

609002-5

내병성

작물육종을

위한

병리검정

지원

농림수산식품부

발간등록번호

11-1543000-000474-01

내병성 작물육종을 위한 병리검정
지원

Screening Center for Disease Resistant
Vegetable Crops

한국화학연구원

주 의
(편집순서 8)

(15 포인트 고딕체열)

↑
6cm
↓

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “내병성 작물육종을 위한 병리검정 지원” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014년 4월 30일

주관연구기관명 : 한국화학연구원
주관연구책임자 : 최 경자
협동연구기관명 : 동아대학교
협동연구책임자 : 이 선우
협동연구기관명 : 한국생명공학연구원
협동연구책임자 : 문 제선
협동연구기관명 : 서울대학교
협동연구책임자 : 강 병철
협동연구기관명 : 서울대학교
협동연구책임자 : 최 도일
협동연구기관명 : 서울대학교
협동연구책임자 : 허 진희
위탁연구기관명 : 강릉원주대학교
위탁연구책임자 : 김 병섭
위탁연구기관명 : KAIST
위탁연구책임자 : 박 현규
위탁연구기관명 : 충북대학교
위탁연구책임자 : 김 흥태
위탁연구기관명 : 부산대학교
위탁연구책임자 : 서 영수

요 약 문

I. 제 목

내병성 작물육종을 위한 병리검정 지원

II. 연구개발의 목적 및 필요성

새로운 계통의 내병성을 검정하는 병리검정은 내병성 작물 육종을 위한 과정 중 가장 우선적으로 필요한 단계이다. 병리검정은 그 방법이 신속, 간편하고 효율적이어야 하며 실험 결과가 정확해야 하는데, 이를 위하여 병리검정 체계의 확립과 아울러 그 기술을 지속적으로 보완 발전시켜 보다 효율적으로 내병성 품종 개발에 기여하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

채소 작물(가지과, 박과, 배추과 작물)의 내병성 육종을 위한 체계적이고 효율적인 병리 검정 체계를 확립하여 육종가에게 병리검정을 지원하였다.

1. 효율적인 *in vivo* 병리검정 체계 확립

가. 균류병에 대한 *in vivo* 병리검정 기술

나. 세균병에 대한 *in vivo* 병리검정 기술

다. 바이러스병에 대한 *in vivo* 병리검정 기술

라. 선충병에 대한 *in vivo* 병리검정 기술

2. 내병성관련 신속·간편 분자마커 검정 기술 확립

가. 고추의 병 저항성관련 분자마커 검정 기술

나. 토마토의 병 저항성관련 분자마커 검정 기술

다. 배추의 병 저항성관련 분자마커 검정 기술

3. 포장 병리검정 체계 확립

가. 배추과 작물 주요 병해에 대한 포장검정 기술

나. 가지과 작물 주요 병해에 대한 포장검정 기술

다. 박과 작물 주요 병해에 대한 포장검정 기술

4. 병리검정 지원

- 가. *In vivo* 병리검정 지원
 - 나. 분자마커 병리검정 지원
 - 다. 포장 병리검정 지원
5. 내병성관련 육종소재 발굴

IV. 연구개발결과

1. 효율적인 *in vivo* 병리검정 체계 확립

가. 23종 균류병에 대한 *in vivo* 병리검정 기술 확립

기주	식물병	병원균
고추/과프리카	역병	<i>Phytophthora capsici</i>
토마토	잎마름역병	<i>Phytophthora infestans</i>
토마토	시들음병	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
토마토	잎곰팡이병	<i>Fulvia fulva</i>
토마토/감자	잿빛곰팡이병	<i>Botrytis cinerea</i>
배추/양배추/무/ 브로콜리	뿌리혹병	<i>Plasmodiophora brassicae</i>
양배추/브로콜리/ 배추	시들음병	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i>
무	시들음병	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>
오이/멜론/호박	흰가루병	<i>Podosphaera xanthii</i>
오이	덩굴썩음병	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>
멜론	덩굴썩음병	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>
오이/수박/멜론	탄저병	<i>Colletotrichum orbiculare</i>

나. 10종 세균병에 대한 *in vivo* 병리검정 기술 확립

기주	식물병	병원균
양배추/배추/무	검은썩음병	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
고추/토마토	꽃마름병	<i>Ralstonia solanacearum</i>
무/배추/양배추	무름병	<i>Pectobacterium carotovorum</i>
수박/멜론	과실썩음병	<i>Acidovorax citrulli</i>

다. 13종 바이러스병에 대한 *in vivo* 병리검정 기술 확립

기주	식물병	병원균
무/배추	TuMV	<i>Turnip mosaic virus</i>
고추/파프리카	PMMoV	<i>Pepper mild mottle virus</i>
오이/고추	CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>
고추	TSWV	<i>Tomato spotted wilt virus</i>
고추/파프리카	PepMoV	<i>Pepper mottle virus</i>
박과 작물	SqMV	<i>Squash mosaic virus</i>
박과 작물	CGMMV	<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i>
박과 작물	WMV2	<i>Watermelon mosaic virus 2</i>
박과 작물	ZYMV	<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>

라. 2종 선충병에 대한 *in vivo* 병리검정 기술 확립

기주	식물병	병원균
토마토	뿌리혹선충병	<i>Meloidogyne incognita</i>
오이	뿌리혹선충병	<i>Meloidogyne incognita</i>

2. 내병성관련 신속·간편 분자마커 검정 기술 확립

가. 고추의 병 저항성관련 분자마커 검정 기술 10종 확립

종류	병원균	유전자	타입	유전자 거리(cM)	
바이러스병	Potyvirus	<i>pvr1</i>	CAPS, HRM	0	
		<i>pvr1²</i>	CAPS, HRM	0	
		<i>Pvr4</i>	SCAR, CAPS	0.1	
		<i>pvr6</i>	CAPS	0	
	TSWV	<i>Tsw</i>	CAPS, HRM	0.1	
	Tobamovirus	<i>L3</i>	CAPS, HRM	0.2	
		<i>L4</i>	CAPS, HRM	0.2	
세균병	CMV	<i>Cmr1</i>	CAPS, HRM	1.5	
		<i>Xanthomonas campestris</i>	<i>Bs2</i>	SCAR, CAPS	1.0
			<i>Bs3</i>	AFLP	0
균류병	<i>Phytophthora capsici</i>	<i>Phyto-5</i>	HRM	1.5	

나. 토마토의 병 저항성관련 분자마커 검정 기술 9종 확립

종류	병원균	유전자	타입	유전자 거리(cM)
바이러스병	TSWV	<i>Sw5</i>	SCAR	0.1
	ToMV	<i>Tm2a</i>	CAPS, HRM	0
	TYLCV	<i>Ty1</i>	CAPS, HRM	0
		<i>Ty2</i>	SCAR	0
		<i>Ty3</i>	SCAR	0
세균병	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Pto</i>	CAPS	0
균류병	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	<i>I-2</i>	CAPS	0
		<i>I-3</i>	HRM	0
선충병	<i>Meloidogyne incognita</i>	<i>Mi</i>	CAPS, HRM	< 0.5

다. 배추의 병 저항성관련 분자마커 검정 기술 1종 확립

종류	병원균	유전자	타입	유전자 거리(cM)
바이러스병	TuMV	<i>trs</i>	SCAR, HRM	0.1

3. 포장 병리검정 체계 확립

가. 배추과 작물 주요 병해 6종에 대한 포장검정 기술 확립

기주	식물병	병원균
배추/브로콜리	뿌리혹병	<i>Plasmodiophora brassicae</i>
무	시들음병	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>
배추	무름병	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>
양배추/브로콜리	검은썩음병	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>

나. 가지과 작물 주요 병해 18종에 대한 포장검정 기술 확립

기주	식물병	병원균
고추	역병	<i>Phytophthora capsici</i>
고추	탄저병	<i>Colletotrichum</i> spp.
고추	흰가루병	<i>Leveillula taurica</i>
토마토	시들음병	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
토마토	잎마름역병	<i>Phytophthora infestans</i>
토마토	잎곰팡이병	<i>Fulvia fulva</i>
토마토	흰가루병	<i>Leveillula taurica</i>
고추/토마토	꽃마름병	<i>Ralstonia solanacearum</i>
토마토	뿌리혹선충	<i>Meloidogyne</i> spp.
가지과 작물	바이러스병	PVX, PVY, TSWV, PepMoV, TMGMV, TMV, CMV-P0, CMV-P1

다. 박과 작물 주요 병해 6종에 대한 포장검정 기술 확립

기주	식물병	병원균
오이/멜론/수박	흰가루병	<i>Podosphaera xanthii</i>
오이/멜론/수박	뿌리혹선충병	<i>Meloidogyne</i> spp.

4. 내병성관련 육종소재 발굴

본 과제에서 확립한 병리검정 기술을 이용하여 다음과 같은 유전자원 1,079계통에 대하여 병리검정을 수행하고 내병성 육종소재 44종을 선발하였다.

작물	식물병	병원균	검정 계통 수	저항성 계통 수
고추	TSWV	<i>Tomato spotted wilt virus</i>	500	2
	CMV-P1	<i>Cucumber mosaic virus-P1</i>	163	9
	뿌리혹선충병	<i>Meloidogyne incognita</i>	103	8
	탄저병	<i>Colletotrichum coccodes</i>	103	2
토마토	꽃마름병	<i>Ralstonia solanacearum</i>	52	10
	흰가루병	<i>Leveillula taurica</i>	9	4
양배추/ 브로콜리	시들음병	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i>	70	9
	뿌리혹병	<i>Plasmodiophora brassicae</i>	70	0
멜론	과실썩음병	<i>Acidovorax citrulli</i>	5	0
배추	무름병	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	4	0
합계			1,079	44

V. 연구성과 및 성과활용 계획

이상과 같은 결과는 새로운 내병성 품종을 개발하는데 있어 필수적인 병리검정 기술을 확립하기 위한 연구이며, 본 과제에서 확립한 병리검정 기술을 이용하여 40여개 종자회사 및 육종학자의 10만여 계통에 대하여 병리검정을 지원하였다.

구 분	의뢰 건수 (개)	<i>In vivo</i> 병리검정 (주)	분자마커 검정 (점)	포장 검정 (계통)
1차년도	40	8,201	1,191	83
2차년도	60	17,600	15,194	235
3차년도	93	24,605	26,056	241
4차년도	91	30,441	22,844	293
5차년도	70	29,071	28,655	71
합계	354	109,918	93,940	923

SUMMARY

I. Title

Screening center for disease resistant vegetable crops

II. Objectives and Importance of the Research

In the process of developing new disease-resistant vegetable crops, it is essential to screen plants based on resistance to their disease. The methods of the screening have to be precise, simple, rapid, and economical.

The objects of this research, therefore, were to establish an efficient screening system and to service screening for the development of disease-resistant cultivar.

III. Contents and Scope of the Research

1. The establishment of efficient *in vivo* assays for disease resistant plants
 - A. *In vivo* assays for resistant plants to fungal diseases
 - B. *In vivo* assays for resistant plants to bacterial diseases
 - C. *In vivo* assays for resistant plants to viral diseases
 - D. *In vivo* assays for resistant plants to nematode diseases
2. The development of simple and rapid assays using molecular markers for disease resistant plants
 - A. Molecular marker assays to detect ten disease resistance genes of chilli pepper plants
 - B. Molecular marker assays to detect nine disease resistance genes of tomato plants
 - C. Molecular marker assays to detect one disease resistance gene of Chinese cabbage plants
3. The establishment of field tests for disease resistant plants
 - A. Field tests for disease resistant crucifer plants
 - B. Field tests for disease resistant solanum plants

- C. Field tests for disease resistant cucurbits plants
- 4. Screening Service
 - A. Service of *in vivo* assays for disease resistant plants
 - B. Service of molecular marker assays for disease resistant plants
 - C. Service of field tests for disease resistant plants
- 5. Selection of disease resistant sources

IV. Results

- 1. The establishment of efficient *in vivo* assays for disease resistant plants

We have established various efficient screening systems for disease resistant plants of vegetable crops including solanum, crucifer and cucurbit.

- A. The development of efficient *in vivo* assays for resistant plants to twenty-three fungal diseases

Crop	Plant disease	Pathogenic fungi
Chili pepper, Paprika	Phytophthora blight	<i>Phytophthora capsici</i>
Tomato	Late blight	<i>Phytophthora infestans</i>
Tomato	Fusarium wilt	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
Tomato	Leaf mold	<i>Fulvia fulva</i>
Tomato, Potato	Gray mold	<i>Botrytis cinerea</i>
Chinese cabbage, Cabbage, Radish, Broccoli	Clubroot	<i>Plasmodiophora brassicae</i>
Cabbage, Broccoli, Chinese cabbage	Fusarium wilt	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i>
Radish	Fusarium wilt	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>
Cucumber, Melon, Squash	Powdery mildew	<i>Podosphaera xanthii</i>
Cucumber	Fusarium wilt	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>
Melon	Fusarium wilt	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>

Cucumber, Anthracnose *Colletotrichum orbiculare*
 Watermelon,
 Melon

B. The development of efficient *in vivo* assays for resistant plants to ten bacterial diseases

Crop	Plant disease	Pathogenic bacteria
Chinese cabbage, Cabbage, Radish	Black rot	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
Chili pepper, Tomato	Bacterial wilt	<i>Ralstonia solanacearum</i>
Chinese cabbage, Cabbage, Radish	Soft rot	<i>Pectobacterium carotovorum</i>
Watermelon, Melon	Bacterial fruit blotch	<i>Acidovorax citrulli</i>

C. The development of efficient *in vivo* assays for resistant plants to thirteen viral diseases

Crop	Plant disease	Pathogenic virus
Chinese cabbage, Radish	TuMV	<i>Turnip mosaic virus</i>
Chili pepper, Paprika	PMMoV	<i>Pepper mild mottle virus</i>
Chili pepper, Cucumber	CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>
Chili pepper	TSWV	<i>Tomato spotted wilt virus</i>
Chili pepper, Paprika	PepMoV	<i>Pepper mottle virus</i>
Cucurbits	SqMV	<i>Squash mosaic virus</i>
Cucurbits	CGMMV	<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i>
Cucurbits	WMV2	<i>Watermelon mosaic virus 2</i>
Cucurbits	ZYMV	<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>

D. The development of efficient *in vivo* assays for resistant plants to two nematode diseases

Crop	Plant disease	Pathogen
Tomato	Root-knot nematode	<i>Meloidogyne incognita</i>
Cucumber	Root-knot nematode	<i>Meloidogyne incognita</i>

2. The development of simple and rapid assays using molecular markers for disease resistant plants

A. The development of molecular marker assays to detect ten disease resistance genes of chilli pepper plants

Kind	Pathogen	Gene	Type	Distance (cM)
Virus	Potyvirus	<i>pvr1</i>	CAPS, HRM	0
		<i>pvr1²</i>	CAPS, HRM	0
		<i>Pvr4</i>	SCAR, CAPS	0.1
		<i>pvr6</i>	CAPS	0
	TSWV	<i>Tsw</i>	CAPS, HRM	0.1
	Tobamovirus	<i>L3</i>	CAPS, HRM	0.2
		<i>L4</i>	CAPS, HRM	0.2
		CMV	<i>Cmr1</i>	CAPS, HRM
Bacteria	<i>Xanthomonas campestris</i>	<i>Bs2</i>	SCAR, CAPS	1.0
		<i>Bs3</i>	AFLP	0
Pseudo-fungi	<i>Phytophthora capsici</i>	<i>Phyto-5</i>	HRM	1.5

B. The development of molecular marker assays to detect nine disease resistance genes of tomato plants

Kind	Pathogen	Gene	Type	Distance (cM)
Virus	TSWV	<i>Sw5</i>	SCAR	0.1
	ToMV	<i>Tm2a</i>	CAPS, HRM	0
	TYLCV	<i>Ty1</i>	CAPS, HRM	0
		<i>Ty2</i>	SCAR	0
		<i>Ty3</i>	SCAR	0
Bacteria	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Pto</i>	CAPS	0
Fungi	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	<i>I-2</i>	CAPS	0
		<i>I-3</i>	CAPS, HRM	0
Nematode	<i>Meloidogyne incognita</i>	<i>Mi</i>	CAPS, HRM	< 0.5

C. The development of molecular marker assay to detect one disease resistance gene of Chinese cabbage plants

Kind	Pathogen	Gene	Type	Distance (cM)
Virus	TuMV	<i>trs</i>	SCAR, HRM	0.1

3. The establishment of field tests for disease resistant plants

A. Field tests for resistant crucifer plants to six diseases

Crop	Plant disease	Pathogen
Chinese cabbage, Broccoli	Clubroot	<i>Plasmodiophora brassicae</i>
Radish	Fusarium wilt	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>
Chinese cabbage	Soft rot	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>
Broccoli, Cabbage	Black rot	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>

B. Field tests for resistant solanaceous plants to eighteen diseases

Crop	Plant disease	Pathogen
Chili pepper	Phytophthora blight	<i>Phytophthora capsici</i>
Chili pepper	Anthracnose	<i>Colletotrichum</i> spp.
Chili pepper	Powdery mildew	<i>Leveillula taurica</i>
Tomato	Fusarium wilt	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
Tomato	Late blight	<i>Phytophthora infestans</i>
Tomato	Leaf mold	<i>Fulvia fulva</i>
Tomato	Powdery mildew	<i>Leveillula taurica</i>
Chili pepper, Tomato	Bacterial wilt	<i>Ralstonia solanacearum</i>
Tomato	Root-knot nematode	<i>Meloidogyne</i> spp.
Solanaceous crops	Viral disease	PVX, PVY, TSWV, PepMoV, TMGMV, TMV, CMV-P0, CMV-P1

C. Field tests for resistant cucurbits to six diseases

Crop	Plant disease	Pathogen
Cucumber, Melon, Watermelon	Powdery mildew	<i>Podosphaera xanthii</i>
Cucumber, Melon, Watermelon	Root-knot nematode	<i>Meloidogyne</i> spp.

4. Selection of resistant genetic resources to various plant diseases

Crop	Plant disease	Pathogen	No of tested lines	No of selected resistance plants
Chili pepper	TSWV	<i>Tomato spotted wilt virus</i>	500	2
	CMV-P1	<i>Cucumber mosaic virus-P1</i>	163	9
	Root-knot nematode	<i>Meloidogyne incognita</i>	103	8
	Anthraxnose	<i>Colletotrichum coccodes</i>	103	2
Tomato	Bacterial wilt	<i>Ralstonia solanacearum</i>	52	10
	Powdery mildew	<i>Leveillula taurica</i>	9	4
Cabbage/ Broccoli	Fusarium wilt	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i>	70	9
	Clubroot	<i>Plasmodiophora brassicae</i>	70	0
Melon	Bacterial fruit blotch	<i>Acidovorax citrulli</i>	5	0
Chinese cabbage	Soft rot	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	4	0
합계			1,079	44

5. Screening service

Research period	No of request	No of tested sample		
		<i>In vivo</i> assay tested (plants)	Molecular marker (line)	Field test (line)
The first year	40	8,201	1,191	83
The second year	60	17,600	15,194	235
The third year	93	24,605	26,056	241
The fourth year	91	30,441	22,844	293
The fifth year	70	29,071	28,655	71
Total	354	109,918	93,940	923

CONTENTS

Chapter I.	Brief Summary of the Project -----	19
Section	1. Object of the Research -----	19
Section	2. Importance of Research -----	19
Section	3. Scope of Research -----	20
Chapter II.	International and Domestic Status of This Technology Development -----	21
Section	1. International status of this technology development	21
Section	2. Domestic status of this technology development --	24
Chapter III.	Scope and Results of Research -----	27
Section	1. The establishment of <i>in vivo</i> assays for resistant plants to fungal diseases -----	27
Section	2. The establishment of <i>in vivo</i> assays for resistant plants to bacterial diseases -----	194
Section	3. The establishment of <i>in vivo</i> assays for resistant plants to viral diseases -----	243
Section	4. The establishment of <i>in vivo</i> assays for resistant plants to nematode diseases -----	269
Section	5. The development of simple and rapid assays using molecular markers for disease resistant plants ---	287
Section	6. Analysis of DNA chip SNP using SDL-PCR -----	340
Section	7. The establishment of field tests for disease resistant plants -----	370
Section	8. Selection of disease resistant resources -----	399
Section	9. Screening service -----	424
Chapter IV.	Accomplishment and Contribution -----	438

Section	1.	Accomplishment -----	438
Section	2.	Contribution -----	446
Chapter V.		Application of the Results -----	448
Chapter VI.		Foreign Science Technology Information Collected During Research -----	474
Chapter VII.		State of the Research Equipments and Instruments	480
Chapter VIII.		References -----	481

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 -----	19
1 절	연구개발의 목적 -----	19
2 절	연구개발의 필요성 -----	19
3 절	연구개발의 범위 -----	20
제 2 장	국내외 기술개발 현황 -----	21
1 절	국외 기술개발 현황 -----	21
2 절	국내 기술개발 현황 -----	24
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 -----	27
제 1 절	균류병 병리검정 체계 확립 -----	27
제 2 절	세균병 병리검정 체계 확립 -----	194
제 3 절	바이러스병 병리검정 체계 확립 -----	243
제 4 절	선충병 병리검정 체계 확립 -----	269
제 5 절	분자마커 병리검정 체계 확립 -----	287
제 6 절	다양한 주요 병 저항성 마커의 신속·정확한 분석을 위한 DNA Chip 기술 개발 -----	340
제 7 절	포장 병리검정 체계 확립 -----	370
제 8 절	내병성관련 육종소재 선발 -----	399
제 9 절	병리검정 지원 -----	424
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	438
제 1 절	목표달성도 -----	438

제 2 절	관련분야에의 기여도 -----	446
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	448
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	474
제 7 장	연구시설·장비 현황 -----	480
제 8 장	참고문헌 -----	481

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 목적

채소 작물의 내병성 육종을 위한 병리검정 체계를 확립하고 병리검정을 지원하는 것을 목표로 한다. 이를 위해 가지과, 박과, 배추과 작물의 내병성 작물 육종을 위한 효과적인 *in vivo* 병리검정 기술을 확립하고, 내병성 관련 고효율 분자마커 검정 기술을 개발하여 내병성 가지과, 박과, 배추과 작물 육종을 위한 체계적인 병리검정 지원센터 구축을 하고자 한다.

제 2절 연구개발의 필요성

우리 농업의 최대 목표는 농가 소득을 도시근로자 소득과 일치시키는 것인데, 우리 농업 중에서 국제경쟁력을 갖출 수 있는 가능성이 비교적 높은 분야가 채소 산업이다. 우리 채소 산업 및 종자 산업을 국제경쟁력 있도록 발전시키기 위해서는 우선적으로 우수한 채소 품종이 지속적으로 개발·보급되어야 한다.

국제 경쟁력이 있는 채소 품종을 위해서는 내병성 품종 종자의 개발이 필수적이다. 이미 선진국에서는 내병성 품종 육성을 위하여 전통육종 기술에 분자육종 기술을 접목하여 우수한 내병성 품종을 개발하기 시작하였다. 전 세계의 많은 종자 회사들 그리고 다국적 종자기업 등이 서로 경쟁하고 있는 현실에서 내병성 등의 혁신적인 장점을 갖춘 품종이 아니면 종자 가격은 거의 정체되어 있다. 2004년에 출시된 한 고추 역병 내병성 품종은 일반 품종의 종자 가격에 비하여 약 2배 이상 높게 형성된 예가 있다. 따라서 1990년대 말에 형성된 후 정체되어 있는 1600억 원 내외의 채소 종자 시장을 확대하고 수출을 증가시키기 위해서는 소비자가 요구하는 내병성 종자 신품종을 개발하는 것이 필요하다.

내병성 육종단계에서 유전자원 확보가 무엇보다 중요하지만, 가장 많은 시간과 경비가 소요되는 단계는 다양한 개체 중에서 우수한 저항성 개체를 선발하는 스크리닝 과정이다. 작물 병리검정은 기반 시설과 전문 인력 그리고 기술이 요구되는 전문분야이다. 하지만 우리나라의 경우 큰 종자회사를 제외하고는 대부분의 중소기업체들과 대학 및 연구소의 경우 자체적으로 다양한 식물병 검정 시스템을 보유하고 있지 않다.

또한 정부에서는 채소산업의 경쟁력을 높이고, 2020년 채소종자 수출 2억 달러를 달성하기 위하여 우수한 신품종 종자를 개발하고자 다양한 연구사업을 통하여 많은 연구비를 투입하고 있어 각 과제 별로 산발적으로 병리검정이 이루어지고 있다. 따라서 채소 종자 산업의 경쟁력을 높이기 위해서는 체계적으로 병리검정을 수행하여 신뢰성 있는 병 저항성 결과를 제공할 수 있는 채소작물 병리검정 지원 센터의 설립이 요구되고 있다.

최근에 생명공학기술이 발달함에 따라 내병성 검정 기술의 떠오르는 중요 분야는 각 식물병에 대한 내병성 분자마커 검정기술이다. 우수한 복합내병성 품종을 개발하기 위해서는 기존의 내병성 품종들을 육종재료로 활용해야 하는데, 분자지표를 이용하여 육종재료가 지니는 내병성 유전인자의 종류와 각 유전인자의 유전자형을 정확히 파악함으로써 결과예측이 가능한 효율적인 교배조합 작성과 후대검정 규모의 예상이 가능하게 된다. 고추분자마커개발사업단과 배추분자마커사업단 등 여러 과제에서는 이러한 내병성 분자마커를 개발하기 위하여 연구하였다. 우리나라의 경우 일부 다국적 기업에서는 분자마커를 이용하여 내병성 육종을 실시하고 있으나, 대다수인 중소기업 및 개인육종가는 정부에서 병리검정지원센터를 설립하여 분자마커검정을 지원

해 주기를 요청하고 있다. 그러나 현재의 검정방법은 매우 비싸고 시간이 많이 걸리기 때문에 기존의 마커를 신속 간편하게 분석할 수 있는 기술의 개발 또한 필요하다.

우리나라 채소종자 산업의 발전을 위해서는 채소종자 품종의 불법 복제를 근절해야 한다. 하나의 품종을 육성하는데 막대한 자금과 시간이 소요되므로 품종의 불법 복제는 종자산업의 근간을 흔드는 일이다. 따라서 내병성 채소작물 육종을 위한 병리검정 지원 사업단은 다른 사업단과 달리 특별히 요구되는 것이 있는데, 일을 위탁하는 회사의 기밀을 철저히 보장할 수 있는 체제를 갖추어야 하며, 근무하는 직원 각자도 철저한 윤리의식으로 무장하는 것이 필요하다. 이와 같은 측면에서 한국화학연구원은 신농약 개발을 위한 스크리닝센터로서 스크리닝 서비스한 경험과 노하우를 갖추고 있으므로 <내병성 작물육종을 위한 병리검정 지원 사업단>을 성공적으로 수행할 수 있었다고 판단된다.

제 3절 연구개발 범위

본 사업단은 그 동안 산발적으로 진행해온 가지과, 박과, 배추과 채소작물의 식물병 내병성 검정을 곰팡이류병, 세균병, 바이러스병 및 선충병 별로 각 세부책임자가 *in vivo* 검정기술을 확립하여 연중 서비스할 수 있는 체계적인 기반을 구축하여 육종가 및 육종학자에 병리검정 서비스를 지원하였다.

본 사업단은 *in vivo* 병리검정뿐만 아니라, 국내외에서 개발된 다양한 내병성 분자마커를 효율적으로 검정할 수 있도록 간편 분자마커 검정 기술을 확립하고 간편·초고속 분석 기술을 활용한 기술 대행 서비스를 위한 기반을 구축하여 효율적으로 육종가에게 지원하였다.

내병성 채소작물 육종을 위한 병리검정 지원 사업단은 내병성 검정을 의뢰하는 회사의 기밀을 유지하는 것이 아주 중요하므로 비밀 유지 및 육종 소재 도난을 대비한 체제를 갖추었다. 또한 근무하는 직원 각자도 철저한 윤리의식으로 무장해야 할 필요가 있다. 따라서 사업단에서는 도난 대비 시설 설치 및 참여연구원에 일정 시간 윤리 교육을 실시하여 이에 대비하였다.

본 사업단 과제에서 개발한 **채소작물의 육종을 위한 병리검정기술**은 본 기술의 실수요자인 종자회사 육종가(개인육종가 포함)를 대상으로 2009년부터 워크샵을 개최하여 지속적으로 교육·지도하였다. 이와 같은 교육 기회를 통하여 우리나라 육종회사의 품종 개발 경쟁력을 강화하게 되고 이를 통해 국내 종자회사의 국제 경쟁력을 강화할 수 있었다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절. 국외 현황

세계 종자시장 규모는 약 780억 달러(2011년 기준)로 2001년 이후 연평균 10% 이상의 고성정 중이다. 이 중 농작물 종자시장은 53%인 450억 달러인데, 이 중 곡물 종자가 79%, 채소 및 화훼 종자가 17% 그리고 사료 및 목초 종자가 14%를 차지하고 있다. 주요 선진국은 일찍부터 종자산업의 중요성을 인식하고 유전자원 확보와 첨단 생명공학을 이용한 신품종 개발에 역점을 두어 왔다. 따라서 종자산업 선·후발국 간에 유전자원의 확보 및 이용을 위한 경쟁이 심화되고 신품종보호권 등은 국가 간 쟁점으로 대두되고 있다. 세계 11대 종자 회사의 국적과 매출액은 Table 1과 같다.

Table 1. 세계 11대 종자 회사의 국적과 모기업의 주력 사업 및 매출액 (한국채소종자산업발달사, 박효근 등, 2008년)

순위	회사명	국적	주 사업	매출액(억 달러)
1	Monsanto+Seminis	미국	제약, 종자	28.03
2	Pioneer(Dupont)	미국	제약, 농약	26.00
3	Syngenta	스위스	제약, 농약	12.39
4	Groupe Limagrain	프랑스	종자	10.44
5	KWS AG	독일	종자	6.22
6	Land O'Lakes	미국	종자	5.38
7	Sakata	일본	종자	4.16
8	Bayer Crop Science	독일	제약, 종자	3.87
9	Takii	일본	종자	3.66
10	DLF-Trifolium	네덜란드	종자	3.20
11	Delta & Pine Land	미국	종자(면화)	3.15

60년대와 70년대의 녹색혁명은 전통육종의 성과였으나, 최근 식물 유전학은 혁명적인 발달을 이룩하였고 전통육종 기술에만 의존한 품종 개량은 이제 한계에 다다랐다. 애기장대와 벼의 게놈을 완전 해독하였고, 현재 옥수수, 토마토, 두과 작물의 염기서열 해독은 진행 중에 있으며, 담배, 토마토, 감자 등 다양한 작물의 형질전환이 성공적으로 이루어지고 있다. 기능유전체학이 발달하게 되어 다양한 유전정보가 제공되고 있고, 전통육종에 분자마커를 활용한 선발 기술과 유전자 조작기술 등의 첨단 기술을 활용한 분자육종의 접목이 이루어지고 있어 이를 통한 작물의 품종개발이 시작되고 있다.

채소 신품종 육종에 있어 가장 큰 핵심요소는 내병성 육종으로, 선진국에서는 *in vivo* 병리검정 스크리닝과 마커 검정을 지원해 주는 전문회사 또는 연구기관이 있다. 내병성 육종을 위한 병리검정은 기존에는 *in vivo* 병리검정이 주된 방법이었으나, 분자마커를 이용한 선발 기술을 이용하면 품종개발 연한을 단축하고 우량개체 선발의 효율이 극대화되므로 이 분자마커를 활용한 선발기술의 중요성이 크게 부각되고 있다.

최근에는 유전공학의 발달로 내병성 관련 분자마커가 많이 개발되고 있다. 다국적 종자회사들을 중심으로 자체 마커 개발 기술과 High-throughput(HT)-MAS(marker assisted

selection) system 확립에 많은 투자가 이루어지고 있다. 네덜란드의 경우에는 민간 육종회사들이 육종 효율을 극대화하기 위하여 Keygene이라는 분자마커 개발 전문회사를 설립하고 성공적으로 운영하고 있다. 현재 프랑스와 일본의 육종회사도 공동 투자하여 분자마커를 개발하고 활용하고 있다.

토마토 유전체는 국제적인 consortium을 구성하여 미국의 NSF의 지원 하에 Cornell 대학 연구팀의 주도로 이루어지고 있는데, 이미 6,000여개의 RFLP, SSR, CAPS 마커들로 구성된 12개 염색체의 physical map에 관한 상세 정보가 Solanaceae Genome Network (SGN)을 통해 세계적으로 공유되고 있다.

미국의 USDA는 유전체 분석이 진행된 작물이나 마커 정보가 많이 축적된 작물을 대상으로 분자육종 기술을 개발하기 위한 연구를 수행하고 있다. 토마토의 경우는 Ohio 주립대학을 중심으로 SNP 마커를 개발하는 연구를 추진 중이며 개발된 SNP 마커는 홈페이지에 공개하고 있다. 민간 육종회사는 대부분의 분자마커를 SNP 마커 형태로 전환하여 사용하고 있으며 분자마커 검정 과정의 대부분을 자동화하여 연간 수십만 개의 분석 능력을 갖추고 있다.

토마토의 경우, 타 작물에 비하여 다양한 분자마커들이 개발되어 있어 해외의 유명 종묘회사들의 육종프로그램에서 토마토의 분자마커 활용도는 다른 과채류보다 높은 실정이다. 현재 19개 이상의 복합내병성, 기능성 등에 관한 분자마커를 이용한 선발이 종자회사나 정부 연구기관에 의해 크게 활용되고 있다. 따라서 선진 외국회사에서 개발된 대부분의 토마토 내병성 품종은 최소한 5종(*Mi*, *Cf*, *Tm2*, *Ve*, *I* 등) 이상의 내병성 유전자를 가지고 있다. 토마토의 경우, 내병성 관련 활용 가능한 분자마커는 Table 2와 같다.

Table 2. 토마토 내병성에 대한 분자마커 개발 현황

식물병	병원균	유전자	마커타입	유전자와의 거리
바이러스				
얼룩시들음병	<i>Tomato spotted wilt virus</i>	TSWV (<i>Sw5</i>)	SCAR	0.1 cM
토마토 모자이크바이러스	<i>Tomato mosaic virus</i>	ToMV (<i>Tm2a</i>)	CAPS	0.1 cM
화잎말림바이러스	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	Ty (<i>Ty-1</i>)	CAPS	
		Ty (<i>Ty-2</i>)	SCAR	
		Ty (<i>Ty-3</i>)	SCAR	
세균				
꽃마름병	<i>Ralstonia solanacearum</i>	B, Rs (<i>Bwr-Q</i>)		
세균성반점병	<i>Pseudomonas syringae</i>	Pst, Pto	CAPS	유전자
세균성점무늬병	<i>Xanthomonas campestris</i>	Bs, Xcv (<i>Bs4</i>)	CAPS	유전자
곰팡이				
잎곰팡이병	<i>Fulviia fulva</i>	LM, Ff (<i>C9</i>)	SCAR	유전자
시들음병	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	F2 (<i>I-2</i>)	CAPS	유전자
		F3 (<i>I-3</i>)	CAPS	유전자
반쪽시들음병	<i>Verticilium dahliae</i>	V, Vd (<i>Ve-1</i>)	SCAR	0.6 cM
갈색뿌리썩음병	<i>Pyrenochaeta lycopersici</i>			유전자
줄기마름병	<i>Alternaria alternata</i>	Asc, Aal	CAPS	유전자

(겉무늬병) 흰가루병	<i>Leveillula taurica</i>	(<i>Asc-1</i>) Lt (<i>Lv</i>)	CAPS	0.4
	<i>Oidium lycopersici</i>	Oi (<i>Oi-qt1,3</i>)	CAPS, SCAR	QTL
선충 뿌리혹선충병	<i>Meloidogyne incognita</i>	N. Mi (<i>Mi</i>)	CAPS	<0.5 cM

고추의 경우, 분자마커 개발을 주도하고 있는 나라는 미국, 프랑스, 이스라엘, 한국 등이며 중국, 일본, 인도, 멕시코, 스페인, 헝가리 등에서도 제한적인 연구가 진행되고 있다. 미국의 경우, 코넬대학교에서는 토마토 유전체 연구를 바탕으로 고추 유전자지도 개발, 병저항성 유전자 마커개발 등의 연구를 주도하여 왔다. 그리고 뉴멕시코대학의 Chile Institute는 유전자원센터를 설립하여 전 세계 유전자원을 수집·관리하고 있다. 프랑스 정부연구소인 INRA에서는 고추 유전자 지도 작성, 역병 및 바이러스병 저항성 마커개발 등의 연구를 수행하고 있으며, 특히 역병에 대한 연구는 전 세계에서 가장 앞서있다.

병 저항성 관련 DNA 마커는 각 병원균에 대한 병 저항성이 발견되어 고추 품종에 도입되어 있다. 고추의 병 저항성 관련 분자마커 개발 현황은 Table 3과 같다.

Table 3. 고추 내병성에 대한 분자표마커 개발 현황

형질	유전자	분자마커	유전자와의 거리	개발 기관	비고
Potyvirus 저항성	<i>pvr1</i> ,	CAPS	0.0	코넬대(미국)	
Potyvirus 저항성	<i>pvr1</i> ²	CAPS	0.0	코넬대(미국)	
Potyvirus 저항성	<i>pvr1</i> ²	CAPS	0.0	코넬대(미국)	
Potyvirus 저항성	<i>Pvr4</i>	AFLP, CAPS	2.1	코넬대(미국)	
Potyvirus 저항성	<i>pvr6</i>	RFLP	0.0	코넬대(미국)	
TSWV 저항성	<i>Tsw</i>	RAPD	3.4	코넬대(미국)	
TSWV 저항성	<i>Tsw</i>	RAPD/CAPS	0.9	INRA(프랑스) 서울대	
선충저항성	<i>Me3/Me4</i>	AFLP	0.5	INRA(프랑스)	
TMV 저항성	<i>L</i>	RFLP	6	서울대	
CMV 저항성	<i>Cmr1</i>	CAPS	1.5	서울대	
세균성점무늬병 저항성	<i>Bs2</i>	AFLP	1	버클리대(미국)	
세균성점무늬병 저항성	<i>Bs3</i>	AFLP	0.0	서울대, 원예연	

배추의 경우, 우리나라 육종 기술은 다른 나라에 비하여 월등히 진보되어 있다. 특히 배추 일대잡종 채종에 관련된 자가불화합성을 이용한 육종기술은 세계적인 수준이다. 육종 연한을 단축하기 위한 배추 반수체 육종기술은 어느 정도 체계화되어 실용화 하고 있으나, 유전형에 따라 차이가 많은 단점이 있다. 소포자 이용기술은 Lichter가 1982년에 유체의 약에서 분리

한 소포자를 배양하여 반수성 식물을 얻는데 성공했다. 배추의 유전체 등 생명공학 기술에 관하여 살펴보면, 미국 위스콘신대학 등에서 배추 유전자 지도를 작성하고 있으며, 노르웨이 스완슨 그룹과 미국 코넬대학에서 배추 원형질체 융합 연구와 유전자 클로닝, 형질전환 등의 연구가 진행되고 있다. 1997년 미국의 코넬대학에서는 배추 무름병 내병성 집단을 육성한 바 있다. 그리고 국립원예특작과학원 김기택 박사팀에서 뿌리혹병 내병성 분자마커 개발을 진행하고 있다.

박과 채소의 경우, 멜론에 대한 분자마커는 많이 개발되어 있으나 상대적으로 오이, 수박이나 호박에 대한 연구는 매우 미미한 실정이다.

제 2절. 국내 현황

2011년 우리나라의 채소종자 시장 규모는 2,337억 원이고, 이중 내수는 약 85%인 1,977억 원이고 수출은 360억 원에 불과하다. 종자 산업은 농업 분야에서 기술집약적인 고부가 가치 산업이므로, 국토가 좁고 자원이 빈약하지만 우수한 인력을 보유하고 있는 우리나라에 적합한 산업분야이다. 앞으로 채소 종자 산업은 Well-Being 소비 경향과 생명공학기술의 발달에 따라 발전 가능성이 매우 크다.

우리나라 채소 종자의 경우 국내육성 품종 점유율이 거의 90%로 매우 높는데, 물론 이는 5대 식량 작물과 약용 작물, 전매 작물에 비하면 다소 낮으나, 사료작물, 과수류, 화훼류, 버섯류 및 해조류에 비하면 월등히 높다. 또한 우리나라 채소 품종들은 1973년 대 이래 1대 잡종으로 전환되어 현재는 채소작물의 종자 갱신율이 거의 100%이다.

우리나라의 경우, 채소 종자 산업만이 유일하게 ‘완전 민간 주도형’으로 발전해 왔다. 한국종자협회에는 54개의 회사가 등록되어 있으나, 개인사업자를 포함하여 국내에서는 약 200여 개의 종자회사가 있는 것으로 추정되고 있다. 민간 주도형 채소육종은 1960년대 초반부터 시작되었으며 그 이후 품종 육성은 이들 회사의 주 업무가 되었다. 무, 배추, 고추 등 일부 채소 종자의 경우에는 육종기술면에서 선진국 수준에 도달해 있고, 우리나라는 전 세계 채소 재배 면적의 68%를 차지하고 있는 아시아권 채소시장의 중심적 위치에 있기 때문에 지속적인 연구를 진행할 경우 종자강국으로 부상할 가능성이 있다. 그러나 국제 시장에서의 경쟁이 날로 치열해 지고 있기 때문에 지속적으로 경쟁력을 높여가지 않으면 언제 다른 나라에 추월당할지 모르는 위치에 있다.

우리나라의 경우, 무(일본), 배추(중국) 및 고추(인도, 인도네시아) 등은 종자를 수출하고 있지만, 토마토, 양파 및 시금치는 일본에서 수입하고 있는 실정이다. 우리 채소종자 산업의 2007년도 종자 수출액은 2,000만 달러를 넘었고, 수입은 약 500만 달러 수준으로 수출 초과가 1,500만 달러에 이르고 있다. 우리 정부에서는 2015년의 종자 수출을 1억 달러로 목표를 정하고, 이 가운데 80%인 8,000만 달러를 채소종자 수출로 달성하기 위한 장기 계획을 수립하고 있다. 하지만 세계 종자 시장에서 수출을 확대하기 위해서는 세계적으로 많이 선호하는 작물인 토마토, 브로콜리, 양파 등의 종자 시장에서 경쟁력을 갖추거나, 우수한 내병성 품종의 종자를 개발하는 것이 필요하다. 2005년 채소종자 수출금액은 Fig. 1과 같다.

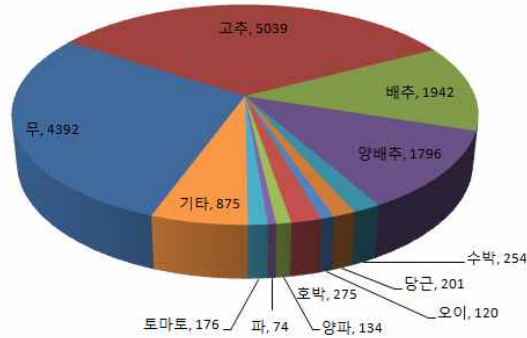


Fig. 1. 채소종자 수출금액 (2005년, 천 US\$)

우리나라는 1997년 <종자산업법>이 제정되기 전까지는 우리나라에 종자 육성자 권리를 보장해 주는 법적 제도적 장치가 없었다. 이는 품종 개발을 저해하고 종자 시장 확대를 저해하는 요소가 되었다. 그러나 1997년 이후에는 <종자산업법> 덕분에 개발된 종자가 품종 보호를 받고 있으며, 현재는 국립종자원에 등록된 품종보호권 등록 품종수는 2,126개에 달한다 (Table 4). 여기에는 국내 판매를 목적으로 하는 화훼류 등 많은 외국 품종도 포함되어 있다.

Table 4. 국립종자원 품종보호권 등록 현황(2008년 1월)

작물구분	작물수	품종수	작물별 품종수
식량	12	456	벼(182), 보리(65), 콩(86), 옥수수(43), 감자(33), 밀(18), 팥(1), 녹두(2), 고구마(17), 완두(3), 강낭콩(3), 귀리(3)
채소	15	284	무(45), 배추(47), 고추(60), 토마토(10), 오이(23), 참외(11), 멜론(4), 수박(33), 호박(14), 상추(27), 시금치(1), 기타(7)
과수	5	98	사과(25), 배(23), 복숭아(36), 포도(8), 참다래(6)
화훼	30	1151	장미(431), 국화(221), 비모란(61), 거베라(62), 백합(46), 페튜니아(46), 카네이션(11), 포인세티아(29), 글라디올러스(24), 무궁화(13), 기타(207)
특용	14	108	참깨(27), 들깨(28), 땅콩(27), 구기자(5), 인삼(8), 유채(2), 울무(2), 맥문동(1), 당귀(2), 황기(1), 기타(5)
사료	3	10	라이그라스(4), 오차드그라스(5), 호밀(1)
버섯류	2	19	느타리(17), 큰느타리(2)

육종 단계별로 볼 때 유전자원의 확보가 무엇보다도 중요하지만, 내병성 채소 품종을 개발하는데 있어 가장 많은 시간과 경비가 소요되는 단계는 다양한 개체 중에서 우수한 저항성 개체를 선발하는 스크리닝 과정이다. 그런데 우리나라 종자회사 중 신젠타종묘, 몬산토코리아, 동부팜한농, 농우바이오, 농협NH종묘센터, 마이엘크롭사이언스 등 비교적 규모가 큰 종자회사의 경우 자체적으로 다양한 식물병 스크리닝 시스템을 보유하고 있을 정도로 인력이 충분히 있는 것으로 판단된다. 하지만 대부분의 중소기업체들과 대학 및 연구소의 경우 자체적으로 표준 식물병원균 및 발병 기술을 보유하기는 어려운 실정이므로 내병성 신품종이 개발되고 있으나 병리검정이 전문적으로 이루어지지 못하고 있다.

이러한 종자회사의 요구를 수용하기 위하여 2006년 (구)원예연구소 원예생명공학과에 원예육종지원센터가 설립되었으나 예산 및 인력 부족 등의 이유로 인하여 현재 실질적인 서비스가 이루어지지 않고 있다.

일부 국내 다국적 종자회사의 경우, 미국, 유럽에서 개발된 몇 가지 병저항성 분자마커를 이용하여 내병성 육종라인을 선발하고 있으나 일반 종자회사에는 공개하지 않고 있다. 그 밖에 큰 종자 회사의 경우에도 내병성 관련 분자마커 검정은 다른 전문회사에 의뢰하여 하는 경우가 대부분 이다.

국립농업과학원 농업유전자원센터에서는 종자은행에 수집 보존된 유전자원의 재배 특성 및 병해충 저항성 검정을 통하여 신품종 육종에 유용한 유전자원을 선발하는 연구를 수행하였다. 그리고 충남대 배추분자마커연구사업단(사업단장 임 용표 교수)에서는 과거에 전통육종방식에 유전정보를 이용한 분자마커 개발을 통한 분자육종 기술 체계를 접목시킴으로써 맞춤형 우수 배추 품종을 개발하고자 하는 연구를 진행하였다. 한편, FnP 고추분자마커사업단(사업단장 김 신제 박사)에서는 고추를 대상으로 배추분자마커사업단과 유사한 연구를 수행하였다. FnP는 또한 고추에서 오이 모자이크 바이러스와 담배 모자이크 바이러스 저항성 식물체 선별 마커 개발에 성공하여 일부회사에 서비스를 하고 있다. 박과 채소의 경우에는 앞서 언급한 회사에서 조차 분자마커를 활용하고 있지 못한 실정으로 이를 활용하기 위한 연구와 기반이 구축되어야 한다.

서울대학교는 그동안 첨단학문 분야와 실용 육종학 분야를 연결하기 위한 많은 연구를 수행하여 왔는데, 대표적인 성과로는 분자마커를 이용한 고추의 유전자 연관군 지도 작성, 병저항성 등 다양한 분자마커 개발, 거대염색체 유전자 은행(BAC library) 구축 등이 있다. 2004년부터는 가지과작물 유전체 국제협력사업에 참여하여 고추와 토마토의 제 2번 염색체에 대한 염기서열 분석을 진행하고 있다. 즉, 분자마커 개발 및 이용을 위한 유전체기술 인프라에 있어서는 국제적으로도 앞서 있다.

한국화학연구원에서는 지난 30여 년간 합성농약, 천연물농약 및 미생물농약 개발을 위하여 20개 이상의 식물병에 대하여 *in vivo* 스크리닝 시스템을 확립하였으며, 이중 벼 도열병, 벼 잎집무늬마름병, 토마토 역병, 토마토 잿빛곰팡이병, 고추 탄저병, 밀 붉은녹병, 보리 흰가루병, 및 배추 뿌리혹병 등 8가지 식물병에 대해서는 365일 지속적으로 검정할 수 있는 시설, 장비, 기술 및 인력을 갖추고 있다. 이러한 기반 시설을 및 기술을 바탕으로 국내에서 개발된 신농약의 대부분에 기여하여 왔으며, 최근에는 천연물농약 및 미생물농약을 개발하는 등 많은 업적을 도출한 바 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절. 균류병 병리검정 체계 확립

1. 고추 역병 저항성 병리검정 기술 체계 확립

가. 효율적인 병리검정 기술 체계 확립

(1) 고추역병균주 동정

o 정확하게 동정된 고추역병 균주를 고추 역병 저항성 스크리닝에 사용하기 위하여 *Phytophthora capsici*에 특이적인 primer를 사용하여 nested PCR하여 고추 역병균을 동정하였다.

o 재료 및 방법

Potato dextrose broth(PDB)에 4일간 액체배양(25°C, 150 rpm)한 *Phytophthora capsici* JHAI 1-7균주 현탁액을 멸균된 filter paper로 걸러내어 균사를 수확하였다. 수확한 균사는 멸균수에 현탁한 후 원심분리(11,000 g, 10 min)하여 상층액을 버리고 같은 방법으로 수차례 세척하였다. 세척된 균사는 동결건조 하였다. 동결건조된 균사는 멸균된 이쑤시개를 이용하여 완전히 파쇄하여 DNA kit(Nucleospin[®])를 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 멸균수를 이용하여 10배 희석하였다. PCR Premix(Maxime PCR Premix 20 μ l/ iNtRON Biotechnology,INC)에 희석된 DNA 1 μ l, Primer ITS4(5-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3), TIS6(5-CAG CGA AAC GCG ATA TGT AG-3)를 10 pmol/ul 농도로 각각 1 μ l, DDW 17 μ l를 첨가하여 PCR를 실시하였다. PCR의 condition은 다음과 같다. 1 cycle : denaturation 95°C 5분, 30 cycle : denaturation 95°C 30초 annealing 56°C 30초, extension 72°C 1분, 1 cycle : extension 72°C 5분으로 실시하였다. PCR product는 1 % agarose gel에서 30분간 100 v 로 영동하여 1XTris Etbr에 20분 동안 염색한 뒤에 electrophoresis로 확인하였다. PCR product를 이용하여 nested PCR 실행하였다. PCR Premix에 PCR product 1 μ l, *P. capsici*에 특이적인 Primer CAPFW(5' TTT AGT TGG GGG TCT TGT ACC 3'), CAPRV2(5' TAC GGT TCA CCA GCC CAT CA 3') 10 pmol/ul 농도로 각각 1 μ l, DDW 17 μ l를 첨가하여 PCR를 실시하였다. PCR의 condition은 1 cycle : denaturation 95°C 5분, 30 cycle : denaturation 95°C 30초 annealing 58°C 30초, extension 72°C 1분, 1 cycle : extension 72°C 5분으로 실시하였다. PCR product는 1% agarose gel에서 30분간 100 v 로 영동하여 1X Tris Etbr에 20분 동안 염색한 후 electrophoresis로 밴드를 확인하였다.

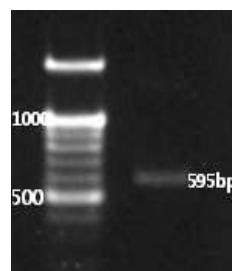


Fig. 1. JHAI 17균주의 nested PCR의 595 bp product

o 결과 및 고찰

기존 논문에서와 같이 *P. capsici*의 특이적인 primer를 사용하여 595 bp 위치에서 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 1). 따라서 분리한 JHAI 1-7균주는 *P. capsici*로 동정할 수 있었다.

(2) 고추 생육시기에 따른 품종별 고추 역병 저항성

o 6종의 고추품종 및 라인(부강, PR파워, PR사대천왕, PR다따, 역강홍장군, CM334)의 생육시기 및 접종원의 농도에 따른 고추 역병에 대한 저항성을 검증하기 위하여 실험하였다.

o 재료 및 방법

50 ml 일회용 포트에 원예용상토를 넣고 6종의 고추품종을 파종하였다. 파종 후 온실에서 고추의 2엽기(2엽이 완전 전개된 고추), 6엽기(6엽이 완전 전개된 고추), 1차 분얼기 까지 재배한 후 각각 고추 역병균을 접종하였다. 6엽기 식물체 부터는 200 ml 포트에 이식하였다. 고추 역병균은 앞에서 동정한 *P. capsici* JHAI 1-7균주를 사용하였다. Oat meal agar(OMA) 배지에 1주일간 배양된 병원균의 기중균사를 제거하고 광을 처리(24 hr, 25°C)한 뒤 4°C 멸균수로 수확하여 1시간 동안 4°C에 보관하여 유주자를 방출시켜 접종하였다. 접종원의 농도는 3×10^3 , 1×10^4 , 3×10^4 sporangia/ml로 3가지로 하였고, 2엽기 식물체는 각 농도별로 포트 당 5 ml, 6엽기와 1차 분얼기 고추는 포트 당 20 ml 씩 soil drenching 방법으로 접종하였다. 접종된 고추는 1일 동안 dew chamber(25°C)에 보관 후 항온실(25°C)에서 광 처리(12 hr/day)하며 병 발생을 관찰하였다. 고추 역병 병조사는 다음과 같은 발병지수로 달관조사 하였으며, 이병율로 환산하였다. 0: 병징이 나타나지 않음, 1: 잎이 처지고 뿌리쪽 줄기에 병징이 나타나기 시작, 2: 잎이 마르고, 뿌리쪽 줄기의 병징이 진전되어 식물체의 60%가 시듦, 3: 식물체가 완전히 고사.

o 결과 및 고찰

- 부강품종은 고추 역병에 대해 감수성이라 판단되고, PR사대천왕, PR다따, 역강홍장군은 중도 저항성, PR파워, CM334는 고추 역병균에 대해 저항성이라 판단된다.
- 접종원의 농도가 낮아질수록 이병율이 낮아지고 고추의 생육단계가 진행될수록 고추역병균에 대한 저항성이 높아졌다.
- 접종원 농도를 3×10^3 sporangia/ml로 하였을 때(Fig. 2) 부강품종은 2엽기에서 이병율이 100%였고 성장 할수록 이병율이 낮아졌다. 또한 중도저항성이라 생각되었던 PR 사대천왕과 PR다따에서는 이병율이 매우 낮았고, 역강홍장군의 2엽기와 6엽기에서 발병되었다. 저항성 품종인 PR파워와 CM334는 발병이 되지 않았다.
- 접종원의 농도가 1×10^4 sporangia/ml이었을 때(Fig. 3) 감수성 품종인 부강의 실험에 사용된 모든 생육단계에서 병이 활발히 발생되었고, 중도 저항성 품종인 역강홍장군, PR다따, PR사대천왕은 2엽기 식물체에서 병 발생이 활발히 진행되었으나 생육단계가 높아질수록 이병율은 감소하였다. 저항성 품종인 PR파워는 2엽기와 6엽기에 낮은 이병율을 보였으나 1차 분얼기 때에는 발병되지 않았다. CM334는 전 생육단계에서 발병이 이루어지지 않아 강한 저항성을 가진 것을 생각된다.
- 접종원의 농도를 3×10^4 sporangia/ml로 하였을 때(Fig. 4) CM334를 제외한 전 품종에서 병이 활발히 발생되었다. PR사대천왕과 PR다따는 2엽기와 6엽기에서 50%이상의 이병율을

나타냈으며, PR사대천왕은 2엽기에서 100% 이병율을 나타내었다. 이병율이 50% 이상일 경우에는 병발생이 진전될 가능성이 높기 때문에 품종간의 차이를 확인하기 어렵다고 생각된다.

- 3×10^3 sporangia/ml 농도로 접종하였을 때 전 품종에서 이병율이 낮아 품종간의 저항성 차이를 확인하기 어렵고, 3×10^4 sporangia/ml 농도로 접종하였을 때 전 품종에서 이병율이 높아 저항성의 차이를 확인하기 어렵다고 판단된다. 또한 6엽기 이후의 식물은 저항성이 높아져 저항성 품종과 중도저항성 품종간의 차이를 명확히 확인할 수 없었다(Fig. 5). 따라서 고추의 생육단계가 2엽기(2엽이 완전히 전개된 고추)일 때 품종별 저항성의 차이를 확인하기에 용이하다고 판단된다.

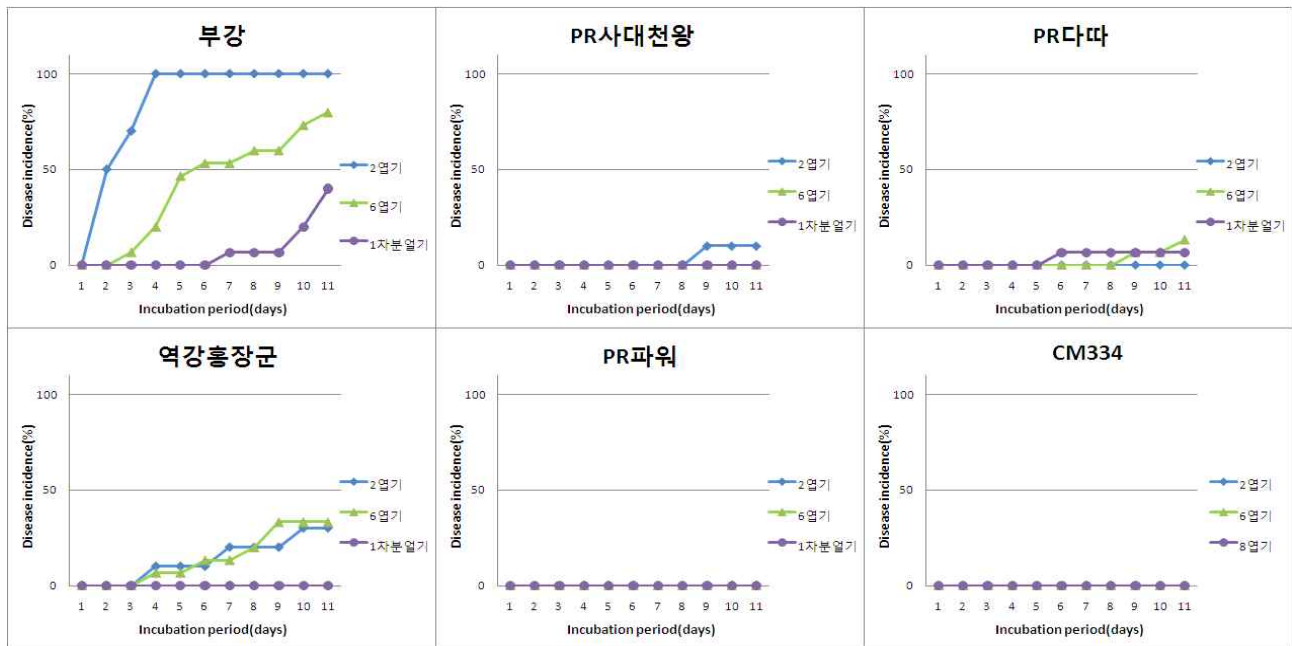


Fig. 2. 고추의 생육시기에 따른 고추 역병 이병율(3×10^3 sporangia/ml)

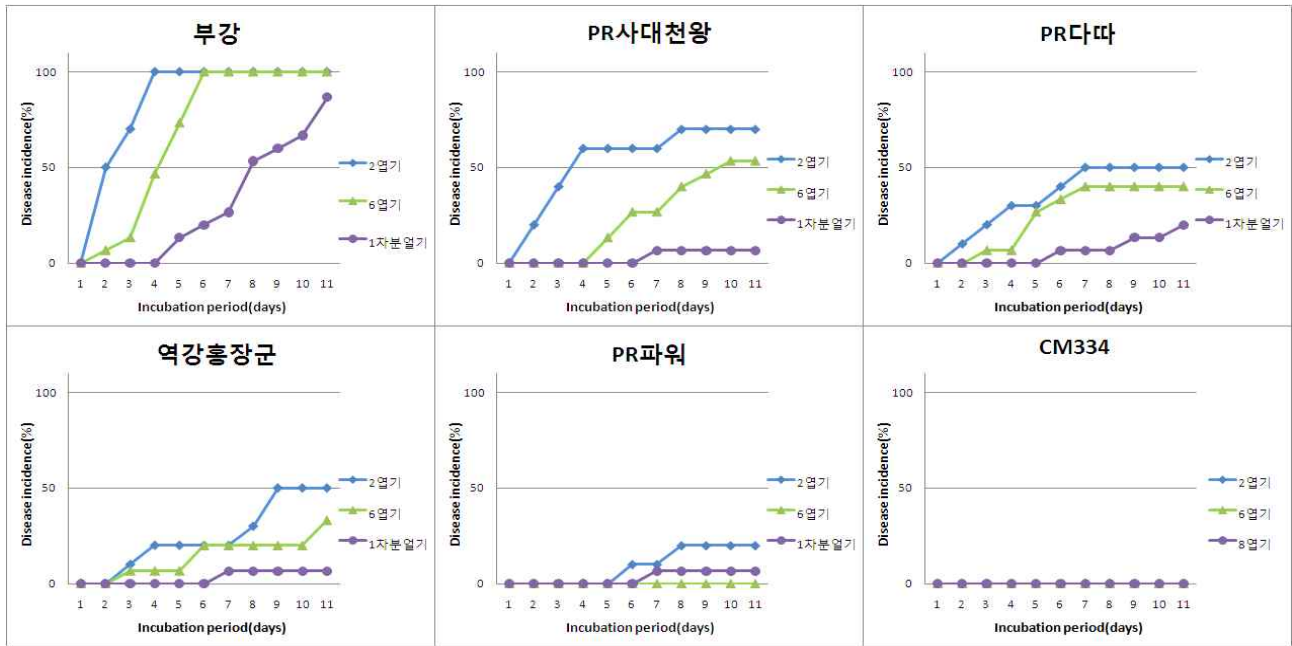


Fig. 3. 고추의 생육시기에 따른 고추 역병 이병율(1×10^4 sporangia/ml)

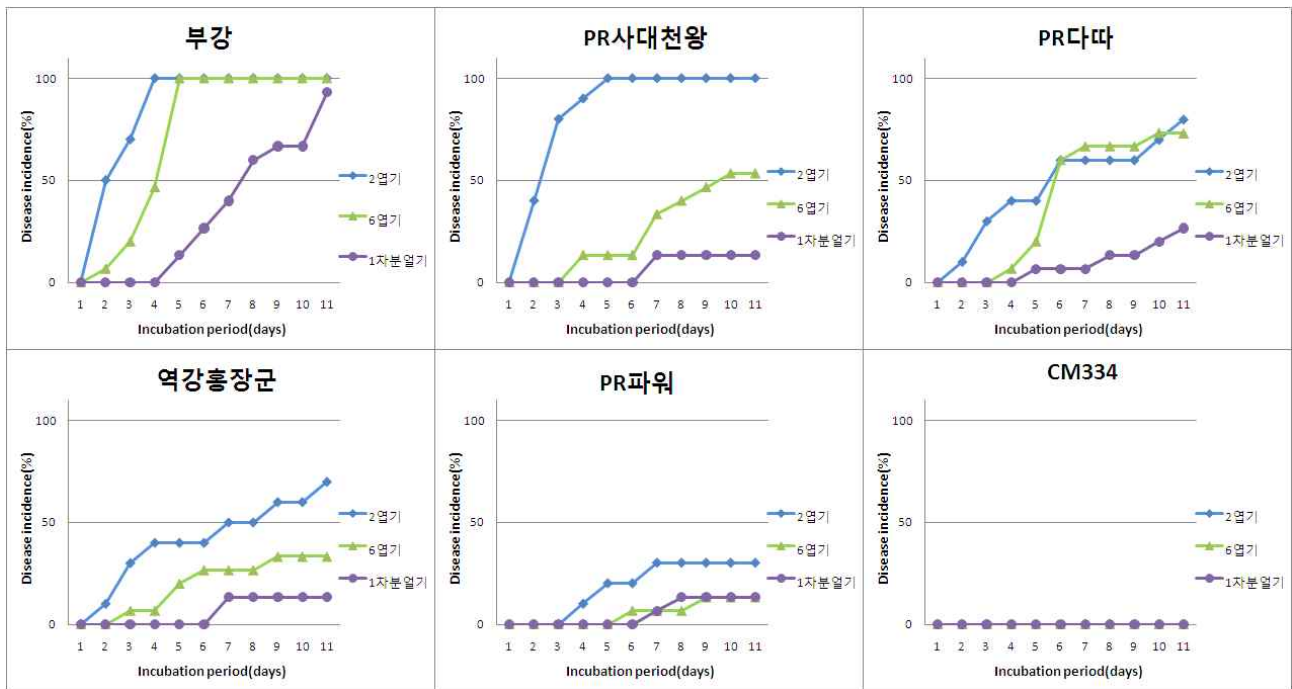


Fig. 4. 고추의 생육시기에 따른 고추 역병 이병율(3×10^4 sporangia/ml)

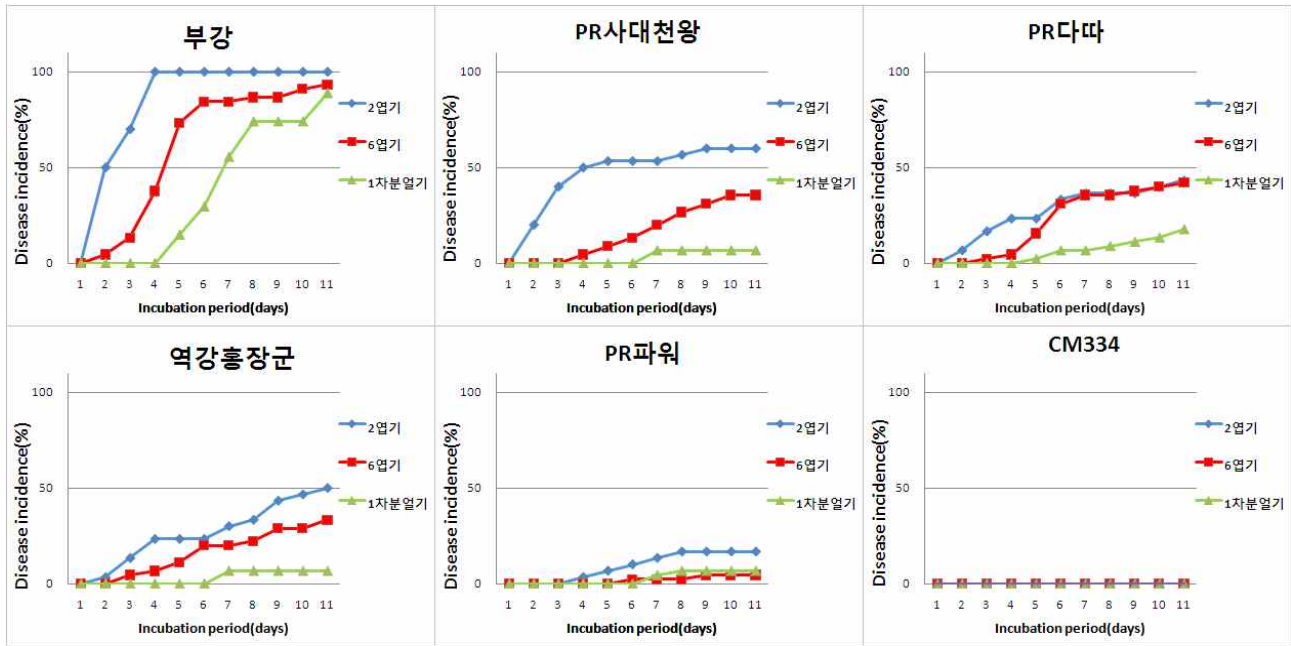


Fig. 5. 고추의 생육시기에 따른 고추 역병 이병율(접종원 농도 통합)

(3) 접종 농도에 따른 품종별 고추 역병 저항성

o 8종의 고추품종(부강, PR파워, PR사대천왕, PR다따, 역강홍장군, 독야청청, 무한길주, CM334)을 이용하여 접종원의 농도에 따른 고추 역병에 대한 저항성을 검증하여 스크리닝에 사용될 고추 역병균의 접종농도를 정하기 위하여 실험하였다.

o 재료 및 방법

50 ml 포트에 원예용상토를 담아 8종의 고추품종을 파종하였다. 파종 후 고추의 2엽기, 6엽기, 1차 분얼기 때 각각 고추 역병균을 접종하였다. 이때 2엽기 및 6엽기는 2엽 및 6엽이 완전히 전개되었을 때 2엽기 및 6엽기라 칭하였고 2엽기 접종 후 식물체는 200 ml 포트에 이식하였다. 접종원의 농도는 3×10^3 , 1×10^4 , 3×10^4 sporangia/ml 3가지로 하였고, 2엽기 식물체는 각 농도별로 포트 당 5 ml, 6엽기와 1차 분얼기 때에는 포트 당 20 ml 씩 soil drenching 방법으로 포자 현탁액을 접종하였다. 접종된 고추는 1일 동안 dew chamber(25°C)에 보관 후 항온실(25°C)에 두어 광처리(12 hr/day)하며 병을 관찰하였다.

o 결과 및 고찰

- 실험에 사용된 모든 품종의 이병율은 접종원의 농도와 비례하여 나타났다(Fig. 6).
- 3×10^3 sporangia/ml 의 농도로 접종하였을 때 부강을 제외한 대부분의 품종에서 거의 발병되지 않았고, 3×10^4 sporangia/ml 의 접종농도는 CM334를 제외한 모든 품종에서 발병되었고 저항성에 따라 발병정도가 조금씩 차이는 있었으나 스크리닝에 사용되기는 적합하지 않은 농도인 것으로 판단된다.
- 1×10^4 sporangia/ml의 농도로 접종하였을 때에는 감수성 품종인 부강에서 100% 이병율을

보였고 중도저항성 품종인 PR사대천왕, PR다따, 역강홍장군에서 40, 40, 17% 이병율을 각각 나타냈고 저항성 품종인 CM334, 무한질주, 독야청청, PR파워는 0, 2, 13, 18% 이병율을 각각 나타내어 1×10^4 sporangia/ml의 농도로 접종하였을 때 저항성 정도의 차이를 확인하기에 적합하리라 판단된다.

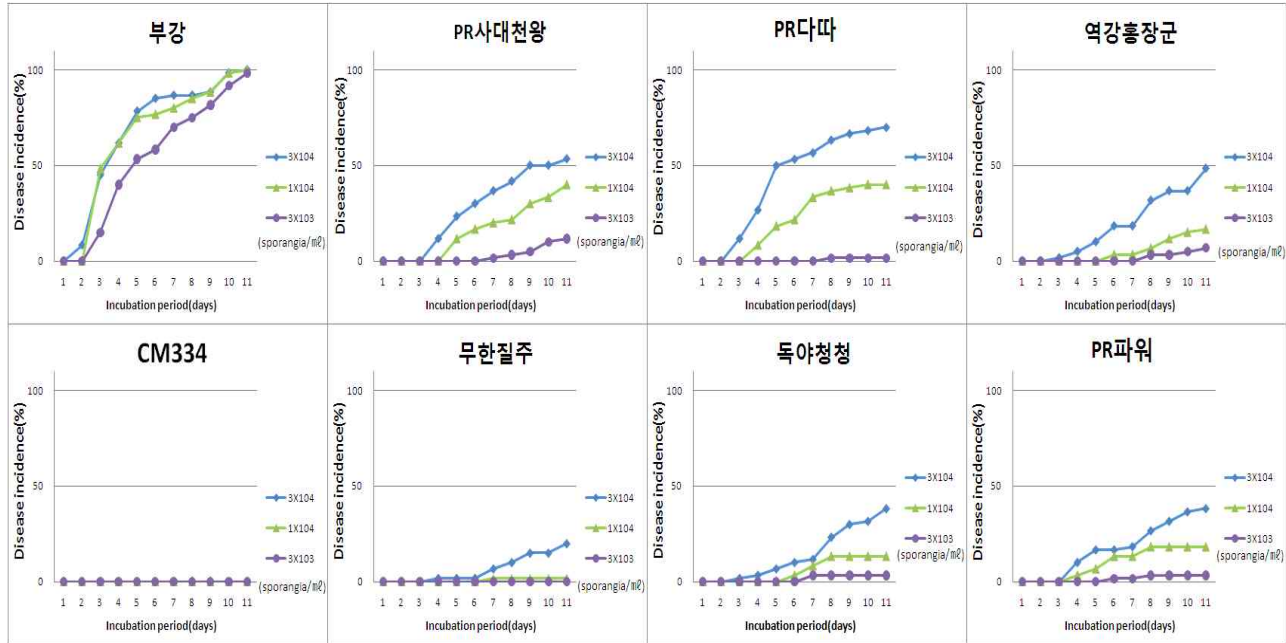


Fig. 6. 고추 8품종의 접종원 농도에 따른 고추역병에 대한 저항성

(4) 고추 역병 균주에 따른 고추 역병 저항성

(가) 확보 균주의 병원성 조사

o *P. capsici* 균주에 따라 고추품종의 저항성에 차이가 있는지 존재를 확인하기 위하여, 강릉대학교에서 *P. capsici* 3종의 균주를 분양받아 JHAI 1-7 균주와 함께 감수성 품종 부강에서 이들의 병원성을 실험하였다(표 1).

o 재료 및 방법

부강품종을 실험에 사용하였으며 생육단계가 2엽기 일 때 접종하였다. 4종의 고추역병 균주를 각각 OMA 배지에 일주일 배양 후 멸균된 붓으로 기중균사를 제거하고 1일 동안 광처리(24 hr/day, 25°C) 한 뒤 4°C 멸균수로 수확하여 1시간 동안 4°C에 보관하여 유주자를 방출시켜 3×10^3 , 1×10^4 , 3×10^4 sporangia/ml의 농도로 soil drenching 방법으로 접종하였다. 접종된 고추는 1일 동안 dew chamber(25°C)에 보관 후 항온실(25°C)에 두어 광처리(12 hr/day)하며 병의 진전을 조사하였다.

Table 1. 병원성 검증에 사용된 균주

균주	
<i>Phytophthora capsici</i> JHAI 1-7	KRICT
<i>Phytophthora capsici</i> KPC-7	강릉원주대학교
<i>Phytophthora capsici</i> KPC-1	강릉원주대학교
<i>Phytophthora capsici</i> MY-1	강릉원주대학교

○ 결과 및 고찰

- 저농도(3×10^3 sporangia/ml)에서 분양받은 4균주는 모두 비슷한 속도로 발병이 진행되었고 이병율도 비슷하게 나타났다(Fig. 7).
- 하지만 고농도(1×10^4 , 3×10^4 sporangia/ml)에서는 KPC-1과 KPC-7 균주들이 JHAI 1-7과 MY-1 균주보다 다소 높은 고추 역병 발병도를 나타냈다.

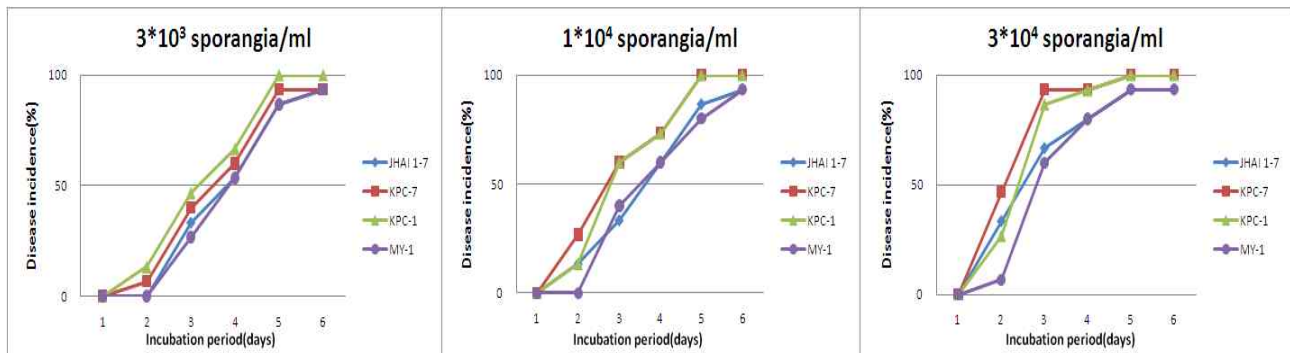


Fig. 7. *Phytophthora capsici* 균주들의 접종농도에 따른 고추 역병 이병율

(나) 4엽기 유묘를 이용한 고추 역병균 4종 균주에 대한 고추 품종의 저항성

○ 고추품종의 저항성이 *P. capsici* 균주에 따른 차이를 확인하기 위하여 강릉대학교에서 분양 받은 *P. capsici* 3종의 균주와 *P. capsici* JHAI 1-7에 대한 7종의 대표품종의 저항성을 확인하였다.

○ 재료 및 방법

7종의 고추품종(부강, PR파워, PR사대천왕, PR다파, 역강홍장군, 독야청청, 무한질주)을 실험에 사용하였고, 고추의 생육단계는 4엽이 완전 전개되었을 때 접종하였다. 접종원의 농도는 1×10^4 sporangia/ml로 하였으며, pot 당 5 ml 씩 soil drenching법으로 접종하였다. 접종원 처리방법, 접종 후 고추 보관방법은 위와 동일하게 하였다. 각 실험구는 5개의 식물체를 이용하였으며 동일한 실험을 두 번 반복하여 평균의 결과를 나타냈다.

○ 결과 및 고찰

- 부강품종은 고추역병 4균주에 대해 동일하게 감수성을 나타냈으며, 중도저항성인 PR다파, 역

강홍장군, PR사대천왕에서 균주에 따른 이병율의 차이를 나타내었다. PR다따는 *P. capsici* KPC-7 균주를 접종하였을 때 이병율이 가장 높았고, 역강홍장군과 PR사대천왕은 *P. capsici* KPC-7을 접종하였을 때 이병율이 가장 높았다(Fig. 8).

- 하지만 저항성 품종인 PR파워, 독야청청, 무한질주는 균주에 따른 이병율의 차이를 거의 나타내지 않았다. 중도저항성 품종은 균주에 따른 저항성의 차이를 나타낼 수 있다고 판단된다.

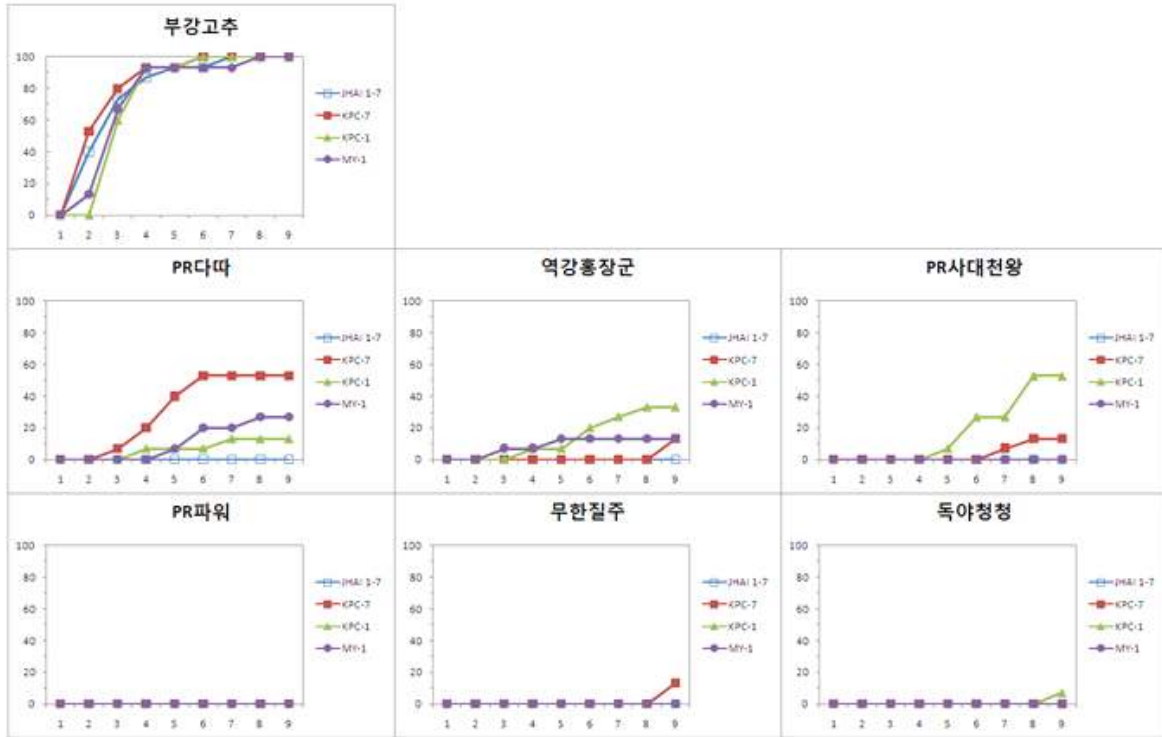


Fig. 8. 4엽기 고추품종 7종에 대한 고추 역병균 4균주의 고추 역병 이병율

(다) 8엽기 유묘를 이용한 고추 역병균 4종 균주에 대한 고추 품종의 저항성

o 고추품종의 저항성이 *P. capsici* 균주와 고추 생육시기에 따른 차이를 확인하기 위하여 강릉대학교에서 분양받은 *P. capsici* 3종의 균주와 *P. capsici* JHAI 1-7에 대한 7종의 대표품종의 저항성을 확인하였다.

o 재료 및 방법

7종의 고추품종(부강, PR파워, PR사대천왕, PR다따, 역강홍장군, 독야청청, 무한질주)을 실험에 사용하였고, 고추의 생육단계는 8엽이 완전 전개되었을 때 접종하였다. 접종원의 농도는 1×10^4 sporangia/ml로 하였으며 pot 당 20 ml 씩 soil drenching법으로 접종하였다. 접종원 처리방법, 접종 후 고추 보관방법은 위와 동일하게 하였다. 각 실험구는 5개의 식물체를 이용하였으며 동일한 실험을 두 번 반복하여 평균의 결과를 나타냈었다.

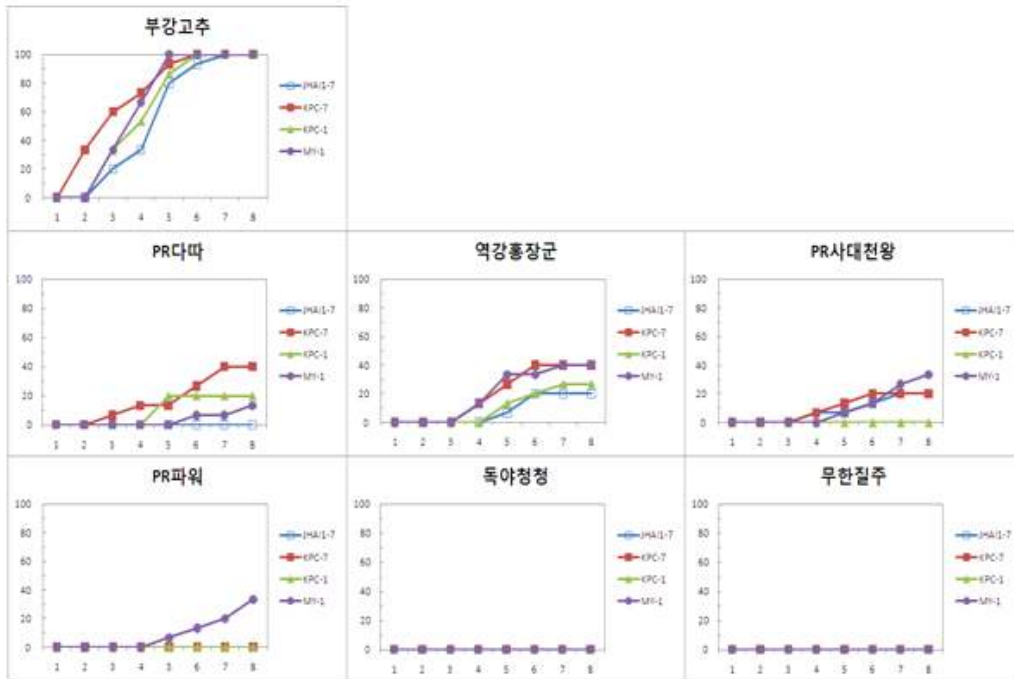


Fig. 9. 8엽기 고추 품종 7종에 대한 고추역병균 4균주의 고추 역병 이병율

o 결과 및 고찰

- 부강은 고추역병 4균주에 대해 동일하게 감수성을 나타냈으며, 중도저항성인 PR다따, 역강홍장군, PR사대천왕에서 균주에 따른 이병율의 차이를 나타내었다(Fig. 9).
- PR다따는 4엽기와 동일하게 *P. capsici* KPC-7을 접종하였을 때 이병율이 가장 높았으나, 역강홍장군과 PR사대천왕은 2엽기 결과와 달리 PR다따 품종처럼 KPC-7 균주를 접종하였을 때 다른 균주보다 더 높은 발병율을 나타냈다.
- 저항성 품종인 PR파워, 독야청청, 무한질주는 균주에 따른 이병율의 차이를 거의 나타내지 않았다.
- 고도 저항성 품종에서는 균주 간 고추 역병에 대한 감수성 차이가 없었으나, 중도저항성 품종은 균주 간 차이를 나타냈으나 균주 특이적인 병 저항성 반응은 확인할 수 없었다.
- 그러므로 고추 역병 저항성 병리검정은 4엽기 고추 유묘에 JHAI 1-7균주를 포트 당 1×10^4 sporangia로 접종하여 실험하고, 고도 저항성인 무한질주고추와 중도 저항성인 역강홍장군고추 품종을 대조 품종으로하여 실험하는 것을 결정하였다.

(5) *Phytophthora capsici* 균주들에 대한 고추 품종들의 저항성

(가)서 론

고추(*Solanum annuum* L.)는 우리나라의 주요 채소 중 하나로 대표적인 고소득 작물이다 (MIFAFF, www.mifaff.go.kr). 고추의 2010년 재배면적은 49,976ha이고, 연간 생산량은 300,463톤이다. 그리고 고추 종자는 국내뿐만 아니라 무, 배추 종자와 더불어 미주, 동남아시아, 중국 등으로 수출하고 있다(Park et al., 2008). 고추 종자 수출은 90년대 중반까지는 10만여 달러에 불과했으나, 2007년에는 714만 달러로 1995년을 기점으로 급격히 증가하고 있다. 고추에 발생

하는 주요 병해로는 역병(*Phytophthora capsici*), 풋마름병(*Ralstonia solanacearum*), 흰가루병(*Leveillula taurica*), 탄저병(*Colletotrichum* spp.) 및 *Cucumber mosaic virus*(CMV), *Pepper mild mottle virus*(PMMoV), *Pepper mottle virus*(PepMoV)등의 바이러스병이 보고되었다(KSPP, 2009).

*P. capsici*에 의해 발생하는 고추 역병은 대표적인 토양 병해인데, 우리나라에서 고추는 고소득 작물이고 제한된 재배 면적에 고추를 연작하므로 역병이 지속적으로 발생하고 있다. 고추 역병을 방제하기 위해서는 유기합성 살균제를 이용한 화학적 방제, 비기주 작물과의 윤작, 길항미생물을 이용한 생물적 방제 및 저항성 품종의 재배 등이 사용되고 있다. 합성 살균제를 이용한 토양병 방제는 한계성이 있고, *P. capsici*는 고추와 같은 가지과 작물뿐만 아니라 박과 작물 등 50개 종 이상의 식물에 역병을 일으키므로 비기주 작물과의 윤작은 용이하지 않다. 그리고 최근에는 약제를 살포하지 않고 재배한 친환경농산물에 대한 수요가 증가함에 따라 역병에 대해 저항성인 고추 품종을 재배하는 것을 선호하고 있다.

지금까지 *P. capsici*에 대한 고추 저항성 유전자원은 AC2258(=Mexican pepper 'Line 29'), CM334(Criollo de Morales 334), PI201234, PI201232 및 PI163192 등이 보고되어 있다(Ares, et al., 2005; Bosland, 1993; Bosland and Lindsey, 1991; Gil Ortega et al., 1991; Kimble and Grogan, 1960; Kim et al., 2010). 고추 역병에 대한 유전자원들의 저항성에 관한 연구가 모두 이해된 것은 아니다. 처음에는 독립적으로 작용하는 2개의 우성유전자에 의해(Smith et al., 1967; Polach and Webster, 1972) 혹은 modifier와 함께 단일 우성유전자(Barksdale et al., 1984)가 저항성을 나타낸다고 하였으나, 최근에는 고추의 역병 저항성을 질적 저항성보다는 chromosome 4, 5, 6, 11 및 12에 존재하는 6개 영역이 저항성을 책임지는 QTL 저항성으로 인식하고 있다(Lefebvre and Palloix, 1996; Lefebvre et al., 2002; Pflieger et al., 2001; Thabuis et al., 2003, 2004). 또한 고추의 역병 저항성은 접종원 농도와 배양시간에 따라 영향을 받으며, 또 고추의 생육시기가 증가할수록 저항성 발현이 뚜렷하게 증가한다고 알려져 있어 이를 뒷받침한다(Barksdale et al., 1984; Kim et al., 1989; Hwang, 2002).

우리나라에서는 2005년부터 AC2258, CM334 및 PI201234 등의 육종재료를 도입한 *P. capsici*에 대한 저항성 품종이 출시되었으며, 현재까지 다양한 회사에서 개발한 많은 역병 저항성 품종들이 판매되고 있다. 하지만 포장에서 이들 저항성 품종의 고추에 역병이 종종 발생하고 있어 혼란을 주고 있다. 역병 저항성에 대한 품종들의 반응 차이를 설명하는 데에는 두 가지 견해가 있다. 첫째는 각 저항성 품종에 대하여 특이적으로 반응하는 *P. capsici* 균주 즉 레이스가 존재한다는 것이다(Glosier et al., 2008; Lee and Kim, 2012; Oelke et al., 2003; Sy et al., 2008; Tamietti and Valentino; 2001). 그러나 오랜 연구에도 불구하고 다른 병원균의 저항성과 달리 세계적으로 통용되는 레이스 분류체계가 아직도 확립되지 못하였다(Kim et al., 2010). 두 번째는 고추의 역병 저항성 유전자에 특이적으로 반응하는 레이스가 존재하는 것이 아니라 *P. capsici* 균주 간에는 병원성(pathogenicity) 세기 즉 병원력(virulence)에 차이가 존재하는데, 고추의 역병 저항성이 질적 저항성이 아니라 양적 저항성 즉 여러 개의 병 저항성 유전자가 저항성에 관여하는 저항성이므로 따라서 상업용 고추 품종들에 이들 저항성 유전자의 종류 및 수가 서로 다르게 도입되어 있고 *P. capsici* 병원력에 따라 저항성 품종의 저항성이 다르게 나타난다는 것이다(Foster and Hausbeck, 2010; Polach and Webster, 1972; Yang et al., 1989). 고추의 역병 저항성이 두 가지 견해 중 어느 것을 따르냐에 따라 역병 저항성 품종을 개발하기 위한 저항성 검정 방법은 달라질 것이다.

따라서 본 연구에서는 고추 품종과 *P. capsici* 균주 간에 특이적인 저항성이 존재하는 지를 조사하기 위하여 즉 품종 특이적 레이스의 존재 여부를 확인하기 위하여, 시판 중인 고추 품종 100개를 구입하여 기존에 생리적 변이가 있다고 보고된(Lee et al., 2010) *P.capsici* 4개 균주에 대한 이들 품종의 저항성 정도를 조사하였다. 그리고 이들 중 실험한 *P. capsici* 균주 모두에 대하여 저항성을 보이는 고도 저항성 품종 6개를 선발하여 *P. capsici* 접종 농도와 접종 후 재배 온도에 따른 이들 품종의 역병 저항성 변화를 조사하였다.

(나) 재료 및 방법

식물 재배

시판 중인 고추 품종 100개(역병 저항성 품종 59개와 감수성 품종 41개)를 구입하여 실험에 사용하였다(Table 1). 8 × 5 연결 포트(포트 당 토양 68mL, 범농)에 원예용상토 5호(부농)를 채워 넣고 각 품종의 종자를 파종한 후 온실(25 ± 5°C)에서 4-5주 동안 재배한 6-7엽기 고추 유묘를 실험에 사용하였다. 접종 1주일 전에 에버그린(N-P-K, 8-4-6; 서울바이오) 비료를 800배로 희석하여 살포하였다. 그리고 접종원의 *P. capsici* 포자 농도 및 접종 후 재배 온도에 따른 저항성 품종들의 역병 저항성 차이를 조사하기 위한 실험은 실험한 고추 품종 중 *P. capsici* 균주 모두에 대하여 저항성을 나타내는 고도 저항성 품종 6개('탄탄대목', '무한질주', '독야청청', '균계일학', '신세계', 'PR 신나라')와 대조 품종으로 '역강홍장군'(코레곤종묘)과 '부강'(몬산토코리아)을 포함한 8개 품종을 앞에서와 동일한 방법으로 재배하였다.

접종원 준비

P. capsici 균주는 강릉원주대학교에서 분양 받은 MY-1, KPC-1 및 KPC-7 균주와 충북대학교에서 분양 받은 JHAI1-7 균주를 실험에 사용하였다. 각각의 균주는 potato dextrose agar(Becton, Dickinson and Co.) 배지에 7일간 배양한 균총으로부터 균사조각을 떼어 직경 13cm의 oatmeal agar(OMA, Becton, Dickinson and Co.) 배지에 plate 당 5개씩 올려놓고 25°C에서 2주 동안 배양하였다. 접종 1일 전에 OMA 배지에 배양한 균총을 멸균한 붓으로 균사를 긁어주고 25°C 배양기에서 24시간 동안 광을 처리하여 포자(유주포자낭, sporangia) 형성을 유도하였다. 포자가 형성된 배지 표면에 차가운 멸균수(4°C)를 붓고 멸균한 붓으로 유주포자낭을 수확한 다음 3점의 거즈로 여과하여 균사를 제거하고 광학현미경 하에서 hemocytometer를 이용하여 유주포자낭의 농도가 1.0×10^4 sporangia·mL⁻¹가 되도록 조정하였다. 이 유주포자낭현탁액을 4°C에서 50-60분 동안 저온처리 하고 실온에서 다시 1시간 동안 배양하여 유주포자낭으로부터 유주포자(zoospore)가 유출된 포자현탁액을 실험에 사용하였다. 접종 농도에 따른 6개 고도 저항성 품종들의 역병 발생 실험을 위해서는 포자현탁액의 유주포자낭 농도를 각각 1×10^4 , 3×10^4 , 1×10^5 및 3×10^5 sporangia·mL⁻¹이 되도록 준비한 후 앞에서와 같이 저온처리 하여 유주포자를 유출시킨 포자현탁액을 접종원으로 사용하였다.

접종 및 병조사

온실에서 재배한 6-7엽기의 고추 유묘에 준비한 *P. capsici*의 포자현탁액을 포트 당 5mL씩 토양에 관주하여 접종하였다. 접종 후 25°C 생육상으로 옮기고 하루 동안 암처리를 하였으며, 그 이후부터는 하루에 12시간씩 광을 처리하면서 재배하였다. *P.capsici* 4개 균주에 대한

시판 고추 품종 100개의 역병 저항성 실험은 네 개 균주 간에 병원성 정도에 차이가 있어 역병 발생 속도가 다르므로 대조 품종인 '부강'에서 역병이 충분히 발생하면 고추 유묘 각 개체의 역병 발생을 조사하였다. 각 유묘의 역병 발생 정도는 발병도(disease index) 0-3의 지수를 사용하여 0 = 건전, 1 = 잎이 약간 시듦(30% 이하의 시듦), 2 = 잎이 시들어 말리며, 줄기도 검게 변하거나 마름(60% 이하의 시듦), 3 = 식물체 고사 등 4단계로 조사하였으며, 각 품종의 발병도(%)는 아래의 식에 따라 계산 하였다.

$$\text{발병도(\%)} = [\text{평균 발병도(disease index)/3}] \times 100$$

평균 발병도(%)가 20% 이하인 경우에는 저항성, 20% 초과 50% 이하의 발병도를 보이면 중도저항성, 그리고 50%를 초과하는 발병도를 보이는 것은 감수성으로 판정하였다. 그리고 병원균 접종 후의 재배 온도에 따른 고도의 저항성인 6개 품종의 고추 역병 발생 실험을 위해서는 역병균을 접종한 후에 각각 25, 28, 30°C 생육상에서 앞에서와 같은 방법으로 재배하였다.

(다) 결과 및 고찰

P. capsici 4개 균주에 대한 고추 품종의 저항성

시판 중인 고추 품종 100개를 구입하여 생리적인 차이가 보고된(Lee et al., 2010) *P. capsici* 4개 균주에 대한 이들 품종의 저항성 정도를 조사하였다. 이들 중 59개는 회사에서 *P. capsici*에 대한 저항성 품종으로 판매하고 있는 품종이고, 41개 품종은 역병 저항성이 아닌 일반 품종이었다. 그리고 *P. capsici* 균주로는 JHAI1-7, KPC-1, KPC-7 및 MY-1를 실험에 사용하였는데, JHAI1-7과 KPC-7 균주는 A1 교배형, MY-1 균주는 A2 교배형, 그리고 KPC-1 균주는 불임(sterile) 균주이었다. 실험한 고추 품종에서 MY-1, KPC-1, JHAI1-7 및 KPC-7 균주는 각각 37, 55, 60, 74%의 평균 발병도를 보여, MY-1 균주가 병원성의 세기인 병원력(virulence)이 가장 낮고 반대로 KPC-7 균주가 가장 병원성이 강한 즉 병원력이 높은 균주라는 것을 알 수 있었다(Table 1). 또 이들 균주의 병원성 정도 차이는 감수성 품종인 '부강'에서도 확인할 수 있었는데, 각 균주를 고추에 접종하고 배양시간이 경과함에 따라 KPC-7, JHAI1-7, KPC-1 그리고 MY-1 균주 순으로 역병이 심하게 발생하였다(결과 미제시).

Polach and Webster(1972)는 고추, 호박 등에서 23개 *P. capsici* 균주를 분리하였고, 서로 다른 기주식물의 병원성에 따라 14개 strain으로 분류하였으나, 고추 품종에 따른 병원성 분화는 발견할 수 없었다고 하였다. 그러나 Yang et al.(1989)은 국내 *P. capsici* 간에 병원력 차이가 크다고 하였다. 그리고 Bowers and Mitchell(1991)은 *P. capsici* 균주 간의 교배에 의해 생겨난 균주들 간에 고추에 대한 병원력에 차이가 있다고 하였으며, Hwang et al.(1991)도 한국, 유럽, 멕시코 등에서 분리한 *P. capsici* 균주들의 mtDNA의 RFLP를 분석하였을 때 균주 간에 큰 차이를 보여 병원력에 차이가 있을 것이라고 하였다. 이들 결과는 우리와 일치하는 것으로 고추에 대한 *P. capsici* 균주들의 병원력은 서로 차이가 있다고 생각되었다.

이들 4개 *P. capsici* 균주들에 대한 시판 고추 품종들의 저항성은 이들 균주의 병원성의 세기인 병원력(virulence)과 상반되는 결과를 나타냈다(Table 2). 가장 병원성이 약한 MY-1 균주에 대해서는 59개 품종이 저항성을 그리고 3개 품종이 중도저항성을 보였다. 이와 반대로 병원성이 가장 강한 균주인 KPC-7에 대해서는 6개 품종만이 저항성을 그리고 18개 품종이 중도저항성을 나타냈다. 한편 중간 정도의 병원력을 보인 균주들인 KPC-1과 JHAI1-7 균주에 대해 각각 27개와 28개가 저항성을 그리고 각각 25개와 16개 품종이 중도저항성을 보였다. 그리고

MY-1, KPC-1, JHAI1-7 및 KPC-7 균주에 감수성을 나타낸 품종의 수는 각각 38, 48, 56 및 76개였다.

Table 2. Resistance degree of one hundred cultivars of *Capsicum annuum* to four isolates of *Phytophthora capsici*.

Cultivar	Triat	Isolate of <i>P. capsici</i>				Mean
		MY-1	KPC-1	JHAI1-7	KPC-7	
PR-Sinnara	Ry	0 ± 0.0x	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0.0
Muhanjilju	R	0 ± 0.0	0 ± 0.0	7 ± 11	3 ± 5.8	2.5
Sinsegae	R	0 ± 0.0	3 ± 5.8	8 ± 13	0 ± 0.0	2.8
Tantandaemok	R	0 ± 0.0	14 ± 19	0 ± 0.0	0 ± 0.0	3.4
Kunkaeilhak	R	0 ± 0.0	5 ± 7.1	0 ± 0.0	10 ± 14	3.8
Dokyacheongcheong	R	0 ± 0.0	10 ± 14	0 ± 0.0	6 ± 7.9	3.9
Ilsongjung	R	0 ± 0.0	5 ± 7.1	0 ± 0.0	23 ± 33	7.1
Ildungkongsin	R	0 ± 0.0	5 ± 7.1	0 ± 0.0	25 ± 35	7.5
Chunyunmanyun	R	0 ± 0.0	2 ± 2.1	7 ± 9.4	25 ± 7.1	8.3
PR-Power	R	0 ± 0.0	0 ± 0.0	3 ± 4.7	33 ± 20	9.0
PR-Oulim	R	0 ± 0.0	9 ± 12	5 ± 7.1	25 ± 12	9.6
Kiribpaksu	R	0 ± 0.0	12 ± 16	0 ± 0.0	35 ± 49	11.6
PR-Kummaek	R	0 ± 0.0	5 ± 7.1	10 ± 14	35 ± 49	12.5
Kataguruma	R	2 ± 2.1	8 ± 7.1	18 ± 26	25 ± 35	13.2
PR-Whanhosung	R	1 ± 1.7	13 ± 5.8	14 ± 15	24 ± 27	13.3
Heemangbong		0 ± 0.0	19 ± 26	3 ± 4.7	35 ± 40	14.2
PR-Manidda	R	0 ± 0.0	10 ± 10	7 ± 5.8	42 ± 40	14.7
PR-Sangsaeng	R	0 ± 0.0	9 ± 12	15 ± 7.1	55 ± 64	19.6
PR-Yuljung	R	0 ± 0.0	0 ± 0.0	15 ± 21	67 ± 47	20.4
Ilinja	R	0 ± 0.0	12 ± 11	16 ± 15	58 ± 6.8	21.3
Ahnjunbelt	R	0 ± 0.0	11 ± 11	44 ± 7.7	30 ± 17	21.4
Sunkuja	R	0 ± 0.0	18 ± 25	8 ± 13	60 ± 44	21.4
PR-Mansae	R	0 ± 0.0	21 ± 19	2 ± 4.0	63 ± 33	21.7
PR-Kusang	R	1 ± 1.7	27 ± 9.1	13 ± 11	50 ± 32	22.8
Yeokganghongjangkun	R	4 ± 7.5	22 ± 20	21 ± 22	43 ± 26	22.8
Bulsaechul	R	8 ± 13	18 ± 17	34 ± 57	33 ± 12	23.3
Baerota	R	4 ± 4.9	32 ± 7.1	18 ± 21	45 ± 21	24.7
Bakjangdaeso	R	0 ± 0.0	10 ± 17	5 ± 6.8	91 ± 5.3	26.7
PR-Jijon	R	3 ± 5.8	30 ± 32	32 ± 11	42 ± 29	26.9
PR-Daechon	R	0 ± 0.0	28 ± 11	18 ± 1.8	63 ± 38	27.3
PR-Ukmankum	R	0 ± 0.0	42 ± 26	22 ± 2.4	47 ± 4.7	27.5
PR-Sanghanka	R	2 ± 4.0	33 ± 43	27 ± 18	51 ± 50	28.4
Hongmiin	R	1 ± 1.7	13 ± 5.8	19 ± 22	81 ± 21	28.5
Mansahungtong	R	0 ± 0.0	10 ± 10	14 ± 6.9	92 ± 6.9	29.2
PR-Bulrocho	R	2 ± 4.0	27 ± 18	27 ± 32	63 ± 25	29.7
PR-Sadaechunwang	R	2 ± 4.0	39 ± 12	26 ± 29	57 ± 32	30.8
PR-Bultina	R	3 ± 5.8	37 ± 24	30 ± 44	54 ± 45	30.9
Meeting	R	0 ± 0.0	7 ± 5.8	50 ± 47	76 ± 25	33.1
PR-Hongdukae	R	0 ± 0.0	24 ± 25	57 ± 11	58 ± 23	34.7
Kummaedal	R	6 ± 9.8	31 ± 13	27 ± 19	87 ± 11	37.5
PR-Jangwonkubjae	R	0 ± 0.0	34 ± 22	58 ± 37	65 ± 28	39.4
Subiyeok	R	2 ± 4.0	28 ± 8.5	41 ± 40	89 ± 9.7	40.0
PR-Kukadaepyu	R	2 ± 4.0	36 ± 15	45 ± 21	83 ± 9.0	41.8
Dokbulwang	R	0 ± 0.0	41 ± 10	45 ± 16	85 ± 13	42.8
JJang	R	1 ± 1.7	38 ± 32	49 ± 25	83 ± 8.9	42.8

PR-Manjangilchi	R	16 ± 27	64 ± 22	37 ± 24	60 ± 41	44.1
PR-Yukbalsan	R	11 ± 16	36 ± 5.8	55 ± 6.8	76 ± 39	44.4
Josaengshintop	R	0 ± 0.0	54 ± 34	65 ± 11	61 ± 31	45.3
Taesan	R	0 ± 0.0	29 ± 16	53 ± 19	100 ± 0.0	45.6
PR-Heemangchan	R	3 ± 5.8	44 ± 12	67 ± 15	73 ± 23	46.9
Hongiljum	R	14 ± 25	41 ± 27	52 ± 28	88 ± 16	48.9
PR-Sun	R	0 ± 0.0	33 ± 49	65 ± 37	100 ± 0.0	49.5
Hankaram	R	11 ± 11	56 ± 33	51 ± 45	84 ± 9.6	50.6
Kangreokjosaengkun	R	0 ± 0.0	45 ± 35	73 ± 15	93 ± 11	53.0
Hanpansung	R	2 ± 2.1	50 ± 42	100 ± 0.0	100 ± 0.0	62.9
PR-Bulmeol	R	16 ± 14	69 ± 25	99 ± 1.9	93 ± 11	69.1
Papiped		5 ± 7.1	89 ± 2.1	100 ± 0.0	100 ± 0.0	73.4
Morningput		14 ± 4.9	90 ± 9.9	100 ± 0.0	97 ± 4.7	75.0
Kangreoktaeyang		17 ± 4.9	85 ± 21	100 ± 0.0	100 ± 0.0	75.4
Hot	R	42 ± 2.1	78 ± 7.1	100 ± 0.0	100 ± 0.0	79.9
Sintongil	R	50 ± 4.2	72 ± 16	100 ± 0.0	100 ± 0.0	80.4
Obok		72 ± 16	69 ± 26	92 ± 12	100 ± 0.0	82.9
Supermanidda		55 ± 64	85 ± 7.1	95 ± 7.1	100 ± 0.0	83.8
PR-Maekom	R	49 ± 12	95 ± 7.1	100 ± 0.0	100 ± 0.0	85.9
Papiyellow		53 ± 28	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	88.3
Dangchan		58 ± 21	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	89.5
Hongbosok		85 ± 20	90 ± 14	97 ± 5.8	90 ± 17	90.5
Dabotop		65 ± 11	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	91.3
Chamjoen		70 ± 9.9	100 ± 0.0	95 ± 7.1	100 ± 0.0	91.3
Kumbit		80 ± 9.9	100 ± 0.0	98 ± 2.4	97 ± 4.7	93.8
Daechon		90 ± 14	85 ± 21	100 ± 0.0	100 ± 0.0	93.8
Hongjangkunbikarim	R	94 ± 9.2	90 ± 14	97 ± 4.7	100 ± 0.0	95.0
Hongjinju		83 ± 14	100 ± 0.0	100 ± 0.0	98 ± 2.4	95.3
Maekomdalkom		83 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	95.8
Mansukgun		85 ± 17	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	96.3
Jinmi		95 ± 7.1	100 ± 0.0	100 ± 0.0	90 ± 14	96.3
Hanbando		87 ± 9.2	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	96.6
Daedulbo		90 ± 14	100 ± 0.0	97 ± 4.7	100 ± 0.0	96.7
Chukjae		90 ± 14	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	97.5
Manidda		92 ± 12	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	97.9
Kukbo		93 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	98.3
Hanson		94 ± 9.2	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	98.4
Utum		94 ± 9.2	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	98.4
Bukang		94 ± 4.6	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	98.6
Wangkun		95 ± 7.1	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	98.8
Matgalchan		95 ± 7.1	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	98.8
Daejangbu		99 ± 2.1	97 ± 4.9	100 ± 0.0	100 ± 0.0	98.8
Youngyangmat		100 ± 0.0	95 ± 7.1	100 ± 0.0	100 ± 0.0	98.8
Haengwun		97 ± 4.9	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	99.1
Hongsimi		97 ± 4.9	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	99.1
Bulmat		100 ± 0.0	97 ± 4.9	100 ± 0.0	100 ± 0.0	99.1
Imkumnim		99 ± 2.1	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	99.6
Kumhyang		100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100.0
Buchon		100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100.0
Sinjokang		100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100.0
Johyang		100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100.0
Kangkun		100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100.0
Chammani		100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100.0
Olgonchan		100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100.0

Newwavepimang	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100.0
Mean	37	55	60	74	

^zSeedlings at 6- to 7- leaf stage were inoculated with four isolates of *P. capsici* by drenching the roots with the spore suspension of each isolate to give inoculum density of 5.0×10^4 sporangia/pot. The plants were incubated in a growth chamber at 25°C with 12-hr light a day. Seven to thirteen days after inoculation, disease severity of the seedlings was rated on a scale of 0 to 3 and the score was standardized onto a 0 to 100 scale. 0, no symptom, 1, leaf-enlarged symptoms with brownish lesions beginning to appear on stems and less than 30% of the plant wilted; 2, leaves defoliated or dead, with rapidly expanding stem lesion and 60% of the plant wilted severely; 3, plant dead.

^yR, resistant cultivar to *P. capsici* commercialized by each seed company.

^xEach value represents the mean disease severity (\pm standard deviation) of three runs with 10 replicates each. Color demonstrates resistance response of cultivars to each isolate of *P. capsici*, R (yellow), resistant, disease severity ≤ 20 ; MR (blue), moderately resistant, $20 <$ disease severity ≤ 50 ; S (green), susceptible, disease severity > 50 .

한편 Table 1과 같이 병원성이 증가하는 균주 순으로 즉 MY-1, KPC-1, JHAI1-7 및 KPC-7 순으로 각 품종의 역병 저항성 반응을 정리하면, 실험한 고추 품종 중 4개를 제외한 모든 품종들은 실험한 *P. capsici* 균주의 병원성 정도와 반대의 순으로 저항성, 중도저항성 및 감수성 반응을 보였다(Table 2). 그러나 ‘PR 만세’, ‘PR 구상’ 및 ‘PR 대촌’ 3개 품종은 KPC-1과 JHAI1-7 균주에 대하여 각각 중도저항성과 저항성을 그리고 및 ‘PR 만장일치’는 두 균주에 대해 각각 감수성과 중도저항성을 보여 병원력과 반대의 저항성을 보이지 않았으나, 두 균주 간에 병원성 차이가 적고 두 균주에 대한 이들 품종의 역병 발생은 차이가 적어 이것이 이들 품종이 두 균주에 대하여 특이적인 저항성 반응을 나타낸 것으로 생각되지 않았다.

우리나라에서 역병 저항성인 고추 품종들은 CM334, AC2258 및 PI201234 등의 저항성 재료를 고추에 도입하여 개발되었으며, 현재 많은 역병 저항성 고추 품종들이 포장에서 재배되고 있다. 하지만 재배 포장에서 이들 품종의 저항성이 종종 무너지는 일이 발생하고 있어 농민들에게 큰 혼란을 주고 있다. 일부 연구자들은 역병 저항성 고추 품종에 특이적으로 반응하는 레이스가 존재한다고 보고한 바 있다(Glosier et al., 2008; Lee and Kim, 2012; Oelke et al., 2003; Sy et al., 2008; Tamietti and Valentino; 2001). 즉, 포장에서 역병 저항성 품종의 저항성이 무너지는 것은 역병균이 저항성 유전자에 대응하여 이를 침입할 수 있는 새로운 레이스의 *P. capsici*가 출현했기 때문이라는 것이다. 그러나 Yang et al.(1989)은 *P. capsici* 국내 균주 간에 병원력 차이는 크나 품종과 균주 간에 특이적인 레이스 분화는 없었다고 하였다. 또한 Foster와 Hausbeck(2010)도 고추의 역병 저항성은 *P. capsici* 균주 간의 병원력에 영향을 받는다고 보고하였다. 그리고 고추 역병 저항성은 질적 저항성이 아니고 양적 저항성 즉 여러 개의 QTL들이 관여하는 저항성이므로 개발된 재배 품종은 CM334 등의 육종재료의 모든 저항성 유전자가 도입된 것이 아니라 일부가 도입되므로 CM334와 같이 모든 균주에 저항성을 나타내는 정도의 저항성을 보이는 그리고 원예적 특성이 우수한 파프리카 품종은 개발된 적이 없었다(Thabuis et al., 2003, 2004).

따라서 Table 1의 결과는 *P. capsici* 균주와 고추 품종 간에 특이적인 저항성 반응이 존재하지 않고, 고추 품종에 우수한 역병 저항성 유전자를 얼마나 많이 도입하였느냐에 따라 균주의 병원성 세기에 반비례하여 고추 품종의 역병 저항성에 차이를 보인다는 것을 알 수 있었다. 즉 우수한 병 저항성 유전자를 품종에 많이 도입한 것들은 예를 들면 ‘PR-신나라’, ‘무한질주’, ‘신세계’, ‘군계일학’, ‘독야청청’ 및 ‘탄탄대목’은 KPC-7과 같이 강한 병원성 균주에 대해서도 저항성을 나타낼 수 있으나, 우수한 병 저항성 유전자가 적게 도입된 품종들은 병원력이 낮은 균주인 MY-1에는 저항성을 나타내나 KPC-1이나 JHAI1-7과 같이 중간 정도의 병원성 균주에도 중도저항성 혹은 감수성 반응을 보였다고 생각되었다.

실험한 고추 품종 중 *P. capsici* 4개 균주에 대하여 저항성을 나타낸 품종의 수를 살펴보면, *P. capsici* 4개 균주 모두에 저항성을 보이는 품종은 ‘PR 신나라’, ‘무한질주’, ‘신세계’, ‘군계일학’, ‘독야청청’ 및 ‘탄탄대목’ 등 6개(6%) 이었다(Table 2). 그리고 3개 균주(MY-1, KPC-1, JHAI1-7)에는 저항성을 보이거나 실험한 균주 중 병원성이 가장 강한 KPC-7 균주에는 중도저항성을 보이는 품종은 11개(11%) 이었으며, *P. capsici* 4개 균주 모두에 대하여 중도저항성 이상을 보이는 품종은 24개(24%)였다. 따라서 시판 품종 중 약 25%가 실험한 모든 균주에 저항성을 나타낼 수 있었다. 실험한 고추 품종 중 역병 저항성으로 판매되고 있는 59개 품종 중 MY-1 균주에 대해서는 55개 품종이 저항성을 그리고 2개는 중도저항성을 나타냈다(Table 1). 그러나 나머지 3개 균주에 대한 저항성 반응은 병원력이 높은 균주일수록 종자회사의 결과와 차이가 있는 품종의 수가 증가하였다. 따라서 우리나라 종묘회사에서는 *P. capsici* MY-1 균주 정도의 병원성을 가지는 균주를 사용하여 역병 저항성을 판단하고 있다고 추정되었다. 그러므로 강한 병원성을 가지는 *P. capsici* 균주들이 존재하는 포장에서는 저항성으로 판매되고 있는 품종도 감수성을 나타내는 일이 발생하리라 예상되었다.

물론 고추 역병 저항성은 단인자의 질적 저항성이 아니라 양적 저항성(QTL 저항성)으로 간주되고 있으므로(Lefebvre and Palloix, 1996; Lefebvre et al., 2002; Pflieger et al., 2001; Thabuis et al., 2003, 2004), 같은 *P. capsici* 균주를 사용하여 실험한 경우에도 접종원 농도 및 온도 등에 따라 저항성 정도가 다를 수 있다(Barksdale et al., 1984; Hwang, 2002). 또한 고추는 *P. capsici*에 대하여 성체저항성을 보이므로 실험하는 고추의 생육시기도 중요하다(Kim et al., 1989). 또한 자연 상태에서 *P. capsici*는 주로 관개수를 따라 이동하고 고추의 잔뿌리로 침입하여 지체부에서 병을 일으킨다(Erwin and Ribeiro, 1996). 따라서 같은 생육시기의 고추라 하더라도 포트 내 토양의 영양상태에 따라 잔뿌리 발육 정도가 다르며 잔뿌리가 발달해 있을수록 *P. capsici*에 더 감수성 반응을 나타낸다. 한편, 회사에서 역병 저항성이 아닌 일반 품종으로 판매하고 있는 품종 41개 중에서 ‘희망봉’은 MY-1, KPC-1 및 JHAI1-7 균주에는 저항성을 그리고 병원성이 가장 높은 KPC-7 균주에는 중도저항성을 보였다. 따라서 고추의 역병 저항성도 농약 등록 시험법과 같은 표준화된 검정 방법이 필요하다고 생각되었다.

접종원 농도 및 재배 온도에 따른 고도 저항성 품종들의 역병 저항성 변화

실험한 *P. capsici* 균주 모두에 저항성을 나타낸 ‘PR 신나라’, ‘무한질주’, ‘신세계’, ‘군계일학’, ‘독야청청’ 및 ‘탄탄대목’ 등 고도 저항성 6개 품종을 선발하여 *P. capsici* 접종원 농도에 따른 이들 품종들의 역병 저항성 변화를 조사하기 위하여, 실험한 균주 중 병원성이 중간 정도인 KPC-1과 JHAI1-7를 접종원 농도가 각각 5×10^4 , 1.5×10^5 , 5×10^5 및 1.5×10^6 sporangia/pot이 되도록 접종하고 25°C에서 재배하여 접종원 양의 증가에 따른 이들 품종의

역병 저항성 정도를 실험하였다. 이들 6개 품종의 평균 발병도는 각각 1.7, 4.5, 3.9 및 16%를 보였으며, 가장 높은 접종원 양인 포트 당 1.5×10^6 개 접종에서도 ‘독야청청’을 제외한 나머지 모든 품종은 저항성을 그리고 ‘독야청청’은 중도저항성을 나타냈다(Table 3). 하지만 중도저항성 대조품종인 ‘역강홍장군’은 접종원 양이 증가함에 따라 역병 발생이 27, 30, 60, 80%로 크게 증가하여 기존의 역병 저항성은 접종원 농도가 증가함에 따라 감소한다는 연구 결과와 일치하였다(Barkadale et al., 1984; Kim et al., 1989). 또 다른 중간 정도의 병원성을 보이는 JHAI1-7 균주도 KPC-1 균주와 마찬가지로 접종원 양을 5×10^4 , 1.5×10^5 , 5×10^5 및 1.5×10^6 sporangia/pot로 증가하여도 실험한 고도 저항성 6개 고추 품종은 저항성 반응을 나타냈다(Table 3). 따라서 고도 저항성 품종들은 KPC-1과 JHAI1-7과 같은 중간 정도의 병원성 균주에 대해서는 접종원 양에 관계없이 저항성을 보인다는 것을 알 수 있었다.

Table 3. Development of *Phytophthora* blight on six highly resistant cultivars of chili pepper caused by *Phytophthora capsici* KPC-1 and JHAI1-7^z.

Cultivar	Trait ^y	Inoculum concentration of KPC-1 ($\times 10^4$ sporangia/pot)				Inoculum concentration of JHAI1-7 ($\times 10^4$ sporangia/pot)			
		5.0	15	50	150	5.0	15	50	150
PR-Sinnara	R	0.0 \pm 0.0 ^x	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	10 \pm 23	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
Sinsegae	R	0.0 \pm 0.0	6.7 \pm 20	0.0 \pm 0.0	10 \pm 30	13 \pm 27	17 \pm 37	0.0 \pm 0.0	17 \pm 37
Kungaeilhak	R	10 \pm 30	6.7 \pm 13	10 \pm 30	3.3 \pm 10	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
Muhanjilju	R	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	23 \pm 43	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	3.3 \pm 10
Tantandaemok	R	0.0 \pm 0.0	6.7 \pm 20	0.0 \pm 0.0	20 \pm 43	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
Dokyacheongcheong	R	0.0 \pm 0.0	6.7 \pm 13	13 \pm 33	40 \pm 30	6.7 \pm 20	3.3 \pm 10	17 \pm 27	6.7 \pm 20
Yeokganghongjanggun	MR	27 \pm 33	30 \pm 33	60 \pm 30	80 \pm 17	3.3 \pm 10	3.3 \pm 10	33 \pm 40	50 \pm 3.3
Bugang	S	100 \pm 0.0	100 \pm 0.0	100 \pm 0.0	100 \pm 0.0	100 \pm 0.0	100 \pm 0.0	100 \pm 0.0	100 \pm 0.0
Mean ^w		1.7	4.5	3.9	16	5.0	3.3	2.8	4.5

^zSeedlings at 6- to 7- leaf stage were inoculated with *P. capsici* KPC-1 and JHAI1-7 by drenching the roots with the spore suspension of each isolate to give inoculum density of 5.0×10^4 , 1.5×10^5 , 5.0×10^5 and 1.5×10^6 sporangia/pot. The plants were incubated in a growth chamber at 25°C with 12-hr light a day. Seven days after inoculation, disease severity of the seedlings was rated on a scale of 0 to 3 and changed into percentage. 0, no symptom, 1, leaf-enlarged symptoms with brownish lesions beginning to appear on stems and less than 30% of the plant wilted; 2, leaves defoliated or dead, with rapidly expanding stem lesion and 60% of the plant wilted severely; 3, plant dead.

^yR, resistant cultivar; MR, moderately resistant cultivar; S, susceptible cultivar.

^xEach value represents the mean disease severity (\pm standard deviation) of two runs with 10 replicates each.

^wMean disease severity of the six resistant cultivars including ‘PR-Sinnara’, ‘Muhanjilju’, ‘Sinsegae’, ‘Tantandaemok’, ‘Kunkaeilhak’, and ‘Dokyacheongcheong’ in each column.

고도 저항성 6개 품종에 접종한 *P. capsici* 포자 농도와 접종 후 재배 온도에 따른 이들 품종의 역병에 대한 저항성 변화를 조사하기 위하여, 실험한 균주 중 병원성이 가장 강한

KPC-7 균주를 5×10^4 및 1.5×10^6 sporangia/pot가 되도록 접종하고 25, 28 및 30°C에서 재배하여 이들 고추 품종의 역병 발생 정도를 조사하였다. 포트 당 유주포자낭 5×10^4 개를 접종하고 25, 28 및 30°C에서 배양하였을 때, 중도저항성 대조품종인 ‘역강홍장군’은 온도가 25, 28 및 30°C로 올라감에 따라 역병 발생도 43, 57 및 90%로 크게 증가하였다. 하지만 고도 저항성 6개 품종의 평균 발병도는 각각 9.5, 9.4, 21%로 온도가 증가함에 따라 역병 발생이 약간 증가하였다(Table 4). 그러나 실험한 품종 별로 살펴보면 ‘독야청청’을 제외한 나머지 5개 품종들의 역병 저항성은 재배 온도가 높아져도 거의 영향을 받지 않았다.

그러나 KPC-7 균주를 1.5×10^6 sporangia/pot의 고농도로 접종하고 25°C에서 재배하였을 때에는 이들 품종들은 대부분 중도 저항성 이상의 저항성을 보였으나, 28-30°C에서 재배하였을 때에는 고도 저항성 품종들도 감수성 반응을 나타내었다. 따라서 이들 고도 저항성 품종도 포장에서 KPC-7과 같이 강한 병원성을 지니는 균주가 1.5×10^6 sporangia/pot와 같이 높은 농도로 존재하고 온도가 28-30°C로 발병 환경이 적합하게 되면 이들 고도 저항성 품종에도 감수성 품종처럼 역병이 발생할 수도 있을 것이라고 생각되었다. 그러나 자연 상태에서 주 당 1.5×10^6 개의 유주포자낭이 접종될 가능성은 매우 낮으므로 이들 고도 저항성 품종들은 일반 포장에서는 역병 저항성이 잘 유지되리라 생각되었다.

Table 4. Development of *Phytophthora* blight on six highly resistant cultivars of chili pepper caused by *Phytophthora capsici* KPC-7 according to inoculum density and incubation temperature^z.

Cultivar	Trait ^y	5×10^4 sporangia/pot			1.5×10^6 sporangia/pot		
		25°C	28°C	30°C	25°C	28°C	30°C
Tantandaemok	R	10 ± 30 ^x	0.0 ± 0.0	10 ± 30	10 ± 30	60 ± 50	20 ± 43
Muhanjilju	R	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	10 ± 30	33 ± 43	60 ± 40	20 ± 37
Dokyacheongcheong	R	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	50 ± 53	27 ± 43	47 ± 43	60 ± 40
Kunkaeilhak	R	20 ± 43	0.0 ± 0.0	13 ± 33	20 ± 43	43 ± 43	73 ± 43
Sinsegae	R	10 ± 30	33 ± 43	20 ± 43	17 ± 37	80 ± 43	57 ± 50
PR-Sinnara	R	17 ± 37	23 ± 43	23 ± 43	57 ± 43	67 ± 47	73 ± 43
Yeokganghongjangkun	MR	43 ± 40	57 ± 17	90 ± 17	87 ± 17	80 ± 23	87 ± 17
Bukang	S	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
Mean ^w		9.5	9.4	21	27	60	51

^zSeedlings at 6- to 7- leaf stage were inoculated with *P. capsici* KPC-7 by drenching the roots with the spore suspension of the isolate to give inoculum density of 5.0×10^4 and 1.5×10^6 sporangia/pot. The plants were incubated in a growth chamber at 25, 28, and 30°C with 12-hr light a day. Seven days after inoculation, disease severity of the seedlings was rated on a scale of 0 to 3 and changed into percentage. 0, no symptom, 1, leaf-enlarged symptoms with brownish lesions beginning to appear on stems and less than 30% of the plant wilted; 2, leaves defoliated or dead, with rapidly expanding stem lesion and 60% of the plant wilted severely; 3, plant dead.

^yR, resistant cultivar; MR, moderately resistant cultivar; S, susceptible cultivar.

^xEach value represents the mean disease severity (\pm standard deviation) of two runs with 10 replicates each.

^wMean disease severity of the six resistant cultivars including 'PR-Sinnara', 'Muhanjilju', 'Sinsegae', 'Tantandaemok', 'Kunkaeilhak', and 'Dokyacheongcheong' in each column.

(6) 고추 역병 저항성과 phytoalexin인 capsidiol 생산량 관계 조사

(가) Capsidiol 분리 및 항균활성

o 고추역병에 대하여 중도저항성 품종인 역강홍장군에 고추 역병균을 접종한 후 capsidiol을 분리하고 capsidiol의 항균활성을 확인하였다.

o 재료 및 방법

역강홍장군 품종을 실험에 사용하였으며 고추의 생육단계가 8엽기가 되었을 때 접종하였다. 접종원의 농도는 1×10^4 sporangia/ml로 하였으며 pot 당 20 ml 씩 soil drenching법으로 접종하였다. 접종원 처리방법, 접종 후 고추 보관방법은 위와 동일하게 하였다. 실험구는 10개의 식물체를 이용하였다. 접종 후 1일간 dew chamber에 보관한 후 수확하였다. 고추 두 품종을 각각 10 g 씩 준비하여 막자사발을 이용하여 고르게 분쇄하였다. 분쇄한 식물체를 250 ml flask에 담고 클로로포름을 150 ml 첨가 하여 추출하였다. Filter paper를 이용하여 추출물을 걸러내고 남은 식물체를 한번더 클로로포름으로 세척하였다. 35°C에서 농축시킨 뒤, 다시 클로로포름으로 씻어내어 상온의 질소하에서 완전건조 시켰다. 농축액을 acetone-cyclohexane(1:3)용액에서 TLC를 실시하였다(Capsidiol: An antifungal compound produced in *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana clevelandii* following infection with tobacco necrosis virus, John A. Bailey, R. S. Burden and G. G. Vincent, Received 20 June 1974. Available online 24 April 2001). 밴드가 생성된 TLC plate를 7영역으로 나누어 긁어낸 실리카를 acetone을 이용하여 2번 추출한 뒤 질소하에서 농축하였다. 농축된 물질은 *Fulvia fulva* TF13에 대한 항균활성을 실험하였다.

o 결과 및 고찰

- *Fulvia fulva* TF13 균주에 항균활성을 가진 영역이 확인되었다. 이 영역의 물질을 capsidiol이라 가정하고 GC-MS를 실시하여 연구된 논문과 비교한 결과 capsidiol로 확인되었다(Fig. 10,11) (Evidence for the metabolism of capsidiol by a cytochrome P-450-dependent enzyme, isabelle saimmaime and philippe. 1993. J. Coulomb. Phytochemistry, 33(4): 787-789).

- Capsidiol의 GC-MS 분석은 아래와 같은 조건에서 실시하였다.

Instrument : GCMS-QP5050 (Shimadzu), Column: Capillary DB-5(30 m x 0.25 mm, 0.25 μ m film thickness, Injector Temp. : 240°C, Column Temp.: 180°C(5 min), rate: 5°C/min, 230°C(for 15 min), Interface Temp. : 250°C, Method file : Capsidiol. qgm.

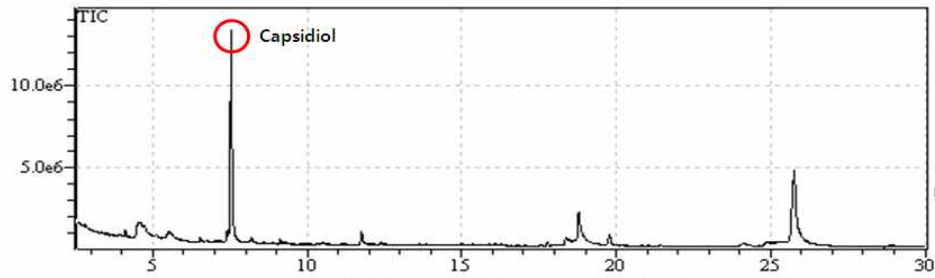


Fig. 10. *Fulvia fulva* TF13 균주에 항균활성을 가진 영역의 GC-MS chromatogram

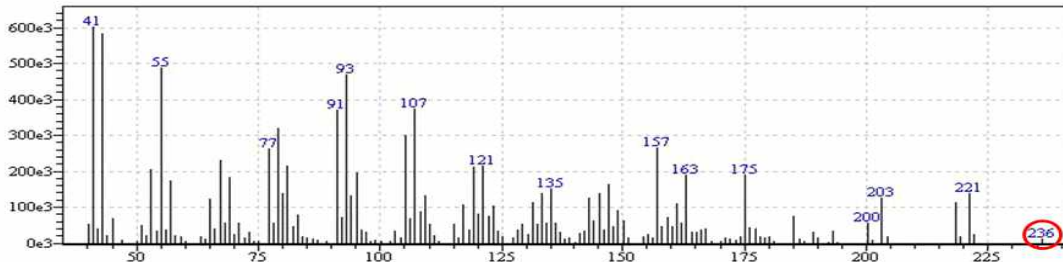


Fig. 11. 역강홍장균에서 분리된 capsidiol의 GC-MS spectrum

(나) 고추 역병 저항성 정도에 따른 capsidiol 생산량 비교

○ 고추 품종의 역병 저항성 정도와 capsidiol 생산량을 비교하여 capsidiol이 고추 역병 저항성에 기여하는 지를 조사하기 위하여 실험하였다. 감수성 품종인 부강, 중도저항성 품종인 역강홍장균, 저항성 품종인 무한질주를 이용하여 capsidiol이 생성되는 시기와 양을 확인하였다.

○ 재료 및 방법

고추의 생육단계는 1차 분얼기였으며, 접종원의 농도는 1×10^4 sporangia/ml로 pot 당 20 ml 씩 soil drenching법으로 접종하였다. 접종원 처리방법, 접종 후 고추 보관방법은 위와 동일하게 하였다. 3품종(부강, 역강홍장균, 무한질주)의 고추를 각각 접종 1일 전, 접종 1일 후, 접종 2일 후, 접종 4일 후에 수확하여 잎, 뿌리, 줄기 3부위로 나누어 각각 동일한 양의 시료를 취한 후 앞에서와 동일한 방법으로 capsidiol을 추출하였다. 그리고 동일한 조건으로 GC-MS 분석을 실시하여 capsidiol peak area를 측정함으로써 생산량을 비교하였다.

○ 결과 및 고찰

- 실험한 모든 품종의 잎에서는 capsidiol이 생성되지 않았다.
- 고추 역병 저항성인 역강홍장균과 무한질주 품종들보다 감수성 품종인 부강에서 많은 양의 capsidiol이 생성되었고 특히 줄기에서 접종 1일 뒤부터 많은 양이 생성됨을 확인 할 수 있었다(Fig. 12).
- 이는 고추품종의 고추역병에 대한 저항성은 capsidiol의 생성과는 관련이 없다고 판단되며 여러 가지 저항성 유전자 및 물질이 복합적으로 연관되어 고추역병저항성에 영향을 미친다고 생각된다.

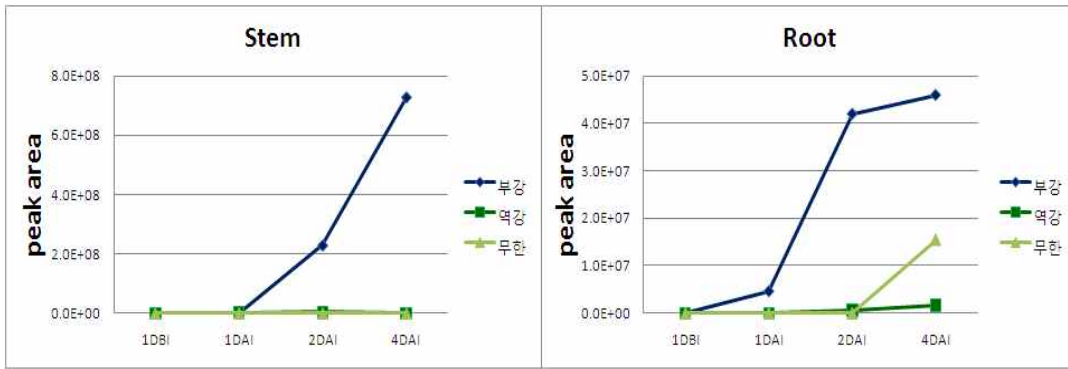


Fig. 12. 대표품종의 capsidiol 생성시기 및 양(1DBI: 접종1일 전, 1DAI: 접종1일 후, 2DAI: 접종2일 후, 4DAI: 접종4일 후)

2. 파프리카 역병 저항성 병리검정 기술 체계 확립

가. 파프리카 품종의 고추 역병균 저항성

o 가지과 작물인 파프리카의 고추 역병에 대한 저항성을 확인하기 위하여 고추 역병균주 *Phytophthora capsici* JHAI 1-7를 사용하여 실험하였다.

o 재료 및 방법

아래의 고추 대표품종 3종(감수성: 부강, 중도저항성: 역강홍장군, 저항성: 무한질주)와 3종의 파프리카 종자를 원예용 상토가 담겨진 50 ml pot에 파종하여 30일간 재배하여 완전 전개된 잎이 2개인 파프리카 유묘에 고추 역병균 JHAI1-7 균주를 접종하였다(Table 5). 접종 방법은 앞의 고추 역병과 동일한 방법으로 하였으며, 접종 농도는 1×10^4 , 3×10^3 sporangia/ml로 하였다. Pot당 5 ml씩 soil drenching법으로 접종하였다. 접종된 고추 및 파프리카는 1일 동안 dew chamber(25℃)에 보관 후 항온실(25℃)에 두어 광처리(12 hr/day)하며 병을 관찰하였다. 파프리카 역병의 병조사는 접종 7일 후에 다음과 같은 발병지수로 달관조사 하였으며, 결과는 이병율로 환산하였다. 0: 병징이 나타나지 않음, 1: 잎이 처지고 뿌리쪽 줄기에 병징이 나타나기 시작, 2: 잎이 마르고, 뿌리쪽 줄기의 병징이 진전되어 식물체의 60%가 시듦, 3: 식물체가 완전히 고사.

Table 5. 실험에 사용된 고추 및 파프리카 품종

종	품명	회사	기타
고추	부강고추	흥농종묘	감수성
	역강홍장군	코레일종묘	중간저항성
	무한질주	신젠타종묘	저항성
파프리카	레드하니	KS종묘	
	오렌지스위트	KS종묘	
	엘로우스위트	KS종묘	

o 결과 및 고찰

- 실험에 사용된 파프리카 3종은 *P. capsici* JHAI1-7 균주에 대해 부강과 비슷한 감수성을 나타내었다(Table 6).
- 따라서 파프리카 역병은 원예용상토에 파종하여 4엽기까지 재배한 파프리카에 1×10^4 sporangia/ml 농도의 *P. capsici* JHAI 1-7 균주를 포트 당 5 ml 씩 접종하고, 25°C의 항온실에서 하루에 12시간 동안 광을 조사하면서 발병 시킨 후 위와 같은 방법으로 0-3의 발병지수로 병조사하여 실험하기로 결정하였다.

Table 6. 파프리카 품종의 역병 이병율

접종농도 (sporangia/ml)	Disease incidence (%)					
	부강고추	역강 홍장군	무한질주	레드하니	오렌지 스위트	옐로우 스위트
3×10^3	100	0	0	80	100	100
1×10^4	100	6.7	0	100	100	100

3. 토마토 역병 저항성 병리검정 기술 체계 확립

가. 토마토 역병 균주의 포자 형성 및 병원성

o 토마토 역병 병 저항성 스크리닝에 사용하기 위한 균주를 선발하기 위하여 확보 균주의 포자 형성량 및 병원성을 실험하였음

o 재료 및 방법

1. V8배지에서 14(20°C)일간 배양한 토마토 균주 8종을 oatmeal agar(OMA) 배지 혹은 V8 juice agar(V8) 배지(직경 13cm)에 접종하였다.
2. 9일(20°C)간 배양한 후 OMA 배지를 광암(12h:12h) 처리 chamber로 이동하여 2주 동안 배양하였다.
3. 2주 동안 광암을 처리하면서 배양한 균주는 찬 멸균수를 plate에 부어준 후, 붓으로 긁은 후 거즈 2겹으로 걸러내고 현미경하에서 혈구계를 사용하여 포자형성량을 조사하였다.
5. 4°C에서 1시간 보관 후에 포자 현탁액을 꺼내어 1×10^4 sporangia/ml 농도가 되도록 조정하였다.
6. 온실에서 재배한 2~3엽기의 토마토(서광토마토) 유묘에 포자현탁액을 분무접종한 후 1일 동안 20°C 습실상에 보관한 후 항온항습실(20°C, 상대습도 70%)에서 병의 발생을 관찰하였다.
7. 접종 4일 후에 토마토 잎에 형성된 병반면적율을 조사하였다.

o 결과 및 고찰

- 토마토 역병균 9종 균주 중 BD081208, PI060825-1, PI060825-2, DART-7, 지변동, PIT 균주들은 포자 형성능이 우수하였으나, 08사기막 감자①, 08사기막 감자②, DN3085 균주는 포자 형성량이 적었다(Table 7).
- 토마토 역병균 9종 균주 중 BD081208, PI060825-1, PI060825-2, DART-7, 지변동, PIT 균주들은 감수성인 서광토마토에 높은 병반면적율을 나타내었으나, 8사기막 감자①, 08사기막 감자②, DN3085 균주는 낮은 병원성을 보였다.
- 그러므로 BD081208, PI060825-1, PI060825-2, DART-7, 지변동, PIT 균주들은 포자 형성능이 우수하고 감수성 토마토 품종에 높은 병반면적율을 나타내었으므로 토마토 역병 병 저항성 검정을 위하여 사용할 수 있으리라 판단되었다.

Table 7. 확보 균주의 포자 형성량 및 병반면적율

No.	균주	배지	포자형성	병반면적율(%)
1	<i>P. infestans</i> BD081208	oatmeal agar	+++	32
2	<i>P. infestans</i> PI060825-1	oatmeal agar	+++	68
3	<i>P. infestans</i> PI060825-2	oatmeal agar	+++	60
4	<i>P. infestans</i> 08사기막 감자①	V8 juice agar	+	0
5	<i>P. infestans</i> 08사기막 감자②	V8 juice agar	+	20
6	<i>P. infestans</i> DN3085	V8 juice agar	+	20
7	<i>P. infestans</i> DART-7	oatmeal agar	+++	45
8	<i>P. infestans</i> 지변동	oatmeal agar	+++	65
9	<i>P. infestans</i> PIT	oatmeal agar	+++	60

+++, 포자형성 우수; ++, 포자형성 보통; + 포자형성 불량

나. 토마토 잎마름역병 균주의 레이스 규명

o 토마토 잎마름역병 저항성 스크리닝에 사용할 균주를 선별하기 위하여 포자형성 및 병원성이 우수한 6종 균주의 레이스를 규명하기 위하여 감수성 및 병저항성 유전자 *Ph-1*, *Ph-2*, *Ph-3*가 각각 포함 된 토마토 역병 저항성 품종 및 라인에 토마토 역병균을 접종하여 병 발생을 조사하였다.

o 실험 방법

1. V8배지에서 14(20℃)일간 배양한 토마토 균주 6종을 oatmeal agar(OMA) 배지(직경 13cm)에 접종하였다.
2. 9일(20℃)간 배양한 후 OMA 배지를 광암(12h:12h) 처리 chamber로 이동하여 2주 동안 배양하였다.
3. 2주 동안 광암을 처리하면서 배양한 균주는 찬 멸균수를 plate에 부어준 후, 붓으로 긁은 후 거즈 2겹으로 걸러내어 포자(유주자낭)을 수확하였다.
4. 4℃에서 1시간 보관 후에 포자 현탁액을 꺼내어 1×10^4 sporangia/ml 농도가 되도록 조정하

였다.

5. 온실에서 재배한 2~3엽기의 5종 토마토 유묘에 포자현탁액을 분무접종한 후 1일 동안 20℃ 습실상에 보관한 후 항온항습실(20℃, 상대습도 70%)에서 병의 발생을 관찰하였다.
6. 접종 4일 후에 토마토 잎에 형성된 병반면적율을 조사하였다.

o 결과 및 고찰

- BD081208 균주를 제외한 5종 균주는 *Ph-1* 저항성 유전자가 포함된 New Yorker 품종에는 감수성 품종과 동일한 병반면적율을 보이고 *Ph-2*와 *Ph-3* 저항성 유전자가 포함된 토마토 품종에서는 거의 병을 일으키지 않으므로 이들은 레이스 T1임을 알 수 있었다(Table 8).
- BD081208 균주는 *Ph-1* 저항성 유전자가 포함된 New Yorker 품종과 *Ph-2*와 *Ph-3* 저항성 유전자가 포함된 토마토 품종들에서 거의 병을 일으키지 않으므로 이들은 레이스 T0임을 알 수 있었다.
- 6균주 중 5종 균주가 T1이고 *Ph-2*와 *Ph-3* 저항성 유전자가 포함된 토마토 품종들을 침입할 수 있는 균주가 없으므로 우리나라 토마토 역병균 균주는 레이스가 단순하리라 판단되었다.
- 그러므로 토마토 역병에 대한 저항성 병리검정을 위해서는 *P. infestans* PIT 균주를 사용하여 검정하기로 결정하였다.

Table 8. *Phytophthora infestans* 균주의 다양한 토마토 품종에 대한 역병 발생

균주	토마토 품종				
	서광토마토	New Yorker (<i>Ph-1</i>)	West Virginia 700 (<i>Ph-2</i>)	CLN2037B (<i>Ph-3</i>)	L3708 (<i>Ph-3</i>)
BD081208	68	17	0	4.3	4.0
PI060825-1	74	61	0.5	7.5	8.0
PI060825-2	81	76	14	11	5.2
DART-7	87	83	4.3	8.5	3.8
지변동	87	93	3.0	7.6	9.5
PIT	99	78	7	13	18

4. 배추 뿌리혹병 저항성 병리검정 기술 체계 확립

가. 관주 접종법을 이용한 효율적인 배추 뿌리혹병 저항성 검정법

(1) 서론

Plasmodiophora brassicae Woron.에 의한 배추 뿌리혹병은 전 세계적으로 발생하여 큰 피해를 주고 있는 주요 토양전염병이다. *P. brassicae*는 절대기생균으로 배추 외에도 양배추, 꽃양배추, 브로콜리, 무 등의 배추과 작물에 뿌리혹병을 일으키며(김 등, 2003; 장 등, 2005), 휴면포자, 유주자, 변형체 등의 형태로 토양에 존재한다(Braselton, 1995). 우리나라에서는 1990년

대 초반부터 배추 재배지역에 이 병이 발생하기 시작하여(Shim 등, 1998), 1990년대 후반에는 뿌리혹병 발생면적이 700여 ha에 달하였으며(Kim 등, 1999), 현재는 전국에 걸쳐 배추, 양배추 등의 배추과 작물에 뿌리혹병이 발생하고 있다.

배추 뿌리혹병을 방제하기 위하여 토양의 pH 조절과 윤작 등의 경종적 방제, 미생물을 이용한 생물학적 방제(Cheah와 Page, 1995; Cheah 등, 2000), 그리고 fluazinam, flusulfamide 및 cyazofamid 등의 살균제를 이용하는 화학적 방제 등에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 그러나 경종적 방제는 뿌리혹병에 대한 방제효과가 낮고, 살균제를 이용한 화학적 방제는 일시적으로 병원균의 밀도를 저하시켜 단기간 내에 방제 효과를 볼 수 있으나 약효가 떨어지면 다시 병원균의 밀도가 높아져 뿌리혹병이 발생하게 된다(Yoshigawa, 1983). 또한 농약의 과다사용으로 인한 경제적 부담과 환경오염 유발 등의 문제점을 야기하고 있다. 따라서 오늘날에는 뿌리혹병 방제를 위하여 저항성 배추 품종의 재배 등 환경친화적인 방법이 요구되고 있다.

배추과 작물의 뿌리혹병 저항성 유전양식은 작물에 따라 다양하게 보고되고 있다. James와 Williams(1980)는 배추의 뿌리혹병 저항성을 단인자 우성으로, Voorrips와 Kanne(1997)는 양배추의 저항성을 2개의 보족유전자로, Laurens와 Thomas(1993)는 케일의 배추 뿌리혹병 저항성을 양적형질로 보고하고 있으나, 아직 이견이 분분하여 앞으로 많은 연구가 필요하다. 한편 병원균의 다양한 분화는 저항성 품종 육성의 가장 큰 어려움 중 하나인데, 그 예로서 저항성 품종을 연작하게 되면 그 품종을 감염할 수 있는 새로운 레이스의 병원균이 출현하여 이 품종의 저항성이 무너지게 된다(Crute와 Pink, 1989). 이를 해결하게 위해서는 병 저항성 유전자가 하나만 포함된 품종이 아니라, gene pyramiding을 통하여 여러 저항성 유전자를 지니는 품종을 개발하는 것이 필요하다. 현재 국내에서는 저항성 품종의 육성(Lee 등, 2001)과 국내 병원균의 race 판별 및 분화(Cho 등, 2003; 김 등, 2003)에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

뿌리혹병 저항성 품종의 육성, 저항성 유전자 규명 및 병저항성 분자마커 개발 등을 위해서는 효율적이고 재현성이 우수한 뿌리혹병 저항성 검정법이 필수적이다. 지금까지 보고된 뿌리혹병균 접종 방법으로는 포자현탁액 침지법(Johnston, 1969; 심 등, 1998), 토양 혼합법(Yoshikawa, 1981; Kuginuki 등, 1997), 이병포장 이식(Lee와 Kim, 2010; 장 등, 2008)과 slurry 방법(Toxopeus와 Janssen, 1975) 등이 보고되었다. 하지만 그 방법이 복잡하고 많은 노동력을 필요로 하며, 침지법과 토양 혼합법 등은 한 개체에 접종되는 포자의 양이 균일하지 않기 때문에 재현성 부족 등의 문제가 발생하고 있다. 하지만 병원균의 휴면포자 현탁액을 토양에 관주 처리 하여 접종하는 관주 접종법은 편리한 접종 방법이나, 이를 이용한 배추 뿌리혹병 저항성 검정에 관해서는 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 토양 관주 접종법을 이용하여 여러 발병 조건에 따른 배추 뿌리혹병 발생을 실험하여 효율적인 배추 뿌리혹병 저항성 검정법을 확립하였다. 또한 확립한 검정법을 이용하여 시판 배추품종 28종의 뿌리혹병 저항성 정도를 조사하였다.

(2) 재료 및 방법

식물 재배

‘노랑김장배추’(홍농씨앗, 문산토코리아) 종자를 5×8육묘용 연결포트(70 ml/pot, 범농사)에 원예용상토 5호(부농사)를 넣고 과종하여 10일 동안 온실(25±5℃)에서 재배한 후 실험에 사용

하였다. 시판되고 있는 배추품종에 대한 뿌리혹병 저항성 검정 실험은 농우바이오, 동부하이텍, 몬산토코리아, 사타카코리아, 신젠타코리아, 제일종묘, 코레곤종묘, 현대종묘 등의 종자회사로부터 뿌리혹병 저항성 품종으로 판매하고 있는 25종 품종(대통배추, 맛춤배추, 부활배추, 불암플러스배추, 아름찬배추, 올품배추, 챔피언배추, 추월배추, CR-고냉지노랑, CR-농심배추, CR-맛배추, CR-맛짱, CR-명가배추, CR-명품, CR-안심배추, CR-알찬, CR-요시마사, CR-장군배추, CR-진심배추, CR-청록배추, CR-키요시, CR-하계배추, CR-황금배추, CR-황록, CR-황태자)과 저항성으로 공시하고 있지 않는 3종 품종(강력여름배추, 노랑김장배추, 삼복엇갈이배추)을 구입하여 위와 동일한 방법으로 재배하여 실험에 사용하였다.

생육시기에 따른 발병 실험에서는 원예용상토 5호에 배추 종자를 파종하고 각각 4, 7, 10, 14일 동안 온실에서 배양한 배추 유묘를 사용하여 실험하였다. 그리고 토양의 종류에 따른 뿌리혹병 발생 실험에서는 원예용상토 5호와 밭토양을 동량으로 섞은 혼합 토양과 원예용상토 5호 등 두 종류 토양에 배추 종자를 파종하여 재배하였으며, *P. brassicae* 강릉 균주의 레이스 검정을 위해서는 원예용상토 5호를 사용하여 양배추 2종 품종('Jersey Queen' 과 'Badger Shipper')과 Rutabaga 2종 품종('Laurentian'와 'Wilhelmsburger')의 종자를 포트 당 1립 씩 파종하여 온실에서 14일간 재배한 후에 접종하였다.

균주 및 접종원 준비

2009년에 강원도 강릉시 왕산면 대기리의 배추 재배포장에서 전형적인 병징을 나타내는 배추뿌리 이병조직을 채집하였다. 뿌리혹병균의 순도를 높이기 위하여 채집한 이병조직을 온실에서 재배한 본엽 2엽기 배추에 접종하여 20℃ 항온항습실에서 1주일 동안 배양한 후 한국화학연구원 발포장에 정식하여 60일 동안 재배하여 증식한 균주를 *P. brassicae* 강릉 균주로 명명하였다.

포장에서 수확한 강릉 균주의 배추 뿌리 이병조직은 -80℃ deep freezer에 보관하면서 실험에 사용하였다. 접종하기 직전에 보관 중인 강릉 균주를 꺼내어 증류수로 수차례 세척하여 이물질이 깨끗이 제거한 후 멸균수를 첨가하여 Warning blender로 마쇄하였다. 그리고 식물조직을 제거하기 위하여 2겹의 가제로 여과하였으며, 준비한 포자현탁액은 광학현미경 하(300배)에서 hemacytometer를 이용하여 포자수를 측정하였다. 멸균수로 희석하여 포자현탁액의 최종농도를 8×10^7 spores/ml로 조정하여 접종원으로 사용하였다. 포자농도에 따른 뿌리혹병 발병 실험에서는 포자현탁액 농도를 2.0×10^7 , 4.0×10^7 , 8.0×10^7 , 1.6×10^8 spores/ml로 조정하여 실험하였다.

접종 및 병 조사

온실에서 재배한 배추 유묘에 포자현탁액을 포트 당 5ml 씩 관주하여 접종하였으며, 접종한 유묘는 20℃ 항온항습실에서 하루에 12시간 광을 처리하며 3일 동안 배양한 후 온실(25±5℃)로 이동하여 수분을 공급하며 재배하였다. 접종 5주 후에 뿌리를 수확하여 뿌리혹 발생 정도에 따라 병을 조사하였다. 조사기준은 0=뿌리혹병 발생이 없음, 1=측근에 뿌리혹이 착생되어 비대정도가 적고 서로 독립하여 존재, 2=측근에 뿌리혹이 착생되며 비대정도가 비교적 큼, 3=주근에 뿌리혹이 착생되며 서로 접합되고 비대정도가 큼, 4=주근에 뿌리혹이 착생되며 서로 접

합되고 비대정도가 매우 큼 등의 5단계로 하였다(Kuginuki 등, 1999; Suwabe 등, 2003).

레이스 검정 실험에서는 평균 발병도가 1.0 이하 일 때 저항성으로, 그리고 1.0 초과이면 감수성으로 판단하였으며, 4개 기주에서의 반응을 저항성과 감수성으로 결정한 후 Williams 레이스 판별기준표에 따라 레이스를 결정하였다(Williams, 1966). 모든 실험은 10반복으로 2회 실시하였으며, SAS(SAS Institute, Inc., 1989, Cary, NC) 프로그램을 이용하여 ANOVA 분석을 하였다. 처리 평균간 비교를 위하여 Duncan's multiple range test ($P=0.05$)를 실시하였다.

(3) 결과 및 고찰

균주 및 레이스 검정

뿌리혹병균의 생리형 분화는 같은 지역 및 포장, 단일 식물체의 뿌리 내에서도 이루어지는 것으로 보고되어(Scot와 Loh, 1985), 기주의 병 저항성과 관련된 기주와 병원균 간의 상호작용을 이해하기 위해서는 단포자 균주 획득이 우선적으로 필요하다(Voorrips 등, 1996). 그러나 장 등(2007)은 71개 단포자 뿌리혹병균을 여러 기주식물에 접종하였을 때, 포장에서와 같은 전형적인 혹 증상을 나타내는 균주가 하나도 없었다고 하였으며, 단포자를 획득되었다 하더라도 충분한 증식이 이루어지지 않아 접종 실험에 사용하기에는 어려움이 따른다고 보고하였다. Voorrips 등(1996)도 단일포자로부터 증식한 균주는 포장균주에 비해 병원성이 훨씬 낮다고 하였다. 따라서 뿌리혹병 저항성 검정법 확립을 위한 본 연구의 실험에 단포자를 분리하여 증식한 뿌리혹병균 균주를 사용하지 않고, 강릉 배추포장에서 채집한 뿌리혹병 이병조직을 다시 배추에 접종하여 무병토에 정식하여 증식한 균주인 '강릉' 균주를 사용하였다.

'강릉' 균주의 레이스를 규명하기 위하여 Williams 판별기주를 이용하여 실험한 결과, rutabaga(Laurentian, Wilhelmsburger)에서는 병원성을 나타내었지만, 양배추 두 품종('Jersey Queen'와 'Badger Shipper')은 이 균주에 저항성을 나타내었다. 따라서 Williams 판별품종을 이용한 레이스 검정 결과에 따라 *P. brassicae* '강릉' 균주는 race 9임을 알 수 있었다(Williams, 1966). Cho 등(2003)도 우리나라의 배추 포장에 race 9가 널리 존재한다고 보고한 바 있다.

토양 종류와 접종원 농도에 따른 뿌리혹병 발생

원예용 상토와 원예용 상토와 밭 토양을 혼합한 토양에서 뿌리혹병 발생을 조사한 결과, 원예용 상토의 경우 접종원의 농도가 증가함에 따라 뿌리혹병 발생이 증가하였다(Fig. 13). 원예용 상토에서 실험한 배추는 포트 당 1.0×10^8 개 포자를 접종하였을 때에는 3 이하의 발병도를 나타냈으나, 포트 당 $2.0 \times 10^8 \sim 8.0 \times 10^8$ 개 포자일 때에는 모두 3 이상의 높은 발병도를 나타내었다.

혼합토양에서는 원예용 상토보다 뿌리혹병이 적게 발생하였으며, 또한 접종원의 농도와 무관한 다양한 병 발생을 보였다. Narisawa 등(2005)은 토양의 공극이 20~40%일 때 뿌리혹병 발생이 최대였다고 보고한 바 있다. 따라서 본 실험에서도 혼합토양에서는 토양의 공극이 적어 위에서 관주처리 하여 접종한 유주자가 아래로 이동하는 것이 어려워 뿌리혹병 발생이 적었다고 생각되었다. 그러므로 접종원 농도와 배추 뿌리혹병 발생량이 정의 상관관계를 나타내는 원예용상토가 뿌리혹병 저항성 검정에 적합한 토양이라고 생각되었다. 그리고 접종원의 농도는 포트 당 4.0×10^8 개와 8.0×10^8 개의 포자를 접종한 처리구가 거의 유사한 뿌리혹병 발병도를

보였으므로, 배추 뿌리혹병 저항성 검정법의 접종원 농도는 포트 당 4.0×10^8 개 포자로 정하였다.

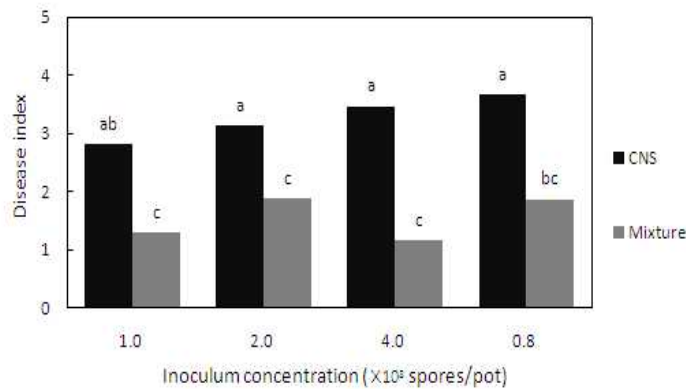


Fig. 13. Clubroot development of Chinese cabbage inoculated with *Plasmodiophora brassicae* 'Gangneung' according to soil type and inoculum concentration. CNS, Commercial horticulture nursery media soil; Mixture, Mixture of CNS and upland soil (1:1, v/v). Columns labeled with the same letter are not significantly different in Duncan's multiple range test ($P = 0.05$).

생육 시기에 따른 발병

과종한 후 온실에서 4일, 7일, 10일, 14일 배양한 배추 유묘에 여러 가지 농도의 뿌리혹병 균을 접종을 하여 뿌리혹병 발생을 조사한 결과, 과종 4일 후 유묘에 접종한 배추의 발병도는 접종한 모든 농도에서 3 이하의 낮은 발병도를 나타냈으며, 과종 7일 후 유묘에 접종한 배추는 가장 낮은 농도인 1.0×10^8 spores/pot를 제외한 나머지 실험구에서는 3 이상의 높은 발병도를 나타내었다(Table 9). 과종 10일과 14일 후 유묘에 접종한 배추는 모든 접종원 농도에서 3 이상의 높은 뿌리혹 발생을 보였다. 즉 배추의 과종 후 생육기간이 증가할수록 배추의 뿌리혹병 발생은 증가함을 알 수 있었다. 포장에서는 배추 뿌리혹병균의 감염시기가 빠를수록 뿌리혹병의 피해정도가 심각하다고 보고하였으나(김 등, 2000a; 2000b), 이는 본 실험과 달리 뿌리혹병균에 감염되는 기간이 증가하기 때문에 나타난 결과로 생각된다. 그리고 많은 식물병의 경우에는 식물이 어릴수록 식물병에 대한 감수성이 증가하는데, 본 실험의 유묘기 배추 간 비교에서는 이와 달리 어린 식물에서 뿌리혹병 발생이 더 낮았는데 이는 뿌리혹병균이 활물기생균이므로 나타난 결과로 추정된다.

Table 9. Clubroot development of Chinese cabbage seedlings according to plant growth stage and inoculum concentration^{a)}

Growth stage (after sowing)	Inoculum concentration ($\times 10^8$ spores/pot)				Mean
	1.0	2.0	4.0	8.0	
4 days	1.8 ^{b)}	2.1	2.2	2.4	2.1
7 days	2.7	3.5	3.4	3.7	3.3
10 days	3.1	3.1	3.7	3.6	3.4
14 days	3.1	3.0	3.3	3.8	3.3

^{a)}Seedlings of Chinese cabbage were inoculated by drenching the spore suspension of *Plasmodiophora brassicae* Gangneung on pots. The plants were incubated in a growth chamber at 20°C for 3 days with 12-hr light a day and then transferred to a greenhouse (25 ± 5°C). Five weeks after inoculation, disease severity of radish seedlings was investigated.

^{b)}Each value represents the mean disease index of two runs with 10 replicates each.

배양기간에 따른 발병

접종 후 배양기간에 따른 발병 정도를 조사하기 위하여 원예용 상토에서 4, 7, 10, 14일 동안 재배한 배추유묘에 여러 가지 포자농도로 접종하고 4주와 5주 후에 발병도를 조사 하였다. 접종 후 5주 동안 배양한 뿌리혹병의 발병도의 평균값은 3.8으로 4주간 배양한 발병도의 평균값 3.2보다 증가하였다(Fig. 14). 접종 후 4주간 배양하였을 때에는 파종 4일 후에 접종한 배추의 발병도는 접종농도가 2.0×10^8 spores/pot 이하로 접종하였을 때 발병도가 3 이하였으며, 접종농도가 4.0×10^8 spores/pot일 때 3 이상의 발병도를 나타내었다. 파종 7일 후에 접종한 배추의 발병도는 접종농도가 1.0×10^8 spores/pot 접종하였을 때 발병도가 3 이하로 나타났고, 접종농도가 2.0×10^8 spores/pot 이상일 때 발병도가 3 이상으로 나타났다. 그러나 파종 10일 이후에 접종하였을 때에는 모든 접종원 농도에서 발병도 3 이상의 높은 발병을 보였다. 하지만 접종 5주 후에 병조사를 하였을 때에는 파종하고 4일에서 14일 유묘에 접종한 모든 실험구에서 3 이상의 높은 발병도를 나타내었다. 따라서 뿌리혹병 저항성 검정을 위해서는 접종 5주 후에 병조사하는 것이 바람직하다고 생각되었다.

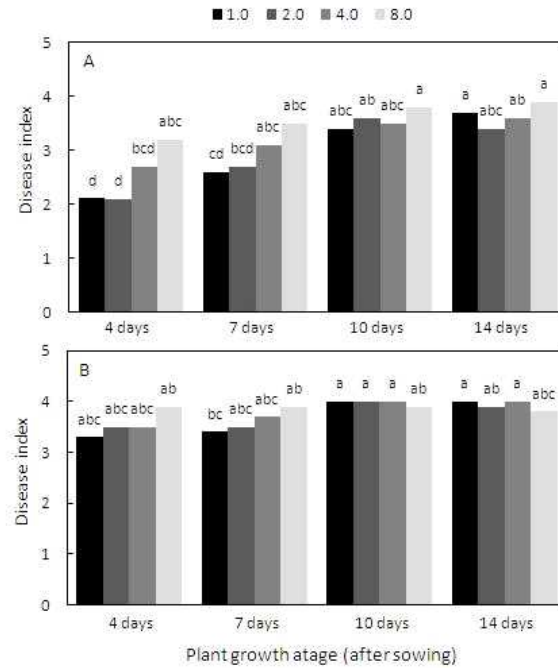


Fig. 14. Clubroot development of Chinese cabbage seedling according to plant growth stage and incubation period. A, 4 weeks after inoculation; B, 5 weeks after inoculation. 1.0 = 1.0×10^8 spores/pot; 2.0 = 2.0×10^8 spores/pot; 4.0 = 4.0×10^8 spores/pot and 8.0 = 8.0×10^8 spores/pot. Columns labeled with the same letter are not significantly different in Duncan's multiple range test ($P = 0.05$).

시판품종의 배추 뿌리혹병 저항성

관주접종법을 이용하여 앞에서 선발한 최적화 조건으로 시판품종 28종 배추의 뿌리혹병 저항성 정도를 실험한 결과, 뿌리혹병에 대하여 저항성 배추품종으로 판매되고 있는 25종 품종은 실험한 강릉균주에 대하여 모두 저항성 반응을 나타내었다(Table 10). 한편 감수성 품종으로 판매되고 있는 3종 품종은 모두 3.5 이상의 높은 뿌리혹병 발생을 보였다. 김 등(2003)은 저항성 배추계통으로 육성된 CR계 품종은 지역이나 재배시기에 따라 이병성, 중도저항성, 저항성 등으로 각기 다르게 나타나 저항성 정도에 일관성이 없는 것으로 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 실험한 모든 CR계 품종들이 '강릉' 균주에 대하여 뚜렷한 저항성 반응을 나타내었으므로 확립한 '강릉' 균주를 이용한 배추 뿌리혹병 저항성 검정법은 효율적이고 재현성이 우수한 방법이라는 것을 알 수 있었다.

Table 10. The degree of resistance of 28 commercial Chinese cabbage cultivars to 'Gangneung' isolate of *Plasmodiophora brassicae*^a

Cultivar	Trait ^b	Seed company	Disease index ^c
Ahreumchan	CR	Syngenta Korea	0 b
Buhwal	CR	Monsanto Korea	0 b
Bulam Plus	CR	Monsanto Korea	0 b
Champion	CR	Monsanto Korea	0 b
Chuwol	CR	Nongwoobio	0 b
CR-Alchan	CR	Dongbu Hitek	0 b
CR-Ansim	CR	Syngenta Korea	0 b
CR-Cheongrok	CR	Monsanto Korea	0 b
CR-Gonaengjinorang	CR	Hyundai Seed	0 b
CR-Hagye	CR	Nongwoobio	0 b
CR-Hwanggeum	CR	Syngenta Korea	0.2 b
CR-Hwangrok	CR	Koregon	0 b
CR-Hwangtaeja	CR	Hyundai Seed	0 b
CR-Janggun	CR	Sakata Korea	0 b
CR-Jinsim	CR	Syngenta Korea	0 b
CR-Kiyoshi	CR	Koregon	0 b
CR-Mat	CR	Nongwoobio	0 b
CR-Matjjang	CR	Dongbu Hitek	0 b
CR-Myeongga	CR	Jeil Seed	0 b
CR-Myeongpum	CR	Sakata Korea	0 b
CR-Nongshim	CR	Syngenta Korea	0 b
CR-Yosimasa	CR	Koregon	0 b
Daetong	CR	Nongwoobio	0 b
Matchum	CR	Nongwoobio	0 b
Olpum	CR	Syngenta Korea	0 b
Gangryeokyeoreum	S	Monsanto Korea	3.5 a
Noranggimjang	S	Monsanto Korea	3.8 a
Sambokeotgalyi	S	Monsanto Korea	3.7 a

^aSeedlings of 28 commercial cultivars were inoculated by drenching the spore suspension of *Plasmodiophora brassicae* 'Gangneung' on pots to give inoculum density of 4.0×10^8 spores/pot. The plants were incubated in a growth chamber at 20°C for 3 days with 12 hr light a day and then transferred to a greenhouse (25 ± 5°C). Five weeks after inoculation, disease severity of radish seedlings was investigated.

^bCR : resistant cultivar to clubroot, S : susceptible cultivar to clubroot.

^cEach value represents the mean disease index of two runs with 10 replicates each. Values

in the labeled with the same letter are not significantly different in Duncan's multiple range test ($P = 0.05$).

나. 국내 재배포장에서 수집한 뿌리혹병균(*Plasmodiophora brassicae*) 균주들에 대한 배추 품종들의 저항성 반응

(1) 서론

우리나라에서 배추(*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*)는 김치의 주재료로, 여름의 고령지 재배, 겨울의 난지 재배 그리고 봄 가을의 일반 재배를 통하여 연중 생산하고 있는 가장 중요한 채소 중 하나이다. 그런데 1990년대 후반부터 배추에 *Plasmodiophora brassicae* Woron.에 의한 뿌리혹병(clubroot)이 심하게 발생하여 배추의 품질을 떨어뜨릴 뿐만 아니라 생산량 감소를 초래하고 있다(Cho et al., 2003). *P. brassicae*는 인공배지에서 배양되지 않는 활물기생균으로, 배추뿐만 아니라 양배추, 무 등 거의 모든 십자화과 작물에 뿌리혹병을 일으켜 전 세계적으로 피해를 주고 있다. 뿌리혹병균은 병든 조직에 무수히 많은 휴면포자를 형성하고, 이것은 휴면포자로 토양에서 월동하는데 환경이 적합하면 7년 이상 생존한다고 알려져 있다(Karling 1968). 배추 뿌리혹병을 방제하기 위해서는 살균제를 이용한 화학적 방제 및 석회질 시비를 통한 토양 pH 조정 등의 경종적 방법이 있지만 이러한 방법으로 완벽한 방제는 어렵다(Voorrips, 1995).

환경 및 경제적 측면에서, 배추 뿌리혹병을 방제하기 위한 가장 효과적인 방법 중 하나는 저항성 품종 재배인데, 우리나라에도 여러 종자회사에서 개발한 많은 저항성 품종들이 판매되고 있다. 배추의 뿌리혹병 저항성은 European fodder turnip인 Siloga, Milan White, Gelria 및 Debra로부터 도입되었으며, *B. rapa*에는 최소한 8개의 저항성 유전자가 있다고 보고되었다(Hirai 2006; Piao et al., 2009). Siloga로부터 *Crr1*, *Crr2* 및 *Crr4* 유전자가, Milan White로부터 *Crr3*이, Gelria R과 ECD02(136-8)로부터 각각 *CRb*와 *CRa* 유전자가, 그리고 Debra로부터 *CRk*와 *CRc* 저항성 유전자가 알려져 있다. 하지만 아직 정확한 유전자 분석과 역할에 대해서는 보고되어 있지 않다.

뿌리혹병균은 기주의 종 및 계통에 따라 다양한 병원성 반응을 보인다고 알려져 왔다(Buczacki et al., 1975; Tanaka et al., 1998; Williams, 1966). 따라서 뿌리혹병균의 레이스 동정을 위하여 양배추 2품종과 rutabaga 2품종을 이용하여 16개의 레이스로 구분하는 Williams(1966) 방법과 ECD(European clubroot differentials) 품종을 사용하는 방법이 유럽과 북미 지역에서 널리 사용되어 왔다(Buczacki et al., 1975). Yoshikawa (1981)에 의하면, 일본에서는 European fodder turnip을 이용하여 뿌리혹병에 저항성(CR, clubroot resistance)인 배추 품종을 50개 이상 육성하여 일본에 출시하였다. 그런데 저항성 배추 품종을 재배한 이후에 이들을 침해하는 뿌리혹병균이 출현하여 대부분의 CR 품종의 저항성이 무너지는 일이 발생했다(Tanaka et al., 1998; Kuginuki et al., 1999). 한편 Hatakeyama 등(2004)은 뿌리혹병균의 레이스 동정을 위해 기존에 사용하여온 Williams 판별법보다 CR 배추 품종을 침해하는 뿌리혹병균에 저항성 차이를 보이는 CR 품종인 Super CR Hiroki와 Ryutoku 그리고 감수성 한 품종을 이용하여 뿌리혹병균의 레이스를 동정하는 것이 더 효율적이며, 일본에는 3품종에서의 반응에 따라 4가지 그룹의 뿌리혹병균이 존재한다고 보고하였다. 하지만 우리나라에서는 아직 CR 배

추를 침해하는 뿌리혹병균에 관한 자세한 보고가 없을 뿐만 아니라, 뿌리혹병균 레이스와 CR 배추 품종들의 저항성과의 관계도 알려지지 않았다.

본 연구에서는 뿌리혹병균의 레이스와 CR 배추의 뿌리혹병 저항성과의 관계를 규명하기 위하여, 우리나라 배추 주산지로부터 뿌리혹병균을 채집하고 Williams 관별품종에 따라 이들의 레이스를 동정하였으며, 여러 종자회사에서 판매하고 있는 뿌리혹병 저항성 배추 품종을 25종 구입하여 이들 균주에 대한 저항성을 조사하였다.

(2) 재료 및 방법

공시품종 및 육묘

여러 종자회사로부터, 뿌리혹병에 대한 저항성 품종으로 판매하는 배추품종 25종(대통배추, 맛춤배추, 부활배추, 불암플러스배추, 아름찬배추, 올품배추, 챔피온배추, 추월배추, CR고냉지노랑, CR농심배추, CR맛배추, CR맛짱, CR명가배추, CR명품, CR안심배추, CR알찬, CR요시마사, CR장군배추, CR진심배추, CR청록배추, CR키요시, CR하계배추, CR황금배추, CR황록, CR황태자)과 일반 품종 3종(강력여름배추, 노랑김장배추, 삼복엇갈이배추)의 종자를 구입하였다. 5×8육묘용 연결포트(70 mL·pot⁻¹, 범농사)에 원예용상토 5호(부농사)를 넣고 각 품종의 종자를 포트 당 1립씩 파종하여 온실(25±5℃)에서 10일 동안 재배한 유묘를 실험에 사용하였다.

수집한 뿌리혹병균의 레이스 검정 실험은 Williams 관별 기주인 양배추 2종(Jersey Queen, Badger Shipper)과 rutabaga 2종(Laurentian, Wilhelmsburger)의 종자를 배추와 동일한 방법으로 파종하고 온실에서 14일간 재배한 후 실험에 이용하였다.

P. brassicae 균주

2009년부터 2010년까지 대전시(DJ), 경기도 연천군(YC), 충청남도 서산시(SS), 충청북도 괴산시(GS), 전라남도 해남군(HN1, HN2) 그리고 강원도 강릉시(GN), 황성군(HS), 정선군(JS), 평창군(PC) 등의 배추 및 양배추 재배포장 10곳에서 전형적인 뿌리혹병을 보이는 뿌리를 채집하였다(Table 11). 채집한 시료는 -80℃ deep freezer에 보관하면서 실험에 사용하였다. 이들 중 연천, 정선 및 강릉 지역에서 채집한 균주들은 증식하여 실험에 사용하였다. 각 균주의 이병조직 1g으로부터 휴면포자를 수확하고, 감수성 배추 품종인 노랑김장배추(몬산토코리아사)를 파종하여 온실에서 재배한 본엽 2엽기 유묘 100주에 준비한 뿌리혹병균을 접종하였다. 접종한 식물은 20℃ 항온항습실에서 1주일 동안 배양한 후 큰 포트에 이식하여 온실(20±5℃)에서 60일 동안 재배한 뿌리를 수확하고 사용할 때까지 deep freezer에 저장하였다.

뿌리혹병균의 접종을 위하여, 보관 중인 이병조직을 꺼내어 증류수로 수 차례 세척하여 이물질을 제거한 후 여기에 멸균수를 첨가하여 Warning blender로 마쇄하였다. 그리고 2겹의 가제로 여과하여 식물조직을 제거한 뿌리혹병균의 포자 현탁액을 준비하였다. 현탁액의 포자 농도를 조사하기 위하여 광학현미경 하(300배)에서 hemocytometer를 이용하여 휴면포자의 수를 측정하였다(Jo et al., 2010). 그리고 멸균수로 희석하여 실험하고자 하는 농도의 포자현탁액을 제조하였는데, 뿌리혹병균의 레이스 검정 실험은 1.6×10^8 spores·mL⁻¹로 그리고 이들에 대한 배추 품종들의 저항성 반응 실험은 8.0×10^7 spores·mL⁻¹이 되도록 하였다.

Table 11. List of 10 field isolates of *Plasmodiophora brassicae* used in this study

Isolate	Districts of collection	Host	Year
DJ	Daejeon-si	Chinese cabbage	2009
GS	Goesan-gun, Chungcheongbuk-do	Cabbage	2009
GN	Gangneung-si, Gangwon-do	Chinese cabbage	2009
HN1	Haenam-gun, Jeollanam-do	Chinese cabbage	2010
HN2	Haenam-gun, Jeollanam-do	Chinese cabbage	2010
HS	Hoengseong-gun, Gangwon-do	Chinese cabbage	2010
JS	Jeongseon-gun, Gangwon-do	Chinese cabbage	2009
PC	Pyeongchang-gun, Gangwon-do	Chinese cabbage	2010
SS	Seosan-si, Chungcheongnam-do	Chinese cabbage	2009
YC	Yeoncheon-gun, Gyeonggi-do	Chinese cabbage	2009

뿌리혹병원균 접종 및 병조사

온실에서 재배한 배추 및 Williams 관별 기주 4종에 각각의 뿌리혹병원균 포자현탁액을 포트 당 5mL씩 관주하여 접종하였다. 접종한 유묘는 20°C 항온습실에서 하루에 12시간 동안 광을 처리하며 3일 동안 배양한 후에 온실(20 ± 5°C)로 이동하여 수분을 공급하며 재배하였다. 배추는 접종 5주 후에 그리고 레이스 관별품종은 6주 후에 뿌리에 발생한 뿌리혹병 정도에 따라 발병도를 조사하였다. 조사기준은 0=뿌리혹병 발생이 없음, 1=측근에 뿌리혹이 착생되어 흑의 크기가 적고 서로 독립하여 존재, 2=측근에 뿌리혹이 착생되며 흑의 크기가 비교적 큼, 3=주근에 뿌리혹이 착생되며 서로 접합되고 흑의 크기가 큼, 4=주근에 뿌리혹이 착생되며 서로 접합되고 흑의 크기가 매우 큼 등의 5단계로 하였다(Kuginuki et al., 1999; Suwabe et al., 2003).

뿌리혹병원균의 레이스 검정 실험에서는 평균 발병도가 1.0 이하일 때는 저항성으로, 그리고 1.0 초과이면 감수성으로 판단하였으며, 4개 기주에서의 반응을 조사한 후에 Williams 레이스 관별기준표에 따라 레이스를 동정하였다(Williams, 1966). 본 연구에서는 포장 균주를 사용하여 실험하므로 뿌리혹병원균의 레이스 동정과 이들 균주에 대한 28종 배추 품종의 저항성 실험은 뿌리혹병원균을 동시에 접종하였다. 그리고 모든 실험은 10반복으로 2회 실시하였다.

(3) 결과 및 고찰

뿌리혹병원균의 레이스

Williams(1966)의 레이스 관별 기주인 양배추 2종(Jersey Queen, Badger Shipper)과 rutabaga 2종(Laurentian, Wilhelmsburger)을 이용하여, 포장에서 채집한 뿌리혹병원균의 레이스를 동정한 결과, 뿌리혹병원균들은 레이스 2, 4, 5 및 9로 확인되었다(Table 12). 그리고 실험한 모든 균주는 감수성 품종인 강력여름배추, 삼복엇갈이배추 및 노랑김장배추에 높은 발병도의 뿌리혹병 발생을 보이므로, 실험한 균주들은 모두 병원성이 있는 뿌리혹병원균이라는 것을 알 수

있었다(Table 3). HS와 YC 균주들은 4종 기주 중 Wilhelmsburger에만 저항성을 나타내고 나머지 품종에서는 뿌리혹병이 많이 발생하여 레이스 2로 동정되었으며, GN, JS, PC 및 GS 균주들은 rutabaga 두 품종에서는 병원성을 나타내었지만, 양배추 두 품종은 이들 균주에 저항성을 보여 레이스 9로 확인되었다(Table 2). 한편, HN1과 HN2 균주는 모든 기주에 병원성을 나타내는 레이스 4였으며, 이와 반대로 DJ와 SS 균주는 모든 기주가 이들에 저항성이므로 레이스 5로 동정되었다. 우리나라에서 레이스 2와 4는 가장 우점하는 레이스이며, 레이스 9 또한 배추에서 많이 발견되는 레이스 중 하나이다(Cho et al., 2003; Jang et al., 2007). 한편 레이스 5는 우점 레이스는 아니지만 배추와 양배추 그리고 순무에서 보고된 바 있다(Cho et al., 2003).

Table 12. Race determination of 10 field isolates of *Plasmodiophora brassicae* using the differential varieties of Williams (1966) ^z.

<i>P. brassicae</i> isolate	Host				Race
	Jersey Queen	Badger Shipper	Laurentian	Wilhelmsburger	
DJ	0.0 ± 0.0 ^y (R ^x)	0.0 ± 0.0 (R)	0.7 ± 0.5 (R)	0.1 ± 0.0 (R)	5
GN	0.7 ± 0.8 (R)	0.0 ± 0.0 (R)	3.5 ± 0.7 (S)	2.4 ± 0.5 (S)	9
GS	0.5 ± 0.5 (R)	0.0 ± 0.0 (R)	3.9 ± 0.3 (S)	2.4 ± 0.7 (S)	9
HN-1	4.0 ± 0.0 (S)	4.0 ± 0.0 (S)	4.0 ± 0.0 (S)	4.0 ± 0.0 (S)	4
HN-2	4.0 ± 0.0 (S)	3.5 ± 0.5 (S)	4.0 ± 0.0 (S)	4.0 ± 0.0 (S)	4
HS	4.0 ± 0.0 (S)	3.8 ± 0.4 (S)	4.0 ± 0.0 (S)	0.6 ± 0.4 (R)	2
JS	0.7 ± 0.6 (R)	0.0 ± 0.4 (R)	2.7 ± 0.9 (S)	2.6 ± 0.5 (S)	9
PC	0.9 ± 0.3 (R)	0.1 ± 0.3 (R)	3.4 ± 0.8 (S)	2.6 ± 0.5 (S)	9
SS	0.3 ± 0.4 (R)	0.0 ± 0.0 (R)	0.7 ± 0.8 (R)	0.4 ± 0.4 (R)	5
YC	3.9 ± 0.3 (S)	3.7 ± 0.5 (S)	3.8 ± 0.6 (S)	0.2 ± 0.4 (R)	2

^z14-day-old seedlings were inoculated with *P. brassicae* by drenching the roots with the spore suspension of each isolate to give inoculum density of 8.0×10^8 spores·pot⁻¹. The plants were incubated in a growth chamber at 20°C for 3 days with 12-hr light a day and then transferred to a greenhouse (20 ± 5°C). Six weeks after inoculation, disease severity of seedlings was rated on a scale 0 to 4. 0, no symptoms, 1, a few very small, separate globular clubs on lateral roots; 2, medium, separate globular clubs on lateral roots; 3, intermediate symptoms on main roots; and 4, severe clubs on main roots.

^yEach value represents the mean (± standard deviation) of two runs with 10 replicates each.

^xS, susceptible (disease index ≥ 1.0); R, resistant (disease index < 1.0).

한편 본 실험의 뿌리혹병원균들은 Fig. 15에서와 같이 지리적으로 유사한 지역에서 수집한 균주들은 동일한 레이스로 동정되었다. 기존에 보고된 것과 달리 이 결과는 뿌리혹병원균의 이동 및 분화가 빈번하지 않다는 것을 제시하고 있으나, 이것은 다양한 지역에서 많은 균주를 채집하여 확인할 필요가 있다(Buczacki et al., 1975; Jones et al., 1982).

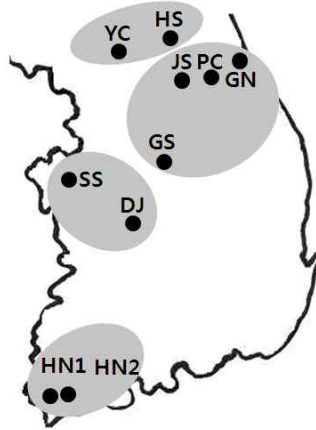


Fig. 15. Field isolates of *Plasmodiophora brassicae* collected from ten regions in Korea. The grouped isolates were determined as same races by differential varieties of Williams. DJ, Daejeon; GS, Goesan; GN, Gangneung; HN, Haenam; HS, Hoengseong; JS, Jeongseon; PC, Pyeongchang; Ss, Seosan; YC, Yeoncheon.

포장 균주들에 대한 CR 품종의 저항성

여러 지역에서 수집한 뿌리혹병원균 10종에 대한 CR 배추 품종 25종의 저항성 정도를 조사한 결과, 모든 CR 배추 품종은 접종한 균주에 따라 저항성 혹은 감수성 반응을 나타냈다 (Table 13). 그리고 각 균주에 의해 발생하는 25개 CR 품종의 뿌리혹병 발병도는 거의 유사하였다.

실험한 뿌리혹병원균들은 CR 품종에서의 반응에 따라 두 그룹으로 나눌 수 있었다 (Table 13). 그룹 1에 속하는 DJ, GS, GN, HS 및 JS 균주를 CR 배추 품종에 접종한 경우에는 모든 CR 품종의 발병도가 1.0 미만이었으므로, CR 배추들은 이들 균주에 저항성임을 알 수 있었다. 반면 그룹 2에 속하는 SS, HN1, HN2, PC 및 YC 균주에 의해서는 모든 CR 품종이 3.5 이상의 높은 발병도를 보여, 이들 뿌리혹병원균에 의해 CR 배추 품종의 저항성이 무너지는 것을 알 수 있었다. 일본에서는 50품종 이상의 CR 배추 품종이 개발되었으나 거의 모든 CR 배추 품종의 저항성이 무너졌다 (Tanaka et al., 1998; Kuginuki et al., 1999). 한편, 우리나라에서는 1995년부터 CR 배추 품종이 개발되었으며, 현재에는 우리도 일본과 마찬가지로 다양한 CR 배추 품종을 침해하는 뿌리혹병원균이 포장에 널리 존재하고 있다고 생각되었다.

*B. rapa*에 속하는 European fodder turnip인 Siloga, Gelia R, Milan White 및 Debra에 뿌리혹병 등에 대한 저항성 유전자가 존재한다고 알려져 있었다. 일본에서는 이들로부터 저항성 유전자를 도입하여 CR 배추를 육성하였다고 알려져 있으나, 자세한 육성 과정에 대해서는 보고된 바 없다 (Yoshikawa, 1981). CR 배추에 병을 일으키는 뿌리혹병원균이 출현한 이후에 포

장 균주를 채집하여 CR 배추 품종들의 저항성을 조사한 결과, CR 품종들은 크게 두 그룹으로 구분되며 이들 품종의 반응에 따라 뿌리혹병균들은 4그룹에 속하였다(Kuginuki et al., 1999; Hatakeyama et al., 2004). 그룹 1은 두 CR 품종 모두를 침해하는 균주, 그룹 2와 그룹 3은 한 쪽 품종에만 병을 일으키는 균주, 그리고 그룹 4는 양쪽 CR 품종을 모두 감염할 수 없는 균주로 구분하였다. 하지만 우리의 결과에서는 여러 회사로부터 CR 배추 품종을 구입하였음에도 불구하고 각 균주에 대한 CR 품종들의 반응은 거의 차이가 없었다(Table 13). 따라서 실험한 CR 배추 품종들의 저항성 유전자원은 다양성이 낮으며, 거의 동일할 지도 모른다고 생각되었다.

European fodder turnip의 뿌리혹병에 대한 저항성 유전자는 Siloga, Milan White, Gelria 및 Debra 등에 8개 이상이 있다(Hirai, 2006; Piao et al., 2009). 그리고 많은 학자들은 *B. rapa*의 뿌리혹병 저항성은 이들은 단인자 우성 유전자에 의한 것이라고 보고하였다(Fuchs and Sacristán, 1996; Hirai et al., 2004; Piao et al., 2002; Strandberg and Williams, 1967; Suwabe et al., 2003). 그러나 Yoshikawa(1981)는 *B. rapa*에서 1개의 주동 유전자와 몇 개의 보족 유전자가 뿌리혹병에 대한 저항성을 나타낸다고 하였다. 한편, 배추의 뿌리혹병 저항성 유전은 단인자 우성인 하나의 저항성 유전자가 저항성 반응에 관여한다고 알려져 있다(James and Williams, 1980; Kuginuki et al., 1999; Yoshikawa, 1993). 그러나, 실제로 European fodder turnip들로부터 배추에 도입된 CR 저항성 유전자는 무엇인지 혹은 한 품종에 몇 개의 저항성 유전자가 도입되었는지에 대해서는 보고된 바 없다. 본 연구에서 그룹 1에 속하는 GN, JS, GS, PC 및 DJ 균주에 대해 CR 품종들은 모두 고도의 저항성을 나타내었으나, 그룹 2에 속하는 SS, HN1, HN2, PC 및 YC 균주들은 실험한 CR 배추 품종에서 감수성 품종과 거의 동일한 정도로 높은 뿌리혹병 발생을 보였다(Table 13). Cho et al.(2008)은 CR 새로운 품종의 뿌리혹병 저항성이 단인자 우성 유전자에 의해 나타낸다고 하였으며, Lee et al.(2001)도 육성한 CR 배추 품종이 단인자 우성 유전을 한다고 하였다. 따라서 본 실험의 CR 배추 품종들도 단인자 우성의 1개 유전자가 뿌리혹병에 대한 저항성을 나타내고, 이 유전자를 극복할 수 있는 뿌리혹병균의 출현에 의해 CR 품종들의 저항성이 무너진다고 생각되었다.

본 연구에서는 2개 이상의 균주가 포함된 4종 레이스의 뿌리혹병균에 대한 CR 배추 품종의 저항성을 조사하였는데, 이들 중 레이스 4를 제외한 3개 레이스의 뿌리혹병균들은 레이스가 동일함에도 불구하고 CR 품종의 반응은 상반되게 나타났다(Table 13). HS와 YC 균주는 모두 레이스 2임에도 불구하고 HS 균주에 대해서는 CR 배추 품종이 저항성 반응을 나타냈으나, YC 균주에는 감수성을 나타내었다. 또한 DJ와 SS 균주는 레이스 5인데 CR 배추 품종이 DJ에 대해서는 저항성을 보였으나, HM 균주에는 감수성을 나타내었다(Fig. 16). 그리고 레이스 9인 PC, GN, JS 및 GS 균주 중 PC 균주를 제외한 나머지 3개 균주들에는 저항성을 보였으나, PC 균주에는 감수성이었다. 이는 같은 레이스의 균주이지만 병원균의 분화로 인하여 CR 배추 품종에 대한 병원성이 달라졌다고 추측되었다. Williams 판별기주에 의한 레이스 2 뿌리혹병균은 Wilhelmsburger의 저항성 유전자에 반응하여 기주를 감염할 수 없고, 레이스 9는 Jersey Queen과 Badger Shipper에 그리고 레이스 5는 4종 기주 모두의 저항성 유전자에 반응하여 병을 일으키지 못 한다. 따라서 본 연구에서 사용된 뿌리혹병균들 중 같은 레이스이나 CR 품종의 반응이 다른 균주를 포함하는 레이스 2, 5 및 9에는 Williams 판별 기주 4종의 저항성 유전자들에 반응하는 균주가 모두 포함되어 있다. 그러므로 본 연구의 CR 배추(*B. rapa* ssp. *pekinensis*)의 뿌리혹병 저항성 유전자는 Williams 판별 기주인 양배추(*B. oleraceae*) 2종

(Jersey Queen, Badger Shipper)과 rutabaga(*B. napobrassica*) 2종(Laurentian, Wilhelmsburger)의 저항성 유전자는 다르다고 생각되었다.

우리나라의 CR 배추 품종 저항성 유전자의 종류와 역사는 알려지지 않지만(Cho et al. 2008), 우리나라의 CR배추 품종 육종에 사용되고 있는 저항성 유전자는 일본에서 유입되었다고 알려져 있다(Hirai et al., 2004). 본 연구에서 특정 뿌리혹병균에 대하여 모든 CR 배추 품종이 유사한 반응을 나타내는 것으로 볼 때, 육종회사에서 사용하는 뿌리혹병 저항성 유전자 source가 거의 동일하거나 상당히 단순하리라 생각되었다. 그리고 채집한 균주의 50%가 개발된 CR 배추 품종의 저항성을 무너뜨리는 뿌리혹병균이므로, 저항성 품종을 침해하는 균주가 이미 포장에 많이 분포하고 있으리라 생각된다. 따라서 뿌리혹병균 저항성 품종 육종에 다양한 뿌리혹병 저항성 유전자를 이용하는 것이 바람직하며, gene pyramiding에 의해 2개 이상의 유전자가 도입된 저항성 품종을 개발하는 것이 시급하다.

Table 13. The degree of resistance of 28 commercial Chinese cabbage cultivars to 10 field isolates of *Plasmodiophora brassicae*²

Cultivar	Trait	HS (Race 2)	YC (Race 2)	HN1 (Race 4)	HN2 (Race 4)	DJ (Race 5)
Ahreumchan	CR ^y	0.3±0.6 ^x	3.5±0.7	4.0±0.0	3.6±0.7	0.0±0.0
Buhwal	CR	0.4±0.5	3.8±0.4	4.0±0.0	3.6±0.5	0.2±0.6
Bulam Plus	CR	0.1±0.3	3.9±0.3	4.0±0.0	3.7±0.6	0.0±0.0
Champion	CR	0.7±0.9	3.7±0.5	4.0±0.0	3.8±0.4	0.0±0.0
Chuwol	CR	0.6±0.9	3.7±0.6	4.0±0.0	4.0±0.0	0.2±0.6
CR-Alchan	CR	0.6±1.0	3.4±0.5	4.0±0.0	3.2±0.6	0.0±0.0
CR-Ansim	CR	0.3±0.6	3.8±0.4	4.0±0.0	3.7±0.6	0.0±0.0
CR-Cheongrok	CR	0.3±0.6	3.6±0.5	4.0±0.0	3.7±0.5	0.0±0.0
CR-Gonaengjinorang	CR	0.6±0.7	3.5±0.5	4.0±0.0	3.2±0.7	0.0±0.0
CR-Hagye	CR	0.2±0.4	3.5±0.7	4.0±0.0	3.6±0.8	0.0±0.0
CR-Hwanggeum	CR	0.1±0.3	3.9±0.3	4.0±0.0	3.3±0.8	0.5±0.0
CR-Hwangrok	CR	0.3±0.5	3.1±0.9	4.0±0.0	2.4±0.9	0.0±0.8
CR-Hwangtaeja	CR	0.5±0.5	3.8±0.4	4.0±0.0	3.9±0.3	0.0±0.0
CR-Janggun	CR	0.6±0.7	3.7±0.5	4.0±0.0	3.8±0.4	0.0±0.0
CR-Jinsim	CR	0.2±0.4	3.7±0.5	4.0±0.0	3.5±0.7	0.2±0.6
CR-Kiyoshi	CR	0.0±0.0	3.9±0.3	4.0±0.0	3.9±0.3	0.0±0.0
CR-Mat	CR	0.5±0.5	3.6±0.5	4.0±0.0	3.7±0.6	0.0±0.0
CR-Matjjang	CR	0.6±0.7	3.3±0.6	4.0±0.0	3.6±0.5	0.0±0.0
CR-Myeongga	CR	0.9±0.5	3.6±0.5	4.0±0.0	3.0±0.9	0.0±0.0
CR-Myeongpum	CR	0.5±0.8	3.7±0.5	4.0±0.0	4.0±0.0	0.0±0.0
CR-Nongshim	CR	0.3±0.6	3.5±0.5	4.0±0.0	3.3±0.8	0.0±0.0
CR-Yosimasa	CR	0.5±0.5	3.7±0.5	4.0±0.0	3.2±0.7	0.0±0.0
Daetong	CR	0.5±0.7	3.8±0.6	4.0±0.0	3.9±0.3	0.0±0.0
Matchum	CR	0.2±0.4	3.6±0.7	4.0±0.0	4.0±0.0	0.0±0.0

Olpum	CR	0.1±0.3	3.7±0.5	4.0±0.0	3.9±0.3	0.0±0.0
Gangryeokyeoreum	-	4.0±0.0	3.6±0.7	4.0±0.0	3.7±0.6	2.6±0.7
Noranggimjang	-	4.0±0.0	4.0±0.0	4.0±0.0	4.0±0.0	3.0±0.8
Sambokeotgalyi	-	3.8±0.4	3.7±0.5	4.0±0.0	3.8±0.4	2.1±0.3

Cultivar	Trait	SS (Race 5)	GN (Race 9)	JS (Race 9)	GS (Race 9)	PC (Race 9)
Ahreumchan	CR ^y	4.0±0.0	0.4±0.5	0.3±0.9	0.0±0.0	3.8±0.4
Buhwal	CR	4.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	3.9±0.3
Bulam Plus	CR	4.0±0.0	0.4±0.5	0.0±0.0	0.0±0.9	4.0±0.0
Champion	CR	3.7±0.6	0.0±0.0	0.0±0.0	0.3±0.0	3.9±0.3
Chuwol	CR	4.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.9	4.0±0.0
CR-Alchan	CR	4.0±0.0	0.5±0.9	0.4±0.8	0.3±0.0	4.0±0.0
CR-Ansim	CR	4.0±0.0	0.1±0.3	0.0±0.0	0.0±0.0	4.0±0.0
CR-Cheongrok	CR	4.0±0.0	0.1±0.3	0.0±0.0	0.0±0.0	3.7±0.5
CR-Gonaengjinorang	CR	3.9±0.3	0.2±0.4	0.0±0.0	0.0±0.0	4.0±0.0
CR-Hagye	CR	4.0±0.0	0.5±0.5	0.0±0.0	0.0±0.0	4.0±0.0
CR-Hwanggeum	CR	4.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	3.9±0.3
CR-Hwangrok	CR	4.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	3.7±0.6
CR-Hwangtaeja	CR	3.7±0.6	0.4±0.5	0.0±0.0	0.0±0.0	4.0±0.0
CR-Janggum	CR	4.0±0.0	0.3±0.5	0.2±0.6	0.0±0.0	3.8±0.4
CR-Jinsim	CR	4.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.4±1.2	3.6±0.5
CR-Kiyoshi	CR	4.0±0.0	0.3±0.5	0.0±0.0	0.0±0.0	4.0±0.0
CR-Mat	CR	4.0±0.0	0.2±0.4	0.0±0.0	0.0±0.0	4.0±0.0
CR-Matjjang	CR	3.9±0.3	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	4.0±0.0
CR-Myeongga	CR	3.9±0.3	0.2±0.4	0.0±0.0	0.0±0.0	3.9±0.3
CR-Myeongpum	CR	3.8±0.6	0.7±0.6	0.1±0.3	0.0±0.0	4.0±0.0
CR-Nongshim	CR	4.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±1.1	3.1±1.0
CR-Yosimasa	CR	3.9±0.3	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.3	3.9±0.3
Daetong	CR	4.0±0.0	0.2±0.4	0.0±0.0	0.3±0.6	3.9±0.3
Matchum	CR	4.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	4.0±0.0
Olpum	CR	4.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	3.3±0.8
Gangryeokyeoreum	-	4.0±0.0	3.9±0.3	3.3±0.6	3.2±0.0	3.9±0.3
Noranggimjang	-	4.0±0.0	3.8±0.4	3.8±0.4	3.9±0.0	4.0±0.0
Sambokeotgalyi	-	4.0±0.0	3.8±0.4	3.5±0.5	3.7±0.0	4.0±0.0

^z10-day-old seedlings of Chinese cabbage were inoculated with *P. brassicae* by drenching the roots with the spore suspension of each isolate to give inoculum density of 4.0×10^8 spores·pot⁻¹. The plants were incubated in a growth chamber at 20°C for 3 days with 12-hr light a day and then transferred to a greenhouse (20 ± 5°C). Five weeks after

inoculation, disease severity of the seedlings was rated on a scale 0 to 4. 0, no symptoms, 1, a few very small, separate globular clubs on lateral roots; 2, medium, separate globular clubs on lateral roots; 3, intermediate symptoms on main roots; and 4, severe clubs on main roots.

^yCR, resistant cultivar to clubroot commercialized by each seed company.

^xEach value represents the mean (\pm standard deviation) of two runs with 10 replicates each.

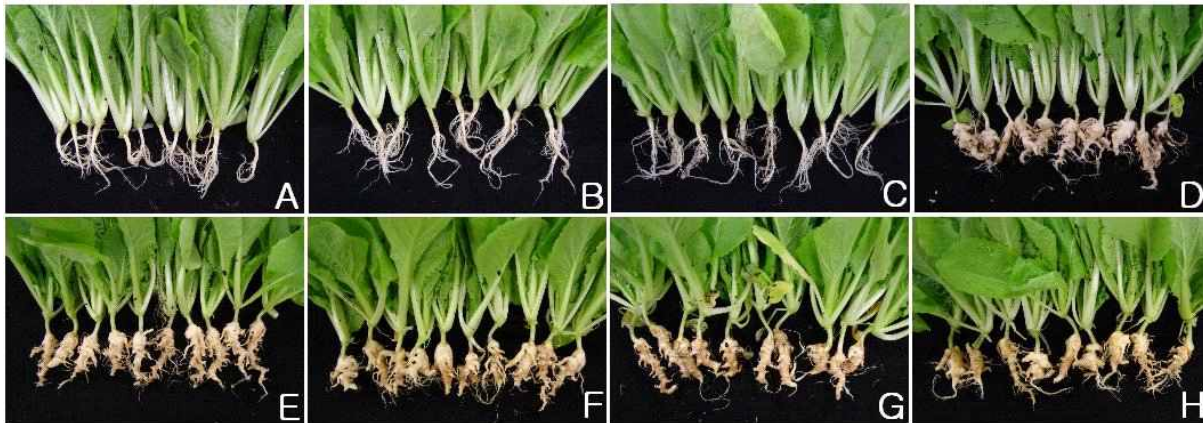


Fig. 16. Clubroot development on cultivars of Chinese cabbage inoculated with HS (A-D) and YC (E-H) isolates of *Plasmodiophora brassicae*. A and E, Ahreumchan; B and F, CR-Alchan; C and G, CR-Janggun; D and H, Sambokeotgalyi.

4. 양배추 뿌리혹병 저항성 병리검정 기술 체계 확립

가. 서론

배추과 작물에 속하는 *Brassica oleracea*는 capitata 그룹인 양배추, Italica 그룹인 브로콜리 그리고 Botrytis 그룹인 컬리플라워 등의 많은 경제적인 작물을 포함하고 있다. 특히 양배추와 브로콜리는 현대 식생활에 빠져서는 안 되는 매우 중요한 작물이다. 브로콜리는 19세기 후반까지는 대중화 되지 않았으나, 1930년대부터 영양학적 가치가 알려지면서 중요한 채소가 되었다(Na, 2008). *B. oleracea*뿐만 아니라 *B. rapa*, *B. napus* 등 대부분의 배추과 작물은 *Plasmodiophora brassicae* Woron.에 의해 발생하는 뿌리혹병으로 인해 큰 피해를 입고 있다. 토양전염성 기생체인 *P. brassicae*에 감염된 식물은 잔뿌리가 없어지고 주근에 혹이 생성되어 양분과 수분의 흡수가 억제되어 생육이 저해되며 시드는 증상이 반복되다가 고사한다. *P. brassicae*는 1878년 러시아에서 Woronin에 의해 처음 기록되었으며 이후 세계 각국에서 뿌리혹병의 기록이 발견되었고(Karling, 1968), 한국에는 1920년대에 처음 기록되었다(Ikegami 등, 1981). 현재는 세계적으로 배추과 작물에 발생하는 가장 심각한 병 중 하나이다.

뿌리혹병균은 거의 모든 배추과 작물에 발생하여 기주가 다양할 뿐만 아니라, 병든 조직에 무수히 많은 휴면포자를 형성하고, 이들 포자들은 토양에서 최대 15년 동안 생존할 수 있어 방제하기에 매우 어려운 토양병이다(Mattush, 1977). 뿌리혹병 방제법으로는 토양의 pH를 조절하거나 십자화과 작물이 아닌 작물과 윤작을 하는 등의 경종적 방제법이 알려져 있으나 현

실적으로는 경제성 때문에 적용하기 어렵고, 길항미생물 등을 이용한 생물적 방제 방법 등이 있으나 아직은 그 효과가 낮아 사용하기에 어려운 실정이다. 그리고 합성 살균제를 이용한 뿌리혹병 방제 방법은 비용이 비싸고 방제효과의 기간이 짧을 뿐만 아니라 환경 독성 등의 우려로 사용에 한계가 있다(Cheah 등, 2000; Yoshikawa, 1983). 그러므로 오늘날에는 친환경 농업에서도 사용이 가능한 저항성 품종이 뿌리혹병 방제를 위해 요구되고 있다.

European fodder turnip(*B. rapa*)인 'Siloga', 'Gelia R', 'Milan White' 및 'Debra'에는 최소한 8개의 뿌리혹병 저항성 유전자가 있다고 알려져 있다(Hirai, 2006; Piao 등, 2009). 그리고 *B. rapa*에 속하는 배추(*B. rapa* subsp. *pekinensis*)의 뿌리혹병 저항성 품종은 European fodder turnip의 저항성 유전자를 도입하여 개발되었다(Yoshikawa, 1993; Hirai, 2006). 그리고 배추 저항성 유전자는 단인자 우성 유전을 한다고 알려져 있다(James와 Williams, 1980; Kuginuki 등, 1999; Yoshikawa, 1993). 이와 달리 *B. oleracea*의 뿌리혹병 저항성 품종은 매우 드물어 단지 몇 품종만이 일본에서 개발되어 사용되고 있다(Baggett와 Kean, 1985). 몇 개의 *B. oleracea* 저항성 유전자원이 보고된 바 있으나, 이들 저항성은 고전적인 유전 분석 및 분자마커 분석에서 단인자가 아닌 다인자 유전을 한다고 알려져 있다(Figdore 등, 1993; Grandclement와 Thomas, 1996; Landry 등, 1992; Moriguchi 등, 1999; Nomura 등, 2005; Rocherieux 등, 2004; Voorrips 등, 1997). 하지만 저항성을 약 54%를 설명할 수 있는 QTL 유전자 *pb-3*과 같은 주요한 유전자가 존재한다고 하였다. 그러나 불행하게도 이들을 검정할 수 있는 특이적인 primer 혹은 RFLP 마커 등은 알려지지 않았다. 이와 같이 뿌리혹병 저항성 양배추는 2개 이상의 유전자가 관여하는 양적 저항성이며 저항성 유전자에 관련된 정보가 아직 부족한 실정이어서 저항성 품종의 개발이 지연되고 있다(Hirai, 2006). *P. brassicae*에 대한 *B. oleraceae*의 저항성에 관한 연구 및 새로운 저항성 육종 소재를 발굴하기 위해서는 반드시 효율적인 저항성 검정 방법이 필요하다.

본 연구는 *B. oleracea*에 속하는 양배추와 브로콜리의 저항성 품종을 개발하기 위한 효율적인 뿌리혹병 저항성 검정 방법을 확립하고, 몇 개의 *P. brassicae* 균주를 사용하여 시판 중인 16종 양배추와 17종 브로콜리 품종의 뿌리혹병 저항성 정도를 조사하였다.

나. 재료 및 방법

식물 재배. 양배추 두 품종 대박나(아시아종묘), 오조라(사카타코리아) 종자와 브로콜리 두 품종 녹국(아시아종묘), 아오시마(사카타코리아) 종자를 5 × 8육묘용 연결포트(70 ml/pot, 범농사)에 원예용상토 5호(부농사)를 넣고 파종하여 온실(25 ± 5°C)에서 14일 동안 재배한 후 실험에 사용하였다. 뿌리혹병균의 레이스 검정 실험에서는 Williams 판별 기주 4종(양배추 'Jersey Queen'과 'Badger Shipper' 그리고 rutabaga 'Laurentian'과 'Wilhelmsburger')을 동일한 방법으로 파종하고 재배하여 실험에 사용하였다.

양배추와 브로콜리 시판 품종의 뿌리혹병 저항성 검정 실험은 농우바이오, 몬산토코리아, 사카타코리아, 아시아종묘, 코레곤종묘, 한국다끼이 등의 종자회사가 판매하고 있는 양배추 16종 품종(그랜드마트, 그린햇, 꼬꼬마, 대박나, 레드마트, 루비아, 아시아볼, 오가네, 오조라, 중생루비아, 레드선, YR에코플러스, YR온누리, YR옴파로스, YR호걸, YR호남)과 브로콜리 17종 품종(녹국, 녹색, 킹덤, 파트너, 얼리유, 에쿠스, 나이스그린, 베리돔, 에이스돔, 그린매직, 녹색, 아오시마, 청제, 하이파이버, 그랜저, 업웰빙, 필그림)을 구입하여 위와 동일한 방법으로 재배하여

실험에 사용하였다.

균주 및 접종원 준비. 2009년부터 2010년까지 경기도 연천군(YC), 충청북도 괴산시(GS) 및 강원도 강릉시(GN1, GN2) 등의 배추 및 양배추 재배포장 4곳에서 전형적인 뿌리혹병을 보이는 뿌리를 채집하였다(Table 14). 채집한 시료는 -80°C deep freezer에 보관하면서 실험에 사용하였다.

Table 14. Four field isolates of *Plasmodiophora brassicae* used in this study

Isolate	Collection districts	Host	Year
GS	Goesan-gun, Chungcheongbuk-do	Cabbage	2009
GN1	Gangneung-si, Gangwon-do	Chinese cabbage	2009
GN2	Gangneung-si, Gangwon-do	Chinese cabbage	2010
YC	Yeoncheon-gun, Gyeonggi-do	Chinese cabbage	2009

접종하기 직전에 보관 중인 뿌리혹을 꺼내어 증류수로 수차례 세척하여 이물질을 깨끗이 제거한 후 멸균수를 첨가하여 Waring blender로 마쇄하였다. 이로부터 식물 조직을 제거하기 위하여 2겹의 가제로 여과하였으며, 준비한 포자현탁액은 광학현미경 하(300배)에서 hemocytometer를 이용하여 포자수를 측정하였다(Jo 등, 2011). 포자 농도에 따른 뿌리혹병 발생 실험을 제외한 모든 실험은 포자현탁액의 최종농도를 ml 당 5×10^8 개가 되도록 멸균수로 희석하여 접종원으로 사용하였다. 포자 농도에 따른 뿌리혹병 발병 실험에서는 포자현탁액 농도를 ml 당 6.3×10^7 , 1.3×10^8 , 2.5×10^8 , 5×10^8 및 1×10^9 개로 각각 조정하여 실험에 사용하였다.

접종 및 병조사. 온실에서 재배한 양배추와 브로콜리 유묘에 포자현탁액을 포트 당 5 ml 씩 토양 관주하여 접종하였다. 접종한 유묘는 20°C 항온항습실에서 하루에 12시간 동안 광을 처리하며 3일 동안 배양한 후에 온실($20 \pm 5^{\circ}\text{C}$)로 이동하여 수분을 공급하며 재배하였다. 배양 기간에 따른 뿌리혹병 발생 실험을 제외한 모든 실험은 접종 5주 후에 뿌리를 수확하여 뿌리혹병 발생 정도에 따라 발병도를 조사하였다. 조사 기준은 0=뿌리혹병 발생이 없음, 1=측근에 흑이 착생되어 비대정도가 적고 서로 독립하여 존재, 2=측근에 흑이 착생되며 비대정도가 비교적 큼, 3=주근에 흑이 착생되며 서로 접합되고 비대정도가 큼, 4=주근에 흑이 착생되며 서로 접합되고 비대정도가 매우 큼 등의 5단계로 하였다(Kuginuki 등, 1999; Suwabe 등, 2003).

레이스 검정 실험에서는 Williams 판별 기주 4종(양배추 'Jersey Queen'과 'Badger Shipper' 그리고 rutabaga 'Laurentian'과 'Wilhelmsburger')에 각 뿌리혹병균의 포자현탁액을 포트 당 5 ml 씩 관주하여 접종 6주 후에 뿌리에 발생한 뿌리혹병 정도에 따라 발병도를 조사하였다. 평균 발병도가 1.0 이하 일 때 저항성으로, 그리고 1.0 초과이면 감수성으로 판단하였으며, 4개 기주에서의 반응을 저항성과 감수성으로 결정한 후 Williams 레이스 판별기준표에 따라 레이스를 결정하였다(Williams, 1966). 모든 실험은 10반복으로 2회 실시하였으며, SAS(SAS Institute, Inc., 1989, Cary, NC) 프로그램을 이용하여 ANOVA분석을 하였다. 처리

평균간 비교를 위하여 Duncan's multiple range test ($P=0.05$)를 실시하였다.

다. 결과 및 고찰

균주 및 레이스 검정. Williams(1966)의 레이스 판별 기주인 양배추 2종(Jersey Queen, Badger Shipper)과 rutabaga 2종(Laurentian, Wilhelmsbuger)을 이용하여 포장에서 채집한 뿌리혹병균의 레이스를 동정한 결과, 뿌리혹병균들은 레이스 2 혹은 레이스 9로 확인되었다 (Table 15). YC 균주는 4종 기주 중 'Wilhelmsbuger'에만 저항성을 나타내고, 양배추 두 품종과 rutabaga 'Laurentian'에서는 높은 발병도를 나타내 레이스 2로 동정되었다. GN1, GN2 및 GS 균주들은 rutabaga 두 품종에서는 병원성을 나타내었지만, 양배추 두 품종은 이들 균주에 저항성을 보여 레이스 9로 확인되었다. 우리나라에는 레이스 10과 12를 제외한 모든 레이스가 존재한다고 보고되어 있으며, 이들 중 레이스 2와 4는 우점하는 레이스에 속하며 레이스 9 또한 배추에서 많이 발견되는 레이스 중 하나로 보고되었다(Cho 등, 2003; Jang 등, 2007).

Table 15. Race determination of four field isolates of *Plasmodiophora brassicae* using the differential varieties of Williams (1966)^a

Host	<i>P. brassicae</i> isolate			
	GS	GN1	GN2	YC
Jersey Queen	0.5 ± 0.5 ^b (R ^c)	0.7 ± 0.8 (R)	0.9 ± 0.3 (R)	3.9 ± 0.3 (S)
Badger Shipper	0.0 ± 0.0 (R)	0.0 ± 0.0 (R)	0.1 ± 0.3 (R)	3.7 ± 0.5 (S)
Laurentian	3.9 ± 0.3 (S)	3.5 ± 0.7 (S)	3.6 ± 0.8 (S)	3.8 ± 0.6 (S)
Wilhelmsbuger	2.4 ± 0.7 (S)	2.4 ± 0.5 (S)	2.9 ± 0.5 (S)	0.2 ± 0.4 (R)
Race	9	9	9	2

^a14-day-old seedlings were inoculated with *P. brassicae* by drenching the roots with the spore suspension of each isolate to give inoculum density of 2.5×10^9 spores/pot. The plants were incubated in a growth chamber at 20°C for 3 days with 12-hr light a day and then transferred to a greenhouse (20 ± 5°C). Six weeks after inoculation, disease severity of seedlings was rated on a scale 0 to 4. 0, no symptoms; 1, a few very small separate globular clubs on lateral roots; 2, medium separate globular clubs on lateral roots; 3, intermediate symptoms on main roots; and 4, severe clubs on main roots.

^bEach value represents the mean (± standard deviation) of two runs with 10 replicates each.

^cS, susceptible (disease index ≥ 1.0); R, resistant (disease index < 1.0).

접종 농도와 배양 기간에 따른 뿌리혹병 발생. GN1 균주를 이용하여 접종 농도와 접종 후 배양 기간에 따른 발병 정도를 조사하기 위하여, 14일 동안 재배된 양배추 2품종('대박나', '오조라')과 브로콜리 2품종('녹국', '아오시마')에 포트 당 3.1×10^8 , 6.3×10^8 , 1.3×10^9 , 2.5×10^9 및 5.0×10^9 개씩을 접종하고 4주, 5주 그리고 6주 동안 재배한 후에 발병도를 조사하였다. 접종된 양배추 '대박나'와 '오조라' 그리고 브로콜리 '아오시마'와 '녹국'의 모든 처리구의 평균 발병도는 각각 1.9, 3.2, 2.8 및 2.7로 '대박나'는 다소 낮은 뿌리혹병 발생이 있었으나, 나머지 세 품종은 유사한 정도의 감수성을 나타냈다(Fig. 17). 포트 당 접종농도가 3.1×10^8 , 6.3×10^8 , 1.3×10^9 , 2.5×10^9 및 5.0×10^9 개로 증가함에 따라 양배추 '대박나'는 1.3, 1.7, 1.8, 2.4, 2.6의 뿌리혹병 발병도를, 양배추 '오조라'는 1.9, 3.1, 3.5, 3.7, 3.7의 발병도를, 브로콜리 '아오시마'는 2.0, 2.4, 2.8, 3.3, 3.3의 발병도를, 그리고 브로콜리 '녹국'은 1.6, 2.3, 3.1, 3.2, 3.4로 실험한 양배추와 브로콜리는 품종에 관계없이 접종한 포자의 수가 증가할수록 뿌리혹병 발생은 증가하였다.

실험한 양배추와 브로콜리 품종들은 접종 후 재배 기간이 4주, 5주 및 6주로 길어짐에 따라 '대박나'는 1.3, 1.8, 2.7의 뿌리혹병 발병도를, '오조라'는 2.8, 3.1, 3.7의 발병도를, '아오시마'는 2.3, 2.8, 3.3의 발병도를 그리고 '녹국'은 2.2, 2.5, 3.4의 평균 발병도를 나타내었다(Fig. 17). 두 기주의 품종 모두에서 뿌리혹병균을 접종하고 재배 기간이 길어짐에 따라 뿌리혹병 발생은 증가 하였다. 접종 4주 후에는 뿌리혹병 발생이 적고, 접종 후에 6주 동안 재배하였을 때에는 품종 간의 저항성 차이가 줄어들어 접종 5주 후에 병조사하는 것이 바람직하다고 생각되었다.

이상의 결과로부터 양배추 및 브로콜리의 뿌리혹병에 대한 저항성을 효율적으로 검정하기 위해서는 포트 당 2.5×10^9 개의 포자를 접종하고 $20 \pm 5^\circ\text{C}$ 의 온실에서 5주 동안 재배하는 것이 적합하다고 생각되었다.

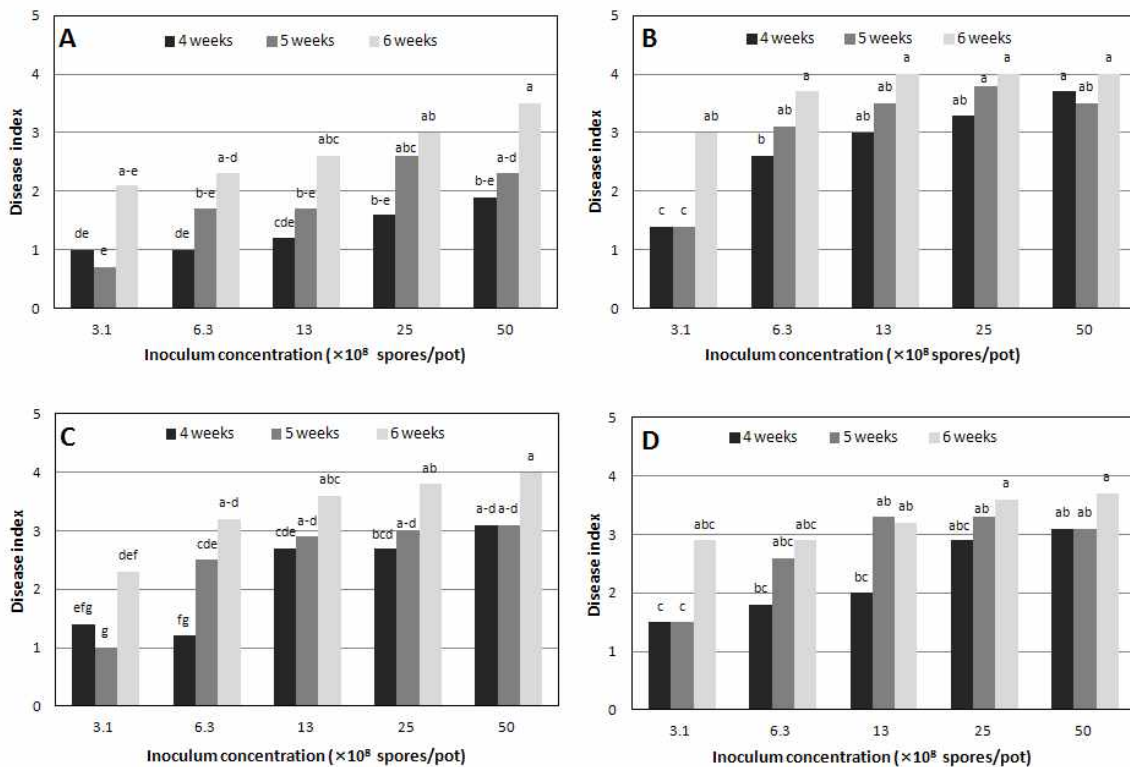


Fig. 17. Clubroot development of cabbage (A, B) and broccoli (C, D) seedlings according to

inoculum concentration and incubation period after inoculating with *Plasmodiophora brassicae*. A, Daebakna; B, Ohjora; C, Nokguk; D, Ahosima. 3.1, 3.1×10^8 spores/pot; 6.3, 6.3×10^8 spores/pot; 13, 1.25×10^9 spores/pot, 25, 2.5×10^9 spores/pot; 50, 5.0×10^9 spores/pot. Columns labeled with the same letter are not significantly different in Duncan's multiple range test ($P = 0.05$).

포장 균주에 대한 양배추와 브로콜리 품종의 저항성. 시판되고 있는 양배추와 브로콜리 품종들의 뿌리혹병 저항성 정도를 알아보기 위하여, 양배추 16종과 브로콜리 17종을 4개의 *P. brassicae* 포장 균주로 접종하고 5주 동안 재배한 결과, 실험한 품종들은 4개 균주에 대하여 다양한 저항성 반응을 나타내었다(Tables 16, 17). GN1, GN2, GS 및 YC 균주에 의한 16종 양배추 품종의 뿌리혹병 평균 발병도는 각각 2.3, 2.7, 2.8 및 4.0으로 *P. brassicae* 균주 간에 병원성 차이가 있었다(Table 16). 레이스 2인 YC 균주에 대해서는 실험한 모든 품종이 높은 감수성을 나타내었지만, 레이스 9인 GN1, GN2 및 GS 균주에 대해서는 '오가네'는 GN1, GN2, GS 균주들에 대하여 중도저항성을 보였고, 'YR 온누리', '대박나', 'YR 호남' 및 'YR 움팔로스'는 GN1 균주에 대하여 중도저항성을 나타내었다. 하지만 고도의 저항성을 나타내는 품종은 없었다.

GN1, GN2, GS 및 YC 균주에 의한 17종 브로콜리 품종의 평균 발병도는 각각 2.5, 2.6, 3.1 및 4.0으로 양배추와 유사한 결과를 보였다(Table 17). 양배추와 브로콜리 모두 YC 균주의 병원성이 가장 높았으며, GS, GN2 그리고 GN1 균주 순으로 병원성이 높았다. 레이스 2인 YC 균주는 양배추와 마찬가지로 실험한 모든 품종에서 발병도 4.0으로 고도의 감수성을 나타냈고, 레이스 9인 GN1 균주는 '킹덤', '파트너', '나이스그린', '녹국', '녹세'에 대하여 중도저항성을 보이고, GN2 균주는 '베리돔'에 그리고 GS 균주는 '하이파이브', '그린매직' 및 '그랜저'에 중도저항성을 나타냈다. 이렇게 양배추와 브로콜리 몇 가지 품종들이 균주에 대하여 다양한 반응을 보이는 이유는 각 병원균의 생리분화에 따른 병원성의 차이와 각 품종이 지닌 복합적인 저항성 유전자가 품종마다 상이하야 균주에 대한 저항성 반응이 다르게 나타난다고 생각되었다(Buczacki 등, 1975; Tanaka 등, 2006). 한편 YC 균주에 의해 모든 양배추 및 브로콜리 품종에서 4.0의 높은 발병도를 나타낸 것은 레이스 2가 Williams 판별품종 중 양배추 2품종(Jersey Queen과 Badger Shipper) 모두에 뿌리혹병을 일으키는 레이스이기 때문에 나타난 결과로 생각되었다. 따라서 양배추 뿌리혹병에 대한 저항성 품종 스크리닝을 위해서는 Williams 판별품종의 양배추 두 품종을 모두 감염할 수 없는 레이스 9 균주가 레이스 2보다 더 적합하리라 생각되었다(Williams, 1966).

Table 16. The degree of resistance of sixteen commercial cabbage cultivars to four field isolates of *Plasmodiophora brassicae*^a

Cultivar	GN1 (race 9)	GN2 (race 9)	GS (race 9)	YC (race 2)
Ohgane	1.4efg ^b	1.3c	1.9c	4.0a
YR-Onnuri	1.1g	2.5ab	2.1bc	4.0a
Daebakna	1.6d-g	2.3abc	2.7abc	4.0a
YR-Honam	1.3fg	2.8ab	2.6abc	4.0a
YR-Omphalos	1.2fg	3.4abc	3.8a	4.0a
Jungsaengrubia	2.6bcd	2.1bc	2.5abc	4.0a
YR-Hogeol	2.0c-g	3.1ab	2.5abc	4.0a
Redmart	2.5bcd	2.1bc	3.5ab	4.0a
YR-Ecoplus	2.9abc	2.6ab	2.7abc	4.0a
Asiaball	2.2b-f	2.8ab	3.3abc	4.0a
Kkokkoma	2.6bcd	2.6ab	3.1abc	4.0a
Redsun	2.8abc	2.8bc	2.8abc	4.0a
Grandmart	2.4b-e	3.1ab	2.9abc	4.0a
Rubia	3.2abc	2.5abc	3.1abc	4.0a
Greenhot	3.2abc	3.0ab	3.3abc	4.0a
Ohjora	3.7abc	3.5a	2.7abc	4.0a
Mean	2.3	2.7	2.8	4.0

^aSeedlings of 16 commercial cultivars were inoculated with *P. brassicae* by drenching the roots with the spore suspension of each isolate to give inoculum density of 2.5×10^9 spores/pot. The plants were incubated in a growth chamber at 20°C for 3 days with 12-hr light a day and then transferred to a greenhouse (20 ± 5°C). Five weeks after inoculation, disease severity of cabbage seedlings was rated on a scale 0 to 4. 0, no symptoms; 1, a few very small separate globular clubs on lateral roots; 2, medium separate globular clubs on lateral roots; 3, intermediate symptoms on main roots; and 4, severe clubs on main roots.

^bEach value represents the mean disease index of two runs with 10 replicates each. Values in the labeled with the same letter are not significantly different in Duncan's multiple range test ($P = 0.05$).

Table 17. The degree of resistance of seventeen commercial broccoli cultivars to four field isolates of *Plasmodiophora brassicae*^a

Cultivar	GN1 (race 9)	GN2 (race 9)	GS (race 9)	YC (race 2)
Highfive	2.2bcd ^b	2.4abc	1.9bc	4.0a
Greenmagic	2.4bcd	2.5ab	1.7c	4.0a
Grandeur	2.5a-d	2.7ab	1.7c	4.0a
Kingdom	1.5d	2.9ab	2.9abc	4.0a
Partner	1.5d	2.7ab	3.2a	4.0a
Nicegreen	1.6d	2.6ab	3.8a	4.0a
Nokguk	1.7cd	3.1ab	3.3a	4.0a
Nokse	1.4d	3.2ab	3.5a	4.0a
Earlyou	2.4bcd	2.4abc	3.3a	4.0a
Cheongje	2.5a-d	2.3ab	3.3a	4.0a
Acedom	3.2ab	2.3abc	3.0a	4.0a
Verydom	3.6a	1.8bc	3.5a	4.0a
Nokje	3.6a	2.4abc	3.0ab	4.0a
Equus	2.4bcd	3.4a	3.4a	4.0a
Aoshima	3.1ab	3.1ab	3.5a	4.0a
Upwellbeing	3.3ab	3.1ab	3.5a	4.0a
Pilgrim	2.8abc	3.4a	3.8a	4.0a
Mean	2.5	2.6	3.1	4.0

^aSeedlings of 17 commercial cultivars were inoculated with *P. brassicae* by drenching the roots with the spore suspension of each isolate to give inoculum density of 2.5×10^9 spores/pot. The plants were incubated in a growth chamber at 20°C for 3 days with 12-hr light a day and then transferred to a greenhouse (20 ± 5°C). Five weeks after inoculation, disease severity of broccoli seedlings was rated on a scale 0 to 4. 0, no symptoms; 1, a few very small separate globular clubs on lateral roots; 2, medium separate globular clubs on lateral roots; 3, intermediate symptoms on main roots; and 4, severe clubs on main roots.

^bEach value represents the mean disease index of two runs with 10 replicates each. Values in the labeled with the same letter are not significantly different in Duncan's multiple range test ($P = 0.05$).

*B. oleracea*의 뿌리혹병에 대한 저항성 유전자에 관한 연구가 현재에도 활발히 진행되고 있다(Carlsson 등, 2004). 케일과 양배추 등에서 많은 저항성 유전자를 발견하였으나(Crisp 등, 1989; Landry 등, 1992; Manzanares-Dauleux 등, 2000), *B. oleracea*의 뿌리혹병에 대한 저항성은 두 개 이상의 다인자에 의해 결정되므로 저항성 품종 개발에 많은 어려움이 따른다

(Moriguchi 등, 1999; Nomura 등, 2005; Rocherieux 등, 2004, Voorrips 등, 1997). 현재 저항성 유전자원을 이용하여 뿌리혹병에 대해 저항성인 양배추 품종이 육종되고 있지만, 국내에는 아직 시판되는 저항성 품종이 없다. 따라서 본 연구에서 확립한 양배추와 브로콜리 저항성 스크리닝 방법은 새로운 저항성 유전자원을 발굴하거나 분자마커 개발 및 저항성 유전자 규명 등의 연구에 유용하게 사용되리라 생각되었다.

5. 무 뿌리혹병 저항성 병리검정 기술 체계 확립

가. 서론

배추과(Cruciferae) 작물인 무(*Raphanus sativus*)는 아시아 또는 지중해 연안이 원산지인 한해살이 또는 두해살이풀로써 우리나라의 5대 채소 가운데 하나이다. 우리나라 전체 채소 생산량 대비 무는 10~15%로, 배추와 더불어 우리의 주요 부식인 김치, 단무지, 외식업체의 식재료로 중요도가 높은 작물이다(구 등, 2006; 이 등, 2008). 그러나 최근 많은 양의 화학비료를 사용하는 무의 연작재배지에서 각종 병해와 생리적 장애가 점차 증가하고 있다. 특히 뿌리혹병은 최근에 많이 발생하는 병으로서 무 재배에서 심각한 문제로 대두되고 있다(조, 2008).

Plasmodiophora brassicae Woronin에 의한 뿌리혹병은 전 세계의 배추과 작물에 발생하여 피해를 주고 있는 주요 병해이다. 우리나라에서는 1920년에 뿌리혹병 발생이 처음 기록되었으나(Nakata와 Takimoto, 1928), 90년대 후반부터 전국적으로 대 발생하여 큰 문제를 일으키고 있다. 특히 뿌리혹병균은 휴면포자로 토양에 존재하며 환경이 적합하면 10년 이상 생존이 가능하다. 토양 및 농기구를 통한 뿌리혹병균 전파 양식 때문에 뿌리혹병은 전국으로 확산되었고, 다양한 배추과 작물의 품종 및 라인에서 실험해 보면 뿌리혹병균은 다양한 생리적 분화가 일어났다고 알려져 있다(Ayers, 1957; Buczacki 등, 1975; Johnston, 1968; Tanaka 등, 1998; Williams, 1966). 뿌리혹병균에 대하여 무는 배추보다 저항성이 높다고 보고되었지만(Akaba 등 2009), 우리나라에서도 경기도, 강원도, 전라북도 등의 무 재배지에서 뿌리혹병 발생이 보고되고 있다(Cho 등, 2003).

뿌리혹병을 방제하기 위한 방법으로 미생물을 이용한 생물학적 방제(Cheah와 Page, 1995; Cheah 등, 2000), fluazinam, flusulfamide 및 cyazofamid 등의 살균제를 이용한 화학적 방제(Shimotori 등, 1996; Komyoji 등, 1995; Mitani 등, 2003), 배추과 작물 이외 작물과의 윤작 그리고 단경기 작물 및 저항성 품종 재배 등의 경종적 방제 방법 등이 이용되고 있다(Tanaka 등, 1999; Murakami 등, 2000; 조 등, 2002). 최근에는 많은 나라들이 농약을 사용하지 않고 재배하는 친환경 농업 정책을 펼치고 있어 저항성 품종을 개발하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 저항성 품종을 재배하면 환경에 영향을 주는 화학 농약의 사용을 줄일 수 있으며, 농작물 손실을 최소화 할 수 있다. 그러나 저항성 품종 육성이 활발히 진행되었던 일본에서는 병원균의 분화로 대부분의 뿌리혹병 저항성 배추 품종들의 저항성이 무너지고 있다고 보고되고 있다(Akaba 등, 2009). 따라서 뿌리혹병에 대한 새로운 저항성 유전자원 선별 및 저항성 품종의 육성이 요구된다. 이를 위해서는 효율적이고 재현성이 우수한 뿌리혹병 검정법이 필수적이다.

본 연구에서는 토양 관주 접종법을 이용하여 여러 발병 조건에 따른 무 뿌리혹병 발생을 실험하여 효율적인 무 뿌리혹병 저항성 검정법을 확립하고자 하였다. 또한 확립한 검정법을 이

용하여 레이스가 다른 두 균주에 대한 시판중인 무 46개 품종의 무 뿌리혹병에 대한 저항성을 조사하였다.

나. 재료 및 방법

뿌리혹병균 균주

2009년에 강원도 강릉시 왕산면 대기리의 배추 재배포장에서 전형적인 병징을 나타내는 배추뿌리 이병조직을 채집하였다. 채집한 이병조직 1 g을 취해 휴면포자를 수확한 후에 온실에서 재배한 본엽 2엽기 배추 100주에 접종하고 20℃ 항온항습실에서 1주일 동안 배양하였다. 이를 뿌리혹병이 발생한 적이 없는 한국화학연구원 발포장에 정식하여 60일 동안 재배하여 증식한 균주를 *P. brassicae* GN-1로 명명하였다. 그리고 2009년에 경기도 연천군 연천읍 차탄리에서 채집한 배추뿌리 이병조직을 GN-1 균주와 동일한 방법으로 증식하였고 이를 *P. brassicae* YC-1 균주로 명명하였다. 뿌리혹병균 GN-1 균주와 YC-1 균주는 각각 -80℃ 초저온냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다. 무 뿌리혹병에 대한 저항성 검정법 확립 실험에는 GN-1 균주를 사용하였으며, 무 및 배추 품종들의 뿌리혹병균에 대한 저항성 실험은 두 균주 모두를 사용하여 실험하였다.

식물 재배

무 뿌리혹병에 대한 저항성 검정법 확립 실험은 몬산토코리아사로부터 구입한 ‘여름춘향이열무’ 품종을 사용하여 실험하였다. 종자를 5 × 8 육묘용 연결포트(70 ml/pot, 범농사)에 원예용상토 5호(부농사)를 넣고 파종하여 10일 동안 온실(25 ± 5℃)에서 재배한 후 접종하였다. 시판 중인 무 품종들의 뿌리혹병에 대한 저항성 검정 실험은 여러 종자회사로부터 뿌리혹병에 대하여 저항성(CR, clubroot resistance)이라 표기된 10개 품종(‘길조’, ‘명산’, ‘비바리월동’, ‘빛고은열무’, ‘슈퍼길조’, ‘아우리월동’, ‘전무후무’, ‘청운플러스’, ‘태청’, ‘하우스청옥’)과 CR을 표시하지 않은 36종 품종(‘가을김장’, ‘강성’, ‘강추’, ‘관동여름’, ‘극동’, ‘대동’, ‘대박’, ‘대평여름’, ‘동하’, ‘미농조생’, ‘박자’, ‘백자’, ‘백춘’, ‘산나리열무’, ‘새롬’, ‘선봉알타리’, ‘송백’, ‘슈퍼모델’, ‘시래기’, ‘아시아가을저장’, ‘알파인’, ‘여름춘향이열무’, ‘장생’, ‘장형봄’, ‘청두’, ‘청수궁중’, ‘청운’, ‘청일품’, ‘초롱’, ‘초비’, ‘탐스런’, ‘태창’, ‘토광’, ‘평강김장’, ‘한농여름’, ‘YR 챔피언열무’)을 구입하여 위와 동일한 방법으로 재배하여 실험에 사용하였다. 무의 생육시기에 따른 뿌리혹병 발생 실험에서는 원예용상토 5호에 무 종자를 파종하고 각각 4일, 7일, 10일 및 14일 동안 온실(25±5℃)에서 재배한 무 유묘를 사용하였다.

그리고 뿌리혹병균 GN-1과 YR-1 균주의 특성을 조사하기 위하여 이들에 대한 배추 품종의 저항성을 검정하였는데, CR 품종으로 판매하고 있는 15종 품종(‘금방울’, ‘노랑맛하장’, ‘산울림’, ‘상장군’, ‘쌈이랑’, ‘썬그린’, ‘영광’, ‘우리’, ‘월동천하’, ‘진청’, ‘태봉’, ‘하대장군’, ‘CR 강산’, ‘CR 여름맛’, ‘CR 입춘’)과 저항성으로 공시하고 있지 않은 8개 품종(‘가을황’, ‘노랑관동’, ‘노랑김장’, ‘노랑김치’, ‘노랑추석’, ‘불암3호’, ‘참이슬엇갈이’, ‘춘미봄’)을 구입하여 무 실험과 동일한 방법으로 파종하고 온실(25 ± 5℃)에서 10일 동안 재배하여 실험에 사용하였다.

접종원 준비 및 접종

접종하기 직전에 초저온냉동고에 보관 중인 균주를 꺼내어 증류수로 수 회 세척하여 이

물질을 제거하고 이를 Waring blender에 넣고 멸균수를 첨가하여 마쇄하였다. 이를 2겹의 가제로 여과하여 식물 조직을 제거하고 광학현미경 하(300배)에서 혈구계수기를 이용하여 휴면포자의 수를 측정하여 포자현탁액을 준비하였다. 포자현탁액의 최종 농도는 ml 당 2×10^8 개가 되도록 멸균수로 희석하였으며, 온실에서 재배한 무 유묘에 준비한 뿌리혹병균의 포자현탁액을 포트 당 5 ml 씩 관주하여 접종하였다.

접종된 양에 따른 뿌리혹병 발생 실험에서는 포자현탁액 농도가 각각 ml 당 2.0×10^6 개, 2.0×10^7 개 및 2.0×10^8 개가 되도록 조정하여 실험하였다. 그리고 배추 품종의 뿌리혹병 저항성 검정 실험은 ml 당 8.0×10^7 개의 포자현탁액을 포트 당 5 ml 씩 관주하여 접종하였다.

발병 및 병조사

접종한 유묘는 20℃ 항온항습실에서 하루에 12시간 광을 처리하며 3일 동안 배양한 후에 온실(20±5℃)로 이동하여 수분을 공급하며 재배하였다. 접종 후 배양기간에 따른 뿌리혹병 발생을 제외한 모든 무 뿌리혹병 실험은 접종 6주 후에 뿌리의 흙을 제거하고 물로 씻은 후에 뿌리에 발생한 혹의 크기에 따라 발병도(0-4)를 조사하였다.

무 뿌리혹병의 병조사 기준은 0=뿌리혹병 발생이 없음, 1=주근에 뿌리혹이 착생되었으며 혹은 비대정도가 적고 서로 독립하여 존재, 2=비대정도가 큰 뿌리혹이 주근에 뿌리혹이 착생, 3=주근이 가늘고 주근과 세근에 작은 혹이 착생, 4=주근이 심하게 가늘고 주근과 세근에 큰 혹이 존재 등의 5단계로 하였다. 평균 발병도는 백분율로 환산하였으며, 발병도(%)가 25% 이하 일 때 저항성으로, 그리고 25% 초과 50% 이하이면 중도 저항성, 50% 초과이면 감수성으로 판단하였다. 그리고 접종 후 배양기간에 따른 뿌리혹병 발생 실험에서는 접종한 후에 각각 3주, 4주, 5주 및 6주 동안 온실(20±5℃)에서 배양하고 뿌리혹병 발생을 조사하였다.

배추 품종에서 GN-1과 YC-1 균주의 뿌리혹병 발생 실험은 조 등(2010)의 방법에 따라 접종 5주 후에 발병도를 조사하고, 평균 발병도를 백분율로 환산하였다. 모든 실험은 10반복으로 2회 이상 실시하였으며, SAS(SAS Institute, Inc., 1989, Cary, NC) 프로그램을 이용하여 ANOVA분석을 하였다. 처리 평균간 비교를 위하여 Duncan's multiple range test ($P=0.05$)를 실시하였다.

다. 결과 및 고찰

뿌리혹병균 균주

기주의 병 저항성과 관련된 기주와 병원균 간의 상호작용을 이해하기 위해서는 단포자 균주 획득이 우선적으로 필요하지만(Voorrips, 1996), 뿌리혹병균은 잘 알려진 바와 같이 활발 기생균이므로 *in vitro*에서 배양이 불가능하고(Arnold 등, 1996), 또한 단일 포자를 이용하여 접종하면 감염은 일어나나 전형적인 혹을 형성하지 않는 등 충분한 증식이 이루어지지 않아 접종원으로 사용하기에 어려움이 있다고 보고되었다(장 등, 2007). 따라서 본 실험에서는 단일 휴면포자를 사용하지 않고 강릉과 연천 배추포장에서 채집한 뿌리혹병 이병조직을 1 g 씩 취하여 이로부터 휴면포자를 수확하고 희석하여 100주의 배추에 접종하고 무병토에 정식하여 증식한 균주인 *P. brassicae* GN-1 균주와 YC-1 균주를 실험에 사용하였다.

실험에 사용하는 뿌리혹병 균주들의 특성을 조사하기 위하여 15개 CR 배추 품종과 8개 감수성 배추 품종에 GN-1 균주와 YC-1 균주를 접종한 결과, 감수성 품종에서는 두 균주 모두

거의 동일하게 높은 뿌리혹병 발생을 나타냈으나, CR 품종들은 두 균주에 대해 서로 다른 반응을 보였다(Table 18). GN-1 균주를 접종하였을 때에는 모두 발병도 10% 이하의 저항성 반응을 나타내었으나, YC-1 균주를 접종한 경우에는 CR 품종 모두에서 감수성 품종과 거의 동일한 95% 이상의 발병을 나타내었으며, CR 품종간 뿌리혹병 발생은 거의 차이가 없었다(Table 18, Fig. 18). 따라서 GN-1 균주는 CR 품종에 뿌리혹병을 일으킬 수 없는 균주이고, YC-1 균주는 실험한 CR 배추 품종들을 침해할 수 있는 즉 배추 CR 품종의 저항성을 무력화시키는 뿌리혹병균임을 알 수 있었다. Yoshikawa(1981)는 *B. rapa*에 속하는 European fodder turnip에서 뿌리혹병균에 대한 저항성 라인을 발견하여 50종이 넘는 뿌리혹병 저항성 배추품종을 육종하였다. 하지만 이후에 대부분 배추 품종의 뿌리혹병 저항성이 무너졌다고 하였다(Kuginuki 등, 1999). 우리나라에서 육종한 15종 CR 배추 품종도 일본에서와 같이 YC-1 균주에 의해 저항성이 무너짐을 알 수 있었다.

Table 18. The degree of resistance of 23 commercial Chinese cabbage cultivars to two isolates of *Plasmodiophora brassicae*^{a)}

Cultivar	Trait	Disease severity (%)	
		GN-1 ^{b)}	YC-1 ^{c)}
CR Gangsan	CR ^{d)}	8 ^{e)}	100
CR Ipchun	CR	3	100
CR Yeoreummat	CR	5	100
Geumbangul	CR	5	100
Hadaejanggun	CR	3	100
Jincheong	CR	8	100
Norangmathajang	CR	8	95
Sangjanggun	CR	3	100
Sanulrim	CR	8	100
Ssamyirang	CR	3	100
Sungreen	CR	8	100
Taebong	CR	0	100
Woldongcheonha	CR	5	100
Woori	CR	3	100
Younggwang	CR	3	100
Bulam III	-	93	100
Chamyiseuleotgalyi	-	85	100
Chunmibom	-	98	100
Gaeulhwang	-	95	100
Norangchuseok	-	95	100
Noranggimjang	-	93	100
Noranggwandong	-	90	100
Norangkimchi	-	98	98

- a) Seedlings of Chinese cabbage were inoculated with GN-1 and YC-1 isolates of *P. brassicae* by drenching the roots in the spore suspension of each isolate on pot to give inoculum density of 4.0×10^8 spores/pot. The plants were incubated in a growth chamber at 20°C for 3 days with 12-hr light a day and then transferred to a greenhouse (20 ± 5°C). Five weeks after inoculation, disease severity of Chinese cabbage seedlings was investigated.
- b) GN-1: isolate collected from Gangneung-si.
- c) YC-1: isolate collected from Yeoncheon-gun.
- d) CR: resistant cultivar to clubroot published by each seed company.
- e) Each value represents the mean disease severity (%) of two runs with 10 replicates each.

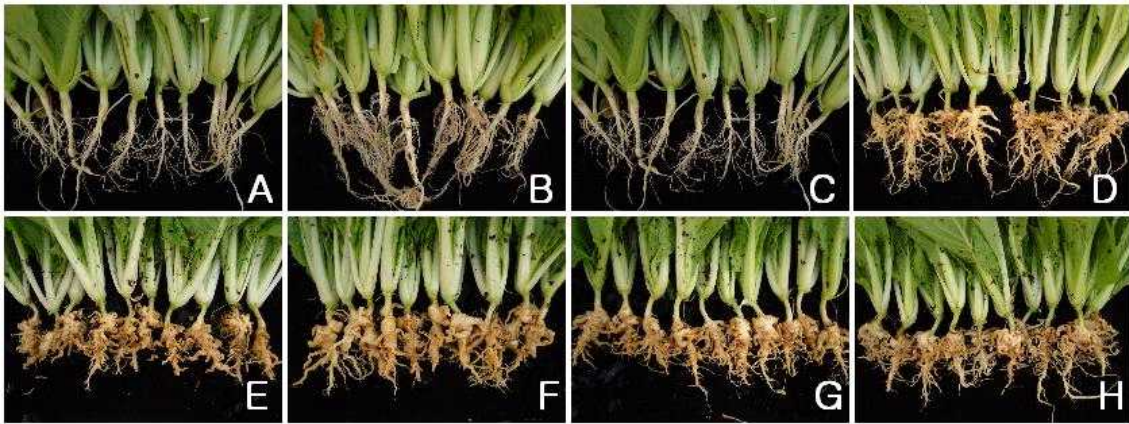


Fig. 18. Clubroot development on commercial cultivars of Chinese cabbage inoculated with GN-1 (A-D) and YC-1 (E-H) isolates of *Plasmodiophora brassicae*. A and E, 'CR Gangsan'; B and F, 'CR Ipchun'; C and G, 'CR Yeoreummat'; D and H, 'Noranggimjang'.

생육 시기에 따른 뿌리혹병 발생

과종한 후 온실에서 4일, 7일, 10일 및 14일 동안 키운 무 유묘에 여러 가지 농도의 뿌리혹균을 접종하여 뿌리혹병 발생을 조사한 결과, 모든 생육시기의 무는 *P. brassicae*의 접종 농도가 증가함에 따라 뿌리혹병이 많이 발생하였으며, 무의 생육시기에 따른 뿌리혹병 발생은 과종 10일, 7일, 4일 14일 후 순으로 높았다(Table 19). 즉, 접종한 여러 생육시기 중 과종 10일 후에 접종한 무에서 뿌리혹병이 가장 많이 발생하였으며, 포트 당 1.0×10^7 개, 1.0×10^8 개, 1.0×10^9 개를 접종하였을 때 각각 70%, 79%, 98%의 뿌리 혹병 발생을 보였다. 하지만 과종 4일 및 14일 후에 접종한 무의 발병도는 실험한 모든 접종원 농도에서 68% 이하의 비교적 낮은 발병을 나타냈다. 따라서 과종 10일 후에 포트 당 1.0×10^9 개를 접종하는 것이 바람직하다고 생각되었다.

Table 19. Clubroot development of radish seedlings inoculated with *Plasmodiophora brassicae* at four plant growth stages^{a)}

Growth stage (after sowing)	Inoculum concentration ($\times 10^7$ spores/pot)			Mean
	1.0	10	100	
4 days	51 ^{b)de}	68b-e	68b-e	63
7 days	54cde	70abc	78ab	67
10 days	70b-e	79ab	98a	82
14 days	47e	49e	67b-e	54

^{a)}Seedlings of radish (cv. Yeoreumchunhyangyiyeolmu) were inoculated with *P. brassicae* GN-1 by drenching the roots in the spore suspension of the pathogen on each pot. The plants were incubated in a growth chamber at 20°C for 3 days with 12-hr light a day and then transferred to a greenhouse (20 ± 5°C). Six weeks after inoculation, disease severity of radish seedlings was investigated.

^{b)}Each value represents the mean disease severity (%) of two runs with 10 replicates each.

배양기간에 따른 발병

접종 후 배양기간에 따른 뿌리혹병 발생을 조사하기 위하여 원예용 상토에서 10일 동안 재배한 무 유묘에 여러 가지 농도의 포자현탁액을 접종하고 3주, 4주, 5주 그리고 6주 후에 발병도를 조사한 결과, 실험한 모든 접종원 농도에서 접종한 후에 재배하는 기간이 증가함에 따라 뿌리혹병 발생은 증가하였다(Table 20). 접종 3주 후에는 모든 접종원 농도에서 18% 이하의 발병을 보였으나, 접종 6주 후에는 79% 이상의 높은 발병을 나타내 1.0 × 10⁷개, 1.0 × 10⁸개, 1.0 × 10⁹개를 접종하였을 때 각각 79%, 89%, 90%의 발병을 보였다. 따라서 뿌리혹병균의 포자 농도가 100배 증가하여도 뿌리혹병 발생은 크게 증가하지 않음을 알 수 있었다. 따라서 무 뿌리혹병 발생은 일정 농도 이상일 경우 *P. brassicae* 접종원 농도보다 접종 이후의 재배기간이 더 크게 영향을 미침을 알 수 있었다. 조 등(2010)은 배추 품종의 뿌리혹병에 대한 저항성 정도를 조사하기에 적합한 발병기간을 접종 후 5주로 보고한 바 있다. 이는 무 뿌리혹병의 경우에는 배추보다 뿌리혹병 발병속도가 늦어 정확한 무 뿌리혹병 저항성을 검정하기 위해서는 충분한 배양기간이 필요하다고 생각되었다.

Table 20. Clubroot development of radish seedlings according to incubation period after inoculation^{a)}

Incubation period	Inoculum concentration ($\times 10^7$ spores/pot)			Mean
	1.0	10	100	
3 weeks	6 ^{b)f}	8 ^f	18 ^f	10
4 weeks	44 ^e	53 ^{de}	63 ^{cd}	53
5 weeks	66 ^{cd}	64 ^{cd}	74 ^{bc}	68
6 weeks	79 ^{abc}	89 ^{ab}	90 ^a	86

^{a)}Seedlings of radish (cv. Yeoreumchunhyangyiyeolmu) were inoculated with *Plasmodiophora brassicae* GN-1 by drenching the roots in the spore suspension of the pathogen on each pot. The plants were incubated in a growth chamber at 20°C for 3 days with 12-hr light a day and then transferred to a greenhouse (20 ± 5°C). Three to six weeks after inoculation, disease severity of radish seedlings was investigated.

^{b)}Each value represents the mean disease severity (%) of two runs with 10 replicates each.

무 품종들의 뿌리혹병 저항성

시판 중인 무 46개 품종의 두 균주(GN-1, CR 배추 품종에 뿌리혹병을 일으키지 못하는 균주; YC-1, 15개 CR 배추 품종을 침입할 수 없는 균주)의 뿌리혹병균에 대한 저항성 정도를 관주접종법을 이용하여 앞에서 선발한 최적화 조건으로 실험한 결과, 무 품종들은 두 균주에 대하여 다양한 저항성 반응을 나타내었으며 두 균주에 대한 저항성 정도에 따라 네 가지 그룹으로 분류할 수 있었다(Table 21). ‘빛고은열무’를 포함한 35개(76%) 품종들은 GN-1 균주와 YC-1 균주 모두에 대하여 저항성 반응을 보였으며, 이들 중 ‘아우리월동’을 포함한 3품종은 GN-1 균주에는 고도의 저항성 반응을 그러나 YC-1 균주에는 중도 저항성 반응을 나타냈다(그룹 1). 그리고 ‘강성’을 포함한 7개(15%) 품종은 GN-1 균주에는 저항성 반응을, 하지만 YC-1 균주에는 감수성 반응을 보였다(그룹 2). 이 중 ‘초비’는 GN-1 균주에 대해 중도 저항성을 나타냈다. 이와 반대로 ‘새롬’을 포함한 3개(7%) 품종은 YC-1 균주에 대해서는 중도 저항성 반응을, 그러나 GN-1 균주에 대해서는 감수성을 나타내었다(그룹 3). 그리고 실험한 무 품종 중 ‘초롱’만이 두 균주 모두에 대하여 감수성을 보이는 품종이었다(그룹 4).

Table 21. The degree of resistance of commercial radish cultivars to two isolates of *Plasmodiophora brassicae*^{a)}

Cultivar	Trait	Disease severity (%)	
		GN-1 ^{b)}	YC-1 ^{c)}
Ahwooriwoldong	CR ^{d)}	10 ^{e)}	40
Bitgoeunyeolmu	CR	3	3
Chungwoon plus	CR	0	0
Housecheongok	CR	5	8
Jeonmuhumu	CR	3	0
Kiljo	CR	0	0
Myeongsan	CR	0	0
Superkiljo	CR	0	0
Taecheong	CR	0	0
Varywoldong	CR	0	13
Alpine	-	3	3
Asia gaulgimjang	-	0	15
Asia gauljeojang	-	3	3
Backja	-	0	3
Baekchun	-	3	0
Bakja	-	10	3
Chengdu	-	5	0
Cheongilpum	-	0	3
Cheongsugungjungmu	-	0	0
Chungwoon	-	0	0
Daeback	-	3	0
Daedong	-	5	25
Daepyeongyeoreum	-	10	30
Geukdong	-	5	0
Jangsaeng	-	3	0
Minongjosaeng	-	5	0
Pyeongganggimjang	-	5	0
Sannariyeolmu	-	3	13
Seonbongaltari	-	3	0
Siraegi	-	8	0
Songbaeck	-	5	13
Taechang	-	18	3
Tamseureon	-	13	23
Togwang	-	8	0
YR Championyeolmu	-	0	0
Chobi	-	30	53
Dongha	-	13	65
Gangchu	-	10	75
Gangseong	-	10	60
Gwandongyeoreum	-	10	60
Hannongyeoreum	-	15	70
Janghyeongbom	-	8	53
Saerom	-	63	40
Supermodel	-	65	25
Yeoreumchunhyangi yeolmu	-	100	33
Chorong	-	55	100

^{a)}Seedlings of each radish cultivar were inoculated with GN-1 and YC-1 isolates of *P. brassicae* by drenching the roots in the spore suspension of each isolate on pot to give

inoculum density of 1.0×10^9 spores/pot. The plants were incubated in a growth chamber at 20°C for 3 days with 12-hr light a day and then transferred to a greenhouse (20 ± 5°C). Six weeks after inoculation, disease severity of the seedlings was investigated.

^{b)}GN-1: isolate collected from Gangneung-si

^{c)}YC-1: isolate collected from Yeoncheon-gun

^{d)}CR: resistant cultivar to clubroot published by seed companies.

^{e)}Each value represents the mean disease severity (%) of two runs with 10 replicates each.

이러한 반응은 배추 품종의 뿌리혹병균에 대한 저항성 반응과는 상이한 결과이다(Table 18, 21). YC-1 균주는 실험한 모든 CR 배추 품종들에 감수성 품종과 동일한 정도의 뿌리혹병을 일으켰으며, GN-1 균주는 모든 CR 품종에 병을 일으키지 못 하였다(Table 18). 하지만 무 품종들의 경우에는 GN-1과 YC-1 두 균주 모두에 저항성 혹은 감수성을 나타내는 경우도 있지만, GN-1 균주에 더 저항성인 품종과 YC-1 균주에 더 저항성인 품종들이 존재하였다(Table 21). 이것은 무(*R. sativus*)와 배추(*B. rapa* ssp. *pekinensis*)의 뿌리혹병 저항성 유전자는 서로 다르기 때문인 것으로 생각되었다. 배추의 뿌리혹병 저항성 유전자는 European turnip(*B. rapa*) 으로부터 도입된 것으로 단인자 우성으로 유전한다고 알려져 있다(James와 Williams, 1980; Kuginuki 등, 1999). *B. rapa*에서 보고된 뿌리혹병 저항성 유전자는 5개의 주동 유전자 (*CRa*(Matsumoto 등, 1998), *Crr1*(Kuginuki 등, 1997; Suwabe 등, 2003), *Crr2*(Suwabe 등, 2003), *Crr3*(Hirai 등, 2004) 및 *CRb*(Piao 등, 2004))와 QTL인 *Crr4*가 있지만 아직 정확한 유전자 분석과 역할에 대해서는 보고되어 있지 않다(Akito 등, 2010). 한편 무에서는 배추과에 피해를 주는 beet cyst nematode (Peterka 등, 2004), *Albugo candida* (Kolte 등, 1991) 그리고 뿌리혹병(Ashizawa 등, 1980)과 같은 병에 대한 저항성을 나타내는 유전자원이 보고되었다. 그리고 뿌리혹병에 대해 강한 저항성을 가지고 있는 무 품종과 라인들이 많이 보고되었지만 (Scheijgrond와 Vos, 1954; Yoshikawa, 1993), 이러한 뿌리혹병에 대한 무의 저항성 유전자 및 저항성 유전 분석은 아직 보고된 바 없으며, 무의 저항성 유전자와 *Brassica* 속 작물의 뿌리혹병 저항성 유전자를 서로 비교한 연구도 보고되지 않았다(Akito 등, 2010).

CR 배추 품종의 저항성 반응이 서로 다른 두 뿌리혹병균 균주를 이용하여 시판중인 46종 무 품종의 뿌리혹병에 대한 저항성 반응을 검정한 결과, CR 품종으로 표기된 10종 품종들 뿐만 아니라 CR임을 표시하지 않은 품종 중 상당수가 뿌리혹병균에 대하여 저항성 반응을 보였다(Table 4). 실험한 무 품종들은 GN-1 균주에 대해서 41개(89%) 품종이 뿌리혹병에 대하여 고도 저항성을, 그리고 1개(2%) 품종이 중도 저항성, 4개(9%) 품종이 감수성을 나타내었다. 그리고 YC-1 균주에 대해서는 32개(70%) 품종이 고도 저항성을, 6개(13%) 품종이 중도 저항성 반응을 보이고, 8개(17%) 품종이 감수성을 나타내 시판 중인 무 품종 대부분은 GN-1 균주뿐만 아니라 YC-1 균주에 대하여 저항성인 품종임을 알 수 있었다. 하지만 소비자의 기호를 충족할 수 있는 고부가가치의 수출용 및 내수용 뿌리혹병 저항성 품종들을 꾸준히 개발할 필요가 있다.

이상의 결과로부터 무 품종들의 *P. brassicae*에 의한 뿌리혹병 저항성을 검정하기 위한 방법으로 무 종자를 원예용 상토에 파종하고 온실(25±5°C)에서 10일 동안 재배한 후에 2×10^8 spores/ml 농도의 *P. brassicae*의 포자현탁액을 주 당 5 ml를 관주하여 접종한다. 그리고 접종한 무는 20°C 생육상에서 하루에 12시간 썬 광을 조사하면서 3일 동안 배양한 후에 온실(20±

5℃)로 이동하여 약 6주 동안 재배한 후에 뿌리혹병 발생을 조사하는 것을 제안하고자 한다.

6. 양배추 및 브로콜리 뿌리혹병에 대한 효율적인 저항성 검정 방법 확립

가. 서론

배추과 작물에 속하는 *Brassica oleracea*는 capitata 그룹인 양배추, Italica 그룹인 브로콜리 그리고 Botrytis 그룹인 컬리플라워 등의 많은 경제적인 작물을 포함하고 있다. 특히 양배추와 브로콜리는 현대 식생활에 빠져서는 안 되는 매우 중요한 작물이다. 브로콜리는 19세기 후반까지는 대중화 되지 않았으나, 1930년대부터 영양학적 가치가 알려지면서 중요한 채소가 되었다(Na, 2008). *B. oleracea*뿐만 아니라 *B. rapa*, *B. napus* 등 대부분의 배추과 작물은 *Plasmodiophora brassicae* Woron.에 의해 발생하는 뿌리혹병으로 인해 큰 피해를 입고 있다. 토양전염성 기생체인 *P. brassicae*에 감염된 식물은 잔뿌리가 없어지고 주근에 흑이 생성되어 양분과 수분의 흡수가 억제되어 생육이 저해되며 시드는 증상이 반복되다가 고사한다. *P. brassicae*는 1878년 러시아에서 Woronin에 의해 처음 기록되었으며 이후 세계 각국에서 뿌리혹병의 기록이 발견되었고(Karling, 1968), 한국에는 1920년대에 처음 기록되었다(Ikegami 등, 1981). 현재는 세계적으로 배추과 작물에 발생하는 가장 심각한 병 중 하나이다.

뿌리혹병균은 거의 모든 배추과 작물에 발생하여 기주가 다양할 뿐만 아니라, 병든 조직에 무수히 많은 휴면포자를 형성하고, 이들 포자들은 토양에서 최대 15년 동안 생존할 수 있어 방제하기에 매우 어려운 토양병이다(Mattush, 1977). 뿌리혹병 방제법으로는 토양의 pH를 조절하거나 십자화과 작물이 아닌 작물과 윤작을 하는 등의 경종적 방제법이 알려져 있으나 현실적으로는 경제성 때문에 적용하기 어렵고, 길항미생물 등을 이용한 생물적 방제 방법 등이 있으나 아직은 그 효과가 낮아 사용하기에 어려운 실정이다. 그리고 합성 살균제를 이용한 뿌리혹병 방제 방법은 비용이 비싸고 방제효과의 기간이 짧을 뿐만 아니라 환경 독성 등의 우려로 사용에 한계가 있다(Cheah 등, 2000; Yoshikawa, 1983). 그러므로 오늘날에는 친환경 농업에서도 사용이 가능한 저항성 품종이 뿌리혹병 방제를 위해 요구되고 있다.

European fodder turnip(*B. rapa*)인 'Siloga', 'Gelia R', 'Milan White' 및 'Debra'에는 최소한 8개의 뿌리혹병 저항성 유전자가 있다고 알려져 있다(Hirai, 2006; Piao 등, 2009). 그리고 *B. rapa*에 속하는 배추(*B. rapa* subsp. *pekinensis*)의 뿌리혹병 저항성 품종은 European fodder turnip의 저항성 유전자를 도입하여 개발되었다(Yoshikawa, 1993; Hirai, 2006). 그리고 배추 저항성 유전자는 단인자 우성 유전을 한다고 알려져 있다(James와 Williams, 1980; Kuginuki 등, 1999; Yoshikawa, 1993). 이와 달리 *B. oleracea*의 뿌리혹병 저항성 품종은 매우 드물어 단지 몇 품종만이 일본에서 개발되어 사용되고 있다(Baggett와 Kean, 1985). 몇 개의 *B. oleracea* 저항성 유전자원이 보고된 바 있으나, 이들 저항성은 고전적인 유전 분석 및 분자마커 분석에서 단인자가 아닌 다인자 유전을 한다고 알려져 있다(Figdore 등, 1993; Grandclement와 Thomas, 1996; Landry 등, 1992; Moriguchi 등, 1999; Nomura 등, 2005; Rocherieux 등, 2004; Voorrips 등, 1997). 하지만 저항성을 약 54%를 설명할 수 있는 QTL 유전자 *pb-3*과 같은 주요한 유전자가 존재한다고 하였다. 그러나 불행하게도 이들을 검정할 수 있는 특이적인 primer 혹은 RFLP 마커 등은 알려지지 않았다. 이와 같이 뿌리혹병 저항성 양배추는 2개 이상의 유전자가 관여하는 양적 저항성이며 저항성 유전자에 관련된 정보가 아직 부족한 실정이어서 저항

성 품종의 개발이 지연되고 있다(Hirai, 2006). *P. brassicae*에 대한 *B. oleracea*의 저항성에 관한 연구 및 새로운 저항성 육종 소재를 발굴하기 위해서는 반드시 효율적인 저항성 검정 방법이 필요하다.

본 연구는 *B. oleracea*에 속하는 양배추와 브로콜리의 저항성 품종을 개발하기 위한 효율적인 뿌리혹병 저항성 검정 방법을 확립하고, 몇 개의 *P. brassicae* 균주를 사용하여 시판 중인 16종 양배추와 17종 브로콜리 품종의 뿌리혹병 저항성 정도를 조사하였다.

나. 재료 및 방법

식물 재배

양배추 두 품종 대박나(아시아종묘), 오조라(사카타코리아) 종자와 브로콜리 두 품종 녹국(아시아종묘), 아오시마(사카타코리아) 종자를 5×8육묘용 연결포트(70 ml/pot, 범농사)에 원예용상토 5호(부농사)를 넣고 파종하여 온실(25 ± 5°C)에서 14일 동안 재배한 후 실험에 사용하였다. 뿌리혹병균의 레이스 검정 실험에서는 Williams 판별 기주 4종(양배추 ‘Jersey Queen’과 ‘Badger Shipper’ 그리고 rutabaga ‘Laurentian’과 ‘Wilhelmsburger’)을 동일한 방법으로 파종하고 재배하여 실험에 사용하였다.

양배추와 브로콜리 시판 품종의 뿌리혹병 저항성 검정 실험은 농우바이오, 몬산토코리아, 사카타코리아, 아시아종묘, 코레곤종묘, 한국다끼이 등의 종자회사가 판매하고 있는 양배추 16종 품종(그랜드마트, 그린햇, 꼬꼬마, 대박나, 레드마트, 루비아, 아시아볼, 오가네, 오조라, 중생루비아, 레드선, YR에코플러스, YR온누리, YR옴파로스, YR호걸, YR호남)과 브로콜리 17종 품종(녹국, 녹색, 킹돔, 파트너, 얼리유, 에쿠스, 나이스그린, 베리돔, 에이스돔, 그린매직, 녹색, 아오시마, 청제, 하이파이버, 그랜저, 업웰빙, 필그림)을 구입하여 위와 동일한 방법으로 재배하여 실험에 사용하였다.

균주 및 접종원 준비

2009년부터 2010년까지 경기도 연천군(YC), 충청북도 괴산시(GS) 및 강원도 강릉시(GN1, GN2) 등의 배추 및 양배추 재배포장 4곳에서 전형적인 뿌리혹병을 보이는 뿌리를 채집하였다(Table 22). 채집한 시료는 -80°C deep freezer에 보관하면서 실험에 사용하였다.

접종하기 직전에 보관 중인 보관 중인 뿌리혹병에 걸린 시료를 꺼내어 증류수로 수차례 세척하여 이물질을 깨끗이 제거한 후 멸균수를 첨가하여 Waring blender로 마쇄하였다. 이로부터 식물 조직을 제거하기 위하여 2겹의 가제로 여과하였으며, 준비한 포자현탁액은 광학현미경하(300배)에서 hemocytometer를 이용하여 포자수를 측정하였다(Jo 등, 2011). 포자 농도에 따른 뿌리혹병 발생 실험을 제외한 모든 실험은 포자현탁액의 최종농도를 ml 당 5×10^8 개가 되도록 멸균수로 희석하여 접종원으로 사용하였다. 포자 농도에 따른 뿌리혹병 발병 실험에서는 포자현탁액 농도를 ml 당 6.3×10^7 , 1.3×10^8 , 2.5×10^8 , 5×10^8 및 1×10^9 개로 각각 조정하여 실험에 사용하였다.

Table 22. Four field isolates of *Plasmodiophora brassicae* used in this study

Isolate	Collection districts	Host	Year
GS	Goesan-gun, Chungcheongbuk-do	Cabbage	2009
GN1	Gangneung-si, Gangwon-do	Chinese cabbage	2009
GN2	Gangneung-si, Gangwon-do	Chinese cabbage	2010
YC	Yeoncheon-gun, Gyeonggi-do	Chinese cabbage	2009

접종 및 병조사

온실에서 재배한 양배추와 브로콜리 유묘에 포자현탁액을 포트 당 5 ml 씩 토양 관주하여 접종하였다. 접종한 유묘는 20°C 항온항습실에서 하루에 12시간 동안 광을 처리하며 3일 동안 배양한 후에 온실(20 ± 5°C)로 이동하여 수분을 공급하며 재배하였다. 배양 기간에 따른 뿌리혹병 발생 실험을 제외한 모든 실험은 접종 5주 후에 뿌리를 수확하여 뿌리혹병 발생 정도에 따라 발병도를 조사하였다. 조사 기준은 0=뿌리혹병 발생이 없음, 1=측근에 흑이 착생되어 비대정도가 적고 서로 독립하여 존재, 2=측근에 흑이 착생되며 비대정도가 비교적 큼, 3=주근에 흑이 착생되며 서로 접합되고 비대정도가 큼, 4=주근에 흑이 착생되며 서로 접합되고 비대정도가 매우 큼 등의 5단계로 하였다(Kuginuki 등, 1999; Suwabe 등, 2003).

레이스 검정 실험에서는 Williams 판별 기주 4종(양배추 'Jersey Queen'과 'Badger Shipper' 그리고 rutabaga 'Laurentian'과 'Wilhelmsburger')에 각 뿌리혹병균의 포자현탁액을 포트 당 5 ml 씩 관주하여 접종 6주 후에 뿌리에 발생한 뿌리혹병 정도에 따라 발병도를 조사하였다. 평균 발병도가 1.0 이하 일 때 저항성으로, 그리고 1.0 초과이면 감수성으로 판단하였으며, 4개 기주에서의 반응을 저항성과 감수성으로 결정한 후 Williams 레이스 판별기준표에 따라 레이스를 결정하였다(Williams, 1966). 모든 실험은 10반복으로 2회 실시하였으며, SAS(SAS Institute, Inc., 1989, Cary, NC) 프로그램을 이용하여 ANOVA분석을 하였다. 처리 평균간 비교를 위하여 Duncan's multiple range test ($P=0.05$)를 실시하였다.

다. 결과 및 고찰

균주 및 레이스 검정

Williams(1966)의 레이스 판별 기주인 양배추 2종(Jersey Queen, Badger Shipper)과 rutabaga 2종(Laurentian, Wilhelmsburger)을 이용하여 포장에서 채집한 뿌리혹병균의 레이스를 동정한 결과, 뿌리혹병균들은 레이스 2 혹은 레이스 9로 확인되었다(Table 23). YC 균주는 4종 기주 중 'Wilhelmsburger'에만 저항성을 나타내고, 양배추 두 품종과 rutabaga 'Laurentian'에서는 높은 발병도를 나타내 레이스 2로 동정되었다. GN1, GN2 및 GS 균주들은 rutabaga 두 품종에서는 병원성을 나타내었지만, 양배추 두 품종은 이들 균주에 저항성을 보여 레이스 9로 확인되었다. 우리나라에는 레이스 10과 12를 제외한 모든 레이스가 존재한다고 보고되어 있으며, 이들 중 레이스 2와 4는 우점하는 레이스에 속하며 레이스 9 또한 배추에서 많이 발견되는 레이스 중 하나로 보고되었다(Cho 등, 2003; Jang 등, 2007).

Table 23. Race determination of four field isolates of *Plasmodiophora brassicae* using the differential varieties of Williams (1966)^a

Host	<i>P. brassicae</i> isolate			
	GS	GN1	GN2	YC
Jersey Queen	0.5 ± 0.5 ^b (R ^c)	0.7 ± 0.8 (R)	0.9 ± 0.3 (R)	3.9 ± 0.3 (S)
Badger Shipper	0.0 ± 0.0 (R)	0.0 ± 0.0 (R)	0.1 ± 0.3 (R)	3.7 ± 0.5 (S)
Laurentian	3.9 ± 0.3 (S)	3.5 ± 0.7 (S)	3.6 ± 0.8 (S)	3.8 ± 0.6 (S)
Wilhelmsbuger	2.4 ± 0.7 (S)	2.4 ± 0.5 (S)	2.9 ± 0.5 (S)	0.2 ± 0.4 (R)
Race	9	9	9	2

^a14-day-old seedlings were inoculated with *P. brassicae* by drenching the roots with the spore suspension of each isolate to give inoculum density of 2.5×10^9 spores/pot. The plants were incubated in a growth chamber at 20°C for 3 days with 12-hr light a day and then transferred to a greenhouse (20 ± 5°C). Six weeks after inoculation, disease severity of seedlings was rated on a scale 0 to 4. 0, no symptoms; 1, a few very small separate globular clubs on lateral roots; 2, medium separate globular clubs on lateral roots; 3, intermediate symptoms on main roots; and 4, severe clubs on main roots.

^bEach value represents the mean (± standard deviation) of two runs with 10 replicates each.

^cS, susceptible (disease index ≥ 1.0); R, resistant (disease index < 1.0).

접종 농도와 배양 기간에 따른 뿌리혹병 발생

GN1 균주를 이용하여 접종 농도와 접종 후 배양 기간에 따른 발병 정도를 조사하기 위하여, 14일 동안 재배된 양배추 2품종('대박나', '오조라')과 브로콜리 2품종('녹국', '아오시마')에 포트 당 3.1×10^8 , 6.3×10^8 , 1.3×10^9 , 2.5×10^9 및 5.0×10^9 개씩을 접종하고 4주, 5주 그리고 6주 동안 재배한 후에 발병도를 조사하였다. 접종된 양배추 '대박나'와 '오조라' 그리고 브로콜리 '아오시마'와 '녹국'의 모든 처리구의 평균 발병도는 각각 1.9, 3.2, 2.8 및 2.7로 '대박나'는 다소 낮은 뿌리혹병 발생이 있었으나, 나머지 세 품종은 유사한 정도의 감수성을 나타냈다(Fig. 19). 포트 당 접종농도가 3.1×10^8 , 6.3×10^8 , 1.3×10^9 , 2.5×10^9 및 5.0×10^9 개로 증가함에 따라 양배추 '대박나'는 1.3, 1.7, 1.8, 2.4, 2.6의 뿌리혹병 발병도를, 양배추 '오조라'는 1.9, 3.1, 3.5, 3.7, 3.7의 발병도를, 브로콜리 '아오시마'는 2.0, 2.4, 2.8, 3.3, 3.3의 발병도를, 그리고 브로콜리 '녹국'은 1.6, 2.3, 3.1, 3.2, 3.4로 실험한 양배추와 브로콜리는 품종에 관계없이 접종한 포자의 수가 증가할수록 뿌리혹병 발생은 증가하였다.

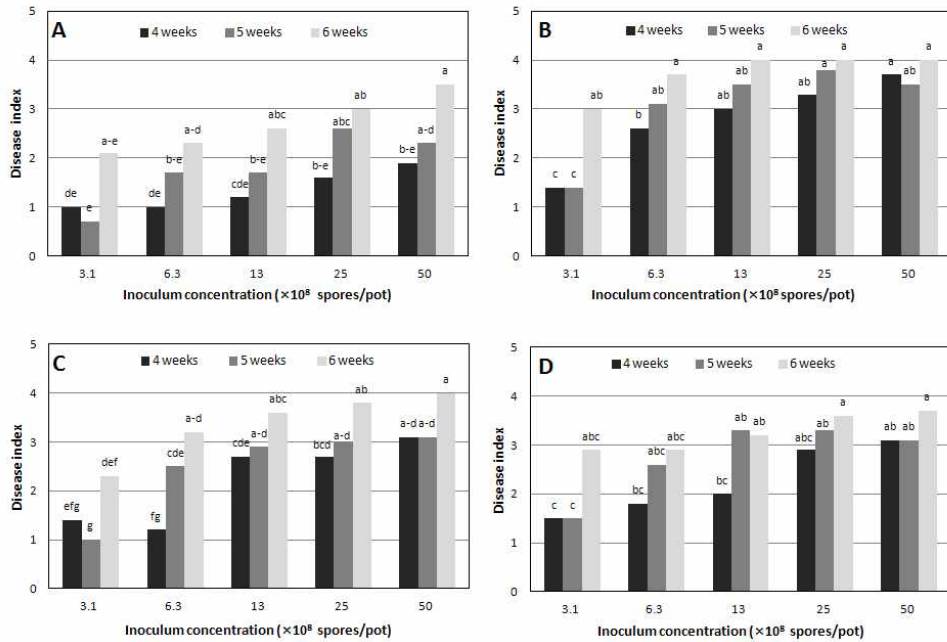


Fig. 19. Clubroot development of cabbage (A, B) and broccoli (C, D) seedlings according to inoculum concentration and incubation period after inoculating with *Plasmodiophora brassicae*. A, Daebakna; B, Ohjora; C, Nokguk; D, Ahosima. 3.1, 3.1×10^8 spores/pot; 6.3, 6.3×10^8 spores/pot; 13, 1.25×10^9 spores/pot, 25, 2.5×10^9 spores/pot; 50, 5.0×10^9 spores/pot. Columns labeled with the same letter are not significantly different in Duncan's multiple range test ($P = 0.05$).

실험한 양배추와 브로콜리 품종들은 접종 후 재배 기간이 4주, 5주 및 6주로 길어짐에 따라 ‘대박나’는 1.3, 1.8, 2.7의 뿌리혹병 발병도를, ‘오조라’는 2.8, 3.1, 3.7의 발병도를, ‘아오시마’는 2.3, 2.8, 3.3의 발병도를 그리고 ‘녹국’은 2.2, 2.5, 3.4의 평균 발병도를 나타내었다(Fig. 19). 두 기주의 품종 모두에서 뿌리혹병균을 접종하고 재배 기간이 길어짐에 따라 뿌리혹병 발생은 증가 하였다. 접종 4주 후에는 뿌리혹병 발생이 적고, 접종 후에 6주 동안 재배하였을 때에는 품종 간의 저항성 차이가 줄어들어 접종 5주 후에 병조사하는 것이 바람직하다고 생각되었다.

이상의 결과로부터 양배추 및 브로콜리의 뿌리혹병에 대한 저항성을 효율적으로 검정하기 위해서는 포트 당 2.5×10^9 개의 포자를 접종하고 $20 \pm 5^\circ\text{C}$ 의 온실에서 5주 동안 재배하는 것이 적합하다고 생각되었다.

포장 균주에 대한 양배추와 브로콜리 품종의 저항성

시판되고 있는 양배추와 브로콜리 품종들의 뿌리혹병 저항성 정도를 알아보기 위하여, 양배추 16종과 브로콜리 17종을 4개의 *P. brassicae* 포장 균주로 접종하고 5주 동안 재배한 결과, 실험한 품종들은 4개 균주에 대하여 다양한 저항성 반응을 나타내었다(Tables 24, 25). GN1, GN2, GS 및 YC 균주에 의한 16종 양배추 품종의 뿌리혹병 평균 발병도는 각각 2.3, 2.7, 2.8 및 4.0으로 *P. brassicae* 균주 간에 병원성 차이가 있었다(Table 24). 레이스 2인 YC 균주에 대해서는 실험한 모든 품종이 높은 감수성을 나타내었지만, 레이스 9인 GN1, GN2 및 GS 균주

에 대해서는 ‘오가네’는 GN1, GN2, GS 균주들에 대하여 중도저항성을 보였고, ‘YR 온누리’, ‘대박나’, ‘YR 호남’ 및 ‘YR 옴팔로스’는 GN1 균주에 대하여 중도저항성을 나타내었다. 하지만 고도의 저항성을 나타내는 품종은 없었다.

GN1, GN2, GS 및 YC 균주에 의한 17종 브로콜리 품종의 평균 발병도는 각각 2.5, 2.6, 3.1 및 4.0으로 양배추와 유사한 결과를 보였다(Table 25). 양배추와 브로콜리 모두 YC 균주의 병원성이 가장 높았으며, GS, GN2 그리고 GN1 균주 순으로 병원성이 높았다. 레이스 2인 YC 균주는 양배추와 마찬가지로 실험한 모든 품종에서 발병도 4.0으로 고도의 감수성을 나타냈고, 레이스 9인 GN1 균주는 ‘킹덤’, ‘파트너’, ‘나이스그린’, ‘녹국’, ‘녹세’에 대하여 중도저항성을 보이고, GN2 균주는 ‘베리돔’에 그리고 GS 균주는 ‘하이파이브’, ‘그린매직’ 및 ‘그랜저’에 중도저항성을 나타냈다. 이렇게 양배추와 브로콜리 몇 가지 품종들이 균주에 대하여 다양한 반응을 보이는 이유는 각 병원균의 생리분화에 따른 병원성의 차이와 각 품종이 지닌 복합적인 저항성 유전자가 품종마다 상이하여 균주에 대한 저항성 반응이 다르게 나타난다고 생각되었다(Buczacki 등, 1975; Tanaka 등, 2006). 한편 YC 균주에 의해 모든 양배추 및 브로콜리 품종에서 4.0의 높은 발병도를 나타낸 것은 레이스 2가 Williams 판별품종 중 양배추 2품종(Jersey Queen과 Badger Shipper) 모두에 뿌리혹병을 일으키는 레이스이기 때문에 나타난 결과로 생각되었다. 따라서 양배추 뿌리혹병에 대한 저항성 품종 스크리닝을 위해서는 Williams 판별품종의 양배추 두 품종을 모두 감염할 수 없는 레이스 9 균주가 레이스 2보다 더 적합하리라 생각되었다(Williams, 1966).

*B. oleracea*의 뿌리혹병에 대한 저항성 유전자에 관한 연구가 현재에도 활발히 진행되고 있다(Carlsson 등, 2004). 케일과 양배추 등에서 많은 저항성 유전자를 발견하였으나(Crisp 등, 1989; Landry 등, 1992; Manzanares-Dauleux 등, 2000), *B. oleracea*의 뿌리혹병에 대한 저항성은 두 개 이상의 다인자에 의해 결정되므로 저항성 품종 개발에 많은 어려움이 따른다(Moriguchi 등, 1999; Nomura 등, 2005; Rocherieux 등, 2004; Voorrips 등, 1997). 현재 저항성 유전자원을 이용하여 뿌리혹병에 대해 저항성인 양배추 품종이 육종되고 있지만, 국내에는 아직 시판되는 저항성 품종이 없다. 따라서 본 연구에서 확립한 양배추와 브로콜리 저항성 스크리닝 방법은 새로운 저항성 유전자원을 발굴하거나 분자마커 개발 및 저항성 유전자 규명 등의 연구에 유용하게 사용되리라 생각되었다.

Table 24. The degree of resistance of sixteen commercial cabbage cultivars to four field isolates of *Plasmodiophora brassicae*^a

Cultivar	GN1 (race 9)	GN2 (race 9)	GS (race 9)	YC (race 2)
Ohgane	1.4efg ^b	1.3c	1.9c	4.0a
YR-Onnuri	1.1g	2.5ab	2.1bc	4.0a
Daebakna	1.6d-g	2.3abc	2.7abc	4.0a
YR-Honam	1.3fg	2.8ab	2.6abc	4.0a
YR-Omphalos	1.2fg	3.4abc	3.8a	4.0a
Jungsaengrubia	2.6bcd	2.1bc	2.5abc	4.0a
YR-Hogeol	2.0c-g	3.1ab	2.5abc	4.0a
Redmart	2.5bcd	2.1bc	3.5ab	4.0a
YR-Ecoplus	2.9abc	2.6ab	2.7abc	4.0a
Asiaball	2.2b-f	2.8ab	3.3abc	4.0a
Kkokkoma	2.6bcd	2.6ab	3.1abc	4.0a
Redsun	2.8abc	2.8bc	2.8abc	4.0a
Grandmart	2.4b-e	3.1ab	2.9abc	4.0a
Rubia	3.2abc	2.5abc	3.1abc	4.0a
Greenhot	3.2abc	3.0ab	3.3abc	4.0a
Ohjora	3.7abc	3.5a	2.7abc	4.0a
Mean	2.3	2.7	2.8	4.0

^aSeedlings of 16 commercial cultivars were inoculated with *P. brassicae* by drenching the roots with the spore suspension of each isolate to give inoculum density of 2.5×10^9 spores/pot. The plants were incubated in a growth chamber at 20°C for 3 days with 12-hr light a day and then transferred to a greenhouse (20 ± 5°C). Five weeks after inoculation, disease severity of cabbage seedlings was rated on a scale 0 to 4. 0, no symptoms; 1, a few very small separate globular clubs on lateral roots; 2, medium separate globular clubs on lateral roots; 3, intermediate symptoms on main roots; and 4, severe clubs on main roots.

^bEach value represents the mean disease index of two runs with 10 replicates each. Values in the labeled with the same letter are not significantly different in Duncan's multiple range test ($P = 0.05$).

Table 25. The degree of resistance of seventeen commercial broccoli cultivars to four field isolates of *Plasmodiophora brassicae*^a

Cultivar	GN1 (race 9)	GN2 (race 9)	GS (race 9)	YC (race 2)
Highfive	2.2bcd ^b	2.4abc	1.9bc	4.0a
Greenmagic	2.4bcd	2.5ab	1.7c	4.0a
Grandeur	2.5a-d	2.7ab	1.7c	4.0a
Kingdom	1.5d	2.9ab	2.9abc	4.0a
Partner	1.5d	2.7ab	3.2a	4.0a
Nicegreen	1.6d	2.6ab	3.8a	4.0a
Nokguk	1.7cd	3.1ab	3.3a	4.0a
Nokse	1.4d	3.2ab	3.5a	4.0a
Earlyou	2.4bcd	2.4abc	3.3a	4.0a
Cheongje	2.5a-d	2.3ab	3.3a	4.0a
Acedom	3.2ab	2.3abc	3.0a	4.0a
Verydom	3.6a	1.8bc	3.5a	4.0a
Nokje	3.6a	2.4abc	3.0ab	4.0a
Equus	2.4bcd	3.4a	3.4a	4.0a
Aoshima	3.1ab	3.1ab	3.5a	4.0a
Upwellbeing	3.3ab	3.1ab	3.5a	4.0a
Pilgrim	2.8abc	3.4a	3.8a	4.0a
Mean	2.5	2.6	3.1	4.0

^aSeedlings of 17 commercial cultivars were inoculated with *P. brassicae* by drenching the roots with the spore suspension of each isolate to give inoculum density of 2.5×10^9 spores/pot. The plants were incubated in a growth chamber at 20°C for 3 days with 12-hr light a day and then transferred to a greenhouse (20 ± 5°C). Five weeks after inoculation, disease severity of broccoli seedlings was rated on a scale 0 to 4. 0, no symptoms; 1, a few very small separate globular clubs on lateral roots; 2, medium separate globular clubs on lateral roots; 3, intermediate symptoms on main roots; and 4, severe clubs on main roots.

^bEach value represents the mean disease index of two runs with 10 replicates each. Values in the labeled with the same letter are not significantly different in Duncan's multiple range test ($P = 0.05$).

7. 무 시들음병 저항성 병리검정 기술 체계 확립

가. 효율적인 무 시들음병 검정법 및 무 품종들의 병 저항성

(1) 서론

무(*Raphanus sativus*)는 오래 전부터 여러 가지 형태로 중국, 한국, 일본 및 유럽의 온대 지방 등에 널리 존재해 왔다(표와 최, 1989). 우리나라 5대 채소 중 하나인 무의 2006년 재배

면적은 13,192 ha로서 533,210 톤이 생산되었다(농림수산식품부, 2007). 무는 저온 감온성이 낮은 신품종 육성과 새로운 작형 세분화로 년중 재배가 가능하게 되었으나, 오랜 기간의 연작으로 인해 각종 병해와 생리적인 장애가 점차 증가하고 있다. 지금까지 무에 발생하는 병해로는 탄저병 등 19종이 보고되어 있다(한국식물병리학회, 2009).

무 시들음병을 일으키는 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*는 불완전균류로 토양 내에서 후벽포자를 형성하여 기주식물 없이도 수년간 휴면상태로 존재하는 것이 가능하다. 그리고 환경이 병해 발생에 양호해지면 후벽포자는 발아하여 기주식물의 뿌리를 침입하여 병을 일으킨다(van Peer 등, 1988). 무 시들음병은 1934년 미국 캘리포니아 San Benito에 있는 White Chinese Winter Radish 채종포에서 처음 보고되었으며, 그 후 1946년 위스콘신 Waukesha의 무 포장에서 무 시들음병 발생이 보고된 후 현재는 미국 각지에서 발생하고 있다(Pound, 1959; Pound와 Fowler, 1953). 우리나라에서는 오래 전부터 이 병이 발생해 왔을 것으로 추정하고 있으나, 1987년에 춘천근교의 무 재배단지에서 처음 보고되었다(남, 1994). 우리나라 여름 무 재배지에서는 6월 말~7월 초 무 생육기에 하엽 부위부터 시들음 증상과 함께 황변하는 증상이 관찰되고 수확기에 지상부위가 말라죽는 병이 발생하였으며, 발병한 뿌리는 생육이 불량하여 상품성이 없고 뿌리를 절단해 보면 도관부가 황변되거나 조직이 경화되어있으며, 비온 후 채집한 뿌리 표면에서는 균사 생장을 관찰할 수 있었다(조 등, 1990; 이 등, 2003).

무 시들음병을 방제하기 위한 방법으로 저항성 품종을 재배하거나 윤작, 건전종자 소독 후 파종, 석회시용, 질소비료의 과용 금지, 토양소독 등이 사용되고 있다(농촌진흥청, 2002). 무는 넓은 면적에서 재배하므로 토양 훈증처리와 같은 토양 살균처리는 경제성이 낮으며, 국내에는 무 시들음병 방제용으로 등록된 살균제가 없을 뿐만 아니라(한국작물보호협회, 2008) 인축 독성과 환경에 대한 관심의 증가로 친환경 농산물의 수요가 증가함에 따라 훈증제 등의 합성 살균제 사용은 점차 줄어들고 있는 실정이다. 그러므로 오늘날 저항성 품종의 재배는 무 시들음병 방제에 있어 가장 환경 친화적인 방법으로 인식되고 있다. 현재 무 시들음병(*F. oxysporum* f. sp. *raphani*)에 저항성인 무 품종들이 농우바이오, 동부하이텍, 몬산토코리아, 신젠타종묘, 코레곤종묘 등의 회사에서 판매하고 있으나, 무 시들음병 저항성 유전자 규명과 저항성 유전양식 그리고 분자마커 개발에 대해서는 거의 보고된 바 없다. 이들 연구를 위해서는 효율적인 병 저항성 검정법이 필수적이다.

따라서 본 연구에서는 효율적인 무 시들음병 저항성 검정법을 확립하고자 접종 방법, 접종원 농도, 침지 시간 등 다양한 발병 조건에 따른 무 시들음병 발생 정도를 조사하였으며, 확립한 검정법을 이용하여 시판품종 41종의 무 시들음병 저항성 정도를 확인하였다.

(2) 재료 및 방법

무 재배

병 저항성 검정법을 확립하기 위한 무 시들음병 실험은 송백무(동부하이텍)와 토광무(동부하이텍) 종자를 사용하였다. 8 × 16 연결 포트(포트 당 토양 20 mL, (주)범농)에 원예용상토 5호(부농사)를 넣고 무 종자를 1립씩 파종하여 온실(25 ± 5°C)에서 14일 동안 재배한 무 유묘를 실험에 사용하였다. 시판 품종의 무 시들음병 저항성 검정 실험은 종자회사에서 시들음병 저항성 품종으로 판매하고 있는 8종 품종과 저항성으로 공시하지 않은 33종 품종을 구입하여 위와 동일한 방법으로 재배하여 실험에 사용하였다.

그 외 관주 접종은 경우 5 × 8 연결 포트(포트 당 토양 70 m^l, (주)범농)에 원예용상토 5호를 넣고 무 종자를 1립씩 파종하여 온실에서 7, 10, 14일 재배한 후 접종실험에 사용하였다.

접종원 준비

무에 시들음병을 일으키는 *F. oxysporum* f. sp. *raphani* KR1균주는 강릉원주대로부터 분양받았으며, 이 균주를 potato dextrose agar(Becton, Dickinson and Co.) 배지에 치상하여 25°C 항온기에서 7일 동안 배양한 균총으로부터 균사조각을 떼어 malt extract broth(Becton, Dickinson and Co.) 배지에 접종하고 이를 25°C 암 상태에서 7일 동안 150 rpm으로 진탕배양하였다. 배양한 KR1 균주는 4겹의 거즈로 걸러 균사를 제거하고, 광학현미경 하에서 hemocytometer를 이용하여 포자(소형분생포자)의 농도를 측정하였다. 멸균수로 1.0 × 10⁷ conidia/m^l가 되도록 희석하여 접종원으로 사용하였다. 접종원 농도실험의 경우에는 각각 1.0 × 10⁶, 3.0 × 10⁶, 1.0 × 10⁷, 3.0 × 10⁷ conidia/m^l로 조정하였으며, 그 외 관주 접종은 경우는 5.0 × 10⁷, 1.5 × 10⁸ conidia/pot 농도로, 이병토 접종법의 경우는 토양 m^l 당 5.0 × 10³과 5.0 × 10⁴개가 되도록 접종원을 준비하였다.

시들음병균 접종

이병토 접종법과 관주 접종법으로 병원균을 접종하는 경우를 제외한 모든 실험은 온실에서 재배한 무의 뿌리를 뽑아 물로 세척하여 흙을 제거한 후 포자현탁액에 2시간 동안 침지하여 접종하였다. 접종한 무 유묘는 5 × 8 연결 포트에 원예용상토 5호를 사용하여 이식하였다. 침지 접종법 중 뿌리 상처는 세척한 뿌리를 가위를 이용하여 2 cm 정도 남기고 자른 후에 포자현탁액에 침지하였다. 또한 침지시간에 따른 무 시들음병 발생의 경우에는 포자현탁액에 각각 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 16시간, 24시간 동안 침지하여 접종하였다. 관주 접종법의 경우에는 5 × 8 연결 포트에서 재배한 무 유묘에 준비한 포자현탁액을 포트 당 5 m^l를 관주하여 접종하였다. 이병토 접종법의 경우에는 멸균한 원예용상토 5호에 100 m^l 당 포자현탁액을 5 m^l를 넣고 잘 섞어 제조한 이병토를 5×8 연결 포트(포트 당 토양 70 m^l)에 넣고 무 종자를 포트 당 1립씩 파종하여 접종하였다.

발병 및 병조사

접종한 무 유묘는 1일 동안 25°C 습실상에서 배양한 후 온실(25 ± 5°C)로 옮겨 약 3~4주 동안 병 발생을 관찰하면서 재배하였다. 병조사는 식물체의 뿌리를 뽑아 세척한 후 도관을 잘라 발병정도를 조사하였다. 발병정도는 0=건전, 1=지하부 도관은 갈변되나 지상부는 병징이 없는 것, 2=지하부는 갈변되고 지상부는 약간 생육이 억제되는 것, 3=지하부는 갈변되고 지상부는 생육이 억제되며 약간 황화된 것, 4=지하부는 갈변되고 지하부와 지상부의 생육은 모두 심하게 억제되며 심하게 황화된 것, 5=고사 등 6단계로 하였으며, 평균 발병도가 1.0 이하인 경우에는 저항성, 1.1~2.5는 중도저항성, 2.5 초과는 감수성으로 판정하였다. 시판품종의 무 시들음병 저항성 실험은 10반복으로 2회 실시하였으며, 이를 제외한 모든 실험은 5반복으로 2회 실시하였다. SAS(SAS Institute, Inc., 1989, Cary, NC) 프로그램을 이용하여 ANOVA 분석을 하였으며, 처리 평균간 비교를 위하여 Duncan's multiple range test ($P=0.05$)를 실시하였다.

(3) 결과 및 고찰

접종법에 따른 무 시들음병 발생

송백무와 토광무에 시들음병을 일으키기 위해, 다른 기주식물에서 *Fusarium* 시들음병 발생을 위해 사용한 접종 방법인 이병토 접종법, 관주 접종법 그리고 뿌리의 포자현탁액 침지법을 이용하여 무 시들음병 발생을 실험하였다. 이병토 접종법의 경우에는 송백무와 토광무 모두에서 시들음병이 발생하지 않았다. 조 등(1990)은 원예용상토 : Vermiculite = 1:1의 혼합 토양에 토양 m/ 당 2.5×10^4 개가 되도록 *F. oxysporum* f. sp. *raphani* KR1의 포자현탁액을 섞어 준비한 이병토에 종자를 파종하여 실험을 수행하였다고 보고하였으나, 본 실험에서는 토양 m/ 당 5.0×10^3 과 5.0×10^4 개의 접종원 농도로 준비한 이병토에 무 종자를 파종하여 접종하였을 때, 모든 처리구에서 시들음병이 발생하지 않았다. 따라서 이병토 접종법은 무 시들음병 저항성 검정에 적합하지 않은 접종 방법으로 생각되었다.

그리고 무 시들음병균을 관주하여 접종한 관주 접종법의 경우에도 포트 당 1.5×10^8 개의 포자농도로 접종하여 실험한 모든 생육시기의 무 유묘에서 무 시들음병이 발생하지 않았다 (Table 26). 송 등(1996)은 양배추 시들음병(*F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*) 발생을 위하여 병원균을 접종하였을 때, 토양 관주법보다 침지 접종법에서 병 발생이 다소 높았다고 보고하였다. 그러나 본 연구의 무 시들음병은 관주 접종법에 의해서는 병이 전혀 발생하지 않았으므로, 관주 접종법 또한 무 시들음병 저항성 검정에 적합하지 않은 것으로 생각되었다.

한편, 침지 접종법의 경우에 뿌리를 잘라 상처를 내고 접종한 결과, 송백무와 토광무 모두에서 높은 발병도를 보였다(Table 27). 그러나 자르지 않은 뿌리를 포자현탁액에 침지하여 실험하였을 때에는 송백무는 상처 유무와 관계없이 모두 높은 시들음 증상을 보였으나, 토광무는 상처 처리구보다 낮은 발병도를 나타냈다. 따라서 무 시들음병 저항성 검정을 위한 접종법으로 뿌리를 잘라주는 상처 없이 접종하는 방법은 품종 간 차이를 확실하게 나타내므로 더 적합한 방법으로 사료된다.

Table 26. Occurrence of *Fusarium* wilt in two radish cultivars after soil drenching of spore suspension of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* KR1^a

Inoculum (conidia/pot)	Cultivar	Plant growth stage (after sowing)		
		7 days	10 days	12 days
5.0×10^7	Songbaek	0 ^b	0	0
	Tokwang	0	0	0
1.5×10^8	Songbaek	0	0	0
	Tokwang	0	0	0

^aEach seedling of two radish cultivars was inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *raphani* KR1 by drenching the spore suspensions on soil of each pot. The infected plants were incubated in humidity chamber at 25°C for 24 hr and then transferred to a greenhouse at 25 ± 5°C. After 3 weeks, disease severity of the radish seedlings was investigated.

^bEach value represents the mean disease index of two runs with five replicates each.

접종원 농도에 따른 병 발생

송백무와 토광무 두 품종 모두 접종원 농도가 증가함에 따라 무 시들음병 발생은 증가하였다(Fig. 20). 3.0×10^7 conidia/ml의 포자현탁액에 침지한 송백무와 토광무는 각각 5.0과 4.6의 발병도를 나타내었으며, 1.0×10^7 conidia/ml 농도에서는 송백무는 4.2, 토광무는 3.4의 무 시들음병 발생률을 보였다. Kuc(1987; 1994)는 식물체의 병 저항성 검정에서 고농도로 병원균을 접종하면 식물체가 조기 낙엽되어 저항성을 유도할 수 있는 잎이 없어 정확한 저항성 검정이 이루어질 수 없다고 보고한 바 있다. 따라서 무 시들음병 저항성 스크리닝을 위해서는 1.0×10^7 conidia/ml 접종원 농도의 포자현탁액에 뿌리를 침지하는 것이 적당하리라 생각된다.

Table 27. Development of Fusarium wilt in two radish cultivars when cut and non-cut roots were dipped in the spore suspension of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* KR1^a

Method	Cultivar	
	Tokwang	Songbaek
Cut root	4.9±0.1a ^b	4.6±0.3a
Non-cut root	2.6±0.3b	4.5±0.4a

^a14-day-old seedlings of two radish cultivars were inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *raphani* KR1 by dipping the roots of radish seedlings in spore suspension of 1.0×10^7 conidia/ml for 2 hr. The infected plants were incubated in humidity chamber at 25°C for 24 hr and then transferred to a greenhouse at $25 \pm 5^\circ\text{C}$. After 3 weeks, disease severity of the radish seedlings was investigated.

^bEach value represents the mean disease index \pm standard deviation of two runs with five replicates each. Values in the labeled with the same letter are not significantly different in Duncan's multiple range test at $P = 0.05$.

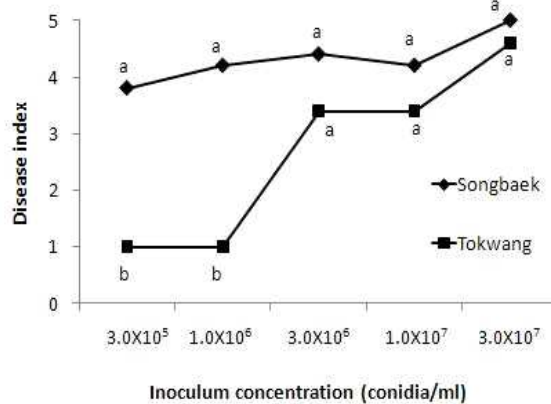


Fig. 20. Fusarium wilt occurrence of two radish cultivars according to inoculum

concentration. 14-day-old seedlings of two radish cultivars were inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* KR1 by dipping the roots of the radish seedlings in each spore suspension for 2 hr. The infected plants were incubated in humidity chamber at 25°C for 24 hr and then transferred to a greenhouse at 25 ± 5°C. After 3 weeks, disease severity of radish seedlings was investigated. Each value represents the mean of two runs with five replicates each. Values in the labeled with the same letter are not significantly different in Duncan's multiple rage test at $P = 0.05$.

침지시간에 따른 병 발생

송백무와 토광무 뿌리를 무 시들음병균 포자현탁액에 각각 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 16시간, 24시간 동안 침지하여 접종한 결과, 모든 처리구에서 높은 시들음병 발생을 보였다. 하지만 침지시간을 길게 하여도 무 시들음병 발생이 증가하지는 않았다(Table 28). 본 연구에서는 1시간의 짧은 시간 동안 침지하여도 높은 병 발생을 보여 더 짧은 시간 침지처리에 의한 무 시들음병 발생에 대해서는 앞으로 검토할 필요가 있다. 이 등(2003)은 위황병 저항성 계통의 육성실험에서 묘를 뽑아 뿌리를 분생포자 현탁액에 2시간 침지하여 실험하였다. 그리고 일반적으로 곰팡이 포자는 수 시간 이내에 점액물질을 분비하여 기주에 부착하므로, 무 시들음병균 접종을 위하여 무 뿌리의 포자현탁액 침지시간은 2시간이 적당하리라 판단되었다(Agrios, 2005).

Table 28. Fusarium wilt development of two radish cultivars according to root dipping period^a

Cultivar	Incubation period (hr)					
	1	2	4	8	16	24
Songbaek	4.8a ^b	3.6ab	3.6ab	2.2b	3.0ab	3.0ab
Tokwang	4.6a	3.4ab	4.2ab	4.0ab	3.2ab	3.4ab

^a14-day-old seedlings of two radish cultivars were inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* KR1 by dipping the roots of radish seedlings in spore suspension of 1.0×10^7 conidia/ml. The infected plants were incubated in humidity chamber at 25°C for 24 hr and then transferred to a greenhouse at 25 ± 5°C. After 3 weeks, disease severity of the radish seedlings was investigated.

^bEach value represents the mean disease index of two runs with five replicates each. Values in the labeled with the same letter are not significantly different in Duncan's multiple rage test at $P = 0.05$.

F₁ 품종의 무 시들음병 저항성

본 연구에서 확립한 무 시들음병 저항성 검정법을 사용하여 현재 시판 중인 41종 무품종의 시들음병 저항성 정도를 조사하였다. 종자회사에서 시들음병 저항성 품종으로 판매하고 있

는 8종 품종 중 3종 품종(38%)은 높은 저항성을 나타냈었으나, 5종 품종(62%)은 중도저항성을 나타내었다(Table 29). 한편, 시들음병 저항성으로 공시하지 않은 무 33종 품종 중 3종 품종(9%)은 이 병에 대하여 높은 저항성을 나타내었으며, 17종 품종(52%)은 중도저항성을 나타냈다. 그 외 13종 품종(39%)은 시들음병에 대하여 감수성을 보였다. 그러므로 시판 품종 41종 무 품종의 시들음병 저항성 정도는 6품종(15%)은 저항성, 22품종(54%)은 중도저항성, 그리고 13품종(31%)은 감수성을 보여 시판 품종 중 약 70% 정도가 무 시들음병에 대한 저항성을 지니고 있음을 알 수 있었다.

Table 29. Resistance degree of the 41 commercial radish cultivars to Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* KR1^a

Cultivar	Company	Trait	Disease index
A01	A	YR ^b	0.4±0.14 ^c
B01	B	YR	0.6±0.42
C01	C		0.7±0.00
D01	D		0.9±0.14
E01	E	YR	0.9±0.28
C02	C		1.0±0.21
C03	C		1.1±0.35
C04	C		1.1±0.35
D02	D		1.1±0.00
C05	C		1.1±0.00
E02	E		1.2±0.21
B02	B		1.3±0.35
B03	B		1.3±0.21
B04	B	YR	1.3±0.07
C06	C		1.3±0.28
F01	F	YR	1.4±0.35
B05	B	YR	1.4±0.49
B06	B	YR	1.4±0.28
B07	B		1.4±0.42
B08	B		1.6±0.28
D03	D		1.7±0.14
B09	B	YR	1.8±0.21
A02	A		1.9±1.06
B10	B		2.0±0.14
A03	A		2.1±0.71
A04	A		2.2±0.07
A05	A		2.2±1.13
C07	C		2.5±0.28
A06	A		2.8±1.56
B11	B		2.8±0.42
D04	D		2.9±0.35
C08	C		2.9±0.21
C09	C		3.2±0.49
D05	D		3.2±0.42
C10	C		3.2±0.28
B12	B		3.3±0.49
C11	C		3.4±0.14
A07	A		3.5±0.07

D06	D	3.6±0.71
B13	B	3.9±0.92
C12	C	4.0±0.00

^a14-day-old seedlings of each radish cultivar were inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *raphani* KR1 by dipping the roots of radish seedlings in spore suspension of 1.0×10^7 conidia/ml for 2 hr. The infected plants were incubated in humidity chamber at 25°C for 24 hr and then transferred to a greenhouse at $25 \pm 5^\circ\text{C}$. After 3 weeks, disease severity of the radish seedlings was investigated.

^bResistant cultivar to Fusarium wilt supported by each seed company.

^cEach value represents the mean \pm standard deviation of two runs with ten replicates each.

나. 발병조건에 따른 무 품종들의 시들음병에 대한 저항성 차이

(1) 서론

무(*Raphanus sativus* L.)는 n=9의 동일 계통을 가지는 십자화과 작물로, 고추, 배추, 마늘과 함께 우리나라의 대표적인 채소 중의 하나로 삼국시대에 도입되었으며, 고려시대부터 재배가 보편화된 것으로 추정된다(Ku 등, 2006). 오늘날에는 저온 감온성이 낮은 신품종 무의 육성과 새로운 작형 세분화로 무의 년 중 재배가 가능하게 되어, 2006년도 무의 재배면적은 13,192ha이었으며 533,210톤의 무가 생산되었다(MIFFAFF, 2007). 하지만, 최근에는 많은 양의 화학비료를 사용하는 무의 연작 재배지에서 각종 병해와 생리적인 장애가 점차 증가하여 무 재배에 어려움을 겪고 있다. 현재까지 무에 발생하는 병해로는 시들음병 등 19종이 보고되어있다(KSPP, 2009).

무에 발생하는 주요 병해인 시들음병에 감염되면 식물체는 시들고, 뿌리의 도관부는 흑갈색으로 변하며, 하위 잎은 황갈색으로 되고 심하면 전체가 말라 죽는다(Kendric과 Snyder, 1936; Peterson과 Pound, 1960). 무에 시들음병을 일으키는 *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*는 토양 전염성 병해이며, 후벽포자를 형성하여 기주식물 없이도 토양에 수년간 휴면상태로 존재하는 것이 가능하다. 이 후, 환경이 좋아지면 후벽포자는 발아하여 기주 식물의 뿌리를 침입하여 시들음병을 일으킨다(van Peer 등, 1988). 시들음병은 전 세계적으로 발생하고 있으며, 우리나라에서도 주요 무 재배지에서 연작으로 인한 시들음병 발생이 점차 증가하고 있다(du Toit와 Pelter, 2003; Moon 등, 2001).

무 시들음병의 방제를 위하여 윤작, 토양 훈증, 종자 소독, 질소비료의 과용 금지 등이 사용되고 있으나, 이들 방법은 경제성도 낮고 뚜렷한 방제효과를 기대할 수 없는 실정이며, 무 시들음병에 대해서는 등록된 살균제도 없어 방제에 어려움을 겪고 있다(Alabouvette 등, 1998). 따라서 저항성 품종의 재배는 무의 시들음병 방제에 있어 가장 환경 친화적인 방법으로 인식되고 있다. 현재 무 시들음병에 대한 저항성 품종은 국내에서 몇 개 회사에서 판매하고 있으나, 저항성 유전자의 규명, 저항성 유전 양식 및 저항성 품종 육성을 위한 분자표지 개발 등에 대해서는 거의 보고된 바 없으며, 이들 연구를 위해서는 효율적이고 신뢰할 수 있는 병 저항성 검정 방법이 필수적으로 요구된다.

따라서 본 연구에서는 Baik 등(2010)이 보고한 시들음병에 대한 무 품종들의 저항성 정도

결과를 바탕으로 이 병에 대하여 저항성 정도가 다른 5종 무 품종을 사용하여 상처 유무, 접종 원 농도, 침지 시간 및 재배 온도 등 발병 조건에 따라 이들 품종의 시들음병에 대한 저항성 차이를 조사하여 보다 효율적인 무 시들음병에 대한 저항성 검정 방법을 확립하기 위하여 실험하였다.

(2) 재료 및 방법

무 재배

효율적인 무 시들음병에 대한 저항성 검정법을 확립하기 위하여, Baik 등(2010)이 실험한 무 41품종의 시들음병에 대한 저항성 정도 결과로부터 저항성 정도가 다른 명산무(신젠타종묘), 청두무(아시아종묘), 장생무(아시아종묘), 한농여름무(동부하이텍) 그리고 청수궁중무(아시아종묘) 등 5종 품종을 선발하여 실험에 사용하였다. 8x16연결 포트(포트 당 토양 15 mL, (주)범농)에 원예용상토 5호(부농사)를 넣고 무 종자를 1립씩 파종하여 온실(25 ± 5°C)에서 14일 동안 재배한 무의 어린 모종을 실험에 사용하였다.

접종원 준비

무에 시들음병을 일으키는 *F. oxysporum* f. sp. *raphani* KR1균주는 강릉원주대학교로부터 분양을 받아 실험에 사용하였다(Baik 등, 2010). Potato dextrose agar(Becton, Dickinson and Co.) 배지 중앙에 KR1 균주의 균사조각을 접종하고 25°C 항온기에서 7일 동안 배양하여 형성된 균총으로부터 균사조각을 떼어 malt extract broth (Becton, Dickinson and Co.)에 접종하고 이를 25°C 암 상태에서 7일 동안 150 rpm으로 진탕배양 하였다. 배양한 KR1 균주는 4겹의 거즈로 걸러 균사를 제거하고, 광학현미경 하에서 hemocytometer를 이용하여 포자(소형분생포자)의 농도를 측정하였다. 포자 농도가 1.0×10^7 conidia/mL가 되도록 멸균수로 희석하여 접종원으로 사용하였다. 접종원 농도에 따른 무 시들음병 발생 실험의 경우에는 시들음병균의 포자 농도를 각각 3.0×10^6 conidia/mL, 1.0×10^7 conidia/mL 및 3.0×10^7 conidia/mL로 조정된 포자현탁액을 사용하여 실험하였다.

시들음병균 접종

모든 실험은 온실에서 재배한 무의 뿌리를 물로 세척하여 흙을 제거한 후 앞에서 준비한 시들음병균 포자현탁액에 침지하여 접종하였다. 접종한 무는 5 × 8 연결 포트(포트 당 토양 50 mL, (주)범농)에 원예용상토 5호를 넣고 이식하였다. 뿌리상처 유무에 따른 무 시들병 발생 실험의 경우에는 가위를 이용하여 무의 뿌리를 2 cm 정도 남기고 자르거나 혹은 자르지 않고 포자현탁액(1.0×10^7 conidia/mL)에 0.5시간 동안 침지하였다. 한편, 침지시간에 따른 무 시들음병 발생 실험의 경우에는 흙을 제거한 무 뿌리를 1.0×10^7 conidia/mL 농도의 포자현탁액에 0시간, 0.5시간, 2시간, 4시간, 8시간 동안 침지하여 접종하였다.

발병 및 병조사

접종 후 재배온도에 따른 5품종 무의 시들음병 발생 실험은 접종한 무 유묘를 20°C, 25°C 및 30°C 항온실에서 하루에 12시간씩 광을 조사하면서 3주 동안 재배하여 시들음병 발생을 조사하였다. 그 외 모든 실험은 접종한 무의 어린 모종을 1일 동안 25°C 습실상에서 배양한 후

온실(25 ± 5℃)로 옮겨 3-4주 동안 재배한 후에 병 발생을 조사하였다. 발병 정도는 0=건진, 1=지하부 도관은 갈변되나 지상부는 병징이 없는 것, 2=지하부는 갈변되고 지상부는 약간 생육이 억제되는 것, 3=지하부는 갈변되고 지상부는 생육이 억제되며 약간 황화된 것, 4=지하부는 갈변되고 지하부와 지상부의 생육은 모두 심하게 억제되며 심하게 황화된 것, 5=고사 등 6단계로 하였으며, 평균 발병도가 1.0 이하인 경우에는 저항성, 1.1-2.5는 중도저항성, 2.5초과는 감수성으로 판정하였다. 모든 실험은 10반복으로 2회 실시하였다. 통계 분석은 SAS(SAS Institute, Inc., 1989, Cary, NC) 프로그램을 이용하여 ANOVA 분석을 하였으며, 처리 평균간 비교를 위하여 Duncan's multiple range test ($P=0.05$)를 실시하였다.

(3) 결과 및 고찰

뿌리 상처에 따른 무 품종들의 시들음병 저항성

가위로 무의 뿌리를 자른 후에 시들음병균(*F. oxysporum* f. sp. *raphani*)을 접종하거나, 뿌리를 자르지 않고 접종한 5품종 무들의 시들음병에 대한 저항성에 차이가 있는지를 알아보기 위하여 실험한 결과, 모든 품종에서 뿌리를 자르고 접종한 처리구는 자르지 않은 처리구에 비하여 같거나 더 높은 발병도를 나타냈다(Fig. 21). 그러나 5종 무 품종들은 뿌리 상처와 관계없이 명산무와 장생무는 1.4 이하의 발병도를 나타내 시들음병에 대한 저항성을, 한농여름무와 청수궁중무는 2.9 이상의 발병도를 보여 감수성을 나타냄을 알 수 있었다. Song 등(1996)은 양배추 유묘 검정의 최적조건을 밝히고자 세척한 양배추 뿌리를 2cm 정도 남기고 자른 후에 시들음병균(*F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*) 포자현탁액에 침지하여 접종하는 방법을 이용하여 양배추 시들음병에 대한 저항성을 실험한 바 있다. 그러나 본 실험에서는 저항성 품종 중 명산무와 장생무는 뿌리 상처 유무에 관계없이 거의 동일한 시들음병 발생을 보였으나, 청두무는 뿌리를 잘라 상처를 내고 접종한 경우에는 자르지 않고 접종한 무보다 저항성이 감소하는 결과를 보였다(Fig. 21). 그리고 식물병 저항성 검정은 가능하면 인위적인 상처없이 병 발생을 유도하여 검정하는 것이 바람직하고, 뿌리를 자르지 않고 접종하는 방법으로도 검정하기에 충분한 시들음병 발생을 보이므로 뿌리를 자르지 않고 접종하는 방법이 저항성 정도를 조사하기에 적당하다고 생각되었다.

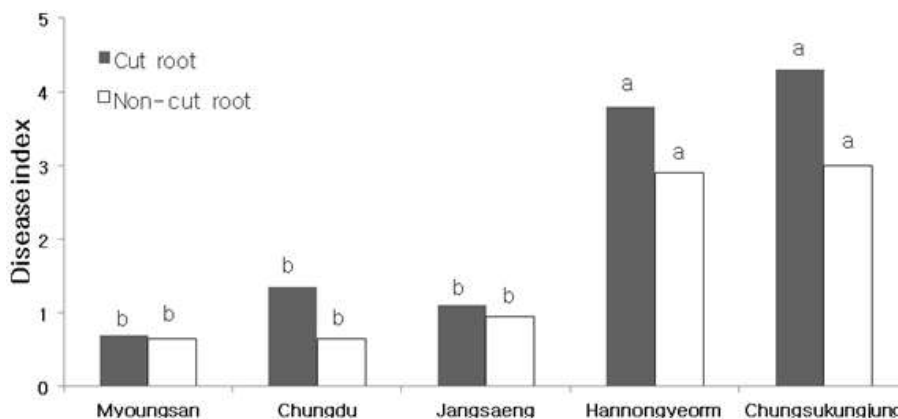


Fig. 21. Development of Fusarium wilt of five radish cultivars when cut and non-cut roots were dipped in spore suspension of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* KR1.

Fourteen-day-old seedlings of the cultivars were inoculated with the fungus by dipping cut or non-cut roots of the seedlings in a spore suspension of 1.0×10^7 conidia/ml for 0.5 hr. The inoculated plants were incubated in humidity chamber at 25°C for 24 hours and then transferred to a greenhouse at $25 \pm 5^\circ\text{C}$. After 3-4 weeks, disease severity of the radish seedlings was investigated. Each value represents the mean disease index of two runs with ten replicates each. Values in the labeled with the same letter are not significantly different in Duncan's multiple range test at $P=0.05$.

침지 시간에 따른 무 품종들의 시들음병 저항성

Baik 등(2010)은 시들음병에 대한 저항성 검정을 확립하기 위하여 포자(소형분생포자)현탁액을 첨가하여 준비한 이병토에 종자를 파종하는 방법, 무 유묘에 시들음병균의 포자현탁액을 관주하는 방법, 그리고 무 뿌리를 포자현탁액에 침지하여 접종하는 방법(침근접종법)으로 접종하여 실험한 결과, 침근접종법이 가장 효과적인 시들음병 발생을 보였다고 하였다. 이를 바탕으로 본 연구에서는 시들음병에 대한 저항성 정도가 다른 5품종 무의 뿌리를 포자현탁액에 침지하는 시간에 따라 시들병 저항성 정도에 차이를 나타내는 지를 조사하기 위하여 실험한 결과, 청수궁중무를 제외한 4품종은 침지시간이 증가함에 따라 시들음병 발생이 증가하였으나, 명산무, 청두무 및 장생무 등 저항성 정도가 높은 품종은 감수성 품종인 한농여름무에 비하여 증가량이 적었다(Table 30). 한편, 가장 높은 감수성을 나타내는 청수궁중무는 포자현탁액에 침지한 즉시 꺼내어 이식하여도 3.0이상의 높은 시들음병 발병도를 보였다. 따라서 시들음병 저항성 검정을 위해서는 품종간에 시들음병에 대한 저항성 정도에 차이가 크게 나타나고 방법이 간단한 30분 동안 침지하는 것이 효율적이라 생각되었다.

Table 30. Fusarium wilt development of five radish cultivars according to root dipping period²

Cultivar	Incubation period (hour)				
	0	0.5	2	4	8
Myoungsan	0.1 ± 0.1 ^x	0.3 ± 0.2	0.6 ± 0.5	0.7 ± 0.5	1.0 ± 0.0
Chungdu	0.1 ± 0.1	0.8 ± 0.5	0.7 ± 0.5	1.6 ± 1.0	1.6 ± 0.9
Jangsaeng	0.7 ± 0.5	0.7 ± 0.5	0.9 ± 0.5	1.3 ± 0.5	2.6 ± 1.1
Hannongyeorm	0.9 ± 0.4	2.5 ± 1.1	3.2 ± 0.4	3.4 ± 1.5	3.9 ± 1.7
Chungsukungjung	3.4 ± 1.1	3.4 ± 1.4	3.5 ± 1.4	3.2 ± 1.3	3.6 ± 0.9

²Fourteen-day-old seedlings of five radish cultivars were inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* KR1 by dipping the roots of the seedlings in a spore suspension of 1.0×10^7 conidia/ml for five different incubation periods. The inoculated plants were incubated in humidity chamber at 25°C for 24 hr and then transferred to a greenhouse at $25 \pm 5^\circ\text{C}$. After 3-4 weeks, disease severity of the radish seedlings was investigated.

^xEach value represents the mean disease index ± standard deviation of two runs with ten

replicates each.

접종원 농도에 따른 무 품종들의 시들음병 저항성.

침근접종법을 이용한 무의 시들음병에 대한 저항성 검정에서 시들음병균 포자현탁액의 포자 농도에 따른 5품종 무들의 병 저항성 차이를 실험한 결과, 감수성 품종인 한농여름무는 접종원의 포자 농도가 증가함에 따라 시들음병 발생이 크게 증가하였다(Fig. 22). 한편, 저항성 품종인 명산무, 청두무 및 장생무는 포자 농도가 증가하여도 통계적인 유의성 있는 차이는 없는 정도로 시들음병 발생이 증가하였다. 하지만 고도의 감수성인 청수궁중무는 접종 농도와 관계없이 3.5 이상의 높은 발병도를 나타냈다. 식물체의 병 저항성 검정에서 고농도로 병원균을 접종하였을 경우에는 저항성을 유도할 수 있는 잎이 조기 낙엽되어 정확한 검정이 이루어질 수 없다(Kuc, 1987; 1994). 그러므로 무 시들음병에 대한 저항성 정도를 조사하기 위해서는 1.0×10^7 conidia/m/ 농도의 시들음병균 포자현탁액에 30분 동안 침지하여 접종하는 것이 효과적이라 생각되었다.

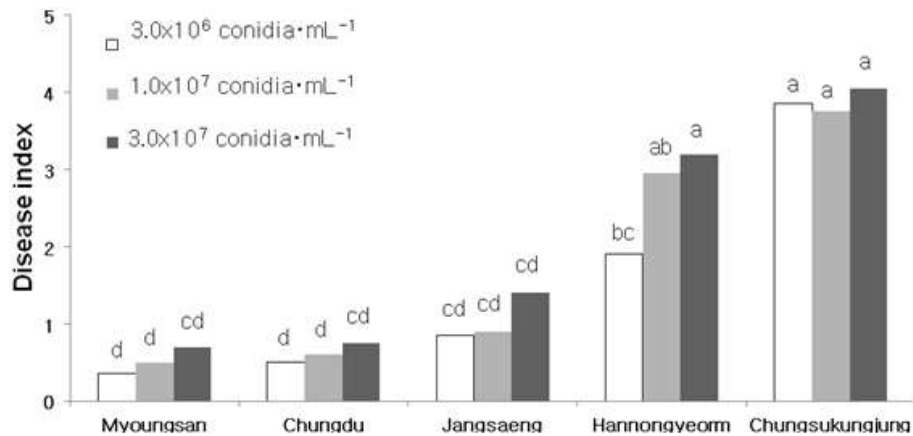


Fig. 22. Fusarium wilt occurrence of five radish cultivars according to inoculum concentration. Fourteen-day-old seedlings of the cultivars were inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* KR1 by dipping the roots of the seedlings in spore suspensions of three different concentrations for 0.5 hr. The inoculated plants were incubated in humidity chamber at 25°C for 24 hr and then transferred to a greenhouse at 25 ± 5°C. After 3–4 weeks, disease severity of radish seedlings was investigated. Each value represents the mean of two runs with ten replicates each. Values in the labeled with the same letter are not significantly different in Duncan’s multiple range test at $P=0.05$.

재배 온도에 따른 무 품종들의 시들음병 저항성

F. oxysporum f. sp. *raphani*의 기주에 대한 병원력 및 특이성은 토양 온도에 따라 변할 수 있다고 보고된 바 있다(Nomura와 Ishii, 1989; Pound와 Fowler, 1953). 따라서 시들음병에 대한 저항성 정도가 다른 5품종 무들의 접종 후의 재배 온도에 따라 시들음병에 대한 저항성 정도에 차이를 나타내는 지를 조사하기 위하여 20°C, 25°C 및 30°C의 생육상에서 시들음병 발생을 실험하였다. 25°C의 항온실에서 재배한 품종들은 20°C에서 재배한 무들보다 저항성 품종

인 명산무, 청두무 및 장생무는 더 높은 저항성을 나타내었으며, 감수성 품종인 한농여름무와 청수궁중무는 더 높은 발병도를 보였다(Fig. 23). 한편 30℃에서는 무가 정상적으로 성장하지 않아 시들음병 저항성 정도 차이를 조사할 수 없었다. 무의 생육 적온은 17-20℃ 이고, 시들음병균인 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*의 생육 및 발병 적온은 25℃이다(Sherf와 Macnab, 1986; Suzuki, 1978). 따라서 무의 시들음병 저항성은 무의 생육 적온보다 시들음병 발병 적온인 25℃에서 저항성 반응은 극대화됨을 알 수 있었다. 그러므로 무 품종의 시들음병에 대한 저항성 정도를 조사하기 위해서는 25℃에서 재배하는 것이 적당하리라 생각되었다. 한편 품종들 간에도 병원균에 대해 작용하는 유전자가 서로 다를 수 있기 때문에 무에서 시들음병 저항성에 대한 좀 더 세밀한 분석을 위해서는 20℃에서 발병을 유도하는 것도 필요할 것이다.

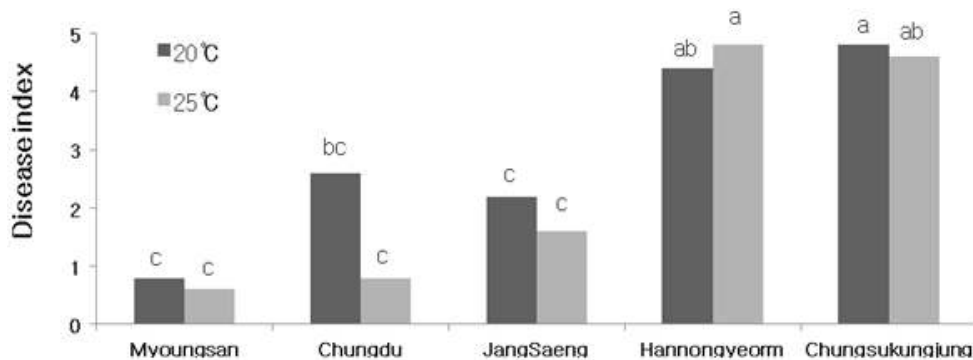


Fig. 23. Development of Fusarium wilt of five radish cultivars according to incubation temperature. Fourteen-day-old seedlings of the cultivars were inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* KR1 by dipping the roots of the seedlings in spore suspension of 1.0×10^7 conidia/ml for 0.5 hr. The inoculated plants were incubated in a growth chamber with 12-hr light a day at 20℃ or 25℃. After 3 weeks, disease severity of the radish seedlings was investigated. Each value represents the mean disease index of two runs with ten replicates each. Values in the labeled with the same letter are not significantly different in Duncan's multiple range test at $P=0.05$.

이상의 결과로부터 무 품종들의 시들음병에 대한 저항성을 검정하기 위한 효율적인 방법으로는 종자를 파종하고 온실(25±5℃)에서 14일 동안 재배한 무의 뿌리를 물로 씻어 흙을 제거한 후 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*의 포자현탁액(1×10^7 conidia/ml)에 30분 동안 침지하고, 원예용 상토에 이식한 후 25℃ 생육상에서 하루에 12시간 동안 광을 조사하면서 3주일 동안 재배한 후에 시들음병 발생을 조사하는 것이 바람직할 것으로 생각되었다. 또한 무 시들음병에 대한 저항성 품종은 현재 여러 회사에서 판매하고 있으나, 시들음병에 대한 저항성 유전자 및 저항성 유전 양식에 대해서는 거의 보고된 바 없다. 일반적으로 QTL 저항성의 경우에는 환경 조건, 접종원 농도 및 식물의 생육 시기 등에 따라 저항성 발현 정도에 큰 차이를 나타낸다(Agrios, 2005). 하지만 본 연구에서 실험한 시들음병에 대한 저항성 품종인 명산무, 청두무 및 장생무의 시들음병에 대한 저항성 정도는 재배 온도에 따라 큰 차이를 보였으나, 온도를 제외한 발병 조건들 즉 뿌리 상처 유무, 포자 농도 및 침지 시간에 따라서 약간의 저항성 차이를

보였을 뿐이었다. 따라서 시들음병균(*F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*)에 대한 A-type 저항성 양배추 품종처럼 무의 시들음병균(*F. oxysporum* f. sp. *raphani*)에 대한 저항성 품종도 소수의 우성 유전자에 의해 저항성을 나타낼 가능성도 있으나, 이는 앞으로 확인할 필요가 있다 (Walker, 1930).

다. 무 시들음병균이 생산하는 Phytotoxin의 병원성 및 저항성에서 역할

(1) 서론

Fusarium 속 균은 전 세계적으로 많은 종의 식물에 심각한 병을 일으키는 병원균으로, 병을 일으키는 기주에 따라 120개 이상의 f. sp.로 구성되어 있다(Agrios, 2005). 무 시들음병은 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*에 의해 발생하는 토양 전염병으로 토양 내에서 후벽포자를 형성하여 기주식물 없이도 수년간 휴면상태로 존재하는 것이 가능하다(Van Peer et al., 1988). 이 병에 감염되면 식물의 하위 잎이 황갈색으로 되며 식물체가 시들고, 뿌리의 도관부는 흑갈색으로 변하여 심하면 식물이 고사한다(Kendric and Snyder, 1936; Peterson and Pound, 1960). 무 시들음병은 1934년 미국 캘리포니아 San Benito에 있는 White Chinese Winter Radish 채종포에서 처음 보고되었으며 1946년 위스콘신 Waukesha의 무 포장에서 시들음병의 발생이 보고된 후 현재는 미국 각지에서 발생하고 있다(Pound, 1959; Pound and Fowler, 1953). 우리나라에서는 1981년 청원군 미농 재배단지에서 처음 발견되었으며, 계속된 연작으로 인하여 시들음병 발생이 점차 증가하고 있다(Nam, 1994; Moon et al., 2001). 무 시들음병의 방제를 위한 방법은 윤작, 토양 훈증, 종자 소독, 질소 비료 과용 금지 등이 있으나, 가장 효과적이고 환경 친화적인 방제 방법은 저항성 품종의 재배이다. 현재 무 시들음병에 대한 저항성 품종은 여러 회사에서 판매 중에 있다. 하지만 저항성 유전자의 규명 및 저항성 품종 육성을 위한 분자마커 등은 거의 보고된 바 없다(Baik et al., 2011).

Fusarium 속에 속하는 많은 종의 곰팡이들은 각종 식물 및 동물에 활성을 보이는 다양한 2차 대사산물을 생산한다. 이차 대사산물에는 *Fusarium* 속 균으로 오염된 곡류의 섭취시 인체에 중독증을 일으키는 mycotoxin, 식물에 독성을 나타내는 phytotoxin 및 미생물에 대하여 항균 활성을 보이는 항생물질 등이 있으며, 활성을 나타내는 2차 대사산물뿐만 아니라 다양한 색소도 생성한다(Vesonder and Golinski, 1989). *Fusarium* 속이 생산하는 phytotoxin에는 fusaric acid, fumonisins, beauvericin, enniatin, moniliformin 및 trichothecenes 등이 있다 (Abbas et al., 1991; Amalfitano et al., 2002; Bacon et al., 1996; Capasso et al., 1996; Idris et al., 2003; Zonno et al., 1996). 이러한 독소들은 괴사, 백화 현상, 생장 억제, 시들음, 종자발아 억제 등을 일으키는 것으로 알려져 있다(Desjardins and Hohn, 1997; Van Asch et al., 1992; Wakulinski, 1989). Fusaric acid는 다양한 *Fusarium* 속이 생산하는 독소로 알려져 있으며, trichothecenes에 속하는 독소인 T-2, HT-2는 *Fusarium* 속뿐만 아니라 *Trichoderma* 속이나 *Myrothecium* 속 등의 곰팡이에 의해서도 생성된다. 특히 T-2 독소는 *Fusarium* 속 곰팡이 독소 중에서 가장 활성이 강한 것으로 알려져 있다(Gaumann, 1957; Kern, 1972; Lee et al., 2012; Placinta et al., 1999; Song et al., 2006). Enniatin과 fumonisin은 유용한 제초제로 평가되고 있으며, 9,10-dehydrofusaric acid는 기생식물인 *Striga hermonation*의 종자 발아를 억제한다(Abbas et al., 1991; Hershenthorn et al., 1992; Zonno et al., 1996).

본 연구에서는, 무 시들음병(*Fusarium wilt*)에 대한 저항성을 검정하는 체계를 확립하던 중 병원균인 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*가 phytotoxin을 생산한다는 것을 확인하고, 이 물질을 분리하고 동정하였다. 그리고 이 병원균의 병원성 및 이 곰팡이에 대한 무의 저항성에서 이 독소의 역할을 규명하기 위하여, 무 시들음병에 대한 저항성 정도가 서로 다른 무 품종들과 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*의 비기주 배추과 작물인 양배추와 브로콜리에 대한 독소의 활성을 조사하였다.

(2) 재료 및 방법

독소 생산을 위한 무 시들음병원균 배양

무 시들음병원균의 phytotoxin 생산을 위하여 *F. oxysporum* f. sp. *raphani* KR1 균주를 potato dextrose agar(PDA; Becton, Dickinson and Co.) 배지에 접종하고 14일 동안 배양한 후에 균총으로부터 균사 조각을 떼어 malt extract broth(MEB; Becton, Dickinson and Co.)에 접종하고 이를 25°C에서 14일 동안 150rpm으로 진탕배양 하였다. 병원균의 배양액은 4겹의 거즈로 걸러 균사를 제거하고, 원심분리(9,500g, 10min, 4°C)한 후에 상정액을 취하여 실험에 사용하였다.

Phytotoxin 생산을 위한 최적의 배지를 선발하기 위하여 nutrient broth(NB; Becton, Dickinson and Co.), Czapek-dox broth(CDB; Becton, Dickinson and Co), tryptic soy broth(TSB; Becton, Dickinson and Co.), potato dextrose broth(PDB; Becton, Dickinson and Co.) 및 MEB 등 5종의 액체 배지에 KR1 균주의 균사 조각을 접종하고 앞에서와 같은 방법으로 배양하고 배양여액을 취하여 실험에 사용하였다.

또한, 접종 후 배양 기간에 따른 독소 생산성을 비교하기 위하여 MEB 배지에 KR1 균주의 균사 조각을 접종하고 25°C에서 각각 5, 8, 11, 14, 17일 동안 배양한 후에 위와 같은 방법으로 배양여액을 수확하였다. 그리고 이들은 phytotoxicity test까지 -20°C 냉동고에 저장하였다.

Phytotoxin의 분리

F. oxysporum f. sp. *raphani*가 생산하는 phytotoxin은 다음과 같은 방법으로 분리하였다. 총 6L의 MEB 배지에 KR1 균주를 배양한 후에 얻은 배양여액을 ethyl acetate와 *n*-butanol 순서로 각각 2회 추출하고 감압농축하여 ethyl acetate, *n*-butanol 및 수용액층으로 분획하였다. 생물 검정(phytotoxicity test)을 통하여 *n*-butanol 층(400mg)이 무 유묘에 독성을 나타내는 것을 확인하였고, *n*-butanol 층으로부터 활성 물질을 분리하기 위하여 100% methanol을 전개 용매로 Sephadex-LH20 column chromatography(25-200 μ m, 2cm i.d. \times 40cm, Sigma-Aldrich)를 하여 얻은 3개의 분획물 중 F2(150mg)가 활성을 나타냈다. F2 층을 silica gel TLC plate(20 \times 20 \times 0.5cm, Merck)에 로딩하고 chloroform:methanol:water = 30:9:1(v/v/v) 용매로 preparative TLC를 실시하여 5개의 분획물을 얻었다. 이들 중 F2-3(45.7mg)이 활성을 나타내어 이를 앞에서와 동일한 방법으로 Sephadex-LH20 column chromatography를 다시 실시하여 4개의 분획물을 얻었다. 이들 중 F2-3-2(26.3mg)이 활성을 나타내어 이를 Sep-Pak C₁₈ cartridge(Waters)에 시료를 주입하고 100% H₂O부터 100% MeOH 까지 순차적으로 물질들을 용출하여 순수한 활성 물질인 SP 화합물(11.8mg)을 얻었다.

기기분석

분리한 SP 화합물의 구조를 동정하기 위하여 질량 분석 및 핵자기 공명 분석을 실시하였다. 질량 분석은 화학물질 이온화(chemical ionization, CI) 모드로 질량분석기(JEOL, JMS-DX303; JEOL Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 그리고 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼은 Bruker AMX-500(500 MHz) NMR spectrometer(Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Rheinstetten, Germany)로 측정하였으며, tetramethylsilane(TMS)을 internal standard로 이용하였다.

Phytotoxicity test

F. oxysporum f. sp. *.raphani*의 배양여액, 물질 분리의 중간과정에 있는 분획물들 그리고 순물질 fusaric acid의 phytotoxicity test는 다음과 같은 방법으로 실험하였다. ‘장생무’(아시아종묘) 종자를 8×16 연결 포트(포트 당 토양 15mL, 범농)에 원예용상토 5호(부농)를 넣고 포트 당 1립씩 파종하여 온실에서 10-12일 재배한 무 유묘를 실험에 사용하였다. 온실에서 재배한 무의 뿌리를 물로 세척하여 흙을 제거한 후에 이를 vial(7mL)에 넣고 무의 뿌리가 침지되도록 배양여액, 분획물 용액 및 fusaric acid 용액을 5mL씩 넣고 수분 증발을 막기 위하여 병의 입구를 parafilm으로 감아주었다. 이때 분획물 및 fusaric acid는 메탄올(MeOH)로 용해하였으며, MeOH의 최종농도가 1%가 되도록 1mM MES(2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, Sigma) buffer와 1% sucrose(Sigma)의 혼합용액(MESS 용액)에 첨가하였다. 배양여액도 마찬가지로 MESS 용액으로 희석하였으며, 무처리구는 약제 없이 MESS 용액만을 처리하였다. 모든 실험은 3반복으로 실시하였다.

무 유묘가 처리 용액을 모두 흡수하였을 경우에는 뿌리가 마르지 않도록 vial에 MESS 용액을 추가로 넣어주었다. 처리한 무 유묘는 25°C 항온습실에서 하루에 12시간씩 광을 처리하며 무 유묘에 시들음 증상이 나타날 때까지 약 2-5일 동안 재배한 후에 약해를 조사하였다. 약해 정도는 0 = 건전, 1 = 1-25%의 시들음, 2 = 26-50%의 시들음, 3 = 51-80%의 시들음, 4 = 81% 이상의 시들음 등의 5단계로 하였다.

배추과 작물에 대한 fusaric acid의 활성을 조사하기 위하여 시들음병에 대한 저항성 정도가 서로 다른 무 5개 품종 즉 저항성인 ‘명산무’, 중도저항성인 ‘청두무’와 ‘장생무’, 감수성인 ‘청수궁중무’와 ‘미농조생무’, 양배추 4개 품종 즉 저항성인 ‘YR호남’과 ‘그랜드마트’, 감수성인 ‘꼬꼬마’와 ‘레드마트’, 그리고 브로콜리 품종 3개(‘베리돔’, ‘그랜저’, ‘에이스돔’) 배추과 작물 총 12개 품종을 앞에서와 마찬가지로 방법으로 재배하고 분리한 SP 화합물의 활성을 조사하였다.

시들음병 저항성 검정

무, 양배추 및 브로콜리 등의 배추과 작물들의 *F. oxysporum* f. sp. *.raphani*와 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*에 대한 저항성 정도를 조사하기 위하여 fusaric acid의 phytotoxicity test와 동일한 12개의 품종을 8×16 연결 포트(포트 당 토양 15mL, 범농)에 원예용상토 5호(부농)를 넣고 종자를 1립씩 파종하여 온실($25 \pm 5^\circ\text{C}$)에서 14일 동안 재배한 유묘를 실험에 사용하였다.

무는 기주이나 양배추는 비기주 식물인 *F. oxysporum* f. sp. *.raphani* KR1 균주와 양배추가 기주인 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* KR3 균주의 균사 조각을 각각 MEB 액체배지에 접종하고 이를 25°C에서 7일 동안 150 rpm으로 진탕배양 하였다. KR1과 KR3 균주의 배양액

은 4겹의 거즈로 걸러 균사를 제거한 후에 원심분리(9,500g, 10min, 4°C)하여 포자를 수확하고, 광학현미경 하에서 hemocytometer를 이용하여 포자(소형분생포자)의 농도를 측정하였다. 포자 농도가 1.0×10^7 spores·mL⁻¹가 되도록 멸균수로 희석하여 접종원으로 사용하였다.

재배한 12개 품종의 뿌리를 물로 세척하여 흙을 제거한 후에 준비한 시들음병균 포자 현탁액에 30분 동안 침지하여 접종 한 후 5 × 8 연결 포트(포트 당 토양 50mL, 범농)에 원예용 상토 5호를 넣고 이식하였다. 접종 후 25°C 습실상에서 24시간 동안 배양한 후에 25°C 항온항 습실로 이동하여 하루에 12시간씩 광을 조사하면서 재배하였다. 약 3주 후에 유묘의 시들음병 발생을 조사하였으며 모든 실험은 10반복으로 2회 실시하였다. 발병 정도는 0 = 건전, 1 = 지하부는 갈변되나 지상부는 시들지 않고 병징이 없는 것, 2 = 지하부는 갈변되고 지상부는 시드는 것, 3 = 지하부는 갈변되고 지상부는 시들며 황화하는 것, 4 = 지하부는 갈변되고 지상부는 심하게 황변하여 시들고 낙엽된 것, 5 = 고사 등 6단계로 하였으며, 평균 발병도가 1.0 이하인 경우에는 저항성, 1.1-2.5는 중도저항성, 2.5 초과는 감수성으로 판정하였다.

(3) 결과 및 고찰

배지 종류에 따른 phytotoxin 생산

F. oxysporum f. sp. *raphani*의 phytotoxin 생산을 위한 최적 배지를 선발하고자 KR1 균주를 NB, CDB, TSB, MEB, PDB 등 5종의 액체배지에서 배양하고 이들 배양여액의 무에 대한 독소 활성을 비교한 결과, 실험에 사용된 모든 배지의 배양여액은 독소 활성을 나타내었다 (Fig. 24). 그러나 NB와 TSB 배지에서는 병원균을 배양하지 않은 배지를 처리하였을 때에도 무 유묘가 고사하였다. 따라서 KR1 균주의 NB와 TSB 배양여액 처리구의 약해(phytotoxicity)는 KR1 균주가 생산한 독소의 활성인지 배지 성분에 의한 것인지 구분하기가 어려우므로, 이들 배지는 독소의 생산에는 적합하지 않은 배지로 생각되었다. 한편 CDB와 MEB 배지의 배양여액은 원액 농도에서는 유사한 활성을 나타내었으나, 처리 농도가 낮아질수록 MEB 배지가 더 높은 활성을 보였다. 그러므로 *F. oxysporum* f. sp. *raphani* KR1 균주의 phytotoxin 생산을 위한 최적 배지로 MEB 배지를 선발하였다.

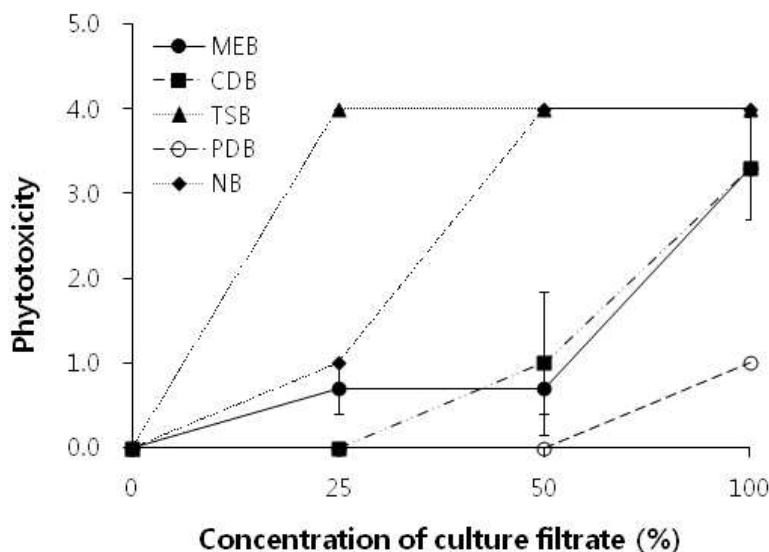


Fig. 24. Phytotoxin production of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* in five incubation media. Mycelial plugs of *F. oxysporum* f. sp. *raphani* KR1 were inoculated in incubation media and incubated in a shaking incubator at 25°C for 14 days. To remove spores and mycelia of the fungus, the fungal culture was filtered with four layers of cheese cloth and centrifuged. Ten-day-old seedlings of radish were treated with the cultural filtrate by dipping the roots of the plants. The applied plants were incubated in a growth chamber at 25°C. After 2 days, phytotoxicity of the culture filtrate on the seedlings was investigated as follows: 0, healthy; 1, wilt of 1-25%; 2, wilt of 26-50%; 3, wilt of 51-80%; 4, wilt of more than 81%. Each value represents the mean \pm standard deviation of three replicates. NB, nutrient broth; CDB, Czapek-dox broth; TSB, tryptic soy broth; MEB, malt extract broth; PDB, potato dextrose broth.

배양 기간에 따른 phytotoxin 생산

F. oxysporum f. sp. *raphani*의 phytotoxin 생산을 위한 최적 배양 기간을 조사하기 위하여 KR1 균주를 각각 5, 8, 11, 14, 17일 동안 배양한 후에 수확한 배양여액(원액 농도)의 phytotoxicity test를 조사하였다. 그 결과, 접종 후 5일부터 11일까지 동안 배양한 것들은 무유묘에 유사한 활성을 나타냈으며, 접종 후 14일 동안 배양한 배양여액은 가장 높은 독소 활성을 보였다. 그러나 17일 동안 배양한 후에는 활성이 약간 감소하였다(Fig. 25). 그러므로 *F. oxysporum* f. sp. *raphani* KR1 균주는 14일 동안 배양하였을 때 독소 생산이 최대에 이른다고 생각되었다.

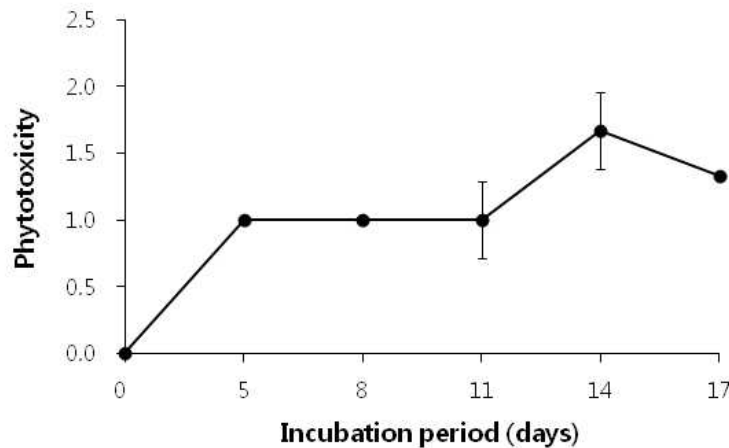


Fig. 25. Phytotoxin production of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* according to incubation period. Mycelial plugs of *F. oxysporum* f. sp. *raphani* KR1 were inoculated in malt extract broth and incubated in a shaking incubator at 25°C for 5, 8, 11, 14, and 17 days. For removing spores and mycelia of the fungus, the fungal culture was filtered with four layers of cheese cloth and centrifuged. Ten-day-old seedlings of radish were treated with the cultural filtrates by dipping the roots of the plants. The applied plants were incubated in a growth chamber at 25°C. After 2 days, phytotoxicity of the culture filtrate

on the seedlings was investigated as follows: 0, healthy; 1, wilt of 1-25%; 2, wilt of 26-50%; 3, wilt of 51-80%; 4, wilt of more than 81%.

Phytotoxin의 동정

F. oxysporum f. sp. *raphani*의 배양액으로부터 분리한 SP 화합물의 구조를 동정하기 위하여 다양한 기기 분석을 실시하였다. SP 화합물의 분자량을 확인하기 위하여 CI-MS(양이온 mode)로 분석한 결과, $[M+H]^+$ 이온이 M/Z 180에서 나타나 분자량은 179이라고 생각되었다. SP 화합물의 정확한 구조를 확인하기 위하여 ^{13}C -NMR과 1H -NMR 분석을 실시하여 탄소와 수소의 위치를 결정하였으며 분자식은 $C_{10}H_{13}NO_2$ 이었다(Table 31). SP 화합물의 NMR data는 Burmesiter et al.(1985)이 보고한 fusaric acid와 일치하여 SP 화합물은 fusaric acid임을 알 수 있었다(Fig. 26).

Table 31. 1H -NMR and ^{13}C -NMR data of SP compound produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* KR1.

Carbon assignment	Chemical shifts (ppm)	
	1H -NMR	^{13}C -NMR
1	8.39	147.9
3	8.21	144.2
3	7.98	141.5
4	2.73	125.4
5	1.61	34.1
6	1.33	33.4
7	0.92	23.2
8		14.1

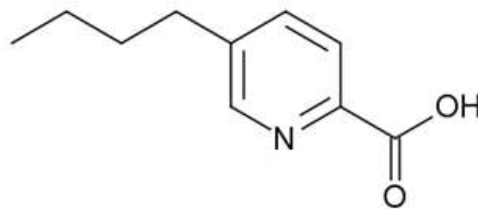


Fig. 26. Chemical structure of fusaric acid.

Fusaric acid는 1937년에 Yabuta et al.에 의하여 처음 보고되었으며, Snyder & Hansen의 연구 결과에 따르면 토마토 시들음병을 일으키는 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*에서 분리한 대사산물 중 하나라고 하였다(Gaumann, 1957; Yabuta, 1937). 또한 Bacon et al.(1996)은 F.

moniliforme, *F. crookwellense*, *F. subglutinans*, *F. sambucinum*, *F. napiforme*, *F. heterosporum*, *F. oxysporum*, *F. solani* 및 *F. proliferatum* 등 서로 다른 78개 *Fusarium* 속 균주의 fusaric acid 생산에 대하여 조사한 결과, fusaric acid는 다양한 *Fusarium* 속에서 광범위하게 생산되며 *Fusarium* 시들음병을 일으키는데 도움을 준다고 하였다. 일반적으로 fusaric acid는 옥수수, 수수 등의 곡물류에 병을 일으키는 *Fusarium* 속이 많이 생산한다고 알려져 있다. 한편, 수박, 토마토, 아마, 양배추 및 카네이션을 기주로 하는 *F. oxysporum* 균주가 생산하는 fusaric acid는 보고된 바 있으나(Davis, 1969; Luz et al., 1990; Marasas et al., 1984, Porter et al., 1990; Smith and Sousadias, 1993), 무를 기주로 하는 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*의 fusaric acid 생산은 처음으로 보고하는 바이다.

배추과 작물에 대한 fusaric acid의 활성

배추과 작물의 *Fusarium* 시들음병균들(*F. oxysporum* f. sp. *raphani*와 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*)에 대한 무 5개, 양배추 4개 및 브로콜리 3개 품종의 저항성을 조사한 결과, *F. oxysporum* f. sp. *raphani*에 대해 무 유묘는 품종에 따라 저항성 혹은 감수성을 보였으나, 양배추와 브로콜리는 품종에 관계없이 저항성을 나타내었다(Table 32). 반대로 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*에는 양배추는 품종에 따라 저항성 혹은 감수성을 보였으나 무에서는 품종에 관계없이 저항성을 나타냈다. 일반적으로 브로콜리의 *Fusarium* 시들음병의 병원균은 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*로 알려져 있으나, 실험한 브로콜리 3개 품종에서 1.4-2.3의 발병도를 보일 뿐이었다. 이들 결과로부터 배추과 작물의 *Fusarium* 시들음병균들 중 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*는 무가 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*는 양배추가 기주 식물이므로 품종에 따라 저항성 및 감수성을 보임을 알 수 있었다.

이와 달리 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*가 생산하는 phytotoxin인 fusaric acid는 기주인 무 유묘뿐만 아니라 이 병원균의 기주가 아닌 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*의 기주인 양배추 4개와 브로콜리 3개 품종의 유묘에도 무와 마찬가지로 높은 phytotoxicity를 보였다(Table 2). 따라서 Shahin and Spivey(1986)가 보고한 바와 같이 fusaric acid는 비기주 특이적 독소(non-host-specific toxin)임을 알 수 있었다.

병원균에 의해 분비되는 저분자량의 2차 대사산물은 식물에 독성을 유발하고 병원균이 병을 일으키는데 도움을 준다. 몇몇 병원균에 의해 생성되는 기주 특이적 독소(host-specific toxin)는 병원균의 기주에만 독성을 나타내지만, 비기주 특이적 독소는 병원균의 기주가 아닌 작물에도 phytotoxicity를 일으킨다(Kuzniak, 2001). 비기주 특이적 독소는 병원균이 병을 일으킬 때에 병 발생을 증가시키지만 병원균이 병을 일으키기 위한 필수 요소는 아닌 반면에 대부분의 기주 특이적 독소는 독소를 분비하여 병원성을 발휘한다(Greenberg and Yao, 2004; Kim et al., 1998; Kuzniak, 2001). 기주 특이적 독소인 HC 독소, *Alternariaalternate*(ALL)독소, T 독소, victorin 등은 세포 내 작용점 및 기주 세포에 programmed cell death를 유도하는 것으로 알려져 있다(Greenberg and Yao, 2004; Kim, 1993; Wolper, et al., 2002).

Table 32. Phytotoxic effect of fusaric acid and development of *Fusarium* wilt on fourteen commercial cultivars of cruciferous vegetable crops.

Crop	Cultivar	Phytotoxicity ^z	Disease index ^y			
			f. sp. <i>raphani</i>		f. sp. <i>conglutinans</i>	
Radish	Myoungsan	3.7 ± 0.6	1.0 ± 1.1 ^x	R ^w	1.4 ± 1.1	MR
	Chungdu	3.7 ± 0.6	1.9 ± 0.9	MR	2.3 ± 1.6	MR
	Jangsaeng	3.3 ± 0.6	2.5 ± 1.6	MR	1.3 ± 0.8	MR
	Minongjosaeng	3.3 ± 0.6	3.4 ± 1.4	S	1.4 ± 0.7	MR
	Chungsukungjung	3.7 ± 0.6	4.0 ± 1.6	S	1.4 ± 1.4	MR
Cabbage	YR-Honam	4.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	R	0.2 ± 0.6	R
	Grandmart	4.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	R	0.9 ± 0.9	R
	Kkokkoma	4.0 ± 0.0	0.6 ± 1.3	R	2.9 ± 1.7	S
	Redmart	4.0 ± 0.0	0.3 ± 0.7	R	3.1 ± 1.4	S
Broccoli	Verydom	3.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	R	1.4 ± 1.1	MR
	Acedom	3.0 ± 0.0	0.1 ± 0.3	R	1.6 ± 1.2	MR
	Grandeur	4.0 ± 0.0	0.9 ± 1.6	R	2.3 ± 1.5	MR

^zFusaric acid isolated from *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* KR1 was dissolved in MeOH and adding in MESS solution, including 1 mM MES and 1% sucrose, to give 50 µg·mL⁻¹ of fusaric acid and 1% MeOH. Ten-day-old seedlings of the cultivars were treated with fusaric acid by dipping the roots of the plants in the solution. The applied plants were incubated in a growth chamber at 25°C. After 5 days, phytotoxicity of the culture filtrate was evaluated as follows: 0, healthy; 1, wilt of 1-25%; 2, wilt of 26-50%; 3, wilt of 51-80%; 4, wilt of more than 81%.

^yFourteen-day-old seedlings of each cultivar were inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *raphani* and *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* by dipping the roots of seedlings in spore suspension of each fungus at a concentration of 1.0 × 10⁷ spores·mL⁻¹ for 0.5 hr. The infected plants were incubated in a growth chamber at 25°C with 12 hr light a day. After 3 weeks, disease severity of the seedlings was investigated on a scale of 0-5, where 0 = no symptoms in tops or roots; 1 = darkening of roots, no stunting or symptoms in tops; 2 = darkening of roots, slightly top stunting, no chlorosis; 3 = dark stunted roots, tops stunted, slight chlorosis; 4 = severe stunting of roots and tops, severe chlorosis; and 5 = death.

^xEach value represents the mean ± standard deviation of two runs with ten replicates each.

^wR, resistant, disease index ≤ 1.0; MR, moderately resistant, 1.0 < disease index ≤ 2.5; S, susceptible, disease index > 2.5.

무 시들음병에 대한 저항성 정도가 서로 다른 무 5개 품종 즉 저항성인 ‘명산무’, 중도저항성인 ‘청두무’와 ‘장생무’ 그리고 감수성인 ‘미농조생무’와 ‘청수궁중무’에 대한 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*가 생산한 fusaric acid의 활성(phytotoxicity)을 조사한 결과, fusaric acid는 무 시들음병의 저항성 정도와 관계없이 실험한 모든 무 품종에서 강한 독소 활성을 보였다(Table 32). Fusaric acid를 처리하고 약 48시간이 지난 후부터 본엽의 잎맥이 검게 변하며 잎이 마르기 시작하였고, 3-5일이 지나면 고사하는 반응을 보였다.

Fusaric acid를 식물에 처리하였을 때, 만약 저항성 품종이 fusaric acid를 분해하는 효소를 생산하거나 fusaric acid의 작용점이 감수성 품종과 달라서 약제가 작용점과 결합하지 못한다면 저항성 품종은 이 독소에 의해 영향을 받지 않을 것이다. 하지만 저항성 품종인 ‘명산무’에서도 fusaric acid는 감수성 품종에서와 마찬가지로 높은 활성을 보였다(Table 32). 또 저항성 품종의 뿌리를 통해 침입한 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*가 기주의 과민성 저항성 반응 덕분에 성장하지 못하게 되면 결과적으로 fusaric acid는 생산할 수 없게 될 것이고 이렇게 되면 기주는 저항성 반응을 보일 것이다. 따라서 fusaric acid는 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*에 대한 무의 저항성과 무관한 독소일 수도 있다고 생각되었다. 하지만 fusaric acid가 저항성 품종에서 기주의 저항성을 유발하는 인자로 작용할 가능성도 있으므로 이것은 독소를 생산하지 못하는 돌연변이체를 이용하여 확인할 필요가 있다.

이상의 결과로부터 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*가 생산하는 phytotoxin인 fusaric acid는 non-host specific toxin으로 병원균의 병원성에는 역할을 하나 기주 특이적 독소는 아니며, ‘명산무’와 같이 고도의 저항성 품종에도 독성을 나타내므로 무 시들음병에 대한 무의 저항성을 검정할 경우에는 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*를 배양한 후에 원심분리하여 독소를 제거한 포자현탁액을 접종원으로 사용하는 것이 반드시 필요하다는 것을 알 수 있었다.

8. 양배추 시들음병 저항성 병리검정 기술 체계 확립

가. 서론

십자화과 작물에 속하는 양배추(*Brassica oleracea* var. *capitata*)의 우리나라에서 재배면적은 2003년도에 5,401 ha로, 고추(57,502 ha)나 배추(47,686 ha), 무(35,158 ha) 등에 비하여 극히 적다. 하지만 국내에서 육성한 양배추 품종들은 외국에서 상당히 인기가 있어 종자 수출액이 2003년에 약 220만 달러로 고추와 무 다음으로 많은 양을 수출하고 있으며, 종자 수출은 점차 증가하고 있다(나종현 등, 2008). 현재까지 양배추에 발생하는 병해로는 시들음병, 뿌리혹병, 검은썩음병 및 무름병 등 14종이 보고되어 있다(한국식물병리학회, 2009). 오늘날 양배추 종자를 수출하기 위한 품종들은 병 저항성을 반드시 필요로 하고 있어 종자회사들은 저항성 품종 개발을 위해 노력하고 있다.

양배추의 연작지에서 발생하여 큰 피해를 주고 있는 시들음병은 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*에 의해 발생한다(문 등, 2001). 이 병원균은 작물의 뿌리로 침입하여 도관을 통해 상부로 이동하여 물관의 기능을 저해한다(Deese와 Stahmann, 1962). 따라서 감염되면 양배추 잎은 노랗게 변하고 또 잎이 떨어지며 더 나아가 식물 전체가 말라죽게 된다(Peterson과 Pound, 1960). Armstrong과 Armstrong(1952, 1966, 1981)과 Ramirez-Villupadua 등(1985)은 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*는 양배추를 포함한 배추과 작물에 시들음병을 일으키며, 이들

은 기주에 병원성에 따라 5종의 계통(strains) 이나 레이스로 구분하였다. 양배추, 케일, 브로콜리, 컬리플라워, 순무, 머스타드, 평지, 무, 구경양배추 및 스톡 등을 감염하는 균주를 레이스 1, 양배추와 컬리플라워를 제외한 위의 모든 기주를 공격하지만 일반적으로 무에 가장 많이 발생하는 균주를 레이스 2, 캘리포니아 지방의 스톡을 침해하는 레이스 3 그리고 뉴욕 지방의 스톡으로부터 분리한 레이스 4로 명명하였다. 이 후 A type 저항성 양배추를 감염하는 시들음병 균을 분리하고 이를 레이스 5로 명명하였다. 그러나 Bosland와 Williams(1987, 1988)는 양배추와 무를 감염하는 균주를 각각 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*와 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*로 구분하였으며, 기주에 대한 병원성은 발병 환경에 따라 변할 수도 있으나, 이 분류 방법은 오늘날 널리 이용되고 있다.

Fusarium 시들음병을 방지하기 위한 방법으로 methyl bromide(MBr)를 이용한 토양소독이 널리 이용되어 왔으나, MBr은 오존층을 파괴하는 물질로 간주되어 현재 사용이 중지된 상태이다(Yagi 등, 1993). 그 외에 배추과 식물이외의 작물과 윤작, 종자 소독 후 파종, 석회 시용 및 질소비료의 과용 금지 등이 사용되고 있으나, 이들 방법으로는 효과적인 방제효과를 나타내지 못하고 있으며 시들음병 방제를 위하여 등록된 살균제도 거의 없는 실정이다. 양배추 시들음병을 방지하기 위한 방법으로 저항성 품종의 재배는 친환경 농산물을 생산할 수 있는 가장 최선의 방법이다. *Fusarium* 시들음병에 대한 양배추의 저항성은 A type과 B type 저항성이 알려져 있으며, A type 저항성은 온도 등의 환경조건에 관계없이 저항성을 나타내는 단인자 우성 유전을 하는 반면에, B type 저항성은 다인자의 지배를 받아 25℃까지는 저항성을 나타내나, 그 이상의 고온에서는 저항성을 나타내지 못하여 높은 시들음병 발생을 보이므로 저항성 품종 개발을 위한 상업육종에서는 이용하기 어려운 저항성 유전자이다(Walker, 1930, 1958). 양배추 A type 저항성 품종이 개발되어 50여 년 동안 사용한 후 이들 저항성 품종을 침해하는 새로운 레이스의 보고가 있었다(Ramirez-Villupadua 등, 1985). 현재 시들음병에 저항성인 양배추 품종은 국내의 다수 회사에서 판매하고 있으나, 저항성 유전자 규명 및 분자마커 개발에 대하여 거의 보고된 바 없다. 이들 연구를 그리고 새로운 저항성 유전자원 탐색을 위해서는 양배추 시들음병에 대한 효율적인 저항성 검정법이 필요하다.

본 연구에서는 효율적인 양배추 시들음병 저항성 검정 방법을 확립하고자 현재 시판되고 있는 9종 양배추 품종의 저항성 정도를 실험하고, 이들 중 시들음병에 대한 저항성 정도가 다른 5종 품종을 선발하여 접종원 농도, 포자현탁액에 침지하는 시간, 재배 온도 및 뿌리 상처 유무 등 다양한 발병 조건에 따른 양배추 품종들의 시들음병 발생을 조사하였다.

나. 재료 및 방법

양배추 재배. 양배추 품종의 종자를 8 × 16 연결 포트(포트 당 토양 20 mL, (주)범농)에 원예용상토 5호(부농사)를 넣고 양배추 종자를 포트 당 1립씩 파종하여 온실(25 ± 5℃)에서 14 일 동안 재배한 양배추 유묘를 실험에 사용하였다.

접종원 준비. 양배추 시들음병을 일으키는 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* KR3 균주는 강릉원주대학교로부터 분양받아 실험에 사용하였다. KR3 균주를 potato dextrose agar(Becton, Dickinson and Co.) 배지에 접종하고 25℃에서 7일 동안 배양한 균총으로부터 균사조각을 떼어 malt extract broth(Becton, Dickinson and Co.) 배지에 접종하고 이를 25℃ 암

상태에서 7일 동안 150 rpm으로 진탕배양 하였다. 배양한 KR3 균주는 4점의 거즈로 걸러 균사를 제거하고, 광학현미경하에서 hemacytometer를 이용하여 포자(소형분생포자)의 농도를 측정하였다. 접종원 농도를 제외한 모든 발병 조건 실험의 경우에는 1.0×10^7 conidia/ml가 되도록 멸균수로 희석하여 접종원으로 사용하였으며, 접종원 농도실험을 위해서 3.0×10^6 , 1.0×10^7 , 3.0×10^7 conidia/ml로 조정하였다. 그리고 9종 양배추 품종의 시들음병에 대한 저항성 정도를 조사하는 실험의 경우에는 3.0×10^7 conidia/ml 농도로 준비하였다.

시들음병균 접종. 온실에서 재배한 양배추의 뿌리를 물로 세척하여 흙을 제거한 후 포자현탁액에 30분 동안 침지하여 접종하였다. 5 × 8 연결 포트(포트 당 토양 68 ml, (주)범농)에 원예용상토 5호를 넣고 접종한 양배추 유묘를 이식하였다. 그 외 뿌리 상처 유무에 따른 양배추 품종의 시들음병 발생 실험에서의 뿌리 상처는 앞에서와 같은 방법으로 준비한 양배추 뿌리를 2 cm 정도 남도록 가위로 자른 후에 동일한 방법으로 포자현탁액에 침지하여 접종하였다. 또한 침지시간에 따른 양배추 시들음병 발생의 경우에는 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* 포자현탁액에 각각 0시간, 0.5시간, 1시간, 2시간 및 3시간 동안 침지하여 접종하였다. 0시간 처리를 위해서는 준비한 양배추 뿌리를 시들음병균 포자현탁액에 담근 즉시 꺼내 토양에 이식하였다. 한편 양배추 9품종의 시들음병 저항성 정도를 조사하는 실험은 포자현탁액에 2시간 동안 침지하여 접종하였다.

발병 및 병조사. 접종한 양배추 유묘는 1일 동안 25°C 습실상에서 배양한 후 온실(25 ± 5°C)로 옮겨 3~4주 동안 시들음병 발생을 관찰하면서 재배하였다. 재배 온도 실험은 접종한 양배추 유묘를 20°C, 25°C 및 30°C 생육상에서 하루에 12시간 씩 광을 조사하면서 3주일 동안 재배한 후에 병조사를 하였다. 양배추 시들음병의 병조사는 식물체의 뿌리를 뽑아 세척한 후 도관을 잘라 발병 정도를 조사하였다. 발병 정도는 0=건전, 1=지하부 도관은 갈변되나 지상부는 병징이 없는 것, 2=지하부는 갈변되고 지상부는 약간 생육이 억제되는 것, 3=지하부는 갈변되고 지상부는 생육이 억제되며 약간 황화된 것, 4=지하부는 갈변되고 지하부와 지상부의 생육은 모두 심하게 억제되며 심하게 황화된 것, 5=고사 등 6단계로 하였으며, 평균 발병도가 1.0 이하인 경우에는 저항성, 1.1~2.5는 중도저항성, 2.5 초과는 감수성으로 판정하였다. 모든 실험은 10반복으로 2회 실시하였으며, SAS(SAS Institute, Inc., 1989, Cary, NC) 프로그램을 이용하여 ANOVA 분석을 하고 처리 평균간 비교를 위하여 Duncan's multiple range test ($P=0.05$)를 실시하였다.

다. 결과 및 고찰

양배추 품종의 시들음병에 대한 저항성

현재 시판중인 9종 양배추 품종의 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*에 의한 시들음병에 대한 저항성을 조사하였다. 조사방법은 백 등(2010)이 보고한 무 시들음병(병원균: *F. oxysporum* f. sp. *raphani*)에 대한 저항성 검정 방법에 따랐다. 조사한 9종 품종 중 각 회사에서 시들음병에 대한 저항성 품종으로 공시한 '오가네', 'YR호남', 'YR호걸', '그랜드마트' 등 4종은 모두 1.0 이하의 낮은 발병도를 보여 저항성임을 확인했다(Table 33). 그 외 시들음병 저항성 품종으로 공시되지 않은 5종 품종 중 '아시아볼'과 '대박나'는 0.3 이하의 발병도를 보여 시들음병에 대하여 높은 저항성 반응을 보였고 '그린햇'은 중도저항성을 나타냈다. 그렇지만 '레드

마트'와 '꼬꼬마'는 4.5 이상의 높은 발병도를 나타내어 감수성 품종임을 알 수 있었다. 백 등 (2010)의 무 시들음병균(*F. oxysporum* f. sp. *raphani*)에 대한 무 품종들의 저항성 결과와 마찬가지로 시판되고 있는 9종 양배추 품종 중 감수성 품종은 2종뿐으로 현재 판매되고 있는 품종들은 대부분 육종과정에서 시들음병에 대한 저항성 유전자가 도입되었음을 알 수 있었다.

양배추 시들음병에 대한 효율적인 저항성 검정 방법을 확립하기 위하여, 위의 결과로부터 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*에 대한 저항성 정도가 다른 5종 품종 즉, 저항성인 'YR호남'과 '오가네', 중도저항성인 '그린햇' 그리고 감수성 품종인 '레드마트'와 '꼬꼬마' 등을 선발하였다.

Table 33. Resistance degree of the nine commercial cabbage cultivars to Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*^a

Cultivar	Company	Trait ^b	Disease index ^c
Asiaball	Asiaseed		0.1
Ogane	Koregon	YR	0.1
YR-honam	Asiaseed	YR	0.2
YR-hogirl	Koregon	YR	0.2
Daebakna	Asiaseed		0.3
Grandmat	Asiaseed	YR	0.5
Greenhot	Asiaseed		1.2
Redmat	Asiaseed		4.5
Ccoccoma	Asiaseed		4.9

^a14-day-old seedlings of each cabbage cultivar were inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* KR3 by dipping the roots in spore suspension of 3.0×10^7 conidia/ml for 2 hr. The inoculated plants were incubated in a dew chamber at 25°C for 24 hr and then transferred to a greenhouse at $25 \pm 5^\circ\text{C}$. After 3-4 weeks, disease severity of the plants was investigated.

^bResistant cultivar to Fusarium wilt supported by each seed company.

^cDisease severity of the diseased plants was rated on a scale of 0-5, where 0 = no symptoms in tops or roots; 1 = darkening of roots, no stunting or symptoms in tops; 2 = darkening of roots, slightly top stunting, no chlorosis; 3 = dark stunted roots, tops stunted, slight chlorosis; 4 = severe stunting of roots and tops, severe chlorosis; and 5 = death.

뿌리 상처에 따른 시들음병 발생

'YR호남' 등 5종 양배추 품종들은 뿌리에 가한 인위적인 상처에 의해 시들음병 발생이 무상처 양배추보다 약간 증가하거나 동일하였다. 하지만 각 품종의 상처 유무에 따른 시들음병 발생은 통계적으로 유의차가 없었다(Fig. 27). 즉, 뿌리 상처와 관계없이 'YR호남'과 '오가네'는

고도의 저항성이었으며 ‘레드마트’와 ‘꼬꼬마’는 높은 감수성을 나타냈다. 송 등(1996)은 양배추 시들음병에 대한 저항성 검정을 위하여 양배추의 뿌리를 자르고 실험하였으나, Ramirez-villupadua 등(1985)은 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*의 레이스를 판별하기 위한 실험에서 뿌리를 자르지 않고 1×10^6 conidia/ml 농도의 포자현탁액에 침지하여 기주 간의 저항성 차이를 볼 수 있었다. 본 연구에서도 양배추 품종의 시들음병에 대한 저항성 정도는 뿌리를 자른 양배추와 자르지 않는 양배추의 저항성 정도가 거의 유사하므로, 양배추 시들음병에 대한 저항성 검정을 위해서는 양배추 유묘의 뿌리로부터 흙을 제거한 후 뿌리를 자르지 않고 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*의 포자현탁액에 침지하는 것이 적절하리라 판단되었다.

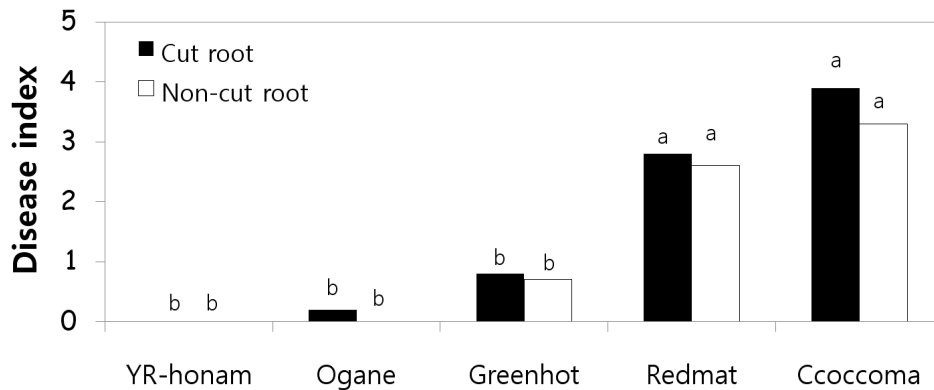


Fig. 27. Development of Fusarium wilt on five cabbage cultivars when cut and non-cut roots were dipped in the spore suspension of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*. 14-day-old seedlings of each cultivar were inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* KR3 by dipping the roots of seedlings in spore suspension of 1.0×10^7 conidia/ml for 0.5 hr. The inoculated plants were incubated in a dew chamber at 25°C for 24 hr and then transferred to a greenhouse at $25 \pm 5^\circ\text{C}$. After 3-4 weeks, disease severity of the diseased plants was rated on a scale of 0-5, where 0 = no symptoms in tops or roots; 1 = darkening of roots, no stunting or symptoms in tops; 2 = darkening of roots, slightly top stunting, no chlorosis; 3 = dark stunted roots, tops stunted, slight chlorosis; 4 = severe stunting of roots and tops, severe chlorosis; and 5 = death. Each value represents the mean disease index of two runs with ten replicates each. Values in the labeled with the same letter are not significantly different in Duncan's multiple range test at $P = 0.05$.

침지시간에 따른 시들음병 발생

양배추 뿌리를 포자현탁액에 30분내지 3시간 동안 침지하여 5종 양배추 품종의 시들음병 발생 정도를 실험한 결과, 침지하는 시간에 관계없이 저항성 품종인 ‘YR호남’과 ‘오가네’는 시들음병이 거의 발생하지 않았으며, 감수성 품종인 ‘레드마트’와 ‘꼬꼬마’는 높은 시들음병 발생을 보였다(Fig. 28). 그러나 각 품종에서 침지하는 시간 간에는 큰 차이가 없었다. 그러나 양배추 뿌리를 포자현탁액에 담근 즉시 꺼낸 경우에는 저항성 품종들뿐만 아니라 감수성 품종인 ‘레드마트’와 ‘꼬꼬마’에서도 낮은 시들음병 발병도를 나타냈다. 송 등(1996)은 양배추 시들음병

저항성 검정을 위하여 양배추 뿌리를 포자현탁액에 5초 동안 침지하여 접종하고 토양에 이식 하였으나, 본 연구에서는 침지한 직후에 꺼내어 토양에 이식한 경우에는 감수성 품종에서도 낮은 발병도를 나타냈다. 따라서 효율적인 양배추 시들음병 저항성 검정을 위해서는 양배추 뿌리를 포자현탁액에 30분 정도 침지하여 접종하는 것이 바람직하다고 생각되었다.

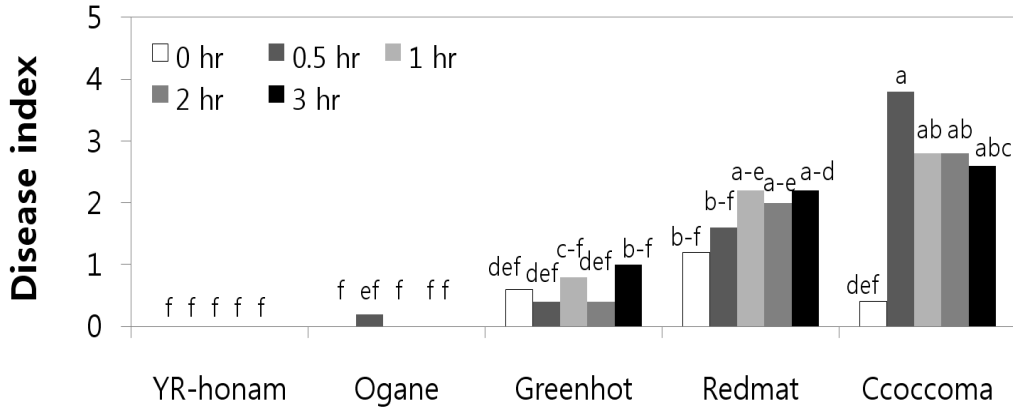


Fig. 28. Fusarium wilt occurrence of five cabbage cultivars according to root dipping period. 14-day-old seedlings of each cultivar were inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* KR3 by dipping the roots of seedlings in spore suspension of 1.0×10^7 conidia/ml. The inoculated plants were incubated in a dew chamber at 25°C for 24 hr and then transferred to a greenhouse at $25 \pm 5^\circ\text{C}$. After 3-4 weeks, disease severity of the diseased plants was rated on a scale of 0-5, where 0 = no symptoms in tops or roots; 1 = darkening of roots, no stunting or symptoms in tops; 2 = darkening of roots, slightly top stunting, no chlorosis; 3 = dark stunted roots, tops stunted, slight chlorosis; 4 = severe stunting of roots and tops, severe chlorosis; and 5 = death. Each value represents the mean disease index of two runs with ten replicates each. Values in the labeled with the same letter are not significantly different in Duncan's multiple range test at $P = 0.05$.

접종원 농도에 따른 시들음병 발생

양배추 뿌리를 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*의 세 가지(3×10^6 , 1×10^7 및 3×10^7 conidia/ml) 농도의 포자현탁액에 침지하여 접종한 5종 양배추 품종들의 시들음병 발생은 모든 품종에서 접종원의 포자 농도가 증가함에 따라 시들음병 발병도도 증가하였다(Fig. 29). 하지만 저항성 품종인 'YR호남'과 '오가네' 그리고 감수성인 '꼬꼬마'는 접종원의 포자 농도 증가에 따른 시들음병 발병도의 증가는 미미하였다. 하지만 중도저항성 품종인 '그린햇'의 경우에는 3×10^6 conidia/ml 접종구는 저항성을 1×10^7 conidia/ml와 3×10^7 conidia/ml 접종구는 중도저항성을 나타냈다. 그리고 감수성인 레드마트도 접종원의 포자 농도가 증가함에 따라 시들음병 발생은 크게 증가하였으나, 모두 감수성 품종으로 판정되는 범위 이내였다. Kuc(1987, 1994)는 병원균을 고농도로 접종하였을 시 조기 낙엽되어 저항성을 유도할 수 있는 잎이 없어지기 때문에 저항성 검정을 하기가 어렵다고 보고한 바 있다. 따라서 저항성 품종과 감수성 품종들 간에

시들음병에 대한 저항성 정도의 차이가 가장 큰 1×10^7 conidia/ml 농도의 포자현탁액에 침지하여 접종하는 것이 효과적이라 생각되었다.

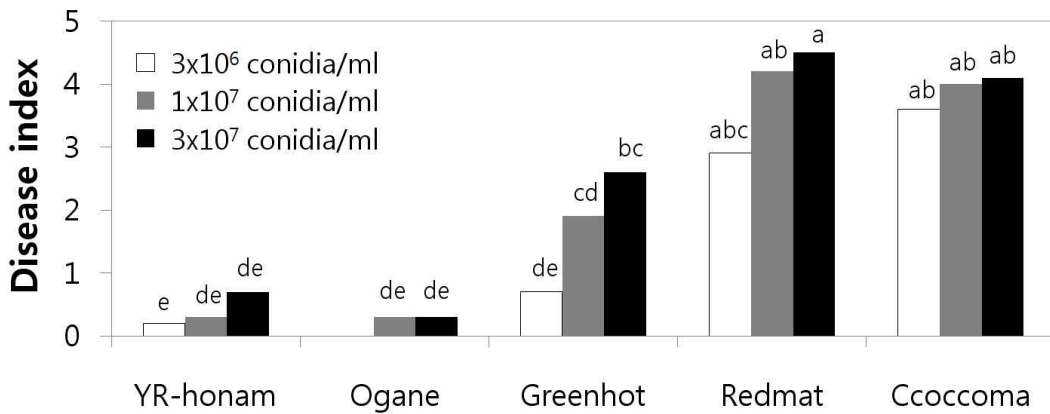


Fig. 29. Fusarium wilt occurrence of five cabbage cultivars according to inoculum concentration. 14-day-old seedlings of each cultivar were inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* KR3 by dipping the roots of seedlings in each spore suspension for 0.5 hr. The inoculated plants were incubated in a dew chamber at 25°C for 24 hr and then transferred to a greenhouse at 25 ± 5°C. After 3-4 weeks, disease severity of the diseased plants was rated on a scale of 0-5, where 0 = no symptoms in tops or roots; 1 = darkening of roots, no stunting or symptoms in tops; 2 = darkening of roots, slightly top stunting, no chlorosis; 3 = dark stunted roots, tops stunted, slight chlorosis; 4 = severe stunting of roots and tops, severe chlorosis; and 5 = death. Each value represents the mean disease index of two runs with ten replicates each. Values in the labeled with the same letter are not significantly different in Duncan's multiple range test at $P = 0.05$.

재배 온도에 따른 시들음병 발생

F. oxysporum f. sp. *conglutinans*의 기주에 대한 병원성은 토양 온도에 따라 변할 수 있다고 보고되었다(Nomura와 Ishii, 1989; Pound와 Fowler, 1953). 따라서 양배추 품종들의 시들음병에 대한 저항성도 발병 온도에 따라 차이를 나타내는지 조사하기 위하여 저항성 정도가 다른 5종 품종을 20°C, 25°C 및 30°C에서 시들음병 발생을 실험한 결과, 25°C에서 실험한 양배추 품종들 중 저항성 품종인 'YR호남', '오가네' 및 '그린햇'은 더 높은 저항성 반응을 그리고 감수성 품종인 '레드마트'와 '꼬꼬마'는 더 높은 감수성 반응을 나타냈다(Fig. 30). 그러나 30°C에서는 감수성 품종들은 25°C와 유사한 발병도를 나타내었으나, 저항성 품종들은 25°C보다 높은 발병도를 나타냈다. 상업용 양배추 품종들은 모든 온도에서 병 저항성을 나타내는 A-type 저항성 유전자를 가진다고 알려져 있다(Walker, 1930, 1958). 하지만 본 연구에서 30°C의 고온에서는 저항성 양배추 품종의 시들음병에 대한 저항성이 다소 감소함을 알 수 있었다. 그러므로 양배추 품종의 시들음병에 대한 저항성 정도를 조사하기 위해서는 접종한 후에 25°C에서 재배하는 것이 적당하리라 판단되었다.

이상의 결과로부터 양배추 품종들의 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*에 의한 시들음병에 대한 저항성을 검정하기 위한 방법으로 양배추 종자를 원예용 상토에 과종하고 온실(25 ± 5°C)에서 14일 동안 재배한 양배추 뿌리를 물로 씻어 뿌리의 흙을 제거한 후에 1 × 10⁷ conidia/ml 농도의 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*의 포자현탁액에 30분 동안 침지하고 원예용 상토에 이식한다. 그리고 접종한 양배추는 25°C 생육상에서 하루에 12시간 씩 광을 조사하면서 3주일 동안 재배한 후에 시들음병 발생을 조사하는 것이 적합하리라 판단되었다.

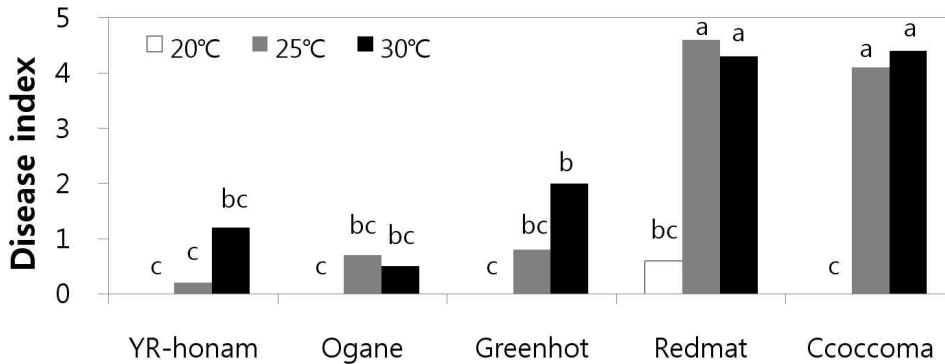


Fig. 30. Development of Fusarium wilt on five cabbage cultivars incubated at some temperatures. 14-day-old seedlings of 5 cabbage cultivars were inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* KR3 by dipping the roots of seedlings in spore suspension of 1.0 × 10⁷ conidia/ml for 0.5 hr. The inoculated plants were cultivated at 20°C, 25°C and 30°C, respectively. After 3 weeks, disease severity of the diseased plants was rated on a scale of 0–5, where 0 = no symptoms in tops or roots; 1 = darkening of roots, no stunting or symptoms in tops; 2 = darkening of roots, slightly top stunting, no chlorosis; 3 = dark stunted roots, tops stunted, slight chlorosis; 4 = severe stunting of roots and tops, severe chlorosis; and 5 = death. Each value represents the mean disease index of two runs with ten replicates each. Values in the labeled with the same letter are not significantly different in Duncan’s multiple range test at *P* = 0.05.

F₁ 품종의 양배추 시들음병 저항성

본 연구에서 확립한 양배추 시들음병 저항성 검정법을 사용하여 현재 시판 중인 16종 양배추 품종의 시들음병 저항성 정도를 조사하였다. 종자회사에서 시들음병 저항성 품종으로 판매하고 있는 10종 품종 중 8종 품종(80%)은 높은 저항성을 나타냈었으나, 2종 품종(20%)은 감수성을 나타내었다(Table 34). 한편, 시들음병 저항성으로 공시하지 않은 양배추 6종 품종 중 2종 품종(33%)은 이 병에 대하여 높은 저항성을 나타내었으며, 4종 품종(67%)은 감수성을 나타냈다. 실험한 16개 품종 중 중도저항성을 나타내는 품종은 없었다. 그러므로 시판 품종 16종 양배추 품종의 시들음병 저항성 정도는 10품종(62.5%)은 저항성 그리고 6품종(37.5%)은 감수성을 보여 시판 품종 중 약 60% 정도가 시들음병에 대한 저항성을 지니고 있음을 알 수 있었다.

Table 34. Resistance degree of the sixteen commercial cabbage cultivars to Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*^a

Cultivar	Trait ^b	Disease index ^c	Response
YR-ompalos	YR	0.2	R
YR-onnuri	YR	0.2	R
YR-honam	YR	0.0	R
Grandmat	YR	0.1	R
Asiaball	YR	0.2	R
YR-hogirl	YR	1.0	R
Ogane	YR	1.0	R
YR-ecoplus	YR	1.0	R
Rubia	YR	5.0	S
Jungsaengrubia	YR	4.9	S
Greenhot		0.1	R
Daebakna		0.0	R
Ozora		5.0	S
CMS-redsun		5.0	S
Ccoccoma		5.0	S
Retmat		5.0	S

^aFourteen-day-old seedlings of each cabbage cultivar were inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* KR3 by dipping the roots in spore suspension of 1.0×10^7 conidia/ml for 0.5 hr. The inoculated plants were incubated in a dew chamber at 25°C for 24 hr and then transferred to a growth chamber with 12-hr light a day at $25 \pm 1^\circ\text{C}$. After 3 weeks, disease severity of the plants was investigated.

^bResistant cultivar to Fusarium wilt supported by each seed company.

^cDisease severity of the diseased plants was rated on a scale of 0–5, where 0 = no symptoms in tops or roots; 1 = darkening of roots, no stunting or symptoms in tops; 2 = darkening of roots, slightly top stunting, no chlorosis; 3 = dark stunted roots, tops stunted, slight chlorosis; 4 = severe stunting of roots and tops, severe chlorosis; and 5 = death.

9. 박과 작물(오이, 멜론) 흰가루병 저항성 병리검정 기술 체계 확립

가. 서론

박과 작물은 멜론(*Cucumis melo*), 오이(*Cucumis sativus*), 호박(*Cucurbita* spp.), 박(*Lagenarias* pp., *Luffa* spp., *Cucurbita* spp.) 및 수박(*Citrullus lanatus*)등이 있으며, 이들에 발생하는 흰가루병(powdery mildew)은 노지보다 온실에서 많이 발생하여 큰 피해를 입히고 있다(Tetteh et al., 2013; Sitterly, 1978). 박과 작물 흰가루병은 잎, 엽병, 그리고 줄기 등에 발생하며, 흰색 또는 회백색을 띄는 분말 모양의 특징적인 병징을 나타내므로 동정이 쉬운 병이다(McGrath and Thomas, 1996). 흰가루병에 걸리면 1차적으로 광합성이 억제되고 심하면 감염된 부위가 빠르게 노화되고 시들어 고사까지 이른다(Zitter, 1996). 박과 작물에 발생하는 흰가루병은 세 가지의 흰가루병균 *Podosphaera xanthii*(syn. *Sphaerotheca fuliginea*), *Golovinomyces cucurbitacearum*(syn. *Erysiphe cichoracearum*), 그리고 *Golovinomyces rotini*(syn. *Erysiphe cichoracearum*)에 의해 생기며, 온대 기후의 지역에서는 *P. xanthii*가 가장 흔하게 발견되고 있다(Bertrand, 1991; Kenigsbuch and Cohen, 1992; Kooistra, 1968; Vakanoulakis et al., 1994; Vakalounakis and Klironomou, 1995). 흰가루병균(powdery mildew fungi)은 보리 흰가루병균(*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*)이나 밀 흰가루병균(*B. graminis* f. sp. *tritici*)처럼 한 종만 제한적으로 침입하기도 하지만, 많은 경우에 흰가루병균은 넓은 기주범위를 가진다(Yarwood, 1978). *P. xanthii* 또한 박과 작물의 많은 종(species)에 흰가루병을 일으킨다고 알려져 있다(Bertrand, 1991).

병 저항성 품종 육성을 위한 저항성 검정을 위해서는 실험에 사용하는 병원균의 race 규명이 중요한데, 오이에서는 다양한 physiological race들이 보고되어 있으나 정립되어 있지 않아 육종에 이용하기 어렵다. 따라서 박과 작물의 흰가루병에서 *P. xanthii*의 race는 주로 멜론 품종을 이용하여 race를 결정하고 있다(Kuzuya et al., 2006). 프랑스에서 8개의 다른 멜론 품종('Vedrantais', 'PMR 45', 'WMR 29', 'Edisto 47', 'PI 414723', 'PMR 5', 'PI 124112' 및 'MR-1')의 반응을 토대로 7개의 레이스가 구별되었다(Bardin et al., 1999). 그리고 일본과 Czech Republic에서 추가적인 race가 보고되었다(Hosoya et al., 1999, 2000; Kristková et al., 2004). 그리고 최근 McCreight(2006)는 32개의 멜론 품종을 이용하여 28개의 race를 보고하였다. 하지만 이는 너무 복잡하여 사용하기 어려우므로 일반적으로는 4개('Topmark', 'PMR 45', 'PMR 6', 'MR-1')의 멜론 품종을 이용하여 race 1, 2, 3으로 구분하는 방법을 사용하고 있다(McGrath and Thomas, 1996).

박과 작물의 흰가루병 방제를 위해서는 살균제 처리와 저항성 품종의 재배 방법을 주로 사용하고 있다(Cohen and Cohen, 1986; Khadar and Abdou, 1972; Sitterly, 1978). 예방적으로 살균제를 처리하는 것이 일반적이나(Perchepied et al., 2005), 최근에 특이적인 작용점을 가지는 살균제가 많이 개발되어 널리 사용되고 있는데, 이는 약제 저항성 흰가루병균의 발달을 촉진하는 위험성을 가지고 있다(McGrath, 2001a). 일부 살균제의 경우에는 이미 저항성이 생겨 큰 방제효과를 기대하기 어려운 상황이다(Grigoriu and Georgopoulos, 1984; Hollomon and Wheeler, 2002; Katan, 1982). 따라서 경제적이고 환경친화적 방제 방법인 저항성 품종의 재배를 선호하고 있다.

*P. xanthii*에 대한 저항성 품종 육종과 유전에 관한 많은 연구가 진행되어 왔다(Bardin et al., 1997). 오이에서는 일찍부터 흰가루병 저항성 품종 'Puerto Rico 37'(Smith, 1948)과

‘SC-50’(Barnes and Epps, 1956) 등이 개발되었다. 그리고 멜론의 경우에도 특징적인 단일 저항성 유전자를 가지는 ‘PMR 45’ 품종 그리고 이외에도 여러 우성, 열성 그리고 변형된 유전자의 다양한 조합을 가진 다수의 품종이 개발되었다(Kenigsbuch and Cohen, 1992). 더 나아가 다양한 박과 작물에서 흰가루병 저항성 유전자나 저항성 메커니즘에 관한 연구가 진행되고 있다(Cohen et al., 1993; Zijlstra et al., 1995). 한편 환경적 그리고 경제적 요구로 상업적인 저항성 품종의 필요성이 강조되어 흰가루병 저항성 품종을 개발하기 위한 연구들이 진행되고 있으나, 결과를 신뢰할 수 있고 최소의 양으로 효율적으로 저항성 개체를 선발하는 것은 내병성 육종에서 여전히 어려운 부분이다(Cohen and Eyal, 1995). 이를 위해서는 흰가루병균 *P. xanthii*의 저항성 특성에 대한 이해와 신속하면서도 안정적인 흰가루병 저항성 검정 방법의 확립이 반드시 필요하다.

본 연구는 박과 작물 흰가루병의 효율적인 저항성 검정 방법을 확립하기 위하여 *P. xanthii* race 1에 대한 박과 작물의 저항성 특성을 조사하였다. 2010년에 대전의 오이 비닐하우스로부터 채집한 흰가루병균을 동정하고 race를 결정하였다. 그리고 이 균주를 이용하여 시판 중인 오이 34개 품종의 생육 시기에 따른 저항성 차이를 조사하였고, 그리고 선발된 12개 오이 품종과 멜론 27개 품종의 재배시기에 따른 흰가루병에 대한 저항성 변이를 확인하였다. 그리고 이 흰가루병균의 7개 수박 품종에 대한 병원성을 조사하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 흰가루병균의 분리 및 동정

대전 지역의 온실에서 흰가루병이 발생한 잎을 채집하여 잎에 형성된 단일 병반으로부터 흰가루병균의 포자를 분리하고 이들을 2엽기의 오이 유묘(‘백미백다다기’, 동부팜한농)에 접종하여 흰가루병균을 증식하였다. 분리한 흰가루병균은 광학현미경 하에서 분생포자100개의 형태, 색, 크기 등의 형태학적인 관찰(Shin and La, 1993; Vakalounakis et al., 1994)과 분자생물학적인 방법으로 동정하였다. 분자생물학적 동정을 위해 ribosomal DNA(rDNA)의 ITS(internal transcribe spaces)영역의 염기서열을 2개의 primer ITS1(5’-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3’)과 ITS4(5’-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3’)를 사용하여 PCR로 증폭시켰다. PCR은 95℃에서 5분간 initial denaturation을 실시한 후에 denaturation 95℃/30초, annealing 52℃/30초, extension 72℃/50초로 35 cycle을 수행하고 마지막으로 final extension을 72℃에서 10분간 처리하였다. 증폭된 산물을 agarose gel-electrophoresis를 통해 밴드를 확인 후 확인된 밴드를 Expin gel kit(GeneAllBioTechnology, Korea)로 정제하였고, pLUG-Prime®TA-cloning vector kit(iNtronBioTechnology, Korea)를 사용하여 클로닝한 후 M13 Forward Primer(5’-GTTTTCCAGTCACGAC-3’)를 이용하여 DNA Engine Tetrad 2 peltier thermal cycler(Bio-Rad, USA)로 PCR반응을 수행하고 ABI Prism 3730xl Analyzer 96 capillary type (Applied Biosystems, USA)을 사용하여 염기서열 분석결과를 얻었다. 그리고 이 염기서열을 BLAST search에 의해 GenBank에 등록된 ITS 영역의 염기서열과 비교하였다.

분리한 흰가루병균은 한 달에 한 번씩 2엽기 오이 유묘(‘백미백다다기’)에 접종하고 온실(20 ± 5℃)에서 11-12엽기까지 재배하는 방법으로 흰가루병균을 증식하면서 이를 실험에 사용하였다.

(2) 식물체 준비 및 발병

분리한 흰가루병균의 race를 결정하기 위하여, 플라스틱 포트(직경 5cm, 토양 90mL)에 원예용상토 5호(부농사)를 넣고 판별 품종 ‘Topmark’, ‘PMR 45’, ‘PMR 6’ 및 ‘MR-1’의 종자를 포트 당 1립씩 파종하였다(McGrath and Thomas, 1996). 그리고 온실(20 ± 5°C)에서 2주 동안 재배한 후에 멜론 유묘를 새로운 포트(직경 9cm, 토양 400mL)에 원예용상토 5호(부농사)를 넣고 이식하고 재배하였다. 그리고 준비한 이병 식물체를 실험하고자 하는 식물 주변에 배치하고 재배하여 흰가루병균이 공기전염 하여 접종되도록 하였다. 그리고 흰가루병 발생을 촉진하기 위하여 병조사할 때까지 잎에 물이 묻지 않도록 토양에만 수분을 공급하면서 재배하였다(Agrios, 2005).

식물 생육시기에 따른 오이 34개 품종의 저항성 차이를 조사하기 위하여 종자회사에서 흰가루병(powdery mildew) 저항성으로 공시한 5개 품종(‘네박자’, ‘미인백다다기’, ‘싱싱백다다기’, ‘아시아스트라이크’, ‘하늘백다다기’)과 저항성으로 공시하지 않은 일반 품종 29개 품종(‘계대백과’, ‘구월반백’, ‘글로리삼척’, ‘낙동청장’, ‘노다지백다다기’, ‘녹야청청’, ‘대선’, ‘리스보이’, ‘맛사지맛짱’, ‘미니사엽’, ‘백미백다다기’, ‘백침맛짱’, ‘신세대’, ‘신정품’, ‘아시아노각’, ‘은천백다다기’, ‘아시아청장’, ‘오대백다다기’, ‘오복자’, ‘월하삼척’, ‘웰빙맛짱’, ‘은미에스’, ‘정선삼척’, ‘중복삼척’, ‘청록맛짱’, ‘청화흑진주’, ‘한성백다다기’, ‘호동청장’, ‘흑룡삼척’)의 종자를 시중에서 구입하여 앞에서와 같은 방법으로 식물체를 준비하고 흰가루병균을 접종하여 실험하였다.

그리고 재배 시기에 따른 흰가루병 저항성 변화를 조사하고자 종자회사에서 흰가루병에 대한 저항성을 공시한 오이 6개 품종(‘드레곤삼척’, ‘네박자’, ‘미인백다다기’, ‘싱싱백다다기’, ‘아시아스트라이크’, ‘하늘백다다기’)과 저항성을 공시하지 않았으나 본 연구에서 *P. xanthii* race 1에 대해 떡잎 혹은 본엽에서 저항성을 보인 6개 오이 품종(‘중복삼척’, ‘흑룡삼척’, ‘리스보이’, ‘구월반백’, ‘정선삼척’ 및 ‘청화흑진주’) 총 12개 오이 품종을 실험에 사용하였다. 이들 오이 품종들은 4개의 재배 시기에 즉, 2010년 11월 5일, 2011년 1월 20일, 2011년 3월 10일 및 2011년 5월 24일에 각각 앞에서와 같은 방법으로 파종하고 흰가루병이 발생하도록 재배하였다.

또 재배 시기에 따른 멜론의 흰가루병 저항성 변화를 조사하고 종자회사에서 흰가루병 저항성으로 공시한 10개 품종(‘얼스해피’, ‘베타리치’, ‘E. 울트라’, ‘문수’, ‘세지오케이’, ‘얼스킹’, ‘JJ원탑’, ‘레드퀸’, ‘얼스VIP’, ‘썸머쿨’)과 일반 품종 16개(‘얼스골드킹’, ‘레이소루’, ‘슈퍼세지’, ‘아시아백금’, ‘아시아성하’, ‘아시아과과야’, ‘아시아황금’, ‘아시아조춘만추’, ‘얼룩과과야’, ‘얼스마운트하계’, ‘얼스엘리제’, ‘얼스엘리트’, ‘얼스탑윈’, ‘얼스파티’, ‘입춘대길’, ‘장춘FR과과이야’) 총 26개 품종을 3개의 재배 시기에 즉, 2010년 11월 19일, 2011년 2월 11일 및 2011년 4월 7일에 앞에서와 같은 방법으로 각 품종의 종자를 파종하고 흰가루병 발생을 유도하도록 재배하였다.

분리한 *P. xanthii* race 1 균주의 수박에 대한 병원성을 조사하고자 7개 수박 품종(‘서태자꿀’, ‘설강102’, ‘슈퍼골드’, ‘꼬꼬마’, ‘낙동꿀’, ‘웰빙’, ‘지존꿀’)을 구입하여 앞에서와 동일한 방법으로 포트에 파종하고 흰가루병이 발생하도록 관리하였다.

흰가루병 발생 조사(병조사) 시기를 결정하기 위하여 모든 실험에는 오이(‘백미백다다기’)를 대조구로 포함하여 실험하였다. 또한 다른 race의 흰가루병균 오염 여부를 확인하기 위하여 모든 실험에는 race 판별 품종 4개(‘Topmark’, ‘PMR 45’, ‘PMR 6’ 및 ‘MR-1’)를 포함하여 실험하였다.

(3) 흰가루병 발생 조사

병조사는 과중하고 24-46일 후에 대조구인 오이(백미백다다기)에서 흰가루병이 충분히 발생하면 충분히 전개된 본엽 및 떡잎을 대상으로 각각의 잎에 발생한 흰가루병 병반면적율(%)을 달관조사 하는 방법으로 하였다. 그리고 각 식물체의 발병도는 조사한 잎들의 병반면적율값을 평균하여 계산하였으며, 각 식물체들의 발병도의 평균값을 각 품종의 평균 발병도로 나타내었다. 평균 발병도가 10% 이하인 경우에는 저항성, 11-35%는 중도저항성, 36% 이상은 감수성으로 판정하였다.

재배 시기에 따른 오이와 멜론 품종들의 흰가루병 저항성 차이를 제외한 모든 실험은 8반복으로 2회 실시하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) 흰가루병균 동정 및 race 검정

대전외 비닐하우스에서 흰색 분말 모양의 전형적인 흰가루병의 병징을 보이는 오이 잎을 채집하여 단일 병반으로부터 흰가루병균 포자를 분리하였다. 흰가루병균의 동정을 위해 광학현미경 하($\times 300$)에서 관찰한 결과, Vakalounakis et al.(1994)이 보고한 *P. xanthii*와 동일하게 무색 타원형이고 포자의 크기가 $34(24-39) \times 23(14-24) \mu\text{m}$ 이고 장경/단경의 비율이 1.48이었다. 그리고 ITS영역의 염기서열(563bp)의 상동성을 BLAST를 통해 분석한 결과에서도 *P. xanthii*(accession no. AB774158)와 100% 일치 하였다. 따라서 우리가 분리한 오이 흰가루병균은 *P. xanthii*(syn. *P. fuliginea*, *P. fusca*)임을 알 수 있었다.

박과 작물의 흰가루병균은 *Podospaera xanthii*(syn. *Sphaerotheca fuliginea*), *Golovinomyces cucurbitacearum*(syn. *Erysiphecichoracearum*), 그리고 *Golovinomyces rotini*(syn. *Erysiphe cichoracearum*)이 주요 병원균으로 보고되었다(Vakalounakis and Klironomou, 1995, 2001). 미국에서는 주로 *P. xanthii*에 의해 그리고 프랑스는 모두에 의해, 지중해 연안의 Crete는 *P. xanthii*에 의해 그리고 이스라엘은 *P. xanthii*에 의해서만 발생하고 있다(Bertrand et al., 1989; Cohen and Eyal, 1995; Thomas et al., 1984; Vakalounakis et al., 1994). 그리고 일본과 우리나라는 *P. xanthii*에 의해 주로 흰가루병이 발생한다고 보고되었다(Hosoya et al., 1999, 2000; Shin, 1994).

McGrath and Thomas(1996)의 방법에 따라 분리한 흰가루병균의 race를 규명하기 위하여 'Topmark', 'PMR 45', 'PMR 6' 및 'MR-1'를 사용하여 분리한 *P. xanthii*의 race를 조사한 결과, 'PMR 45'와 'PMR 6'은 모든 생육 시기에서 저항성 반응을 나타냈고, 'Topmark'는 떡잎뿐만 아니라 본엽에서도 높은 감수성을 보였다(Table 35). 이와 달리 'MR-1'은 떡잎에는 흰가루병이 발생하였으나, 4엽기와 6엽기의 본엽들에서는 흰가루병 병반이 형성되지 않았다(Table 35). 떡잎에서 나타나는 흰가루병에 대한 저항성 반응은 포장에서의 저항성과 반드시 일치하지 않는다는 Kooistra(1968)에 따라 본엽에서 저항성을 나타낸 'MR-1'은 이 흰가루병균에 대하여 저항성으로 판단되었다(Table 35). 따라서 본 연구에 사용된 대전에서 분리한 박과 작물 흰가루병균은 race 1이라는 것을 알 수 있었다(Kuzuya et al., 2006).

*P. xanthii*의 여러 race 중 race 1은 미국 동부지역에서 가장 흔하게 존재하는 주요한 흰가루병균으로 보고되었다(McGrath and Thomas, 1996). 그리고 일본에서도 race 1이 우세하게 멜론 흰가루병을 일으킨다고 하였다(Takada et al., 1974, 1975). 이후 여러 race들이 계절에 따

라 다르게 우점하긴 하지만, race 1에 의한 흰가루병이 여전히 많이 발생하고 있다(Hosoya et al., 1999). 우리나라 흰가루병균의 race에 관한 보고는 거의 없는 실정인데, 우리나라 종자회사에서는 race 1을 우점종으로 인식하고 있었으며 우리의 흰가루병균도 race 1이므로 우리나라도 race 1이 우점 race일 수도 있으나 이는 지역별로 많은 균주를 채집하여 확인하는 것이 필요하다.

Table 35. Resistance of differential melon genotypes to *Podosphaera xanthii* at three growth stages of plant^Z.

Cultivar	One-leaf stage	Four-leaf stage		Six-leaf stage			
	Cotyledone	1 st -leaf	2 nd -leaf	1 st -leaf	2 nd -leaf	3 rd -leaf	4 th -leaf
Topmark	100 ± 0.0 ^y	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	95 ± 0.0
PMR 45	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
PMR 6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
MR-1	34 ± 15	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

^ZDisease severity was measured by infected leaf area (%) at fully expanded leaves of each plant growth stage.

^yEach value represents the mean disease severity ± standard deviation of two runs with eight replications each.

(2) 생육 시기에 따른 흰가루병 발생

흰가루병 저항성 검정에 가장 적합한 생육 시기를 결정하고자 오이 39개 품종의 *P. xanthii* race 1에 대한 저항성 정도를 1엽기 오이의 떡잎, 4엽기 오이의 1과 2엽 그리고 6엽기 오이의 1-4엽의 흰가루병 발생을 조사하였다. 오이 39개 품종은 오이용 대목 품종이 5개, 종자회사에서 흰가루병 저항성 품종으로 공시하고 있는 5개 품종 그리고 일반 품종 29개가 포함되었다(Table 36). 흰가루병 저항성 품종으로 공시된 5개 품종 중 ‘네박자’를 제외한 나머지 4개 품종은 떡잎과 본엽 모두에서 감수성 품종과 유사한 정도의 높은 흰가루병 발생을 보였다. 그리고 ‘네박자’는 *P. xanthii* race 1에 대하여 1엽기의 떡잎에서는 저항성 반응을 보였으나 4엽기와 6엽기의 본엽에서는 높은 감수성을 보였다(Table 36).

한편, 저항성 품종으로 공시하지 않은 29개 품종 중 ‘중복삼척’와 ‘리스보이’는 떡잎(1엽기)과 본엽(4엽기와 6엽기)이 유사하게 저항성을 나타냈다. 그러나 ‘흑룡삼척’과 ‘정선삼척’은 떡잎에서는 감수성을 나타냈으나 4엽기와 6엽기의 본엽에서는 저항성을 보였다. 이와 달리 ‘구월백반’과 ‘청화흑진주’는 1엽기의 떡잎에서는 저항성을 보였으나, 4엽기와 6엽기에서는 감수성을 보였다. 따라서 오이 품종의 흰가루병 저항성을 떡잎을 사용하여 검정하는 것은 많은 오류를 낳을 것이라 생각되었다.

오이 39개 품종의 떡잎의 흰가루병에 대한 저항성이 본엽과 차이를 보이는 것과 달리, 4엽기와 6엽기 오이에서 본엽 1엽의 흰가루병 저항성은 거의 대부분의 품종에서 식물체 전체의 흰가루병 저항성 정도와 상당히 유사하였다(Table 36). 그리고 각 오이 품종의 *P. xanthii* race 1에 대한 저항성은 4엽기와 6엽기 식물간에 거의 차이가 없었다(Table 36).

Cohen and Eyal(1995)는 *P. xanthii* race 1에 대해 멜론의 떡잎 시기에서 떡잎이 저항성

일 경우에는 식물체가 2엽기 혹은 포장에서 성숙한 생육 시기가 되어도 강한 저항성을 나타내고, 떡잎이 감수성이면 이후 식물이 생장함에 따라 저항성 혹은 감수성으로 나뉘게 된다고 보고하였다. 따라서 떡잎에서 저항성이면 저항성으로 간주하고, 떡잎이 감수성인 식물체는 2엽기까지 조사한 후에 결정하는 것이 필요하다고 하였다. 하지만 본 연구에서 오이의 경우에는 멜론과 달리 오이 품종에 따라 떡잎에서 저항성인 것이 본엽에서 감수성 반응 보이거나 반대로 떡잎은 감수성인데 나중에 자란 본엽은 저항성을 보이는 등 여러 가지의 경우가 존재하였다 (Table 36). 하지만 본엽 1엽의 저항성은 유묘가 성장하여도 크게 달라지지 않았다.

그리고 Table 35의 멜론에서도 떡잎의 저항성은 변하나 본엽 1엽의 저항성 변하지 않았다. 따라서 병리검정의 효율성을 고려할 때 박과 작물의 흰가루병은 각 품종의 본엽 1엽의 흰가루병 발생을 조사하여 저항성을 검정하는 것이 바람직할 것이라 생각되었다.

Table 36. Development of powdery mildew on 34 cucumber cultivars caused by *Podosphaera xanthii* race 1 at three growth stages of seedlings^z.

Cultivar	Trait	One-leaf	Four-leaf stage		Six-leaf stage	
		Cotyledon	1 st leaf	Whole ^x	1 st leaf	Whole ^w
Jungboksamcheok		10 ± 5.8 ^v	11 ± 7.8	8.5 ± 4.3	8.0 ± 4.7	8.6 ± 6.0
Russboy		18 ± 9.1	26 ± 8.9	21 ± 3.7	58 ± 11	56 ± 6.0
Heukryongsamcheok		70 ± 0.0	22 ± 13	18 ± 6.6	66 ± 31	31 ± 13
Jeongseonsamcheok		60 ± 0.0	20 ± 20	14 ± 9.3	28 ± 22	21 ± 2.6
Asiastrike	R	62 ± 8.4	58 ± 19	63 ± 17	100 ± 0.0	98 ± 1.0
Cheonghwaheukjinju		6.2 ± 2.9	56 ± 21	52 ± 8.4	78 ± 11	72 ± 14
Guwolbanbaek		34 ± 5.5	76 ± 11	45 ± 7.8	100 ± 0.0	71 ± 11
Nebakja	R	13 ± 5.7	78 ± 11	79 ± 8.2	73 ± 12	82 ± 6.8
Glorysamcheok		50 ± 10	86 ± 5.5	74 ± 2.2	83 ± 14	66 ± 2.5
Ohdaebaekdadagi		40 ± 12	92 ± 2.7	85 ± 7.3	100 ± 0.0	89 ± 12
Daeseon		36 ± 13	92 ± 2.7	78 ± 6.0	100 ± 0.0	88 ± 9.9
EunmiS		42 ± 8.4	92 ± 2.7	83 ± 7.3	100 ± 0.0	91 ± 10
Nodagibaekdadagi		52 ± 8.4	95 ± 0.0	79 ± 8.2	100 ± 0.0	90 ± 6.0
Hodongcheongjang		66 ± 8.9	95 ± 0.0	85 ± 4.5	100 ± 0.0	95 ± 3.0
Massagemasjjang		46 ± 15	95 ± 0.0	85 ± 2.5	100 ± 0.0	97 ± 1.4
Asiacheongjang		64 ± 5.5	95 ± 0.0	75 ± 6.7	100 ± 0.0	86 ± 5.1
Baekmibaekdadagi		68 ± 4.5	95 ± 0.0	81 ± 3.4	100 ± 0.0	95 ± 2.7
Baekchimmasjjang		47 ± 5.5	93 ± 2.7	74 ± 4.5	100 ± 0.0	94 ± 0.7
Nogyacheongcheong		60 ± 8.2	94 ± 2.5	82 ± 3.6	100 ± 0.0	92 ± 4.1
Hansungbaekdadagi		54 ± 8.9	94 ± 4.2	81 ± 4.5	100 ± 0.0	95 ± 4.2
Wellbeingmasjjang		54 ± 8.9	96 ± 2.2	84 ± 8.2	100 ± 0.0	96 ± 2.6
Sinjeongpum		68 ± 4.5	96 ± 2.2	87 ± 4.5	100 ± 0.0	94 ± 3.5
Cheongnogmasjjang		68 ± 8.4	97 ± 2.7	88 ± 2.1	100 ± 0.0	94 ± 2.1
Gyedaebaekgwa		76 ± 5.5	97 ± 2.7	57 ± 2.9	100 ± 0.0	69 ± 4.2
Nagdongcheongjang		68 ± 4.5	97 ± 2.7	88 ± 3.1	100 ± 0.0	95 ± 3.8
Miinbaekdadagi	R	54 ± 8.9	97 ± 2.7	83 ± 4.0	100 ± 0.0	91 ± 5.4
Minisayop		100 ± 0.0	100 ± 0.0	95 ± 2.7	100 ± 0.0	97 ± 1.1
Ohbokja		78 ± 4.5	96 ± 4.2	81 ± 11	100 ± 0.0	84 ± 6.5
Sinsedae		68 ± 4.5	98 ± 2.7	87 ± 7.2	100 ± 0.0	100 ± 0.0

Singsingbaekdadagi	R	70 ± 0.0	98 ± 2.7	94 ± 4.2	100 ± 0.0	93 ± 4.4
Haneulbaekdadagi	R	62 ± 4.5	98 ± 2.7	84 ± 6.3	100 ± 0.0	93 ± 3.4
Euncheonbaekdadagi		65 ± 11	99 ± 2.7	82 ± 8.0	100 ± 0.0	83 ± 10
Wolhasamcheok		82 ± 4.5	89 ± 16	78 ± 11	100 ± 0.0	75 ± 5.9
Asianogak		58 ± 4.5	82 ± 23	73 ± 22	100 ± 0.0	88 ± 21

^zDisease severity was measured by infected leaf area (%) at fully expanded leaves of each plant growth stage.

^yR, resistant cultivars to powdery mildew commercialized by seed company.

^xDisease severity of 1st to 2nd leaves of each seedling was investigated.

^wDisease severity of 1st to 4th leaves of each seedling was investigated.

^vEach value represents the mean disease severity ± standard deviation of two runs with eight replications each.

(3) 재배시기에 따른 오이 및 멜론 품종들의 저항성 차이

재배시기에 따른 오이 품종들의 흰가루병 저항성 차이를 조사하고자, Table 35의 결과로부터 종자회사에서 일반품종으로 공시하고 있으나 떡잎이나 본엽에서 저항성을 나타낸 6개 품종(‘중복삼척’, ‘흑룡삼척’, ‘러스보이’, ‘구월백반’, ‘정선삼척’ 및 ‘청화흑진주’)과 종자회사에서 저항성으로 공시한 6개 품종(‘드래곤삼척’, ‘네박자’, ‘미인백다다기’, ‘싱싱백다다기’, ‘아시아스트라이크’, ‘하늘백다다기’)의 재배시기를 달리하여 *P. xanthii* race 1에 의한 흰가루병 발생을 조사하였다. 일반 품종 중 ‘정선삼척’은 11-12월, 1-3월, 3-4월, 5-6월에 각각 21, 67, 30, 8.8%의 병반면적율을 보여 겨울로 감에 따라 재배 온도가 점차 낮아짐에 따라 저항성이 감소하다가 봄이 오면서 점차 재배 온도가 올라감에 따라 다시 저항성이 증가하였다(Table 37). 그리고 ‘중복삼척’과 ‘청화흑진주’는 ‘정선삼척’과 마찬가지로 재배 시기에 따라 *P. xanthii* race 1에 대해 저항성에 차이를 보였다. 그러나 재배시기에 관계없이 ‘러스보이’는 중도저항성을, 그리고 ‘흑룡삼척’과 ‘구월반백’은 감수성을 보였다.

그리고 저항성으로 판매하고 있는 6개 품종 중 ‘드래곤삼척’은 11-12월, 1-3월, 3-4월, 5-6월에 각각 4.5, 57, 22, 8.8%의 병반면적율을 보여 ‘정선삼척’과 마찬가지로 온도가 올라감에 따라 저항성은 증가하였다. 그리고 ‘네박자’는 11-12월, 1-3월 및 3-4월에는 저항성을 나타내지 않았으나 5-6월에는 중도저항성을 보였다(Table 37). 하지만 나머지 4개 품종은 재배 시기에 관계없이 *P. xanthii* race 1에 대하여 저항성을 나타내지 않았다. 이는 이들 품종이 race 1에 대한 저항성이 아닌 다른 race에 저항성인 품종이기 때문으로 생각되었다.

*P. xanthii*가 주요 원인균인 박과 작물 흰가루병은 따뜻한 시기에 더 빠르게 진행하며 특히, 기온이 20℃ 이상으로 상승하면 많이 발생하는 병으로 알려져 있다(Cho et al., 2009; McGrath and Thomas, 1996). 그런데 낮은 온도(15-20℃)에서 감수성, 높은 온도(25-30℃)에서는 저항성을 나타내는 것처럼 온도에 민감한 저항성을 보이는 오이와 멜론 품종들이 지속적으로 보고되면서(Morishita et al., 2003; Pérez-García et al., 2001), 흰가루병 저항성과 온도와의 관계에 대한 관심이 증가하고 있다. 본 연구에서 실험한 오이 품종 중 온도가 올라감에 따라 저항성이 증가하는 것이 다수 있었다(Table 37). 이는 Morishita et al.(2003)이 오이 품종들 중 일부는 온도에 상관없이 항상 저항성을 나타내며 또 일부는 낮은 온도에서는 감수성을 높은

온도에서는 저항성을 나타낸다고 보고한 것과 일치하는 결과이다.

오이에서와 마찬가지로 재배시기에 따른 멜론 품종들의 흰가루병 저항성 차이를 조사하고자, 흰가루병 저항성으로 공시된 멜론 11개 품종과 일반 품종 16개 품종, 총 27개 품종의 3개 재배시기(11-1월, 2-3월, 4-5월)에 따른 흰가루병 발생을 조사하여 저항성 변이를 조사한 결과, 흰가루병 저항성으로 공시된 10개 중 5개 품종(‘얼스해피’, ‘베타리치’, ‘E. 울트라’, ‘문수’, ‘세지오케이’)은 모든 재배 시기에서 고도의 저항성을 보였다(Table 38). 그리고 ‘JJ원탑’과 ‘얼스VIP’는 11-1월과 2-3월에는 고도의 감수성을, 4-5월에는 중도저항성을 나타냈다. 나머지 3개 저항성 품종은 실험한 모든 재배 시기에서 감수성을 보였다. 따라서 이들은 race 1이 아닌 다른 race에 대한 저항성 품종으로 생각되었다.

일반 멜론 품종 16개 중 ‘아시아조춘만추’는 11-1월, 2-3월 및 4-5월에 각각 44, 31, 10%의 병반면적율을 보여 재배 시기에 따라 저항성 차이가 있었다(Table 38). 하지만 나머지 15개 품종들은 실험한 모든 시기에서 높은 감수성을 보였다(Table 38). 따라서 실험한 멜론 품종 중 오이에서와 같은 정도로 온도에 민감한 저항성 품종은 없었으며, *P. xanthii* race 1에 대하여 고도의 저항성을 보인 6개 멜론 품종들은 재배 시기에 관계없이 항상 높은 저항성을 발현한다는 것을 알 수 있었다.

그리고 재배 시기에 따른 오이 12개와 멜론 27개 품종의 흰가루병 저항성 차이에서도 6엽기 식물의 1엽의 저항성 반응은 잎이 충분히 전개된 1-4엽의 평균 병반면적율을 기준으로 한 저항성 반응과 거의 차이가 없음을 알 수 있었다(Tables 37 and 38). 따라서 오이뿐만 아니라 멜론에서도 본엽 1엽의 흰가루병 저항성이 전체 식물체의 저항성을 나타낼 수 있음이 다시 확인되었다.

Table 37. Development of powdery mildew on 12 cucumber cultivars caused by *Podosphaera xanthii* race1 in a greenhouse during four growing seasons^z.

Cultivar	Trait ^y	Nov. 5 - Dec. 16, 2010		Jan. 20 - March 2, 2011		March 10 - April 18, 2011		May 24 - June 27, 2011	
		1 st -leaf	Whole plant ^x	1 st -leaf	Whole plant ^x	1 st -leaf	Whole plant ^x	1 st -leaf	Whole plant ^w
Dragonsamcheok	R	15 ± 0.0 ^s	4.5 ± 0.7	73 ± 10	57 ± 5.8	60 ± 21	22 ± 10	11 ± 4.3	6.0 ± 2.0
Nebakja	R	73 ± 12	82 ± 6.8	97 ± 2.6	89 ± 4.8	79 ± 11	79 ± 13	53 ± 15	46 ± 9.0
Jungboksamcheok		8.0 ± 4.7	8.6 ± 6.0	28 ± 15	37 ± 9.8	73 ± 16	71 ± 7.7	17 ± 14	12 ± 8.0
Russboy		58 ± 11	56 ± 6.0	74 ± 24	55 ± 17	61 ± 13	53 ± 8.2	49 ± 17	39 ± 11
Jeongseonsamcheok		28 ± 22	21 ± 4.0	94 ± 1.8	67 ± 5.2	63 ± 20	30 ± 11	10 ± 6.4	8.8 ± 5.4
Cheongwahaekjinju		78 ± 11	72 ± 14	95 ± 0.0	83 ± 6.5	43 ± 7.1	24 ± 6.5	38 ± 15	27 ± 9.3
Mean		43 ± 5.6	40 ± 2.3	77 ± 4.4	65 ± 2.8	63 ± 6.1	47 ± 4.8	30 ± 5.2	23 ± 3.1
Asiastrike	R	100 ± 0.0 ^s	98 ± 1.0	100 ± 0.0	76 ± 6.6	100 ± 0.0	98 ± 1.3	73 ± 7.1	57 ± 8.4
Miinbaekdadagi	R	100 ± 0.0	91 ± 5.4	100 ± 0.0	96 ± 2.2	100 ± 0.0	93 ± 3.3	96 ± 4.2	78 ± 8.0
Singsingbaekdadagi	R	100 ± 0.0	93 ± 4.4	100 ± 0.0	97 ± 0.4	100 ± 0.0	98 ± 0.6	98 ± 2.7	79 ± 6.7
Haneulbaekdadagi	R	100 ± 0.0	93 ± 3.4	100 ± 0.0	97 ± 0.4	100 ± 0.0	98 ± 0.6	99 ± 1.8	87 ± 4.3
Heukryongsamcheok		66 ± 31	31 ± 13	99 ± 2.3	90 ± 4.4	100 ± 0.0	86 ± 4.5	79 ± 8.3	56 ± 8.2
Guwolbanbaek		100 ± 0.0	71 ± 11	100 ± 0.0	77 ± 10	100 ± 0.0	84 ± 5.9	98 ± 2.7	59 ± 5.6
Mean		94 ± 5.2	80 ± 5.3	100 ± 0.4	89 ± 2.1	100 ± 0.0	93 ± 1.5	90 ± 1.8	72 ± 3.3

^zDisease severity was measured by infected leaf area (%).

^xDisease severity of 1st to 4th leaves of each seedling was investigated.

^wDisease severity of 1st to 3rd leaves of each seedling was investigated.

Table 38. Development of powdery mildew on 27 melon cultivars caused by *Podosphaera xanthii* race 1 in a greenhouse during three growing seasons^z.

Cultivar	Trait	NJan.19, 2010		-Mar.11,7,2011		-July 202011	
		1 st -leaf	Whole plant ^x	1 st -leaf	Whole plant	1 st -leaf	Whole plant
Earl'shappy	R	0.0 ± 0.0 ^w	0.0 ± 0.0	14 ± 32	5.6 ± 12	19 ± 31	7.5 ± 9.0
Betarich	R	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.6 ± 0.9	0.6 ± 0.4	3.3 ± 1.9	2.4 ± 0.9
E.ultra	R	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Munsu	R	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.5 ± 1.1	1.4 ± 0.4	3.5 ± 1.3	2.3 ± 0.6
Saegiokoi	R	0.6 ± 0.9	0.3 ± 0.3	5.1 ± 2.4	2.8 ± 1.3	4.9 ± 4.3	3.4 ± 1.4
Asiajochunmanchun		95 ± 3.8	44 ± 3.8	79 ± 16	31 ± 8.8	29 ± 17	10 ± 4.7
Jjonetop	R	100 ± 0.0	67 ± 6.4	100 ± 0.0	77 ± 3.4	100 ± 0.0	49 ± 5.4
Earl'sVIP	R	100 ± 0.0	57 ± 3.8	100 ± 0.0	67 ± 5.1	96 ± 4.2	49 ± 6.5
Mean ^v		37 ± 0.4	21 ± 1.0	38 ± 4.6	23 ± 2.0	32 ± 5.2	15 ± 2.3
Earl'sgoldking		100 ± 0.0	84 ± 4.8	100 ± 0.0	97 ± 1.9	100 ± 0.0	98 ± 1.2
Earl'sking	R	100 ± 0.0	89 ± 8.2	100 ± 0.0	100 ± 0.6	100 ± 0.0	99 ± 1.2
Superseji		100 ± 0.0	85 ± 3.6	100 ± 0.0	100 ± 0.4	100 ± 0.0	93 ± 2.5
Asiabeakgeum		100 ± 0.0	86 ± 3.3	100 ± 0.0	99 ± 0.9	100 ± 0.0	93 ± 3.3
Asiapapaya		100 ± 0.0	85 ± 5.2	100 ± 0.0	98 ± 2.2	100 ± 0.0	91 ± 8.9
Asiahwangguem		100 ± 0.0	86 ± 3.1	100 ± 0.0	98 ± 0.7	100 ± 0.0	95 ± 7.9
Eolrookpapaya		100 ± 0.0	92 ± 4.9	100 ± 0.0	99 ± 0.9	100 ± 0.0	95 ± 2.9
Earl'smounthagye		100 ± 0.0	84 ± 12	100 ± 0.0	99 ± 0.6	100 ± 0.0	99 ± 0.4
Earl'stopone		100 ± 0.0	79 ± 20	100 ± 0.0	94 ± 2.8	100 ± 0.0	97 ± 2.7
Ipchundaegil		100 ± 0.0	90 ± 5.9	100 ± 0.0	84 ± 6.1	94 ± 4.2	61 ± 8.4
JangchunFRpapaya		100 ± 0.0	98 ± 0.9	100 ± 0.0	99 ± 0.6	100 ± 0.0	98 ± 2.2
Redqueen	R	100 ± 0.0	95 ± 1.9	100 ± 0.0	99 ± 0.7	100 ± 0.0	91 ± 6.1
Earl'sparty		100 ± 0.0	86 ± 5.6	100 ± 0.0	97 ± 2.8	100 ± 0.0	86 ± 10
Earl'sellesse		100 ± 0.0	95 ± 3.6	100 ± 0.0	98 ± 0.9	100 ± 0.0	95 ± 2.4
Earl'selite		100 ± 0.0	94 ± 2.4	100 ± 0.0	99 ± 0.0	100 ± 0.0	96 ± 3.7
Reisor		100 ± 0.0	84 ± 38	100 ± 0.0	97 ± 3.5	100 ± 0.0	96 ± 3.5
Asiaseongha		98 ± 2.6	70 ± 6.8	100 ± 0.0	74 ± 4.3	98 ± 3.7	56 ± 8.9
Summercool	R	99 ± 1.8	66 ± 3.7	100 ± 0.0	74 ± 4.1	100 ± 0.0	83 ± 9.4
Mean ^v		100 ± 0.2	84 ± 3.6	100 ± 0.0	95 ± 0.3	100 ± 0.3	90 ± 2.0

^zDisease severity was measured by infected leaf area (%).

^yR, resistant cultivars to powdery mildew commercialized by seed company.

^xDisease severity of 1st to 4th leaves of each seedling was investigated.

^wEach value represents the mean disease severity ± standard deviation of eight replicates

10. 토마토 시들음병 저항성 병리검정 기술 체계 확립

가. 효율적인 토마토 시들음병 저항성 스크리닝 체계 확립

(1) 서론

토마토(*Solanum lycopersicum* L.)는 중요한 가지과 작물로 주로 시설 재배에 의존하여 재배되고 있기 때문에 연작 재배로 인하여 다양한 병해가 증가하고 있다. 토마토에 발생하는 병해 중 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder and Hansen에 의해 발생하는 토마토 시들음병(Fusarium wilt)은 전 세계적으로 토마토에 가장 큰 피해를 주는 병의 하나로써 알려져 있다(Walker, 1971). 토마토 시들음병이 발생시 일반적으로 잎이 황화나 시들음 및 생장이 위축이 나타나며 점차적으로 말라죽는 전신성 병해이기 때문에 막대한 경제적 손실을 야기한다. 토마토 시들음병을 방제하기 위해서는 윤작 및 석회와 유기물 시용, 토양 훈증제를 이용한 화학적 방제, 저항성품종 및 저항성 대목을 이용한 접목재배 등이 이용되고 있다(농촌진흥청, 2009). 석회와 유기물 시용 및 토양훈증제의 사용은 경제성이 낮고 환경 및 인축 독성에 대한 사회적 관심과 친환경 농산물의 수요가 증가하면서 사용이 점차 줄어들고 있다. 반면 저항성품종 및 저항성 대목을 이용한 접목재배는 이런 문제점들을 대체 할 수 있는 새로운 방제 방법으로 많은 사람들이 관심을 가지고 있으며, 특히 종자회사들에서 많은 저항성 품종을 개발하여 시판하고 있다.

F. oxysporum f. sp. *lycopersici*(FOL)는 race 특이적인 저항성 유전자를 가진 토마토 품종에서 병원성 차이를 보이는 균주들을 발견된 순서에 따라 3개의 race (race 1, race 2, 및 race 3)로 구분하였다. Bohn과 Toker(1939)는 토마토 근연종인 *Lycopersicon pimpinellifolium* PI 79532(Missouri accession 160)가 FOL에 저항성이 있음을 발견하였고, 이는 단일 우성 유전자에 의해 조절되어지는 저항성으로써 이를 *I* 유전자로 명명하고 많은 재배 품종에 도입되었다. 그 후 *I* 유전자가 도입된 토마토 품종에 시들음병을 야기하는 균주들이 출현하였고, 이들을 race 2 균주로 보고하였다(Alexander and Toker, 1945; Gerdemann and Finley, 1951). *L. esculentum* × *L. pimpinellifolium*의 교잡으로 얻은 PI 126915는 race 1과 2에 고도 저항성을 나타내었고(Alexander and Hoover, 1955; Cirulli and Alexander, 1966; Stall and Walter, 1965), 이 저항성은 두 개의 서로 다른 유전자에 의해 조절되어지는 것으로 PI 79532에서 유래한 race 1에 저항성 유전자를 *I* 유전자가 알려졌고 PI 126915으로부터 얻은 race 2에 저항성 유전자를 *I-2* 유전자로 명명하였다(Cirulli and Alexander, 1966; Laterrot and Philouze, 1984). 1960년 이래로 *I-2* 유전자가 상업용 품종에 도입되어 재배되었다(Gage, 1975). Race 1과 2에 저항성인 품종을 침해하는 새로운 race인 race 3균주는 호주의 Queensland 지방에서 처음 분리되었고, 뒤이어 미국의 몇몇 주에서 보고되었다(Grattidge and O'Brien, 1982; Davis, 1988; Volin and Jones, 1982). *L. pennellii*의 PI414773과 LA716로부터 race 3에 저항성을 보이는 유전자를 보고하였고, 이를 *I-3* 유전자로 명명하였다(Bournival and Vallejos, 1991; McGrath et al., 1987; Scott and Jones, 1989). 현재 *I-3* 유전자가 도입된 몇몇 토마토 품종들이 육종되어있다(Jones, 1991). 앞으로 새로운 race의 출현이나 저항성 유전자원 탐색을 위해서는 토마토 시들음병에 대한 효율적인 저항성 검정법이 필요하다.

따라서 본 연구에서는 효율적인 토마토 시들음병 저항성 검정 방법을 확립하고자 현재 시판되고 있는 6종 토마토 품종과 race가 판명된 6개의 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 의 저

항성과 병원성 정도를 조사하고 이들 중 race 1에 저항성 품종으로 도태랑마스터와 race 2에 저항성 품종으로 슈퍼선로드를 선발하였고, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2로 KACC 40043 균주와 race 3로 TF104균주를 각각 선발하여 뿌리상처 유무, 포자현탁액에 침지시간, 재배온도, 및 접종원 농도 등 다양한 발병조건에 다른 토마토 품종들의 시들음병 발생을 조사하였다.

(2) 재료 및 방법

접종원 준비

토마토 시들음병을 일으키는 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*는 한국농업미생물자원센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)로부터 분양 받은 FOL race 2 균주인 KACC 40037, KACC 40038, KACC 40043, KACC 40044, KACC 40045 및 원예특작과학원으로부터 분양 받은 FOL race 3인 TF104 균주를 사용하였다.

토마토 시들음병 저항성 검정법을 확립하기 위한 실험은 KACC 40043(race 2)와 TF104(race 3)균주를 사용하였다. 각각의 균주는 potato dextrose agar(PDA, Becton, Dicknson and Co.) 배지에 접종하여 25°C에서 5일간 배양 후 균사 선단의 균사조직을 떼어 malt extract broth(MEB, Becton, Dicknson and Co.)에 접종하고 25°C 암 상태에서 7일간 150 rpm으로 진탕배양을 하였다. 배양한 각각의 균주는 4겹의 거즈를 이용하여 균사를 제거하고 광학현미경하에서 hemotocytometer를 이용하여 포자의 농도를 측정하였다. 접종원 농도에 따른 저항성 정도 실험을 제외한 모든 실험의 경우에는 1×10^7 conodia/ml로 사용하였고, 접종원 농도에 따른 실험은 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 conodia/ml가 되도록 접종원을 준비하였다.

시들음병 접종

토마토 품종의 시들음병에 대한 저항성 정도는 시판중인 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) race 1에 저항성 품종인 '롱런'과 '도태랑마스터', FOL race 2에 저항성 품종인 '슈퍼선로드', '도태랑다이아', '제우스42', 및 시들음병 저항성 품종으로 공시하지 않은 '서광'을 사용하였다. 토마토 시들음병 저항성 검정법을 확립하기 위한 실험은 '도태랑마스터'(코레곤종묘)와 '슈퍼선로드'(사카다코리아) 품종을 사용하였다. 토마토 품종의 종자는 128공 연결 포트에 썩썩이(농우) : 질석 (1:1, v/v)의 혼합토를 넣고 토마토 종자를 파종하여 온실(25 ± 5°C)에서 14~21일 동안 재배한 2엽기 토마토 유묘를 실험에 사용하였다. 토마토 뿌리를 물로 세척하여 흙을 제거한 후 포자 현탁액에 30분 동안 침지하여 접종하였다. 5×8 연결포트에 썩썩이를 넣고 접종한 토마토 유묘를 정식하였다. 뿌리 상처 유무에 따른 저항성 정도 실험에서 뿌리 상처는 앞에서와 같은 방법으로 준비한 토마토 유묘의 뿌리를 2 cm 정도 남기고 가위를 이용하여 자른 후에 동일한 방법으로 포자 현탁액에 침지하여 접종하였다. 침지 시간에 따른 저항성 정도 실험은 포자 현탁액에 각각 30 S, 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h 동안 침지하여 접종하였다. 접종한 토마토 유묘는 1일 동안 25°C 습실상에서 배양한 후 25°C 생육상에 옮겨 3주 동안 시들음병 발생을 관찰하면서 재배하였다. 온도 따른 저항성 정도 실험은 접종한 토마토 유묘는 1일 동안 20, 25, 30°C 습실상에서 배양한 후 20, 25, 30°C 생육상에 옮겨 3주 동안 시들음병 발생을 관찰하면서 재배하였다.

발병도 조사

병조사는 식물체 뿌리를 뽑아 도관을 잘라 발병정도를 조사하였다. 발병정도는 0=건전, 1=도관이 갈변되나 지상부는 병징 없는 것, 2= 도관이 갈변되고 지상부는 생육이 억제된 것, 3=도관이 갈변되고 지상부는 생육이 억제되며 약간 황화한 것, 4= 생육이 심하게 억제 되고 황화하여 시들고 낙엽된 것, 5= 고사 등 5 단계로 하였다. 평균발병도가 1.0 이하 일 경우에는 저항성, 1.1~3은 중도 저항성, 3 초과는 감수성으로 판정하였다. 모든 실험은 5반복으로 2회 실시하였으며 SAS(SAS Institute, Inc., 1989, Cary, NC) 프로그램을 이용하여 ANOVA 분석을 하였으며, 처리 평균간 비교를 위하여 Duncan's multiple range test($P=0.05$)를 실시하였다.

(3) 결과 및 고찰

토마토 품종의 시들음병에 대한 저항성

FOL race 1에 저항성 품종으로 공시한 '롱런' 품종과 '도태랑마스터'는 FOL race 2 균주에서 서로 다른 반응을 나타내었다. '롱런' 품종은 KACC 40045를 제외한 나머지 균주들에서는 2이상의 감수성이나 중도 저항성을 나타내었고, '도태랑마스터' 품종은 4.0 이상의 높은 발병도를 나타내었다. KACC 40045균주는 두 품종에서 각각 1과 1.7의 발병도를 나타내었다. FOL race 3 균주인 TF104는 모든 FOL race 1에 저항성 품종에 높은 발병도를 나타내었다(Table 39).

FOL race 2에 저항성 품종으로 공시한 '슈퍼선로드', '도태랑다이아' 및 '제우스 42' 품종은 FOL race 2 균주인 KACC 40037, KACC 40038, 및 KACC 40044는 세 품종 모두에서 중도 저항성을 보였고, KACC40045 균주는 '슈퍼선로드'와 '도태랑다이아' 품종에서는 중도 저항성을 보인데 비하여 '제우스 42' 품종에서는 감수성 보였다. 반면 KACC 40043균주는 FOL race 2에 저항성을 가진 3 품종 모두에서 감수성을 나타내었다. FOL race 3 균주인 TF104는 모든 FOL race 2에 저항성 품종에서 4.0이상의 높은 발병도를 나타내었다.

시들음병 저항성 품종으로 공시하지 않은 서광 품종은 FOL race 2 균주 중 KACC 40037, KACC 40038, 및 KACC 40043에 대하여 감수성을 보인 반면 KACC 40044과 KACC 40045에서는 중도저항성을 보였다. FOL race 3 균주인 TF104는 '서광' 품종에서 높은 발병도를 보였다.

토마토 시들병에 대한 효율적인 저항성 검정방법을 확립하기 위하여 위의 결과를 바탕으로 FOL race 1에 저항성 품종으로 '도태랑마스터'와 FOL race 2에 저항성 품종으로 '슈퍼선로드'를 선발하였고 FOL race 2 균주로 KACC40043과 FOL race 2 균주로 TF104를 선발하였다.

Table 39. Resistance degree of the six commercial tomato cultivars to Fusarium wilt caused by different race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*^a

Cultivar	Trait ^b	Race 1 ^c					Race 2			Race 3
		46 ^d	47	48	37	38	43	44	45	TF104
Longrun	R1	2.3±0.1 ^e	0.0±0.0	0.0±0.0	2.7±0.7	2.8±1.1	2.2±1.1	3.1±0.7	1.0±0.0	3.2±0.8
Dotaerangmaster	R1	2.1±1.0	0.0±0.0	0.0±0.0	4.4±0.6	4.4±0.6	4.0±1.1	4.6±0.6	1.7±0.7	4.7±0.1
Supersunload	R1, R2	2.1±0.1	0.0±0.0	0.6±0.9	1.9±0.7	1.7±1.0	0.4±0.0	2.6±1.7	2.4±2.3	4.8±0.3
Dotaerangaia	R1, R2	2.5±1.0	0.5±0.7	0.7±1.0	2.2±0.3	1.5±0.1	0.4±0.6	2.1±0.1	1.7±0.4	3.5±1.3
Zeus 42	R1, R2	1.2±0.3	0.3±0.4	0.2±0.3	2.6±0.0	1.4±0.8	0.4±0.6	2.6±1.7	0.6±0.6	4.4±0.8
SeoKwang		2.6±0.1	0.4±0.1	0.2±0.1	4.4±0.1	4.6±0.1	3.9±0.1	2.8±0.1	1.5±0.1	4.7±0.1

^aSeedlings at second true leaves stage of each tomato cultivar were inoculated with each *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* by root dipping of tomato seedlings in spore suspension of 1×10^7 conidia/ml for 0.5 h. The infected plants were incubated in humidity chamber at 25°C for 24 h and then transferred to a growth room at $25 \pm 2^\circ\text{C}$. After 3 weeks, disease index of the tomato seedlings was investigated.

^bResistant cultivars to Fusarium wilt were kindly supplied by seed companies

^cDesignations of race 1 and 2 were kindly provided by Korean Agricultural Culture Collection (KACC) and designations of race 3 were kindly supplied by National Institute of Horticultural & Herbal Science (NIHHS).

^d37=KACC 40037, 38=KACC 40038, 43=KACC 40043, 44=KACC 40044, and 45=KACC 40045.

^eEach value represents the mean disease index±standard deviation of two runs with five replications each.

뿌리상처에 따른 시들음병 발생

토마토 유묘의 뿌리에 인위적인 상처에 의한 시들음병의 발생을 살펴 본 결과 FOL race 1에 저항성인 도태랑마스터 품종은 KACC 40043(race 2)와 TF104(race 3) 균주 모두에서 상처 유무와 상관없이 높은 발병도를 나타내었다(Table 40). race 2에 저항성인 슈퍼선로드 품종은 상처 유무와 상관없이 KACC 40043(race 2)에 대하여 저항성을 TF104(race 3)에서는 감수성을 나타내었다. 즉 뿌리상처와 관계없이 도태랑마스터 품종은 FOL race 2와 3균주에 대하여 감수성을 나타내었고, 슈퍼선로드 품종은 FOL race 2에 감수성보였고, FOL race 3에 저항성을 나타내었다. *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*의 race에 따른 토마토 유묘의 저항성 검정은 토마토 유묘의 뿌리를 자르고 포자현탁액에 침지하거나 뿌리의 흙을 제거한 후 포자 현탁액에 침지하여 저항성 검정을 하였다(Bournival et al., 1989; Marlatt et al., 1996; Mes et al., 1998; Cai et al., 2003; Kim, 2005). 본 연구에서 토마토 품종의 시들음병에 대한 저항성 정도는 뿌리를 자른 유묘나 자르지 않은 유묘의 감수성과 저항성의 정도가 거의 유사하므로, 효율적인 토마토 시들음병에 대한 저항성 검정을 위해서는 토마토 유묘의 뿌리로부터 흙을 제거한 후 뿌리를 자리지 않고 포자현탁액에 침지하는 것이 적절할 것으로 생각된다.

Table 40. Development of Fusarium wilt on tomato cultivars according to cut and non-cut root^a

Cultivar	Isolate	Root dipping period	
		Cut root	Non-cut root
Dotaerangmaster	KACC40043	4.3±0.6a ^b	4.7±0.3a
	TF104	4.8±0.2a	4.9±0.2a
Supersunload	KACC40043	0.2±0.3a	0.0±0.0a
	TF104	4.6±0.2b	4.2±0.2b

^aSeedlings at second true leaves stage of each tomato cultivar were inoculated with each *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* by root dipping of cut and non-cut roots of tomato seedlings in spore suspension of 1×10^7 conidia/ml for 0.5 h. The infected plants were incubated in humidity chamber at 25°C for 24 h and then transferred to a growth room at $25 \pm 2^\circ\text{C}$. After 3 weeks, disease index of the tomato seedlings was investigated.

^bEach value represents the mean disease index±standard deviation of three runs with five replications each. Values in the labeled with the same letter are not significantly different in Duncan's multiple range test at $P = 0.05$.

침지시간에 따른 시들음병 발생

토마토 뿌리를 포자 현탁액에 30초에서 4시간까지 서로 다른 침지 시간에 따른 시들음병 발생 정도를 조사한 결과, 침지하는 시간에 상관없이 ‘도태랑마스터’ 품종은 KACC 40043(race 2)와 TF104(race 3)균주 모두에서 높은 발병도를 나타내었고 ‘슈퍼선로드’ 품종은 KACC 40043(race 2)에 대하여 저항성을 TF104(race 3)에서는 감수성을 나타내었다(Table 41). 김 (2005)은 토마토 유묘의 뿌리를 포자 현탁액에 침지하는 시간에 따른 발병도 실험에서 1×10^6 conodia/ml의 포자 현탁액에 1분간 침지시 거의 발병하지 않았지만 10분 이상 침지시 높은 발병도를 나타내었다. 반면 Mes et al.(1998)은 1×10^7 conodia/ml의 포자 현탁액에 1분 이상 침지하여 기주간의 저항성 차이를 볼 수 있었다. 본 연구에서는 포자현탁액에 침지한 직후 꺼내어 즉, 1×10^7 conodia/ml의 포자 현탁액에 30초간 침지 할 경우 토마토 시들음병에 대한 저항성을 효과적으로 검정 할 수 있을 것으로 생각된다.

Table 41. Development of Fusarium wilt on tomato cultivars according to root dipping period^a

Cultivar	Isolate	Root dipping period					
		30 S	0.5 h	1 h	2 h	3 h	4 h
Dotaerangmaster	KACC40043	4.2±0.8a ^b	4.7±0.1a	4.8±0.0a	4.8±0.3a	4.9±0.1a	4.5±0.4a
	TF104	4.7±0.1a	4.5±0.7a	4.7±0.4a	4.7±0.4a	4.8±0.3a	5.0±0.0a
Supersunload	KACC40043	0.0±0.0a	0.0±0.0a	0.0±0.0a	0.2±0.3a	0.0±0.0a	0.1±0.1a
	TF104	3.3±0.7b	3.6±0.0b	4.1±0.4b	3.9±0.1b	4.4±0.0b	4.3±1.0b

^aSeedlings at second true leaves stage of each tomato cultivar were inoculated with each *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* by root dipping of tomato seedlings in spore suspension of 1

$\times 10^7$ conidia/ml for 30 S, 0.5, 1, 2, 3, and 4 h. The infected plants were incubated in humidity chamber at 25°C for 24 h and then transferred to a growth room at $25 \pm 2^\circ\text{C}$. After 3 weeks, disease index of the tomato seedlings was investigated.

^bEach value represents the mean disease index \pm standard deviation of two runs with five replications each. Values in the labeled with the same letter are not significantly different in Duncan's multiple range test at $P = 0.05$.

재배온도에 따른 시들음병 발생

토마토 품종들의 발병 온도에 따른 시들음병에 발생정도를 조사하기 위하여 토마토 유묘를 포자현탁액에 침지한 후 20, 25, 및 30°C의 서로 다른 온도에서 재배하며 병 발생정도를 조사한 결과, 20°C에서는 KACC 40043(race 2)과 TF104(race 3)균주가 race 1에 저항성을 가진 '도태랑마스터' 품종에서 각각 1.9와 2.2의 발병도로 중도 저항성을 나타내었다(Table 42). Race 1과 2에 저항성을 가진 '슈퍼선로드'는 KACC 40043에서 감수성을 보였고 TF104(race 3) 균주에서는 중도저항성을 나타내었다. 반면 25°C와 30°C에서는 두 품종 모두에서 유사한 발병도를 나타내었다. '슈퍼선로드' 품종에서는 25°C보다 30°C에서 높은 발병도를 나타내었지만 통계적으로 유의차가 없었고 김(2005)은 토마토 유묘의 재배온도에 따른 병 발현의 최적온도 실험에서 온도 증가에 따라 발병도가 증가하여 25°C와 30°C 사이에서 높은 발병도를 나타내었다. 토마토 시들병에 대한 저항성 검정은 주로 20~30°C에서 실험하고 있으며, 기주간의 저항성 차이를 구분 할 수 있었다(Mes et al., 1998; Huang and Lindhout, 1997; El Mohtar et al., 2007; Bournival et al., 1989). 본 실험에서는 토마토 품종의 시들음병에 대한 저항성 정도는 20°C에서는 감수성 품종이 중도저항성 반응을 보이므로 20°C보다는 25°C나 30°C에서 실험하는 것이 적합 할 것으로 생각된다.

Table 42. Development of Fusarium wilt on tomato cultivars according to incubation temperature^a

Cultivar	Isolate	Incubation temperature		
		20°C ^b	25°C	30°C
Dotaerangmaster	KACC40043	1.9 \pm 0.1a	4.6 \pm 0.3b	4.9 \pm 0.1b
	TF104	2.2 \pm 0.6a	4.6 \pm 0.4b	4.6 \pm 0.2b
Supersunload	KACC40043	0.0 \pm 0.0a	0.03 \pm 0.1a	0.1 \pm 0.1a
	TF104	2.1 \pm 0.5b	3.7 \pm 0.2c	4.3 \pm 0.3c

^aSeedlings at second true leaves stage of each tomato cultivar were inoculated with each *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* by root dipping of tomato seedlings in spore suspension of 1×10^7 conidia/ml for 0.5h. The infected plants were incubated in humidity chamber at 20, 25, and 30°C for 24 h and then transferred to a growth room at 20, 25, and $30 \pm 2^\circ\text{C}$. After 3 weeks, disease index of the tomato seedlings was investigated.

^bEach value represents the mean disease index \pm standard deviation of three runs with ten replications each. Values in the labeled with the same letter are not significantly different

in Duncan's multiple range test at $P = 0.05$.

접종원 농도에 따른 시들음병 발생

FOL race 1에 저항성 품종으로 공시한 '도태랑마스터'는 FOL race 2 균주인 KACC 40043과 FOL race 3 균주인 TF104의 서로 다른 농도(1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 및 1×10^8 conidia/ml)의 포자 현탁액에 침지하여 한 결과 농도와 상관없이 높은 발병도를 나타내었다. FOL race 2에 저항성 품종으로 공시한 '슈퍼선로드'는 KACC 40043(race 2)균주의 포자 현탁액 농도와 상관없이 낮은 발병도를 나타내었고, TF104(race 3)균주에서는 높은 발병도를 나타내었다. 즉, FOL race 2와 3균주의 접종 농도와 관계없이 '도태랑마스터' 품종에 감수성을 '슈퍼선로드'에 저항성을 나타내었다(Table 43). 김(2005)은 접종원의 농도에 따른 병 발현을 조사한 결과 접종 농도가 증가 할수록 발병도가 높게 나타났고, 1×10^7 conidia/ml 보다 1×10^6 conidia/ml에서 높은 발병도를 나타내었다. 현재 토마토 시들병에 대한 저항성 검정에 대한 많은 연구들이 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ conidia/ml의 다양한 농도에서 효과적으로 감수성과 저항성 품종을 검정할 수 있었다(Cai et al., 2003; Mes et al., 1998; Huang and Lindhout, 1997; El Mohtar et al., 2007; Bournival et al., 1989). 본 실험에서는 토마토 품종의 시들음병에 대한 저항성 정도는 FOL의 포자농도와 상관없이 감수성과 저항성을 구별 할 수 있었지만, 본 연구에서는 1×10^7 conidia/ml으로 실험하는 것이 적합 할 것으로 생각된다.

Table 43. Development of Fusarium wilt on tomato cultivars according to inoculum concentration^a

Cultivar	Isolate	Inoculum concentration(conidia/ml)				
		1×10^{6b}	5×10^6	1×10^7	5×10^7	1×10^8
Dotaerangmaster	KACC40043	4.9±0.1a ^c	4.5±0.1a	4.4±0.8a	4.7±0.4a	4.7±0.4a
	TF104	4.8±0.3a	4.5±0.7a	4.6±0.6a	4.6±0.6a	4.2±0.6a
Supersunload	KACC40043	1.0±0.8a	0.6±0.8a	0.4±0.3a	0.2±0.0a	0.7±1.0a
	TF104	3.8±0.3b	4.1±1.0b	4.3±0.4b	4.2±0.8b	4.4±0.3b

^aSeedlings at second true leaves stage of each tomato cultivar were inoculated with each *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by root dipping of tomato seedlings in different spore suspension (1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 conidia/ml) for 0.5 h. The infected plants were incubated in humidity chamber at 25°C for 24 h and then transferred to a growth room at 25±2°C. After 3 weeks, disease index of the tomato seedlings was investigated.

^bEach value represents the mean disease index±standard deviation of two runs with five replications each. Values in the labeled with the same letter are not significantly different in Duncan's multiple range test at $P = 0.05$.

나. 토마토 시들음병에 대한 간편 대량 검정법 개발

(1) 서론

토마토 시들음병(*Fusarium wilt*)은 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder and Hansen에 의해 전세계적으로 발생하는 병으로, 토마토 재배에서 가장 큰 피해를 주는 병 중 하나이다(Walker, 1971). 토마토 시들음병은 감염된 토마토가 시들어 죽는 토양병으로 막대한 경제적 손실을 초래할 뿐만 아니라, 방제가 어려운 균류병으로 알려져 왔다. 토마토 시들음병의 방제는 토양 훈증제를 이용한 화학적 방제, 윤작 및 석회와 유기물 시용이 널리 사용되었다(Jones et al., 1972; Jones and Overman, 1971; Jones and Woltz, 1972; Weststeijn, 1973; Woltz and Jones, 1973). 하지만 이들 방법은 경제성이 낮고 잔류 독성으로 인한 환경 문제를 야기하고 있으며, 친환경 농산물에 대한 수요 증가 등의 이유로 점차 기피되고 있다. 반면 저항성 대목을 이용한 접목 재배 및 저항성 품종 재배는 이런 문제점을 대체할 수 있는 친환경적인 방제 방법으로 인식되어 많은 연구자들이 저항성 품종을 개발하고자 노력하고 있다.

F. oxysporum f. sp. *lycopersici*(FOL)균주는 단일 우성 저항성 유전자(*I*, *I-2*)를 가진 토마토 품종에 대한 병원성에 따라 race 1, 2 및 3으로 명명되었다(Alexander and Tucker, 1945; Grattidge and O' Brien, 1982). Race 1은 시들음병에 대한 저항성 유전자가 없는 토마토에만 병을 일으킬 수 있는 균주로, race 1 균주에 대한 저항성은 토마토 근연종인 *Lycopersicon pimpinellifolium* PI79532(Missouri accession 160)로부터 유래한 단일 우성 저항성 유전자 *I*에 의한 것이다(Bohn and Tucker, 1939). 그리고 *I* 유전자를 침해할 수 있는 race 2 균주에 대한 저항성은 *L. esculentum* × *L. pimpinellifolium*의 교잡종인 PI126915에서 발견되었으며 *I-2* 유전자로 명명되었다(Cirulli and Alexander, 1966; Laterrot and Philouze, 1984). 그 이후에 출현한 race 3 균주는 *I*와 *I-2* 유전자를 가진 토마토에 시들음병을 일으킬 수 있는 균주로, race 3에 대한 저항성은 *L. pennellii*의 PI414773과 LA716에서 확인하였고, 이들로부터 유래한 저항성 유전자는 *I-3*이다(Bournival and Vallejos, 1991; McGrath et al., 1987; Scott and Jones, 1989). *I*와 *I-2* 저항성 유전자를 포함하는 많은 토마토 품종들이 개발되었으며, 현재 *I-3* 유전자를 가진 시들음병 저항성 토마토 품종들이 개발 중에 있다.

토마토 시들음병의 저항성 및 병원성 검정을 위한 FOL의 접종 방법으로는 개체 간에 시들음병 발생 정도의 차이가 적고, 저항성과 감수성 품종을 명확하게 구별 할 수 있는 root dip 방법을 많이 사용하고 있다(Bost, 2001; Bournival et al., 1989; Davis et al., 1988; Grattidge and O' Brien, 1982; Huang and Lindhout, 1997; Park et al., 2012). 하지만 root dip 방법은 재배 중인 토마토 뿌리를 뽑아 물로 세척하여 흙을 제거한 후에 이를 FOL 포자 현탁액에 침지하고 다시 새로운 포트에 이식하여 재배한 후에 병조사하는 검정 방법으로 대량의 시료에 대하여 시들음병 저항성을 검정할 경우에는 많은 시간과 과도한 노동력이 소요되고 있다. 따라서 root dip 방법에 비하여 보다 간편하고 대량 유묘 검정이 가능한 접종 방법을 이용하는 것이 저항성 검정의 효율을 크게 증가시킬 수 있으리라 생각되었다. 본 연구의 tip 및 scalpel 방법은 본 연구에서 처음 보고하는 토마토 시들음병 접종 방법으로, FOL 균주가 토마토를 감염하기 위해서는 뿌리에 상처가 있어야 하므로 root dip 방법에서처럼 재배 중인 토마토 뿌리를 뽑아 FOL 포자 현탁액에 침지하고 다시 토양에 이식하는 대신에 tip 및 scalpel 방법은 재배 중인 토마토 유묘의 뿌리에 tip 및 scalpel로 상처를 내고 FOL 포자 현탁액을 뿌리에 관주하여 접종하는 방법이다. 따라서 이들 방법은 토마토를 뽑거나 이식하지 않아 root dip 방법에 비하여 FOL을 접

중하는 간편한 접종 방법이었다.

본 연구에서는 root dip 방법보다 더 간단하고 효율적인 접종 방법을 이용한 대량 유묘 검정 방법을 확립하고자, race가 판명된 FOL 균주인 KACC40043(race 2)과 TF104(race 3)를 사용하여 race 1에 대한 저항성 품종인 ‘도태랑마스터’와 race 1과 2에 저항성인 ‘슈퍼선로드’를 이용하여 tip 방법, scalpel 방법, root dip 방법의 접종 방법에 따른 토마토 시들음병의 발생을 조사하였다. 그리고 대량 검정을 위하여 선발한 scalpel 접종 방법을 이용하여 포자 농도 및 발병 온도에 따른 토마토 품종들의 저항성과 감수성 차이를 비교하였다.

(2) 재료 및 방법

접종원과 유묘 준비

토마토 시들음병을 일으키는 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*는 한국농업미생물자원센터 (Korean Agricultural Culture Collection, KACC)로부터 분양받은 race 2인 KACC40043 균주와 국립농업과학원으로부터 분양 받은 race 3인 TF104 균주를 사용하였다. 토마토는 FOL race 1에 저항성 품종인 ‘도태랑마스터’(다끼이종묘)와 FOL race 1과 2에 저항성인 ‘슈퍼선로드’(사카타코리아) 두 품종을 사용하였다. FOL 균주는 malt extract broth(Becton, Dicknson and Co.)에 접종하고 25°C 암상태에서 7일 동안 150rpm으로 진탕배양 하였다. 그리고 배양한 균주는 4겹의 거즈를 이용하여 균사를 제거하고, 원심분리하여 상정액을 제거하고 멸균수로 현탁하여 접종원을 준비하였다(Park et al., 2012). 포자현탁액의 포자 농도는 hemocytometer를 사용하여 광학현미경 하에서 조사하였으며, 멸균수를 이용하여 1×10^7 conidia·mL⁻¹농도가 되도록 희석하였다.

접종 방법에 따른 시들음병 발생 실험에서 root dip 방법은 8 × 16 연결 포트(포트 당 토양 13mL, 범농사)에 원예용 상토(쭉쭉이, 농우바이오):vermiculite = 1:1(v/v)의 혼합토를 넣고 토마토 종자를 파종하여 온실(25 ± 5°C)에서 약 2주일 동안 재배한 2엽기 토마토 유묘를 실험에 사용하였다(Park et al., 2012). Scalpel 방법과 tip 방법은 5 × 8 연결 포트(포트 당 토양 70mL, 범농사)에 원예용 상토를 넣고 토마토 종자를 파종하여 온실(25 ± 5°C)에서 약 2주일 동안 재배한 2엽기 토마토 유묘를 실험에 사용하였다. 소면적 대량 검정을 위한 scalpel 검정 방법은 6 × 12 연결 포트(포트 당 토양 30mL, 범농사)에 쭉쭉이 상토를 넣고 종자를 파종하였다.

시들음병 접종 및 발병도 조사

Tip, scalpel 및 root dip 접종 방법에 따른 토마토 시들음병 발생은 1×10^7 conidia·mL⁻¹ 농도의 FOL 포자 현탁액을 접종하였으며 접종 후 25°C에서 재배하였다. Root dip 방법은 재배한 토마토 뿌리를 물로 세척하여 흙을 제거한 후에 FOL 포자 현탁액에 토마토 뿌리를 30분 동안 침지하여 접종하고, 5 × 8 연결 포트에 원예용 상토 쭉쭉이를 넣고 접종한 토마토 유묘를 정식하였다(Park et al., 2012). Tip 방법은 5 × 8 연결 포트에서 재배한 2엽기 토마토 유묘에 10mL tip을 이용하여 지체부에서 1cm 떨어진 곳에서 45°각도 2cm 깊이로 뿌리를 향하여 상처가 생기도록 찌르고 FOL 포자 현탁액을 10mL씩 관주하여 접종하였다. Scalpel 방법은 5 × 8 연결 포트의 2엽기 토마토 유묘에 scalpel을 이용하여 지체부에서 1cm 떨어진 곳에서 45°각도 2cm 깊이로 뿌리를 향하여 찢어서 뿌리에 상처를 주고 10mL tip을 이용하여 상처난 뿌리에

FOL 포자 현탁액을 10mL씩 관주하였다. 소면적 대량 유묘 검정을 위한 6 × 12 연결 포트틀 이용한 scalpel 방법에서는 앞에서와 같은 방법으로 scalpel로 상처를 주고 FOL 포자 현탁액을 포트 당 5mL씩 관주하여 접종하였다.

접종한 토마토 유묘는 25℃ 혹은 30℃ 습실상에서 1일 동안 배양한 후 각각 25와 30℃ 생육상으로 옮겨 하루에 12시간씩 광을 조사하면서 4주 동안 재배하였다. 토마토 시들음병 병 조사는 도관의 갈변 여부와 생육 억제로 발병 정도를 조사하였다. 발병 지수는 0 = 건전, 1 = 도관이 갈변되나 지상부의 생육은 정상인 것, 2 = 도관이 갈변되고 지상부의 생육이 약간 억제된 것, 3 = 도관이 갈변되고 지상부는 생육이 억제되며 약간 황화한 것, 4 = 생육이 심하게 억제되고 황화하여 시들고 낙엽된 것, 5 = 고사 등 6단계로 하였다(Cai et al., 2003; Park et al., 2012). 평균 발병도가 1.0 이하는 저항성, 1.1 - 3.0은 중도저항성, 3.0 초과는 감수성으로 판정하였다. 소면적 대량 검정을 위한 6 × 12 연결 포트틀 이용한 scalpel 방법 검정의 모든 실험은 10반복으로 2회 실시하였으며, SAS(SAS Institute, Inc., 1989, Cary, NC) 프로그램을 이용하여 ANOVA 분석을 하였으며 처리 평균간 비교를 위하여 Duncan's multiple range test($P=0.05$)를 실시하였다.

(3) 결과 및 고찰

접종 방법에 따른 토마토 시들음병 발생

접종 방법에 따른 토마토 시들음병의 발생에서 FOL race 1에 저항성인 '도태랑마스터'는 KACC40043(race 2)과 TF104(race 3) 균주를 root dip, tip 및 scalpel 방법으로 접종하였을 때에는 모두 3.3 이상의 높은 발병도를 보였다. 하지만 tip 방법은 root dip과 scalpel 방법에 비하여 개체 간의 발병도 차이가 심하였다(Table 44). FOL race 2에 저항성인 '슈퍼선로드'는 TF104(race 3) 균주에 대해서 scalpel 방법에서는 root dip 방법과 유사한 발병도를 보였지만, tip 방법에서는 2.7의 낮은 발병도로 중도 저항성을 보였다. 한편 '슈퍼선로드'는 KACC40043(race 2) 균주에 대해서는 접종 방법에 상관없이 모두 저항성을 나타냈다. 따라서 scalpel 방법에 의한 FOL 접종 과정에서 발생한 상처는 토마토의 시들음병에 대한 저항성에 영향을 미치지 않았다는 것을 알 수 있었다.

토마토 시들음병에 대한 품종의 저항성과 병든 식물에서 분리한 균주들의 race 판별 및 병원성 기작을 연구하기 위한 접종 방법은 토마토 유묘의 뿌리를 포자현탁액에 침지하는 root dip 방법이 주로 사용되고 있다(Bost, 2001; Bournival et al., 1989; Davis et al., 1988; Grattidge and O' Brien, 1982; Huang and Lindhout, 1997; Park et al., 2012). 하지만 root dip 방법은 시간과 노동력이 많이 소요되는 접종 방법이다. 본 연구에서 제안한 scalpel 접종 방법은 root dip 방법과 유사한 시들음병 발병도를 보이며 개체간 변이가 적고(Table 1), 대량의 시료에 대한 검정에서 토마토 뿌리를 물로 세척하여 흙을 제거한 후 포자 현탁액에 침지하고 새로운 토양에 이식하는 root dip 방법보다 보다 간편하고 효율적인 검정법으로 생각되었다.

Table 44. Development of *Fusarium* wilt on tomato cultivars according to inoculation method.

Inoculation method	Isolate	Tomato cultivar	
		Dotaerangmaster	Supersunload
Root dip ^z	KACC40043	4.3 ± 0.4a ^w	0.0 ± 0.0b
	TF104	4.8 ± 0.2a	3.3 ± 0.4a
Scalpel ^y	KACC40043	4.2 ± 0.1a	0.0 ± 0.0b
	TF104	3.3 ± 0.1a	3.3 ± 0.1a
Tip ^x	KACC40043	3.6 ± 1.1a	0.0 ± 0.0b
	TF104	3.5 ± 1.2a	2.7 ± 0.1a

^zSeedlings of tomato cultivars at two-leaf stage were inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by dipping roots of the plants in spore suspension of 1×10^7 conidia·mL⁻¹ for 0.5 hour. The infected plants were transplanted and incubated in humidity chamber at 25°C for 24 hours and then transferred to a growth room at 25°C with 12-hour light a day. After 4 weeks, disease severity of the seedlings was investigated on a scale of 0-5.

^ySeedlings of tomato cultivars at two-leaf stage were inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* by cutting the roots with scalpel and then pouring a 10 mL-aliquot of the spore suspension in soil. The infected plants were incubated in humidity chamber at 25°C for 24 hours and then transferred to a growth room at 25°C with 12-hour light a day. After 4 weeks, disease severity of the seedlings was investigated on a scale of 0-5.

^xSeedlings of tomato cultivars at two-leaf stage were inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* by injuring the roots with 10-mL tip and pouring a 10 mL-aliquot of the spore suspension simultaneously. The infected plants were incubated in humidity chamber at 25°C for 24 hours and then transferred to a growth room at 25°C with 12-hour light a day. After 4 weeks, disease severity of the seedlings was investigated on a scale of 0-5.

^wEach value represents the mean disease index ± standard deviation of two runs with ten replications each. Values in the labeled with the same letter within columns are not significantly different in Duncan's multiple range test at $P=0.05$.

접종 농도와 재배 온도에 따른 토마토 시들음병 발생

Scalpel 방법을 이용하여 접종 농도와 접종 후 재배 온도에 따른 토마토 시들음병 발생 차이를 살펴보기 위하여, 5 × 8 연결 포트에서 자라는 2엽기 토마토 유묘에 1×10^7 과 1×10^8 conidia·mL⁻¹의 농도의 포자 현탁액을 10mL씩 접종하고 이를 25와 30°C 습실상에서 1일 동안 배양한 후 각각 25와 30°C 생육상에 옮겨 4주 동안 재배한 후에 발병도를 조사하였다.

Race 1에 저항성인 '도태랑마스터'는 KACC40043(race 2)와 TF104(race 3) 균주 모두에서 실험한 접종 농도나 재배 온도와 상관없이 4.0 이상의 높은 발병도를 나타내었다(Table 45). 그리고 race 2에 저항성인 '슈퍼선로드'는 KACC40043 균주에 대해서는 두 가지 조건에 상관없

이 0.2 이하의 낮은 발병도를 보여 고도의 저항성을 나타냈으며, TF104 균주에 의해 발병도 3.1 이상의 높은 시들음병 발생을 보였다. 이들 중 FOL을 1×10^7 conidia·mL⁻¹의 농도로 접종하고 25°C에서 재배한 처리구는 다른 처리구에 비하여 상대적으로 낮은 발병도를 나타냈지만 각 품종의 시들음병균에 대한 감수성과 저항성은 명확하게 구분되었다.

Table 45. Development of Fusarium wilt on two tomato cultivars according to incubation temperature and inoculum concentration^z.

Incubation temperature	Inoculum concentration (conidia·mL ⁻¹)	Isolate	Tomato cultivar	
			Dotaerangmaster	Supersunload
25°C	1×10^7	KACC40043	4.0 ± 0.6a ^b	0.0 ± 0.0b
		TF104	4.6 ± 0.2a	3.1 ± 0.7a
	1×10^8	KACC40043	4.2 ± 0.5a	0.1 ± 0.1b
		TF104	4.6 ± 0.4a	3.9 ± 0.5a
30°C	1×10^7	KACC40043	4.1 ± 0.4a	0.2 ± 0.3b
		TF104	4.5 ± 0.1a	4.2 ± 0.8a
	1×10^8	KACC40043	4.0 ± 0.6a	0.2 ± 0.0b
		TF104	4.9 ± 0.1a	4.2 ± 0.8a

^zSeeds of tomato cultivar were sown in 5 × 8 plastic cell tray and grown in green house at 25 ± 5°C. Seedlings of tomato cultivars at two-leaf stage were inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by cutting the roots with scalpel and then pouring a 10 mL-aliquot of the spore suspension in soil. The infected plants were incubated in humidity chamber at 25 and 30°C for 24 hours and then transferred to a growth room at 25 and 30°C, respectively with 12-hour light a day. After 4 weeks, disease severity of the seedlings was investigated on a scale of 0-5.

^yEach value represents the mean disease index ± standard deviation of two runs with ten replications each. Values in the labeled with the same letter within columns are not significantly different in Duncan's multiple range test at P=0.05.

기존의 토마토 시들음병에 대한 저항성 검정은 주로 1×10^6 부터 1×10^8 conidia·mL⁻¹사이의 포자 농도로 접종하고 20 - 30°C에서 재배하였다(Bournival et al., 1989; El Mohtar et al., 2007; Huang and Lindhout, 1997; Mes et al., 1999). 하지만 Park et al.(2012)은 토마토 품종의 시들음병 발생은 접종 후 20°C에서 재배하였을 때는 감수성 품종에서 시들음병 발생이 적어 중도 저항성 반응을 보이므로 20°C보다는 25 - 30°C에서 실험하는 것이 적합하다고 보고하였다. Scalpel 접종 방법을 이용한 본 실험에서 토마토 두 품종의 시들음병균들에 대한 저항성 정도는 실험한 접종 농도와 재배 온도에 상관없이 감수성과 저항성 반응을 보였다(Table 45). 하지만 접종원 준비를 고려하면 1×10^8 conidia·mL⁻¹보다는 1×10^7 conidia·mL⁻¹이 더 효율적이라

고 생각되었다. 따라서 scalpel 방법에 의한 토마토 품종의 시들음병에 대한 저항성 정도 조사는 1×10^7 conidia·mL⁻¹ 농도의 포자 현탁액을 10mL씩 접종하고 25 - 30°C에서 재배하는 것이 바람직할 것으로 생각되었다.

소면적 대량 유묘 검정을 위한 scalpel 검정 방법

5 × 8 연결 포트를 이용한 scalpel 방법 보다 공간적으로 더 효율적인 소면적 대량 유묘 검정 방법을 확립하기 위하여, 6 × 12 연결 포트에서 재배한 2엽기 토마토 유묘에 scalpel로 상처를 내고 1×10^7 과 1×10^8 conidia·mL⁻¹농도의 포자 현탁액을 5mL씩 접종한 후 이들을 25와 30°C 습실상에서 1일 동안 배양하고 각각 25와 30°C 생육상으로 옮겨 4주 동안 재배한 후 시들음병 발생을 조사하였다. 실험은 12반복으로 2회 실시하였다.

실험 1에서 FOL race 1에 저항성을 가진 ‘도태랑마스터’는 race 2인 KACC40043과 race 3인 TF104에서 접종 농도나 접종 후 재배 온도와 상관없이 3.6 이상의 높은 발병도를 나타내었다. 그리고 FOL race 2에 저항성인 ‘슈퍼선로드’는 KACC40043 균주에 대해서 조건에 상관없이 저항성을 보였다. 그리고 TF104 균주는 1×10^8 conidia·mL⁻¹의 농도로 접종하고 25와 30°C에서 재배하였을 때에는 4.0 이상의 높은 발병도를 나타내었지만, 1×10^7 conidia·mL⁻¹에서는 각각 1.9와 2.8의 낮은 시들음병 발병도를 나타내었다(Table 46). 반면에 실험 2에서는 ‘도태랑마스터’는 KACC40043과 TF104 균주에 접종 농도나 재배 온도와 상관없이 4.3 이상의 높은 감수성을 보였다. 뿐만 아니라 ‘슈퍼선로드’도 TF104에 대해 4.1 이상의 높은 발병도를 나타내었다(Table 46, Fig. 31). 물론 KACC40043 균주에 대해서는 조건에 관계없이 저항성 반응을 보였다.

앞의 5 × 8 연결 포트를 이용한 scalpel 방법과 달리 소면적 대량 검정을 위한 6 × 12 연결 포트를 이용한 본 실험은 두 번의 유묘 간에 차이를 보였다(Table 46). 그리고 토마토와 FOL 균주의 감수성 반응에서 5 × 8 연결 포트를 이용한 scalpel 방법보다 6 × 12 연결 포트를 이용한 방법에서 처리구 내 개체 간의 발병도 차이가 더 크음을 알 수 있다(Tables 45, 46). 그러나 저항성 반응은 두 방법 모두에서 고도의 저항성을 나타냈으며, 개체 간의 발병도 차이도 적었다.

기존의 토마토 시들음병의 저항성 검정을 위한 접종 방법은 대부분의 연구에서 root dip 후에 새로운 포트에 이식한 후 재배하여 시들음병 발병도를 조사하였다(Cai et al., 2003; Mes et al., 1999; Teunissen et al., 2003). 하지만 대량 유묘 검정에서 root dip 접종 방법은 시간 및 노동력이 많이 소요되는 어려움이 있다. 이를 해결하기 위한 본 연구에서 5 × 8 연결 포트를 이용한 scalpel 방법은 root dip 방법과 유사한 정도의 정확한 저항성 검정 결과를 제공하며, root dip 방법보다 접종 방법이 간단하고 효율적임을 알 수 있었다. 한편 6 × 12 연결 포트에서 재배한 토마토를 이용한 scalpel 방법은 실험 간에 그리고 반복 간에 다소 차이가 있으나 공간적으로 제약을 받는 대량 유묘 검정의 경우에 토마토 유묘의 감수성과 저항성을 간단히 검정 할 수 있는 효율적인 방법이라고 생각되었다.

Table 46. Development of Fusarium wilt on two tomato cultivars using mass-screening method^z.

Exp.	Cultivar	Isolate	25°C		30°C	
			1×10^{7y}	1×10^8	1×10^7	1×10^8
Exp. 1	Dotaerangmaster	KACC40043	3.8 ± 0.9^x	4.3 ± 1.0	4.0 ± 1.0	4.8 ± 0.6
		TF104	3.6 ± 1.4	4.3 ± 1.4	4.3 ± 1.0	5.0 ± 0.0
	Supersunload	KACC40043	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
		TF104	1.9 ± 2.1	4.0 ± 1.3	2.8 ± 2.0	4.8 ± 0.6
Exp. 2	Dotaerangmaster	KACC40043	4.3 ± 1.5	4.6 ± 1.0	4.8 ± 0.6	5.0 ± 0.0
		TF104	4.8 ± 0.6	4.3 ± 1.3	5.0 ± 0.0	4.9 ± 0.3
	Supersunload	KACC40043	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
		TF104	4.7 ± 0.8	4.1 ± 2.0	4.6 ± 0.7	4.6 ± 0.8

^zSeeds of tomato cultivar were sown in 6×12 plastic cell tray and grown in green house at $25 \pm 5^\circ\text{C}$. Seedlings of tomato cultivars at two-leaf stage were inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by cutting the roots with scalpel and then pouring a 5 mL-aliquot of the spore suspension in soil. The infected plants were incubated in humidity chamber at 25 and 30°C for 24 hours and then transferred to a growth room at 25 and 30°C , respectively with 12-hour light a day. After 4 weeks, disease severity of the seedlings was investigated on a scale of 0-5.

^ySpore concentration, conidia·mL⁻¹

^xEach value represents the mean disease index \pm standard deviation of twelve replications.

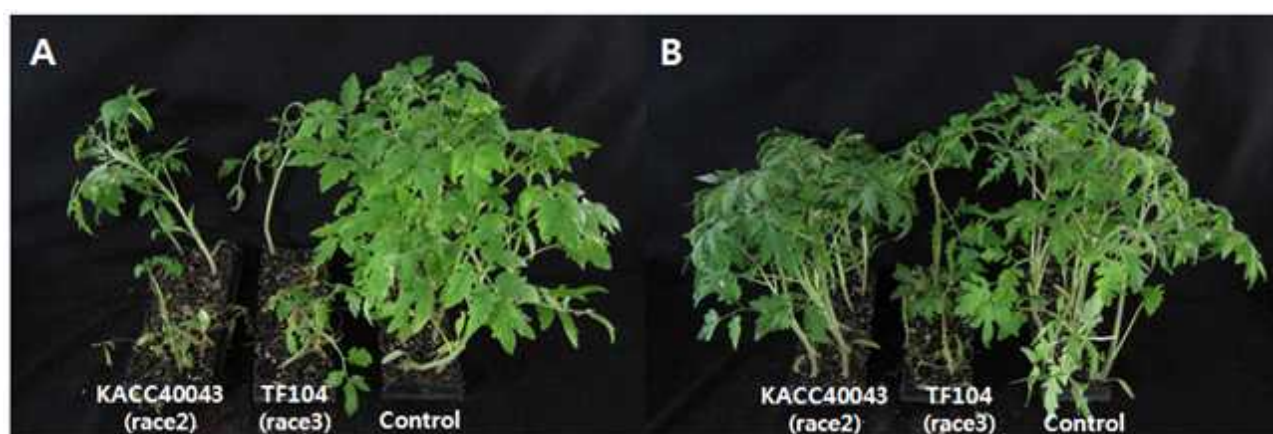


Fig. 31. Fusarium wilt development of tomato seedlings grown in 72-plastic cell tray. The plants were inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by cutting the roots with scalpel and then pouring a 5 mL-aliquot of spore suspension (1×10^7 conidia·mL⁻¹) in soil. The infected plants were incubated in humidity chamber at 25°C for 24 hours and then transferred to a growth room at 25°C with 12-hour light a day. A, Dotaerangmaster; B, Supersunload; Control, non-inoculated.

11. 박과 작물 탄저병 저항성 스크리닝 체계 확립

가. 효율적인 박과 작물 탄저병 저항성 스크리닝 체계 확립

(1) 서론

Colletotrichum spp.에 의한 탄저병은 채소 및 과수 등 다양한 작물에 발생하여 경제적으로 많은 손실을 일으키고 있다(Agrios, 2005). 대표적인 탄저병균으로는 *C. orbiculare*(Syn. *C. lagenarium*), *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *C. lindemuthianum* 및 *C. sublineolum* 등이 있다. 탄저병균은 작물 지상부의 거의 모든 부위를 침해할 수 있으며, 기주식물의 잎, 줄기, 과실 등에 병반을 형성하고 병이 진전되면 조직 괴사, 썩음, 가지 마름 등의 증상을 나타낸다. 박과 작물을 재배하는 지역에서 가장 심각한 병해 중 하나인 탄저병은 *C. orbiculare*에 의해 발생하며, 1867년 이탈리아에서 처음 발견되었다(Sherf and Macnab, 1986). 그 이후 유럽, 아시아, 북아메리카, 오스트레일리아 등에 발생하기 시작하여 현재에는 전 세계적으로 큰 피해를 주는 병으로 보통 따뜻하고 습기가 많은 곳에서 발생한다. 병원균의 분생포자는 습도가 높을 경우 잘 형성되고 비가 내릴 때 빗방울이 전염원이 되며 특히 장마철에 많이 발생한다(Agrios, 2005). 우리나라에서는 시설재배를 많이 하는 경남, 충남지역에 많이 발생하는 것으로 알려져 있다(Huh et al., 2010).

Goode(1958)는 *C. orbiculare*를 오이, 수박 및 호박 품종들에 대한 병원성에 따라 race 1, 2, 3으로 분류하였다. Race 1은 실험에 사용한 모든 오이 품종에 탄저병을 일으켰고, 수박 품종 중 'Charlestone Grey', 'Congo' 및 'Fairfax'에는 약한 병원성을, 그리고 호박 품종 'Butternut'은 중도저항성을 나타내었다. 이와 달리 race 2 병원균은 실험한 모든 수박과 오이 품종에서 강한 병원성을 보였고, 호박 품종 'Butternut'은 중도 저항성을 보였다. 그리고 race 3은 'Butternut'이 immune 반응을 보이는 것을 제외한 나머지 반응은 모두 race 1과 동일하였다. 그 이후에 Dutta et al.(1960)와 Jenkins et al.(1964)은 추가적인 품종들을 사용하여 race 4, 5, 6, 7을 보고하였다. 이들 중 race 1과 2가 가장 널리 분포하고 있으며 강한 병원성을 나타낸다(Sitterly, 1973). 그 이후에 수행한 DNA marker와 vegetative compatibility grouping(VCG) 등의 연구 결과는 이들 7개 race 구분과 일치하지 않았다. 그리고 *C. orbiculare* race 1에 대한 저항성 유전자는 race 3에 대한 저항성 유전자와 동일한 것이라고 보고되었다(Hall et al., 1960; Sherf and Macnab, 1986). 따라서 7개 race 보다는 2개 race 즉 오이와 멜론을 주로 감염하는 race 1(예전 race 1, 3)과 수박을 주로 침입하는 race 2(예전 race 2)로 구분하는 것이 바람직하다고 하였다(Sitterly and Keinath, 1996; Wasilwa et al., 1993).

박과작물 탄저병을 방제하기 위하여 무병 종자 재배 그리고 합성농약을 이용한 화학적 방제 등이 주로 사용되고 있으며, 외국에서는 저항성 품종을 재배하는 경우도 있다. 탄저병에 대한 합성 살균제의 방제 효과는 낮은 편이며 특히 방제 시기를 놓칠 경우 큰 피해를 주게 된다(Agrios, 2005). 그리고 환경 문제에 대한 관심이 증가하고 유기농산물에 대한 수요가 증가하면서 생물적 방제나 저항성 품종에 대한 관심이 높아지고 있다. 한편 경제, 사회적 측면에서 박과작물 탄저병에 대한 친환경적인 방제 방법은 저항성 품종을 재배하는 것이다. 하지만 우리나라에서는 탄저병에 저항성인 박과작물 품종이 거의 개발되어 있지 않다. 그리고 고추, 콩, 수수 등의 작물에서는 탄저병 저항성 유전자원 발굴, 저항성 유전 및 저항성 유전자 규명 연구가 활

발히 진행된 반면 박과작물 탄저병에 대한 연구는 거의 보고되지 않았다(AVRDC, 1999, 2003; Chala and Tronsmo, 2012; Goncalves-Vidigal et al., 2011, 2012; Kelly and Vallejo, 2004; Lee et al., 2010; Lee and Kim, 2012; Pakdeevaporn et al., 2005; Yoon et al., 2004).

본 연구는 우리나라 박과작물 시판 품종들의 탄저병에 대한 저항성 정도를 조사하고 그리고 탄저병 저항성 육종을 위한 재료를 확보하고자, 오이, 수박, 멜론, 참외 및 호박 등의 박과작물 112개 품종들의 *C. orbiculare*에 대한 저항성을 검정하였다.

(2) 재료 및 방법

식물 재배

시판 중인 참외 6개 품종, 수박 4개 품종, 호박 17개 품종, 멜론 27개 품종, 오이 36개 품종, 그리고 대목 22개 품종을 구입하여 실험에 사용하였다. 일회용 포트(직경 7.0cm, 200mL)에 원예용 상토 쭉쭉이(농우바이오사)를 넣고 각 품종의 종자를 1립씩 파종하여 온실(25 ± 5°C)에서 본엽이 전개되기 직전까지 재배하였다. 그리고 이후에는 흰가루병 감염을 회피하기 위하여 25°C 생육상으로 이동하여 하루에 12시간씩 광을 조사하면서 재배하였다. 각 품종의 유묘를 2-3엽기까지 재배한 후에 접종 실험에 사용하였다. 각 실험에는 이병성 대조 품종으로 '백미백다다기오이'(동부한농)를 포함하여 실험하였다.

접종원 준비

박과작물 탄저병을 일으키는 *C. orbiculare*는 농업과학기술원 한국농업미생물자원센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)로부터 분양받은 KACC 40809 균주를 사용하여 실험하였다. KACC 40809 균주의 균사조각을 potato dextrose agar(Becton, Dickinson and Co.) 배지 중앙에 올려놓아 접종하고, 25°C에서 5일 동안 배양하여 포자를 형성하였다. 배양한 탄저병균 plate에 차가운 멸균수(4°C)를 넣고 멸균한 붓으로 포자를 수확하였으며, 균사를 제거하기 위하여 2겹의 가제로 여과하여 포자현탁액을 준비하였다(Wasilwa et al., 1993). 그리고 광학현미경 하에서 hemocytometer를 이용하여 포자 수를 조사하고 멸균수로 희석하여 포자 농도가 4.0×10^5 spores·mL⁻¹가 되도록 조정하여 접종원으로 사용하였다. 탄저병균이 유묘에 부착하는데 도움을 주기 위하여 준비한 포자현탁액에 Tween 20을 250µg·mL⁻¹ 농도가 되도록 첨가하였다.

접종 및 병조사

2-3엽기의 박과작물 유묘에 *C. orbiculare*의 포자현탁액을 흘러내리기 직전까지 분무하여 접종한 후, 25°C 습실상에서 암상태로 48시간 동안 배양하였다. 습실처리한 유묘는 항온항습실(25°C, 상대습도 80%)로 이동하여 하루에 12시간씩 광을 처리하며 재배하여 탄저병 발생을 유도하였다. 접종 9-11일 후에 각 유묘의 본엽 1엽의 발병 정도를 조사하였다. 발병도 조사는 0 = 건전, 1 = 1-10%의 병반면적율, 2 = 11-20%의 병반면적율, 3 = 21-50%의 병반면적율, 4 = 51-75%의 병반면적율, 5 = 76-90%의 병반면적율, 6 = 90% 이상의 병반면적율 등 7단계로 하였으며, 평균 발병도가 1.0 이하인 경우에는 저항성, 1.0 초과 2.5 이하는 중도저항성, 2.5 초과는 감수성으로 판정하였다(Wasilwa et al., 1993). 그리고 모든 실험은 3반복씩 2회 실시하였다.

(3) 결과 및 고찰

오이 품종들의 탄저병 저항성

*C. orbiculare*에 대한 오이 36개 품종의 저항성을 실험한 결과, 6개 품종은 중도저항성을 그리고 30개 품종은 감수성을 보였다(Table 47). 탄저병 저항성 품종으로 시판되었던 ‘아시아스트라이크’는 중도저항성을 나타내었으며, 그 외에 ‘서포트’, ‘통일백다다기’, ‘대선오이’, ‘청록맛짱’, ‘녹야청청’ 및 ‘아시아노각’ 등은 저항성 중도저항성을 보였다(Table 1). 그러나 실험한 36개 품종 중 탄저병(*C. orbiculare*)에 대하여 고도의 저항성을 나타내는 품종은 없었다. 탄저병에 저항성인 오이 계통으로 8개의 PI 라인이 보고되었는데, 1개 우성 유전자에 의한 저항성을 가지는 PI 175120, PI 179676, PI 183305, PI 183445, PI 63213, 그리고 1개 유전자 이상이 관여하는 것으로 알려진 partial dominance 저항성을 가지는 PI 197087, 다양한 유전자에 의한 저항성을 가진 PI 163217 및 변이 유전자 저항성인 PI 175111 등이다(Sherf and Macnab, 1986). 그리고 최근에는 *C. orbiculare* race 1, 2 및 3에 저항성인 오이 품종이 개발되었다(Sitterly and Keinath, 1996).

Table 47. Resistance degree of 36 commercial cultivars of cucumber to *Colletotrichum orbiculare*².

Cultivar	Scientific name	Disease index	Response
Asiastrike	<i>Cucumis sativus</i>	1.7 ± 0.6 ^y	MR ^x
Daeseon	<i>Cucumis sativus</i>	2.0 ± 0.0	MR
Tongilbaedadagi	<i>Cucumis sativus</i>	2.0 ± 0.0	MR
Asianogak	<i>Cucumis sativus</i>	2.3 ± 0.6	MR
Cheongrokmatjjang	<i>Cucumis sativus</i>	2.3 ± 1.2	MR
Nokyacheongcheong	<i>Cucumis sativus</i>	2.3 ± 0.0	MR
Hodongcheongjang	<i>Cucumis sativus</i>	2.7 ± 0.6	S
MiinBaekdadagi	<i>Cucumis sativus</i>	2.7 ± 0.6	S
Singsingbaekdadagi	<i>Cucumis sativus</i>	2.7 ± 0.6	S
Welbeingmatjjang	<i>Cucumis sativus</i>	2.7 ± 0.6	S
Asiacheongjang	<i>Cucumis sativus</i>	3.0 ± 1.0	S
Dragonsamcheok	<i>Cucumis sativus</i>	3.0 ± 0.0	S
Euncheonbaekdadagi	<i>Cucumis sativus</i>	3.0 ± 1.0	S
Glorysamcheok	<i>Cucumis sativus</i>	3.0 ± 0.0	S
Hanseongbaekdadagi	<i>Cucumis sativus</i>	3.0 ± 1.0	S
Ildongcheongjang	<i>Cucumis sativus</i>	3.0 ± 0.0	S
Asiaunchun	<i>Cucumis sativus</i>	3.3 ± 0.6	S
Eunmieseun	<i>Cucumis sativus</i>	3.3 ± 0.6	S

Guwolbanbaek	<i>Cucumis sativus</i>	3.3 ± 0.6	S
Nakdongcheongjang	<i>Cucumis sativus</i>	3.3 ± 1.5	S
Gyedaebaekgwa	<i>Cucumis sativus</i>	3.7 ± 2.1	S
Haneulbaekdadagi	<i>Cucumis sativus</i>	3.7 ± 0.6	S
Mujinjang	<i>Cucumis sativus</i>	3.7 ± 1.2	S
Baekchimmatjjang	<i>Cucumis sativus</i>	4.0 ± 1.7	S
Nebakja	<i>Cucumis sativus</i>	4.0 ± 2.0	S
Odaebaekdadagi	<i>Cucumis sativus</i>	4.0 ± 1.0	S
Cheonghwaheukjinju	<i>Cucumis sativus</i>	4.3 ± 1.2	S
Shinjeongpung	<i>Cucumis sativus</i>	4.3 ± 0.6	S
Nodajibaekdadagi	<i>Cucumis sativus</i>	4.7 ± 0.6	S
Minisayeop	<i>Cucumis sativus</i>	4.7 ± 0.6	S
Reoseuboy	<i>Cucumis sativus</i>	4.7 ± 2.3	S
Shinsedae	<i>Cucumis sativus</i>	4.7 ± 0.6	S
Wolhasamcheok	<i>Cucumis sativus</i>	5.3 ± 0.6	S
Heukryongsamcheok	<i>Cucumis sativus</i>	6.0 ± 0.0	S
Jeongseonsamcheok	<i>Cucumis sativus</i>	6.0 ± 0.0	S
Jungboksamcheok	<i>Cucumis sativus</i>	6.0 ± 0.0	S
BaekmiBaekdadagi	<i>Cucumis sativus</i>	2.6 ± 0.9	S

^zSeedlings of cucumber cultivars at 2- to 3-leaf stage were inoculated with *C. orbiculare* KACC 40809 by spraying spore suspension of the fungus at a concentration of 4.0×10^5 spores·mL⁻¹. The inoculated plants were incubated in a dew chamber at 25°C for 48 h and then transferred to growth chamber (25°C, RH 80%). After 9–11 days, disease severity of the plants (the first true leaf) was investigated on a scale of 0–6 (0 = healthy, 1 = 1–10%, 2 = 11–20%, 3 = 21–50%, 4 = 51–75%, 5 = 76–90%, 6 = 90% over).

^yEach value represents the mean (± standard deviation) of two runs with 3 replicates each.

^xResistance response, R = resistant (disease index ≤ 1.0), MR = moderately resistant (1.0 < disease index ≤ 2.5), S = susceptible (disease index > 2.5).

수박 품종들의 탄저병 저항성

탄저병(*C. orbiculare*)에 대한 수박 4품종(‘꼬꼬마’, 서태자꿀, ‘설강102’ 및 ‘스마트꿀’)의 저항성을 실험한 결과, 실험한 모든 품종은 6.0의 높은 발병도를 보여 고도의 감수성임을 알 수 있었다(Table 48). 농업유전자원으로부터 분양 받은 *C. orbiculare* KACC 40809 균주는 수박에서 분리하였고, 본 연구에서 실험한 대부분의 수박과 오이 품종에서 감수성을 그리고 호박 품종에는 중도저항성을 보이므로 race 2로 추정되나(Goode, 1958; Sitterly and Keinath, 1996), 이를 위해서는 Goode(1958)이 제시한 수박 품종 ‘Charlestone Grey’, ‘Congo’ 및 ‘Fairfax’에서의

저항성 여부를 확인하는 것이 필요하다.

Table 48. Resistance degree of 17 commercial cultivars of squash and 4 commercial cultivars of watermelon to *Colletotrichum orbiculare*^z.

Cultivar	Scientific name	Disease index	Response
Gammirak	<i>Cucurbita maxima</i>	1.0 ± 0.4 ^y	R ^x
Teotbat	<i>Cucurbita moschata</i>	1.0 ± 0.0	R
Danbiseu	<i>Cucurbita maxima</i>	1.3 ± 0.2	MR
Hanson	<i>Cucurbita maxima</i>	1.3 ± 0.0	MR
Crocodile	<i>Cucurbita maxima</i>	1.4 ± 0.5	MR
Hwanggeum	<i>Cucurbita maxima</i>	1.4 ± 1.9	MR
Bomul	<i>Cucurbita maxima</i>	1.7 ± 0.5	MR
Gurijiwang 10	<i>Cucurbita maxima</i>	1.7 ± 0.9	MR
Jindong	<i>Cucurbita moschata</i>	1.7 ± 0.9	MR
Supergeumbiseu	<i>Cucurbita maxima</i>	1.7 ± 0.9	MR
Green	<i>Cucurbita moschata</i>	1.9 ± 1.2	MR
Heukjong	<i>Cucurbita ficifolia</i>	2.0 ± 1.0	MR
Ajiguri 10	<i>Cucurbita maxima</i>	2.5 ± 3.5	MR
Baekbi	<i>Cucurbita maxima</i>	2.5 ± 1.7	MR
Ajjimang	<i>Cucurbita maxima</i>	2.7 ± 0.5	S
Kinka	<i>Cucurbita moschata</i>	2.7 ± 2.3	S
Mannyang	<i>Cucurbita maxima</i>	3.4 ± 0.9	S
Kokoma	<i>Citrullus lanatus</i>	6.0 ± 0.0	S
Seolgang 102	<i>Citrullus lanatus</i>	6.0 ± 0.0	S
Seotajaggul	<i>Citrullus lanatus</i>	6.0 ± 0.0	S
Smartggul	<i>Citrullus lanatus</i>	6.0 ± 0.0	S
Baekmibaekdadagi	<i>Cucumis sativus</i>	2.9 ± 0.6	S

^zSeedlings of cucumber cultivars at 2- to 3-leaf stage were inoculated with *C. orbiculare* KACC 40809 by spraying spore suspension of the fungus at a concentration of 4.0×10^5 spores·mL⁻¹. The inoculated plants were incubated in a dew chamber at 25°C for 48 h and then transferred to growth chamber (25°C, RH 80%). After 9–11 days, disease severity of the plants (the first true leaf) was investigated on a scale of 0–6 (0 = healthy, 1 = 1–10%, 2 = 11–20%, 3 = 21–50%, 4 = 51–75%, 5 = 76–90%, 6 = 90% over).

^yEach value represents the mean (± standard deviation) of two runs with 3 replicates each.

^xResistance response, R = resistant (disease index ≤ 1.0), MR = moderately resistant (1.0 < disease index ≤ 2.5), S = susceptible (disease index > 2.5).

Winstead et al.(1959)는 수박 86개 품종의 *C. orbiculare* race 1, 2, 3에 대한 저항성을 검정한 결과, 75개 품종은 3개 race 모두에 감수성을 보였으며 Black Kleckley, Blackstone,

Charlestone Gray, Congo, Fairfax, Georgia No 4, Hope Diamond, NC-20, NC-21 및 NC-22 등 10개 품종은 race 1과 3에는 저항성을 그리고 race 2에는 감수성을 보였다. 그리고 Jenkins et al. (1964)도 Winstead et al.(1959)와 마찬가지로 *C. orbiculare* race 1에 저항성을 보이는 유전자원은 모두 race 3에도 저항성을 보이거나 race 2에는 감수성이었다고 하였다. 그러나 Rhodes(1979)는 라인 R143이 *C. orbiculare* race 2에 대한 저항성을 가진다는 것을 발견하였고, 그 후 race 2에 저항성인 PI 라인들(270550, 326515, 271775, 271779, 203551, 299379 및 189225)이 보고되었다(Sowell et al., 1980; Suvanprakorn and Norton, 1980). 또 Boyhan et al.(1994)는 76개의 PI 라인 및 품종을 대상으로 저항성을 평가하여 race 2에 저항성을 가지는 PI 512385를 선발하였다. 그러나 지금까지 개발된 탄저병 저항성인 몇 가지 품종들은 race 1과 3에 저항성을 보이는 것이었다(Jenkins et al., 1964; Sitterly and Keinath, 1996; Winstead et al., 1959). 우리나라에서 Huh et al.(2010)은 race 1과 3에 강한 저항성이고 race 2에는 중도저항성인 중생종 수박 ‘한결’을 육성하였다고 보고한 바 있다.

호박 품종들의 탄저병 저항성

Cucurbita 속에는 27개 종이 있으나 재배가 가능한 호박은 *Curcubita moschata*(동양종 호박), *C. maxima*(서양종 호박), *C. pepo*(폐포종 호박), *C. mixta*(잡종 호박) 및 *C. ficifolia*(흑종 호박) 등 5종이 있다. 본 연구에서는 시중에서 구입한 *C. moschata* 4종, *C. maxima* 12종 그리고 *C. ficifolia* 1종 등 17개 품종의 *C. orbiculare*에 대한 저항성 정도를 조사하였다. *C. moschata* 중 ‘텃밭꽃호박’은 저항성을 나타내었고, ‘진동에호박’과 ‘그린애호박’은 중도저항성을 그리고 ‘킹카애호박’은 감수성을 나타내었다(Table 2). *C. maxima*는 ‘감미락단호박’만이 저항성을 나타내었고, ‘단비스단호박’, ‘한손’, ‘크로커다일단호박’, ‘황금단호박’, ‘슈퍼금비스단호박’, ‘보물단호박’, ‘구리지왕10밤호박’, ‘백비단호박’ 및 ‘아지구리10밤호박’은 중도저항성을 그리고 ‘아지지방밤호박’과 ‘만냥단호박’은 감수성을 나타내었다. ‘흑종호박’은 중도저항성을 나타내었다(Table 48). 이상의 결과로부터 호박 품종들은 다른 박과작물에 비하여 낮은 발병도를 나타내며, 호박 종류에 따른 탄저병 저항성 차이는 없는 것으로 생각되었다.

참외 및 멜론 품종들의 탄저병 저항성

참외와 멜론은 식물학적으로는 같은 종이나, 동양의 기후 조건에 적응하여 분화된 품종을 참외 또는 동양종 멜론이라고 하여 서양에서 진화한 멜론과 구분한다. 참외 6개 품종과 멜론 27개 품종의 탄저병(*C. orbiculare*)에 대한 저항성을 실험한 결과, 모든 품종은 감수성을 나타냈다(Table 49). 하지만, 실험한 품종 중 ‘세지오케이’를 제외한 모든 품종은 5.1 이상의 높은 발병도를 나타내었으나, ‘세지오케이’는 3.3의 상대적으로 낮은 발병도를 나타내었다. 멜론 유전자원 중 탄저병에 대한 저항성 유전자원이 아직 보고된 바 없으므로, 저항성 참외 및 멜론 품종 개발을 위한 저항성 육종 소재의 발굴이 필요한 실정이다(Sitterly and Keinath, 1996).

Table 3. Resistance degree of 27 commercial cultivars of melon (*Cucumis melo*) and 6 commercial cultivars of oriental melon (*C. melo* var. *makuwa*) to *Colletotrichum orbiculare*^z.

Cultivar	Scientific name	Disease index	Response
Sejiokay	<i>Cucumis melo</i>	3.3 ± 2.3 ^y	S ^x
Myeongpumkkul	<i>C. melo</i> var. <i>makuwa</i>	5.1 ± 0.9	S
Munsu (136)	<i>Cucumis melo</i>	5.3 ± 1.2	S
Joeundae	<i>C. melo</i> var. <i>makuwa</i>	5.8 ± 0.4	S
Gaeguri	<i>C. melo</i> var. <i>makuwa</i>	6.0 ± 0.0	S
Geumbat	<i>C. melo</i> var. <i>makuwa</i>	6.0 ± 0.0	S
Geumsang	<i>C. melo</i> var. <i>makuwa</i>	6.0 ± 0.0	S
Geumje	<i>C. melo</i> var. <i>makuwa</i>	6.0 ± 0.0	S
Aseajochunmanchu	<i>Cucumis melo</i>	6.0 ± 0.0	S
Aseaseongha	<i>Cucumis melo</i>	6.0 ± 0.0	S
Asiabaekgeum	<i>Cucumis melo</i>	6.0 ± 0.0	S
Asiahwanggeum	<i>Cucumis melo</i>	6.0 ± 0.0	S
Asiapapaya	<i>Cucumis melo</i>	6.0 ± 0.0	S
Betarich	<i>Cucumis melo</i>	6.0 ± 0.0	S
E.ultra (102)	<i>Cucumis melo</i>	6.0 ± 0.0	S
Earl'selite	<i>Cucumis melo</i>	6.0 ± 0.0	S
Earl'sellesse	<i>Cucumis melo</i>	6.0 ± 0.0	S
Earl'sgoldking	<i>Cucumis melo</i>	6.0 ± 0.0	S
Earl'shappyy	<i>Cucumis melo</i>	6.0 ± 0.0	S
Earl'sking	<i>Cucumis melo</i>	6.0 ± 0.0	S
Earl'smounthagye	<i>Cucumis melo</i>	6.0 ± 0.0	S
Earl'sparty	<i>Cucumis melo</i>	6.0 ± 0.0	S
Earl'stopone	<i>Cucumis melo</i>	6.0 ± 0.0	S
Earl'sVIP	<i>Cucumis melo</i>	6.0 ± 0.0	S
Eolrookpapaya	<i>Cucumis melo</i>	6.0 ± 0.0	S
Ipchundaegil	<i>Cucumis melo</i>	6.0 ± 0.0	S
JangchunFR-Papaiya	<i>Cucumis melo</i>	6.0 ± 0.0	S
Jjonetop	<i>Cucumis melo</i>	6.0 ± 0.0	S
Redqueen	<i>Cucumis melo</i>	6.0 ± 0.0	S
Reisor	<i>Cucumis melo</i>	6.0 ± 0.0	S
Shinpumjong (143)	<i>Cucumis melo</i>	6.0 ± 0.0	S
Summercool	<i>Cucumis melo</i>	6.0 ± 0.0	S
Superseji	<i>Cucumis melo</i>	6.0 ± 0.0	S
Baekmibaekdadagi	<i>Cucumis sativus</i>	3.3 ± 1.6	S

^zSeedlings of cucumber cultivars at 2- to 3-leaf stage were inoculated with *C. orbiculare* KACC 40809b by spraying spore suspension of the fungus at a concentration of 4.0×10^5 spores·mL⁻¹. The inoculated plants were incubated in a dew chamber at 25°C for 48 h and

then transferred to growth chamber (25°C, RH 80%). After 9–11 days, disease severity of the plants (the first true leaf) was investigated on a scale of 0–6 (0 = healthy, 1 = 1–10%, 2 = 11–20%, 3 = 21–50%, 4 = 51–75%, 5 = 76–90%, 6 = 90% over).

^yEach value represents the mean (\pm standard deviation) of two runs with 3 replicates each.

^xResistance response, R = resistant (disease index \leq 1.0), MR = moderately resistant (1.0 < disease index \leq 2.5), S = susceptible (disease index > 2.5).

대목 품종들의 탄저병 저항성

우리나라에서 박과작물의 덩굴쪄김병과 뿌리썩음병을 방제하기 위하여 사용하는 대목 품종들은 대부분 박(*Lagenaria* spp.)이나 호박(*Curcubita* spp.)이다. 구입한 22종 대목의 *C. orbiculare*에 대한 저항성을 검정한 결과, 오이에 접목하기 위한 4개 대목 품종 중 ‘눈부셔’ ‘유니콘’ 및 ‘쓰야끼EX’는 저항성을 나타내었고, ‘슈퍼흑종’은 감수성 반응을 보였다(Table 50). 수박용 6개 대목 품종 중 ‘내병토좌’는 중도저항성을 나타내었으나, ‘FR보디가드’외 4종은 감수성을 나타내었다. 그리고 참외를 위한 대목 품종 5개 중 ‘RS111’, ‘강근토좌’ 및 ‘황제토좌’는 저항성을 보였고, ‘아시아신토좌’와 ‘중토좌’는 중도저항성을 보였다. 그리고 여러 박과작물에 사용하기 위한 대목 품종 7종 중에 ‘NO.8’, ‘신토좌’, ‘불패토좌’ 및 ‘뉴타입’은 저항성을, ‘서포트’는 중도저항성을, 그리고 ‘FR루트파워’와 ‘FR히어로’는 감수성을 나타냈다(Table 4). 이들 결과로부터 ‘쓰야끼EX’, ‘눈부셔’, ‘유니콘’, ‘RS111’, ‘강근토좌’, ‘황제토좌’, ‘NO.8’, ‘신토좌’, ‘불패토좌’ 및 ‘뉴타입’ 등의 10개 대목 품종은 탄저병 저항성 육종을 위한 중요한 유전자원으로 이용할 수 있을 것이라 생각되었다.

고추 탄저병을 일으키는 *C. acutatum*과 *C. gloeosporioides*는 우리나라에서 고추의 수량과 품질에 가장 많은 영향을 주는 병원균이다(Park and Kim, 1992). *C. chinense* ‘PBC932’와 *C. baccatum* ‘PBC80’과 ‘PBC81’이 저항성을 가지고 있는 유전자원으로 알려져 있고(AVRDC 1999, 2003; Pakdeevanaporn, 2005; Yoon et al., 2004), *C. baccatum*에 속한 ‘Aji Limon’과 *C. baccatum* var. *pendulum* 3–4도 고추 탄저병에 저항성인 것으로 보고되었다(Lee et al., 2010; Lee and Kim, 2012). 한편 강낭콩에 탄저병을 일으키는 *C. lindemuthianum*에 대한 저항성 유전자는 기주 특이적인 단일 우성 유전자로 gene-for-gene 개념에 따른 HR 반응과 관련되어 있으며, 총 19개의 저항성 유전자가 보고되어 있다(Goncalves-Vidigal et al., 2011, 2012; Kelly and Vallejo, 2004). *C. sublineolum*은 수수에 탄저병을 일으키는 병원균으로, Chala and Tronsmo(2012)는 2007년과 2008년 포장실험을 통해 56개 에티오피아 수수에서 두 해 모두 저항성을 보인 6개 유전자원을 선발하였다. 하지만 우리나라의 박과작물 자원 및 품종들의 *C. orbiculare*에 대한 저항성 정도는 거의 보고되지 않았다.

Table 50. Resistance degree of 22 commercial cultivars of rootstock to *Colletotrichum orbiculare*^z.

Crop	Cultivar	Scientific name	Disease index	Response	
Cucumber	Nunbusyeo	<i>Cucurbita moschata</i>	1.0 ± 0.0 ^y	R ^x	
	Union	<i>Cucurbita moschata</i>	1.0 ± 0.0	R	
	JjeuyakaEX	-	1.0 ± 0.0	R	
	Superheukjong	-	3.0 ± 1.0	S	
Watermelon	Naebyeongtoza	-	1.2 ± 0.2	MR	
	FR-bodyguard	<i>Lagenaria siceraria</i>	5.4 ± 0.9	S	
	ShinFR-bulsajo	-	5.4 ± 0.9	S	
	Daeryeok 3 ho	<i>Lagenaria siceraria</i>	6.0 ± 0.0	S	
	FR-hongsam	<i>Lagenaria leucantha</i>	6.0 ± 0.0	S	
	FR-seotaja	<i>Lagenaria siceraria</i>	6.0 ± 0.0	S	
	Oriental melon	RS111	-	0.3 ± 0.6	R
		Ganggeuntoza	<i>Cucurbita</i> sp.	0.9 ± 0.2	R
Hwangjaetoza		<i>Lagenaria siceraria</i>	0.9 ± 0.2	R	
Asiashintoza		<i>Cucurbita</i> sp.	1.1 ± 0.2	MR	
Jungtoja		<i>Lagenaria siceraria</i>	1.2 ± 0.2	MR	
Cucurbits	NO.8	<i>Cucurbita moschata</i>	0.3 ± 0.6	R	
	Shintoza	<i>Cucurbita mixta</i>	0.9 ± 0.2	R	
	Bulpaetoza	<i>Lagenaria siceraria</i>	1.0 ± 0.0	R	
	Newtype	<i>Lagenaria siceraria</i>	1.0 ± 0.0	R	
	Support	<i>Lagenaria siceraria</i>	1.3 ± 0.6	MR	
	FR-root power	<i>Lagenaria siceraria</i>	5.4 ± 0.9	S	
	FR-hero	<i>Lagenaria siceraria</i>	6.0 ± 0.0	S	
		Baekmibaekdadagi	<i>Cucumis sativus</i>	3.0 ± 1.4	S

^zSeedlings of cucumber cultivars at 2- to 3-leaf stage were inoculated with *C. orbiculare* KACC 40809 by spraying spore suspension of the fungus at a concentration of 4.0×10^5 spores·mL⁻¹. The inoculated plants were incubated in a dew chamber at 25°C for 48 h and then transferred to growth chamber (25°C, RH 80%). After 9–11 days, disease severity of the plants (the first true leaf) was investigated on a scale of 0–6 (0 = healthy, 1 = 1–10%, 2 = 11–20%, 3 = 21–50%, 4 = 51–75%, 5 = 76–90%, 6 = 90% over).

^yEach value represents the mean (± standard deviation) of two runs with 3 replicates each.

^xResistance response, R = resistant (disease index ≤ 1.0), MR = moderately resistant (1.0 < disease index ≤ 2.5), S = susceptible (disease index > 2.5).

나. 채집한 박과 탄저병 병원균 분리 및 병원성 실험

(1) 재료 및 방법

(가) 채집한 박과탄저병 병원균 분리

대전광역시 유성구 교촌동, 노은동 부근에서 채집한 탄저병에 감염된 박과작물(오이, 수박, 참외, 호박)에서 이병조직을 채집하였다. 채취한 시료는 멸균된 가위로 가로, 세로가 5 mm 이 되도록 잘라준 후, 1% NaOCl 용액에 1분과 100% ethanol에 30초간 표면 소독 후 streptomycin 100 µg/ml이 첨가된 PDA배지에 5조각씩 치상하였다. 27°C incubator에서 5일간 배양하며 탄저병균으로 생각되는 균주를 분리하였다.

(나) 균주 동정

특이적 프라이머를 이용한 *Colletotrichum*균주의 동정

Thang 등(2006)이 보고한 *C. orbiculare*에 특이적인 primer를 이용하여 분리 균주들을 동정하기 위하여 PCR을 수행하였다. 대조균주로는 스크리닝 실험에서 사용하고 있는 *Colletotrichum coccodes*를 이용하여 비교를 하였다. 분리한 DNA(10ng)을 PCR-프리믹스(PCR-premix; iNtRON Biotechnology, Korea)와 혼합하여 *C. orbiculare*에 특이적인 primer인 RB(5'-GCTGTCACCTTTGTGGTGTG-3'), RC(5'-TGTCGTAGCCCATCTTGTC-3') 프라이머를 이용하여 PCR 증폭하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 pre-denaturation 시킨 후, 95°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분 extension하여 총 35 cycle 실시하였으며 최종 denaturation는 72°C에서 10분으로 하였다. PCR product는 1% agarose gel에서 전기영동하여 ethidium bromide로 염색하여 UV로 확인하였다.

ITS 영역의 염기서열을 이용한 *Colletotrichum*균주의 동정

*Colletotrichum*균주의 ITS 영역의 염기서열을 얻기 위하여 PDA배지에서 배양한 균주의 균사로부터 DNA를 분리한 후, PCR-프리믹스(PCR-premix; iNtRON Biotechnology, Korea)와 혼합하여 ITS 5(5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') 및 ITS 4(5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') 프라이머를 이용하여 ITS 영역을 증폭하였다. 상기 증폭된 PCR 산물을 위저드 PCR 프랩 키트(Wizard PCR prep kit; Promega, medison, WI, USA)를 사용하여 정제한 후, 마크로젠(Seoul, Korea)에 의뢰하여 염기서열을 얻었다. 염기서열은 NCBI의 BLAST를 이용하여 GenBank 데이터베이스와 염기서열을 비교하였다. CLUSTAL X로 염기서열을 정렬하고, PHYDIT 프로그램 버전 3.0을 사용하여 neighbour-joining tree를 작성하였다.

(다) 분리한 *C. orbiculare*의 병원성

접종원 준비 및 접종

박과작물에 탄저병을 일으키는 *C. orbiculare* KACC 40809균주와 분리한 12균주를 PDA배지에 접종하고 25°C에서 5일 동안 배양하였다. 배양된 균주에 차가운 멸균수(4°C)를 이용하여 포자를 수확하여 2점의 거즈로 이용하여 균사체를 제거 후 광학현미경 하에서 혈구측정계를 이용하여 포자수를 측정하여 Tween 20 수용액 250 µg/ml을 이용하여 4.0×10^5 spores/ml로 희석하였고, 포자 형성이 적은 C1-1, C5, C6, C8, C10균주는 농도를 8.0×10^4 spores/ml로 희석하여 접종원을 준비하였다.

병원균 접종

분리한 균주들의 오이에 대한 병원성 실험을 위해 백미백다다기오이(동부한농)를 200 ml 음료수 컵에 원예용상토 쭉쭉이(농우바이오)를 넣고 파종하여 온실(25 ± 5°C)에서 흰가루병 전염을 예방하기 위해 떡잎이 나오는 시점까지만 온실에서 재배한 후, 접종 전까지는 실내 25°C 항온항습실에서 하루에 12시간 광을 조사하면서 재배하며 2~3엽기의 유묘를 사용하였다. 포자 현탁액을 본엽이 충분히 젖을 때까지 분무 접종을 한 후 48시간 동안 25°C 습실상에서 배양한 후 항온항습실(25°C, 상대습도 80%)로 이동하여 하루에 12시간씩 광을 처리하며 발병을 유도하였다. 접종 9일 이후 발병도를 조사하였다. 실험은 3반복씩 2회 실시하였다.

분리한 균주의 race 검정

현재 시판중인 호박품종 중에서 박과탄저병에 대해 저항성이 높았던 품종 단비스단호박, 감미락단호박, 한손(미니단호박), 크로커다일단호박 등 총 4종과 수박 품종으로 설강 102, FR서태자(대목), 스마트꿀수박 등 총 3 품종을 선발하였고, 분리한 균주 중 채집한 곳이 다른 C1-1, C7, C10균주와 대조 균주로 KACC 40809의 포자현탁액을 2.0×10^4 와 8.0×10^4 spores/ml로 희석하여 이전에 설명한 방법으로 race 검정을 실시하였다. 분리한 균주들의 race 검정을 위하여 수박 품종으로 설강 102, FR서태자(대목), 스마트꿀수박 등 총 3 품종에 대하여 병원성을 검정하였다.

발병 및 병조사

박과탄저병의 병 조사는 각각 잎의 병반 면적율을 조사하였다. 발병도는 0 = 건전, 1 = 1-10% 감염, 2 = 11-20% 감염, 3 = 21-50% 감염, 4 = 51-75% 감염, 5 = 76-90% 감염, 6 = 90% 이상 감염 등 7단계로 하였으며, 실험은 3반복씩 1~2회 실시하였다.

(2) 결과 및 고찰

(가) 균주 분리 및 동정

박과작물의 이병 조직으로 125균주를 분리하였고, 배양적 특징을 바탕으로 *Colletotrichum*속으로 생각되는 12균주를 분리하였다(Table 51). 분리한 균주들을 *C. orbiculare* 특이적인 프라이머를 이용하여 동정한 결과 *C. orbiculare*에 종 특이적인 216 bp의 밴드를 얻을 수 있었다(Fig. 32). 이들 균주들 가운데 포자 형성이 잘 되는 C1-1, C8, C10균주를 선발하여 ITS 영역의 염기서열을 분석한 결과 서로간에 염기서열이 일치하였고, 기존에 보고되어진 *C. orbiculare* MAFF 306589와 같은 그룹을 형성하고 세 균주는 *C. orbiculare* MAFF 306589와 각각 99.8%의 유사성을 보였다(Fig. 33). 따라서 대전광역시 유성구 노은동, 교촌동에서 채집한 박과작물에서 분리된 12균주는 모두 *C. orbiculare*임을 알 수 있었다.

Table 51. Isolates used in this study

Isolate	Origin	
	Host	Location
C1	Cucumber (leaf)	Gyochon-dong, Daejeon
C1-1	Cucumber (leaf)	Gyochon-dong, Daejeon
C2	Cucumber (leaf)	Noeun-dong, Daejeon
C3	Cucumber (leaf)	Noeun-dong, Daejeon
C4	Cucumber (leaf)	Noeun-dong, Daejeon
C5	Cucumber (leaf)	Noeun-dong, Daejeon
C6	Cucumber (leaf)	Noeun-dong, Daejeon
C7	Cucumber (leaf)	Noeun-dong, Daejeon
C8	Cucumber (leaf)	Noeun-dong, Daejeon
C10	Cucumber (leaf)	Noeun-dong, Daejeon
C11	Cucumber (leaf)	Noeun-dong, Daejeon
C12	Cucumber (leaf)	Noeun-dong, Daejeon

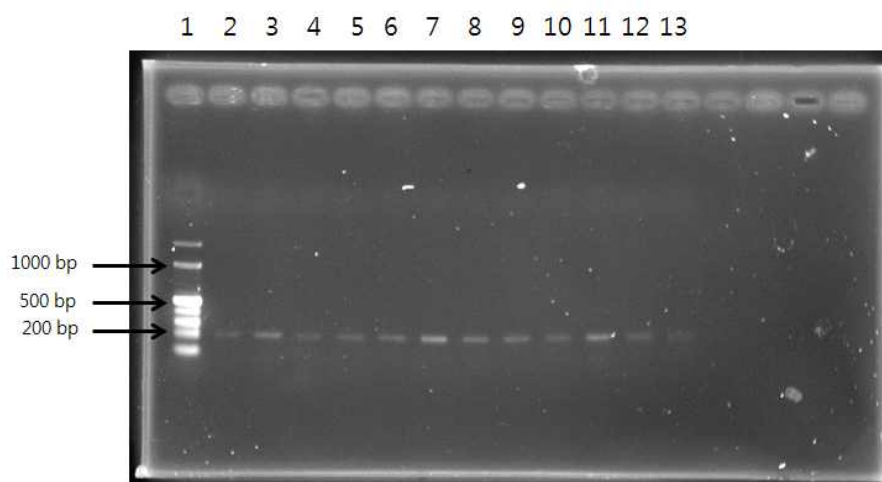


Fig. 32. Amplification of DNA from 12 isolates using primer pair RB and RC. Lane 1, 100 bp DNA ladder marker; lane 2, C1; lane 3, C1-1; lane 4, C2; lane 5, C3; lane 6, C4; lane 7, C5; lane 8, C6; lane 9, C7; lane 10, C8; lane 11, C10; lane 12, C11; lane 13, C12.

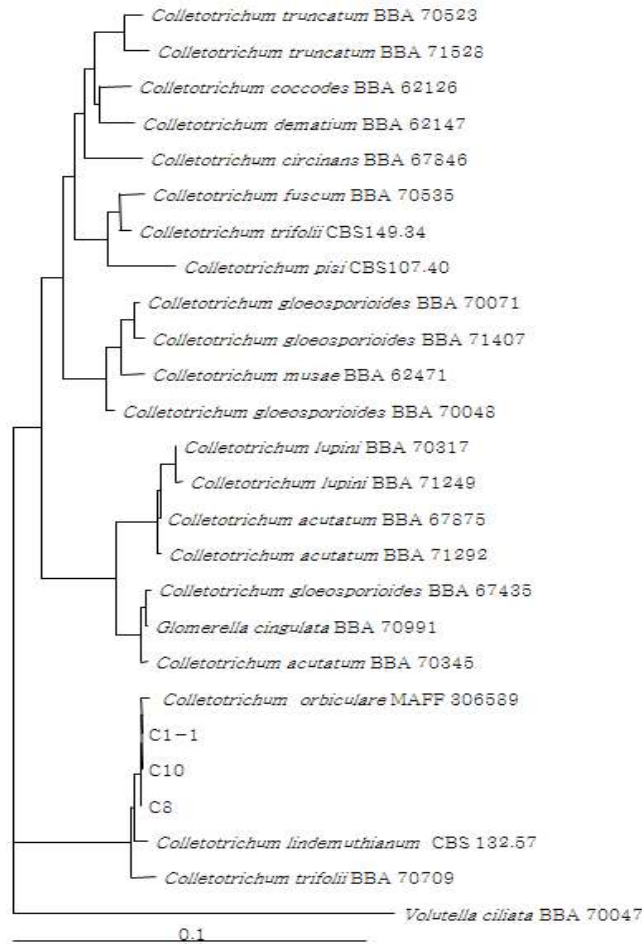


Fig. 33. Neighbor-joining tree based on ITS sequences showing relationships among *Colletotrichum*. The bar represents 0.1 substitutions per nucleotide position.

(나) 분리한 균주의 오이에 대한 병원성

분리한 균주들의 오이에 대한 병원성을 조사한 결과 C1-1, C5, C6, C8, C10, 및 C12균주는 4.0×10^5 spores/ml 농도에서 보다 8.0×10^4 spores/ml의 낮은 농도에서 높은 발병도를 나타내었다. 반면 C1, C2, C3, C4, C7, C11, 및 대조균주인 KACC 40809에서는 높은 농도인 4.0×10^5 spores/ml에서 보다 높은 발병도를 나타내었다(Table 52).

Table 52. Resistance degree of the cucumber cultivar to cucurbit anthracnose caused by *Colletotrichum orbiculare*^a

Isolate	Spore concentration ($\times 10^4$ spores/ml)	
	8.0	40
C1	-	3.7 \pm 0.6 ^b
C1-1	6.0 \pm 0.0	-
C2	-	4.0 \pm 0.0
C3	-	6.0 \pm 0.0
C4	-	1.0 \pm 0.0
C5	3.7 \pm 0.6	-
C6	3.0 \pm 1.0	-
C7	-	2.7 \pm 0.6
C8	4.3 \pm 1.2	-
C10	5.7 \pm 0.6	-
C11	-	5.0 \pm 1.0
C12	3.7 \pm 0.6	-
KACC 40809	-	1.3 \pm 0.6

^aSeedlings at 2~3 true leaf stage of Cucumber cultivar (Baekmi) were inoculated with *C. orbiculare* by spray inoculation in spore concentration of 8.0×10^4 and 4.0×10^5 spores/ml. The inoculated plants were incubated in a dew chamber at 25°C for 48 hr and then transferred to growth chamber (25°C, relative humidity 80%). After 8–10 days, disease index of the plants was investigated.

^bEach value represents the mean (\pm standard deviation) of one run with 3 replicates each (0 = healthy, 1 = 1–10%, 2 = 11–20%, 3 = 21–50%, 4 = 51–75%, 5 = 76–90%, 6 = 90% over).

(다) 호박품종을 이용한 race 검정

분리한 균주들 중 race 1과 race 3을 구분하기 위해 호박 품종에서의 발병도를 조사하였다. 호박은 Race 1균주에서 중도 저항성, race 3균주에서 immune을 보이기 때문에 race1과 3를 구분 할 수 있는 박과작물이다. 분리한 3균주는 4개의 호박 품종에서 중도저항성이나 저항성을 나타내었다. 단지 C7 균주는 Crocodile에 감수성을 나타내었다. Race 3 균주로 알려진 KACC 40903균주는 4개의 호박 품종에서 저항성이나 중도저항성을 보여 이전의 보고와 다른 결과를 나타내었다. 따라서 반복 실험이 필요 할 것으로 생각되어진다(Table 53).

Table 53. Resistance degree of the squash cultivars to cucurbit anthracnose caused by *Colletotrichum orbiculare*^a

Isolate	Cultivar	Spore concentration ($\times 10^4$ spores/ml)	
		2.0	8.0
C1-1	Danbiseu	1.3 \pm 0.6 ^b	1.0 \pm 0.0
	Gammirak	1.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.6
	Hanson	0.7 \pm 0.6	1.3 \pm 0.6
	Crocodile	0.7 \pm 0.6	2.0 \pm 1.0
C7	Danbiseu	1.0 \pm 0.0	2.0 \pm 1.7
	Gammirak	1.7 \pm 0.6	1.3 \pm 0.6
	Hanson	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0
	Crocodile	1.3 \pm 0.6	3.0 \pm 1.0
C10	Danbiseu	1.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.6
	Gammirak	1.3 \pm 0.6	1.3 \pm 0.6
	Hanson	1.7 \pm 0.6	2.7 \pm 0.6
	Crocodile	1.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.6
KACC 40809	Danbiseu	1.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.6
	Gammirak	1.0 \pm 0.0	1.7 \pm 0.6
	Hanson	1.3 \pm 0.6	1.3 \pm 0.6
	Crocodile	1.7 \pm 0.6	1.0 \pm 0.0
KACC 40903	Danbiseu	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0
	Gammirak	1.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.6
	Hanson	1.3 \pm 0.6	1.0 \pm 0.0
	Crocodile	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0

^aSeedlings at 2~3 true leaf stage of squash cultivar were inoculated with *C. orbiculare* by spray inoculation in spore concentration of 8.0×10^4 and 4.0×10^5 spores/ml. The inoculated plants were incubated in a dew chamber at 25°C for 48 hr and then transferred to growth chamber (25°C, relative humidity 80%). After 8-10 days, disease index of the plants was investigated.

^bEach value represents the mean (\pm standard deviation) of one run with 3 replicates each (0 = healthy, 1 = 1-10%, 2 = 11-20%, 3 = 21-50%, 4 = 51-75%, 5 = 76-90%, 6 = 90% over).

(라) 수박 품종을 이용한 race 검정

첫번째 실험에서 습실처리 후 향온습실상에 재배하는 과정에서 문제가 발생하여 8.0×10^4 spores/ml의 접종농도로 처리한 C1-1, C10, KACC 40809균주의 결과가 제대로 나오지 못했다. 하지만 나머지 균주에서는 C7이 race 2인 KACC 40809균주와 같은 반응을 보였고, KACC

40903균주와 C10균주는 스마트꿀수박 품종에서 저항성을 보였기 때문에 race 1임을 예상할 수 있었다(Table 54). 두 번째 실험에서 분리한 균주들 가운데 race 1을 찾기 위하여 선발한 수박 품종에 대하여 발병도를 조사하였다. 대조균주인 KACC 40809와 KACC 40903 균주 처리구에서 높은 발병도를 보여 명확한 race 검정은 어려웠지만, C10균주는 지난번 결과와 유사하게 스마트꿀수박 품종에서 저항성을 보였고, C1, C5 균주에서도 설강 102, FR서태자 품종에서는 발병도가 높았으나 스마트꿀수박품종에서는 상대적으로 발병도가 낮았다(Table 55).

Table 54. Resistance degree of the watermelon cultivars to cucurbit anthracnose caused by *Colletotrichum orbiculare*

Isolate	Spore concentration ($\times 10^4$ spores/ml)	Cultivar		
		Seolgang 102	FR-seotaja	Smartggul
C1-1	2.0	6.0 \pm 0.0 ^c	5.0 \pm 1.7	1.0 \pm 0.0
	8.0	3.0 \pm 2.6	5.3 \pm 1.2	1.0 \pm 1.0
C7	2.0	4.7 \pm 2.3	6.0 \pm 0.0	6.0 \pm 0.0
	8.0	6.0 \pm 0.0	6.0 \pm 0.0	6.0 \pm 0.0
C10	2.0	4.7 \pm 2.3	6.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0
	8.0	2.0 \pm 1.0	6.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0
KACC 40809	2.0	5.3 \pm 1.2	3.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0
	8.0	3.3 \pm 2.5	3.0 \pm 1.0	0.7 \pm 0.6
KACC 40903	2.0	4.7 \pm 2.3	6.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0
	8.0	6.0 \pm 0.0	4.7 \pm 1.2	3.7 \pm 2.1

^aSeedlings at 2~3 true leaf stage of watermelon cultivar were inoculated with *C. orbiculare* by spray inoculation in spore concentration of 2.0×10^5 and 8.0×10^5 spores/ml. The inoculated plants were incubated in a dew chamber at 25°C for 48 hr and then transferred to growth chamber (25°C, relative humidity 80%). After 8–10 days, disease index of the plants was investigated.

^bEach value represents the mean (\pm standard deviation) of one run with 3 replicates each (0 = healthy, 1 = 1–10% 2 = 11–20%, 3 = 21–50%, 4 = 51–75%, 5 = 76–90%, 6 = 90% over).

^cResistance response, R = resistant 0–1.0 (disease index), MR = moderately resistant 1.1–2.5, S = susceptible 2.6–6.

Table 55. Resistance degree of the watermelon cultivars to cucurbit anthracnose caused by *Colletotrichum orbiculare*^a

Isolate	Cultivar		
	Seolgang 102	FR-seotaeja	Smartggul
C1	6.0 ± 0.0 ^b	5.7 ± 0.6	2.7 ± 2.9
C1-1	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0
C2	1.0 ± 0.0	2.7 ± 1.2	3.7 ± 2.1
C3	3.0 ± 2.6	5.0 ± 1.7	1.3 ± 0.6
C4	1.3 ± 0.6	3.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
C5	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0
C6	2.7 ± 2.9	4.7 ± 1.2	2.7 ± 2.9
C7	6.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0	1.3 ± 0.6
C8	1.0 ± 0.0	5.7 ± 0.6	1.0 ± 0.0
C10	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
C11	1.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
C12	6.0 ± 0.0	4.0 ± 1.7	4.7 ± 2.3
KACC 40809	6.0 ± 0.0	5.3 ± 1.2	4.7 ± 2.3
KACC 40903	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0

^aSeedlings at 2~3 true leaf stage of watermelon cultivar were inoculated with *C. orbiculare* by spray inoculation in spore concentration of 2.0×10^5 and 8.0×10^5 spores/ml. The inoculated plants were incubated in a dew chamber at 25°C for 48 hr and then transferred to growth chamber (25°C, relative humidity 80%). After 8–10 days, disease index of the plants was investigated.

^bEach value represents the mean (± standard deviation) of one run with 3 replicates each (0 = healthy, 1 = 1–10%, 2 = 11–20%, 3 = 21–50%, 4 = 51–75%, 5 = 76–90%, 6 = 90% over).

12. 토마토 잎곰팡이병 저항성 병리검정 기술 체계 확립

가. 서론

가지과 작물인 토마토(*Solanum lycopersicum*)는 중요한 농가 소득 작물 중 하나로서 생산량 증대와 품질 향상을 위해 시설재배가 꾸준히 증가하고 있는 작물이다(Kang et al., 2011). 최근 토마토의 시설재배가 증가함에 따라 노지 재배에서는 문제가 되지 않았던 잎곰팡이병이 심하게 발생하여 경제적으로 큰 피해를 주고 있어 그 중요도가 증가하고 있다. *Fulvia fulva*(syn. *Cladosporium fulvum*)에 의해 발생하는 잎곰팡이병은 시설재배와 같은 특수 환경에서 그리고 20–25°C의 비교적 낮은 온도에서 시설 내 상대습도가 높을 때 많이 발생하고, 일단 발생하면 급격히 퍼져 그 피해가 매우 심하게 된다(Kim, 1992). 토마토 잎곰팡이병을 방제하기

위한 방법으로는 주로 살균제 처리에 의한 화학적 방제가 널리 이용되어왔으나, 인축에 대한 독성 및 환경 오염 등에 대한 사회적 관심이 증가하고 친환경 농산물에 대한 수요가 증가함에 따라 잎곰팡이병을 방제하기 위해 저항성 토마토 품종을 재배하는 방법을 선호하고 있다.

F. fulva 저항성은 약 100년 전부터 Cf 저항성 유전자에 의해 결정된다고 보고(Lind, 1909; Norton, 1914), 야생 토마토 근연종으로부터 Cf 저항성 유전자를 재배 품종에 도입해 왔다. 토마토 재배 품종에 도입된 Cf 저항성 유전자는 *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5*, *Cf-6*, *Cf-9*, *Cf-11*이 있는데, *Cf-2*, *Cf-9*와 *Cf-11*는 *S. pimpinellifolium*부터, *Cf-5*는 *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*로부터, 그리고 *Cf-4*는 *Lycopersicon habrochaites*로부터 도입되어 잎곰팡이병 저항성 품종을 육성하기 위하여 이용되고 있다(Enya et al., 2009; Takken et al., 1998). 다양한 야생 토마토로부터 얻은 저항성 유전자가 도입된 토마토는 이미 개발되어 상업적으로 판매되고 있다. 국내에서는 *Cf-4*와 *Cf-9* 저항성 품종이 주종을 이루고 있으며 *Cf-5* 품종도 일부 개발되었으며, 저항성 품종의 육종 또한 지속적으로 이루어지고 있다(Kim et al., 2011).

1970년 말에 *F. fulva*에 의한 토마토 피해가 더 이상 크게 일어나지 않을 것이라 기대하며 *Cf-9* 저항성 유전자를 토마토 품종에 도입하였고(Thomma et al., 2005), 현재까지 상업적으로 판매되고 있는 많은 토마토 품종에 *Cf-9* 유전자가 이용되고 있으며, 국내에도 많은 *Cf-9* 토마토 품종이 재배되고 있다. 토마토 잎곰팡이병균 *F. fulva*의 race는 감염할 수 있는 Cf 저항성 유전자 이름을 열거하는 방법으로 레이스를 명명한다. 즉 *Cf-2*를 침해하는 균주는 race 2 그리고 *Cf-2*와 *Cf-4*를 감염하는 균주는 race 2.4이다. Cf 저항성 유전자가 도입된 토마토 품종이 포장에 재배됨에 따라 병원성이 다른 race를 가진 *F. fulva*의 발생이 뒤따르게 되어 다양한 race 분화가 지속적으로 보고되고 있다(Boukema, 1981; Day, 1954; Enya et al., 2009; Laterrot and Clerjeau, 1979; Laterrot et al., 1985; Laterrot, 1986; Lindhout et al., 1989). 일본에서는 Enya et al.(2009)이 기존 발견된 6개(race 0, 2, 4, 2.4, 4.11, 2.4.11)의 race와 *Cf-4*, *Cf-9*, *Cf-11*을 감염하는 다른 2개의 새로운 race 4.9와 4.9.11을 보고하였으며, 뉴질랜드에서도 race 2.4.5.9를 발견함에 따라 이 잎곰팡이 병원균에 의해 *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5*와 *Cf-9* 저항성 유전자가 극복되었다(Boukema, 1981). 그리고 프랑스에서는 race 2.4, race 2.5, race 2.5.9를 분리하였다고 보고하였으며(Laterrot and Clerjeau, 1979; Laterrot et al., 1985; Laterrot, 1986), 현재 유럽에서는 *Cf-6*을 제외한 모든 저항성 유전자를 침입하는 균주들이 보고되었다(Lindhout et al., 1989). 이와 같이 국외 여러 나라에서 *Cf-9* 유전자를 극복한 race 출현을 지속적으로 보고하고 있으나, 국내에서는 토마토 잎곰팡이병의 발생뿐만 아니라 병원균의 race에 대한 연구가 거의 없는 실정이다.

본 연구에서는 충청남도에 위치한 토마토 재배지에서 잎곰팡이병이 발생한 4개의 *Cf-9* 품종으로부터 토마토 잎을 채집하고, 병반으로부터 *F. fulva* 15개 균주를 분리하고 동정하였다. 그리고 이들의 병원성을 2개 *Cf-9* 품종뿐만 아니라 *Cf-4*와 *Cf-5* 품종들에 대하여 실험하였으며, 이들 중 *Cf-4* 품종은 감염하지 못하는 2개 균주를 선발하여 *Cf-9* 품종으로 보고된(Kim et al., 2011) 17개 토마토 품종의 이들 균주에 대한 저항성을 조사하였다.

나. 재료 및 방법

균주 분리

2012년 충남 부여군 일대에서 *Cf-9* 저항성 토마토 품종 ‘큐티’, ‘도태랑다이아’, ‘유니콘’

및 ‘라피토’에 잎곰팡이병이 심하게 발생하여 잎곰팡이 병징을 보이는 토마토 잎을 채집하였다. 각 품종의 토마토 잎 뒷면에는 황갈색 혹은 갈색의 원형내지 부정형의 병반 위에 토마토 잎곰팡이병 병원균의 전형적인 포자가 형성되어 있었으며, 이로부터 다음과 같은 방법으로 단포자 분리를 하였다. 병반의 포자를 백금으로 긁어내어 1.5% water agar(Junsei Chemical Co.) 배지에 희선도말한 후에 광학현미경 하에서 배지 위에 있는 단일 포자를 떼어내어 potato dextrose agar(PDA, Becton, Dickinson and Co.) 배지에 올려놓고 25°C에서 배양하였다.

균주 동정

분리한 15개 균주들은 균총의 색과 모양 그리고 광학현미경 하에서 관찰하였을 때 포자의 색, 크기, 모양 등이 거의 동일하였다. 따라서 15개 균주 중에서 분리한 품종을 고려하여 9개를 선발하고 이들의 genomic DNA를 분리하여 PCR 증폭하고 염기서열 분석을 통하여 균주를 동정하였다. 선발한 9개 균주를 PDA 배지에 접종하고 25°C에서 10일 동안 전배양한 균총으로부터 균사조각을 떼어 potato dextrose broth(PDB; Becton, Dickinson and Co.) 배지에 접종하고 25°C에서 18일 동안 정치 배양을 한 후에 균사체를 수확하였다.

균사체를 동결 건조하고 1.5mL tube에 넣고 마쇄한 뒤 Park et al.(2005)의 방법에 따라 genomic DNA 분리와 ITS 영역의 Polymerase chain reaction(PCR) 증폭을 수행하였다. 마쇄된 균사체를 STES buffer(500mM NaCl, 200mM Tris-HCl(pH 7.6), 10mM EDTA, 1% SDS)와 혼합하고 phenol/chloroform/isoamyl alcohol(25:24:1) extraction 처리 후 ethanol로 genomic DNA를 침전시켰으며 DNA는 -20°C에 보관하여 사용하였다. PCR은 15ng의 genomic DNA, 10pmol의 ITS5(5′-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3′)와 ITS4(5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′) primer(White et al., 1990), 10mM Tris-HCl, 40mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 250μM dNTP, 2.5units의 Taq DNA polymerase(Bioneer, Korea)에 H₂O를 첨가하여 최종 50μl의 반응액을 만들어 94°C에서 3분간 initial denaturation을 실시한 후에 denaturation 96°C/40초, annealing 55°C/40초, extension 72°C/60초로 30 cycle을 수행하고 final extension 72°C에서 15분간 실시하였다.

PCR 산물은 PCR quick-spin PCR product purification kit(iNtRON BioTechnology, Korea)로 정제하고 ABI Prism[®]BigDyeterminatorcyclesequencingkits(AppliedBiosystems,USA)로 반응 후 ITS5/4 primer를 이용하여 PTC-225 peltier thermal cycler(MJ research, USA)로 염기서열을 결정하였다. 그리고 이 염기서열을 BLAST search에 의해 GenBank에 등록된 ITS 영역의 염기서열과 비교하였다(Fig. 34). GenBank accession no.는 Fig. 1의 균주 이름 다음의 괄호 안에 표기하였다. 토마토에서 분리한 균주와 GenBank로부터 얻은 염기서열은 CLUSTAL X(Thompson et al., 1997)와 PHYDIT program version 3.0(Chun, 1995)을 이용하여 분석하였다. Neighbor-joining tree는 PHYLIP 3.57c package(Felsenstein, 1985)의 Kimura’s 2-parameter distance model(Kimura, 1980)를 이용하여 작성하였다.

식물 재배

분리한 균주들의 병원성을 검정하기 위하여 감수성 품종인 ‘서광’(문산토코리아)과 Cf-4 품종인 ‘슈퍼도태랑’(코레곤종묘), Cf-5 품종인 ‘요요캡틴’(고농종묘) 그리고 Cf-9 품종인 ‘큐티’(다끼이종묘)와 ‘도태랑다이하’(다끼이종묘) 총 5개 품종의 토마토 종자를 각각 6 × 12 육묘용 연결포트(40mL/pot, 범농사)에 원예용 상토(쑥쑥이, 농우바이오)를 넣고 파종하였다. 그리고 온

실(25 ± 5°C)에서 2주일 동안 재배한 후에 플라스틱 포트(직경 6.5cm, 토양 180mL)로 토마토 유묘를 이식하고 약 2주일 동안 더 재배하여 본엽 3엽이 완전히 전개된 4-5엽기의 토마토 유묘를 실험에 사용하였다.

그리고 분리한 *F. fulva* 균주에 대한 시판 중인 *Cf-9* 저항성 품종들의 저항성을 조사하기 위하여, Kim et al.(2011)이 '토마토 품종 2011'에서 *Cf-9* 저항성 품종으로 보고한 토마토 17개 품종('큐티', '도태랑골드', '도태랑마스터', '도태랑다이하', '포세이돈', '유니콘', '롱런', '제우스42', '조이풀', '호용', '토사마', '마이로꾸', '슈퍼선로드', '하드랑', '키스풀', '미니찰미니', '큐피랑')을 시종에서 구입하여 감수성 대조 품종인 '서광'과 함께 앞에서와 동일한 방법으로 파종하고 재배하여 실험에 사용하였다.

접종원 준비

분리한 균주들의 시판 중인 *Cf-4*, *Cf-5* 및 *Cf-9* 저항성 품종에 대한 병원성은 분리한 *F. fulva* 15개 균주 모두를 사용하였으며, 시판 중인 17개의 품종에 대한 병원성은 2개 균주(TQ-3와 TR-4)를 선발하여 실험하였다. 그리고 모든 병원성 실험에는 KACC로부터 분양받은 KACC 46044(race 2.4)를 대조 균주로 포함하였다. *F. fulva* 균주들은 PDA 배지에 접종하고 25°C에서 3주일 동안 배양하여 포자를 형성하였다. 형성된 포자를 수확하기 위하여 배양한 균주의 균층에 멸균한 PDB 용액(5배 희석액)을 넣고 멸균한 붓으로 긁어준 후에 4겹의 거즈로 걸러 균사를 제거하여 포자 현탁액을 준비하였다. 접종원의 포자 농도를 광학현미경 하에서 hemocytometer를 이용하여 측정하고 $1-5 \times 10^5$ conidia·mL⁻¹의 농도가 되도록 멸균한 PDB 용액(5배 희석액)으로 희석하였다.

병원균 접종 및 병 조사

온실에서 재배한 4-5엽기의 토마토 유묘에 준비한 *F. fulva*의 포자 현탁액을 흘러내리기 직전까지 충분히 분무하여 접종하였다. 접종한 토마토 유묘는 25°C 습실상에서 48시간 동안 배양한 후 25°C, 상대습도 80%의 항온항습실로 이동하여 하루 12시간씩 광을 처리하며 재배하였다. 접종 18-28일 후에 감수성 대조 품종인 '서광'에서 잎곰팡이병이 충분히 발생하면 각 토마토 유묘의 본엽 1엽부터 3엽까지의 잎 면적 중 잎곰팡이병 병징이 나타난 비율인 병반면적율(%)을 달관조사 하였다. 모든 실험은 처리 당 토마토 유묘 3개씩을 사용하여 2회 실시하였으며, 평균 병반면적율이 10% 이하이면 저항성으로, 10% 초과한 경우에는 감수성으로 결정하였다.

다. 결과 및 고찰

균주 분리 및 동정

2012년 충남 부여군 일대에서 잎 뒷면에 황갈색내지 갈색의 전형적인 토마토 잎곰팡이병 병징을 보이는 *Cf-9* 저항성 토마토 4개 품종('큐티', '도태랑다이하', '유니콘', '라피토')의 잎을 채집하여 광학현미경 하에서 단포자 분리를 수행하여 총 15개 균주를 분리하였다. '큐티', '도태랑다이하' 및 '유니콘' 품종으로부터 각각 4개 균주씩 그리고 '라피토' 품종으로부터 3개 균주가 분리되었다. 4개의 *Cf-9* 토마토 품종으로부터 분리한 토마토 잎곰팡이병균 15개 균주는 Table 56과 같다.

Table 56. List of *Fulvia fulva* isolated from *Solanum lycopersicum* cultivars collected in 2012.

Host	Isolate
<i>S. lycopersicum</i> cv. <i>dotaerangdia</i>	TD-1, TD-2, TD-3, TD-4
<i>S. lycopersicum</i> cv. <i>cutie</i>	TQ-1, TQ-2, TQ-3, TQ-4
<i>S. lycopersicum</i> cv. <i>rapito</i>	TR-2, TR-3, TR-4
<i>S. lycopersicum</i> cv. <i>unicorn</i>	TU-1, TU-2, TU-3, TU-4

분리한 균주들의 포자의 크기 및 형태 그리고 PDA 배지에서의 균총의 모양 및 색이 거의 같아서 모두 동일한 병원균으로 생각되었다(Holliday and Mulder, 1976). 따라서 분리한 15개의 균주 중 품종을 고려하여 9개 균주를 선발하고 이들의 ITS 영역의 ITS5/4 염기서열을 분석한 결과 9개 균주는 모두 100% 동일한 염기서열을 가졌으며 이들 중 TQ-3 균주의 염기서열을 Genbank에 등록하였다(Genbank accession no. KC999875). 분리한 9개 균주의 ITS 염기서열은 GenBank에 등록된 *F. fulva* 3개 균주를 포함하여 총 14개 균주의 ITS 염기서열과의 유연관계 분석을 수행하기 위하여, 이들 균주의 ITS 영역 염기서열 상동성 비교를 통해 작성된 phylogenetic tree에서 실험한 9개 균주 모두는 *F. fulva*(=*Cladosporium fulvum*)와 동일한 그룹을 형성하였다(Fig. 34). 따라서 *Cf-9* 저항성 토마토 품종으로부터 분리한 균주들은 모두 *F. fulva*로 동정되었다.

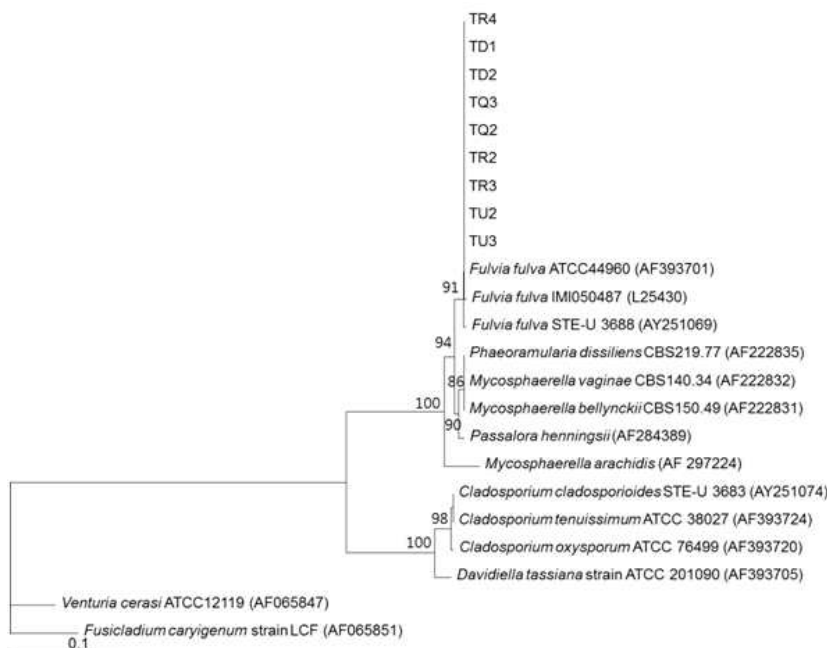


Fig. 34. Neighbor-joining tree based on ITS sequences showing relationships among *Fulvia fulva* (= *Cladosporium fulvum*) isolated from tomato and closely related species. The values above each branch indicate the percentage levels of bootstrap support (> 50%) for the branch point based on 1000 resamplings. The bar represents 0.1 substitutions

per nucleotide position. () is GenBank accession number.

분리 균주의 *Cf-4*, *Cf-5* 및 *Cf-9* 품종에 대한 병원성

국내에는 토마토 잎곰팡이병에 대한 저항성을 위해 저항성 유전자 *Cf-4*, *Cf-5* 및 *Cf-9*를 포함하는 품종들이 판매되고 있다. 분리한 15개 균주의 *Cf-4*, *Cf-5* 및 *Cf-9* 저항성 품종에 대한 병원성을 *Cf-9* 품종은 ‘큐티’와 ‘도태랑다이아’, *Cf-4* 품종은 ‘슈퍼도태랑’ 그리고 *Cf-5* 품종은 ‘요요캡틴’을 사용하여 실험한 결과, 분리한 15개 균주는 모두 *Cf-9* 품종인 ‘도태랑다이아’와 ‘큐티’에 강한 병원성을 나타내었으나, *Cf-4* 저항성 품종인 ‘슈퍼도태랑’은 분리한 균주 중 5개에 대해서는 감수성을 그리고 10개 균주에는 저항성을 보였다(Table 57). 한편 *Cf-5* 저항성 품종인 ‘요요캡틴’에는 15개 균주 모두가 높은 병원성을 보였다. 따라서 분리한 균주 중 약 33%는 *Cf-4*, *Cf-5* 및 *Cf-9* 품종 모두에 병원성을 가지나, 약 67%는 *Cf-5*와 *Cf-9* 품종은 가해할 수 있으나 *Cf-4* 품종에는 병원성을 나타내지 못하는 것을 알 수 있었다(Table 2).

Table 57. Pathogenicity of *Fulvia fulva* isolates on five tomato cultivars carrying a resistance gene to *F. fulva* such as *Cf-4*, *Cf-5*, and *Cf-9*.

Isolate	Tomato cultivar									
	Seogwang (-)		Superdotaerang (<i>Cf-4</i>)		Yoyocaptain (<i>Cf-5</i>)		Cutie (<i>Cf-9</i>)		Dotaerangdia (<i>Cf-9</i>)	
TD-1	65 ± 8.7 ^y	S ^x	6.7 ± 2.9	R	55 ± 0.0	S	98 ± 2.9	S	100 ± 0.0	S
TD-2	85 ± 8.7	S	0.0 ± 0.0	R	95 ± 5.0	S	98 ± 2.9	S	100 ± 0.0	S
TD-3	43 ± 31	S	22 ± 12	S	38 ± 34	S	47 ± 14	S	70 ± 20	S
TD-4	97 ± 5.8	S	0.0 ± 0.0	R	75 ± 22	S	77 ± 2.9	S	98 ± 2.9	S
TQ-1	68 ± 10	S	50 ± 44	S	67 ± 5.8	S	25 ± 15	S	48 ± 13	S
TQ-2	73 ± 15	S	0.0 ± 0.0	R	75 ± 13	S	95 ± 5.0	S	92 ± 7.6	S
TQ-3	88 ± 2.9	S	10 ± 8.7	R	67 ± 7.6	S	97 ± 2.9	S	97 ± 5.8	S
TQ-4	95 ± 5.0	S	5.0 ± 7.1	R	70 ± 5.0	S	80 ± 5.0	S	77 ± 12	S
TR-2	77 ± 12	S	70 ± 23	S	57 ± 5.8	S	82 ± 7.6	S	82 ± 10	S
TR-3	52 ± 5.8	S	53 ± 13	S	52 ± 5.8	S	55 ± 10	S	78 ± 20	S
TR-4	87 ± 2.9	S	0.0 ± 0.0	R	53 ± 20	S	80 ± 26	S	68 ± 7.6	S
TU-1	97 ± 5.8	S	0.0 ± 0.0	R	100 ± 0.0	S	98 ± 2.9	S	97 ± 5.8	S
TU-2	80 ± 13	S	10 ± 7.1	R	57 ± 10	S	73 ± 16	S	87 ± 14	S
TU-3	80 ± 8.7	S	85 ± 22	S	68 ± 12	S	78 ± 15	S	88 ± 10	S
TU-4	90 ± 13	S	0.0 ± 0.0	R	85 ± 5.0	S	97 ± 2.9	S	95 ± 5.0	S
KACC 46044	100 ± 0.0	S	100 ± 0.0	S	0.0 ± 0.0	R	3.3 ± 2.9	R	0.0 ± 0.0	R

²Seeds of tomato cultivar were sown in 5 × 8 plastic cell tray and grown in a greenhouse at 25 ± 5°C. Seedlings of tomato at four to five leaf stage were inoculated with each *F. fulva* isolate (1-5 × 10⁵ conidia·mL⁻¹). The infected plants were incubated in humidity chamber at 25°C for 48 hours and then transferred to a growth chamber at 25°C and 80%

RH with 12-hour light a day. Disease severity of the plant was measured using percentage of infected leaf area 18 to 28 days after inoculation.

^yEach value represents the mean disease severity \pm standard deviation of two runs with three replicates each.

^xS, susceptible; R, resistant.

Cf-9 품종의 잎곰팡이병 저항성을 극복하는 새로운 race는 일본, 네덜란드, 폴란드 등의 세계 각국에서도 지속적으로 보고되고 있으나(Enya et al., 2009; Laterrot, 1986; Lindhout et al., 1989), 국내에서는 아직 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서, 국내에서 저항성 육종에 *Cf* 저항성 유전자로 가장 많이 이용 중인 *Cf-9*을 도입한 토마토 품종에 잎곰팡이병을 일으키는 새로운 race의 *F. fulva* 균주가 국내에도 발생하였음을 처음으로 보고하고자 한다. 그리고 국내 다양한 race를 가진 균주들이 존재하고 있을 가능성이 있으므로 보다 효율적인 저항성 품종 육성 및 이용을 위하여 앞으로 국내에 분포하고 있는 *F. fulva*의 race 종류 및 분포 비율 등에 대한 연구가 필요하다.

그리고 *Cf-4*, *Cf-5* 및 *Cf-9* 저항성 품종을 침해하는 균주들은 이들 품종에서 감수성 대조 품종과 거의 동일한 정도의 병반면적율을 나타내었다(Table 2). 즉 양적 저항성과 달리 저항성 품종을 감염할 수 있는 *F. fulva* 균주는 마치 저항성 유전자가 없는 것과 같이 병 저항성 토마토에 잎곰팡이병을 일으키는 것을 알 수 있었다. 이는 토마토의 *F. fulva*에 대한 저항성은 *Phytophthora capsici*에 대한 고추의 역병 저항성과 달리 gene-for-gene 이론을 따르는 질적 저항성이기 때문이라 생각되었다(van den Ackerveken et al. 1992; van Kan et al., 1991).

시판 중인 17개 토마토 품종에 대한 병원성

분리한 *F. fulva* 15개 균주 중 *Cf-9* 품종에는 잎곰팡이병을 일으키나 *Cf-4* 품종은 감염하지 못하는 *F. fulva* 2개 균주(TQ-3와 TR-4)를 선발하여 이들에 대한 *Cf-9* 저항성 품종으로 보고된(Kim et al., 2011)토마토 17개 품종의 저항성 차이를 실험한 결과, 두 균주 모두에 대해 15개 품종들은 감수성 대조품종인 ‘서광’과 유사한 정도의 높은 감수성을 보였다(Table 58). 그리고 이들 15개 품종들은 *Cf-9* 품종을 감염하는 두 균주에 의해 품종 간에 큰 차이가 없이 거의 동일하게 저항성이 무너짐을 알 수 있었다(Table 58). 그러므로 이들 15개 토마토 품종들은 잎곰팡이병 저항성을 위해 *Cf-9*만을 가지는 품종으로 생각되었다. 이것은 *Cf-9* 특이적인 분자 마커를 이용하여 확인할 필요가 있다.

실험한 17개 품종들은 대조 균주인 KACC 46044(race 2.4)에 대하여 높은 저항성을 나타내었다. 그러므로 실험한 17개 품종들은 *Cf-2*와 *Cf-4* 저항성 유전자를 단독으로 혹은 동시에 포함하고 있지 않다는 것을 알 수 있었다. 한편 실험한 17개 품종 중 ‘호용’과 ‘슈퍼선로드’ 두 품종은 두 균주 모두에 대해 저항성을 나타냈다(Table 58). Kim et al.(2011)은 ‘호용’과 ‘슈퍼선로드’ 두 품종에 *Cf-9* 저항성 유전자가 포함되어 있다고 보고하였으나, 두 품종은 실험한 TQ-3, TR-4 및 KACC46044 균주 모두에 대해 저항성을 보였으므로 두 품종은 *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5* 및 *Cf-9*을 제외한 다른 잎곰팡이병 저항성 유전자를 포함하고 있거나, 이들 품종에 2개 이상의 *Cf* 저항성 유전자가 도입되어 있다고 생각되었다(Tables 57, 58). 개발된 대부분의 토마토 품종들은 하나의 저항성 유전자만을 포함하고 있는데, 이는 여러 개의 병원성 유전자를 가질 수 있는 *F. fulva*의 race에는 효과적이지 않다(Lindhout et al., 1989). 따라서 저항성 유전자

를 한 개 도입하는 것보다 여러 개를 도입하였을 때 새로 도입된 유전자에 병원성을 보이는 race의 발생을 지연시킬 수 있다(Laterrot, 1981). 따라서 이를 위한 저항성 품종의 개발이 지속적으로 시도되고 있다(Enya et al., 2009; Thomas et al., 1998).

Table 58. Resistance degree of the 18 commercial tomato cultivars to three isolates of *Fulvia fulvā*.

Cultivar	Resistance gene ^y	Isolate					
		TQ-3		TR-4		KACC 46044	
Cutie	<i>Cf-9</i>	32 ± 15 ^x	S ^w	67 ± 7.6	S	0.0 ± 0.0	R
Dotaeranggold	<i>Cf-9</i>	50 ± 13	S	70 ± 5.0	S	0.0 ± 0.0	R
Dotaerangmaster	<i>Cf-9</i>	43 ± 18	S	82 ± 13	S	0.0 ± 0.0	R
Dotaerangdia	<i>Cf-9</i>	45 ± 5.0	S	58 ± 7.6	S	0.0 ± 0.0	R
Poseidon	<i>Cf-9</i>	31 ± 16	S	62 ± 16	S	0.0 ± 0.0	R
Unicorn	<i>Cf-9</i>	27 ± 2.9	S	48 ± 10	S	0.0 ± 0.0	R
Longrun	<i>Cf-9</i>	25 ± 5.0	S	52 ± 5.8	S	0.0 ± 0.0	R
Zeus42	<i>Cf-9</i>	45 ± 5.0	S	68 ± 33	S	0.0 ± 0.0	R
Joyful	<i>Cf-9</i>	43 ± 2.9	S	52 ± 7.6	S	0.0 ± 0.0	R
Hoyong	<i>Cf-9</i>	0.0 ± 0.0	R	0.0 ± 0.0	R	0.0 ± 0.0	R
Tosama	<i>Cf-9</i>	60 ± 5.0	S	58 ± 18	S	0.0 ± 0.0	R
Myroggu	<i>Cf-9</i>	25 ± 13	S	53 ± 13	S	0.0 ± 0.0	R
Supersunload	<i>Cf-9</i>	1.7 ± 2.9	R	0.0 ± 0.0	R	0.0 ± 0.0	R
Hardrang	<i>Cf-9</i>	28 ± 12	S	28 ± 16	S	0.0 ± 0.0	R
Kissggul	<i>Cf-9</i>	47 ± 2.9	S	55 ± 17	S	0.0 ± 0.0	R
Minichalmini	<i>Cf-9</i>	42 ± 2.9	S	55 ± 8.7	S	0.0 ± 0.0	R
Kewpierang	<i>Cf-9</i>	27 ± 2.9	S	53 ± 28	S	0.0 ± 0.0	R
Seogwang	-	40 ± 10	S	45 ± 10	S	37 ± 5.0	S

^zSeeds of tomato cultivar were sown in 5 × 8 plastic cell tray and grown in a greenhouse at 25 ± 5°C. Seedlings of tomato at four to five leaf stage were inoculated with each *F. fulva* isolate (1-5 × 10⁵ conidia·mL⁻¹). The infected plants were incubated in humidity chamber at 25°C for 48 hours and then transferred to a growth chamber at 25°C and 80% RH with 12-hour light a day. Disease severity of the plant was measured using percentage of infected leaf area 18 to 28 days after inoculation.

^yResistance gene of each cultivar to *F. fulva* was reported by Kim et al.(2011).

^xEach value represents the mean disease severity ± standard deviation of two runs with three replicates each.

^wS, susceptible; R, resistant.

그리고 Enya et al.(2009)은 화학적 방제를 하지 않은 지역에서 Cf-9 병원성 *F. fulva*가 발견된 것이 화학적 방제제를 사용하지 않음에 따라 더 빠르고 쉽게 새로운 race가 가속화되어 진화하였다고 보고 빠른 병원균의 진화에 대비하여 화학적, 경종적 방제와 저항성 토마토 품종이 조합된 체계적인 경작 방법이 발전되어야 한다고 하였다. 우리나라도 현재 상업적으로 많이 이용되고 있는 Cf-9 저항성 유전자를 극복하는 잎곰팡이 병원균 race가 포장에 존재하는 것으로 확인됨에 따라 토마토 잎곰팡이병 방제를 위한 종합적 방제 체계 구축이 필요하리라 생각된다.

13. 멜론 덩굴쪄김병 저항성 병리검정 기술 체계 확립

가. 서론

최근 고품질 소비추세에 따라 웰빙식품의 선호와 함께 멜론은 독특한 향기와 높은 당도로 인하여 대중적인 소비가 증가되고 있는 추세이다. 머스크멜론(*Cucumis melo* L.)은 박과류에 속하는 1년생의 식물로 수분을 제외한 대부분의 성분이 탄수화물이며 이 중 대부분은 가용성 당성분이며, 식이섬유도 소량 함유되어있다. 수확하여 후숙을 시키면 단맛과 특이한 향기가 나는 것이 멜론의 주요 특징이다. 우리나라에서 생산되는 것은 대부분이 시설 내에서 토경재배를 중심으로 연중 출하되고 있는데, 이는 멜론이 고온, 건조를 요하는 작물이기 때문이다. 일반적으로 다른 과실에 비하여 생육기간이 짧은 멜론은 전업으로 재배할 경우 봄·여름·가을·겨울의 연간 4회 재배가 가능하다(차 등, 2013).

Fusarium oxysporum f. sp. *melonis*에 의해서 발생하는 멜론의 덩굴쪄김병은 세계적으로 심각한 수량손실을 일으킨다. 이 병원균은 토양에서 끊임없이 생존하기 때문에 한번 정착하면 오랫동안 남는다. 식물의 뿌리로 침입한 후, 기주의 도관에 정착하여 식물에 시들음 증상을 나타내고 결국 유묘나 성숙한 식물체가 고사하게 된다. 이 덩굴쪄김병 균주는 영구적인 특성을 가지기 때문에 저항성 품종을 재배하는 것이 좋다(Stanley 등, 2002). *F. oxysporum* f. sp. *melonis*에는 4개의 레이스가 보고되었다. 레이스 0, 1, 2, 그리고 1,2인데, 레이스 1,2는 식물이 고사되기 전에 황화증상이 나타나는 레이스 1,2y와 식물 고사되기 전에 황화증상 없이 시들음 증상이 나타나는 레이스 1,2w로 나누어진다. 레이스 0, 1, 그리고 2의 저항성은 우성으로 단일 유전된다. 현재 레이스 0, 1, 그리고 2에 높은 저항성인 많은 지원이 보고되었고 이미 시판되고 있지만, 레이스 1,2에 대해서는 높은 저항성을 가진 유전자 밝혀지지 않았다(Matsumoto 등, 2011).

*F. oxysporum*은 형태상으로는 구별이 되지 않지만 적어도 80개 이상의 분화형을 가지며 각각의 기주에게 높은 기주특이성을 나타낸다. 하지만 오이나 수박 등 박과작물 간에 교차 병원성을 나타낸다는 많은 보고가 있다(Zhou 등, 2007). 최근 멜론의 수요 재배가 늘어가면서 멜론 덩굴쪄김병의 새로운 저항성 유전자원 탐색을 위해서는 멜론 덩굴쪄김병에 대한 효율적인 저항성검정법이 필요하다.

본 연구는 보유중인 균주를 분자생물학적으로 동정하고, 유전자형을 가진 여러 품종을 이용하여 레이스를 판별하고자하였다. *F. oxysporum* f. sp. *melonis*의 생장이 가장 좋은 최적배지를 선발하여 모든 실험에 이용하였다. 또한 기주특이성을 확인하고자 여러 박과작물에 접종하여 병발생을 확인해보았다. 멜론의 저항성 품종을 개발하기 위한 효율적인 덩굴쪄김병 저항

성 검정 방법을 확립하고자 시판되고 있는 멜론 품종의 저항성 정도를 실험하고, 이들 중 덩굴쪄김병에 대한 저항성의 정도가 다른 6종 품종을 선발하여 접종 방법, 접종원 농도, 침지 시간, 재배온도 등 다양한 발병 조건에 따른 멜론 덩굴쪄김병 발생 정도를 조사하였다.

나. 재료 및 방법

균주 동정

F. oxysporum f. sp. *melonis* GR 균주를 PDA 배지에 접종하고 25°C에서 7일 동안 배양한 후에 균사체를 수확하였다. InstaGene Matrix #732-6020 solution 20ul에 colony를 따서 현탁하여 12000rpm으로 5분간 원심분리 후 상등액 1ul을 사용하였다. 염기서열 분석을 위하여 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 프라이머, ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 프라이머(White 등, 1990), EF-1(5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3') 프라이머, EF-2(5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3') 프라이머(O'Donnell 등, 1998), 그리고 증류수 22.8ul, PCR buffer(10X) 3ul, dNTP 10mM, ITS1(10P) 1ul, ITS4(10P) 1ul, enzyme 2.5unit/ul의 반응액을 사용하여 PCR증폭을 수행하였다. PCR은 95°C에서 2분간 initial denaturation을 실시한 후에 denaturation 95°C/30초, annealing 54°C/30초, extention 72°C/1분으로 35 cycle을 수행하고 final extention 72°C에서 10분간 실시하였다(Wagacha 등, 2010). 분석된 염기서열은 BLAST search에 의해 GenBank에 등록된 ITS와 TEF영역의 염기서열과 비교하였다. *F. oxysporum* f. sp. *melonis* GR 균주와 Gen Bank로부터 얻은 염기서열은 CLUSTAL X(Thompson 등, 1997)와 PHYDIT program(Chun, 1995)을 이용하여 분석하였다. Neighbor-joining tree는 PHYLIP 3.57c package(Felsenstein, 1985)의 Kimura's 2-parameter distance model(Kimura, 1980)을 이용하여 작성하였다.

최적배지 선발

균주를 배양하기 위해 PDA배지에 *F. oxysporum* f. sp. *melonis* GR 균주를 접종하여 25°C incubator에서 7일 동안 전배양하였다. 125ml 삼각플라스크에 6종류의 배지(malt extract broth, Czapek-dox broth, potato dextrose broth, V8-juice broth, Clarified V8 broth, glucose-peptone-yeast extract broth)를 각각 3개의 플라스크에 50ml씩 담고 전배양한 PDA배지에서 균사 말단부위에 7mm cork borer로 균사 조각을 만들어 하나의 플라스크에 3조각씩 접종하였다. 접종한 배지는 shaking incubator(150rpm, 25°C)에서 배양한다. 배양한 broth배지에서 1ml씩 수거하여 4겹 거즈로 거르고 광학현미경하에서 hemocytometer를 이용하여 포자(소형 분생포자)수를 샘플 당 2회씩, 3일차부터 9일차까지 하루에 한번 같은 시각에 측정하였다.

멜론 재배

멜론 덩굴쪄김병 저항성 검정법을 확립하기 위해 시판중인 멜론 6품종 '레드퀸'(농협종묘), '썸머쿨'(코래곤종묘), '슈퍼세지'(아시아종묘), '아시아파파야'(아시아종묘), '얼룩파파야'(아시아종묘), '아시아황금'(아시아종묘) 종자를 선발하여 실험에 사용하였다. 6품종의 종자를 8 × 16 육묘용 연결 포트(15mL/pot, 범농사)에 원예용상토 5호(부농사)를 넣고 종자를 1립씩 파종하여 온실(25 ± 5°C)에서 plant growth stage에 따른 발병 실험을 제외한 모든 실험에서 14일 동안

재배하며 멜론 유묘를 실험에 사용하였고, plant growth stage에 따른 발병 실험을 위해서 각각 7일, 10일, 13일, 16일 동안 재배하여 사용하였다.

기주특이성 확인

멜론에 병을 일으키는 *F. oxysporum* f. sp. *melonis* GR 균주의 박과작물에 대한 교차병원성을 알아보기 위해 시판중인 오이 품종인 ‘아시아청장오이’와 ‘백미백다다기오이’, 멜론 품종인 ‘베타리치’와 ‘아시아황금’, 수박 품종인 ‘서태자’와 ‘꼬꼬마수박’, 그리고 참외 품종인 ‘금제’와 ‘조은대’에 접종하여 병 발생을 조사하였다.

레이스 검정

F. oxysporum f. sp. *melonis* GR 균주의 레이스를 검정하기 위해 *Fom-1*, *Fom-2* 특성을 가진 ‘Atlantis’, *Fom-2* 특성을 가진 ‘13M338’, *Fom-1* 특성을 가진 ‘Charentais’, *F. oxysporum* f. sp. *melonis* GR에 저항성인 ‘썸머쿨’과 ‘아세아성하’, *F. oxysporum* f. sp. *melonis* GR에 감수성인 ‘얼룩과과야’와 ‘아시아황금’에 균주를 접종하여 멜론 덩굴쪄짐병의 발생을 조사하였다.

접종원 준비

멜론에 덩굴쪄짐병을 일으키는 *F. oxysporum* f. sp. *melonis* GR 균주를 potato dextrose agar(Becton, Dickinson and Co.) 배지에 접종하고 25°C에서 7일 동안 배양한 균총으로부터 균사조각을 떼어 V8 juice broth 배지에 접종하고 이를 25°C 암 상태에서 7일 동안 150 rpm으로 진탕배양 하였다. 배양한 *F. oxysporum* f. sp. *melonis* GR 균주는 4겹의 거즈로 걸러 균사를 제거하고, 광학현미경하에서 hemacytometer를 이용하여 포자(소형분생포자)의 농도를 측정하였다. 접종원 농도를 제외한 모든 발병 조건의 실험의 경우 3.3×10^6 conidia/ml가 되도록 멸균수로 희석하여 접종원으로 사용하였으며, 접종원 농도실험을 위해서 1.3×10^4 conidia/ml, 4.0×10^4 conidia/ml, 1.2×10^5 conidia/ml, 3.6×10^5 conidia/ml, 1.1×10^6 conidia/ml로 조정하였다.

덩굴쪄짐병균 접종

온실에서 재배한 멜론의 뿌리를 물로 세척하여 흙을 제거한 후 포자현탁액에 30분동안 침지하여 접종하였다. 5 × 8 연결 포트(68mL/pot, 범농사)에 원예용상토 5호를 넣고 접종한 멜론 유묘를 이식하였다. 그 외 뿌리 상처 유무에 따른 멜론 품종의 덩굴쪄짐병 발생 실험에서의 뿌리 상처는 앞에서와 같은 방법으로 준비한 멜론 뿌리를 2.0-2.5 cm 정도 남도록 가위로 자른 후에 동일한 방법으로 포자현탁액에 침지하여 접종하였다. 또한 침지시간에 따른 멜론 덩굴쪄짐병 발생의 경우 *F. oxysporum* f. sp. *melonis* GR 포자현탁액에 각각 0시간, 0.5시간, 1시간, 3시간 및 5시간 동안 침지하여 접종하였다. 0시간 처리를 위해서는 준비한 멜론 뿌리를 포자현탁액에 담근 즉시 꺼내 토양에 이식하였다.

발병 및 병조사

접종 후 재배온도에 따른 멜론의 덩굴쪄짐병 발생 실험은 접종한 멜론 유묘를 1일 동안 20°C, 25°C 및 30°C 습실상에서 배양한 후 20°C, 25°C 및 30°C 향온향습실에서 하루에 12시간

씩 광을 조사하면서 약 3주 동안 재배하여 병의 발생을 조사하였다. 그 외 모든 실험은 접종한 멜론의 어린 유묘를 1일 동안 25℃ 습실상에서 배양한 후 항온항습실 (25 ± 5℃)로 옮겨 약 1주 동안 재배한 후 28℃ 항온항습실로 옮겨서 약 2주 동안 재배하였다.

병조사는 식물체의 뿌리를 뽑은 후 도관을 잘라 발병 정도를 조사하였다. 발병정도는 0 = 건전, 1 = 도관이 갈변되고, 생육이 약간 억제된 것, 2 = 도관이 갈변되고, 생육이 현저히 억제된 것, 3 = 도관이 갈변되고, 생육이 심하게 억제된 것, 4 = 고사 등의 5단계로 하였다. 평균 발병도가 1.0 이하인 경우에는 저항성, 1.1~2.5는 중도저항성, 2.5초과는 감수성으로 판정하였다. 단, 기주특이성을 확인하는 실험에서는 0 = 건전, 1 = 지하부는 갈변되나 지상부는 병징이 없는 것, 2 = 지하부는 갈변되고 지상부는 약간 생육이 억제되는 것, 3 = 지하부는 갈변되고 지상부는 생육이 억제되며 약간 황화된 것, 4 = 지하부는 갈변되고 지하부와 지상부 모두 생육이 억제되며 심하게 황화된 것, 5 = 고사 등의 5단계로 하여 평균 발병도가 1.0 이하인 경우에는 저항성, 1.1-2.5는 중도저항성, 2.5 초과는 감수성으로 판정하였다. 모든 실험은 10반복으로 2회 실시하였다. 통계분석은 SAS(SAS Institute, Inc., 1989, Cary, NC) 프로그램을 이용하여 ANOVA 분석을 하였으며, 처리 평균간 비교를 위하여 Duncan's multiple range test($P = 0.05$)를 실시하였다.

다. 결과 및 고찰

균주 동정

*Fusarium*속의 종간 구별에는 여러 가지 유전적 마커 중 translation elongation factor 1- α (TEF) 유전자가 가장 적합하다고 평가되고 있다(Geiser 등, 2004). 이를 이용하여 *F. oxysporum* f. sp. *melonis* GR 균주의 염기서열을 분석한 결과, NCBI에서 등록된 균과 98%이상의 상동성을 나타내었다(Fig. 35).

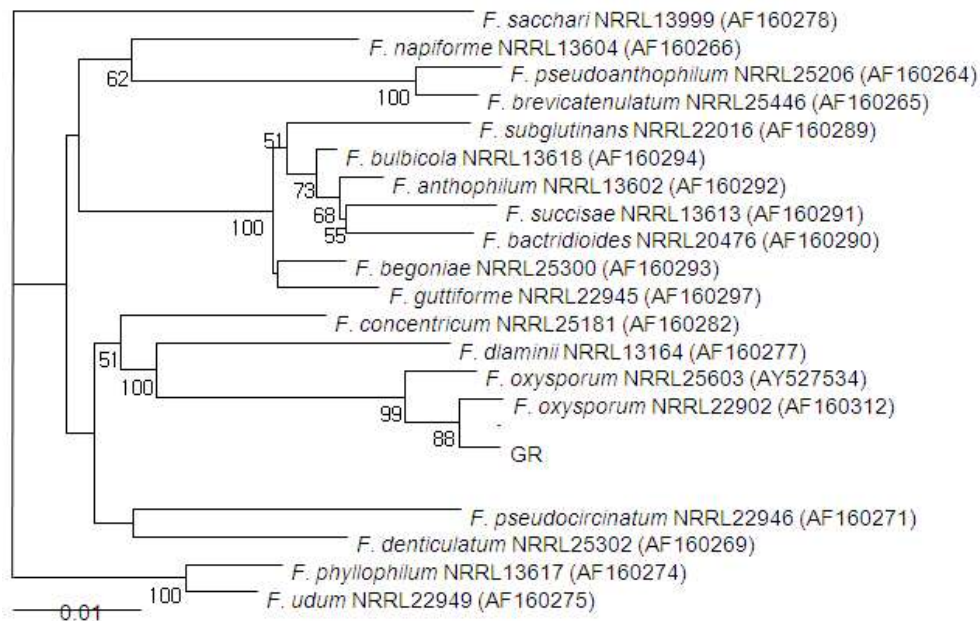


Fig. 35. Phylogenetic tree based on sequences of TEF regions of *Fusarium oxysporum* isolates and related species. The values above each branch indicate the percentage levels of

bootstrap support (>50%) for the branch point based on 1000 resamplings. The bar represents 0.1 substitutions per nucleotide position. () is GenBank accession number.

최적배지선발

V8-juice broth(V8), clarified V8 broth(C-V8), malt extract broth(MEB), Czapek-dox broth(CDB), potato dextrose broth(PDB), glucose-peptone-yeast extract broth(GYPB) 총 여섯 가지 배지에 *F. oxysporum* f. sp. *melonis* GR을 접종하여 9일간 포자 형성을 관찰한 결과, V8 배지에서 눈에 띄게 포자가 많이 형성되었다(Fig. 36). Clarified V8 broth배지에서는 V8 배지보다는 포자가 적게 형성되었지만 다른 배지보다는 훨씬 많은 양의 포자를 형성하였다. 하지만 접종 후 8일부터는 형성률이 점점 낮아지기 시작했다. 반면에 GYPB와 PDB는 접종 후 7일부터 포자형성률이 높아지기 시작했지만 포자수는 V8 배지보다는 현저히 낮았다. MEB와 CDB에서는 포자가 매우 적게 형성되었다. 따라서 *F. oxysporum* f. sp. *melonis* GR 균주를 효율적으로 생산하기 위해서는 V8-juice broth에서 7일 동안 배양하는 것이 최적이라고 생각되었다.

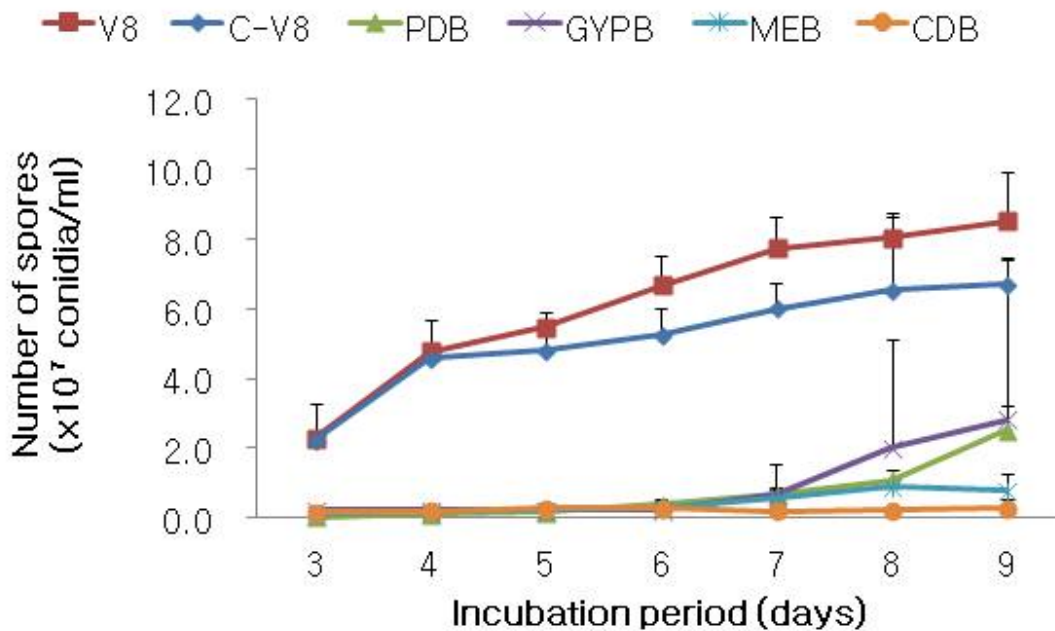


Fig. 36. Spore production of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* according to incubation medium.

기주 특이성 확인

멜론 덩굴쪄김병균을 시판 중인 오이, 멜론, 수박, 그리고 참외 품종에 접종하여 병 발생을 조사한 결과, 오이 품종인 ‘아시아청장오이’와 ‘백미백다다기오이’, 수박 품종인 ‘서태자’와 ‘꼬꼬마수박’에는 병이 거의 발생하지 않았다. 반면에 멜론 품종인 ‘베타리치’와 ‘아시아황금’, 참외 품종인 ‘금제’와 ‘조은대’는 대부분 고사하여 매우 심한 감수성이 나타났다(Table 59). 따라서 *F. oxysporum* f. sp. *melonis* GR은 멜론 또는 참외에만 병을 일으켜 기주특이성이 있는 병원균이라 판단된다.

Table 59. Development of Fusarium wilt on cucurbits caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* GR

Crop	Cultivar	Scientific name	Disease index	Response
Cucumber	Asiacheongjang	<i>Cucumis sativus</i>	1.0 ± 1.8	R
	Baekmibaekdadagi	<i>Cucumis sativus</i>	0.0 ± 0.0	R
Melon	Betarich	<i>Cucumis melo</i>	3.6 ± 1.2	S
	Asiahwanggeum	<i>Cucumis melo</i>	5.0 ± 0.0	S
Watermelon	Seotaja	<i>Citrullus lanatus</i>	1.0 ± 1.3	R
	Kokoma	<i>Citrullus lanatus</i>	0.0 ± 0.0	R
Oriental melon	Geumje	<i>C. melo</i> var. <i>makuwa</i>	5.0 ± 0.0	S
	Joeundae	<i>C. melo</i> var. <i>makuwa</i>	5.0 ± 0.0	S

^aResistance response, R = resistant ≤ 1.0; MR = 1.0 < moderately resistant ≤ 2.5; S = susceptible > 2.5.

***F. oxysporum* f. sp. *melonis* GR의 레이스 검정**

F. oxysporum f. sp. *melonis* GR 균주를 레이스 판별 품종에 접종하여 멜론 덩굴쪄김병 발생을 조사한 결과, *Fom-1*, *Fom-2* 특성을 가진 ‘Atlantis’와 ‘MR-1’과 *Fom-2* 특성을 가진 ‘13M338’에서는 저항성이었고, *Fom-1* 특성을 가진 ‘Charentais’는 감수성을 보였다. 대조로 사용한 *F. oxysporum* f. sp. *melonis* GR에 저항성인 ‘썸머쿨’과 ‘아세아성하’는 저항성을 잘 나타냈으며 GR 균주에 감수성인 ‘얼룩파파야’와 ‘아시아황금’도 감수성을 나타냈다(Table 60). 따라서 이들 결과로부터 *F. oxysporum* f. sp. *melonis* GR 균주는 race 1인 것으로 확인되었다 (Table 61).

Table 60. Disease resistance of race differential varieties

Cultivar	Trait	Disease index	Response ^a
Atlantis	<i>Fom-1</i> , <i>Fom-2</i>	0.4	R
MR-1	<i>Fom-1</i> , <i>Fom-2</i>	0.0	R
13M338	<i>Fom-2</i>	0.1	R
Charentais	<i>Fom-1</i>	4.0	S
Eolukpapaya	S	3.9	S
Asiahwanggeum	S	4.0	S

^aResistance response: R, resistant ≤ 1.0; MR, moderately resistant 1.1-2.5; S, susceptible, > 2.5.

Table 61. Race determination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* GR using the differential varieties of Risser et al. (1985).

Cultivar or genotype	Race			
	0	1	2	1,2 (the old race 3)
Charentais T	S	S	S	S
Doublon (<i>Fom-1</i>)	R	S	R	S
CM 17-187 (<i>Fom-2</i>)	R	R	S	S
MR-1	R	R	R	S

시판중인 멜론 품종의 덩굴쪄김병에 대한 저항성

현재 시판중인 23종의 멜론 품종의 *F. oxysporum* f. sp. *melonis* GR에 의한 덩굴쪄김병에 대한 저항성을 조사하였다. 조사한 품종 중 각 회사에서 덩굴쪄김병에 대한 저항성 품종으로 공시한 ‘장춘FR과파이야R’, ‘레드퀸’, ‘썸머쿨’, ‘아세아성하’, ‘아세아조춘만추’ 등 5종 중 ‘아세아조춘만추’를 제외한 4종은 모두 1.0 이하의 낮은 발병도를 보여 저항성임을 확인했다(Table 62). 그 외 덩굴쪄김병 저항성 품종으로 공시되지 않은 18종 품종 중 ‘얼스골드킹’, ‘얼스해피’, ‘얼스킹’, ‘슈퍼세지’, ‘아시아과파야’, ‘얼스탑윈’, ‘얼스VIP’, ‘얼스파티’, ‘얼스엘리제’, ‘얼스엘리트’, ‘JJ하계’, ‘베타리치’, ‘아세아조춘만추’ 등 13종은 중도저항성을 나타냈다. 그렇지만 ‘얼룩과파야’, ‘JJ원탑’, ‘세지오케이’, ‘장춘FR과파이야S’, ‘아시아황금’은 2.1 이상의 높은 발병도를 나타내어 감수성 품종임을 알 수 있었다.

멜론 덩굴쪄김병에 대한 효율적인 저항성 검정 방법을 확립하기 위하여, 위의 결과로부터 *F. oxysporum* f. sp. *melonis* GR에 대한 저항성 정도가 다른 6종 품종 즉, 저항성인 ‘레드퀸’과 ‘썸머쿨’, 중도저항성인 ‘슈퍼세지’와 ‘아시아과파야’, 그리고 감수성 품종인 ‘얼룩과파야’와 ‘아시아황금’ 등을 선발하였다.

Table 62. Resistance degree of the twenty-three commercial melon cultivars to Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* GR^a

Cultivar	Trait	Disease index	Response ^b
Earlsgoldking		1.3	MR
Earlshappy		1.4	MR
Earlsking		1.9	MR
Superseji		1.3	MR
Asiapapaya		2.0	MR
Eolukpapaya		4.0	S
Earlsmounthagye		1.3	MR
Earlstopone		1.5	MR
Jjonetop		2.2	S
Sejiokay		2.4	S
Jangchoon-FRpapaiya-R	R	1.0	R
JangchoonFRpapaiya-S		4.0	S
Redqueen	R	0.7	R
EarlsVIP		1.1	MR
Earlsparty		1.1	MR
Earlselysee		1.3	MR
Earlselite		2.0	MR
Jjhagye		1.7	MR
Betarichi		2.0	MR
Asiahwanggeum		4.0	S
Summercool	R	0.7	R
Asiaseongha	R	1.0	R
Asiajochunmanchu	R	1.3	MR

^aSeven-day-old seedlings of twenty-three melon cultivars were inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *melonis* GR by dipping the roots of seedlings in spore suspension of 3.3×10^6 conidia/ml for 0.5 hr. The inoculated plant were incubated in dew chamber at 25°C for 24 hour and then transferred to a growth room at 25°C with 12-hour light a day. After 6 days, transferred to a growth room at 28°C with 12-hour light a day. After 3 weeks, disease severity of the seedling was investigated on a scale of 0-4, where 0 = represents no disease; 1 = slight discoloration of vascular system, slight stunting; 2 = slight discoloration of vascular system, marked stunting; 3 = slight discoloration of vascular system, severe stunting; 4 = death. Each value represents the mean disease index of ten replicates each.

^bResistance response: R, resistant, ≤ 1.0 ; MR, moderately resistant, 1.1-2.5; S, susceptible, > 2.5 .

뿌리 상처에 따른 멜론 덩굴쪼김병 발생

가위로 멜론의 뿌리를 자른 후에 덩굴쪼김병균(*F. oxysporum* f. sp. *melonis* GR)을 접종하거나, 뿌리를 자르지 않고 접종한 6품종 멜론이 덩굴쪼김병에 대한 저항성의 차이가 있는 지

를 알아보기 위하여 실험한 결과, 각 품종의 상처 유무에 따른 덩굴쪄김병 발생은 차이가 거의 없었다(Fig. 37). 즉, 뿌리 상처와 관계없이 ‘레드퀸’, ‘썸머쿨’, 그리고 ‘슈퍼세지’는 저항성이었으며 ‘얼룩과과야’와 ‘아시아황금’은 높은 감수성을 나타냈다. 본 연구에서 멜론 품종의 덩굴쪄김병에 대한 저항성 정도는 뿌리를 자른 멜론과 자르지 않은 멜론의 저항성 정도가 거의 유사하므로, 멜론 덩굴쪄김병에 대한 저항성 검정을 위해서는 멜론 유묘의 뿌리로부터 흙을 제거한 후 뿌리를 자르지 않고 *F. oxysporum* f. sp. *melonis* GR의 포자현탁액에 침지하는 것이 적절하다고 판단되었다.

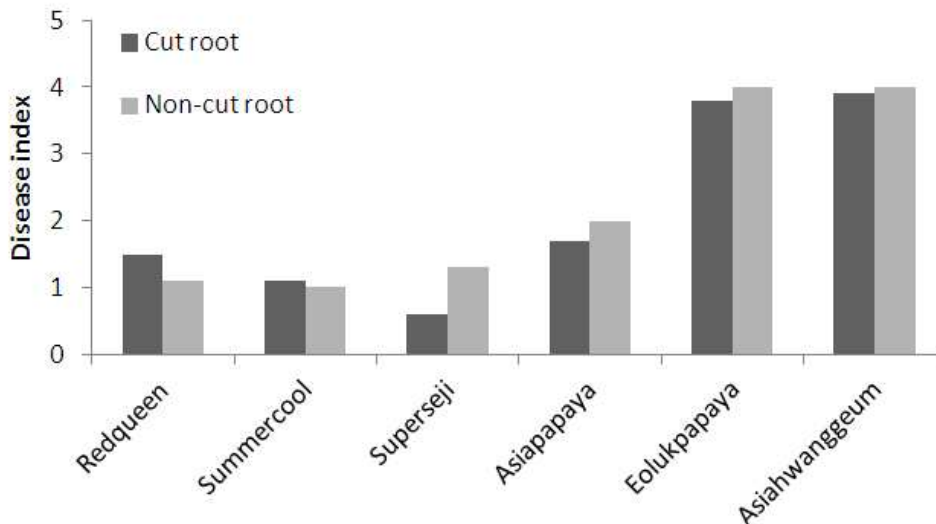


Fig. 37. Development of Fusarium wilt on six melon cultivars when cut and non-cut roots were dipped in the spore suspension of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* GR . Seven-day-old seedlings of each cultivar were inoculated with *Fusarium oxysporum* f sp. *melonis* GR by dipping the roots of seedlings in spore suspension of 3.3×10^6 conidia/ml for 0.5hr. The inoculated plant were incubated in dew chamber at 25°C for 24 hour and then transferred to a growth room at 25°C with 12-hour light a day. After 6 days, transferred to a growth room at 28°C with 12-hour light a day. After 3 weeks, disease severity of the seedling was investigated on a scale of 0-4, where 0 = represents no disease; 1 = slight discoloration of vascular system, slight stunting; 2 = slight discoloration of vascular system, marked stunting; 3 = slight discoloration of vascular system, severe stunting; 4 = death. Each value represents the mean disease index of two runs with ten replicates each.

침지 시간에 따른 멜론 덩굴쪄김병 발생

멜론 뿌리를 포자현탁액에 30분내지 5시간 동안 침지하여 6종 멜론 품종의 덩굴쪄김병 발생 정도를 실험한 결과, 침지시간이 증가함에 따라 덩굴쪄김병 발생이 증가하였으나, 저항성 정도에는 큰 차이가 없었다(Fig. 38). 그러나 중도저항성인 ‘아시아과과야’는 5시간 이상 접촉하였을 때 감수성을 나타내며 침지하는 시간이 증가함에 따라 병 발생이 크게 증가하였다. 한편, 높은 감수성을 나타내는 ‘얼룩과과야’와 ‘아시아황금’은 포자현탁액에 침지한 즉시 꺼내어 이식

하여도 4.0에 가까운 높은 덩굴쪄김병 발병도를 보였다. 따라서 효율적인 멜론 덩굴쪄김병 저항성 검정을 위해서는 양배추 뿌리를 포자현탁액에 30분 정도 침지하여 접종하는 것이 효율적이라 생각되었다.

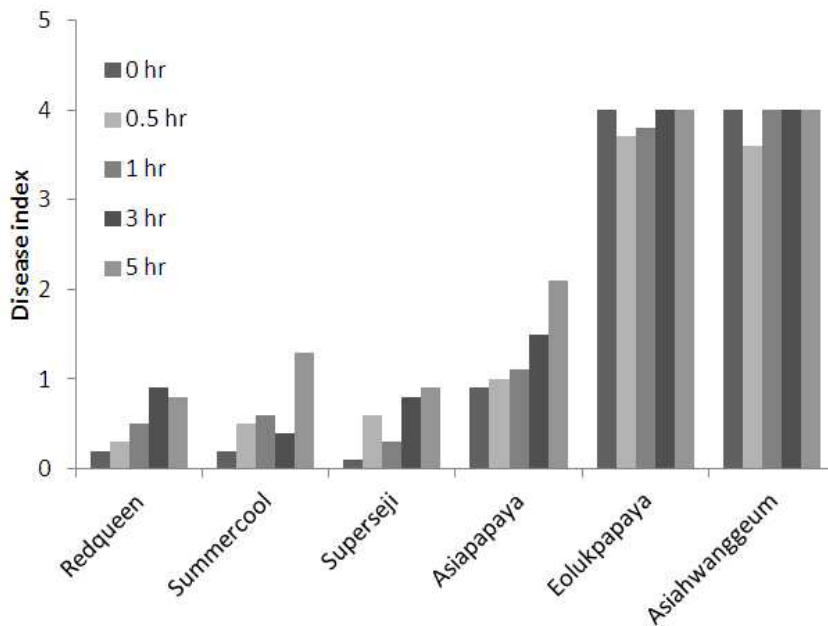


Fig. 38. Fusarium wilt occurrence of six melon cultivars according to dipping period of roots in spore suspension. Seven-day-old seedlings of each cultivars were inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* GR by dipping the roots of seedlings in spore suspension of 3.3×10^6 conidia/ml. The inoculated plant were incubated in dew chamber at 25°C for 24 hour and then transferred to a growth room at 25°C with 12-hour light a day. After 6 days, transferred to a growth room at 28°C with 12-hour light a day. After 3 weeks, disease severity of the seedling was investigated on a scale of 0-4, where 0 = represents no disease; 1 = slight discoloration of vascular system, slight stunting; 2 = slight discoloration of vascular system, marked stunting; 3 = slight discoloration of vascular system, severe stunting; 4 = death. Each value represents the mean disease index of two runs with ten replicates each.

접종원 농도에 따른 멜론 덩굴쪄김병 발생

멜론 뿌리를 *F. oxysporum* f. sp. *melonis* GR 균주의 다섯 가지(1.3×10^4 , 4.0×10^4 , 1.2×10^5 , 3.6×10^5 , 1.1×10^6 conidia/ml) 농도의 포자현탁액에 침지하여 6종 멜론 품종의 덩굴쪄김병 발생 정도를 실험한 결과, ‘얼룩과파야’와 ‘아시아황금’은 농도와 관계없이 모든 농도에서 높은 감수성을 나타냈다. 대부분의 품종에서 접종원의 포자 농도가 증가함에 따라 덩굴쪄김병의 발병도도 미미하게 증가하였다(Fig. 39). 중도저항성인 ‘아시아과파야’의 경우 1.3×10^4 , 4.0×10^4 , 1.2×10^5 conidia/ml 농도의 접종구에서 저항성을 나타냈고, 3.6×10^5 , 1.1×10^6 conidia/ml 농도의 접종구에서는 중도저항성을 나타냈다. Kuc(1987, 1994)는 식물체의 병 저항성 검정에서 고농도로 병원균을 접종하면 식물체가 조기 낙엽되어 저항성을 유도할 수 있는

있어 정확한 저항성 검정이 이루어질 수 없다고 보고한 바 있다. 따라서 멜론 덩굴쪄김병에 대한 저항성 정도를 조사하기 위해서는 3.6×10^5 conidia/ml 농도의 포자현탁액에 침지하는 것이 효과적이라 생각되었다.

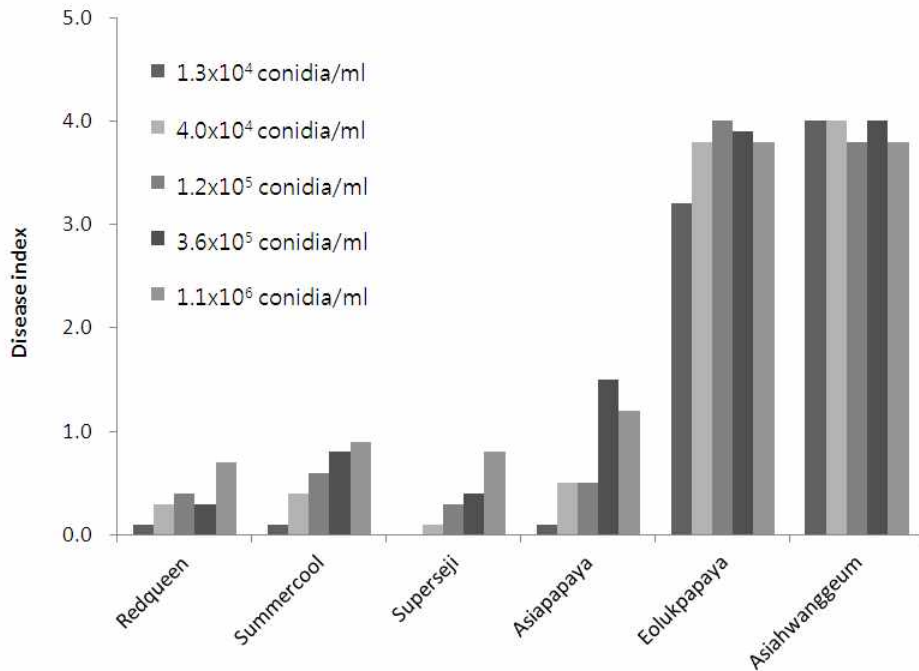


Fig. 39. Fusarium wilt occurrence of six melon cultivars according to root dipping period. Seven-day-old seedlings of each cultivar were inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* GR by dipping the roots of seedlings in each spore suspension for 0.5 hr. The inoculated plant were incubated in dew chamber at 25°C for 24 hour and then transferred to a growth room at 25°C with 12-hour light a day. After 6 days, transferred to a growth room at 28°C with 12-hour light a day. After 3 weeks, disease severity of the seedling was investigated on a scale of 0-4, where 0 = represents no disease; 1 = slight discoloration of vascular system, slight stunting; 2 = slight discoloration of vascular system, marked stunting; 3 = slight discoloration of vascular system, severe stunting; 4 = death. Each value represents the mean disease index of two runs with ten replicates each.

재배 온도에 따른 멜론 덩굴쪄김병 발생

멜론 품종들의 덩굴쪄김병에 대한 저항성이 접종 후의 재배 온도에 따라 차이를 나타내는지 조사하기 위하여 20°C, 25°C 및 30°C에서 병 발생을 실험하였다. 그 결과 20°C에서 저항성 품종인 ‘레드퀸’은 중도저항성을 나타냈고, 중도저항성인 ‘슈퍼세지’와 ‘아시아파파야’는 감수성이 나타났다(Fig. 40). 전체적으로 20°C에서는 병 발생이 심하고 빠르게 나타났다. 30°C에서는 중도저항성을 보이던 ‘슈퍼세지’가 저항성을 나타냈다. ‘얼룩파파야’와 ‘아시아황금’은 모든 온도에서 심한 감수성을 나타냈다. 따라서 저항성 품종과 감수성 품종 간에 덩굴쪄김병에 대한 저항성 정도의 차이가 큰 30°C에서 재배하는 것이 적합하다고 판단된다. 하지만 30°C의 항온항습실에서는 초기에 유묘들이 자리를 잡지 못하고 시들어 죽는 경우가 많기 때문에 약 28°C에

서 저항성 검정을 하기로 하였다.

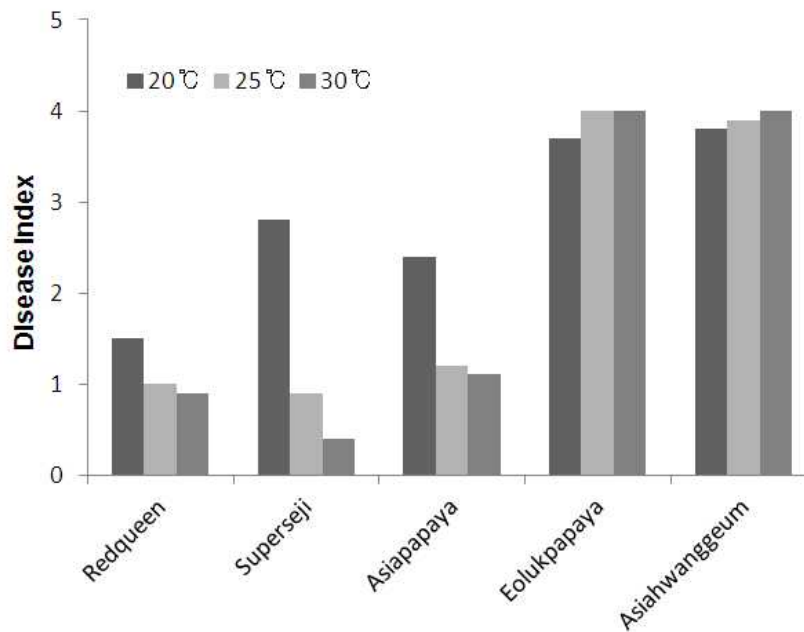


Fig. 40. Fusarium wilt occurrence of six melon cultivars according to incubation temperature. Seven-day-old seedlings of each cultivar were inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* GR by dipping the roots of seedlings in spore suspension of 3.3×10^6 conidia/ml for 0.5 hr. The inoculated plant were incubated in dew chamber at 20°C, 25°C, and 30°C for 24 hour and then transferred to a growth room at 20°C, 25°C, and 30°C, respectively, with 12-hour light a day. After 3 weeks, disease severity of the seedling was investigated on a scale of 0-4, where 0 = represents no disease; 1 = slight discoloration of vascular system, slight stunting; 2 = slight discoloration of vascular system, marked stunting; 3 = slight discoloration of vascular system, severe stunting 4 = death. Each value represents the mean disease index of two runs with ten replicates each.

멜론의 생육시기에 따른 덩굴쪼김병 발생

각각의 멜론 품종으로 유묘의 성장 정도가 다른 식물체를 이용하여 멜론 덩굴쪼김병 발생 정도를 실험하였다. 실험 결과, 모든 품종에서 멜론의 생육시기에 관계없이 저항성 품종인 ‘레드퀸’, ‘썸머쿨’은 병발생이 적었고, ‘슈퍼세지’는 병이 거의 발생하지 않았으며, ‘아시아파파야’도 중도저항성의 범위에 있었다. 또한 감수성 품종인 ‘얼룩파파야’와 ‘아시아황금’은 심한 덩굴쪼김병 발생을 보였다(Fig. 41). 식물체를 오래 키우면 실험기간이 길어지고 재배하는데 어려움이 있다. 따라서 7일 키운 유묘를 실험에 사용하는 것이 효율적이라 생각되었다.

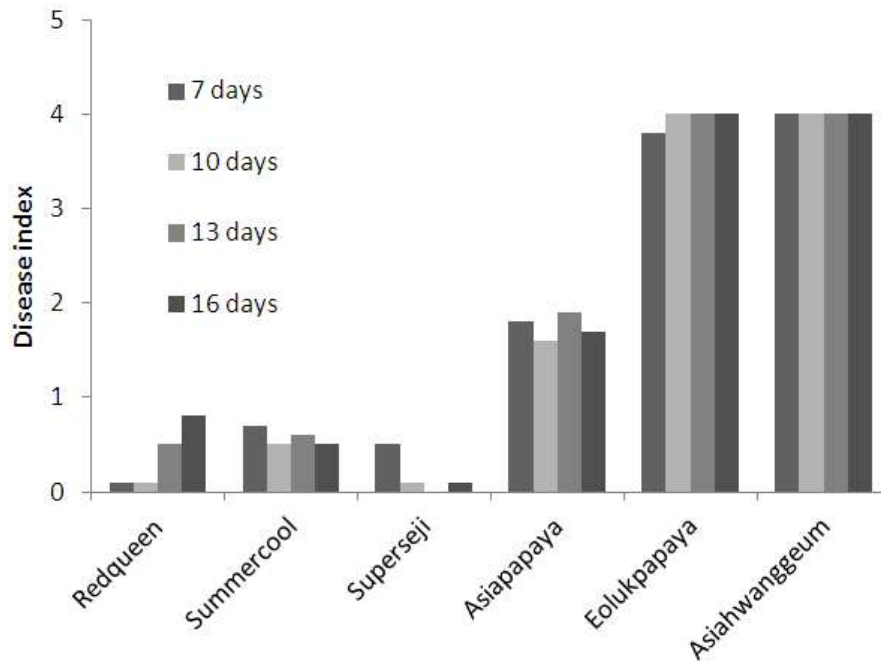


Fig. 41. Fusarium wilt occurrence of six melon cultivars according to plant growth stage. Respectively, seven-day-old, ten-day-old, thirteen-day-old, sixteen-day-old seedlings of each cultivar were inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* GR by dipping the roots of seedlings in spore suspension of 3.3×10^6 conidia/ml. The inoculated plant were incubated in dew chamber at 25°C for 24 hour and then transferred to a growth room at 25°C with 12-hour light a day. After 6 days, transferred to a growth room at 28°C with 12-hour light a day. After 3 weeks, disease severity of the seedling was investigated on a scale of 0-4, where 0 = represents no disease; 1 = slight discoloration of vascular system, slight stunting; 2 = slight discoloration of vascular system, marked stunting; 3 = slight discoloration of vascular system, severe stunting; 4 = death. Each value represents the mean disease index of two runs with ten replicates each.

14. 오이 덩굴쪼김병 저항성 병리검정 기술 체계 확립 가. 서론

*Fusarium oxysporum*은 전 세계적으로 퍼져있는 토양 전염성 병원균으로 100종 이상의 경제적으로 중요한 작물에 도관의 시들음과 피층에 괴사를 일으킨다(Both, 1971). 이 병원균이 뿌리를 통해 침입한 후, 지체부나 그 윗쪽의 도관을 폐쇄하여 식물체를 시들게 하는데, 박과작물의 경우 병에 걸린 도관 부위가 파열되어 줄기가 세로로 쪼개지는 병징 즉, 덩굴쪼김을 나타낸다(Lee and Lee, 1994).

*F. oxysporum*은 기주특이성에 가지며 그에 따라 적어도 80개 이상의 기주 분화형으로 나뉘어지고 있다(Armstrong and Armstrong, 1981; Snyder and Hansen, 1940). 박과작물에 침입하는 *F. oxysporum* 균주는 오이, 수박, 멜론, 박, 수세미 등의 다섯개의 기주에 따라 기주분화형이 *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, *F. oxysporum* f. sp. *niveum*, *F. oxysporum* f. sp.

melonis, *F. oxysporum* f. sp. *lagenaria*, 및 *F. oxysporum* f. sp. *luffae* 등으로 나누어진다. 그러나 플로리다에서 수박으로부터 분리된 *F. oxysporum* f. sp. *niveum* 은 머스크멜론에 병원성이 보고된바 있으며(Owen, 1955, 1956) *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*가 수박과 멜론에 병원성을 보이는 것(Owen, 1955)과 같이 기주 분화형의 기주 특이성에도 불구하고 박과작물 안에서는 교차 병원성이 많이 보고되고 있다.(Bouhot, 1981; Davis, 1966; Gerlagh and Blok, 1988; Martyn and McLaughlin, 1983; McMillan, 1986; Owen, 1955, 1956).

오이에 침입하는 기주분화형인 *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*균주에 의해 발생하는 덩굴쪄짐병은 전세계적으로 가장 일반적인 채소 중 하나인 오이의 생장에 빠르고 심각하게 영향을 미쳐 품질과 생산량에 피해를 주고 있다(Ahn et al. 1998; Chen et al. 2010; Vakalounakis, 1993). 이 균은 부생균 상태로도 생존하며 토양 속에서 유기물 부족 없이 오랜기간 생존이 가능하므로(Burgess, 1981) 그 방제가 매우 어렵다. 이 병을 방제하기 위해 일반적인 화학농약을 많이 사용하고 있지만 잔류 농약 문제, 화학농약에 저항성 균주의 발생과 같은 부분에서 환경 문제를 야기할 수 있으므로 안전하고 효과적인 대안법이 필요하다. 현재 오이덩굴쪄짐병을 방제하기 위해 접목재배를 주로 이용하고 있으나 이 방법은 품질 면에서 오이 고유의 맛이 떨어지며 곡과 발생이 많아 상품 가치를 낮추고 접목시 노동력이 많이 요구되는 문제점이 있으므로(Yang and Kim, 1994) 이러한 현실에서 저항성 오이 품종 육성이 최선의 대안이다.

유전자형의 저항성 반응에 따라 *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*은 세 개의 레이스 1, 2, 3으로 구분되어지며(Armstrong et al., 1978), 오이의 Fusarium 저항성은 단일 우성 유전자 또는 단인자 또는 다인자 열성 유전자의 영향을 받는다(Kanno et al., 1991; Toshimitsh and Noguchi, 1975)

오이 저항성은 cvs. Ano 2와 Aofushinari 에서 발견된 다원유전자계(Kanno et al., 1991; Vakalounakis, 1996)나 cv. WIS-248 같은 품종이 보이는 *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* race 2에 저항성 단일 우성 유전자 'Foc' 등이 있으며(Netzer et al., 1977), 이후 Vakalounakis(1993, 1995), Vakalounakis and Smardas(1995)에 의해 알려진 *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* races 1 and 2 저항성인 단일 우성유전자 'Fcu-1'가 cvs. SMR-18와 WI-2757안에서 확인되었다..

현재 오이 덩굴쪄짐병에 대한 저항성 품종에 대한 요구에도 국내에선 저항성품종이 아직 판매되지 못하는 현실에서 저항성 유전자의 규명, 저항성 유전양식 및 저항성 품종 육성을 위한 분자표지 개발 등에 대한 연구가 시급하다. 따라서 이들 연구를 위해서는 효율적이고 신뢰할 수 있는 병 저항성 검정방법이 필요하다.

본 연구에서는 효율적인 오이 덩굴쪄짐병 저항성 검정방법을 확립하고자 오이로부터 *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*균주를 분리, 동정하고 그 균주를 이용하여 현재 시판되고 있는 오이 45품종과 대목 23품종에 대한 저항성 정도를 실험하고, 이들 중 덩굴쪄짐병에 대한 저항성 정도가 다른 6품종을 선발하여 접종원 농도, 뿌리 상처 유무, 재배온도, 생육정도 및 포자현탁액 침지시간 등 다양한 발병조건에 따른 오이 덩굴쪄짐병 발생을 조사하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 균주동정

2013년 강릉에서 채집한 전형적인 덩굴쪄김병 병반을 형성한 오이 식물체로부터 오이 덩굴쪄김병균이 분리되었다. 염기서열 분석을 통한 분리된 병원균의 동정을 수행하고자 PDA 배지에 접종되어 25°C에서 7일 동안 배양한 균사체를 InstaGene matrix (Bio-Rad, USA)를 사용하여 산물을 얻어 ITS(Internal Transcribe Spaces)영역과 TEF(translation elongation factor 1 a)영역의 Polymerase chain reaction(PCR) 증폭을 수행하였다. ITS영역은 universal primer ITS1(5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')/ITS4(5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')를 이용하였고, TEF영역은 EF1T(5'-ATG GGT AAG GAG GAC AAG AC-3')/EF2T(5'-GGA AGT ACC AGT GAT CAT GTT-3')를 이용하여(O' Donnell et al., 1998) 동정하였다. PCR 반응액은 InstaGene matrix 산물 1ul, 10mM의 dNTP 1ul, 10pmol의 primer 각각 1ul, 10×Buffer 3ul, 2.5unit/ul의 EF-Taq DNA polymerase(Solgent, Korea)를 0.2ul 넣고 멸균수로 반응액의 부피를 최종 30ul가 되게 하였다. ITS영역 유전자 증폭은 95°C에서 5분간 initial denaturation을 실시한 후에 denaturation 95°C/45초, annealing 55°C/1분, extention 70°C/1분으로 35 cycle을 수행하고 final extension 70°C에서 10분간 실시하였고, TEF영역 유전자 증폭을 위해 95°C에서 2분간 initial denaturation 후에 denaturation 95°C/30초, annealing 54°C/30초, extention 72°C/1분으로 35 cycle을 수행하고 final extension 72°C에서 10분간 수행하였다. 그리고 PCR 산물은 Big Dye® terminator v3.1 cycle sequencing kits(Applied Biosystems, USA)로 반응 후 각각의 primer로 DNA Engine Tetrad 2 peltier thermal cycler(Bio-Rad, USA)을 이용하여 PCR반응을 수행하고 ABI Prism 3730xl Analyzer 96 capillary type (Applied Biosystems, USA)로 염기서열 분석결과를 얻었다. 그리고 이 염기서열을 BLAST search에 의해 GenBank에 등록된 ITS영역 또는 TEF영역의 염기서열과 비교하였고, 동정하고자 하는 균주와 GenBank로부터 얻은 염기서열은 CLUSTAL X(Thompson et al., 1997)와 PHYDIT program version 3.0(Chun, 1995)을 이용하여 분석하였다. Neighbor-joining tree는 PHYLIP 3.57c package(Felsenstein, 1985)의 Kimura's 2-parameter distance model(Kimura, 1980)를 이용하여 작성하였다.

(2) 최적 배지 선발 및 접종원 준비

분리한 병원균의 효율적인 배양을 위한 포자 생성 최적배지를 선발하고자 일반적으로 균류 배양에 많이 사용되고 있는 6종류의 배지 Czapek-dox broth(CDB), potato dextrose broth(PDB), malt extract broth(MEB), clarified V8 broth(C-V8 broth), V8-juice broth(V8 broth), glucose-yeast extract-peptone broth(GYPB)를 사용하였다(Table 63). 본 균주를 PDA 배지에 접종하여 25°C에서 7일간 배양된 균사 말단부분을 7mm cork borer로 잘라내어 각각의 배지 50ml에 3조각을 접종하고 7일 동안 150rpm으로 25°C 암상태로 진탕배양 하였다. 배양된 균주를 4겹의 거즈로 걸러 균사를 제거하고 광학현미경하에서 hematocytometer를 이용하여 포자(소형분생포자)의 농도를 측정하였다.

최적 포자 생성을 위한 배지로 선발된 배지를 이용하여 동일한 방법으로 접종원을 준비 하였으며 접종원 농도 실험을 제외한 모든 실험의 경우는 1.0×10^7 conidia/ml가 되도록 멸균수로 희석하여 접종원으로 사용하였고, 접종원 농도 실험에서는 1.1×10^6 , 3.3×10^6 , 1.0×10^7 , 3.0×10^7 , 9.0×10^7 conidia/ml 농도로 준비하였다.

Table 63. Compositions of media for spores production of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* ① in this study.

Media	Composition
Czapek-dox broth	Sucrose 30.0g, sodium nitrate 3.0g, dipotassium phosphate 1.0g, magnesium sulfate 0.5g, potassium chloride 0.5g, ferrous sulfate 0.01g, distilled water 1L
Potato dextrose broth	Potato starch 4g, dextrose 20g, distilled water 1L
Malt extract broth	Malt extract 6.0g, maltose 1.8g, dextrose 6.0g, yeast extract 1.2g, distilled water 1L
Clarified V8 broth	V8 200ml, CaCO ₃ 3.0g-centrifuge at 4000rpm for 15min, distilled water 1L
V8-juice broth	V8 juice 200ml, CaCO ₃ 3.0g, distilled water 1L
Glucose-yeast extract -peptone broth	Glucose 20.0g, yeast extract 5.0g, bacto-peptone 5.0g, distilled water 1L

(3) 식물체 재배

균주의 기주를 확인하고자 오이(아시아청장, 백미백다다기), 멜론(베타리치, 아시아황금), 수박(서태자, 꼬꼬마), 참외(금제, 조은대) 8품종을 선발하여 각각의 종자를 8×16 연결포트(50ml/pot, 범농사)에 원예용상토 5호(부농사)를 넣고 포트당 1립씩 파종하여 온실에서 7일간 재배한 유묘를 실험에 사용하였다.

시판 중인 오이 45품종(한성백다다기, 노다지백다다기, 오대백다다기, 대선, 은미에스, 무진장, 일동청장, 드레곤삼척, 통일백다다기, 글로리삼척, 녹야청청, 백침맛짱, 아시아노각, 은천백다다기, 아시아스트라이크, 웰빙맛짱, 청록맛짱, 호동청장, 네박자, 중복삼척, 하늘백다다기, 미니사엽, 흑룡삼척, 월하삼척, 계대백과, 러스보이, 미니큐, 젤루존백침, 79낙합, 낙동청장, 미인백다다기, 신세대, 신정품, 싱싱백다다기, 정선삼척, 청화흑진주, 팔도삼척, 화이트, 은성백다다기, 조은백다다기, 평강내병삼척, 입추낙합, 강력삼척, 아시아청장, 백미백다다기)과 대목 23품종(서포트, 뉴타입, 눈부셔, 유니온, 슈퍼흑종, 쓰야까EX, FR히어로, FR홍삼대목, 불페토좌, FR루트과워, FR보디가드, FR서태자, 내병토좌, 신토좌, 대력3호, 신FR불사조, 불로장생, 황제토좌, 중토좌, NO.8, 강근토좌, 신토좌, RS111)을 구입하여 저항성 검정 실험을 위한 품종 선발을 위해 위와 동일한 방법으로 재배하였다.

오이덩굴쫄김병 저항성 검정법을 확립하기 위해 오이 4품종 ‘러스보이’(아시아종묘), ‘미니큐’(아시아종묘), ‘글로리삼척’(아시아종묘), ‘중복삼척’(신젠타)과 오이 대목 2품종 ‘서포트’(쿠루메원종육성회), ‘눈부셔’(한국다끼이) 종자를 생육 정도에 따른 실험을 제외한 모든 실험은 동일하게 파종하여 온실에서 7일간 재배 후 사용하였고, 생육 정도에 따른 실험에서는 7, 10, 13, 16일간 재배하여 실험을 수행하였다.

(4) 병원균 접종

온실에서 재배한 식물체의 뿌리를 물로 세척하여 흙을 제거한 후 포자 현탁액에 30분 동안 침지하여 접종하였다. 5 × 8 연결 포트(68ml/pot, 범농사)에 원예용상토 5호(범농사)를 넣고

접종한 유묘를 이식하였다. 그 외 뿌리 상처 유무에 따른 발생 실험에서의 뿌리 상처는 위의 방법으로 준비한 식물체 뿌리를 2-2.5cm 정도 남기고 자른 후 동일한 방법으로 접종하였다. 또한 침지시간에 따른 발생 실험에서는 침지시간을 0, 0.5, 1, 3, 5 시간 동안 침지 접종하였으며, 0시간 처리는 식물체의 뿌리를 포자현탁액에 침지 후 즉시 꺼내어 이식하는 방법으로 수행하였다.

(5) 발병 및 병조사

접종 후 재배 온도에 따른 실험은 접종한 식물체 유묘를 20℃, 25℃ 및 30℃ 습실상에서 24시간 동안 배양 후 각 온도의 항온실에서 하루 12시간씩 광을 처리하며 재배하며 오이 덩굴쪄짐병의 발생을 관찰하였고, 접종원의 포자농도와 상처 유무에 따른 병 발생 실험은 25℃ 습실상에서 24시간 배양 후 25℃ 항온항습실로 옮겨 3주 동안 재배하고 병 발생을 조사하였다. 온도별 실험이 진행된 후 수행한 생육시기와 침지시간에 따른 병 발생 실험은 25℃ 습실상에서 24시간 배양하고 25℃ 항온항습실에서 일주일 정도 재배 후 28℃ 항온항습실로 옮겨 2주 동안 재배한 후 병조사를 실시하였다.

병조사는 식물체의 뿌리를 뽑아 도관을 잘라 발병정도를 조사하였으며 발병정도는 0=건전, 1=도관이 갈변되고, 생육이 약간 억제된 것, 2=도관이 갈변되고, 생육이 현저히 억제된 것, 3=도관이 갈변되고, 생육이 심하게 억제된 것, 4=고사 등의 5단계로 하였다. 평균발병도가 1.0 이하인 경우에는 저항성, 1.0초과 2.0이하는 중도저항성, 2.0 초과는 감수성으로 판정하였고, 모든 실험은 10반복으로 2회 실시하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) 균주 동정

2013년 강릉에서 채집된 오이의 전형적인 오이 덩굴쪄짐병 병반으로부터 분리한 균주①의 ITS영역의 ITS1/4 염기서열을 분석한 결과, *F. oxysporum* (DQ459007) 균주와 100%의 염기서열 유사도를 보였으며, GenBank에 등록된 *F. oxysporum* 균주를 총 17개 균주의 ITS 염기서열과의 유연관계 분석을 수행하기 위해 이들 ITS 영역 염기서열 상동성 비교를 통해 작성된 phylogenetic tree에서 균주①과 *F. oxysporum*은 동일한 그룹으로 확인하였다(Fig. 42-A). *Fusarium* 속내 더욱 정확한 균의 동정을 위한 TEF영역의 EF1T/EF2T염기서열 분석(O' Donnell et al., 1998)에서도 *F. oxysporum* (AF160312)균주와 99.22%의 높은 유사도를 보이며 타 균주들과의 TEF 염기서열과의 염기서열 상동성 비교를 통한 유연관계 분석을 수행한 phylogenetic tree에서도 균주①과 *F. oxysporum*은 동일한 그룹을 형성하였다(Fig. 42-B). 따라서 균주①이 *F. oxysporum*임이 확인되었다.

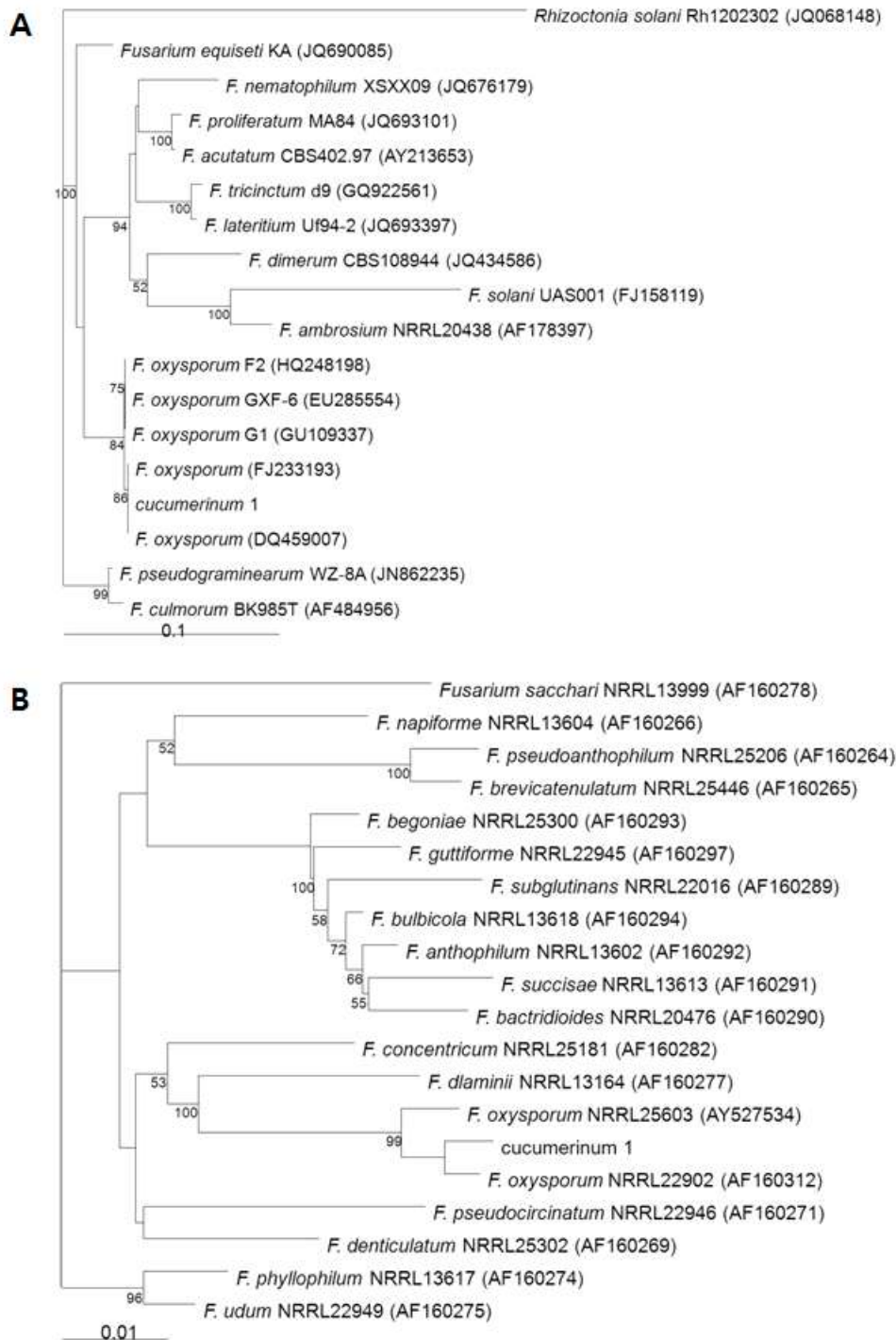


Fig. 42. Phylogenetic tree based on sequences of (A) rDNA-ITS and (B) TEF regions of *Fusarium oxysporum* isolates and related species. The values above each branch indicate the percentage levels of bootstrap support (> 50%) for the branch point based on 1000 resamplings. The bar represents 0.1 substitutions per nucleotide position. () is GenBank accession number.

(2) 덩굴쪍김병균의 기주 검정

분리한 균주①의 기주를 확인하고자 오이, 멜론, 수박 및 참외 네 가지 작물의 시판중인

2품종을 각각 선발하여 병원성 검정을 수행하였고 병원성 검정 결과에서 본 균주는 오이에 특히 높은 병원성을 보였고, 멜론, 참외에도 병원성이 나타내며 수박에는 비교적 낮은 병원성이 확인되었다(Table 64).

*F. oxysporum*은 형태로 구별이 불가능하지만 높은 기주 특이성을 나타내며 서로 다른 레이스나 분화형이 서로 다른 기주를 침입하므로 적어도 80개의 다른 기주분화형(formae speciales)으로 나뉜다(Agrios, 2005; Armstrong and Armstrong, 1981; Snyder and Hansen, 1940). 하지만 *F. oxysporum*의 기주분화형의 기주 특이성에도 불구하고 박과작물에서 분리된 *F. oxysporum*의 교차 병원성은 많이 보고되고 있다(Bouhot, 1981; Davis, 1966; Gerlagh and Blok, 1988; Martyn and McLaughlin, 1983; McMillan, 1986; Owen, 1955, 1956). 이 균주가 보이는 교차 병원성은 Owen (1955)에 의해 보고된 것처럼 *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*가 보인 수박과 멜론에 대한 병원성으로 판단되며, 균주①이 오이에서 분리되었으므로 오이에 강한 병원성을 나타내는 바 본 균주를 *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*균주로 확인하였다.

Table 64. Host-specific of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* ① to cucumber, melon, watermelon and oriental melon^a.

Crop	Cultivar	Scientific name	Disease index ^b
Cucumber	Asiacheongjang	<i>Cucumis sativus</i>	4.0 ± 0.0
	Beakmibaekdadagi	<i>Cucumis sativus</i>	2.8 ± 1.1
Melon	Betarich	<i>Cucumia melo</i>	2.0 ± 0.0
	Asiahwanggeum	<i>Cucumia melo</i>	2.6 ± 0.9
Watermelon	Seotaja	<i>Citrullus lanatus</i>	1.4 ± 1.1
	Kokoma	<i>Citrullus lanatus</i>	1.0 ± 0.0
Oriental melon	Geumje	<i>C. melo</i> var. <i>makuwa</i>	2.0 ± 0.0
	Joeundae	<i>C. melo</i> var. <i>makuwa</i>	3.0 ± 1.0

^a7-day-old seedlings of each cultivar were inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* ① by dipping the roots in spore suspension of 1.0×10^7 conidia \cdot ml⁻¹ for 30 min. The inoculated plants were incubated in dew chamber at 25°C for 24 hr and then transferred to a growth room at 25°C with 12-hour light a day. After 3 weeks, disease severity of the plants was investigated.

^bEach value represents the mean disease severity ± standard deviation of two runs with ten replicates each.

(3) 최적 포자형성 배지 선발

균주 ①의 효율적인 균주 활용을 위해 포자를 가장 많이 형성하는 배지를 선발하고자 Czapek-dox broth(CDB), potato dextrose broth(PDB), malt extract broth(MEB), clarified V8 broth(C-V8 Broth), V8-juice broth(V8 Broth) 및 glucose-yeast extract-peptone broth(GYPB)등 총 6개의 배지에 대한 포자 형성량을 확인하였고, 그 결과 GYPB 배지에서는 0.4×10^7 conidia/ml의 적은 양의 포자가 형성되었으나 V8 juice를 이용한 배지의 경우 C-V8 broth, V8 broth 모두 많은 양의 포자가 형성되었으며, 특히 원심분리 통해 맑아지는 과정에서 영양분

손실이 일어난 C-V8 broth에 비해 양분이 더 충분한 V8 Broth 배지에서 10.0×10^7 conidia/ml의 가장 높은 포자 형성량을 보였다(Fig. 43). 따라서 *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* ①균주의 최적 포자형성 배지는 V8 broth로 선발되었다.

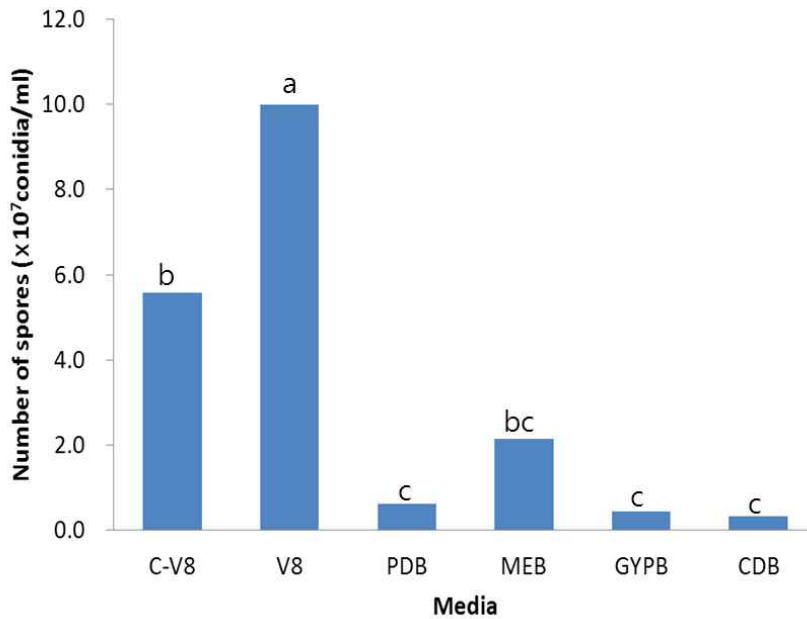


Fig. 43. Spores production of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* ① in six differential broth media (C-V8, clarified V8 broth; V8, V8-juice broth; PDB, potato dextrose broth; MEB, malt extract broth; GYPB, glucose-yeast extract-peptone broth; CDB, Czapek-dox broth). Values in the labeled with the same letter are not significantly different in Duncan's multiple range test at $P = 0.05$.

(4) 오이 품종 및 대목 품종의 덩굴쪄김병에 대한 저항성

현재 시판 중인 오이 45품종과 대목 23품종의 *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*에 의한 덩굴쪄김병 저항성을 조사하였다. 조사한 45종의 오이 품종 중 1.0이하의 낮은 발병도를 보이는 저항성 품종은 없었으며, 7품종(은천백다다기, 청록맛짱, 호동청장, 미니사엽, 러스보이, 미니큐, 백미백다다기)은 중도저항성을 보였고 나머지 38품종은 2.1이상의 높은 발병도를 보이며 감수성 품종으로 나타났다(Table 65). 그리고 대목 품종 23품종 모두 0.5 이하의 매우 낮은 발병도를 보여 덩굴쪄김병에 대한 높은 저항성이 확인되었다(Table 66). 이는 현재 시판 중인 대목 품종은 오이 덩굴쪄김병에 높은 저항성을 가지고 있지만 오이 품종에 오이 덩굴쪄김병에 대한 저항성 유전자가 도입되지 못하고 있음을 보여주며 덩굴쪄김병에 대한 오이 품종의 저항성 연구의 필요성을 보여주고 있다.

오이 덩굴쪄김병에 대한 효율적인 저항성 검정 방법을 확립하기 위하여, 위의 결과로부터 *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*에 대한 비교적 높은 저항성을 보인 '러스보이', '미니큐' 품종과 높은 감수성을 보인 '중복삼척', '글로리삼척', 그리고 오이 대목 품종 '서포트', '눈부서' 등을 6품종을 선발하였다.

Table 65. The degree of resistance of 45 commercial cucumber cultivars to Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* ①^a.

Cultivar	Scientific name	Disease index ^b	Response ^c
Hansungbaekdadagi	<i>Cucumis sativus</i>	2.2 ± 0.2	S
Nodagibaekdadagi	<i>Cucumis sativus</i>	2.8 ± 0.1	S
Ohdaebaekdadagi	<i>Cucumis sativus</i>	2.9 ± 0.7	S
Daeseon	<i>Cucumis sativus</i>	3.3 ± 0.3	S
EunmiS	<i>Cucumis sativus</i>	2.7 ± 0.8	S
Mujinjang	<i>Cucumis sativus</i>	2.2 ± 0.9	S
Ildongcheongjang	<i>Cucumis sativus</i>	2.6 ± 0.8	S
Dragonsamcheok	<i>Cucumis sativus</i>	3.1 ± 0.3	S
Tongilbaekdadagi	<i>Cucumis sativus</i>	2.8 ± 0.8	S
Glorysamcheok	<i>Cucumis sativus</i>	3.4 ± 0.0	S
Nogyacheongcheong	<i>Cucumis sativus</i>	3.6 ± 0.3	S
baegchimmasjjang	<i>Cucumis sativus</i>	2.5 ± 0.0	S
Asianogak	<i>Cucumis sativus</i>	2.7 ± 0.6	S
Euncheonbaegdadagi	<i>Cucumis sativus</i>	2.0 ± 0.0	MR
Asiastrike	<i>Cucumis sativus</i>	2.9 ± 0.4	S
Wellbeingmasjjang	<i>Cucumis sativus</i>	2.3 ± 0.8	S
Cheongnogmasjjang	<i>Cucumis sativus</i>	1.7 ± 0.7	MR
Hodongcheongjang	<i>Cucumis sativus</i>	1.8 ± 0.4	MR
Nebagja	<i>Cucumis sativus</i>	2.9 ± 0.8	S
Jungboksamcheok	<i>Cucumis sativus</i>	3.4 ± 0.4	S
Haneulbaekdadagi	<i>Cucumis sativus</i>	2.1 ± 0.8	S
Minisayop	<i>Cucumis sativus</i>	1.5 ± 0.3	MR
Heukyongsamcheok	<i>Cucumis sativus</i>	3.3 ± 0.4	S
Wolhasamcheok	<i>Cucumis sativus</i>	3.5 ± 0.4	S
Gyedaebaekgwa	<i>Cucumis sativus</i>	2.5 ± 0.1	S
Russboy	<i>Cucumis sativus</i>	1.4 ± 0.2	MR
Minicue	<i>Cucumis sativus</i>	1.1 ± 0.7	MR
JelruJohnbaekchim	<i>Cucumis sativus</i>	2.5 ± 0.1	S
79nakhap	<i>Cucumis sativus</i>	2.1 ± 0.4	S
Nagdongcheongjjang	<i>Cucumis sativus</i>	3.0 ± 0.3	S
Miinbaekdadagi	<i>Cucumis sativus</i>	2.9 ± 0.1	S
Sinsedae	<i>Cucumis sativus</i>	3.1 ± 0.4	S
Sinjeongpum	<i>Cucumis sativus</i>	3.0 ± 0.1	S
Singsingbaekbabagi	<i>Cucumis sativus</i>	3.1 ± 0.4	S
Jungsunsamcheok	<i>Cucumis sativus</i>	3.1 ± 0.7	S
Cheonghwaheukjinju	<i>Cucumis sativus</i>	3.2 ± 0.1	S
Paldosamcheok	<i>Cucumis sativus</i>	3.2 ± 0.1	S
White	<i>Cucumis sativus</i>	3.1 ± 0.3	S

Eunsungbaekdadagi	<i>Cucumis sativus</i>	2.1 ± 0.1	S
Joeunbaekdadagi	<i>Cucumis sativus</i>	2.4 ± 0.4	S
Pyeongkangnaebyeongsamcheok	<i>Cucumis sativus</i>	3.8 ± 0.0	S
Ipchunnakhap	<i>Cucumis sativus</i>	2.4 ± 0.3	S
Kangryeoksamcheok	<i>Cucumis sativus</i>	3.3 ± 0.1	S
Asiacheongjang	<i>Cucumis sativus</i>	2.7 ± 0.1	S
Baegmibaekdadagi	<i>Cucumis sativus</i>	2.0 ± 0.3	MR

^a7-day-old seedlings of each cucumber cultivar were inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* ① by dipping the roots in spore suspension of 1.0×10^7 conidia \cdot ml⁻¹ for 30 min. The inoculated plants were incubated in dew chamber at 25°C for 24 hr and then transferred to a growth room at 25°C with 12-hour light a day. After 3 weeks, disease severity of the plants was investigated.

^bEach value represents the mean disease severity ± standard deviation of two runs with ten replicates each.

^cR, MR, and S indicate resistant (disease index \leq 1.0), moderate resistant ($1.0 <$ disease index \leq 2.0), and susceptible (disease index $>$ 2.0), respectively.

Table 66. Resistance degree of 23 commercial cultivars of rootstock to *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* ①^a.

Scion	Cultivar	Scientific name	Disease index ^b	Response ^c
Cucumber	Support	<i>Lagenaria siceraria</i>	0.0 ± 0.0	R
	Newtype	<i>Lagenaria siceraria</i>	0.8 ± 1.3	R
	Nunbusyeo	<i>Cucurbita moschata</i>	0.0 ± 0.0	R
	Union	<i>Cucurbita moschata</i>	0.0 ± 0.0	R
	Superheukjong	-	0.1 ± 0.3	R
	JjeuyakaEX	-	0.5 ± 0.8	R
Watermelon	FR-hero	<i>Lagenaria siceraria</i>	0.0 ± 0.0	R
	FR-hongsam	<i>Lagenaria leucantha</i>	0.0 ± 0.0	R
	Bulpaetoza	<i>Lagenaria siceraria</i>	0.3 ± 0.5	R
	FR-rootpower	<i>Lagenaria siceraria</i>	0.0 ± 0.0	R
	FR-bodyguard	<i>Lagenaria siceraria</i>	0.0 ± 0.0	R
	FR-seotaja	<i>Lagenaria siceraria</i>	0.0 ± 0.0	R
	Naeyeongtoza	-	0.3 ± 0.7	R
	Shintoza	-	0.2 ± 0.4	R
	Daeryeok3ho	<i>Lagenaria siceraria</i>	0.0 ± 0.0	R
	ShinFR-bulsajo	-	0.0 ± 0.0	R
	Bulrojangsaeng	-	0.0 ± 0.0	R
Oriental melon	Hwangjaetoza	<i>Lagenaria siceraria</i>	0.0 ± 0.0	R

Jungtoza	<i>Lagenaria siceraria</i>	0.0 ± 0.0	R
NO.8	<i>Cucurbita moschata</i>	0.0 ± 0.0	R
Ganggeuntoza	<i>Cucurbita</i> sp.	0.0 ± 0.0	R
Shintoza	-	0.0 ± 0.0	R
RS111	-	0.0 ± 0.0	R

^a 7-day-old seedlings of each cucumber cultivar were inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* ① by dipping the roots in spore suspension of 1.0×10^7 conidia \cdot ml⁻¹ for 30 min. The inoculated plants were incubated in dew chamber at 25°C for 24 hr and then transferred to a growth room at 25°C with 12-hour light a day. After 3 weeks, disease severity of the plants was investigated.

^b Each value represents the mean disease severity \pm standard deviation of two runs with ten replicates each.

^c R, MR, and S indicate resistant (disease index \leq 1.0), moderate resistant ($1.0 <$ disease index \leq 2.0), and susceptible (disease index $>$ 2.0), respectively.

(5) 접종원 농도에 따른 덩굴쪄김병 발생

오이와 오이대목 품종의 뿌리를 *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* ①의 다섯 가지 농도의 포자 현탁액에 침지하여 접종한 결과, 포자 현탁액 농도의 변화에 관계없이 대목 품종 ‘서포트’, ‘눈부셔’는 0.0이하의 저항성을 유지하고 오이 감수성 품종 ‘중복삼척’, ‘글로리삼척’의 경우 또한 지속적인 3.0이상의 감수성을 보였다. 하지만 저항성 품종 ‘러스보이’, ‘미니큐’의 경우엔 포자 현탁액의 농도가 증가함에 따라 오이 덩굴쪄김병의 발병도가 증가하였고 ‘미니큐’의 경우 접종원의 농도가 높아져도 저항성으로 판정되는 범위 이내에 포함되지만 ‘러스보이’의 경우에 9.0×10^7 conidia/ml의 농도에서 중도저항성으로 판정되었다(Fig. 44). 실험에 사용한 가장 낮은 농도인 1.1×10^6 conidia/ml에서 1.0×10^7 conidia/ml의 농도 범위가 접종 농도에 따른 오이 덩굴쪄김병 발생에 안정적인 저항성 차이를 확인할 수 있는 농도이며, 포자 현탁액 준비의 효율성을 고려하여 1.1×10^6 conidia/ml 농도의 포자현탁액에 침지하여 접종하는 것이 가장 효과적이라고 생각되었다.

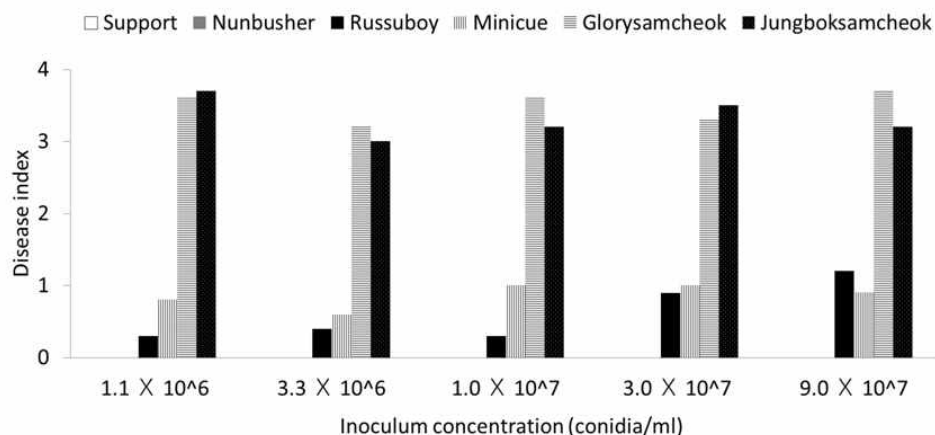


Fig. 44. Fusarium wilt occurrence of four cucumber cultivars and two rootstock cultivars

according to inoculum concentration. 7-day-old seedlings of each cultivar were inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* ① by dipping the roots in spore suspension of 1.1×10^6 , 3.3×10^6 , 1.0×10^7 , 3.0×10^7 , and 9.0×10^7 conidia \cdot ml⁻¹ for 30 min. The inoculated plants were incubated in dew chamber at 25°C for 24 hr and then transferred to a growth room at 25°C with 12-hour light a day. After 3 weeks, disease severity of the plants was investigated.

(6) 뿌리 상처에 따른 덩굴쪄김병 발생

뿌리 상처에 따른 덩굴쪄김병의 발생을 검정한 결과, 인위적인 상처를 가하여 접종하였을 때 상처가 없는 경우에 비해 저항성 오이 품종의 평균 발병도가 0.4 정도 증가하였으며 감수성인 오이품종과 높은 저항성을 가진 대목품종은 상처의 유무에 큰 상관없이 ‘중복삼척’, ‘글로리삼척’은 높은 감수성을, ‘서포트’와 ‘눈부셔’는 고도의 저항성을 나타냈다(Fig. 45). *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* ①를 식물체에 접종할 때 여러 연구자들은 뿌리를 잘라서 수행하고 있지만(Ahn et al., 1998, Vakalounakis, 1993, 1995), 오이 덩굴쪄김병 저항성 검정을 수행할 때 유묘의 흙을 제거하고 세척하는 과정에서 발생하는 상처만으로도 감염에 충분하므로 저항성 품종과 감수성 품종 간에 오이 덩굴쪄김병의 저항성 정도 차이를 확실히 보여주는 인위적인 상처를 내지 않는 방법이 더 바람직하다.

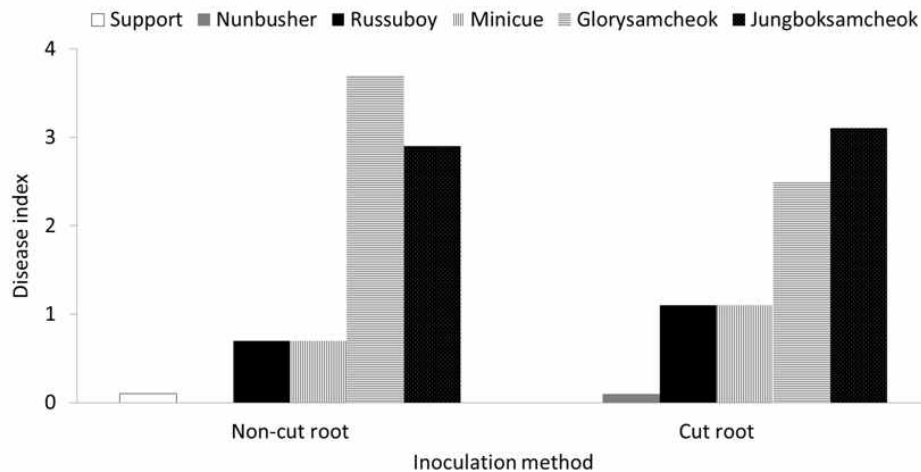


Fig. 45. Development of Fusarium wilt on four cucumber cultivars and two rootstock cultivars when cut and non-cut roots were dipped in the spore suspension of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. 7-day-old seedlings of each cultivar were inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* ① by dipping the cut and non-cut roots in spore suspension of 1.0×10^7 conidia \cdot ml⁻¹ for 30 min. The inoculated plants were incubated in dew chamber at 25°C for 24 hr and then transferred to a growth room at 25°C with 12-hour light a day. After 3 weeks, disease severity of the plants was investigated.

(7) 재배온도에 따른 덩굴쪄김병 발생

F. oxysporum f. sp. *cucumerinum*균주를 접종한 실험에 일반적으로 많은 연구자들은 접종 후 재배온도를 24-26°C로 수행하고 있으나(Ahn et al., 1998; Vakalounakis, 1993, 1995,

1996; Vakalounakis and Smardas, 1995), 세 가지 다른 재배온도(20℃, 25℃, 30℃)에서 덩굴쪄김병 발생을 검정한 결과 대목과 감수성 오이 품종의 저항성 반응은 재배온도에 따라 변화가 없지만 저항성 오이 품종의 경우 온도가 증가할수록 저항성이 증가하는 경향을 보였다(Fig. 46). 20℃의 경우 저항성 오이 품종인 ‘러스보이’와 ‘미니큐’의 평균 발병도가 3.2를 보이며 저항성이 완전 무너짐이 확인되었으며, 30℃에서는 0.9의 평균 발병도를 보이며 저항성을 매우 높게 나타내었다. 따라서 오이 덩굴쪄김병 저항성 검정을 위한 재배온도는 30℃가 적절한 것으로 판단되지만 30℃의 높은 온도에서는 식물체가 초기에 잘 정착하지 못하고 고사하는 경우가 다수 발생하게 되는 문제점이 있다. 따라서 온도가 높을수록 저항성 특성을 확인하는 것은 용이하지만 25℃에서 일주일 정도 초기 정착을 시키고 이후 좀 더 높은 온도(28℃내외)로 이동시켜 재배하는 방법 등의 초기 정착 문제를 해결할 대책이 필요하다.

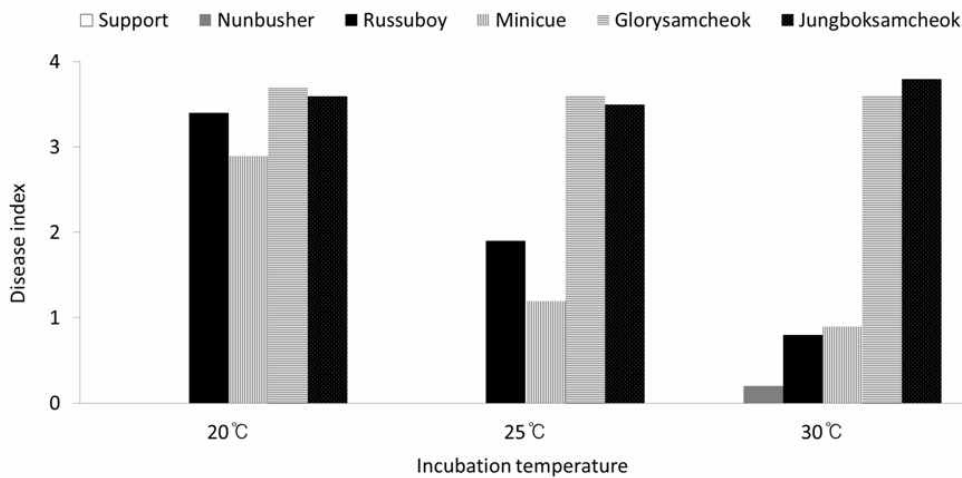


Fig. 46. Development of Fusarium wilt on on four cucumber cultivars and two rootstock cultivars incubated at some temperatures. 7-day-old seedlings of each cultivar were inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* ① by dipping the roots in spore suspension of 1.0×10^7 conidia \cdot ml⁻¹ for 30 min. The inoculated plants were cultivated at 20℃, 25℃ and 30℃ and then transferred to a growth room at 20, 25, 30℃ with 12-hour light a day, respectively. After 3 weeks, disease severity of the plants was investigated.

(8) 생육정도에 따른 덩굴쪄김병 발생

멜론 품종에 대한 *F. oxysporum* f. sp. *melon*의 접종법에 관한 연구 중 Latin et al.(1986)은 떡잎단계의 6일 식물체가 본엽 1엽이 펼쳐진 11일된 식물체에서 더 적은 병 발생을 확인하였으며, 일반적으로 식물체가 성장함에 따라 저항성이 높아지는 것이 통상적이다. 하지만 대목 품종과 감수성 오이품종에서는 생육정도에 따른 큰 차이를 확인할 수 없었으며 저항성 오이품종 ‘러스보이’와 ‘미니큐’의 경우 7일 재배된 유묘, 13일 재배된 유묘에서 각각 1.0, 2.4의 평균 발병도를 보이며 유묘가 성장함에 따라 일정한 시기까지 저항성 오이품종의 덩굴쪄김병에 대한 감수성이 증가함이 확인되었다(Fig. 47). 병리검정의 효율성도 높으며 품종 간 저항성 차이도 잘 나타낼 수 있는 7일 재배된 유묘를 사용하는 것이 오이 덩굴쪄김병 검정에 효율적일 것으로 판단된다.

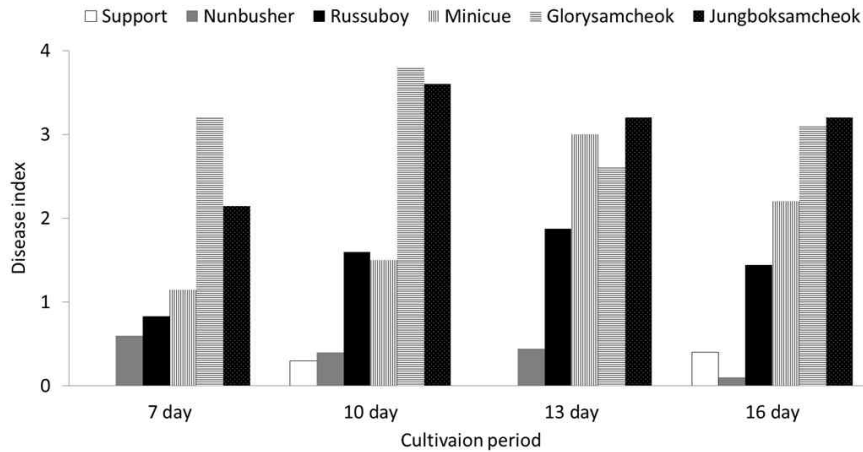


Fig. 47. Fusarium wilt occurrence on four cucumber cultivars and two rootstock cultivars inoculated at different growth stages. Seven-, ten-, and thirteen- and sixteen-day-old seedlings of each cultivar were inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* ① by dipping the roots in spore suspension of 1.0×10^7 conidia \cdot ml⁻¹ for 30 min. The inoculated plants were incubated in dew chamber at 25°C for 24 hr and then transferred to a growth room at 25°C. After 7 days, the inoculated plants were transferred to a growth room at 28°C with 12-hour light a day. At 3 weeks after inoculation, disease severity of the plants was investigated.

(9) 침지시간에 따른 덩굴쪄김병 발생

유묘의 뿌리를 포자 현탁액에 0, 0.5, 1, 3, 5시간 동안 침지하여 4종의 오이품종과 2종의 대목 품종의 덩굴쪄김병 발생 정도를 실험한 결과, 0, 0.5, 1, 3, 5시간에 평균 병발생량이 1.3, 1.2, 1.7, 1.6, 1.6을 보이며 침지시간이 길어질수록 병발생도가 약간 상승하였으나 그 차이가 크지 않으며, 침지하는 시간에 따른 발병도에서 큰 차이를 보이는 품종 또한 없었다(Fig. 48). 따라서 포자현탁액에 유묘 뿌리를 담갔다가 접종하는 0시간 접종만으로도 충분할 것으로 보이나 일반적으로 곰팡이 포자는 수 시간 내에 점액물질을 분비하여 기주에 부착하므로(Agrios, 2005) 충분한 접종시간을 제공하기 위해 30분 정도의 침지 접종 시간을 가지는 것이 바람직하고 생각된다.

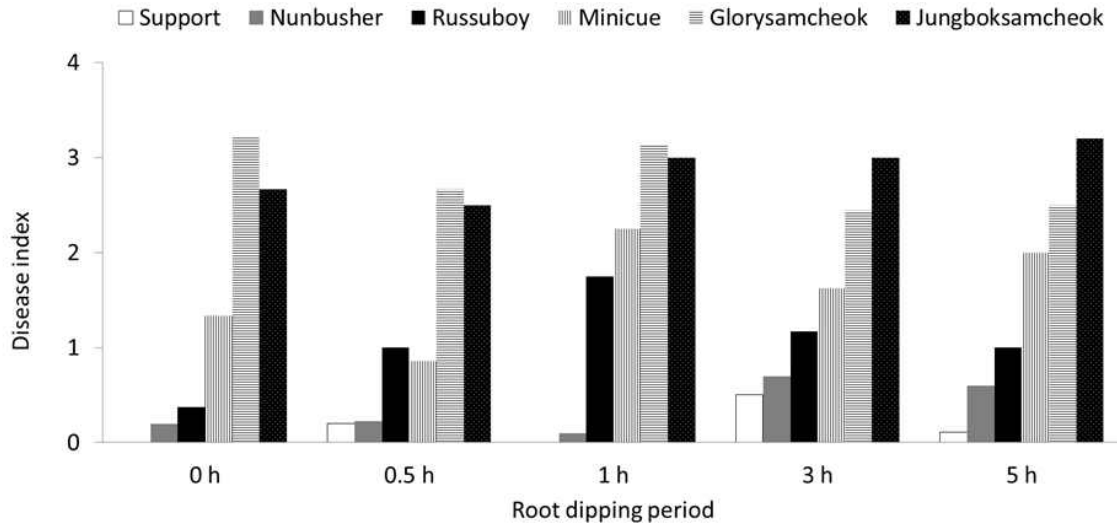


Fig. 48. Fusarium wilt development of four cucumber cultivars and two rootstock cultivars according to root dipping period. 7-day-old seedlings of each cultivar were inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* ① by dipping the roots in spore suspension of 1.0×10^7 conidia \cdot ml⁻¹ for 0, 0.5, 1, 3, and 5 hr. The inoculated plants were incubated in dew chamber at 25°C for 24 hr and then transferred to a growth room at 25°C. After 7 days, the inoculated plants were transferred to a growth room at 28°C with 12-hour light a day. At 3 weeks after inoculation, disease severity of the plants was investigated.

제2절. 세균병 병리검정 체계 확립

1. 토마토 및 고추 풋마름병 저항성 검정 체계 구축

가. 토마토 풋마름병 저항성 검정 체계 구축

(1) 병원균 및 식물품종

(가) 병원세균 확보 및 배양

토마토 풋마름병을 유발하는 병원세균인 *Ralstonia solanacearum* 32 균주를 확보하여 CPG 배지에 30도에서 배양하여 토마토 풋마름병 저항성 검정 구축에 활용하였다. 확보한 균주는 유전체 분석이 완료된 프랑스 균주인 GM11000 균주와 국내 고추, 토마토, 담배, 파프리카, 가지 등에서 발생한 풋마름병 균주를 확보하였으며 이들은 race 1 27균주와 race 3 5균주로 확인되었다. 병원 세균을 배양하기 위한 조건은 병원세균 접종을 위한 규모(원예용 부농상토 토양 200-300 g 포트의 식물체에 3포트 접종을 기준)로 대체적으로 배양하였다. 먼저, CPG broth 5 ml에 *R. solanacearum*을 접종하여 30°C, 200 rpm으로 18-24 hrs 전배양 하였다. 이후 전배양된 병원균을 200 ml의 CPG broth에 1/100 - 1/1,000 (0.2-2 ml) 접종한 후, 30°C, 200 rpm으로 18-24 hrs 배양하였다. 세균 배양액을 상온에서 8,000 rpm, 10분간 원심분리한 후, 상층액을 제거하였다. 세균 pellet은 50 ml 멸균수에 현탁하여 상온에서 8,000 rpm, 10분간 원심분리하여 배지 성분 및 외피다당류 일부를 제거하였다. 확보한 세균 pellet은 OD₆₀₀=0.3-0.5 ($3 \sim 5 \times 10^8$ CFU/ml) 가 되도록 100 ml 멸균수에 현탁하여 접종에 사용하였다.

(나) 토마토 식물의 확보 및 육성

풋마름병 검정을 위해 토마토 순계라인으로 풋마름병 저항성 순계품종인 Hawaii7998, Hawaii7996, B-Blocking, 06-9-44-2를 확보하여 활용하였고 감수성 순계품종으로 Bonny Best 품종과 Money Maker를 이용하였다. 필요한 경우 감수성 품종으로 상업재배 품종이 서건이 이용되기도 하였다. 이들 토마토 품종들은 유리온실에서 20-28도 온도조건에서, 광은 자연광 조건에서 4-6주간 생육하여 실험에 사용하였다. 각 식물의 종자는 지피포트(또는 작은 포트)에 직파한 후 3주차에 직접 유묘검정하거나 옮겨심기하여 파종 후 총 4-6주차에 유묘검정하기까지 육성하였다. 종자는 원예용 부농상토에 파종하며 별도의 시비를 하지 않았는데 이는 상업용 육묘장에서 알려지지 않은 시비를 하는 경우 병이 발생하지 않는 경우 있었기 때문이다. 식물을 육성시에는 습도를 조절하지 않고 수돗물을 관주하면서 육성하였다. 광이 부족하여 웃자라거나 냉해(냉해의 경우 배축이 보라색이며 잎도 뒷면이 보라색이 됨)를 받지 않도록 육성하였다. 식물의 육성은 온도 22-28도 사이에서 수행하였다.

(다) 풋마름병 접종 및 발병 조사

토마토 풋마름병 저항성 검정을 위한 적절한 검정법을 확립하기 위해 네 가지 서로 다른 접종법을 시도하였다. 토마토 품종 당 5 개체의 반복으로 접종하였으며 접종 후 식물체는 32도에서 14시간 광조건, 25도에서 10시간 광조건을 유지하며 발병을 관찰하였다. 접종법은 토양관주법, 뿌리절단과 토양관주, 뿌리 침지법, 줄기주입법을 시도하였다.

① 토양관주법의 경우(soil soaking) 포트 반복 간 변이가 발생할 수 있으며, 세균 현탁액을 식물체가 있는 포트에 부어주었다. 이때 토양 1 g 당 세균의 수가 10^7 CFU 되도록 농도를 조절하여 부어주었다. 대조구는 세균을 현탁하지 않은 동량의 멸균수를 부어주어 발병 조건에

식물체를 두고 관찰하였다.

② 뿌리절단과 토양관주(root cutting and soil soaking): 멸균된 scalpel이나 시약 스푼을 사용하여 식물체 배측으로 부터 주위 2-3 cm 둘레로 3회 삽입하여 식물체의 뿌리 부분을 절단하고 토양을 덮어주었다. 뿌리가 절단된 식물체에 위와 같은 토양관주법으로 세균 현탁액을 부어주었다.

③ 뿌리 침지(root dipping): 이 방법은 병원균의 병원성 확인을 위한 일반적인 방법이나 고추는 뿌리 침지로 인해 식물체 자체가 영향을 받으므로 적용되지 않고 토마토에만 적용가능한 방법이다. 식물체의 뿌리가 손상되지 않도록 뿌리 주변의 흙을 털어주고, 흐르는 물에 씻어 토양을 최대한 제거하였다. 토양이 제거된 식물체 뿌리 부분을 준비된 세균 현탁액에 뿌리가 완전히 잠기도록 담귀둔 후, 30분간 유지하였다. 이때 대조구는 세균을 현탁하지 않은 SDW에 뿌리를 담귀 두었다. 반응이 끝난 식물체는 다시 포트에 옮겨심기 한 후, 발병 조건에 식물체를 두고 관찰하였다.

④ 엽병주입(petiole infiltration): 이 방법은 병원세균의 병원성 확인을 위한 일반적인 방법으로 세균 현탁액 10 μ l를 tip으로 끌어 올린 후, 식물체의 줄기와 엽병 사이에 꽂아주었다. 이때 tip 끝에 공기가 유입되는 것을 주의해야 하며, 식물체 크기에 따라 1-3개의 tip을 꽂아주었다. 대조구는 세균을 현탁하지 않은 깨끗한 멸균수를 tip을 사용하여 주입하였다. 접종된 식물체는 발병조건에서 유지하며, 접종 1-2일 이후 식물체의 관다발 조직으로 유입된 것이 확인되면 tip을 제거하였다.

접종한 식물은 습도가 70%, 광조건 14시간(낮)/암조건 10시간(밤)인 조건에서 세가지 서로 다른 온도조건(낮 35도, 밤 28도/항상 32도/낮 32도 밤 25도)에서 유지할 수 있는 생육상에서 발병을 관찰하였다. 이때 발병지수(disease index)는 0, 시든 잎 없음; 1, 0-25%의 잎 시들음; 2, 25-50%의 잎 시들음; 3, 50-75%의 잎 시들음; 4, 75-100%의 잎 시들음으로 정량화하고 각 처리당 5-10개체의 식물체를 이용하고 무처리는 수돗물 만을 관주하였다.

(2) 식물품종에서 저항성/감수성 반응

(가) 적정 접종법: 토양관주

토마토 풋마름병 저항성 검정을 대규모로 진행하기 위한 적정 접종법은 자연 발병에 가장 유사한 방식인 토양 관주법으로 선택하였다. 뿌리 침지법의 경우 다수의 저항성 품종 후보를 대량 검정하기 위하여 소모되는 세균 현탁액의 양이 너무 많으며 뿌리의 상처로 인해 저항성 품종에서도 발병이 되어 대조구와 비교가 어려웠다. 줄기 주입법은 자연 상태의 발병과 달리 세균 현탁액이 직접 물관에 도달하도록 하여 저항성 대조구에서 발병으로 대조구와 비교가 어려웠다. 따라서 토양에 세균의 농도가 토양 1 g당 10^7 CFU 정도 처리되며 상처의 인위적인 유발이 없이 발병을 유도하는 토양관주방법으로 토마토 풋마름병을 검정하였다.

(나) 적정 병원균주

토마토 풋마름병을 유발하는 병원세균 32균주에 대하여 토마토 순계품종 6품종의 반응을 2차례에 걸쳐 토양관주법으로 평가하였다. 다음의 Table 1은 1차 검정 결과이며 이를 토대로 2차 검정 결과는 Table 2로 정리하였다. 이때 저항성 판정을 위해 감수성 식물체의 경우 5일 이내에 초기 병징이 관찰되거나 접종시 식물체 상태, 접종 조건 및 접종 후 식물체 관리 환경에 따

라 10일 이후에 병이 진전되는 경우를 관찰하였다. 감수성 식물체의 경우 접종 후 15일 이전에 고사 반응이 진행되며, 15일까지 병이 진전되지 않는 경우 일부 저항성으로 판단하였다. 토마토 풋마름병 저항성 계통의 경우 온도가 35도 이상 유지되면 완전한 저항성을 보이는 경우는 없는 것으로 보이며, 접종 후 유지 환경에 따라 발병 반응이 진행될 수 있었다. 최종 식물의 반응은 접종 후 15일을 기준으로 접종된 식물체의 disease index 값이 평균 1 이하면 저항성, 2 이하면 중도 저항성(추가 접종 or 3주 이상 관찰 필요), 2 초과인 경우 감수성으로 판단하였다.

Table 1. *Ralstonia solanacearum* 균주들의 토마토 순계에서 반응

균주(race)	서건	AVR	BB	H7996	H7998	BoB	MM
GMI1000 (1)	S	R	R	R	R	R	S
SL312 (1)	R	S	S	R	S	S	S
SL467 (1)	R	R	R	R	R	R	R
SL535 (1)	R	R	R	R	R	R	R
SL740 (1)	R	R	R	R	R	R	R
SL776 (1)	R	S	R	R	R	S	S
SL882 (1)	R	R	R	R	R	S	R
SL1020 (1)	S	S	R	S	S	S	S
SL1081 (1)	R	S	S	R	S	R	S
SL1870 (3)	S	S	S	S	S	S	S
SL1889 (1)	S	S	R	R	R	S	S
SL1924 (1)	R	R	R	R	R	R	R
SL1931 (1)	S	R	S	R	R	S	S
SL1944 (1)	S	R	R	R	R	S	S
SL1971 (1)	S	R	R	R	S	S	S
SL2029 (3)	S	R	R	R	R	S	S
SL2064 (3)	S	R	S	R	S	S	R
SL2264 (3)	S	R	R	R	R	R	R
SL2268 (3)	S	R	S	R	R	R	S
SL2312 (3)	S	R	R	S	R	R	R
SL2313 (3)	S	S	R	R	R	R	S
SL3384 (1)	S	R	R	R	R	R	R
SL3395 (1)	S	R	S	R	R	R	S
SL3400 (1)	R	R	S	R	R	R	R
SL3500 (1)	S	R	R	R	R	R	S
SL3505 (1)	S	R	R	S	R	S	S
SL3531 (1)	S	S	R	R	R	S	R

* AVR, 06-9-44-2; BB, B Blocking; H, Hawaii; BoB, Bonny Best; MM, Moneymaker

Table 2. *Ralstonia solanacearum* 균주들의 토마토 순계에서 반응(2차)

Strain (race)	AVR	BB	H7996	H7998	BoB	MM
SL341 (1)	S	S	S	S	S	S
SL740 (1)	S	S	R	R	R	R
SL882 (1)	R	R	R	R	S	S
SL1924 (1)	S	S	S	R	S	R
SL1944 (1)	R	M	R	R	S	R
SL2264 (3)	R	R	R	R	S	R
SL3384 (1)	S	R	R	R	S	S
SL3500 (1)	S	S	R	R	S	S
GMI1000 (1)	S	R	S	R	S	R

AVR, 06-9-44-2; BB, B Blocking; H, Hawaii; BoB, Bonny Best; MM, Moneymaker

위의 결과로부터 병원성이 강한 병원균인 SL341과 SL882를 저항성 품종의 평가를 위한 균주로 선정하였는데 특히 SL341 균주의 경우 병원성이 강하며 병원성 변이없이 안정적인 병원성을 보여주며 대부분의 저항성 품종에서 발병하였다. 반면 SL882의 경우는 약간의 변이는 있었으나 기존에 알려진 저항성 품종과 감수성 품종에서 예상되는 병원성을 보였다. 따라서 토양관주법에 따라 병원균주 SL341과 SL882를 토마토에 접종하여 평가하면 SL341 균주를 이용하여 기존의 저항성 자원과는 다른 자원을 탐색하는 것이 가능할 것이며 SL882 균주로는 기존의 저항성 계통과 유사한 자원을 탐색하는 것이 가능할 것이다.

(다) 온도에 따른 저항성 붕괴

다수의 균주들과 순계 토마토 품종을 활용하여 구축한 토마토 풋마름병 저항성 검정 시스템을 서로 다른 온도조건에서 평가하였다. 온도에 따른 저항성 반응의 변화 및 저항성/감수성 반응에 미치는 온도의 효과를 검정하기 위해 세 가지 온도조건(낮 35도, 밤 28도/항상 32도/ 낮 32도 밤 25도)에서 토마토 풋마름병의 발병을 검정하였다. 이용한 균주는 검정을 위해 선발되었던 *Ralstonia solanacearum* 균주들 SL341, SL882, SL1944 이었다. 풋마름병 검정 대조품종은 토마토 풋마름병을 검정하기 위한 순계 토마토 품종들로 이들을 지속적으로 증식하며 사용하였다. 저항성 순계라인으로 Hawaii7998, Hawaii7996, B-Blocking, 06-9-44-2를 활용하였고 감수성 순계라인으로 Bonny Best 품종과 Moneymaker를 이용하였다. 이들 토마토 품종들은 유리온실에서 20-28도 온도조건에서, 광은 자연광 조건에서 4-6주간 생육하여 실험에 사용하였다. 저항성/감수성 반응의 검정은 확립한 토양관주법으로 각 균주가 토양 1 g 당 10^7 cfu 접종될 수 있도록 관주하고 습도가 70%, 광조건 14시간(낮)/암조건 10시간(밤)인 조건에서 세가지 서로 다른 온도조건(낮 35도, 밤 28도/항상 32도/낮 32도 밤 25도)에서 유지할 수 있는 생육상

에서 발병을 관찰하였다. 이때 발병지수(disease index)는 0, 시든 잎 없음; 1, 0-25%의 잎 시들음; 2, 25-50%의 잎 시들음; 3, 50-75%의 잎 시들음; 4, 75-100%의 잎 시들음으로 정량화하고 각 처리당 10개체의 식물체를 이용하고 무처리는 수도물만을 관주하였다.

그 결과는 다음의 그림 Fig. 1 ~ 3에 정리하였다. 그림에서 보이듯이 온도가 낮 온도 35도까지 증가할수록 일부 균주(특히 SL1944의 경우)에서 저항성 품종인 Hawaii7998, Hawaii7996, B-Blocking의 저항성이 급격히 붕괴되는 것으로 나타났다. 이는 감수성 품종인 Bonny Best 나 Moneymaker에서 발병이 온도별로 차이가 나지 않는 현상과는 대조적이었다. 다른 저항성 대조품종인 06-9-44-2는 비교적 온도에 무관하게 저항성이 유지되었다. 일반적으로 병원성이 강한 SL341 균주에서는 온도별로 커다란 차이를 관찰할 수 없었으며 병원성이 약한 SL882 균주의 경우에도 뚜렷한 차이는 없었다. 저항성 품종 중에서 온도에 증가에 따른 급격한 차이를 보여주는 품종은 Hawaii7998 품종으로 32/25도 조건에서는 SL1944 균주에 대하여 14일까지 전혀 발병하지 않았으며 35/28도 조건에서는 접종 3-4일만에 발병하여 5일째에 완전히 고사하였다. 따라서 저항성 평가에 이들 순계를 활용하기 위하여 발병온도가 중요한 요인으로 여겨진다. 이는 고온에서 토마토에서 저항성의 급격한 붕괴 가능성과 함께 SL1944 균주가 고온에 고도로 적응된 균주일 가능성도 보여준다.

35°C-28°C

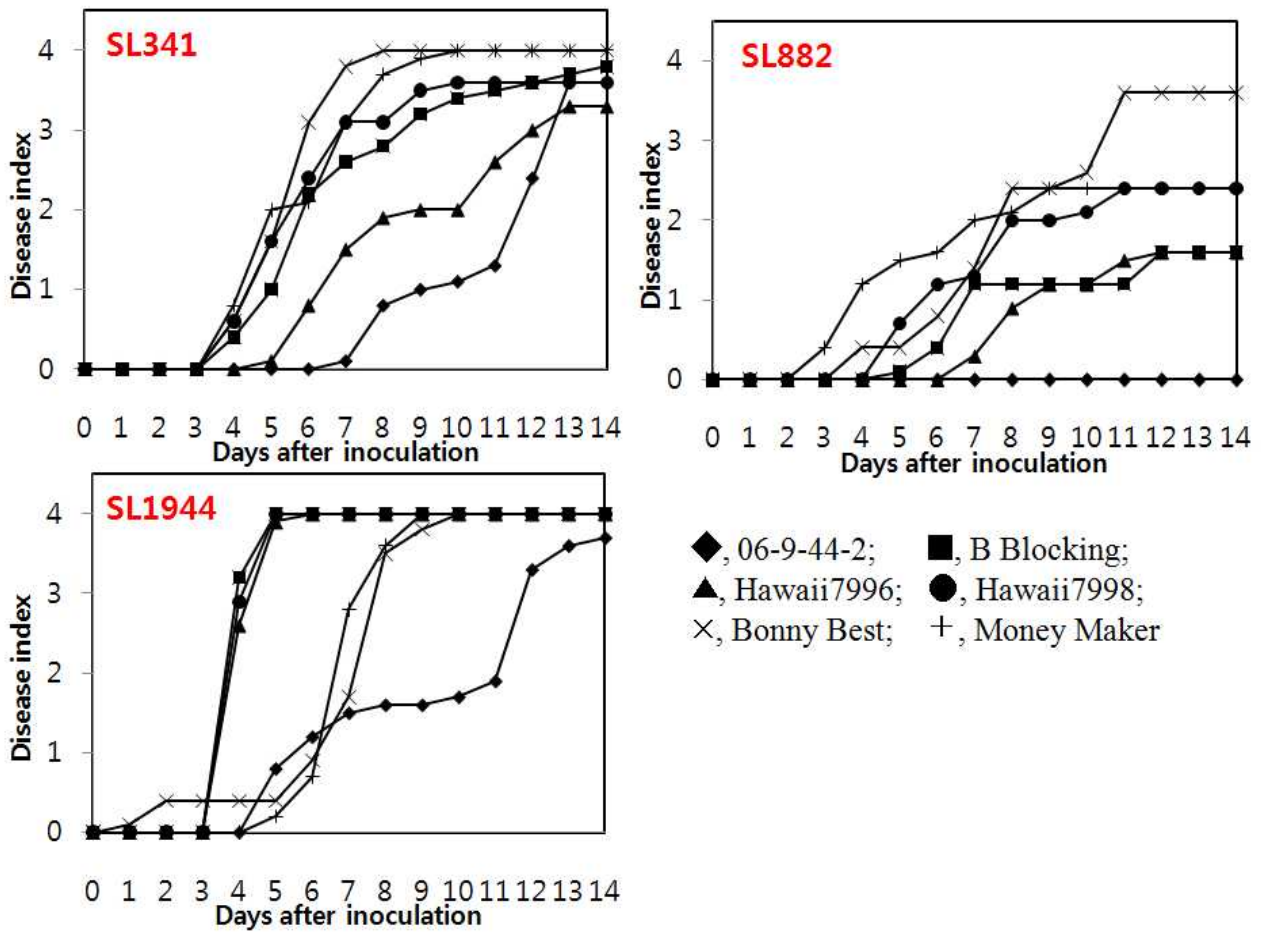


Fig. 1. 낮 35도, 밤 28도 조건에서 토마토 순계 품종들의 세가지 균주에 대한 반응

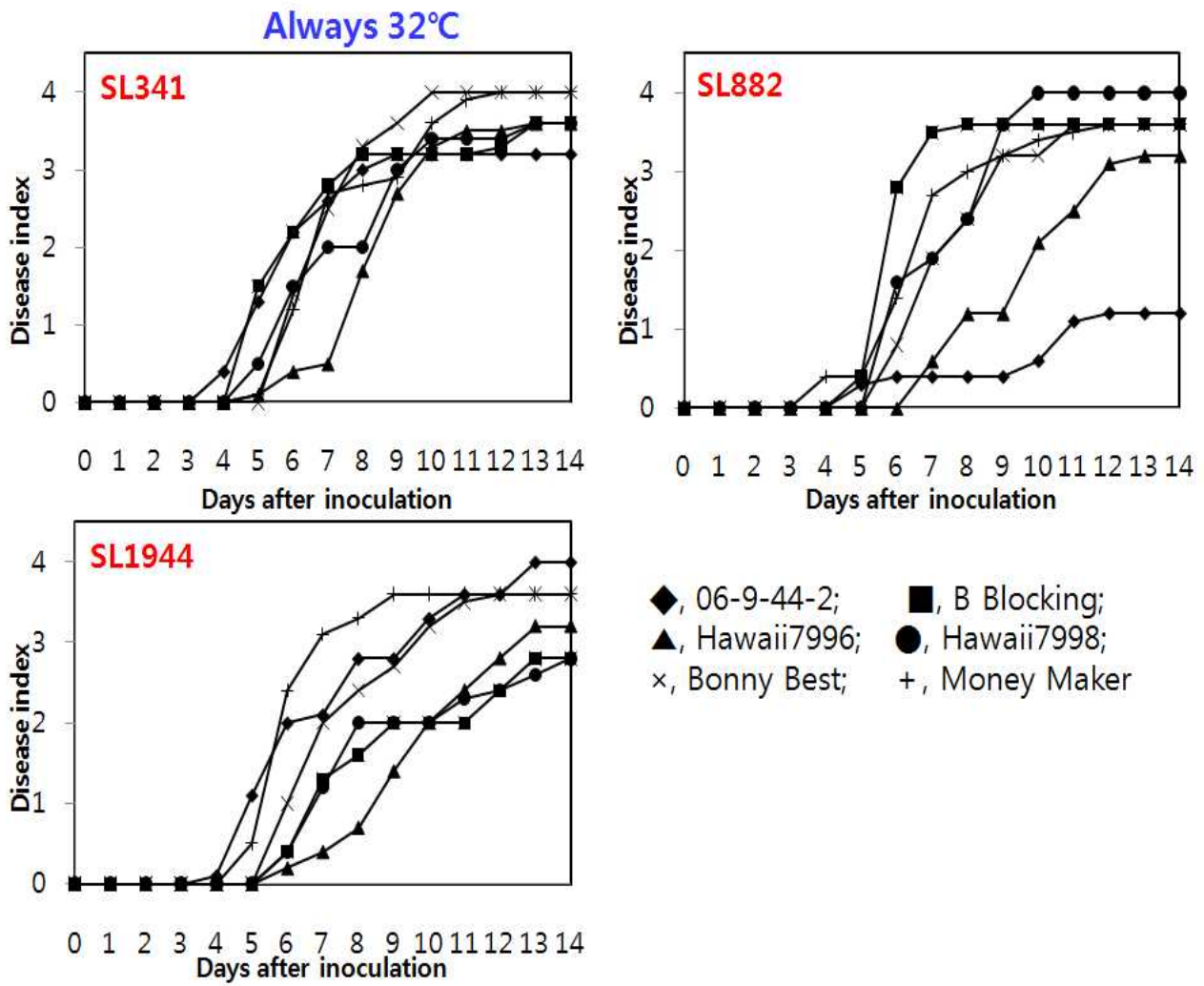


Fig. 2. 항상 32도 조건에서 토마토 순계 품종들의 세가지 균주에 대한 반응

32°C-25 °C

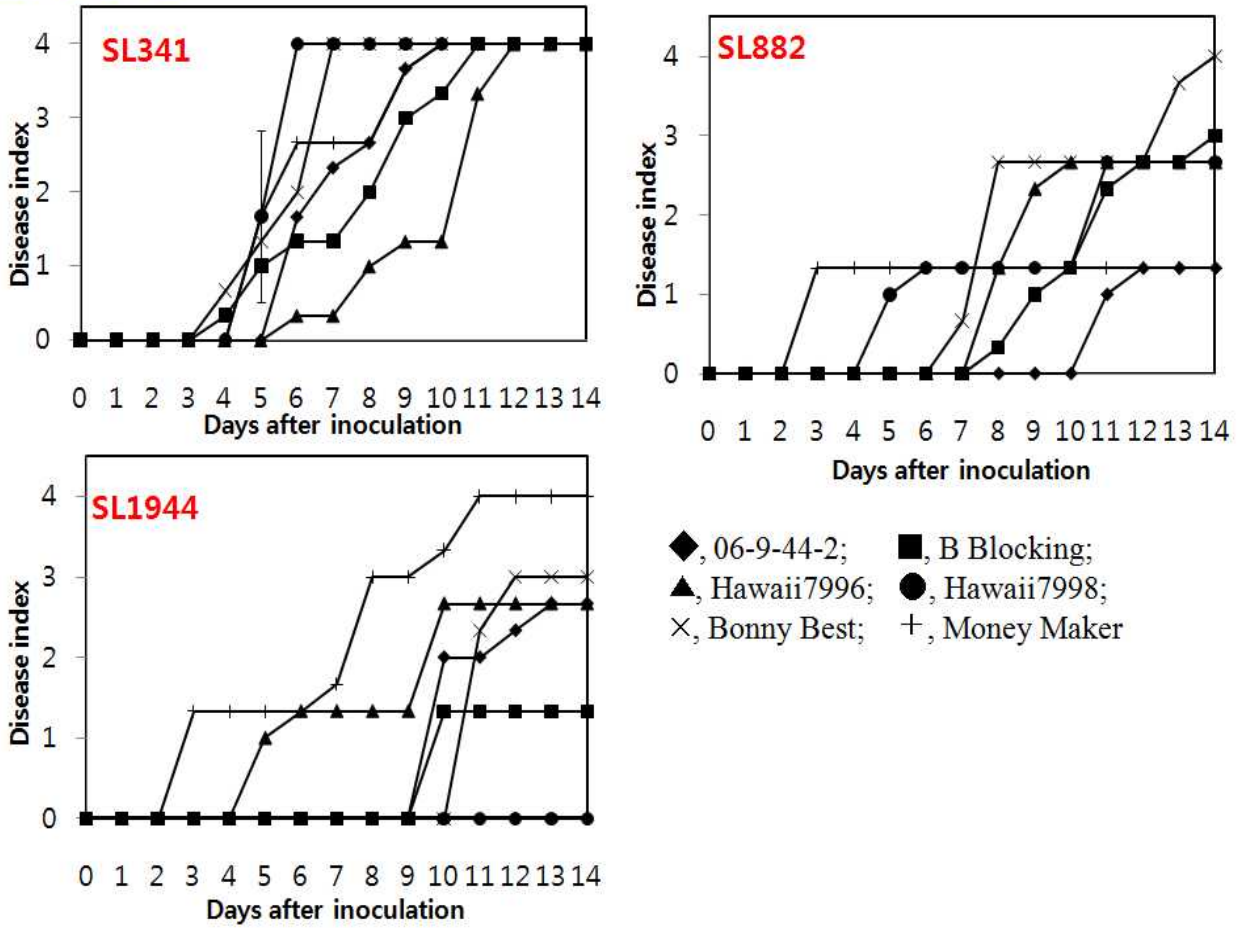


Fig. 3. 낮 32도, 밤 25도 조건에서 토마토 순계 품종들의 세가지 균주에 대한 반응

나. 고추 풋마름병 저항성 검정 체계 구축

(1) 병원균 및 식물품종

(가) 병원세균 확보 및 배양

고추 풋마름병을 유발하는 병원세균인 *Ralstonia solanacearum* 로는 고추에 병원성이 우수한 고추분리 균주들(SL341, SL1931, SL3395, SL3505, SL3531, SW1001, SW1002, SL2268)들을 이용하였다. 균주들은 CPG 배지에 30도에서 배양하여 저항성 검정 구축에 활용하였다. 병원 세균을 배양하기 위한 조건은 병원세균 접종을 위한 규모(원예용 부농상토 토양 200-300 g 포트의 식물체에 3포트 접종을 기준)로 대체적으로 배양하였다. 먼저, CPG broth 5 ml에 *R. solanacearum*을 접종하여 30°C, 200 rpm으로 18-24 hrs 전배양 하였다. 이후 전배양된 병원균을 200 ml의 CPG broth에 1/100 - 1/1,000 (0.2-2 ml) 접종한 후, 30°C, 200 rpm으로 18~24 hrs 배양하였다. 세균 배양액을 상온에서 8,000 rpm, 10분간 원심분리한 후, 상층액을 제거하였다. 세균 pellet은 50 ml 멸균수에 현탁하여 상온에서 8,000 rpm, 10분간 원심분리하여 배지 성분 및 외피다당류 일부를 제거하였다. 확보한 세균 pellet은 OD₆₀₀=0.3-0.5 ($3-5 \times 10^8$ CFU/ml) 가 되도록 100 ml 멸균수에 현탁하여 접종에 사용하였다.

(나) 고추 식물의 확보 및 육성

풋마름병 검정을 위해 고추 순계라인으로 풋마름병 저항성 순계품종인 MC4를 확보하여 활용하였고 감수성 순계품종으로 수비초 품종을 이용하였다. 이들 고추 품종들은 유리온실에서 20-28도 온도조건에서, 광은 자연광 조건에서 6-10주간 생육하여 실험에 사용하였다. 각 식물의 종자는 지피포트(또는 작은 포트)에 직파한 후 옮겨심기하여 파종 후 총 6-10주차에 유묘검정하기까지 육성하였다. 식물을 육성시에는 습도를 조절하지 않고 수돗물을 관주하면서 육성하였다. 식물의 육성은 온도 22-28도 사이에서 수행하였다.

(다) 풋마름병 접종 및 발병 조사

고추 풋마름병 저항성 검정을 위한 적절한 검정법을 확립하기 위해 세 가지 서로 다른 접종법을 시도하였다. 고추 품종 당 5 개체의 반복으로 접종하였으며 접종 후 식물체는 32도에서 14시간 광조건, 25도에서 10시간 광조건을 유지하며 발병을 관찰하였다. 접종법은 토양관주법, 뿌리절단과 토양관주, 뿌리 침지법, 줄기주입법을 시도하였다.

① 토양관주법의 경우(soil soaking) 포트 반복 간 변이가 발생할 수 있으며, 세균 현탁액을 식물체가 있는 포트에 부어주었다. 이때 토양 1 g 당 세균의 수가 10^7 CFU 되도록 농도를 조절하여 부어주었다. 대조구는 세균을 현탁하지 않은 동량의 멸균수를 부어주어 발병 조건에 식물체를 두고 관찰하였다.

② 뿌리절단과 토양관주(root cutting and soil soaking): 멸균된 scalpel이나 시약 스포를 사용하여 식물체 배측으로 부터 주위 2-3 cm 둘레로 3회 삽입하여 식물체의 뿌리 부분을 절단하고 토양을 덮어주었다. 뿌리가 절단된 식물체에 위와 같은 토양관주법으로 세균 현탁액을 부어주었다.

③ 엽병주입(petiole infiltration): 이 방법은 병원세균의 병원성 확인을 위한 일반적인 방법으로 세균 현탁액 10 μ l를 tip으로 끌어 올린 후, 식물체의 줄기와 엽병 사이에 꽂아주었다. 이때 tip 끝에 공기가 유입되는 것을 주의해야 하며, 식물체 크기에 따라 1~3개의 tip을 꽂아주

었다. 대조구는 세균을 현탁하지 않은 깨끗한 멸균수를 tip을 사용하여 주입하였다. 접종된 식물체는 발병조건에서 유지하며, 접종 1-2일 이후 식물체의 관다발 조직으로 유입된 것이 확인되면 tip을 제거하였다.

접종한 식물은 광조건 14시간(낮)/암조건 10시간(밤)인 조건에서 세가지 서로 다른 온도 조건(낮 35도, 밤 28도/항상 32도/낮 32도 밤 25도)에서 유지할 수 있는 생육상에서 발병을 관찰하였다. 이때 발병지수(disease index)는 0, 시든 잎 없음; 1, 0-25%의 잎 시들음; 2, 25-50%의 잎 시들음; 3, 50-75%의 잎 시들음; 4, 75-100%의 잎 시들음으로 정량화하고 각 처리당 5-10개체의 식물체를 이용하고 무처리는 수돗물만을 관주하였다.

(2) 식물품종에서 저항성/감수성 반응

(가) 적정 접종법: 토양관주 또는 뿌리절단과 토양관주

고추 풋마름병 저항성 검정을 대규모로 진행하기 위한 적정 접종법은 자연 발병에 가장 유사한 방식인 토양 관주법으로 선택하였다. 그러나 고추의 경우 토양 관주법에 의하여 발병에 변이가 심한 경우 뿌리절단과 토양관주를 병행하는 방법도 사용하였다. 토마토에서 활용 가능한 뿌리 침지법의 경우 고추에서는 수분 장애가 발생하여 활용이 어려웠다. 줄기 주입법은 자연 상태의 발병과 달리 세균 현탁액이 직접 물관에 도달하도록 하여 저항성 대조구에서 발병으로 대조구와 비교가 어려웠다. 따라서 토양에 세균의 농도가 토양 1 g당 10^7 CFU 정도 처리되며 상처의 인위적인 유발이 없이 발병을 유도하는 토양관주방법으로 고추 풋마름병을 검정하였다. 필요한 경우 뿌리부분 절단후 토양관주를 시도하였다.

(나) 적정 균주 선발 및 저항성 평가

아래의 Fig. 4는 고추 분리 균주들의 두 가지 대조구 고추 품종에서 반응으로서 대다수의 균주가 선발한 SL1931 균주와 유사한 양상으로 저항성 품종이 MC4에서 발병이 미약한 반면 감수성 품종인 수비초에서 급격한 발병과 함께 5-8일내에 고사를 유발하였다. 즉, 고추 풋마름병 저항성 검정에 SL1931이 유효함을 확인할 수 있었다. 접종 방법으며 토양 관주법으로 발병이 안정적으로 감수성 품종에서 유발할 수 있는 조건을 확립하게 되었다. 한편, SL341, SL1931과 함께 고추에 대한 병원성이 가장 약한 균주였던 SL2268를 이용하여 두가지 접종방법으로 고추에서 발병을 조사하였다. 다음의 Fig. 5는 추가적인 접종을 통해 고추에서 SL341, SL1931이 우수한 검정균주임을 확인한 것으로 SL2268은 특별히 고추에서 발병이 잘 안되는 균주로 나타났다.

이때 저항성 판정을 위해 감수성 식물체의 경우 5일 이내에 초기 병징이 관찰되거나 접종 시 식물체 상태, 접종 조건 및 접종 후 식물체 관리 환경에 따라 10일 이후에 병이 진전되는 경우를 관찰하였다. 감수성 식물체의 경우 접종 후 15일 이전에 고사 반응이 진행되며, 15일까지 병이 진전되지 않는 경우 일부 저항성으로 판단하였다. 토마토 풋마름병 저항성 계통의 경우 온도가 35도 이상 유지되면 완전한 저항성을 보이는 경우는 없는 것으로 보이며, 접종 후 유지 환경에 따라 발병 반응이 진행될 수 있었다. 최종 식물의 반응은 접종 후 15일을 기준으로 접종된 식물체의 disease index 값이 평균 1 이하면 저항성, 2 이하면 중도 저항성(추가 접종 or 3주 이상 관찰 필요), 2 초과인 경우 감수성으로 판단하였다.

Soil-soaking

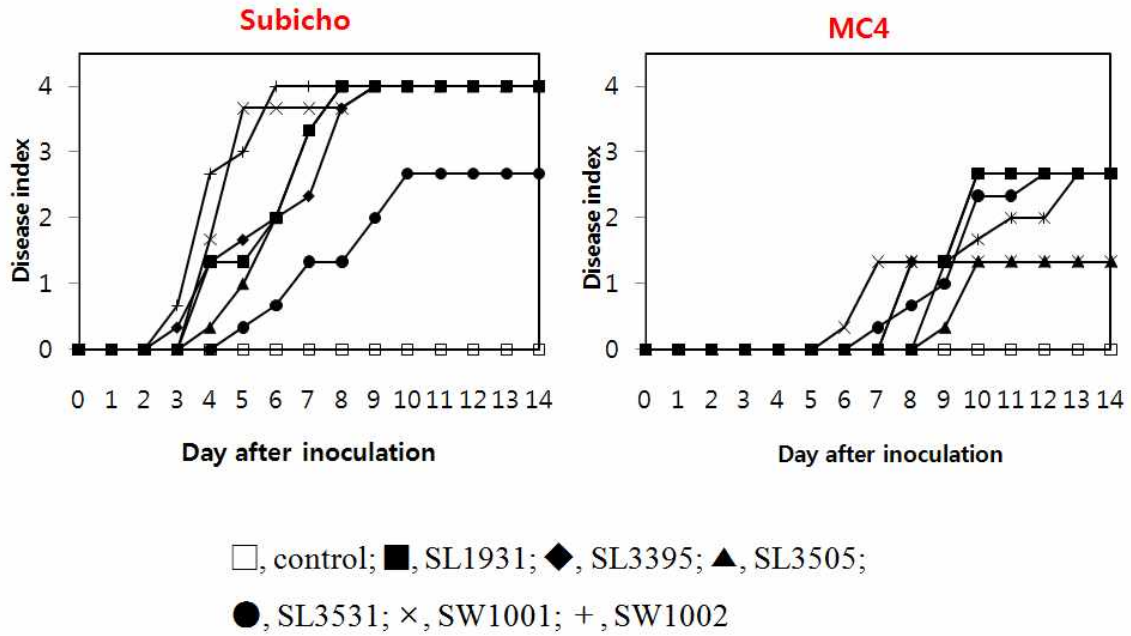


Fig. 4. 토양 관주법에 의한 고추 품종에서의 고추 풋마름 병원균주들에 대한 발병양상

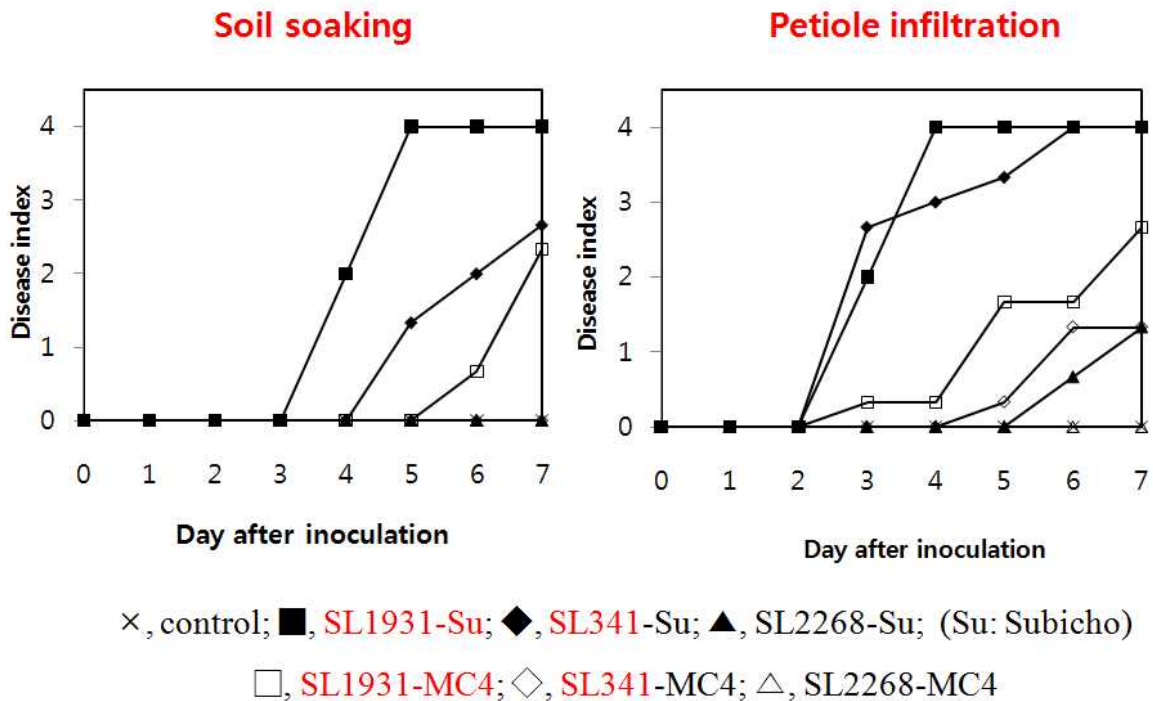


Fig. 5. 수비초와 MC4의 두가지 접종법에 따른 고추 풋마름병 발병 양상

다. 풋마름병 병원성 관련 요인의 분석

(1) 변이체 분석

(가) Exopolysaccharide 생산 결핍 변이체 선발

가지과 작물 풋마름병을 유발하는 *Ralstonia solanacearum* 균주 중 병원성이 안정적인 SL341 균주를 이용하여 병원성 변이에 관련된 다양한 변이체를 확보하여 저항성 검정에 활용하기 위한 연구를 추가로 수행하였다. 이는 기존에 풋마름병균의 주요 병원성 요인으로 외피다당류(exopolysaccharide, EPS), 세포벽분해효소(cellulase, glucanase)등이 알려져 있는데 본 연구에서는 외피다당류 합성 변이체들을 선발하였다. 이전 연구에서 외피다당류 합성 변이체들은 모두 비병원성이나 일부 연구진이 EPS 합성이 결핍이 되어도 발병에 관련된 변이체가 있음을 보고한 경우가 있었다. 해당 변이에 대한 유전연구와 분자생물학적 분석이 충분치 않아 이에 대한 연구를 수행하였다. 연구방법은 EZ-Tn5TM<KAN-2>Tnp Transposome TM kit를 이용하여 *in vitro* Tn 삽입 변이체를 대량확보 한 후 TZC 배지에서 EPS 생산이 결핍된 균주만 선발하였다.

(나) 변이체의 Tn 삽입 부위 결정 및 complementation

선발한 변이체의 병원성을 토마토에서 직접 검정하는 방법을 이용하여 EPS 생산이 감소하였거나 결핍된 변이체의 병원성을 확인하였다. 그 결과 선발한 대다수의 변이체가 병원성을 보이지 않았으며 아래의 방법으로 Tn 이 삽입된 부위를 결정한 결과 해당 유전자들은 조절유전자인 *phcA*, *xpsR*, 또는 *eps* 유전자 집단에 Tn 이 삽입된 것으로 확인되었다. 이들 유전자들은 이미 EPS 생산과 병원성과 연관되어 이미 유전자이었다. 그러나, EPS가 결핍된 변이체들 중 병원성과 기존에 연관성이 알려져 있지 않거나 EPS가 감소하였으나 병원성을 유지하는 변이체를 2종 SL341P2 와 SL341P4을 선발하였다. 각 변이체에서 Tn이 single copy로 삽입되었음을 Southern blot으로 확인하였다.

선발된 변이체들 전체에 대하여 Tn이 삽입된 부위의 유전자를 분석하기 위해서 변이체의 전체 genomic DNA를 분리하고 transposon primers KAN-2 FP-1 (5'-ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC-3')와 KAN-2 RP-1 (5'-GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG-3')를 이용하여 변이부위를 직접 염기서열 분석하였다. 그리고 EPS가 감소하였으나 병원성을 유지하는 변이체를 2종 SL341P2 와 SL341P4의 경우에는 Tn 삽입부위를 pUC119에 클로닝하여 염기서열을 결정하였다.

변이체의 complementation을 위해서는 변이된 유전자 전체 ORF를 PCR 방법을 이용하여 클로닝하여 pRK415 벡터에 도입하고 각 변이체에서 complementation(병원성 회복 또는 EPS 생산 회복)여부를 판별하였다.

(다) 변이체 SL341P4

SL341P4 변이체는 *eps* 유전자 집단의 주변에 있는 가상의 막단백질(hypothetical transmembrane protein)이 결핍된 변이체였다(Fig. 6). 이 변이체를 감수성 토마토 품종인 Moneymaker와 저항성 품종인 Hawaii7996에서 각각 토양관주 방법으로 변이체와 wild type 그리고 변이체 complementation 균주를 접종하여 병원성 및 저항성 반응의 변화를 분석하였다.

SL341P4 mutant in a gene on megaplasmid



➤ Tn5 insertion into *probable dTDP-glucose 4, 6-dehydratase transmembrane protein* on megaplasmid

Fig. 6. SL341P4 변이체의 Tn 삽입 부위 결정

흥미롭게도 변이체 SL341P4는 EPS 생산이 완전히 결핍되었으나 감수성 품종인 Moneymaker에서 병원성이 일부 유지되었다. 그러나 저항성 품종인 Hawaii7996에서는 전혀 발병하지 못했다(Fig. 7). SL341P4가 위의 Fig. 6에서 보여지는 유전자로 complementation 하였을 때 EPS 생산은 완전히 회복되었다. 병원성은 회복이 되었으나 wild type 수준으로 회복 되지는 못했는데 이는 벡터인 pRK415가 항생제 선택압이 없을 경우 변이체에서 손실될 수 있는데 접종한 식물체에서 2주간 유지되는 많은 변이체가 플라스미드를 손실하기 때문인 것으로 여겨진다.

SL341P4 변이체의 결과는 일반적으로 EPS가 결핍이 되면 완벽히 병원성을 상실하여 작물 저항성 판정에 전혀 활용할 수 없으나 해당 변이체가 EPS 생산이 결핍되어 있음에도 품종별로 발병에 차이가 나는 상이한 반응을 보이는 것은 토마토에서 풋마름병 저항성의 발현이 단순한 기작으로 발현되지 않음을 시사한다. 즉, 발병이 초기 침입부터 물관에서 병원성을 발현할 때 까지 기주는 여러단계에서 저항성을 발휘할 가능성을 보여주는 것으로 이들 변이체를 이용하여 저항성 검정을 수행하면 다양한 저항성 기작별로 저항성 품종을 구분할 수 있을 것이다. 이는 풋마름병 저항성 검정의 새로운 전략을 제공할 수 있을 것으로 예상되는 결과이다. 또한, 이들 변이체를 이용하여 풋마름병의 발생기전을 더욱 깊이 이해할 수 있을 것으로 예상된다.

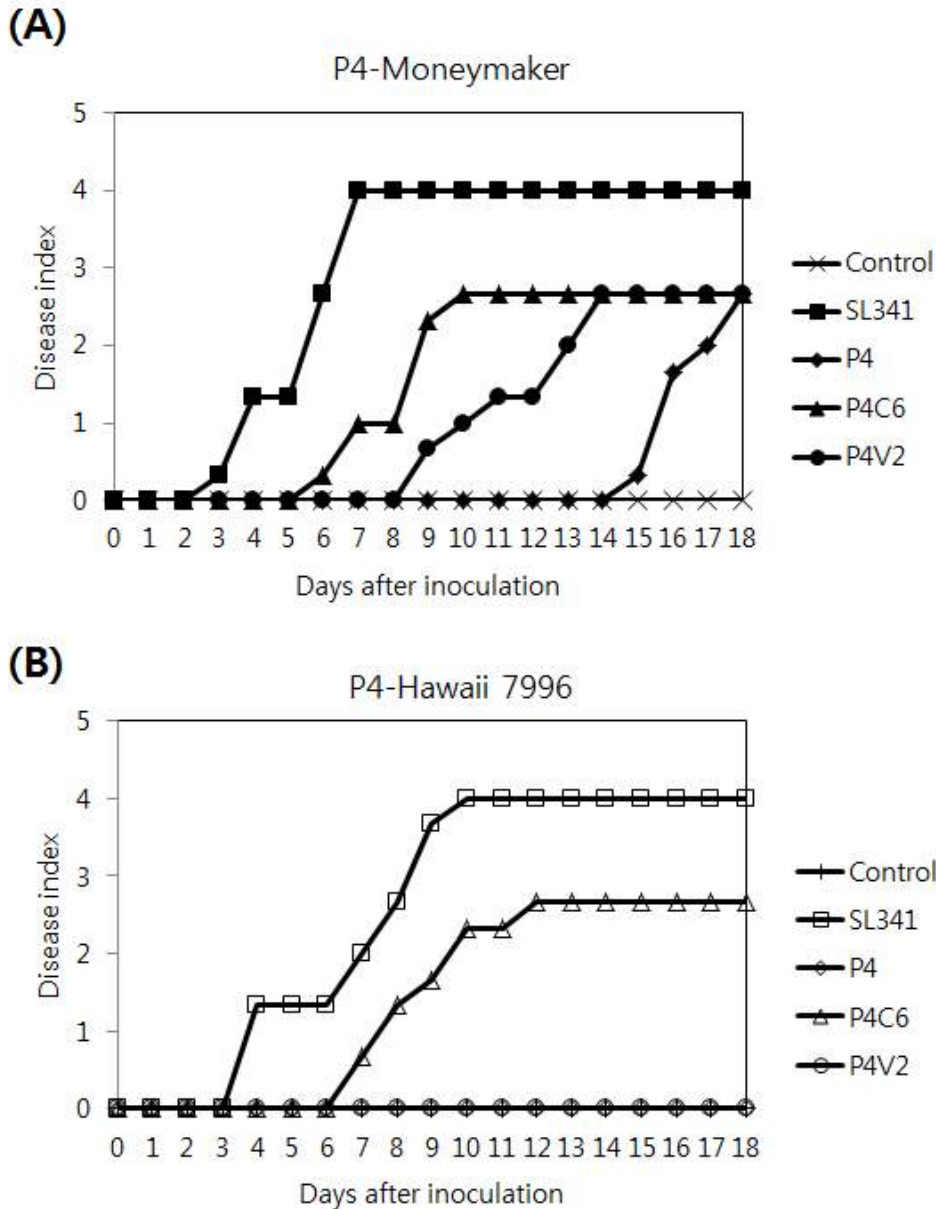


Fig. 7. 토마토 품종들의 SL341 균주 및 SL341P4 변이체들의 반응. (A) 풋마름병 감수성 순계인 Moneymaker의 반응, (B) 풋마름병 저항성 순계인 Hawaii 7996의 반응. P4, Tn 삽입 변이체; P4C6, 변이체 complementation 균주; P4V2, pRK415만 보유하는 SL341P4 변이체

(라) 변이체 SL341P2

SL341P2 변이체의 경우 Tn이 삽입된 부위의 유전자는 glutamate dehydrogenase가 변이된 변이체로 나타났으며 흥미롭게도 대부분의 풋마름병균이 분해해서 빨간색을 나타내는 triphenyl tetrazolium chloride (TTC)를 분해하지 못하는 것으로 나타났다. 즉 dehydrogenase가 결핍된 것으로 확인할 수 있었고 이는 해당유전자가 glutamate dehydrogenase 계열의 효소를 생산하는데 관련된 것으로 예상할 수 있었다. 흥미롭게도 변이체 SL341P2는 EPS 생산이 현저히 저하되었는데 재배품종인 서건 품종 토마토에서 병원성을 완전히 유지하였다.

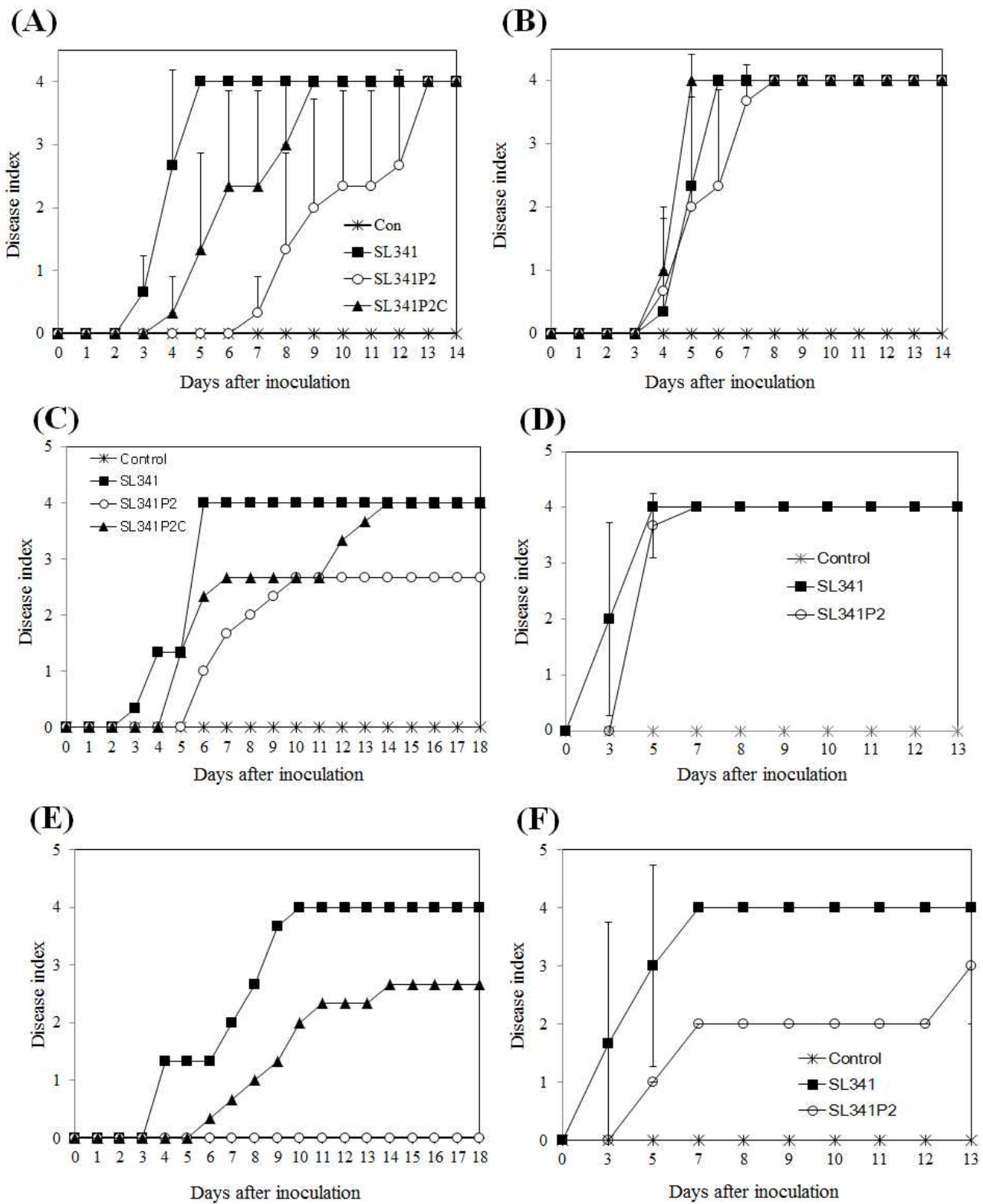


Fig. 8. 토마토 품종 Zuiken (A, B), Moneymaker (C, D), Hawaii7996 (E, F)에 토양관주 (A, C, E)와 줄기주입(B, D, F)으로 SL341, SL341P2, 그리고 complementation 균주인 SL341P2C의 시간에 따른 발병

따라서 각각 감수성 품종인 Zuiken, Moneymaker 와 저항성 품종인 Hawaii7996에서 각각 토양관주 방법과 줄기주입법으로 변이체와 wild type 그리고 변이체 complementation 균주를 접종하여 병원성 및 저항성 반응의 변화를 분석하였다. 그 결과는 Fig. 8과 같다. 위의 Fig. 8에서 보이듯이 병원성이 강한 wild type SL341은 세 품종에서 모두 발병하여 품종간 저항성 반응의 차이가 없으나, SL341P2 변이체는 일반적으로 저항성으로 알려진 순계인 Hawaii 7996에서는 전혀 발병하지 않았다. 반면에 감수성 계통인 Zuiken과 Moneymaker에서는 wild type에 비해 느리기는 하였으나 발병이 진행되었다. SL341P2 변이체의 complementation 균주인 P2C의 경우에는 wild type 수준에 해당하는 발병을 보였다. 즉 변이체의 글루탐산 대사가 EPS 생산과 연관되어 EPS 생산의 감소가 품종간 저항성 반응의 차이와 상관되어 있음을 확인할 수 있었다.

이 변이체의 결과는 일반적으로 EPS가 결핍이 되면 완벽히 병원성을 상실하여 작물 저항성 판정에 전혀 활용할 수 없으나 해당 변이체가 EPS 생산이 심각하게 감소되어 있음에도 감수성 품종에 발병하며 순계 품종별로 상이한 반응을 보이는 것은 토마토에서 풋마름병 저항성의 기작이 단순하지 않음을 시사한다. 즉, 발병이 초기 침입부터 물관에서 병원성을 발현할 때 까지 기주는 여러 단계에서 저항성을 발휘할 가능성을 보여주는 것으로 이들 변이체를 이용하여 저항성 검정을 수행하면 다양한 저항성 기작별로 저항성 품종을 구분할 수 있을 것이다. 특히 품종별로 물관에서의 글루탐산등 아미노산의 성분차이가 저항성 발현의 중요한 요인일 가능성도 검토할 필요가 있다. 이들 변이체들을 이용하면 풋마름병 저항성 검정의 새로운 전략을 제공할 수 있을 것으로 예상되는 결과이다. 또한, 이들 변이체를 이용하여 풋마름병의 발생기전을 더욱 깊이 이해할 수 있을 것으로 예상된다.

라. 고추 토마토 풋마름병 저항성 검정 구축 결과

(1) 식물체의 육성[고추, 토마토 식물체 육성 동일하게]

- ◆ 저항성 토마토 품종(Hawaii 7996), 감수성 토마토(서건, Moneymaker)
- ◆ 저항성 고추 품종(MC4), 감수성 고추(수비초)
- ◆ 식물의 종자를 지피포트(또는 작은 포트)에 직파한 후 3주차에 직접 유묘검정하거나 옮겨심기하여 파종후 총 4-6주차에 유묘검정(고추는 6-8주차)
- ◆ 종자를 원예용 부농상태에 파종하며 별도의 시비를 하지 않음(가끔 상업용 육묘장에서 알려지지 않은 시비를 하는 경우 병이 발생하지 않는 경우 있음)
- ◆ 식물의 습도의 조절하지 않고 수돗물을 관주하면서 육성, 광이 없어 웃자라거나 냉해(냉해의 경우 배축이 보라색이며 잎도 뒷면이 보라색이 됨)를 받지 않도록 육성 - 웃자라거나 냉해를 받으면 판정이 어려움.
- ◆ 온도는 22-28도 사이에서 육성하면 충분함.
- ◆ 유묘검정은 작은 포트에서 파종후 3주된 유묘에 접종
- ◆ 한번 옮겨심기 하는 경우, 본엽이 2엽 분화 이후 옮겨심기하여 파종후 총 육성기간 4-6주된 유묘에 접종, 고추 토마토 모두 이런 방식의 육성이 식물체의 상태가 좋으므로 rating 에 유리함.

(2) 병원 세균 *Ralstonia solanacearum* 의 배양 및 접종원 준비

- ◆ 토마토 검정의 경우 대부분의 병원균 strain 들이 적절하나 고추의 경우 반드시 고추에서 분리한 균주를 사용하여야 함.
- ◆ 병원 세균을 배양하기 위한 조건(원예용 부농상토 토양 200-300 g 포트의 식물체에 3포트 접종을 기준으로 아래를 작성)
- ◆ CPG broth 5 ml에 *R. solanacearum*을 접종하여 30°C, 200 rpm으로 18~24 hrs 전배양 한다.
- ◆ 전배양된 병원균을 200 ml의 CPG broth에 1/100 ~ 1/1,000 (0.2~2 ml) 접종한 후, 30°C, 200 rpm으로 18~24 hrs 배양한다.
- ◆ 세균 배양액을 상온에서 8,000 rpm, 10분간 원심분리한 후, 상층액을 버린다.
- ◆ 세균 pellet은 50 ml 멸균수에 현탁하여 상온에서 8,000 rpm, 10분간 원심분리하여 배지 성분 및 외피다당류 일부를 제거한다.
- ◆ 모아진 세균 pellet은 OD₆₀₀=0.3~0.5 ($3 \sim 5 \times 10^8$ CFU/ml) 가 되도록 100 ml 멸균수에 현탁한다.

(3) 병원 세균 접종 및 유지

(가) 토양 관주(Soil soaking)

- ◆ 토마토, 고추 모두 적용되나 고추에서 포트 반복간 변이가 심할 수 있음
- ◆ 세균 현탁액 30 ml을 식물체가 있는 pot (부농상토 200-300 g을 기준으로)에 부어준다. 이때 대조구는 세균을 현탁하지 않은 동량의 멸균수를 부어주어 발병 조건에 식물체를 두고 관찰한다.

(나) 뿌리절단과 토양관주(Root cutting and soil soaking)

- ◆ 고추의 경우 토양관주로 포트간 변이가 심할 때 적용
- ◆ 멸균된 scalpel이나 시약 스푼을 사용하여 식물체 배측으로 부터 주위 2-3 cm 둘레로 3회 삽입하여 식물체의 뿌리 부분을 절단하고 토양을 덮어준다.
- ◆ 뿌리가 절단된 식물체에 세균 현탁액 30 ml을 부어준다. 이때 대조구는 세균을 현탁하지 않은 멸균수를 뿌리가 절단된 식물체에 부어주어 발병 조건에 식물체를 두고 관찰한다.

(다) 뿌리 침지(Root dipping)

- ◆ 이 방법은 병원균의 병원성 확인을 위한 일반적인 방법이나 고추는 뿌리 침지로 인해 식물체 자체가 영향을 받으므로 적용되지 않고 토마토에만 적용함.
- ◆ 식물체의 뿌리가 손상되지 않도록 뿌리 주변의 흙을 털어주고, 흐르는 물에 씻어 토양을 최대한 제거한다.
- ◆ 토양이 제거된 식물체 뿌리 부분을 준비된 세균 현탁액에 뿌리가 완전히 잠기도록 담귀둔 후, 30분간 유지한다. 이때 대조구는 세균을 현탁하지 않은 멸균수에 뿌리를 담귀둔다.
- ◆ 반응이 끝난 식물체는 다시 포트에 옮겨심기 한 후, 발병 조건에 식물체를 두고 관찰한다.

(라) 엽병주입(Petiole infiltration)

- ◆ 고추등의 식물에서 병원성 확인을 위한 일반적인 방법
- ◆ 세균 현탁액 20 μ l를 tip으로 끌어 올린 후, 식물체의 줄기와 엽병 사이에 꽂아준다. 이때 tip 끝에 공기가 유입되는 것을 주의해야 하며, 식물체 크기에 따라 1~3개의 tip을 꽂아준다. 대조구는 세균을 현탁하지 않은 깨끗한 멸균수를 tip을 사용하여 주입한다.

- ◆ 접종된 식물체는 발병조건에서 유지하며, 접종 1~2일 이후 식물체의 관다발 조직으로 유입된 것이 확인되면 tip을 제거한다.

(4) *Ralstonia solanacearum* 접종 후 발병을 위한 식물체 유지 조건.

Temperature	1. Day-35℃ and Night-30℃ 2. Day-32℃ and Night-28℃ 3. Day-30℃ and Night-25℃
Light period	Day-14 hrs and Night-10 hrs
Humidity	70% or not controlled

- ◆ 풋마름병 발병 조건에 상대 습도가 큰 영향을 주지는 않음
- ◆ 위의 온도의 경우 토마토는 3번 조건이 고추의 경우 2번 조건이 적절함
- ◆ 온도가 1번 조건인 경우 일부 균주가 저항성 품종에서도 발병함.

(5) 발병 Rating

- ◆ 병 발생시 발병엽에 시들음 증상이 나타나며, 이병엽율에 따라 0~4로 disease index 기록. 토마토와 같이 한 엽병에 많은 잎이 달리는 경우, 엽병을 기준으로 기록함.
- ◆ 0, 이병엽율 0%, 식물체 잎이 모두 건전한 상태를 유지.
- ◆ 1, 이병엽율 1~25% (시들은 잎의 백분율)
- ◆ 2, 이병엽율 26~50% (시들은 잎의 백분율)
- ◆ 3, 이병엽율 51~75% (시들은 잎의 백분율)
- ◆ 4, 이병엽율 75%~, 식물체 고사.

(6) 저항성 판정

- ◆ 감수성 식물체의 경우 (4~6주 유묘 사용시) 5일 이내에 초기 병징이 관찰됨. 정식이전의 감수성 유묘인 경우 3일부터 시들음 관찰되기도 함
- ◆ 접종시 식물체 상태, 접종 조건 및 접종 후 식물체 관리 환경에 따라 10일 이후에 병이 진전되는 경우 있음.
- ◆ 감수성 식물체의 경우 접종 후 15일 이전에 고사 반응이 진행되며, 15일까지 병이 진전되지 않는 경우 일부 저항성을 지니는 것으로 판단할 수 있음.
- ◆ 풋마름병 저항성 계통의 경우 온도가 35도 이상 유지되면 완전한 저항성을 보이는 경우는 없는 것으로 보이며, 접종 후 유지 환경에 따라 발병 반응이 진행될 수 있음.
- ◆ 접종 후 15일을 기준으로 접종된 식물체의 disease index 값이 평균 1 이하면 저항성, 2 이하면 중도 저항성(추가 접종 or 3주 이상 관찰 필요), 2 초과인 경우 감수성으로 판단할 수 있음.

(7) 주의 사항

- ◆ 토양의 상태에 따라 포트간 변이가 심하므로 5반복이 일반적임. 포트에 이끼나 곰팡이 생기

면 발병하지 않음.

- ◆ 사용한 포트의 재사용 금지
- ◆ 해당 병원균은 생물적 작용제 이므로 상용한 토양과 식물을 전부 멸균하여 폐기함.

2. 배추 무름병 저항성 검정 구축

가. 배추 무름병 저항성 검정 체계 구축

(1) 병원균 및 배추품종

(가) 병원세균 배양 및 접종

배추 무름병 저항성 검정 시스템 구축을 위해 무름병원균 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 균주 type culture를 포함하여 8 strain을 확보하였다. 확보한 균주는 아래의 Table 3과 같다.

Table 3. 사용한 무름병원균 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 균주

균 주 명	분리 기주
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> ATCC15713 (type culture)	감자
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> KACC10225	배추
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> ATCC12312	담배
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> KACC10421	무우
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> LY34	배추
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> ECC301365	상추
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> KNU28206	무우
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> PCC21	배추

무름병의 발병에 사용한 병원균주의 준비는 먼저 *Pectobacterium* 균주를 nutrient broth에 진탕배양하고 원심분리에 의해 균체를 회수하여 생리식염수에 현탁하여 세균의 농도를 600 nm에서 흡광도 0.2 (1×10^8 cfu/ml)로 맞추었다. 세균은 nutrient broth에서 배양할 때 30도에서 200 rpm으로 24-36시간 진탕배양하였다. 배양세균의 현탁액을 희석하여 세균의 최종 농도를 1×10^6 cfu/ml로 조정하여 최종 멸균한 glycerol과 4:1의 비율로 균질하게 혼합한 후 혼합액을 배추의 기부에 10 ml 관주하고 날짜별로 병징(잎의 무름)을 관찰하였다. 접종후 배추는 25도, 18도에서 유지하며 병징을 관찰하였다. 이때 병원균의 농도를 10^5 cfu/ml, 10^6 cfu/ml, 10^7 cfu/ml에서도 접종하여 적정 접종 농도를 결정하였다. 처리당 접종 배추식물 반복수는 3-5 개체였다.

(나) 식물의 확보 및 육성

사용한 배추품종은 감수성 대조구로 참맛(고농종묘) 품종을 사용하였으며 저항성 후보 품종으로 중앙대 (주)바이오브리딩에서 육성된 DH-SR-5, DH-SR-6을 분양받아 이용하였다. 이

전에 저항성 품종으로 코넬대학에서 육성된 C3-26, C3-28, C3-29 품종은 순계가 아닌 형질이 고정되지 않은 중간계통으로 종자를 얻을 수 없었다. 따라서 확보한 배추 품종을 20-28도의 온실에서 육성하며 무름병 접종에 이용하였다. 접종전 배추는 25도의 온실에서 육성하고 접종후 배추는 생육상에서 22도 (명기 16시간), 17도 (암기 8시간)에 유지하며 병징을 관찰하였다. 처리당 접종 배추식물 반복수는 3-5 개체였다.

(2) 병원균 접종 및 발병 정량화

(가) 접종 및 발병조사

배양세균의 현탁액을 희석하여 세균의 최종 농도를 1×10^6 cfu/ml 로 조정하여 최종 멸균한 glycerol 과 4:1의 비율로 균질하게 혼합한 후 혼합액을 배추의 기부에 10 ml 관주하고 날짜별로 병징(잎의 무름)을 관찰하였다. 발병의 정량화는 접종 후 날짜별로 발병한 잎의 백분율로 달관조사하며 이때 발병지수(disease index)는 아래의 지수를 이용하였다. 0, 무름증상 없음(저항성); 1, 0-25%의 잎 무름(저항성); 2, 25-50%의 잎 무름(중도 저항성); 3, 50-75%의 잎 무름(감수성); 4, 75-100%의 잎 무름(감수성).

(나) 병원균 접종 농도별/균주별 배추 무름병 진전

참맛 품종을 이용한 균주의 농도와 균주 종류별 발병양상을 확인 한 결과 아래의 Fig. 9, 10, 11 처럼 담배에서 분리균주는 다른 작물에서 분리된 균주들보다 저농도의 세균접종에서 발병이 현저히 감소하였다. 병원균의 모든 접종 농도에서 배추, 상추, 무 분리균주들이 안정적인 발병을 유발하였으며 특히 LY34는 병원성이 강하였고 KACC10225는 상대적으로 저농도의 세균접종에서 발병이 약하여 두 균주를 향후 검정에 이용하기로 결정하였다.

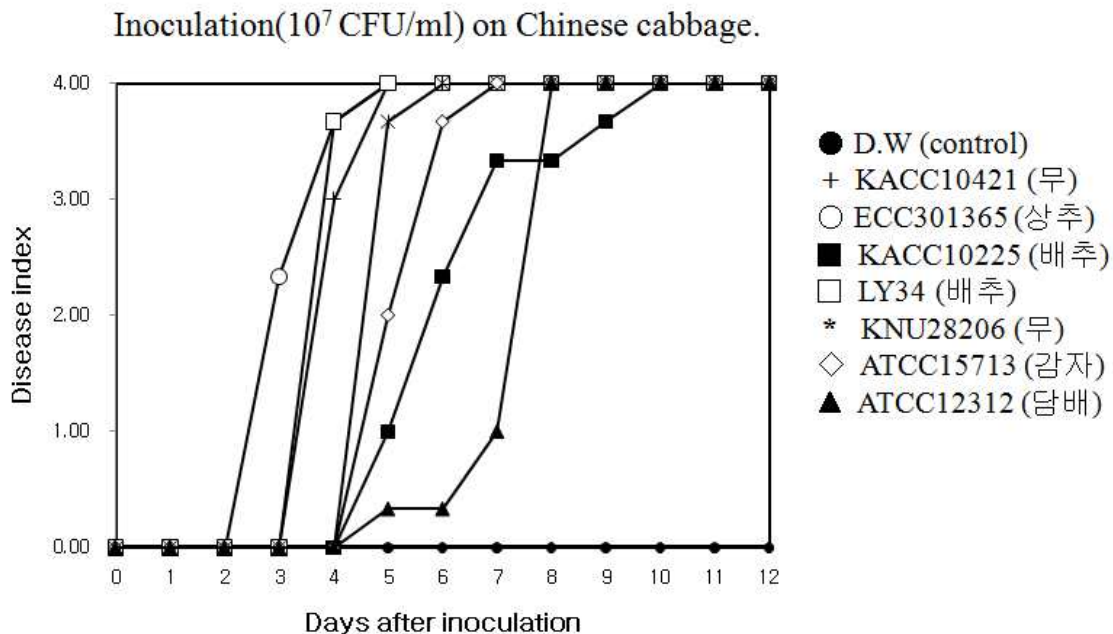


Fig. 9. 병원균 접종 농도 10^7 cfu/ml에서 균주별 배추에서 발병양상

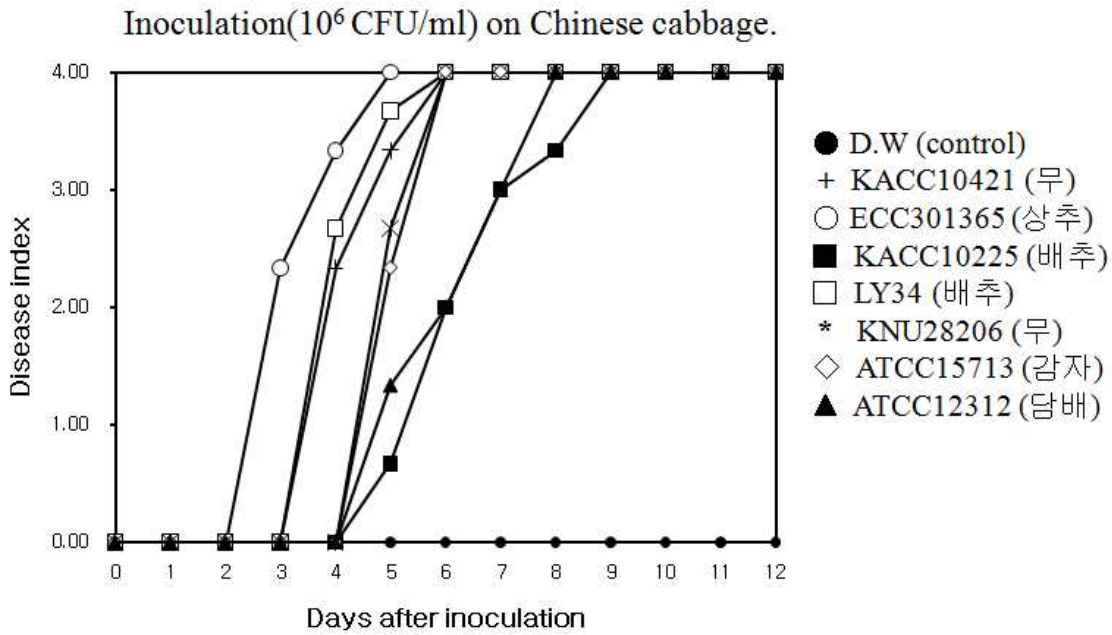


Fig. 10. 병원균 접종농도 10^6 cfu/ml에서 균주별 배추에서 발병양상

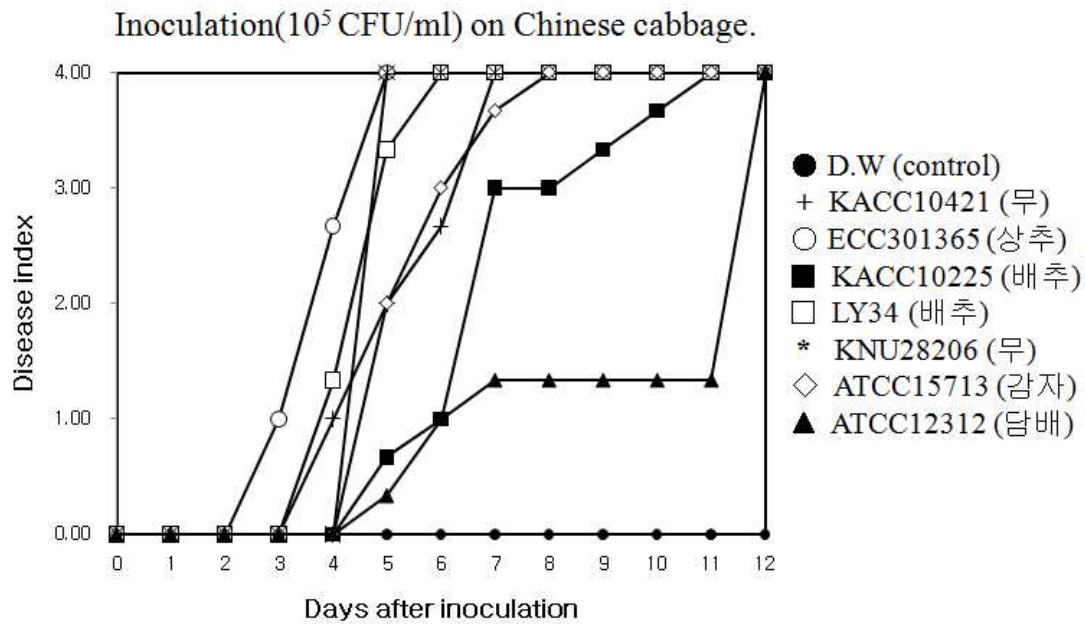


Fig. 11. 병원균 접종농도 10^5 cfu/ml에서 균주별 배추에서 발병양상

나. 배추 무름병 저항성 품종 후보 평가

(1) 온도별 발병 평가

(가) 저온에서의 발병

배추 무름병저항성 대조구로 이용할 후보 배추 품종인 DH-SR-5(또는 DH-SR-5-3)와 DH-SR-6(또는 DH-SR-6-1)에 대하여 온도별 균주별 무름병 발병을 날짜별로 조사하였다. 그 결과 저온 18도 조건에서는 두 개의 균주 LY43과 KACC10225로 10^6 cfu/ml의 농도로 접종하였을 경우 두 품종에서 병원균에 따라 발병 반응에서 차이를 보였다. 접종 균주가 KACC10421 (무우 분리균주) 인 경우 대조구와 두개의 순계에서의 발병에서 차이가 없었으며 대개 발병률이 낮았다. LY43 (배추 분리균주)인 경우 대조구 품종에 비해 두 개의 순계에서 발병률이 낮았으며 발병이 느리게 진전되어 두 순계가 배추 무름병에 어느 정도의 저항성이 있을 것으로 예상된다(Fig. 12).

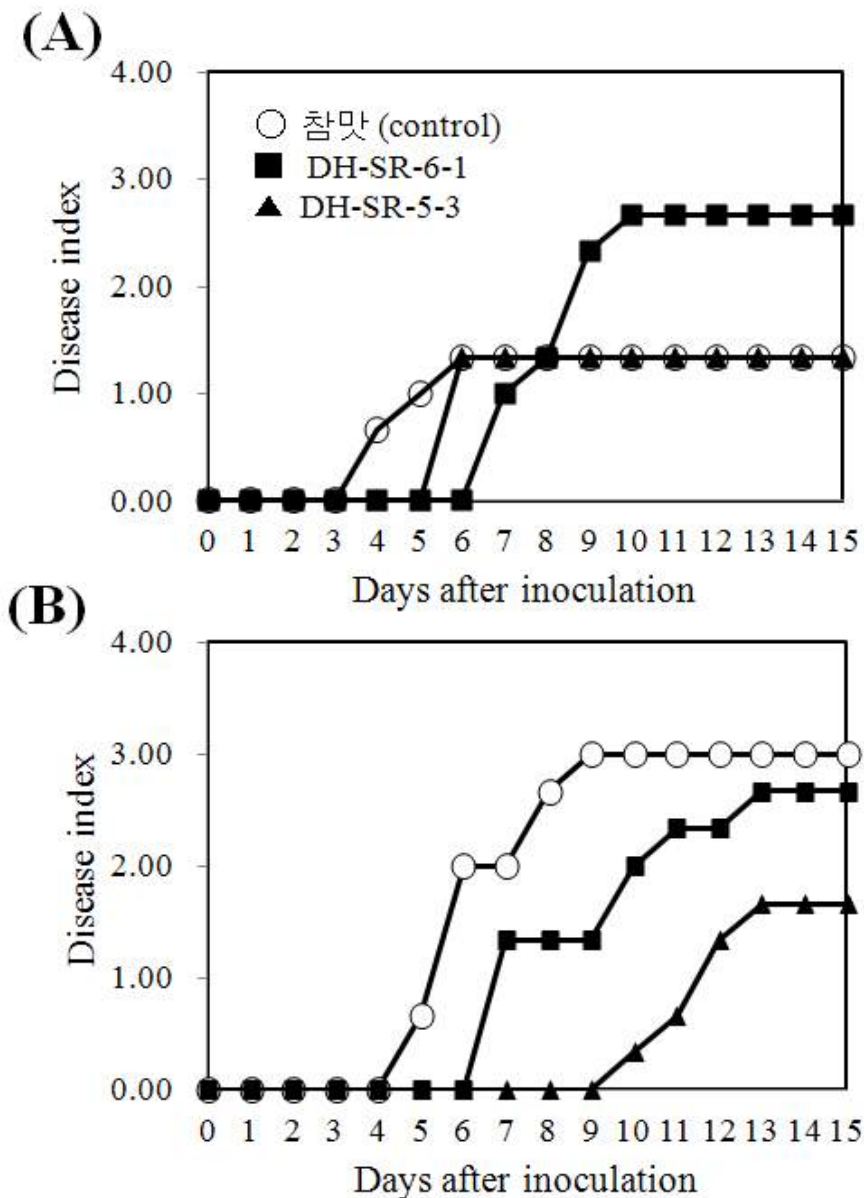


Fig. 12. 두가지 병원균의 배추 저항성 후보 품종에서 저온 발병조사 (A) KACC10421 균주에 의한 발병, (B) LY43 균주에 의한 발병

(나) 상온에서의 발병

배추 무름병은 생산지 뿐 아니라 상온저장 조건에서도 심각한 문제가 되므로 상온조건에서 발병을 유도하고 발병도를 저항성 후보 품종에 대하여 조사하였다. 동일하게 DH-SR-5 와 DH-SR-6 에 대하여 25도 발병조건에서는 두 개의 균주 LY43과 병원성이 우수한 상추분리 균주인 ECC301365로 10^5 cfu/ml의 농도로 접종하였을 경우 모든 조건에서 발병이 심각하였다 (Fig. 13). 따라서 두 개의 저항성 대조구 후보 품종들은 25도 조건에서는 저항성을 전혀 발휘하지 못하는 것으로 나타났다.

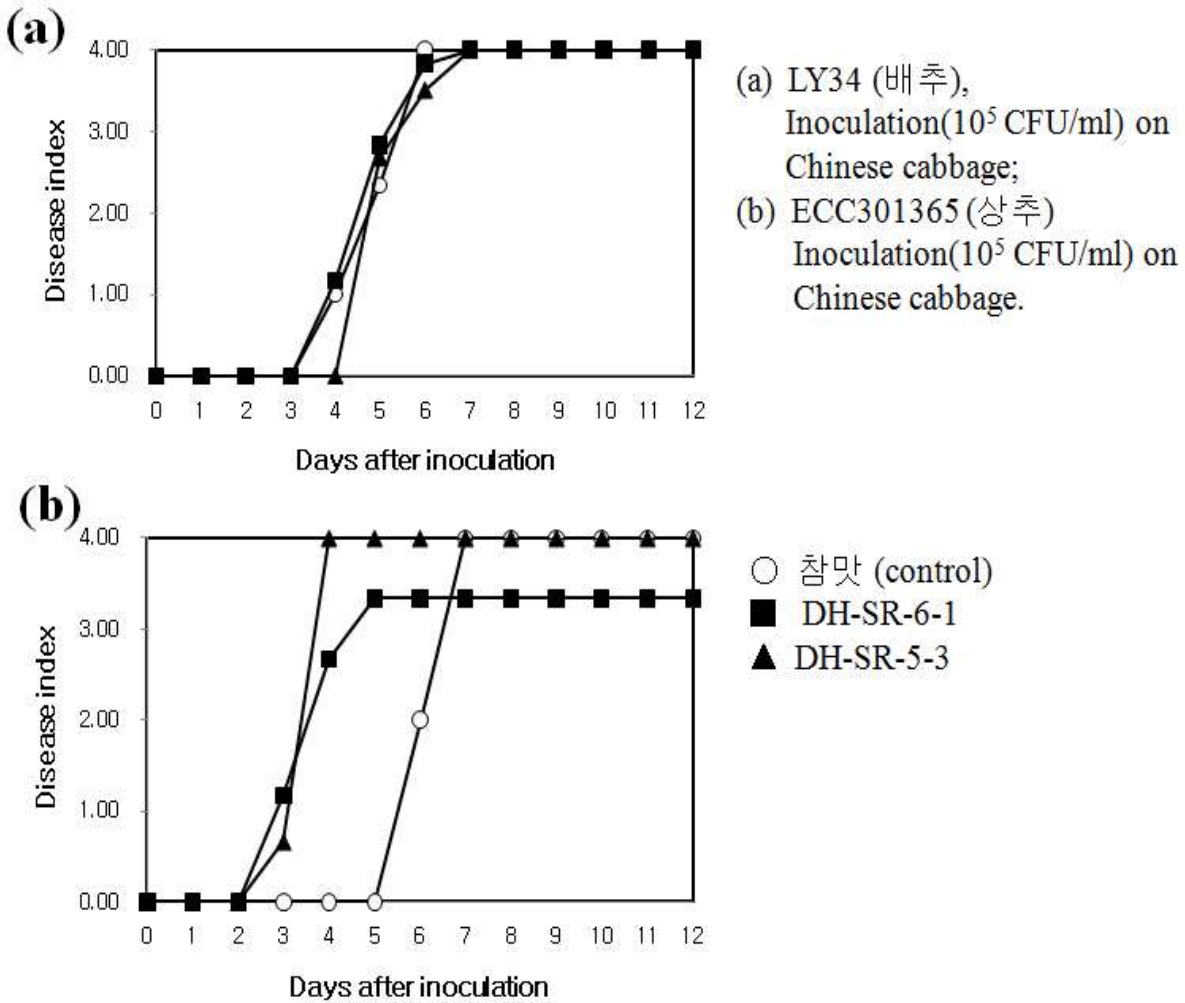


Fig. 13. 25도에서 두가지 병원균에 의한 저항성 감수성 대조구 품종의 발병

(다) 저항성 후보 품종의 평가

이상의 결과에 의해 담배 분리 균주를 제외한 대부분의 본 연구에 이용한 균주가 배추 무름병을 잘 유도하여 품종 저항성 검정이 용이하나 저항성 후보 품종 대조구는 모든 조건에서 완벽한 저항성을 발휘하지는 못하는 것으로 나타났다. 이는 현재까지 무름병에 대한 완벽한

저항성 품종이 부재한 것과 일치하는 결과이다. 다만 김장용 배추가 25도 이하의 저온조건에서 흔하게 재배가 되므로 저온 조건에서는 본 연구에서 검정한 두 개의 저항성 품종 DH-SR-5와 DH-SR-6가 효과적이며 본 연구를 저온에서 저항성 검정할 때 저항성 대조구 품종으로 유효할 것으로 판단된다. 저항성 검정을 위한 평가방법에 비해 대조구 품종이 부재하나 배추와 유사한 방법으로 양배추, 무, 상추 등의 채소의 무름병 저항성 검정이 가능하다.

다. 배추 무름병 저항성 검정 구축 결과

(1) 식물체의 육성[배추, 양배추, 무 등]

- ◆ 저항성 품종 대조구: 부재
- ◆ 식물의 종자를 지피포트(또는 작은 포트)에 직파한 후 4-6주차에 유묘검정
- ◆ 종자를 원예용 부농상태에 파종하며 별도의 시비를 하지 않음
- ◆ 식물의 습도의 조절하지 않고 수돗물을 관주하면서 육성하며 대부분 김장용 채소로 저온에서도 육성이 가능함
- ◆ 온도는 15-25도 사이에서 육성하면 충분함, 온도에 따라 접종할 유묘의 육성기간이 달라짐
- ◆ 유묘검정은 작은 포트에서 파종 후 4-6주된 유묘에 접종

(2) 병원 세균 *Pectobacterium carotovorum* 의 배양 및 접종원 준비

- ◆ 병원 세균을 배양하기 위한 조건: Nutrient broth에 병원세균을 접종하여 *R. solanacearum* 을 접종하여 30도에서 200 rpm으로 24-36시간 진탕배양 한다.
- ◆ 세균 배양액을 상온에서 8,000 rpm, 10분간 원심분리한 후, 상층액을 버린다.
- ◆ 세균 pellet은 멸균수에 현탁하여 1×10^6 CFU/ml 가 되도록 조정한다.
- ◆ 세균 현탁액과 멸균한 glycerol 과 4:1의 비율로 균질하게 혼합하여 식물체의 기부에 접종한다.

(3) 병원 세균 접종 및 유지

- ◆ 세균 현탁액과 멸균한 glycerol 과 4:1의 비율로 균질하게 혼합한 접종액을 식물체의 기부에 10 ml 부어준다.
- ◆ 처리당 접종 식물체는 5반복을 유지하며 이때 대조구는 세균을 현탁하지 않은 동량의 멸균수를 부어주고 발병 조건에 식물체를 두고 관찰한다.

(4) 병원균 접종 후 발병을 위한 식물체 유지 조건.

Temperature	Day-22°C and Night-17°C
Light period	Day-16 hrs and Night-8 hrs
Humidity	70% or not controlled

(5) 발병 Rating

- ◆ 병 발생시 발병엽이 황화되며 물러짐을 발병한 잎의 백분율로 달관조사 하며 이때 발병지

수(disease index)는 아래의 지수를 이용함

- ◆ 0, 황화 및 무름증상 없음 0%, 식물체 잎이 모두 건전한 상태를 유지 (저항성)
- ◆ 1, 0-25%의 잎 황화 및 무름 병징(발병지수 평균 1 미만: 저항성)
- ◆ 2, 25-50%의 잎 황화 및 무름(발병지수 평균 2 미만: 중도 저항성)
- ◆ 3, 50-75%의 잎 황화 및 무름(감수성)
- ◆ 4, 75-100%의 잎 황화 및 무름(감수성)

(6) 저항성 판정

- ◆ 감수성 식물체의 경우 (4~6주 유묘 사용시) 4일 이내에 초기 병징이 관찰됨.
- ◆ 감수성 식물체의 경우 접종 후 7일 이전에 고사 반응이 진행됨
- ◆ 저온에서 10일까지 발병도가 1 이상을 넘지 않으면 저항성으로 판별할 수 있으나 25도 이상에서는 모든 품종이 발병함.

3. 배추, 무, 양배추 검은썩음병 저항성 검정 구축

가. 검은썩음병 저항성 검정 체계 구축

(1) 병원균 및 식물품종

(가) 병원세균 레이스 정보

배추, 양배추, 무 등의 채소 검은썩음병을 유발하는 병원세균 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 균주는 비병원성 유전자와 판별품종의 저항성 유전자간의 상호작용에 의해 총 6개의 병원세균 레이스로 분화되어 있는데 최근에는 3개의 레이스가 추가되었다. 다음의 Table 4는 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 균주의 레이스 분화표인데 국내에 존재하는 균주에 대한 레이스 분화가 연구가 전무한 실정이다. 또한 국내에서 레이스 분화를 판명할 판별품종이 존재하지 않아 국내에 발생한 검은썩음병의 병원세균에 대한 레이스 조사가 선행되면 다양한 저항성 자원을 평가할 수 있다. 다만 사용되는 판별 품종의 대부분을 확보가 용이하지 않아 국내 발병에 대한 병원학적 역학조사가 어려운 실정이다.

본 연구에서는 국내 확보 균주와 표준균주를 이용하였으나 레이스에 대한 정보를 제공할 수 없으므로 인해 정확한 저항성 자원별로 저항성 검정 시스템의 구축보다는 발병을 정량적으로 평가하는 방법을 평가하였다.

Table 4. 십자화과 *Brassica* 관별품종과 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 균주의 유전자-유전자 상호작용 관계

		Races/avirulence genes (A)					
		1	2	3	4	5	6
		A1	...	A1	A1?
Differential cultivars or accessions	Resistance genes	...	A2
		...	A3	A3	...	A3	...
		A4
	
		?	...
	
Wirosa F1 (<i>B. oleracea</i>) Just Right Hybrid	
Turnip (<i>B. rapa</i>), Line 14R of Cobra (<i>B. napus</i>) Seven Top Turnip (<i>B. rapa</i>)	R4	
PI199947 (<i>B. carinata</i>)	R1	R4	?	...	
Florida Broad Leaf Mustard (<i>B. juncea</i>)	R1	R4	?	?	
Miracle F1 (<i>B. oleracea</i>)	R3	

+: 감수성, -: 저항성, (+): 약한 감수형

(나) 병원세균 배양 및 접종

배추, 양배추, 무 등의 채소 검은썩음병 저항성 검정 시스템 구축을 위해 우선 병원균 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 균주 GW-3, GW-7, KACC10377 균주를 확보하였다. 해당 균주의 정확한 동정은 16S rRNA 유전자를 프라이머 8F, 1492r을 이용하여 증폭하고 유전자 서열을 결정된 결과 99% 이상의 identity로 해당균주로 동정이 되었다. 접종을 위한 병원세균 균주들은 yeast extract-dextrose-CaCO₃ (YDC)배지에 48시간, 30°C에서 진탕배양 또는 Peptone sucrose broth(PSB)배지에서 24시간, 30°C에서 진탕배양 하였다. 진탕배양한 *X. campestris* pv. *campestris* 균주는 세균 배양액을 상온에서 8,000 rpm, 10분간 원심분리한 후, 상층액을 제거하였다. 세균 pellet은 적정한 양의 멸균수에 현탁하여 접종원의 농도가 OD₆₀₀에서 0.3(3-5×10⁸ cfu/ml)이 되도록 조정하였다. 병원세균의 접종은 위의 세균 현탁액을 적정 농도로 희석하여 몇가지 희석된 세균의 농도에서 두가지 접종방법으로 아래와 같이 접종하였다.

(다) 식물 품종의 확보 및 육성

확보한 기주 품종은 참맛(배추), 대박나(양배추), 금메달(무)를 대조구 품종으로 그리고 마쓰모(저항성 양배추), 레드마트(감수성 양배추), 녹색(저항성 꽃양배추), 녹색(저항성 꽃양배추)를 검정을 위한 후보 대조구 품종으로 확보하였다. 사용된 종자는 1% 차아염소산나트륨에 5분간 표면살균 후 살균수로 모든 성분이 제거될 때까지 5분간 행귀내었다. 표면 살균된 종자는 시판되는 흥농 바이오 플러그 2호 상토(Seminis Korea Co., Ltd)를 채운 지름 45 mm 포트에 파종하여 2-3주 생육 후, 지름 110 mm 포트에 옮겨심기하였다. 식물체는 광주기 16시간 22°C와

암주기 8시간 17℃로 설정된 생육상에서 생육되었다. 식물체는 생육 4-6주가 지난 후 접종 실험에 사용되었다.

(2) 병원균 접종 및 발병 정량화

(가) 병원균 접종

검은썩음병 저항성 검정을 위한 발병시스템을 확립하기 위해 다음과 같이 연구를 수행하였다. 먼저 병원세균은 PSB 배지를 이용하여 30℃에서 24시간 동안 200 rpm으로 진탕배양하고 배양된 세균을 원심분리하여 멸균수에 현탁하여 OD₆₀₀에서 0.3(3-5×10⁸ cfu/ml)이 되도록 조정하였다. 이 현탁액을 이용하여 식염수로 세균의 다양한 농도의 접종액을 준비하였다. 즉 세균의 밀도가 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹ CFU/ml의 농도로 재현탁하여 준비하였다.

접종은 두 가지 방법으로 수행하였는데, 첫 번째 방법은 준비된 현탁액을 분무기를 이용하여 배추와 무에 충분히 적셔지도록 적절히 분무한 후 48시간 봉지를 씌워 습도를 유지한 후 봉지를 벗기고 14일동안 발병도를 관찰하였다. 또 다른 방법으로는 끝에 흠이 있는 핀셋(mouse tooth forcep)에 얇은 면전(솜)을 감고 준비된 세균 접종액을 묻힌 후 핀셋을 이용하여 배추와 무의 잎 가장자리를 약하게 째어가며 접종하였고 16일동안 발병도를 관찰하였다. 모든 접종은 세 개체 반복수(각 잎당 3-5 곳의 잎 가장자리 접종)와 멸균수를 동일한 방법으로 접종한 대조구를 포함하였다. 발병도는 16일 동안 비교, 관찰하여 다음과 같이 조사되었다. 병원세균 현탁액을 배추, 양배추에 분무 접종한 경우는 28도에서 48시간 동안 습실처리한 후, 25도의 생육상에서 8일간 유지하며 병반면적율을 조사하였다. 핀셋 접종인 경우는 접종전과 동일한 조건에서 유지하면서 발병율을 조사하였다. 연구수행은 적정 접종방법을 선정하고 접종후 결과는 작물별, 균주별, 접종농도별, 접종후 날짜별로 관찰하며 수행하였다.

(나) 발병 조사

채소에 분무접종하였을 경우에는 형성된 검은썩음병 병반면적율을 조사하며 0-30%의 병반면적율을 보이는 품종은 저항성, 31-70%의 병반면적율을 나타내는 품종은 중도저항성, 71% 이상의 병반면적율을 나타내는 품종은 감수성 품종으로 판정할 수 있으나 분무접종의 경우 접종 이후에 나타난 새 잎에 대한 병반 면적율을 계상할 수 없어 정확한 새로운 정량법이 필요하다. 이는 검은썩음병을 유발하는 세균이 주로 수공을 통해 감염이 시작되므로 어린 새잎에 추가 감염의 기회가 감소하기 때문이다.

핀셋을 이용한 잎 가장자리 상처접종의 경우 병징은 Vicenter 등 (2001)의 기술에 따라 발병인덱스를 이용하였다. [0, 병징없음; 1, 약한 괴사 및 퇴록(접종부위만); 2, V자형의 병반(면적 1 cm²이하)과 검은 잎맥; 3, V자형의 병반(면적 1 cm²이상)과 검은 잎맥]. 평균 16일까지 평균 발병인덱스가 2 이상이면 감수성으로 판정하였다.

나. 검은썩음병 발병 조건 확립

(1) 병원균 접종 방법 평가

(가) 분무 접종과 핀셋 접종

분무접종과 핀셋을 이용한 상처접종에서의 검은썩음병의 발병을 평가한 결과 일반적으로

핀셋에 의한 상처접종이 저항성/감수성을 평가하기에 적절한 평가방법으로 나타났다. 이는 검은썩음병의 저항성은 병원균의 비병원성 유전자(avirulence gene)과 저항성 유전자(resistance gene)의 상호작용의 결과이므로 저항성 반응은 명백한 null 반응 또는 과민성 반응(hypersensitive response)로 나타나게 된다. 분무 접종의 경우 식물체의 잎에 분무처리후 병원균이 접촉된 잎에서의 발병과 별도로 발병을 관찰하는 동안에 생성되는 새로운 잎에서는 병징을 확인할 수 없어서 정량적인 평가가 어려울 수 있다. 실제 분무접종 결과로 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* KACC10377과 GW-7을 10^8 CFU/ml 농도로, 그리고 GW-3을 10^9 CFU/ml 농도로 배추와 무의 잎에 분무 접종하면 배추와 무의 잎에 전형적인 검은썩음병의 병징이 관찰되었다. 그러나 일반적으로 GW-7에 의한 발병이 높았으나 병징의 발현이 처리된 모든 식물체에서 균일하게 관찰되지 않아 동일 품종의 식물별로 편차가 심하였다. 더욱이 분무접종의 경우는 발병이 균일하지 않으며 재현성이 낮았다. 따라서 대량으로 품종을 평가할 경우는 적절치 않아 보인다.

그에 비해 핀셋에 의한 상처 접종의 경우는 처리한 잎과 처리 부위를 명확히 기록할 수 있어서 접종부위에서 발병 또는 과민성 반응을 구별 할 수 있었다. 분무접종에 비해 핀셋접종의 경우는 병징이 접종한 잎에서 균일하게 발현하여 병원성 검정에 핀셋접종이 더 재현성이 높을 것으로 나타났다. 이는 핀셋에 의한 상처접종으로 저항성/감수성 반응의 평가가 명확함을 의미한다.

(2) 병원균 접종 밀도 평가

(가) 배추와 무에서 발병

분무접종에 비해 핀셋에 의한 상처접종의 경우는 병징이 접종한 잎에서 균일하게 발현하여 병원성 검정에 핀셋접종이 더 재현성이 높을 것으로 나타났다. 배추의 경우 10^6 CFU/ml에서 GW-7이 가장 병원성이 좋았고(Fig. 14A), 10^7 CFU/ml에서는 GW-7과 GW-3이 비슷한 병원성을 보였으며(Fig. 14B), 10^8 CFU/ml에서는 GW-7 균주가 가장 좋은 병원성을 나타내었다(Fig. 14C). 그리고 무의 경우는 10^6 CFU/ml에서 세 균주 모두 초기 병원성은 비슷하나, 11일부터 차이가 나 16일째 GW-7과 GW-3 균주에서 무 잎에 심한 검은썩음병 병징이 관찰되었고(Fig. 14D), 10^7 CFU/ml에서는 GW-7이 가장 좋은 병원성을 보였다(Fig. 14E). 10^8 CFU/ml에서는 세 균주가 모두 비슷한 병원성을 나타냈으나 그 중에서 GW-7이 가장 좋은 병원성을 나타냄을 확인하였다(Fig. 14F). 이를 통해 GW-7이 적정병원성 균주임을 확인하였고, 접종 적정 농도는 $10^6 - 10^8$ CFU/ml이 효과적임을 확인할 수 있었다.

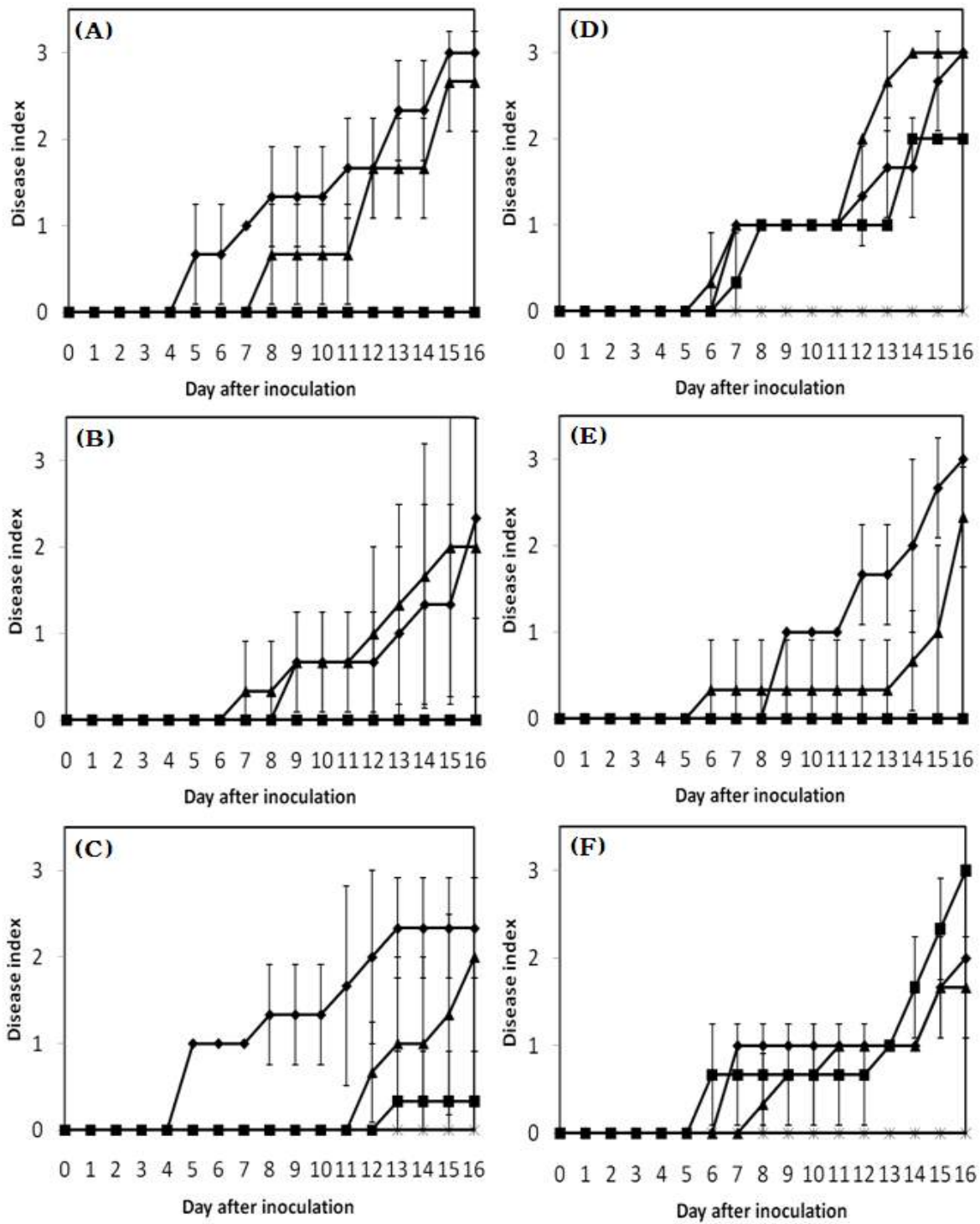


Fig. 14. *X. campestris* pv. *campestris* 균주별 배추(A to C)와 무(D to F)에서의 농도별 발병 진전. (A)와 (D), 10^6 CFU/ml; (B)와 (E), 10^7 CFU/ml; (C)와 (F), 10^8 CFU/ml. *, Control; ■, KACC10377; ◆, GW-7; ▲, GW-3. 각 잎당 3부위 접종, 포트당 3잎 접종 및 세 포트 반복의 평균과 표준편차(수직바)

(나) 양배추 발병

한편, 배추나 무에서 검은썩음병 발병에 비해 양배추에서 발병은 상대적으로 낮은 것으로 나타났다. 병원균의 접종조건등의 모든 조건은 배추에서나 무에서와 동일하였으나 농도별 접종에서 두 경우 모두 발병이 낮았으며 이는 세균의 농도를 낮게 접종하였기 때문이거나 또는 사용한 양배추 품종인 대박나가 상대적으로 처리한 네균주에 부분적인 저항성을 발현하기 때문일 것으로 예상된다. 따라서, 공시한 세가지 균주로 양배추 접종을 통한 저항성 평가를 위해서 대박나가 저항성 대조구 품종으로 적절할 것으로 예상된다. 감수성 품종은 대다수의 레이스에 감수성인 레드마트를 이용하는 것이 적절한 것으로 평가된다.

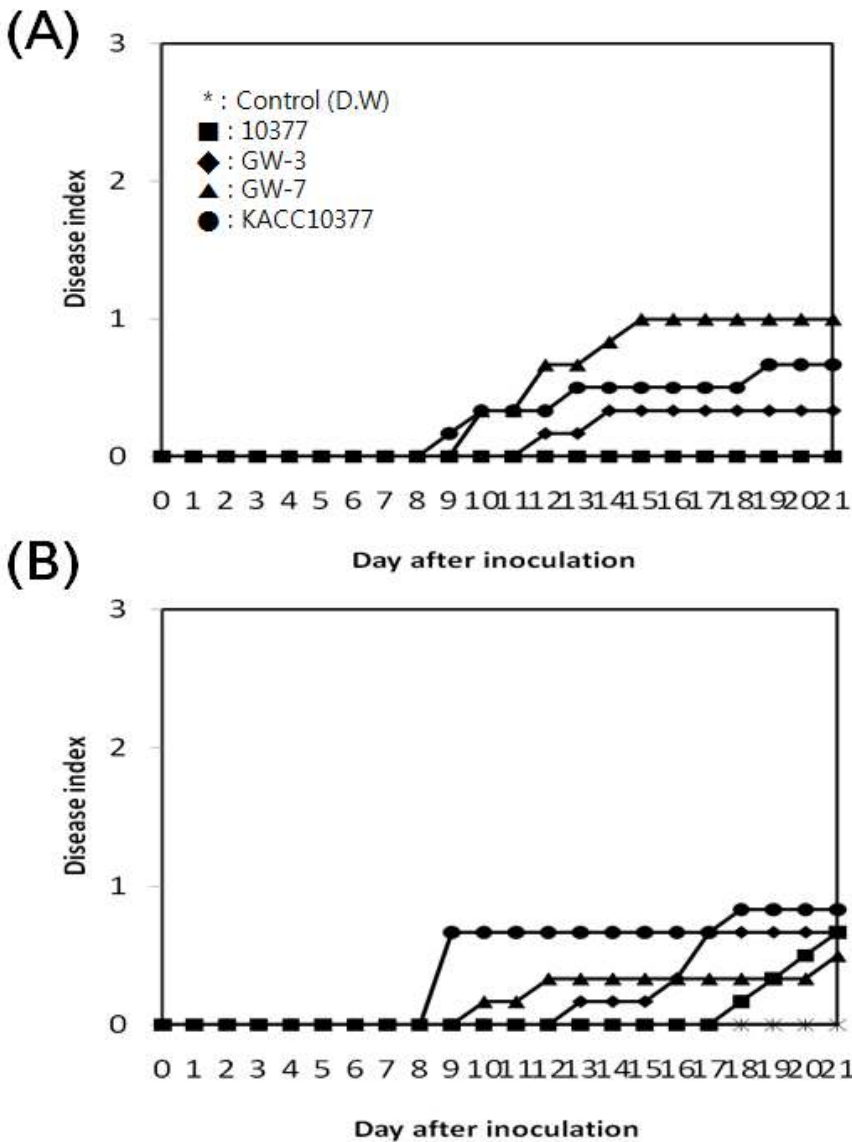


Fig. 15. *X. campestris* pv. *campestris* 균주별 양배추에서 발병진전. (A) 세균 농도 10^6 CFU/ml, (B) 세균 농도 10^7 CFU/ml 검은썩음병 발병진전.

다. 양배추 검은썩음병에 대한 저항성 스크리닝 체계 확립

(1) 서론

Xanthomonas campestris pv. *campestris*(Pammel) Dowson(XCC)에 의하여 배추과 작물에 발병되는 검은썩음병은 세계적으로 십자화과에 큰 피해를 주고 있는 병 중 하나로서(Kamoun et al. 1992; Williams, 1980), 도관세포가 검어지고 잎 가장자리에 V모양으로 황화되는 괴사 병반을 특징적으로 보인다(Smith, 1911; Stewart and Harding, 1903; Sutton and Williams, 1970). 병이 진전됨에 따라 엽맥의 도관을 덮고 있는 유조직 세포 또한 검어지고 식물은 점점 시들며 생육이 억제되어 마침내 이름처럼 썩어 버린다(Shusarenko et al. 2000). 상대 습도 80-100%, 25-35℃ 온도의 발생 호조건을 가져 따뜻하고 습도가 높은 곳에서 잘 발생되나 지리적으로 널리 분포하며 세계적으로 피해를 주고 있다(Griesbach et al., 2003). *Brassica* 속 작물이나 십자화과 잡초 등에도 침입 가능하고 특히 *B. oleracea* 작물의 생산량과 품질 저하에 큰 손실을 발생시킨다(Taylor et al., 2002; Williams, 1980).

*B. oleracea*는 Capitata그룹인 양배추, Italica그룹인 브로콜리 그리고 Botrytis그룹인 컬리플라워 등의 농업 채소분야에서 매우 중요하게 여겨지는 많은 경제적인 작물을 포함하고 있다(Cartea et al., 2008; Jo et al., 2012). 양배추는 Brassica 속의 대표적인 작물로 지중해 연안 일대와 아시아가 원산지이고 재배 역사가 가장 오래된 작물 중 하나로서(Oh et al., 2011), 평창, 남양주, 괴산, 홍성, 달성 등지를 주산지로 국내 생산량의 30%를 제주도에서 다음으로 강원도로부터 23%가 생산되며 많은 양배추가 국내에서 재배, 생산되고 있다(Eum et al., 2012; Lee, 2007).

양배추에 발생하는 주요 병해인 검은썩음병은 방제가 어려우나 방제를 위해 작물을 다양화하고 윤작재배를 하거나 건전한 종자, 유묘를 사용하며 잠재적인 감염원이 될 수 있는 감염된 식물 잔재와 십자화과 잡초를 제거하는 방법 등이 일반적으로 수행된다(Kocks et al., 1998; Schaad and Dianese, 1981; Williams, 1980). 그리고 저항성 품종의 사용도 아주 중요한 방제방법으로(Williams, 1980), 저항성 품종을 통한 방제는 낮은 비용으로 안정성을 가질 수 있어 큰 잠재성을 가진 방법으로 중요하게 인지되고 있다(Taylor et al., 2002; Vicente et al. 2001). XCC 저항성에 대한 연구로 품종 'Early Fuji'와 'Hugenot'가 유전적 특성을 가져 고도저항성을 나타낸다고 처음 보고된 이후(Bain, 1952; Bain, 1955), 많은 연구자들은 *B. carinata*, *B. juncea*, *B. napus*, *B. nigra*, *B. rapa* 뿐만 아니라 *B. oleracea*에도 많은 저항성 유전자형을 추가적으로 선발하여 도입하였다(Dickson and Hunter, 1987; Guo et al., 1991; Hunter et al., 1987; Marthe et al., 2002; Monakhos and Djalilov, 2000; Quazi, 1988; Sharma et al., 1972; Westman et al., 1999; Williams et al., 1972). 하지만 과거부터 지속적으로 저항성에 대한 연구가 수행되고 있었음에도 검은썩음병의 저항성 품종 재배는 쉽지 않아 성공된 사례도 적은 실정이다(Ignatov et al., 1998; Jensen et al., 2005; Taylor et al., 2002, Vicente et al. 2001). 앞으로 성공적인 XCC에 대한 양배추의 저항성 연구와 새로운 저항성 육종 소재의 발굴이 수행되기 위해서는 효율적이고 신뢰할 수 있는 병 저항성 검정법의 확립이 필수적으로 요구된다.

따라서 본 연구에서는 효율적인 양배추 검은썩음병 저항성 검정법을 확립하고자 접종 방법, 접종 엽, 생육 정도, 재배 온도 등의 다양한 발병조건에 따라 양배추 검은썩음병의 발생 정도를 조사하였으며, 확립한 검정법을 통해 시판 중인 양배추 16품종에 대한 검은썩음병 저항성 정도를 확인하였다.

(2) 재료 및 방법

양배추 재배

양배추 검은썩음병 저항성 검정법을 확립하기 위해 시판 중인 양배추 3품종 ‘루비아’(한국다끼이), ‘오조라’(사카타코리아), 그리고 ‘그린햇’(아시아종묘)과 조은종묘로부터 분양받은 검은썩음병 검정용 양배추 4품종 ‘Saint’, ‘Joeun ACE’, ‘Wonder ball’, ‘XCCR 500’ 종자를 공시하였으며 그 특성은 Table 5과 같다. 7품종의 종자를 5 × 8 육묘용 연결포트(70mL/pot, 범농사)에 원예용상토 5호(부농사)를 넣고 파종한 후, 생육 정도에 따른 실험을 제외한 모든 실험에서는 4주 동안 재배한 양배추로 실험하였고 생육 정도에 따른 발병조건에서는 3주, 4주, 5주간 양배추 육묘를 온실(25 ± 5°C)에서 재배하여 사용하였다.

시판 품종에 대한 저항성 검정 실험은 문산토코리아, 농우바이오, 아시아종묘, 코레곤종묘, 한국다끼이, 사카타코리아 등의 종자회사에서 판매하고 있는 양배추 16품종(CMS레드선, YR옴과로스, YR온누리, YR호남, 꼬꼬마, 대박나, 레드마트, 아시아블, YR호걸, 오가네, 루비아, 중생루비아, 오조라, 그랜드마트, 그린햇, YR에코플러스)과 조은종묘로부터 분양받은 검정용 양배추 7개(8398, 중감21호, Saint, Joeun ACE, Rareball, Wonder Ball, XCCR 500)를 위와 동일한 방법으로 재배하여 실험을 수행하였다.

Table 5. Trait of three commercial cabbage cultivars and four comparative cultivars against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

	Cultivar	Company	Trait ^z
Commercial cultivar	Rubia	Takii korea	
	Ohjora	Sakata korea	
	Greenhot	Asia seed	R
Comparative cultivar ^y	Saint	Seminis	S
	Joeun-ACE	Joeun seed	MR
	Wonder-ball	Seminis	MR
	XCCR 500	Joeun seed	R

^zResistant cultivar to black rot were kindly supplied by seed companies. S, susceptible; MR, moderately resistance; R, resistant.

^yComparative cultivars were obtained from Joeun seed, Goesan, Korea.

접종원 준비 및 병원균 접종

양배추 검은썩음병을 일으키는 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* KACC10377을 KACC로부터 분양받아 -70°C deep freezer에 보관하며 사용하였다. Trypticase soy agar(TSA, Becton, Dickinson and Co.)에 접종하여 30°C에서 3일 동안 전배양시킨 균주를 TSA배지에 재접종하여 2일 동안 30°C에서 분 배양시켰다. 균주가 배양된 배지에 멸균수를 부어 spreader로 수확하여 세균 현탁액을 만들었다. DU@800 UV/Visible Spectrophotometer(Beckman coulter Inc., Fullerton)를 사용하여 흡광도(OD, Optical density)를 측정하고 현탁액의 농도를

OD₆₀₀=0.125가 되도록 멸균수를 이용하여 조정하였다.

접종 방법에 따른 발병을 조사하기 위해 핀셋, 핀, 가위를 이용하여 4가지 방법으로 병원균을 접종하였다. 1엽과 2엽을 대상으로 핀셋 접종은 현탁액을 문힌 핀셋으로 수공과 엽맥에 직접적인 상처가 나지 않게 잎 가장자리에 엽당 2회씩 상처(0.3cm²)를 내었고, 핀 접종은 침핀 18개를 묶어 현탁액에 담근 후 식물체 엽의 가장 직경이 넓은 부위의 각 양쪽에 상처가 나도록 접종하였다. 가위 접종은 두가지 방법으로 수행하였고, 현탁액이 묻은 가위로 엽의 직경이 가장 넓은 부위 양 옆을 엽맥을 피하여 1cm 잘라 접종하는 방법과 잎 말단 부분이 2cm 남도록 제거하여 접종하는 방법을 이용하였다. 그리고 핀셋으로 엽맥에 직접적인 상처를 내며 접종하는 방법과 엽맥에 직접적인 상처가 나지 않게 수공과 엽맥을 피하여 접종하는 방법을 엽당 4회씩 수행하여 접종 위치에 따른 병 발생을 조사하였다. 또한 접종 방법에 따른 발생 실험을 제외한 모든 실험은 1-2엽을 핀셋으로 수공과 엽맥을 피해 엽당 4회씩 상처 접종하였고, 적합한 접종 엽을 조사하는 실험에서는 1-4엽에 동일한 방법으로 핀셋 접종을 수행하였다.

발병 및 병조사

접종 후 재배 온도에 따른 7품종의 양배추 검은썩음병 발생 실험은 접종한 양배추를 22℃, 26℃ 및 30℃ 습실상에서 24시간 동안 배양 후 각 온도의 항온실에서 하루 12시간씩 광을 처리하며 재배하며 양배추 검은썩음병의 발생을 관찰하였고, 그 외 모든 실험은 22℃ 습실상에서 24시간 배양 후 22℃ 항온습실로 옮겨 13-20일 동안 재배한 후 병 발생을 조사하였다. 발병 정도는 0=건전하거나 접종 부위 주변에 0.3cm²(접종 부위 면적) 이하의 약한 HR 반응 보이는 것, 1=접종 부위 주변 0.15cm²(접종 부위의 1/2) 이하의 병반을 보이거나 황화되는 현상만 보이는 경우 또는 진전형 병반없이 접종 부위 주변으로 0.3cm²이상의 강한 HR반응을 나타내는 것, 2=1cm²이하의 병반을 나타내는 것, 4: 1cm²이상의 병반 또는 고사 등 4단계로 하였다. 그리고 가위로 엽 끝을 접종하는 경우는 주맥을 기준으로 병반 길이를 조사하여 0=건전, 1=0.2cm이하, 2: 0.2cm 초과 1cm이하, 4: 1cm이상의 병반 또는 고사한 경우 등 4단계로 조사하였으며, 모든 실험은 10반복으로 실시하였다. 통계 분석은 SAS(SAS Institute, Inc., 1989, Cary, NC) 프로그램을 이용하여 ANOVA 분석을 하였으며, 처리 평균간 비교를 위하여 Duncan's multiple range test($P=0.05$)를 실시하였다.

(3) 결과 및 고찰

접종 방법에 따른 검은썩음병의 발생

접종 방법에 따른 양배추 검은썩음병의 발생을 조사하기 위해 핀셋, 18침, 가위로 side 접종 그리고 엽 말단을 접종하는 4가지 방법으로 접종이 수행되었다. 가위로 접종하는 두 방법 중 주맥이 접종되도록 엽 말단을 자르는 방법은 특히 저항성과 감수성의 차이를 보기 어려울 정도로 모든 품종에서 2.4이상의 높은 발병도를 보였고 side를 자르는 방법 또한 모든 품종에서 고르게 높은 발병도를 나타내었다. 그리고 18침 접종의 경우 평균 발병도에서는 차이를 보이는 듯 하였으나 품종간의 병 발병도에서 통계적으로 유의차가 없었고 핀셋 접종의 경우는 감수성 품종으로 보이는 '오조라'의 경우 3.2, 저항성 품종 'XCCR 500'은 0.8의 병 발생량을 보이며 품종간의 저항성 차이를 나타내며 통계적으로 유의차도 확인되었다(Fig. 16). 가위로 접종하는 두 방법은 접종 과정에서 편리성이 있으나 병 발생량이 심하고 품종 간의 차이를 나타내

지 못하여 검정 방법으로 적절하지 않은 것으로 나타났으며, Tonguç 등(2003)에 의해 2개의 침으로 접종하고 35일 후 병조사를 하는 방법 등으로 기존 저항성에 관한 연구에 사용되고 있는 침 접종 방법을 본 실험에서 상처와 접종량을 증가시키기 위해 18침으로 빠른 병 발생이 가능하도록 설계하여 수행하였으나 품종간의 유의차가 보이지 않는다는 점에서 비효율적인 것으로 보인다. 핀셋으로 접종하는 방법은 검은썩음병 접종에 일반적으로 사용되고 있는 방법으로(Ignatov et al., 1998; Staub and Williams, 1972; Taylor et al., 2002; Vicente et al., 2001), 본 연구에서도 다른 접종 방법과 비교하여 병발생도 우수하고 선발된 품종간의 유의적 차이도 잘 나타내고 있음에 가장 효과적인 방법으로 보인다.

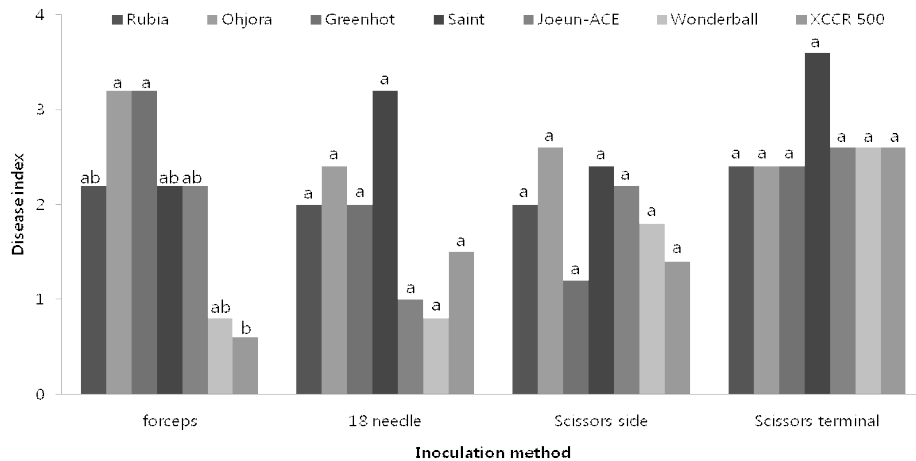


Fig. 16. Development of black root on seven cabbage cultivars according to four different inoculation methods. Four-week-old seedlings of cabbage cultivars were inoculated with *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* KACC 10377. The infected plants were incubated in humidity chamber at 22°C for 24 hours and then transferred to a growth room at 22°C with 12-hour light a day. After 2-3 weeks, disease severity of the seedlings was investigated on a scale of 0-4. Values in the labeled with the same letter are not significantly different in Duncan's multiple range test at $P = 0.05$.

Staub and Williams (1972)에 의해 검은썩음병 접종은 엽맥의 직접적인 상처 접종보다 엽맥에 직접적인 상처를 가하지 않고 접종하는 방법이 저항성과 감수성 품종의 병 발생량 비교에 효과적이라 보고하며 접종 위치의 중요성을 제기한 바 있다. 따라서 핀셋을 사용하여 엽맥에 직접적으로 접종하는 방법과 엽맥 근처에 접종하는 방법을 비교하였고 그 결과 엽맥에 접종한 경우 품종간의 저항성 차이가 품종의 특성과 상당히 달랐으며 간접적인 위치에 접종하였을 때는 저항성, 중도저항성, 그리고 감수성 품종들의 특성이 효과적으로 나타났다(Fig. 17). 가장 효과적인 접종 방법으로 판단된 핀셋 접종을 수행할 때는 엽맥에 직접적인 상처를 가하는 것보다 엽맥을 피해서 접종하는 방법이 검은썩음병 저항성 검정에 우수한 것으로 확인되었다.

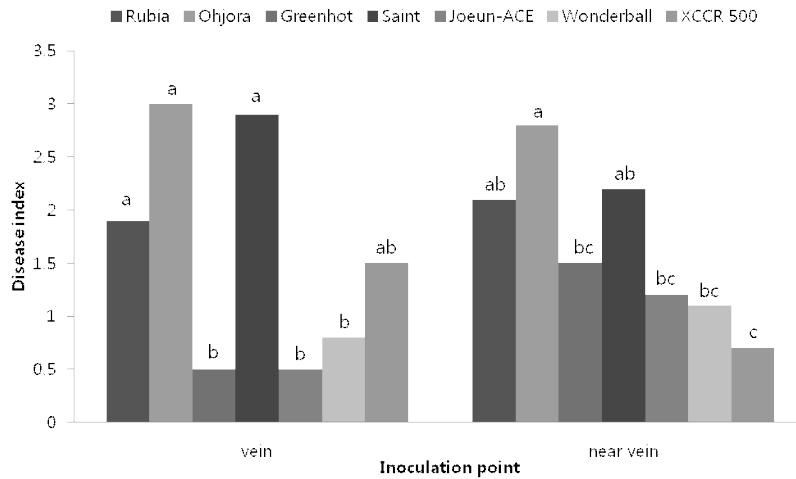


Fig. 17. Black root occurrence of seven cabbage cultivars after inoculation of veins and near vein. Four-week-old seedlings of cabbage cultivars were inoculated with *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* KACC 10377 using forceps. The infected plants were incubated in humidity chamber at 22°C for 24 hours and then transferred to a growth room at 22°C with 12-hour light a day. After 2-3 weeks, disease severity of the seedlings was investigated on a scale of 0-4. Values in the labeled with the same letter are not significantly different in Duncan's multiple range test at $P = 0.05$.

접종 엽위에 따른 검은썩음병의 발생

검은썩음병 검정을 위한 병원균 접종에서 적절한 엽를 조사하고자 1-4엽까지 접종을 수행한 결과, 2엽에서 가장 감수성 품종 '루비아', '오조라', 'Saint'는 더 높은 감수성을 보이며 저항성을 띄는 품종인 '그린햇', 'Joeun-ACE', 'Wonderball', 및 'XCCR 500'은 더 높은 저항성 반응을 나타내었고 상위 엽으로 갈수록 병의 발생량이 감소되는 양상을 보인다(Fig. 18). 양배추 검은썩음병의 연구는 3-4엽까지 접종하여 가장 많은 엽의 발병율을 조사하거나 개체별로 조사하는 방법으로 현재까지 연구가 진행되고 있으며(Soengas et al. 2007; Taylor et al. 2002; Vicente et al., 2001), 다수의 개체를 대상으로 실험이 진행하고자 할 때 처리 엽에 대한 연구는 시간과 노동력을 절약할 수 있다는 측면에서도 중요성을 가지는 부분임에도 적절한 접종 엽위에 대한 연구는 부족하다. 하지만 검은썩음병 접종시 접종은 2엽까지의 접종만으로도 저항성 검정이 가능할 것으로 보임에 따라 1-2엽을 접종하여 그 중 병 발생 정도를 조사하는 것으로 무리가 없을 것으로 판단된다.

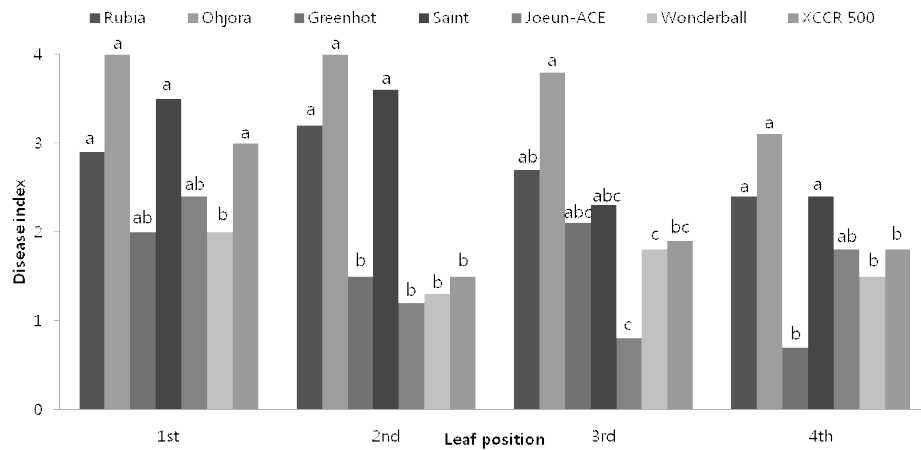


Fig. 18. The effect of leaf position among black root development on seven cabbage cultivars. Four-week-old seedlings of cabbage cultivars were inoculated with *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* KACC 10377 using forceps. The infected plants were incubated in humidity chamber at 22°C for 24 hours and then transferred to a growth room at 22°C with 12-hour light a day. After 2-3 weeks, disease severity of the seedlings was investigated on a scale of 0-4. Values in the labeled with the same letter are not significantly different in Duncan's multiple range test at $P = 0.05$.

생육 정도에 따른 검은썩음병의 발생

XCC의 접종 시기에 대한 실험을 위해 선발된 7품종의 파종 시기를 조절하여 5, 4, 3주 재배 후 접종하였다. 파종 후 5주간 재배 후 접종된 경우 양배추의 특성에 크게 상관없이 모든 실험구에서 3.1이상의 발병도를 보이며 다른 실험구에 비해서 병의 진전이 빠르게 나타났고, 3주의 경우는 저항성 품종 'XCCR500', 감수성으로 판단되는 '루비아' 품종이 각각 발병도 0.8과 4.0로 저항성 특성과 동일한 양상을 보이긴 하였지만 4주 재배 후 접종하였을 경우가 가장 큰 유의차를 나타내어 특성을 잘 나타낼 수 있는 접종 시기는 파종 후 4주로 판단되었다(Fig. 19). 기존 Jensen 등(2005)에 의한 *B. oleracea*에 발생하는 검은썩음병의 저항성 검정 실험 중 정식 후 생육 기간에 차이를 두고 접종을 수행하여 수치상 차이가 확인된 바 있으나 야외에서 수행되었던 관계로 접종 시기뿐만 아니라 접종 초기의 강우량 차이도 있어 적절한 접종 시기에 대한 평가는 이루어지지 못하였다. 하지만 재배 기간이 충분하지 못할 경우 병의 진전이 원만하지 않고 길어지면 하위 엽이 노화되고 낙엽지는 증상을 발생하여 정확한 저항성 검정에 어려움을 나타내므로 적절한 접종 시기에 접종하는 것은 중요한 부분이다.

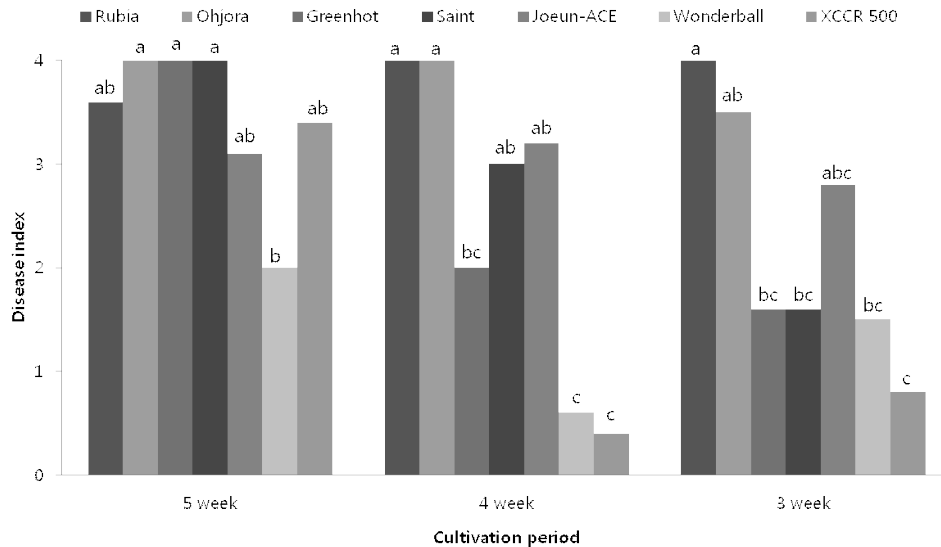


Fig. 19. Black root development of seven cabbage cultivars according to different cultivation period after seeding. Seedlings of cabbage cultivars were inoculated with *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* KACC 10377 using forceps. The infected plants were incubated in humidity chamber at 22°C for 24 hours and then transferred to a growth room at 22°C with 12-hour light a day. After 2-3 weeks, disease severity of the seedlings was investigated on a scale of 0-4. Values in the labeled with the same letter are not significantly different in Duncan's multiple range test at $P = 0.05$.

재배 온도에 따른 검은썩음병의 발생

양배추는 생육 적온인 20-24°C에서는 빠르고 안정적인 저항성 도입이 가능하나 양배추 성장보다 세균의 생육에 호조건인 30-32°C내외의 온도에는 저항성 발현이 늦어진다고 보고되고 있는 것처럼(Staub and Williams, 1972), 본 실험에서도 세균 생육에 적온인 30°C에서는 병 저항성이 거의 나타나지 못하였고 26°C에서 불안정적인 수치를 보이다가 양배추 생육에 가장 좋은 온도 22°C에서는 '루비아', '오조라', '그린햇', 'Saint', 'Joeun-ACE', 'Wonderball', 'XCCR 500'는 각각 2.8, 4.0, 2.3, 3.0, 0.9, 0.6, 0.6의 평균 발병도를 나타내며 품종간의 뚜렷한 특성을 보이고 있다(Fig. 20).

이상 결과로부터 양배추 검은썩음병에 대한 저항성을 효율적으로 검정하기 위해서는 파종 후 4주간 재배한 식물체의 1-2엽을 대상으로 엽맥에 직접적인 상처를 피하며 핀셋으로 접종하고 접종 후 22°C 생육상에서 재배 후 검정하는 것이 가장 적합하다고 판단되었다. 본 연구에서 확립한 양배추 검은썩음병 저항성 품종 검정방법은 앞으로 새로운 저항성 유전자원을 발굴하거나 분자마커 개발 및 저항성 유전자 규명 등의 연구를 수행할 때 유용하게 활용될 수 있다.

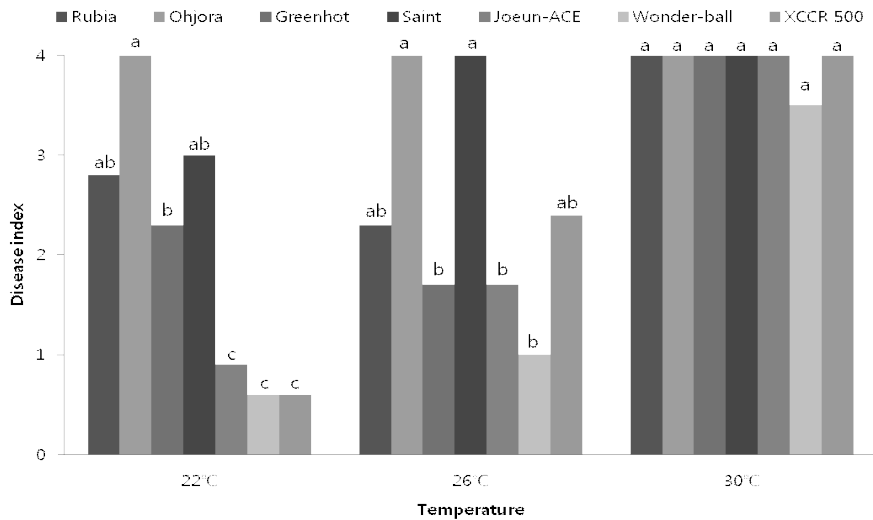


Fig. 20. Development of black root on seven cabbage cultivars incubated at some temperature. Four-week-old seedlings of cabbage cultivars were inoculated with *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* KACC 10377 using forceps. The infected plants were incubated in humidity chamber at 22°C, 26°C, and 30°C for 24 hours and then transferred to a growth room at 22°C, 26°C, and 30°C with 12-hour light a day. After 2-3 weeks, disease severity of the seedlings was investigated on a scale of 0-4. Values in the labeled with the same letter are not significantly different in Duncan's multiple range test at $P = 0.05$.

시판 중인 양배추 품종에 대한 품종별 저항성 차이

본 연구에서 확립한 양배추 검은썩음병 저항성 검정법을 사용하여 현재 시판 중인 양배추 16 품종과 7 대조품종의 검은썩음병 저항성 정도를 조사하였다. 16개 시판품종 중 'YR-오파로스' 1품종(6%)이 저항성을 보였으며, 중도저항성은 'YR-온누리', 'YR-호남', '그린햇' 그리고 'YR-에코플러스' 등 4품종(25%), 나머지 11품종(69%)은 감수성을 보였다(Table 6). 그러므로 1품종(6%)은 저항성, 4품종(25%)은 중도저항성, 그리고 11품종(69%)은 감수성 품종으로 확인되어 시판 중인 양배추 품종의 약 70% 이상이 양배추 검은썩음병에 저항성을 가지지 못한 것으로 드러났다.

Table 6. The degree of resistance of sixteen commercial cabbage cultivars and seven comparative cultivars to black rot caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* KACC 10377^z.

Cabbage Cultivar	Trait ^y	Disease index	
Commercial cultivar	CMS-Redsun	2.0 ± 1.2 ^x	
	YR-Omphalos	0.8 ± 0.9	
	YR-Onnuri	1.4 ± 0.7	
	YR-Honam	1.1 ± 1.0	
	Kkokkoma	1.7 ± 1.2	
	Daebakna	3.0 ± 1.2	
	Redmart	2.7 ± 1.0	
	Asiaball	1.8 ± 0.4	
	YR-Hogeol	1.6 ± 1.1	
	Ohgane	2.3 ± 1.2	
	Rubia	2.1 ± 0.8	
	Jungsaengrubia	1.8 ± 1.3	
	Ohjora	2.8 ± 1.0	
	Grandmart	R	1.7 ± 0.5
	Greenhot	R	1.5 ± 1.1
YR-Ecoplus	R	1.2 ± 0.9	
Comparative cultivar ^w	8398	S	1.7 ± 1.4
	Junggam 21 ho	S	1.4 ± 0.7
	Saint	S	2.2 ± 0.6
	JOEUN ACE	MR	1.2 ± 0.6
	Rareball	S-MR	2.4 ± 1.2
	Wonder Ball	MR	1.1 ± 0.9
	XCCR 500	R	0.7 ± 0.8

^zFour-week-old seedlings of cabbage cultivars were inoculated with *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* KACC 10377 using forceps. The infected plants were incubated in humidity chamber at 22°C for 24 hours and then transferred to a growth room at 22°C with 12-hour light a day. After 2-3 weeks, disease severity of the seedlings was investigated on a scale of 0-4. Values in the labeled with the same letter are not significantly different in Duncan's multiple range test at $P = 0.05$.

^yResistant cultivar to black rot were supplied by seed companies. S, susceptible; MR, moderately resistance; R, resistant.

^xEach value represents the mean disease severity ± standard deviation of ten replications.

^wComparative cultivars were obtained from Jooun seed, Goesan, Korea.

라. 배추, 무, 양배추 검은썩음병 병리검정 및 저항성 검정 구축

(1) 식물체의 육성

- ◆ 저항성/감수성 품종: 병원균 레이스에 따라 적절한 대조 품종이 확보되어야 함(다만, 본연구의 공시 균주를 상요할 경우 저항성 품종으로 대박나, 감수성 품종으로 레드마트를 이용)
- ◆ 식물의 종자를 지피포트(또는 작은 포트)에 직파한 후 3주차에 직접 유묘검정하거나 옮겨심기하여 파종후 총 4-6주차에 유묘검정
- ◆ 종자를 원예용 부농상태에 파종하며 별도의 시비를 하지 않음
- ◆ 병원균 접종 전 온도는 17-25도 사이에서 육성하며 접종후 22-25도에서 명기 16시간 암기 8시간을 유지하며 습도를 조절하지는 않음

(2) 병원 세균 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 의 배양 및 접종원 준비

- ◆ 병원세균은 PSB 액체배지에 접종하여 30℃, 200 rpm으로 24 시간 진탕배양한다.
- ◆ 세균 배양액을 상온에서 8,000 rpm, 10분간 원심분리한 후, 상층액을 버린다.
- ◆ 세균 pellet은 멸균수에 현탁하여 OD₆₀₀=0.3 (3-5 × 10⁸ CFU/ml) 이 되도록 조정한다.
- ◆ 세균 현탁액을 기주에 따라 10⁷-10⁸ CFU/ml 이 되도록 멸균된 식염수로 희석한다.

(3) 병원 세균 접종 및 유지

(가) 분무 접종

- ◆ 준비된 세균현탁액을 분무기를 이용하여 배추, 무, 양배추의 잎이 충분히 적셔지도록 분무한 후 48시간 봉지를 씌어 습도를 유지함.
- ◆ 이후 봉지를 벗기고 유지하면서 2주간 발병도를 관찰함. 이때 대조구는 세균을 현탁하지 않은 동량의 멸균수를 부어주어 발병 조건에 식물체를 두고 관찰한다.

(나) 핀셋 상처접종

- ◆ 끝에 홈이 있는 구부러진 핀셋(mouse tooth forcep)에 얇은 면전(솜)을 감고 준비된 세균 접종액을 적셔서 배추와 무등 작물의 잎 가장자리에 약하게 짚어서 접종함.
- ◆ 각 잎당 3-5 곳의 잎 가장자리에 접종하며 세 개체의 반복을 포함함. 접종한 잎을 표기하고 16일간 발병도를 관찰함
- ◆ 대조구는 멸균수를 동일한 방법으로 처리한 식물체를 포함함.

(4) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 접종 후 발병을 위한 식물체 유지 조건.

Temperature	Day-25℃ and Night-25℃
Humidity	분무접종: 48시간 봉지 씌우기 핀셋접종: 조절하지 않음

(5) 발병 Rating 및 저항성 판정

- ◆ 분무접종시 검은썩음병 병반면적율을 조사하며 0-30%의 병반면적율을 보이는 품종은 저항

성, 31-70%의 병반면적율을 나타내는 품종은 중도저항성, 71% 이상의 병반면적율을 나타내는 품종은 감수성 품종으로 판정

- ◆ 핀센을 이용한 잎 가장자리 상처접종의 경우 병징은 Vicenter 등 (2001)의 기술에 따라 발병인덱스를 이용함. 평균 16일까지 발병 인덱스가 2 이상인 경우 감수성임
 - 0, 병징없음
 - 1, 약한 괴사 및 퇴록(접종부위만)
 - 2, V자형의 병반(면적 1 cm²이하)과 검은 잎맥
 - 3, V자형의 병반(면적 1 cm²이상)과 검은 잎맥

(6) 주의 사항

- ◆ 분무접종의 경우 접종되지 않은 잎의 발병율을 제외할 수 있도록 함

4. 박과 과실썩음병 저항성 검정 구축

가. 저항성 검정 체계 구축

(1) 병원균 및 식물 품종

(가) 박과과실썩음병 일반

박과 과실썩음병은 세균에 의한 다범성 작물병으로 병원균은 과거 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* 로 명명되었다가 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* 로 그리고 최근에 *Acidovorax citrulli* 로 개명되었다. 기주는 수박, 호박, 메론, 참외, 오이, 박등의 박과작물을 포함하며 기주에서의 병징은 유묘마름, 과실썩음을 동반하며 병원균의 존재는 1965년 최초 보고되었으며 포장에서 병이 실제로 보고되기는 1990년 중국의 수박재배단지에서 최초 보고되었다. 현재까지 상업화된 저항성 품종은 보고되어 있지 못하며 일부 저항성 대목이 존재하는 것으로 알려져 있다. 병원균은 주로 종자전염 하는 것으로 알려져 있으며 최근 우리나라에서 수박 및 메론 재배지에서 문제가 되고 있는 작물병 이다.

(나) 병원세균 확보 및 배양

박과 과실썩음병 저항성 검정 체계 구축을 위해 우선 병원세균인 *Acidovorax citrulli* (또는 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*)를 아래와 같이 확보하였다. 호박종자에서 분리한 균주 DBH1는 본 연구팀이 감염이 의심되는 호박 종자에서 선택배지를 이용하여 직접 분리 하였으며 표준균주 ATCC29625 는 균주은행으로부터 분양받은 균주이다. 한편, 과실썩음병이 발생한 경북 안동으로부터 수박 과실 병부위로부터 콜로니 유형이 상이한 4개의 균주를 분리하고 16S rRNA 유전자 서열을 분석하였다. 4 균주는 모두 *Acidovorax citrulli* 균주와 유전자 염기서열에서 99% 유사성을 보여 과실썩음병균으로 동정하였다. 해당 균주들을 아래의 Table 7로 정리하였다.

Table 7. 과실썩음병 병원 세균주

균 주	분리원(분양)
<i>Acidovorax citrulli</i> DBH1	호박종자 분리균주
<i>Acidovorax citrulli</i> KACC10652 (ATCC29625)	수박과실(표준균주 분양)
<i>Acidovorax citrulli</i> KA5	수박과실 분리균주
<i>Acidovorax citrulli</i> KA7	수박과실 분리균주
<i>Acidovorax citrulli</i> YA6	수박과실 분리균주
<i>Acidovorax citrulli</i> YA7	수박과실 분리균주

병원세균은 nutrient agar 나 King's B 배지에서 통상적으로 배양하며 액체 배양의 경우 King's B 액체배지에를 이용하여 30도에서 진탕배양하며 접종원을 준비하였다.

(다) 식물의 확보 및 육성

박과 과실썩음병의 기주 작물로서 수박, 참외, 멜론을 사용하였으며 일부 저항성 후보 식물과 함께 상업 종자인 서태자 수박, 금제 참외, 얼스마운트하게 멜론을 이용하였다. 각 식물은 수계에서 발아하여 균일하게 발아한 종자를 지피포트(또는 작은 포트)에 옮겨 심은 후 자엽주입 접종의 경우 어린 자엽이 나온 1-2주차에 사용하였으며 본엽에 분무접종의 경우는 2번째 본엽이 나온 4주차에 분무접종에 이용하였다. 식물의 육성은 원예용 부농상토로 이용하였으며 온실의 25-30도에서 육성하며 별도의 시비는 하지 않았다.

(라) 병원균 접종 및 발병조사

병원균 접종을 위한 접종원 준비는 다음과 같이 수행하였다. *Acidovorax citrulli* 균주는 King's B 액체배지에를 이용하여 30도에서 24시간 진탕배양하였으며 배양액을 접종원을 준비하고 세균 배양액을 상온에서 8,000 rpm, 10분간 원심분리한 후, 상층액을 제거하였다. 세균 pellet은 멸균수에 현탁하여 OD₆₀₀=1.0 (2×10^9 CFU/ml) 가 되도록 조정된 후 적절한 부피의 멸균수로 희석하여 접종에 사용하였다.

접종방법은 분리한 병원균의 병원성 확인을 위해 1-2주된 유묘의 자엽에 병원세균 현탁액을 주입하는 방법과 4주된 유묘의 본엽에 병원세균 현탁액을 분무접종하는 방법으로 감수성/저항성을 평가하기 위한 방법을 시도하였다.

우선 자엽 주입접종을 위해 세균의 현탁액을 자엽의 뒷면에 주입하였다. 이때 병원균의 다양한 밀도로 희석된 접종액을 처리하며 대조구로 멸균수만을 주입하였다. 주입후 5일 이내에 발병을 조사하였다. 병원세균의 적정 발병온도로 알려진 30도에서 10^5 - 10^8 cfu/ml 농도의 병원균을 자엽에 주입하였으며 그 후 멸칭을 통하여 습도를 유지하며 30도에서 관찰하였다. 병원세균 주입 3-5일 후 수침상 병징 및 5-7일 자엽 괴사 및 유묘 고사를 관찰하였는데 발병율은 접종한 엽수에 대한 발병한 엽수의 백분율로 결정하였다.

분무접종의 경우는 희석된 농도의 병원세균이 충분히 식물이 잎에 적셔지도록 병원세균액을 엽면 분사접종하였으며 식물을 30도에서 봉지를 씌우고 16시간의 명조건, 8시간의 암조건

에서 유지하였다. 각 처리당 반복의 10개의 식물체를 사용하고 대조구로는 멸균수를 분무 접종한 처리구를 포함하였다. 발병의 평가는 발병면적율(diseased leaf area%, DLA)을 아래의 지표로 disease index로 결정하였다. (0, DLA 0%; 1, 1-25%; 2, 26-50%; 3, 51-75%; 4, 76-100%)

(2) 식물에서의 저항성 감수성 반응

(가) 분리 병원균의 병원성 검정

수박에서 분리한 병원균의 각종 작물의 병원성 검정에 앞서 우선 병원균의 병원성을 평가하기 위한 표준 방법 확립을 위한 분양 받은 균주인 ATCC29625를 이용하여 자엽주입 방법과 분무접종법을 평가하였다. 아래의 Fig. 21은 수박, 참외, 멜론의 자엽에서 표준균주의 병원성을 자엽주입 방법으로 발병 면적률로 정량하고 접종 5일 후 disease index 에 따라 그래프로 나타낸 것이다. 발병면적률로 나타내면 멜론에서 발병률이 일정하지 않은 것으로 나타나며 일반적으로 10^7 - 10^8 cfu/ml 의 균주농도에서 안정적으로 발병이 유도되었다.

본 연구에서 수박에서 분리한 4개의 균주 KA5, KA7, YA6, YA7 들도 동일한 방법으로 모두 병원성이 확인되었다.

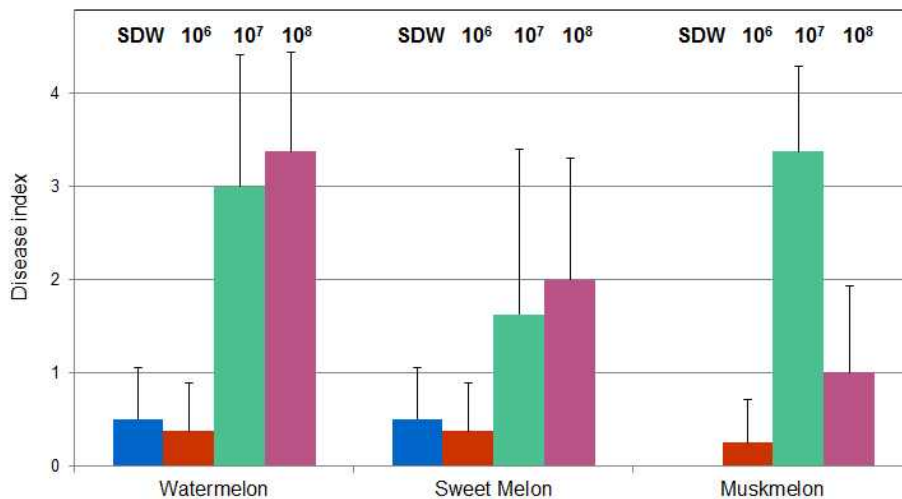


Fig. 21. 수박, 참외, 멜론에서 표준균주 농도별 자엽의 발병면적률에 따른 발병도

저항성 검정을 위해서 원예용 부농상토에 4주간 육묘한 박과 작물 묘를 이용하여 분무접종한 결과는 다음의 Fig. 22, 23과 같다. 접종방법은 유묘에 표준균주 ATCC29625 병원균 현탁액을 분무살포하여 습도를 유지하도록 멀칭하고 접종된 입에서의 수침 및, 퇴록, 황화현상을 관찰하며 발병 면적율을 정량하여 disease index로 계수화 하였다.

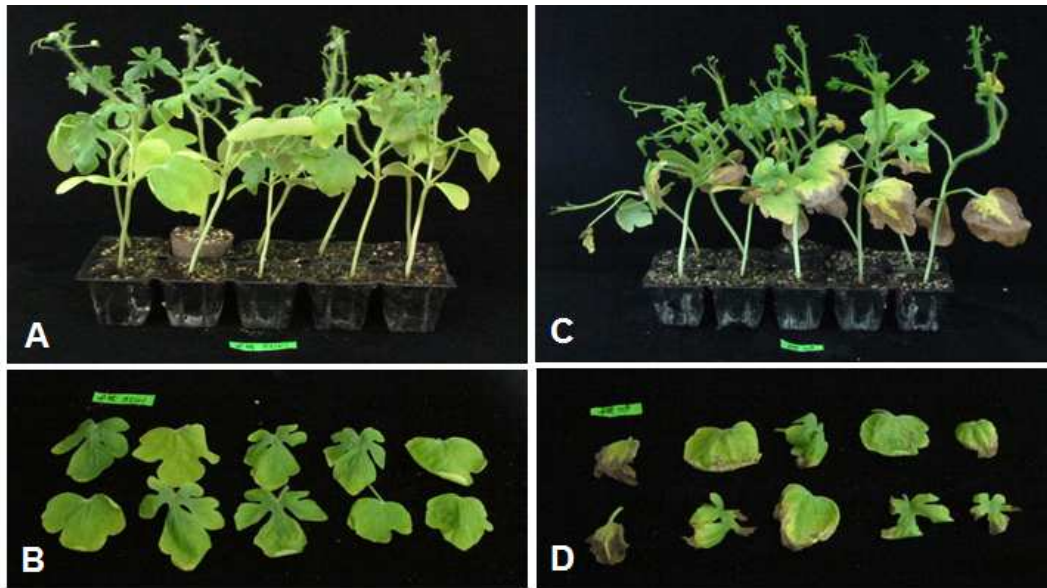


Fig. 22. 수박 유묘에서 표준균주 ATCC29625에 의한 발병사진. (A,B) water control; (C,D) 10^8 cfu/ml 분무 접종에 의한 발병 (접종 15일 후)

분무 접종에 의한 발병 식물의 분무된 잎의 발병 면적율을 정량하고 이를 disease index 로 계수화 하여 표준 균주 농도별 작물별 발병을 확인하였다. 아래의 Fig. 18은 그 결과로 표준 균주는 멜론에 병원성이 약한 결과를 보였다. 참외나 수박에서는 병원균 10^6 - 10^8 cfu/ml 농도로도 충분히 발병이 되었다. 그러나 박과 과실썩음병의 경우 아직 적절한 저항성 후보 품종이 없어서 본 연구에서는 일부 저항성 품종 대조구를 확보하기 위한 연구도 수행하였다.

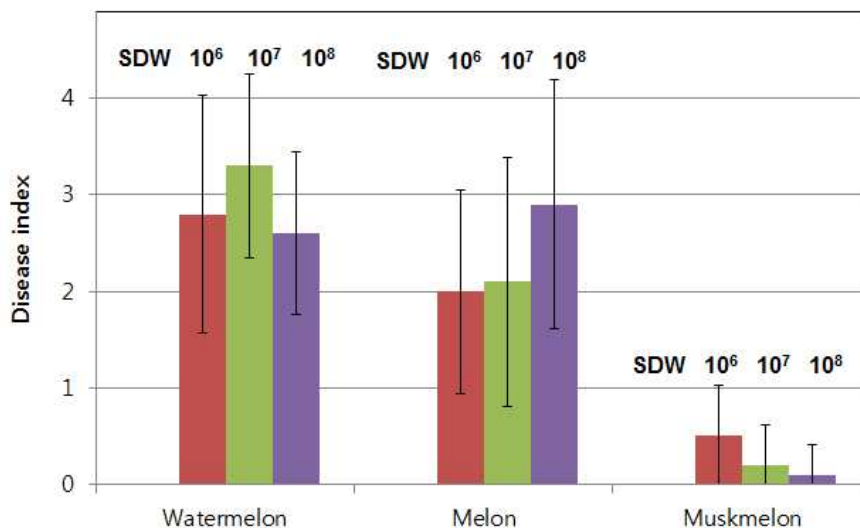


Fig. 23. 표준균주 ATCC29625 병원균 농도별, 작물별 분무접종에 의한 발병도(접종 15일 후)

(나) 분리 병원균의 작물별 병원성

국내 발병한 수박에서 분리한 4개의 균주에 대한 병원성은 자엽주입법으로 확인한 후 분무 접종에 의해 수박, 참외, 멜론에서 발병을 평가하였다. 아래의 Fig. 24는 분무접종결과 세 가지 작물에서 균주를 5×10^8 cfu/ml의 농도로 접종하였을 때 균주별로 평균 발병도를 나타낸 것이다. 그림에서 나타난 것처럼, 4가지의 균주가 모두 수박과 참외에서 잘 발병한 반면 멜론에서는 발병이 약한 것으로 나타났다. 특히 병원세균의 밀도가 감소하면 멜론에서 발병은 상당히 감소하여 해당 균주들이 대부분 멜론에서 병원성이 상대적으로 약한 것으로 예상된다. 다만 YA7 균주는 멜론에서도 상당히 병원성을 보유하는 것으로 평가할 수 있었다.

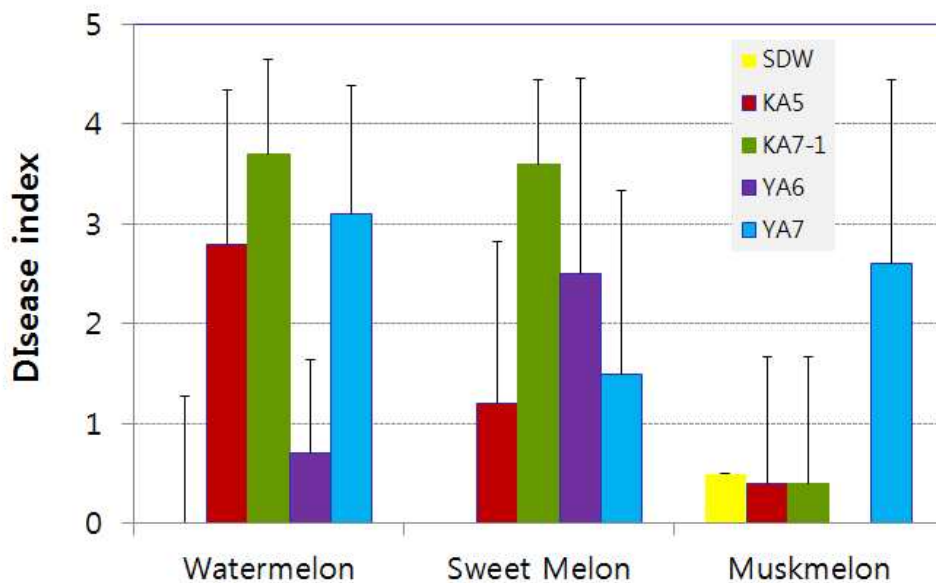


Fig. 24. 국내 분리균주의 수박, 참외, 멜론에서 발병정도.

국내 분리 균주들의 기주별 병원성 차이로 인해 멜론에서 검정을 위한 균주를 평가하기 위해 세 가지 서로 다른 멜론 품종을 이용하여 병원성을 평가하였다. 사용한 멜론은 상업 품종인 얼스마운트, 슈퍼세지, JJ하계 품종을 구입하여 평가하였으며 병원균의 밀도는 5×10^8 cfu/ml의 농도로 유지하였고 품종 당 10개체의 반복을 포함하였다. 비교균주로 분양받은 균주인 ATCC29625를 포함하고 멸균수만 처리한 대조구도 포함되었다. 분무접종 후 14일에 발병도를 평가하였으며 그 결과는 아래의 Fig. 25에 나타내었다. 아래의 그림에서처럼 검정한 모든 균주 중 YA7 균주만이 세 개의 멜론 품종을 모두 감염하였으며 YA6는 얼스마운트와 JJ하계 품종에 KA7 균주는 얼스마운트 품종을 감염할 수 있었다. 그러나 KA5와 ATCC29625 균주는 세 품종의 멜론에서 거의 병원성을 보이지 않았다.

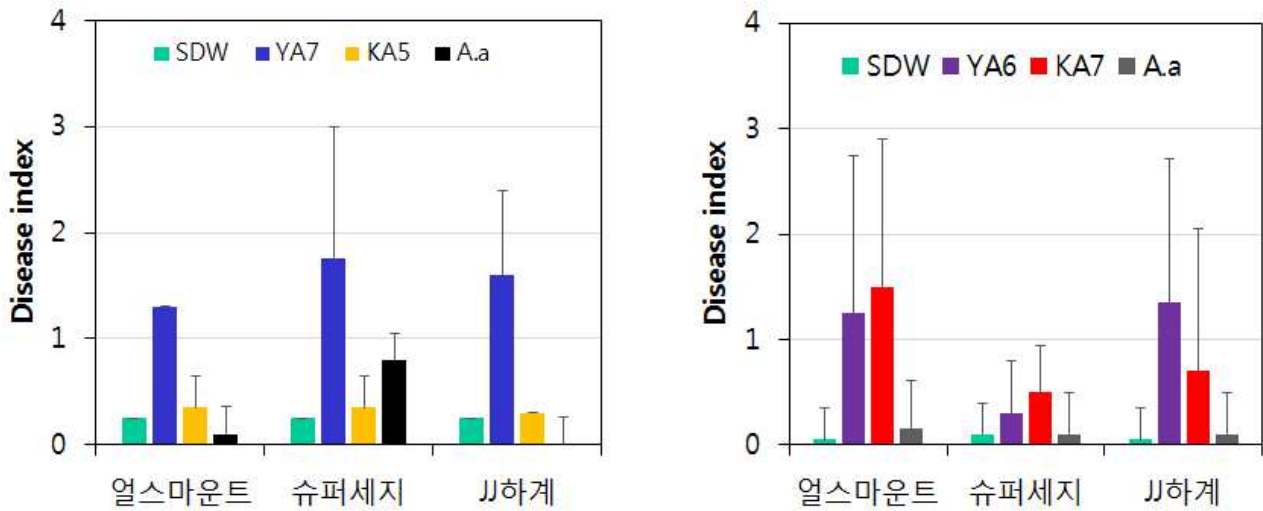


Fig. 25. 국내 분리 균주의 세 가지 멜론 품종에서 분무접종에 의한 발병도.

위의 결과는 병원세균이 멜론에서 일반적으로 병원성이 약하며 특히 균주간에도 병원력에서 기주 품종별로 차이가 있음을 나타낸다. 멜론에서 저항성/감수성 검정을 위해서는 국내 멜론에서 분리한 병원 세균을 이용하여 재평가할 필요가 있다. 본 연구에서 박과 과실썩음병을 평가하는 2년간 국내 멜론단지에서 박과 과실썩음병은 보고되어 있지 않으며 현재까지 국내에 메론 분리균주는 확보할 수 가 없었다.

(다) 저항성 멜론 후보 품종 평가

박과 과실썩음병에 대한 저항성 후보 품종 멜론 DBR1과 DBR3를 YA7 균주로 평가한 결과 두 품종 모두 슈퍼세지와 비교하여 오히려 감수성임을 확인하였다(Fig. 26). 그러나 오히려 본 실험을 통해 슈퍼세지는 저항성 품종일 가능성을 확인 할 수 있었다.

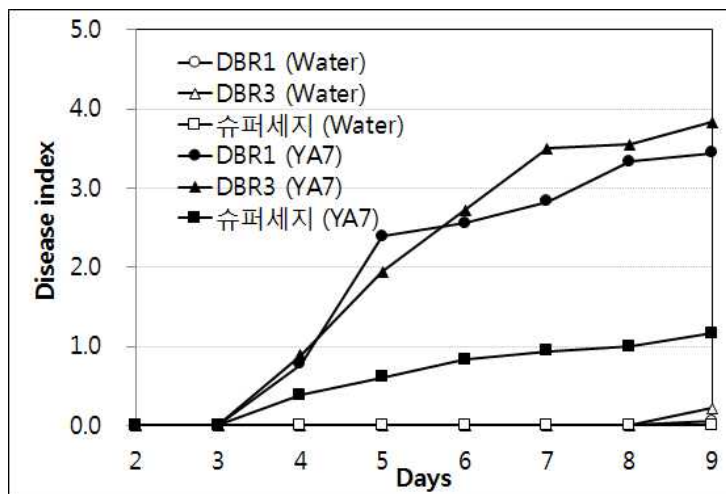


Fig. 26. 저항성 후보 메론 품종의 저항성/감수성 평가, YA7 균주를 이용한 평가

나. 박과 과실썩음병 병원균 병리검정 구축 요약

(1) 식물체의 육성[수박, 참외, 멜론 식물체 육성 동일하게]

- ◆ 저항성 품종 없음: 다수의 멜론 품종(수퍼세이지, 엘스마운트, JJ하계)이 국내 수박 분리균주에 저항성일 가능성 있음, 수박 저항성 품종 없음.
- ◆ 식물의 종자를 수계 받아하거나 지피포트(또는 작은 포트)에 직파한 후 2-4주차에 직접 자엽주입하거나 분무접종 함.
- ◆ 종자를 원예용 부농상태에 파종하며 별도의 시비를 하지 않음
- ◆ 식물의 습도의 조절하지 않고 수돗물을 관주하면서 육성, 온도는 25-30도 사이에서 육성하면 충분함.

(2) 병원 세균의 배양 및 접종원 준비

- ◆ King's B broth에 병원세균을 접종하여 초기 정지기까지 30도에서 24시간 진탕배양함
- ◆ 세균 배양액을 상온에서 8,000 rpm, 10분간 원심분리한 후, 상층액을 버리고 세균 pellet은 멸균수에 현탁하여 OD₆₀₀=1.0 (2×10^9 CFU/ml) 가 되도록 조정한다.
- ◆ 일반적으로 주입접종과 분무접종을 위해서는 10^8 CFU/ml 의 세균액을 주입하거나 분무접종함. (본 연구에서 메론의 경우 대부분 발병이 안되었으므로 10^9 CFU/ml을 분무하였으나 발병이 약하였음. 그러나 일부 메론에서 10^9 CFU/ml 분무에 의해 급격히 발병함)

(3) 병원 세균 접종 및 발병 rating

(가) 자엽주입 접종

- ◆ 세균의 현탁액을 자엽의 뒷면에 주입할 때 병원균의 희석된 접종액을 처리하며 대조구로 멸균수만을 주입함
- ◆ 병원세균의 적정 발병온도로 알려진 30도에서 식물을 유지함
- ◆ 병원균을 자엽에 주입 후 후 비닐 봉지 씌우기를 통하여 습도를 유지하며 30도에서 관찰
- ◆ 병원세균 주입 3-5일 후 수침상 병징 및 5-7일 자엽 괴사 및 유묘 고사를 관찰하며 발병율은 접종한 엽수에 대한 발병한 엽수의 백분율로 결정함

(나) 분무접종

- ◆ 희석된 농도의 병원세균이 충분히 식물이 앞에 적셔지도록 병원세균액을 엽면 분사접종함
- ◆ 식물을 30도에서 봉지를 씌우고 16시간의 명조건, 8시간의 암조건에서 유지함
- ◆ 각 처리당 반복의 10개의 식물체를 사용하고 대조구로는 멸균수를 분무 접종
- ◆ 발병의 평가는 발병면적율(diseased leaf area%, DLA)을 아래의 지표로 disease index로 결정함(0, DLA 0%; 1, 1-25%; 2, 26-50%; 3, 51-75%; 4, 76-100%)

(4) 주의 사항

- ◆ 해당 작물 병에 대한 연구가 충분치 않으며 아직 병원형 race 등 병원형 변이에 대한 충분한 조사가 부족하여 저항성/감수성 평가의 대조구 설정이 어려움 있음. 기주와 병원세균 사이의 유전자-유전자 상호작용의 평가가 가능할지 추가 연구가 필요함

다. 병원균 검출 및 동정

(1) 병원균 선택배지 및 콜로니 관찰

본 연구는 병리검정 서비스의 과정에서 예상하지 못하게 수행한 결과로 박과 채소작물에 서 최근 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*에 의한 과실썩음병이 심각해지고 있어서 종자에서 해당 병원균을 검출하기 위한 기초방법을 확립하였다. 연구는 병원균 오염이 의심되는 호박종자를 이용하였다. 우선 병원균을 확보하기 위해 종자의 표면을 살균수로 여러차례 씻어내고 종자를 멸균된 막자사발에서 마쇄하고 phosphate-buffered saline(PBS)를 5 ml 정도 넣고 현탁하여 현탁액을 Ethanol neutral red(ENR) agar 배지에 희석평판법으로 도말하였다. 이후 28도에서 2일간 배양하고 현미경을 이용하여 관찰하여 아래의 Fig. 27와 같은 콜로니들을 계대배양하였다.

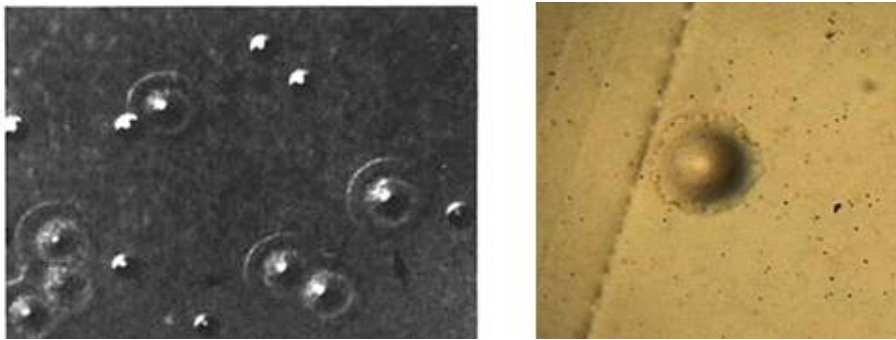


Fig. 27.. ENR 배지에서 형성된 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* 유사 콜로니. (좌) 문헌에 나타난 콜로니(화살표), Rane, K. K., and Latin, R. X. 1992. Bacterial fruit blotch of watermelon: Association of the pathogen with seed. Plant Dis. 76:509-512. (30 배 배율), (우) 호박종사에서 분리한 콜로니 (30배 배율)

(2) 병원균 특이적 PCR

순수분리된 해당 콜로니들의 병원균 동정을 위해서 16S rRNA 유전자를 증폭하고 유전자 서열을 결정하여 GenBank DB와 비교한 결과 99%이상의 identity로 전장의 16S rRNA 유전자 서열이 일치하여 해당 병원세균을 확보하고 BH1 균주를 확보하였다. 종자에서 검출을 위한 프라이머로 기존에 해당 병원균 특이 프라이머로 알려진 WFB1 (5'-GAC CAG CCA CAC TGG GAC-3') 과 WFB2 (5'-CTG CCG TAC TCC AGC GAT-3') 프라이머 쌍을 이용하여 해당 병원세균을 colony PCR 수행한 결과 예상되는 360 bp의 DNA가 증폭되었다(annealing temp: 65도). 병원균에서 특이적으로 두쌍의 프라이머가 이용되면 병원균이 검출된 종자의 마쇄액에서도 동일한 PCR 산물이 검출될 수 있었다(Fig. 28).

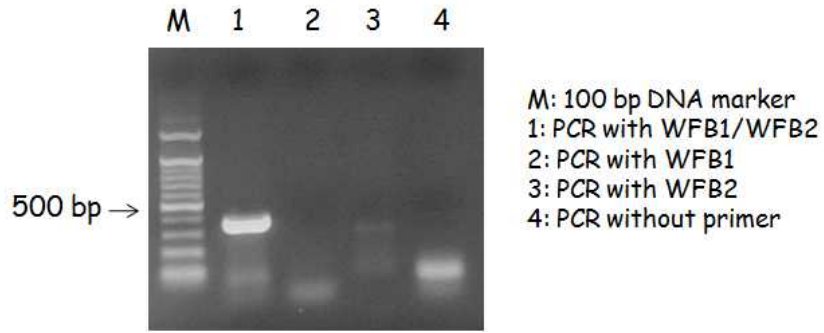


Fig. 28 마쇄된 감염 호박종자에서 병원균 검출을 위한 PCR 결과

제 3절. 바이러스병 병리검정 체계 확립

1. 전국 단위의 바이러스 이병 의심 시료의 수집

채소 작물의 바이러스 병리 검정을 위한 바이러스 균주는 본 과제를 수행하는 연구실에 이미 확보되어 있었음. 그러나 다른 식물 병원균인 원생생물, 곰팡이, 세균, 및 파이토플라스마와 달리 바이러스는 대부분의 경우 게놈이 불안정한 리보핵산(RNA)으로 구성되어 있을 뿐만 아니라, 이들 RNA 게놈의 *de novo* 복제를 담당하는 RNA-dependent RNA polymerase는 일반적으로 잘 알려진 DNA-dependent DNA polymerase가 가지고 있는 편집 기능을 가지고 있지 않기 때문에 무작위적인 돌연변이의 출현이 매우 높은 빈도로 일어나고 있음. 또한 기주 식물 세포내에서 바이러스의 생활사를 완성하기 위하여 필수적인 단백질의 합성도 기주 식물의 단백질 합성 도구에 전적으로 의존하기 때문에 기주 식물의 종류는 물론 동일한 기주 식물일지라도 품종 수준의 차이라도 지속적인 계대 배양은 선택적인 선발 압력으로 인하여 전혀 다른 게놈의 염기서열과 병원성을 가진 바이러스의 출현이 우려됨.

따라서 채소 작물의 바이러스 병리 검정을 위하여 실험실에서 연구용으로 활용되는 바이러스 균주를 동일하게 활용하는 것은 포장에서 나타나는 현상을 왜곡하는 병리 검정 결과를 초래 할 수 있음. 이러한 이유로 본 과제에서는 채소 작물의 바이러스 병리 검정에 활용되는 모든 바이러스를 전국단위에서 수집된 포장 균주를 활용하였음.

바이러스 균주의 수집은 일부 도서 지방을 제외하고 제주를 포함한 전국 단위에서 수집되었음. 수집대상 균주는 포장에서 실제 재배되는 채소 작물이 나타내는 병징의 정도에 따라 개별적으로 수집되었음. 바이러스 시료 수집의 대상이 된 채소 작물은 가지과의 고추, 토마토, 가지, 감자, 박과의 호박, 수박, 참외, 멜론, 오이, 십자화과의 배추, 무, 등이며 기타 채소 작물로는 상추, 시금치 등으로 구성되어 있음(Table 1). 조사 대상 채소 작물 가운데 1종의 바이러스도 수집되지 않은 작물은 단년생인 십자화과의 유채 및 갓으로 바이러스 전염 원인인 곤충 벡터의 활동 시기 이전에 재배가 완료되어 바이러스 시료의 수집이 되지 않은 것으로 사료됨.

이들 채소 작물에 자주 발생하고 국내 생태 환경에 정착하여 지속적으로 발생하거나 지속적인 피해가 나타나는 바이러스들을 우선적으로 확보하였음(Table 1). 동일한 작물에서 수집된 동일한 바이러스의 경우 시료 수집 당시 포장에서 재배되는 채소 작물에 나타나는 특징적인 병징이 지역에 따라 나타나지 않는 경우는 무 작위적으로 표준 시료를 제작하기 위한 재료로 활용되었음. 수집된 모든 바이러스 이병 의심 시료는 본 연구실이 보유하고 있는 바이러스 진단용 프라이머를 활용하여 RT-PCR에 의하여 진단되었음(Table 2).

본 과제의 지원으로 전국 단위의 바이러스 시료 수집의 결과 나타난 포장에서의 특이적인 바이러스 병 발생 현황은 가지과 및 박과 채소 바이러스에서 현저하게 나타났음. 기존에 알려진 박과 채소 작물에 병을 발생하는 바이러스는 WMV2 (Watermelon mosaic virus 2)의 발생 빈도가 현격하게 높아져 있었음. 가지과 채소 작물에 발생하는 바이러스의 경우 2008년 국내 발생 최초 보고된 TYLCV(*Tomato yellow leaf curl virus*)가 전국적으로 확산되어 있는 사실이 확인되었음.

Table 1. 전국 단위에서 수집된 바이러스 균주 목록^a.

기주식물		바이러스
가지과	고추	Pepper mild mottle virus (PMMoV)
		Pepper mottle virus (PepMoV)
		Broad bean wilt virus 2 (BBWV2)
		Cucumber mosaic virus (CMV)
		Tobacco mild green mosaic virus (TMGMV)
	토마토	Tomato spotted wilt virus (TSWV)
		Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)
	감자	Potato virus S (PVS)
Potato virus Y (PVY)		
박과	메론	Watermelon mosaic virus 2 (WMV2)
		Melon necrotic spot virus (MNSV)
		Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)
	조롱박	Watermelon mosaic virus 2 (WMV2)
		Papaya ringspot virus (PRSV)
	참외	Watermelon mosaic virus 2 (WMV2)
		Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)
	호박	Watermelon mosaic virus 2 (WMV2)
		Kyuri green mottle mosaic virus (KGMMV)
		Squasi mosaic virus (SqMV)
		Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)
	오이	Watermelon mosaic virus 2 (WMV2)
		Cucumber mosaic virus (CMV)
		Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)
	십자화과	무
Ribgrass mosaic virus		
기타	상추	Lettuce mosaic virus (LMV)

^a수집된 균주는 바이러스의 병징을 고려하지 않고 계놈 서열이 확인된 시료를 표준 시료의 제작 및 병리 검정에 활용하였음. 수집된 바이러스 가운데 신·변종은 병리 검정에 활용하기 위하여 기주 범위, 국내 분포, 등의 추가 연구가 필요하기 때문에 제외되었음.

Table 2. 수집된 시료로부터 바이러스를 검출하기 위해 사용된 primer sets.

	Virus	Primer	Sequence
가 지 과	CMV ²⁾	CMR3-C30	CCA CAC GGT AGA ATC AAA T
		CMR3-N50	CGC AGG TGG TTA ACG GT
	BBWV2	BBW2-C40	GCT AGG TCC AGG CAA ATT GTA
		BBW2-N30	GTT GGT GCG ATG TCA GG
	PepMoV	PepMo-C40	TAT CGT GGC ATG TAT GGT TCT TG
		PepMo-N40	GAA TAC AAA CCA AGC CAA GT
	TYLCV	TYLCV-1f	GTC AAC CAA TCA AAT TGC ATC CTC AA
		TYLCV-1-2r	GTC CAA AAT CAA TTG GGC
박 과	CGMMV	CG-C60	AAT TAA GTA AAG TCC TGA CG
		CG-N30	TGA TCT TAC AAA ACA CCT
	MNSV	MN-C05	AAA GCG TTA TTA CTA GGA TTG AC
		MN-N55	GAG GCA ACA TTT CGT ACA CTG AGG
	ZYMV	ZYM-C10	AGG CTT GCA AAC GGA GTC TAA T
		ZYM-N50	TAT ATA GAG ATG AGA AAT GCA GA
	WMV2	WM2-C20	CTT ATA ACG ACC CGA AAT GCT A
		WM2-N50	AGT CCG TAT ATG CCT AGA T
십자 화과	TuMV	TuM-C10	TCA CCA CAT GCG CTA ACA CCA A
		TuM-N60	ACA TTG AAA AGC GTA ACC A

2. 바이러스 표준 균주의 제작

채소 작물에 병을 일으키는 바이러스를 수집하여 바이러스 병리 검정을 위한 표준 시료를 제작하였음. 다년간 포장에서 수집된 바이러스 시료를 분석하여 일정 부분의 바이러스 계통에 변화가 없을 경우 표준 시료 제작에 활용 하였으나 일부 바이러스의 경우 1회 계대 증식 배양으로 다른 바이러스 대비 상대적으로 변이가 매우 높아 코호의 범칙을 반영 할 수 없는 경우는 표준 시료의 제작에서 제외되었음.

수집된 시료로부터 병리검정을 위한 표준 시료의 제작은 바이러스의 검출로부터 계통의 일부 서열을 확인하여 최종적으로 동결 건조하여 영하 20°C 냉동 보관하였음(Fig. 1). 그러나 동결 건조된 표준 바이러스 균주 가운데 일부 potyvirus속에 속하는 바이러스의 경우 1년 미만 생물학적인 활성이 유지되는 것으로 확인되어 영하 70°C 냉동고에 파우더 형태로 보관하고 최초 분리된 기주와 동일한 식물에서 증식하여 유지하고 있음(Table 3).

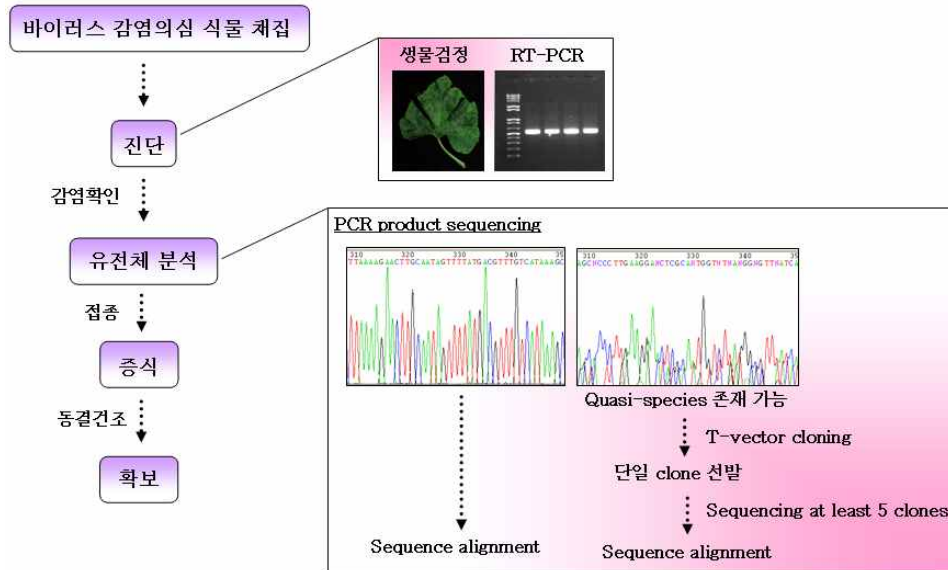


Fig. 1. 시료의 수집 및 감염 예상 바이러스의 검출이 확인된 시료는 계놈의 일부 염기 서열의 확인 결과를 토대로 표준 시료의 제작 여부를 판단하였음. RT-PCR product를 클로닝하는 과정을 생략하여 quasi-species의 존재 여부를 판단하고 만약 quasi-species의 존재가 확인되면 RT-PCR product를 클로닝하여 변이의 정도를 확인하여 표준 시료 제작의 대상으로 선정하였음.

Table 2. 채소 바이러스 병리검정에 활용된 바이러스 표준 시료 목록.

기주식물		표준 균주
가지과	고추	Pepper mild mottle virus (PMMoV)
		Pepper mottle virus (PepMoV)
		Tobacco mild green mosaic virus (TMGMV)
	토마토	Tomato spotted wilt virus (TSWV)
		Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)
	감자	Potato virus S (PVS)
Potato virus Y (PVY)		
박과	메론	Watermelon mosaic virus 2 (WMV2)
		Melon necrotic spot virus (MNSV)
		Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)
	조롱박	Watermelon mosaic virus 2 (WMV2)
		Papaya ringspot virus (PRSV)
	참외	Watermelon mosaic virus 2 (WMV2)
		Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)
	호박	Watermelon mosaic virus 2 (WMV2)
		Kyuri green mottle mosaic virus (KGMMV)
		Squasi mosaic virus (SqMV)
		Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)
	오이	Watermelon mosaic virus 2 (WMV2)
		Cucumber mosaic virus (CMV)
		Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)
	십자화과	무
Ribgrass mosaic virus		
기타	상추	Lettuce mosaic virus (LMV)

3. Quasi-species의 분석

가지과, 박과, 십자화과 등의 채소 작물에 발생하는 바이러스 가운데 기주 세포내에서 계놈의 복제 과정이 매우 불안정하여 기주 식물 기준으로 한 세대 내에서 변이 바이러스가 발생하는 바이러스가 있는 것으로 알려져 있음. 대표적으로 이러한 현상이 발생하는 바이러스인 BBWV2와 CMV를 대상으로 quasi-species의 발생 빈도를 조사하였음. 고추에서 분리된 두 종류의 바이러스 계놈의 일부 염기 서열을 분석한 결과 BBWV2에서 4종류와 CMV에서 2종류의 quasi-species가 확인되었음(Fig. 2).

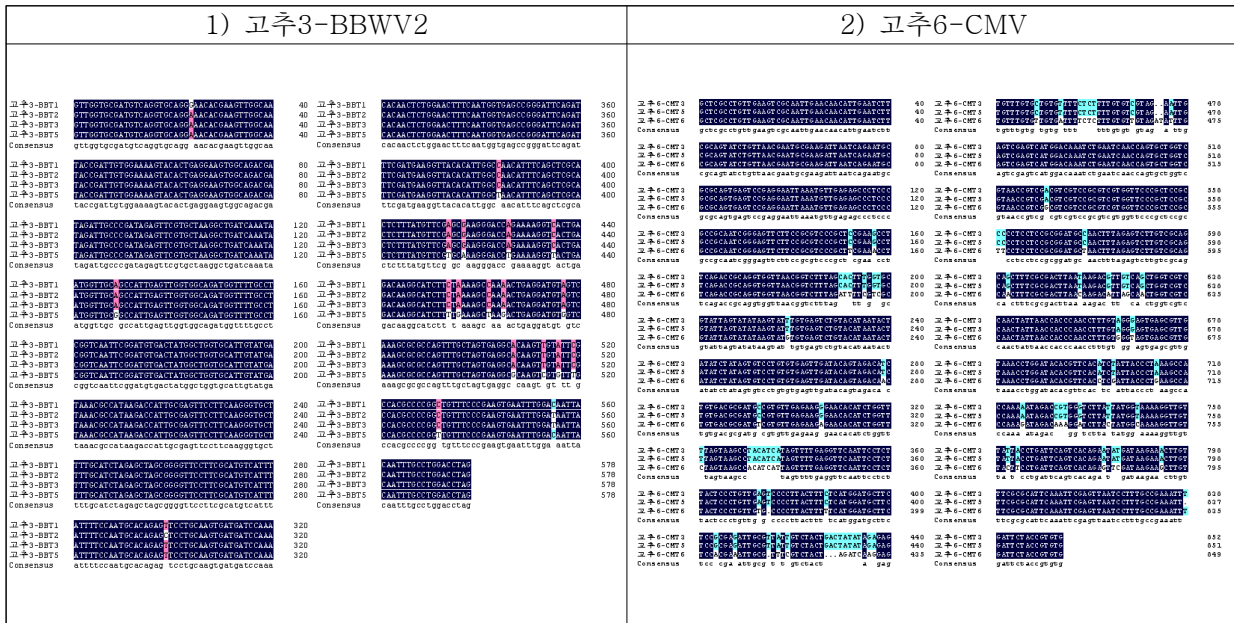


Fig. 2. 포장에서 수집된 바이러스 감염 의심 고추 시료로부터 검출된 BBWV2 및 CMV의 일부 계놈 서열. 동일한 시료에서 동일한 바이러스를 검출하여 염기서열을 확인한 결과 매우 높은 빈도의 quasi-species가 확인되었음. 4종류의 BBWV2 quasi-species와 2종류의 CMV quasi-species가 나타났음.

이러한 분석 결과를 토대로 이 두 종류의 바이러스를 병리 검정용 표준 시료로 활용되어 의뢰된 종자에 한차례 접종되어 기주 식물에서 계대 배양 되면 어느 정도 수준의 quasi-species가 발생되는지에 대한 시뮬레이션을 수행하였음. 시뮬레이션 재료는 충청북도 청원군 하석리에서 수집된 CMV 감염 고추 시료를 활용하였음. 시험 대상 바이러스 계놈 영역은 변이가 상대적으로 높은 빈도로 나타나는 CMV RNA3의 3a 바이러스 단백질을 발현하는 지역을 선정하였음(Fig. 3).

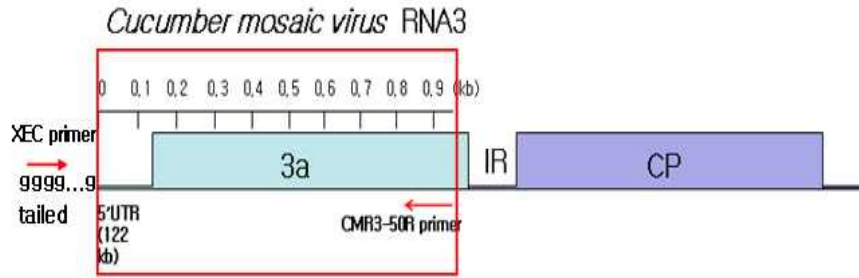


Fig. 3. CMV의 quasi-species를 확인하기 위하여 분석된 CMV RNA3 5' 부위.

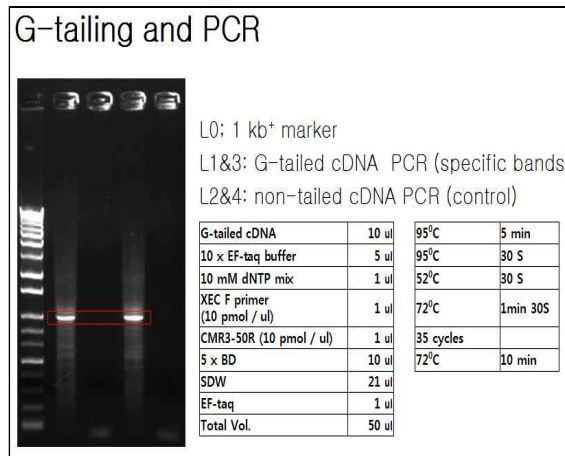


Fig. 4. 수집된 고추 시료의 total RNA를 주형으로 특이 프라이머(CMR3-50R)를 사용하여 cDNA를 합성 하였으며, 3' 말단에 poly G tailing 하여 PCR을 수행한 결과. Poly G tailing 과정을 생략한 주형 cDNA에서는 증폭 산물이 없는 것으로 확인되어 반응의 특이성이 입증되었음.

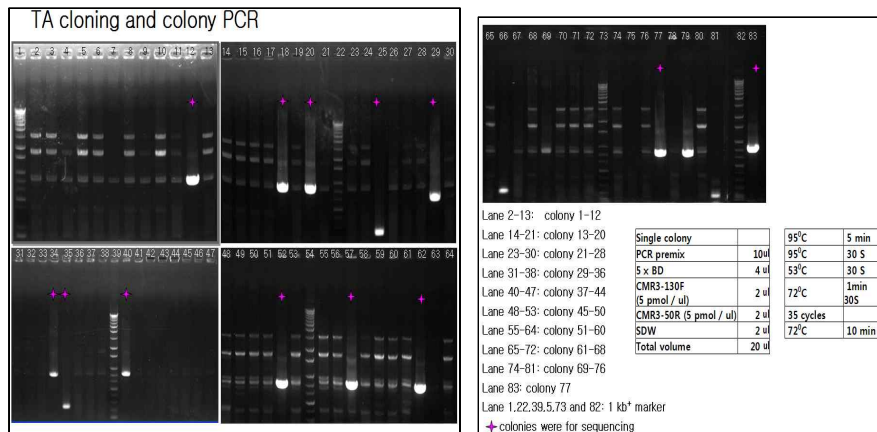


Fig. 5. Fig. 4에서 증폭된 산물을 CMR3-50R와 G tailing에 상보적인 프라이머를 사용하여 PCR을 수행한 후, PCR product를 T-vector에 클로닝 하였음. 각각의 콜로니로부터 insert를 확인한 결과. 증폭된 insert의 크기가 동일하지 않고 서로 다른 것으로 나타났음. 증폭된 산물은 아가로스 겔에서 분리하여 염기서열이 결정되었음.

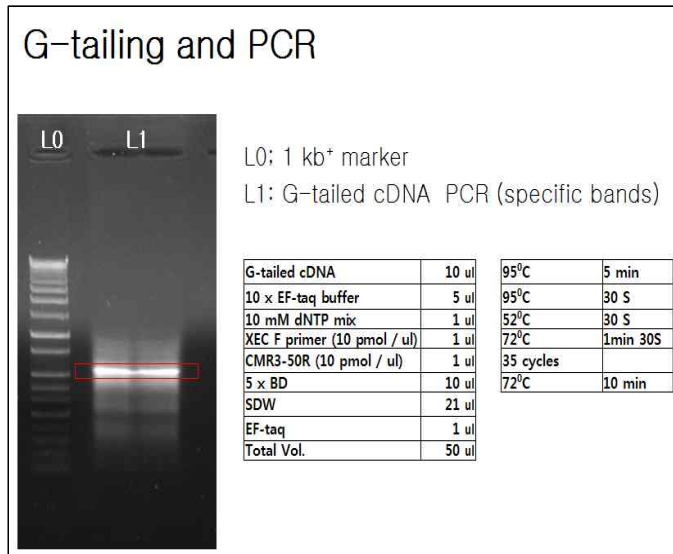


Fig. 6. 최초 수집된 고추 시료의 즙액을 활용하여 건전한 고추(녹광)에 접종하여 바이러스 병징을 확인하였음. 이 고추로부터 total RNA를 주형으로 특이 프라이머(CMR3-50R)를 사용하여 cDNA를 합성 하였으며, 3' 말단에 poly G tailing 하여 PCR을 수행한 결과.

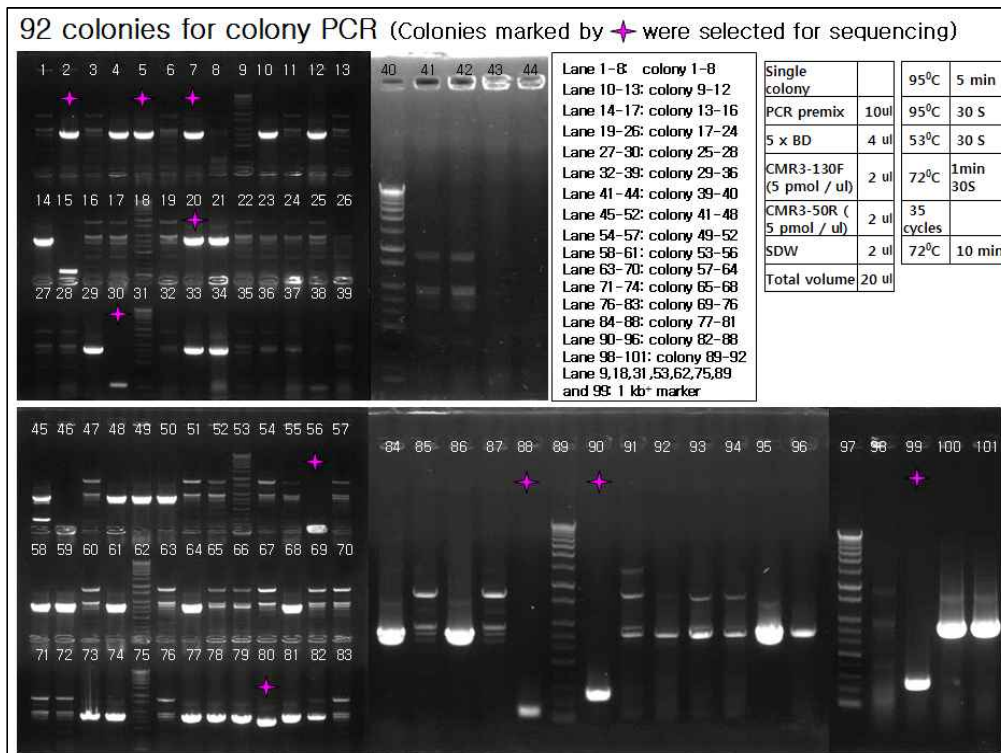
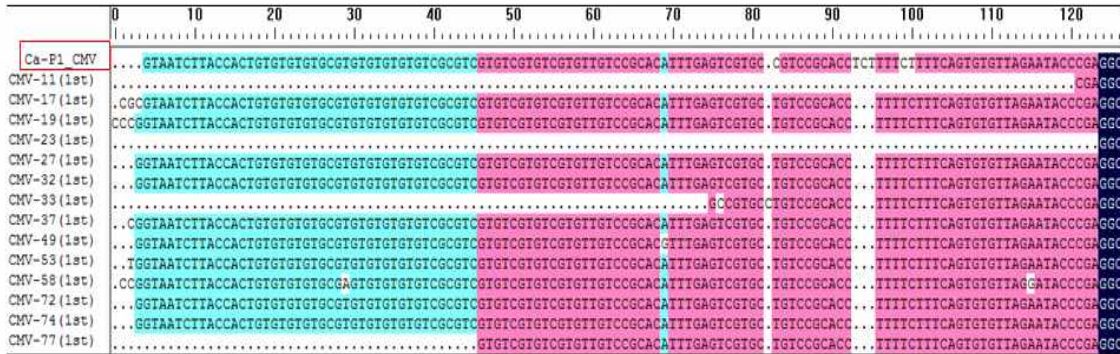


Fig. 7. Fig. 6에서 증폭된 산물을 CMR3-50R와 G tailing에 상보적인 프라이머를 사용하여 PCR을 수행한 후, PCR product를 T-vector에 클로닝 하였음. 각각의 콜로니로부터 insert를 확인한 결과. 증폭된 insert의 크기가 동일하지 않고 서로 다른 것으로 나타났음. 증폭된 산물은 아가로스 겔에서 분리하여 염기서열이 결정되었음.

Alignment of 5'-UTR sequences of CMV RNA3

* Ca-P1 sequence from NCBI was selected for standard comparison

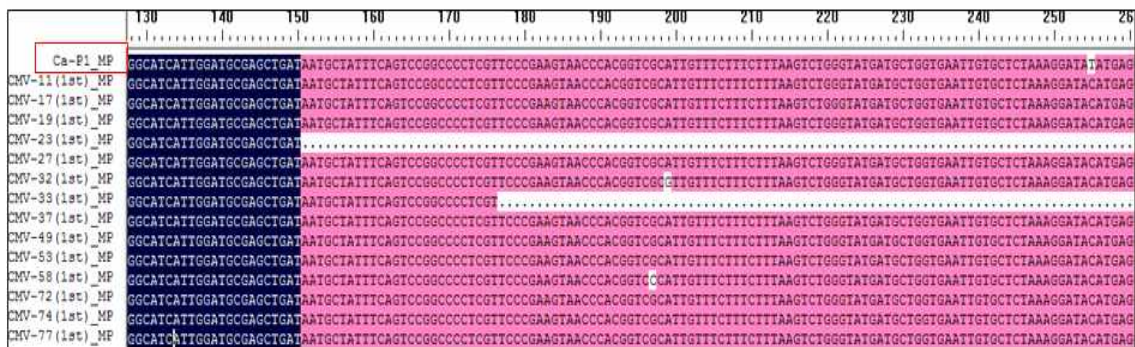
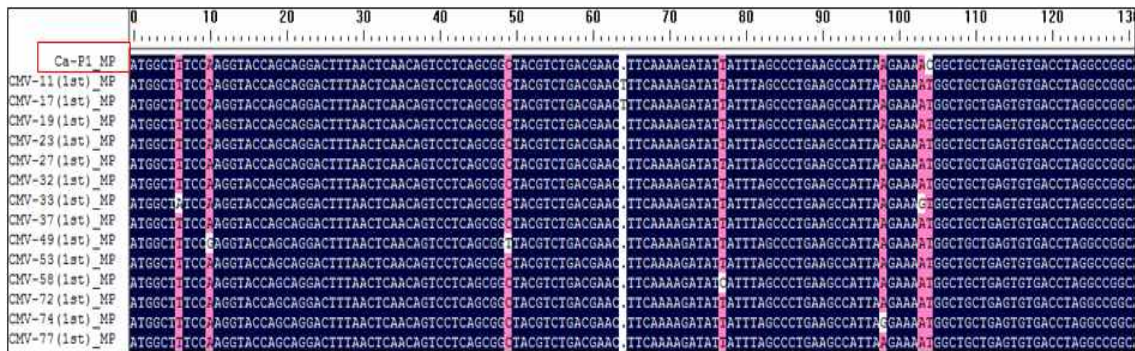
→ 1st detection



Alignment of MP sequences of CMV RNA3

* Ca-P1 sequence from NCBI was selected for standard comparison

→ 1st detection



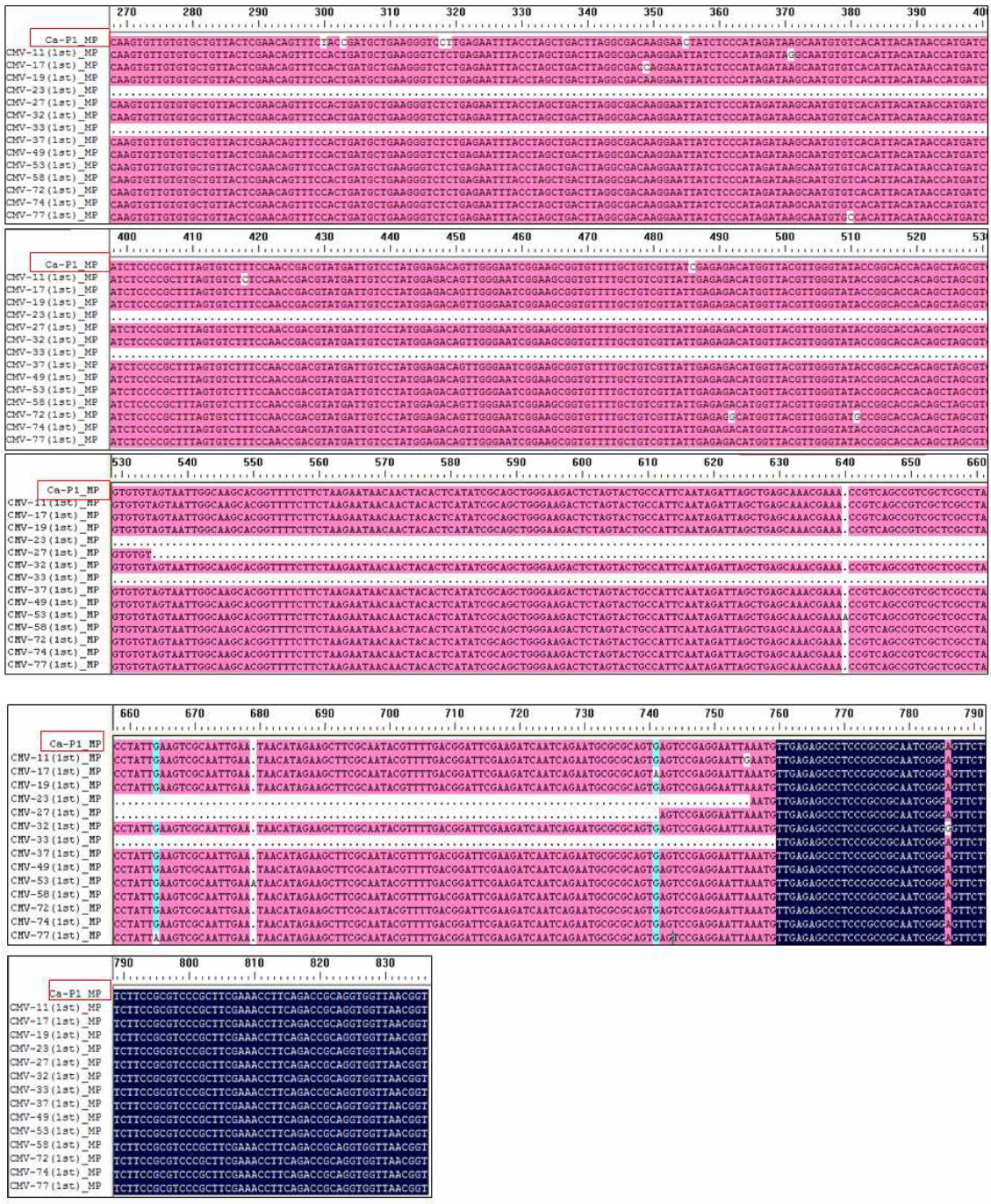


Fig. 8. Fig. 5에 나타난 증폭 산물의 염기서열과 이들의 분석결과. 분석에 의하여 나타난 결과는 NCBI에 등록된 CMV Ca-P1 sequence를 기준으로 alignment하였음. Alignment는 DNAMAN을 활용하여 UTR region과 ORF 영역을 나누어 비교하였음.

Alignment of amino acid sequences of MP of CMV RNA3

* Ca-P1 sequence from NCBI was selected for standard comparison

→ 1st detection

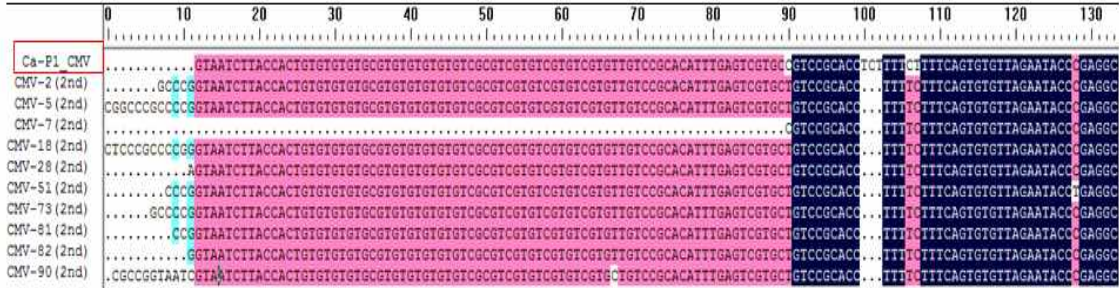


Fig. 9. Fig. 5에 나타난 증폭 산물의 아미노산서열과 이들의 분석결과. 분석에 의하여 나타난 결과는 NCBI에 등록된 CMV Ca-P1 sequence를 기준으로 alignment하였음. Alignment는 DNAMAN을 활용하여 ORF 영역에서만 이루어졌음.

Alignment of 5'-UTR sequences of CMV RNA3

* Ca-P1 sequence from NCBI was selected for standard comparison

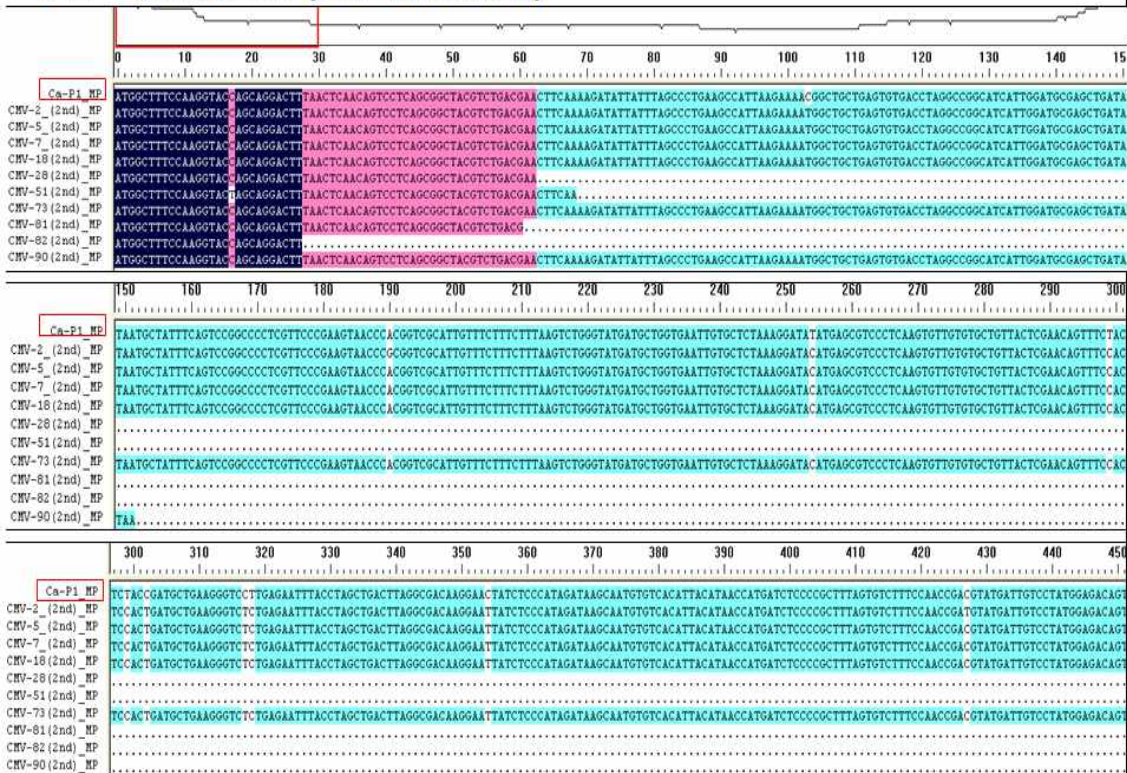
→ 2nd detection (Re-infection)



Alignment of MP sequences of CMV RNA3

(Ca-P1 sequence from ncbi was selected for standard comparison)

→ 2nd detection (Re-infection)



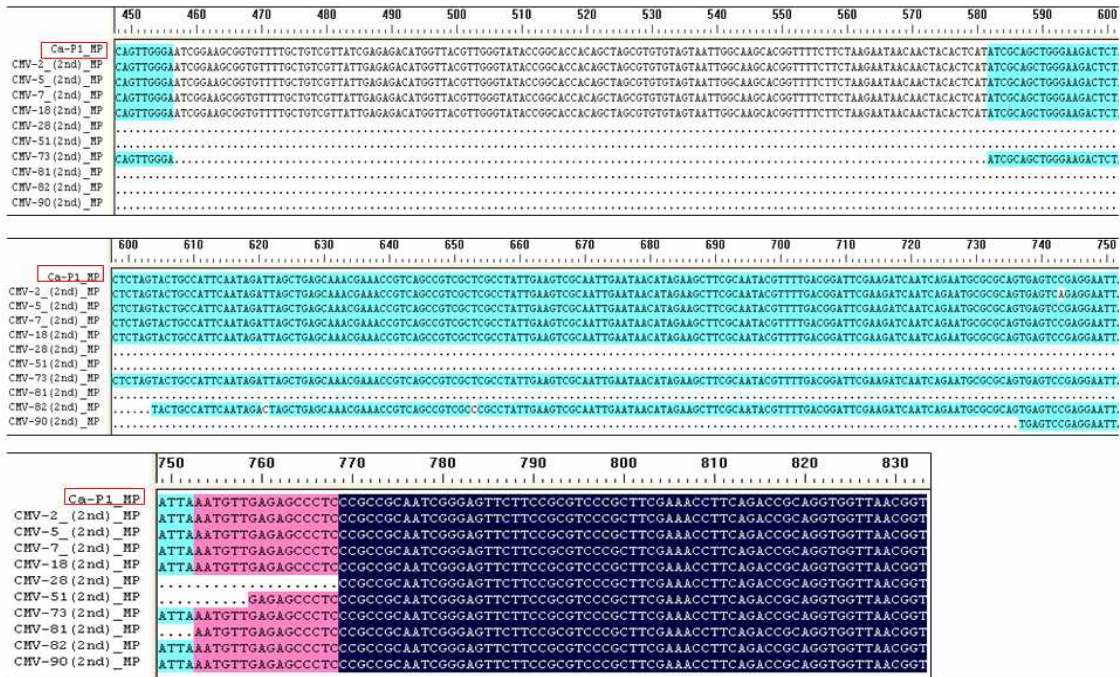


Fig. 10. Fig. 6에 나타난 증폭 산물의 염기서열과 이들의 분석결과. 분석에 의하여 나타난 결과는 NCBI에 등록된 CMV Ca-P1 sequence를 기준으로 alignment하였음. Alignment는 DNAMAN을 활용하여 UTR region과 ORF 영역을 나누어 비교하였음.

Alignment of amino acid sequences of MP of CMV →2nd detection (Re-infection)



Fig. 11. Fig. 6에 나타난 증폭 산물의 아미노산 서열과 이들의 분석결과. 분석에 의하여 나타난 결과는 NCBI에 등록된 CMV Ca-P1 sequence를 기준으로 alignment하였음. Alignment는 DNAMAN을 활용하여 ORF 영역에서만 비교하였음.

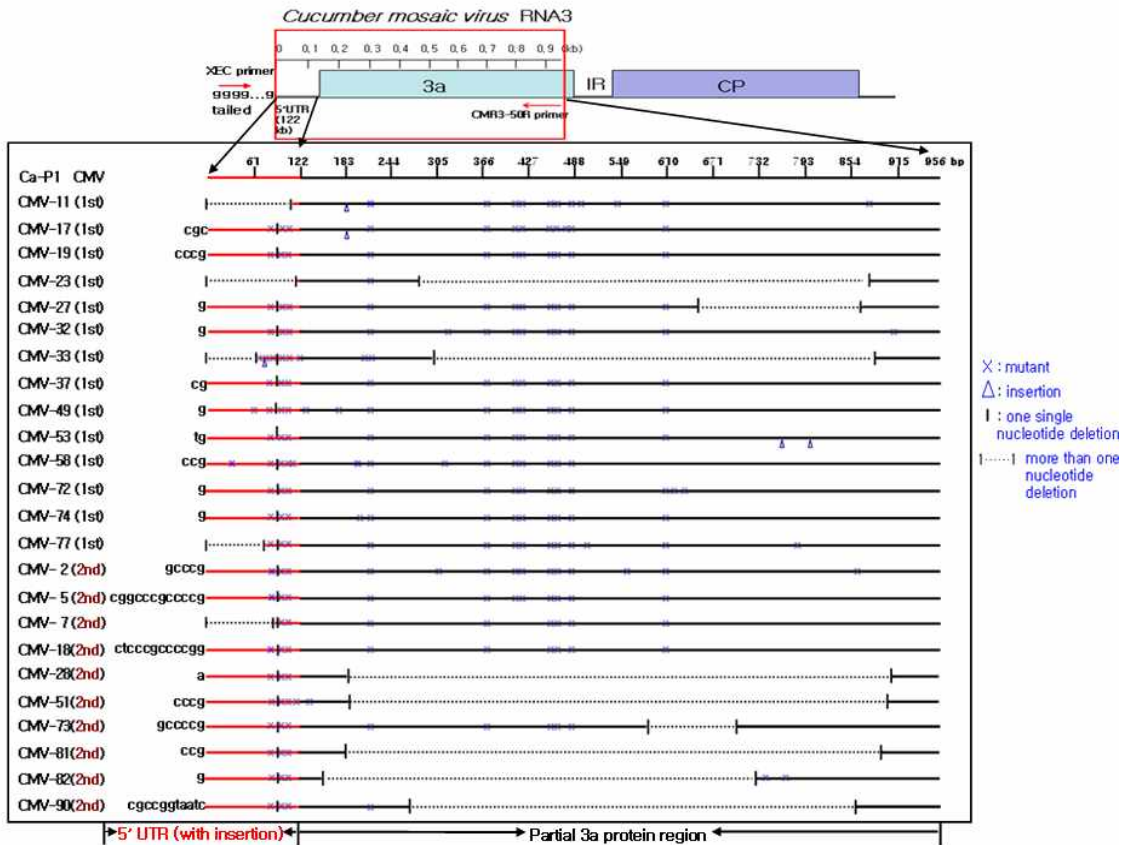


Fig. 12. Fig. 5-11에서 나타난 전체 결과 요약. 최초 포장에서 확인된 CMV quasi-species의 패턴과 한 차례의 계대 배양 이후 나타난 패턴이 매우 다른 것을 확인하였음. 결론적으로 단 한차례 배양 과정에서 극심한 변이를 일으켜 대량의 quasi-species를 생산하는 바이러스의 경우 포장에서 재배되어지거나 육종 재료로 활용되는 계통의 병리 검정에 사용될 경우 매우 상반된 결과가 나타날 우려가 큼.

4. 이머징 바이러스의 동정

최근 알려지지 않은 다양한 원인에 의하여 포장에서 나타나는 바이러스 이병 의심 작물에 대한 진단이 불가능한 빈도가 지속적으로 높아지고 있음. 기후의 급격한 변화, 농산물 및 이들의 종자 수출입의 증가, 국외로부터 도입되는 새로운 작물 또는 외래 식물의 국내 농업 환경에서의 정착, 일부 바이러스 저항성 채소 작물 품종의 재배로 인한 우점 바이러스의 변화 등이 주된 원인으로 추정되고 있음. 국외에서 유입되었거나 포장 주변에서 자생하고 있는 중간 기주로부터 포장에서 재배되는 작물로 전이되어 전국적으로 확산되었거나 확산 과정에 있는 바이러스를 제외하더라도 포장 시료로부터 진단 불가능한 시료는 현재 생리적인 현상에 의한 병으로 간주하여 생리 장애로 판단하고 있음.

본 과제를 통한 전국 단위의 채소 작물 바이러스 조사 및 수집 바이러스 시료는 기존에 확립된 바이러스 검출 방법을 활용하여 바이러스의 이병을 확인하고 종 수준에서 바이러스를 확인하였음. 그러나 일부 바이러스 이병 의심 시료 가운데 기존의 검출 방법에 의하여 바이러스의 검출이 불가능한 경우가 있었음. 대표적으로 본 과제에서 새롭게 동정된 신종 바이러스 및 국내에서 보고되지 않았던 바이러스가 다수 확인되었음. 이러한 신종 및 변종 바이러스에 대한 연구 결과는 앞으로 국내 재배 채소 작물에 정착 및 확산 여부를 지속적으로

모니터링 하는 연구에 활용되어야 할 것으로 사료됨.

가. *Brugmansia mosaic virus* (BrMV)

가지과 식물로 주로 조경 목적으로 국내에 도입되어 전국적으로 확산되어 있는 관목인 엔젤트럼펫에서 신종 바이러스가 동정되었음 (참고문헌). 본 과제의 바이러스 조사 연구 과정에서 대전 지역 엔젤트럼펫에서 확인이 된 이후 농촌진흥청 연구팀에 의하여 수원 지역에서 동일한 바이러스가 검출되었음. BrMV는 Genus potyvirus에 속하는 바이러스로써 국내에서 재배되는 가지과 작물 재배 포장으로 유입될 경우 가지과 작물에 막대한 피해가 예상됨. 따라서 BrMV가 가지과 작물에 유입될 경우 나타나는 영향을 추정하기 위하여 고추, 담배, 가지, 토마토 등의 주요 가지과 작물을 대상으로 생물 검정을 수행하였음. BrMV의 생물 검정 결과 고추를 제외한 담배, 가지, 토마토에 매우 강한 병원성을 나타내었음 (Table 3).

Table 3. 가지과 작물을 대상으로 BrMV의 병원성 검증^a.

생물 검정 대상 가지과 작물	BrMV의 병원성
고추	병원성 없음
담배	매우 강한 병원성
가지	매우 강한 병원성
토마토	매우 강한 병원성
페추니아	매우 강한 병원성

^a고추를 제외한 4종의 가지과 식물에 강한 병원성을 나타냈음. 가지과 작물로 새롭게 유입될 가능성이 높은 신종 바이러스로 판단됨.

나. *Lettuce mosaic virus* (LMV)

국화과 식물로 전국적으로 고루 재배되는 상추에서 분리한 바이러스로써 기존에 국내에 발생한다는 보고는 있으나 본 과제를 통하여 전체 게놈 서열이 완성되었음. (참고문헌 및 그림).무주군에서 분리된 국내 발생 LMV의 게놈 서열을 기준으로 앞으로 국내 정착 LMV와 국외에서 유입되는 LMV의 구분 및 이에 대한 대비가 가능해졌음.

다. *Brassicca yellow virus* (BrMV)

십자화과 식물로 전국적으로 고루 재배되는 배추에서 바이러스 이병 의심 배추 시료가 경상북도 청송에서 수집되었음. 배추과 감염 바이러스를 대상으로 기존에 알려진 배추과 감염 바이러스 검출 방법으로 바이러스를 진단하였으나 검출되지 않았음. 따라서 본 연구팀이 개발한 식물 바이러스 진단용 대용량 올리고 DNA chip에 시료를 처리하여 Genus polerovirus의 일종으로 확인되었음. 칩에 포함된 probe 가운데 양성 반응을 나타낸 probe들의 서열을 참고하여 바이러스를 검출하였음. 이 바이러스의 전체 RNA 게놈 서열을 결정된 결과 *Brassicca yellow virus* (BrYV)와 *Beet western yellows virus* (BWYV)가 두 종의 바이러스가 서로 재조합된 결과 나타난 변종 바이러스인 것으로 나타났음 (Fig. 13). Polerovirus 속에 속하는 바이러스는 다른 그룹의 바이러스와 달리 이러한 중간 재조합이 상대적으로 빈번하게 나타나는 것으로 알려져 있음.

A variant of Brassica yellow polerovirus

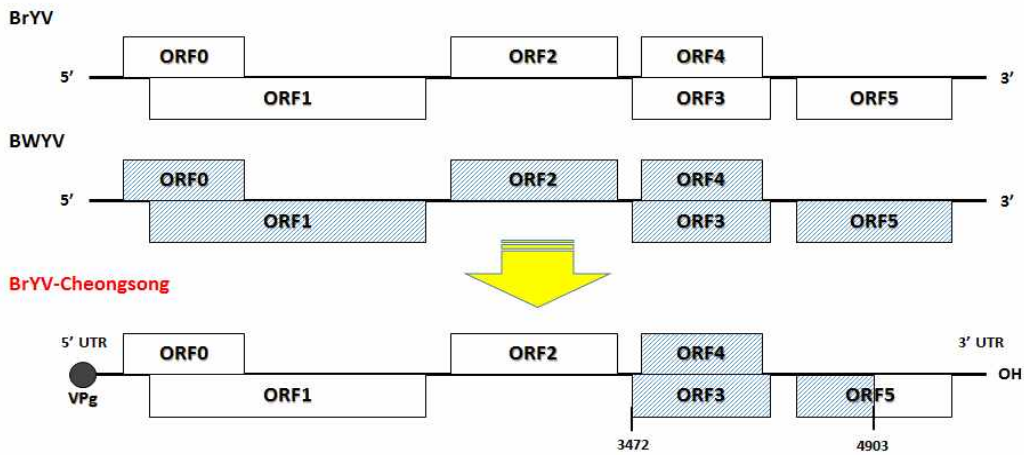


Fig. 13. 배추에서 동정된 두 종류의 polerovirus가 재조합을 일으켜 나타난 새로운 BrYV 변종. Open box로 표시된 BrYV의 염기서열을 약 80% 정도 가지고 있으나 ORF3, 4 그리고 일부 ORF5의 염기서열은 BWYV 유래로 밝혀졌음.

라. Unknown endornavirus ; 가칭 *Pepper dwarfing endornavirus*

청송군 파천면의 고추 재배 포장에서 수집된 바이러스 이병 의심 시료에서 확인된 신종 고추 감염 바이러스임. 기존에 보고된 고추 감염 바이러스 검출법 및 식물 바이러스 진단용 대용량 올리고 DNA chip에 의하여 진단되지 않은 바이러스로써 일루미나의 paired-end RNA sequencing 결과를 본 연구진이 확보하고 있던 생물정보학 활용 식물 바이러스 동정 파이프라인에 적용하여 동정된 바이러스임. *Pepper dwarfing endornavirus*(가칭)의 특징은 RNA 게놈이 double-strand로 구성되어 있음. 전체 게놈 서열은 완성되지 않았으나 현재 약 90% 완성되었음. 기존에 알려진 식물 endornavirus의 염기 서열과 비교해 보면 약 70%의 상동성을 보여 전 세계적으로 고추에서 최초로 보고된 신종 바이러스로 사료됨(Fig. 14).

Pepper dwarfing endornavirus (가칭)

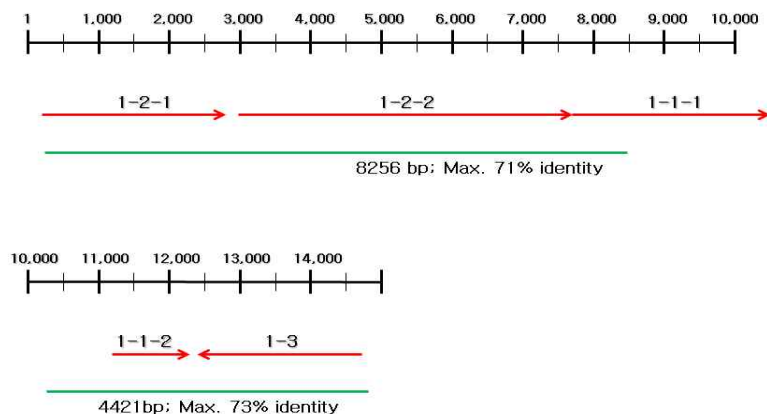


Fig. 14. 고추에서 확인된 가칭 *Pepper dwarfing endornavirus*. 현재까지 염기서열 분석 결과 전 세계적으로 보고되지 않은 신종 바이러스. 붉은색 선은 contig이며 녹색 선은 실험결과 추가로 확보된 염기서열임.

마. Unknown capillovirus ; 가칭 *Spinach mottle capillovirus*

무주군 무주읍의 시금치 재배 포장에서 수집된 바이러스 이병 의심 시료에서 확인된 신종 시금치 감염 바이러스임. 기존에 보고된 시금치 감염 바이러스 검출법 및 식물 바이러스 진단용 대용량 올리고 DNA chip에 의하여 진단되지 않은 바이러스로써 일루미나의 paired-end RNA sequencing 결과를 본 연구진이 확보하고 있던 생물정보학 활용 식물 바이러스 동정 파이프라인에 적용하여 동정된 바이러스임. 기존에 알려진 식물 capillovirus의 염기 서열과 비교해 보면 약 80%의 상동성을 보여 전 세계적으로 시금치에서 최초로 보고된 신종 바이러스로 사료됨 (Fig. 15).

Spinach mottle capillovirus (가칭)

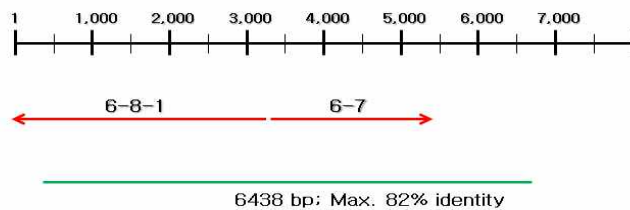


Fig. 15. 시금치에서 확인된 가칭 *Spinach mottle capillovirus*. 현재까지 염기서열 분석 결과 전 세계적으로 보고되지 않은 신종 바이러스. 붉은색 선은 contig이며 녹색 선은 실험결과 추가로 확보된 염기서열임.

5. 바이러스 병리 검정 기술 개발

채소 작물의 바이러스 병리 검정 기술 개발을 위하여 국내에서 발생하는 바이러스를 활용한 병리 검정 기술이 보고되었거나 기존에 확립된 기술은 전무한 상태임. 기주 작물의 일정 부분에서 국부 감염을 일으키는 원생생물, 곰팡이, 세균 등의 병원균과 달리 바이러스는 기주 작물의 전신을 감염하는 절대 활물 기생균임.

일반적으로 기주 식물에 전신 감염을 일으키는 바이러스는 매우 다양한 전신 병징을 나타냄. 바이러스에 의하여 나타나는 병징은 모자이크(mosaic), 얼룩(mottle), 황화(yellow), 윤문(ringspot), 줄무늬(streak), 왜성(dwarf), 백화(chlorotic), 반점(fleck), 총생(bushy), 괴사(necrotic) 등 무수히 많은 형태의 병징을 나타냄. 이러한 형태의 병징은 특정 바이러스와 특정 기주에서 고정되어 있지 않고 주변 환경 및 기주의 상태에 따라 다양하게 나타나는 것이 일반적임. 따라서 바이러스 병을 최종적으로 확인하기 위한 육안 검사법은 특수한 몇몇 경우에만 해당되며 대부분의 경우 분자생물학적인 방법에 의하여 최종 진단이 가능함.

이러한 바이러스의 특성으로 인하여 정량적인 병반의 측정이 곤란하여 정성적이며 객관적인 병리 검정 결과를 도출할 가능성이 낮음. 일반적으로 연구실에서 수년간 순화된 바이러스의 경우 선택적 선발 과정을 거쳐 포장에서 벡터인 곤충 및 다양한 유전적 배경을 가진 기주 식물과 공진화를 거친 바이러스와 매우 다른 경향을 나타낼 개연성이 높음. 따라서 본 과제에서는 포장에서 수집된 바이러스 균주만을 활용하였으며 바이러스의 감염으로 인하여

나타나는 기주 작물의 영향을 객관적으로 나타낼 수 있는 지상부의 생체중을 기준으로 바이러스 병리 검정 기술 개발을 시도하였음.

가. 이병 작물에 나타나는 병징에 의하여 감수성 및 저항성 품종 판별

국내에서 시판되는 고추 4 품종, 무 3 품종, 호박 3 품종과 CGMMV, BBWV2, PepMoV, TuMV, WMV2, ZYMV 6 종류의 서로 다른 바이러스를 대상으로 동일한 바이러스에 의하여 서로 다른 품종이 나타내는 병징의 상대적인 차이 및 옆 표면에 나타나는 병징의 형태를 관찰하였음. 그림 1에서 나타난 바와 같이 동일한 품종에 서로 다른 바이러스가 이병된 경우에도 육안으로 식별이 거의 불가능함. 따라서 바이러스 병리 검정은 세균, 곰팡이 등의 병원균과 달리 병징의 정량적 분석에 의하여 수행하기 곤란함.

바이러스 병 병리 검정 기술을 확립하기 위하여 필수적인 조건으로 감수성 또는 저항성 판별 품종이나 계통이 확립되어야 한다. 이러한 판별 품종을 확립하기 위하여 본 연구팀이 다른 국가 연구 개발 사업을 수행하는 과정에서 특정 채소 작물 바이러스에 대한 저항성 표지가 기재되어 있는 해외에서 재배되는 상업용 F1 종자를 대상으로 시험한 결과 예상과 매우 다른 결과를 얻었음. 이러한 결과는 국외 연구팀이 병리 검정을 위해 사용한 바이러스의 종은 국내 포장에 널리 분포하는 바이러스와 같은 종명을 가지고 있으나 실제 동일한 작물에 병원성이 달리 나타나는 균주인 것으로 추측됨. 따라서 국·내외에 존재하는 바이러스의 isolate 또는 strain에 대한 선행 연구가 우선되어야 할 것으로 사료됨.

나. 호박 F1 품종을 활용한 바이러스 병 병리 검정 기술 개발



Fig. 16. 국내 시판 7품종의 호박 F1 종자의 병리 검정 결과. 유묘에 바이러스가 이병 될 경우 ZYMV에 의한 성장 저해는 대조구 대비 40-80%로 나타났음.



Fig. 17. 국내 시판 6품종의 호박 F1 종자의 병리 검정 결과. 유묘에 바이러스가 이병 될 경우 WMV2에 의한 성장 저해는 대조구 대비 60-80%로 나타났음.

다. 오이, 참외, 멜론 및 호박 F1 품종을 활용한 바이러스 병 병리 검정 기술 개발

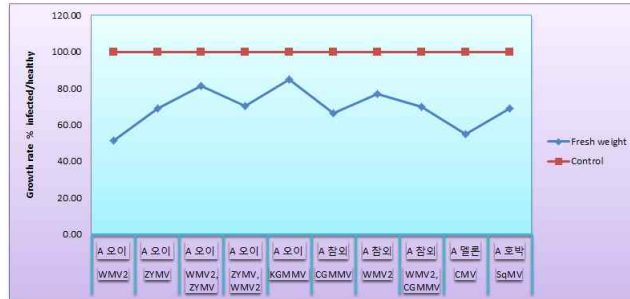


Fig. 18. 국내 시판 오이, 참외, 멜론, 호박 F1 종자의 병리 검정 결과. 오이 유묘에 바이러스가 이병 될 경우 CGMMV에 의한 성장 억제가 WMV2/ZYMV에 의한 복합 감염 대비 더 크게 나타났음. 멜론 및 호박의 경우는 각각의 바이러스에 의하여 대조구 대비 50-70% 수준의 생체중을 보였음.

라. 무 F1 품종을 활용한 바이러스 병 병리 검정 기술 개발

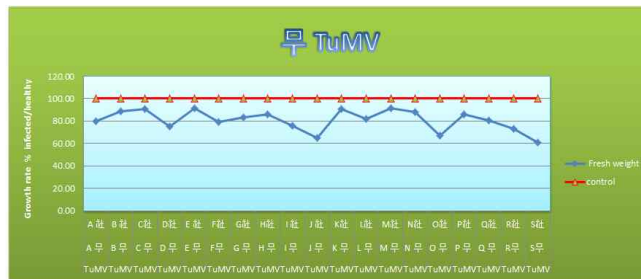


Fig. 19. 국내 시판 무 19종류 F1 종자의 병리 검정 결과. TuMV에 접종된 무 유묘는 대조구 대비 60-95% 범위내의 생체중을 나타냈음. 저항성 대비 품종과 비교 할 수 없으나 바이러스에 감염된 유묘가 건전 유묘 대비 95%의 생체중을 나타내는 결과로 국내 시판 종자 및 육종 자원에 TuMV에 저항성을 부여하는 계통이 존재 할 가능성이 매우 높음.

마. 고추 F1 품종을 활용한 바이러스 병 병리 검정 기술 개발

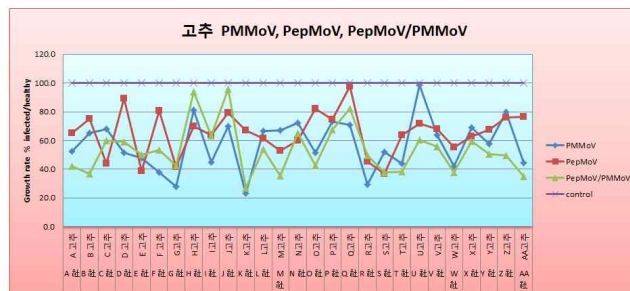


Fig. 20. 국내 시판 27종류의 고추 F1 종자의 병리 검정 결과. 고추에 다발하는 두 종류의 바이러스를 활용하여 단도 및 복합 감염에 의한 바이러스 병리 검정을 실시한 결과 Fig. 20에서 나타난바와 같이 바이러스 감염에 의하여 나타나는 생체중의 감소폭이 품종에 따라 다른 작물에 대비하여 크게 나타났음. 또한 복합 감염이 단독 감염에 비하여 생체중의 감소가 더 크게 나타나지 않았음. 결론적으로 두 종류의 바이러스에 의하여 누적 피해가 나타나는 것이 아닌 것으로 판단됨.

6. 바이러스 병 병리 검정 프로토콜

본 과제에서 수행된 바이러스 검출 방법, 표준 시료 제작 방법, 바이러스 계놈의 일부 서열 확인 방법, quasi-species 확인 방법, 신종 바이러스 동정 방법, 및 바이러스 병리 검정 방법에 대한 상세 프로토콜

가. 바이러스 병리 검정을 위한 바이러스 접종 방법

바이러스 접종 대상 식물을 온실 또는 생장실에서 접종 대상 식물의 제1 본엽이 활착할 때까지 키워 떡잎 또는 본엽의 일부(잎 표면적의 약 10-20%)에 접종원을 처리하여 바이러스를 감염시킨다. 주변 온도 또는 습도 등과 같이 환경적 요인에 따른 병징의 변화가 크게 나타날 경우 온·습도 및 광 조사 기간을 조절 할 수 있는 식물 생장기나 식물 생장실에서 접종을 수행하는 것이 바람직하다.

포장에서 수집된 fresh tissue를 즉시 사용하지 않을 경우 액체 질소가 포함된 막자사발에서 powder로 곱게 갈아서 액체 질소를 모두 제거한 다음 -70℃에 보관하여 필요시 사용한다. 일부는 바이러스 검출 및 계놈의 염기 서열 확인을 위하여 사용한다.

수집된 식물 조직과 1× Phosphate Buffered Saline(PBS), pH 7.4 buffer를 1:4(w/v)의 비율로 보관된 식물 조직의 분말 또는 온전한 형태의 식물 조직을 막자사발에서 갈아서 접종원을 준비한다.

접종원의 대조구로 식물 조직이 포함되지 않은 buffer만을 잎 표면에 처리한다. 다소 번거롭지만 buffer에 건전한 식물로부터 수집된 식물 조직을 buffer에 곱게 갈아 접종원으로 사용하는 것을 대조구로 활용하는 것이 바람직하다. 일반적으로 접종을 원활하게 하기 위하여 연마제로써 금강사 분말(400mesh)를 사용하지만 필수적인 것은 아니다.

접종이 완료되고 일반적으로 바이러스 감염이 육안으로 확인되는 10-20일 경과되면 바이러스가 접종된 식물의 지상부를 수확하여 생체중을 기록하고 일부 식물 조직은 바이러스 감염 여부를 판단하는데 사용한다.

나. 바이러스 진단 및 검출방법을 위한 RT-PCR

채소 바이러스의 검출을 위하여 마련된 특별한 방법은 없으며 각각 바이러스에 특이적인 primer의 특성에 따라 적절한 RT-PCR 프로그램을 사용할 수 있다.

바이러스 가운데 도관부에만 기생하는 바이러스 그룹(예를 들어 *Luteoviridae*)은 바이러스의 titer가 매우 낮은 수준이나 정량적인 측면에서 RT-PCR 주형으로 충분하다. 다만 기대한 실험 결과를 얻지 못 할 경우 사용하는 주형 또는 RT-PCR의 cycle 수를 늘려 적절한 방법을 확립하는 것이 바람직하다.

채소 바이러스에서 드문 경우이지만 계놈의 형태가 ds(double strand)RNA인 바이러스는 cDNA 합성과정에서 dsRNA를 해체하는 denature 과정이 포함되는 것이 바람직하다.

다. Plant total RNA Extraction

Harvest plant tissue and weight : virus에 이병된 식물 조직을 준비한다.

Grind plant tissue in mortal & pestle with liquid nitrogen : 식물체를 곱게 갈아서 용액에

해리되는 면적을 넓힌다. 다시 해동 되지 않도록 주의하며, 갈아둔 식물체를 담은 용기나, 옮길 수저도 liquid nitrogen을 넣어 차갑게 해둔다.

Add Trizol 1ml and mixing.(trizol 1ml / tissue 0.1g) : nitrogen에 영향을 받지 않으므로 trizol을 nitrogen으로 얼린 tissue에 바로 넣는다. vortexing 해주어서 고루 섞이도록 해준다. Plant tissue가 충분히 녹아들도록 해준다.

Add 200 μ l Chloroform(1/5 of Trizol Vol.) and vortexing for 30sec.

Stay on room temperature for 5min. : 실온에 정치하여 확연하게 층이 분리되는 것을 확인한다.

Spin at 13000rpm for 5min. at 4 $^{\circ}$ C and save supernatant : centrifugation을 이용하기 위해서 30-40분전에 temperature down을 해놓고 supernatant을 옮겨 담은 용기도 얼음에 꽂아둔다.

Repeat step 4-6 : supernatant을 옮길 때에는 pellet층이 따라 올라오지 않도록 주의 하여 옮기며, 혹 tissue가 요동을 쳐서 지지분한 상층액일 경우 필히 이 step을 행하여 다시 한번 거른다.

Add 80%(vol. of final supernatant vol.) Isopropanol and inverting : RNA가 뭉치는 단계이며, vortexing이 아닌 부드러운 mixing으로(invert) 작업한다. 알코올 성분에서는 RNA가 안정된 상태이므로 얼음에 꽂아서 작업하지 않아도 되지만, Isopropanol은 차게 해두어 사용하는 것도 좋다.

Spin at 13000rpm for 15min. at 4 $^{\circ}$ C, Decant solution carefully : nucleic acid는 alcohol에서 insoluble하여 안정하다. 용기의 바닥에 하얗게 침전된 것을 확인하고(RNA) 침전된 반대방향으로 용액을 따라낸다.

Add 2ml 100% EtOH, Spin at 13000rpm for 10min. at 4 $^{\circ}$ C : washing과 RNA 침전을 목적으로 다음 80% EtOH을 넣기 전에 EtOH으로 가라앉힌다.

Decant solution carefully and Add 80% EtOH (2ml) : 세게 섞지 않고 pellet이 보존되도록 부드럽게 돌려준다.

Spin at 13000rpm for 15min. at 4 $^{\circ}$ C : 물에 불순물들이 용해되고 RNA는 washing된다.

Dry pellet and Resuspension in DW.(RNA용 DDW.또는 DEPC water) : alcohol이 포함된 상태의 pellet을 실온의 공기 중에 누워서 말린다.

말린 pellet은 흰색이 희미해진다. pipet을 이용하여 Resuspend하며, DW에 용해된 RNA는 불안정한 상태이므로 찬 tube에 옮겨 담고 vortexing을 해서 완전하게 용해시킨 후에 spin down(30sec.)을 통해 혹 있을 불순물을 가라앉히고 상층을 다시 차고 깨끗한 tube에 옮겨 담는다.

라. 5' RACE

Invitrogen社 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends kit를 이용하였음.

First strand cDNA is synthesized from total RNA using a gene-specific primer (GSP1) that the user provides and SuperScript™ II, a derivative of Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) with reduced RNase H activity. After first strand cDNA synthesis, the original mRNA template is removed by treatment with the RNase Mix (mixture of RNase H, which is specific for RNA:DNA heteroduplex molecules, and

RNase T. Unincorporated dNTPs, GSP1, and proteins are separated from cDNA using a S.N.A.P. Column. A homopolymeric tail is then added to the 3'-end of the cDNA using TdT and dCTP.

Since the tailing reaction is performed in a PCR-compatible buffer, the entire contents of the reaction may be directly amplified by PCR without intermediate organic extractions, ethanol precipitations, or dilutions. PCR amplification is accomplished using Taq DNA polymerase, a nested, gene-specific primer (GSP2, designed by the user) that anneals to a site located within the cDNA molecule, and a novel deoxyinosine-containing anchor primer (patent pending) provided with the system.

Following amplification, 5' RACE products can be cloned into an appropriate vector for subsequent characterization procedures, which may include sequencing, restriction mapping, preparation of probes to detect the genomic elements associated with the cDNA of interest, or in vitro RNA synthesis. The Abridged Anchor Primer (AAP), Abridged Universal Amplification Primer (AUAP), Anchor Primer (AP) [available separately], and Universal Amplification Primer (UAP) include recognition sequences for Mlu I, Sal I, and Spe I to facilitate restriction endonuclease cloning of RACE products.

5' RACE products may also be used for procedures that do not require an intermittent cloning step such as dsDNA cycle sequencing or probe preparation.

최종적으로 PCR product의 염기서열을 분석한다.

마. LSON 칩 표준 프로토콜

기존에 활용되는 바이러스 검출 방법에 의하여 검출되지 않는 바이러스 이병 시료는 약 500종의 식물 바이러스 진단용 칩에 적용하여 검출이 가능함.

(1) Plant total RNA Extraction

Harvest plant tissue and weight : virus에 이병된 식물 조직과 건전 식물체 조직을 같은 무게로 나누어 담아 놓는다. 냉동된 상태의 식물체일 경우 해동되지 않도록 주의하여 작업한다.

Grind plant tissue in mortal & pestle with liquid nitrogen : 식물체를 곱게 갈아서 용액에 해리되는 면적을 넓힌다. 다시 해동 되지 않도록 주의하며, 갈아둔 식물체를 담은 용기나, 옮길 수저도 liquid nitrogen을 넣어 차갑게 해둔다.

Add Trizol 1ml and mixing.(trizol 1ml / tissue 0.1g) : nitrogen에 영향을 받지 않으므로 trizol을 nitrogen으로 얼린 tissue에 바로 넣는다. vortexing 해주어서 고루 섞이도록 해준다. Plant tissue가 충분히 녹아들도록 해준다.

Add 200 μ l Chloroform(1/5 of Trizol Vol.) and vortexing for 30sec.

Stay on room temperature for 5min. : 실온에 나누어 확연하게 층이 분리되는 것을 확인한다.

Spin at 13000rpm for 5min. at 4°C and save supernatant : centrifugation을 이용하기 위해서 30-40분전에 temperature down을 해놓고 supernatant를 옮겨 담은 용기도 얼음에 꽂아둔다.

Repeat step 4-6 : supernatant를 옮길 때에는 pellet층이 따라 올라오지 않도록 주의 하여 옮기며, 혹 tissue가 요동을 쳐서 지지분한 상층액일 경우 필히 이 step을 행하여 다시 한번

거른다.

Add 80%(vol. of final supernatant vol.) Isopropanol and inverting : RNA가 묻치는 단계이며, vortexing이 아닌 부드러운 mixing으로(invert) 작업한다. 알코올 성분에서는 RNA가 안정된 상태이므로 얼음에 꽂아서 작업하지 않아도 되지만, Isopropanol은 차게 해두어 사용하는 것도 좋다.

Spin at 13000rpm for 15min. at 4°C, Decant solution carefully : nucleic acid는 alcohol에서 insoluble하여 안정하다. 용기의 바닥에 하얗게 침전된 것을 확인하고(RNA) 침전된 반대방향으로 용액을 따라낸다.

Add 2ml 100% EtOH, Spin at 13000rpm for 10min. at 4°C : washing과 RNA 침전을 목적으로 다음 80% EtOH을 넣기 전에 EtOH으로 가라앉힌다.

Decant solution carefully and Add 80% EtOH (2ml) : 세계 섞지 않고 pellet이 보존되도록 부드럽게 돌려준다.

Spin at 13000rpm for 15min. at 4°C : 물에 불순물들이 용해되고 RNA는 washing된다.

Dry pellet and Resuspension in DW.(RNA용 DDW.또는 DEPC water) : alcohol이 포함된 상태의 pellet을 실온의 공기 중에 누워서 말린다 : 말린 pellet은 흰색이 희미해진다. pipet을 이용하여 Resuspend하며, DW에 용해된 RNA는 불안정한 상태이므로 찬 tube에 옮겨 담고 vortexing을 해서 완전하게 용해시킨 후에 spin down(30sec.)을 통해 혹 있을 불순물을 가라앉히고 상층을 다시 차고 깨끗한 tube에 옮겨 담는다.

(2) cDNA synthesis & Dye labeling

(가) A single dye

10~30 μ g의 total RNA에 primer를 첨가한다 : primer는 RNA량의 1/10정도의 양으로 넣는다.

70°C에서 10min정도 반응시킨다.

Ice에서 놓아둔 후 충분히 온도가 내려간 후에 다음 작업을 행한다.

Final 반응액의 1/5의 5X reaction buffer를 넣고 1/10의 10mM dNTPs를 넣어준다.

Final 반응액의 1/10의 cy5 or cy3 dCTP dye를 넣고 25°C에서 5min정도 놔둔다 : dye를 넣은 후 광을 차단하며 실험에 임한다.

Taping 후 spin down 하고 superscript II reverse transcriptase를 400unit/30 μ l 정도 넣는다.

Incubation 42°C에서 2hr 반응한다(광차단).

70°C에서 15min 동안 inactivation 시킨 후 spin down 해준다.

DNA purification kit를 이용하여 DNA concentration을 높여서 DEPC water로 elution행한다 : DNA purification kit를 이용하여 chip에 사용될 양의 1/2에 맞춰서 DEPC water로 elution하기도 한다.

(나) Dye swapping

10~30 μ g의 sample total RNA에 primer를 첨가한다. (primer는 RNA량의 1/10정도의 양으로 넣는다.)

70°C에서 10min정도 반응시킨다.

Ice에서 놓아둔 후 충분히 온도가 내려간 후에 다음 작업을 행한다.

Final 반응액의 1/5의 5X reaction buffer를 넣고 1/10의 10mM dNTPs를 넣어준다.

Final 반응액의 1/10정도의 양 cy5 dCTP dye를 virus sample에 넣고 동량의 cy3 dCTP dye를

host sample에 넣는다 : cy3가 감광이 더 좋으므로 control에 넣어주는 것이 적절하다.
dye를 넣은 후 광을 차단하며 실험에 임한다.

25°C에서 5min정도 놔둔다.

Taping 후 spin down 하고 superscript II reverse transcriptase를 400unit/30 μ l 정도 넣는다.

Incubation 42°C에서 2hr 반응한다(광차단).

70°C에서 15min 동안 inactivation 시킨 후 spin down 해준다.

DNA purification kit를 이용하여 DNA concentration을 높여서 DEPC water로 elution한다 :

DNA purification kit를 이용하여 chip에 사용될 양의 1/2에 맞춰서 DEPC water로 elution하기도 한다.

7. 바이러스 저항성 토마토 품종 선발을 위한 효과적인 *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) 접종 방법 개발

가. TYLCV 토마토 발병 지역에서 다양한 isolate 확보

김해, 부산(국립원예특작과학원 시설원예시험장) 지역에서 TYLCV에 감염된 토마토를 채집하여, 병징 및 TYLCV 특이적 primers(Table 4)를 이용한 PCR로 TYLCV isolates를 확보하였다.

Table 4. Primers for detection of TYLCV, cloning of full-length genome of TYLCV, and sequencing of TYLCV clones

Primer code	Sequence (5' to 3')	Reference
Detection of TYLCV with PCR		
AV494	GCCYATRTAYAGRAAGCCMAG	Wyatt and Brown, 1996
AC1048	GGRTTDGARGCATGHGTACATG	
PTYc787	GTTCGATAATGAGCCCAG	Salati et al., 2002
PTYc1121	ATGTAACAGAAACTCATG	
TYLCV primers for cloning		
PTYC1v2182	CCCAGACCATGGCCGCGCAGCGGAATAC	Nahkla et al., 1994
PTYC1c2140	AATAACCCATGGAGACCCATAAGTATTG	
Sequencing of TYLCV cloned sequences		
p0390_internal	GCGGGACTCTAATCATAAAAACC	
TY_26-	TGGGGACCACATAAAAAGGAA	
TY_521-	GGACTTTACATGGGCCTTCA	
PTYc787	GTTCGATAATGAGCCCAG	

PTYc1121	ATGTAACAGAAACTCATG
T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGGG
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG

나. TYLCV clone 확보 및 Agrobacterium 매개 TYLCV 접종 방법 확립

김해에서 TYLCV에 감염된 토마토를 채집한 isolate를 TYLCV-KH라고 명명하였다. 이에 대해 감염성 클론을 제작하기 위하여 전체 염기서열을 PCR법과 Bacteriophage DNA polymerase RCA (rolling circle amplification)법(Haible et al., 2006)을 이용하여 결정하였다. TYLCV 유전체 full-length genome은 1.0mer 라고 정의하였다.

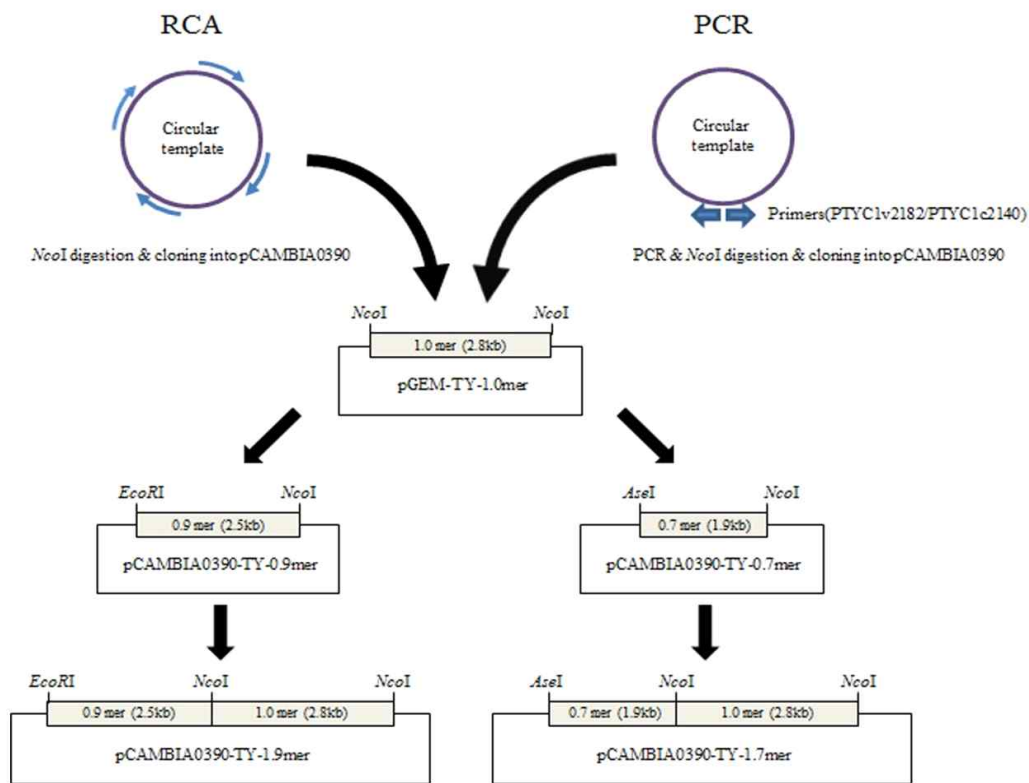


Fig. 21 TYLCV 감염성 클론 제작 과정 도식도. 감염성 클론 제작을 위해서 RCA 기반 방법을 통해서 1.9mer TYLCV genome을 가진 감염성 클론을 제작하였고, PCR 기반 방법을 사용하여 1.7mer TYLCV genome을 가진 감염성 클론을 제작.

TYLCV DNA를 주형으로 한 쌍의 PCR 프라이머, PTYC1v2182 (5' - C C C A G A C C A T G G C C G C G C A G C G G A A T A C - 3') 와 PTYC1c2140(5'-AATAACCCATGGAGACCCATAAGTATTG-3')을 이용하여 PCR 증폭 후 PCR 산물을 *NcoI* 제한효소로 처리하여 TYLCV genome 1.0mer를 pGEM-T Easy vector에 클로닝하였다. RCA 방법으로 증폭된 TYLCV genome도 마찬가지로 *NcoI* 제한효소 처리 후 pGEM-T Easy vector에 클로닝하였고 이를 pGEM-TY-KH라고 명명하였다. 전체 염기서열은 pGEM-T Easy vector에 있는 SP6, T7 promoter 영역과 TYLCV detection에 사용되는

PTYc787(5'-GTTTCGATAATGAGCCCAG-3')와 TYc1121(5'-ATGTAACAGAAACTCATG-3') primer 그리고 서열분석에서 나온 정보를 바탕으로 만든 TYLCV 내부서열 primer를 통해서 전체 유전체를 sequencing 하였고 서열 길이는 2,774bp인것으로 알아냈다 (Fig. 21).

pGEM-TY-KH를 이용하여 RCA based-EcoRI, *NcoI* (0.9mer), PCR based-*AseI*, *NcoI* (0.7mer)제한효소를 각각 처리하여 단편을 만들어 pCAMBIA0390 벡터로 클로닝하여 pCMABIA0390-TY-0.9mer, pCAMBIA0390-TY-0.7mer라 명명하였다. pGEM-TY-KH를 *NcoI* (1.0mer) 제한효소 처리 후 pCAMBIA0390-TY-0.9mer, pCAMBIA0390-TY-0.7mer 벡터에 클로닝하여 pCAMBIA0390-TY-1.9mer, pCAMBIA0390-TY-1.7mer를 제작하였다 (Fig. 1). 감염성 테스트를 위해 *A. tumefaciens* GV3101을 pCAMBIA-TY-1.9mer/1.7mer로 형질전환시켰다.

형질전환된 *A. tumefaciens*을 Luria-Bertani(LB) Kanamycin(50ug/ml), Gentamycin(25ug/ml) 배지 5ml에 28°C 배양기에서 24시간 전배양한 후 5ml 배지에서 10시간 본배양하였다. 4,000rpm에서 10분간 원심분리하여 박테리아를 회수하고 10mM MgCl₂, 200uM acetosyringone, 10mM MES을 넣어 OD₆₀₀ 0.6농도로 현탁하였다. 상온에서 4시간 가량 둔 후 감염성 테스트에 사용하였다. 제작된 TYLCV 감염성 클론을 시험하기 위해 이용한 토마토 식물체는 감수성 품종인 Super-sunroad 품종을 시중에서 구입하여 사용하였다. 클론당 식물체 수는 1-2그루에 처리하였고 접종 방법은 바늘을 제거한 1ml 주사기를 잎 뒷면에 대고 균이 주입되는 반대편 잎에 손가락을 대고 동일한 압력으로 받쳐주면서 접종하였다. 접종한 토마토 식물체는 insect-free한 속에서 27°C 일장 16시간, 17°C 8시간의 조건을 유지해주는 식물 배양기에서 배양하였다.



Fig. 22 TYLCV 감염성 클론을 접종한 토마토 식물체에서 병징 관찰. *A. tumefaciens*매개로 TYLCV감염성 클론을 접종한 토마토 식물체에서 황화, 성장저해, 잎 말림 등의 전형적인 TYLCV 감염 증상이 관찰됨. (A),(B) RCA 기반으로 만든 pCAMBIA-TY-1.9mer 감염성 클론 접종, (C) PCR 기반으로 만든 pCAMBIA-TY-1.7mer 감염성 클론 접종.

토마토에 *A. tumefaciens* 접종후약 4주 뒤 잎 말림, 황화, 성장저해 등의 전형적인 TYLCV 감염 증상이 관찰 되었다. 감염성 테스트 결과 병징의 증상 등급과 감염 효율적인 측면에서 RCA 방법 기반으로 구축한 감염성 클론과 PCR 방법 기반으로 구축한 감염성 클론에 차이점은 없었다(Fig. 22). 다음으로 병징이 나타난 토마토 잎에서 viral genome의 존재여부를 확인하기 위해서 PCR을 수행하였다. 병징이 나타난 토마토 잎을 추출하여 genomic DNA를 뽑고 TYLCV specific primer로 확인하였다.

Fig. 23의 전기영동 결과를 살펴보면 감염된 토마토에서는 AV494/AC1048, PTYv787/PTYc1121 primer set 두 개에서 모두 TYLCV viral genome의 존재를 뚜렷이 확인할 수 있었다. 반면, 대조군으로 사용된 건강한 토마토에서는 viral genome을 확인 할 수 없었다. 이를 통해 *A. tumefaciens* 매개로 한 감염성 클론의 접종이 성공적으로 이루어졌음을 알 수 있고, RCA 기반으로 제작한 감염성 클론과 PCR 기반으로 제작한 감염성 클론의 병원성 테스트에서 병징의 증상 등급과 효율성에 있어서 차이점이 없다는 것을 알 수 있었다.

RCA 클로닝의 경우 PCR 방법과 비교하였을 때 더 간편한 방법이다. 클로닝을 위해 full length 증폭 시 랜덤 프라이머를 사용하기 때문에 유전자 서열정보가 필요하지 않으며, 좀 더 싸고 시간을 절약할 수 있다는 장점을 가지고 있다. TYLCV와 같은 geminivirus의 감염성 클론 뿐만 아니라 RCA 방법을 기반으로 하여 동물 병원성 circovirus나 nanovirus와 같은 다른 병원성 바이러스의 genome 증폭에도 적용시킬 수 있다. 그러므로 RCA 기반으로 한 감염성 클론 제작은 본 실험에서 구축한 TYLCV 감염성 클론 뿐만 아니라 새롭게 출현하거나 알려지지 않은 geminivirus에도 매우 유용하게 사용될 수 있다.

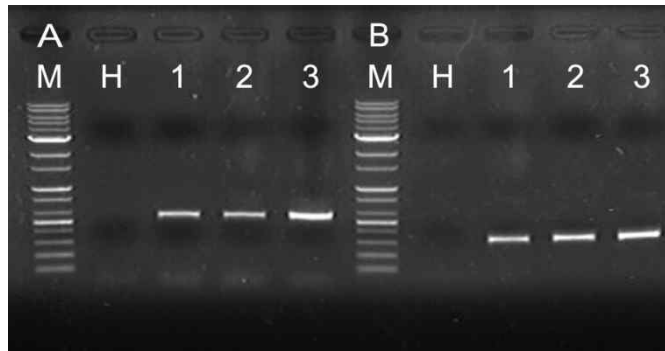


Fig. 23 TYLCV 감염성 클론 접종 후 토마토에서 뽑은 DNA로부터 TYLCV viral genome 확인. (A) AV494 / AC1048 primer 사용, (B) PTYv787 / PTYc1121 primer 사용, M, 1kb plus ladder molecular size marker; H, healthy tomato sample; 1-2, pCAMBIA0390-TY-1.9mer infected tomato sample; 3, pCAMBIA0390-TY-1.7mer infected tomato sample.

제 4절. 선충병 병리검정 체계 확립

1. 토마토 뿌리혹선충병에 대한 효율적인 저항성 검정법 확립

가. 서론

뿌리혹선충(*Meloidogyne* spp.)은 전 세계적으로 각종 작물에 큰 피해를 주고 있으며, 뿌리혹선충에 감염된 작물은 뿌리에 혹이 형성되기 때문에 뿌리혹선충에 의한 피해를 쉽게 진단할 수 있다. 뿌리혹선충의 기주는 식량작물, 원예작물, 목본류 등 2,000여종에 이르고, *Meloidogyne* 속 선충은 70종 이상이나 경제적으로 큰 피해를 입히는 것은 *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* 및 *M. hapla* 등 4종으로 알려져 있다(Barham and Winstead, 1957; Choi and Choo, 1978). 시설과채류에서는 *M. incognita*와 *M. arenaria*에 의한 피해가 크고, 노지에서는 *M. hapla*에 의한 피해가 심하다(Kim, 2001; Kim et al., 2001; Mitkowski and Abawi, 2003). 뿌리혹선충의 1세대는 약 30-60일 정도이며, 온도나 환경의 변화에 의해서 세대기간이 더 짧아질 수 있으며, 시설에서 한 작물을 연작하면 피해가 더 커지는 특징을 나타낸다(Cho et al., 2000; Kim and Han, 1998). 가지과 작물에 속하는 토마토(*Solanum lycopersicum* L.)는 재배 면적 및 생산량이 증가하는 추세이고, 주로 시설재배에 의존하여 연작재배하기 때문에 뿌리혹선충병 발생이 큰 문제가 되고 있다.

뿌리혹선충병의 방제는 화학적 방제, 물리적 방제(태양열 소독, 온탕 침지법), 재배적 방제(답전윤환, 저항성 품종 재배, 비기주 작물과 윤작) 및 생물적 방제(살선충 곰팡이, 천연물) 등의 방법들이 알려져 있다(Chon et al., 1996). 최근 약효가 우수한 살선충제를 이용한 선충 방제가 이루어지고 있지만, 토양 및 물의 이동, 유묘, 농기구 등에 의한 재오염이 지속적으로 발생되고 있어 근본적인 방제 방법으로 인식되지 못하고 있다. 최근에는 환경친화적인 측면에서 살선충 물질을 함유한 식물 추출물을 이용하여 방제하고자 시도하고 있다(Kim et al., 1998; Oka et al., 2012; Wiratno et al., 2009). 하지만 뿌리혹선충은 기주 범위가 매우 넓어 경제성이 높은 비기주 저항성 윤작 작물을 찾기가 어렵다. 따라서 장기적으로는 가장 환경친화적 방제 방법인 저항성 품종이나 저항성 대목을 이용한 접목 재배가 효과적일 것이다(Kinloch and Hinson, 1972; Rhoades, 1976).

균류병 및 세균병에 대한 작물의 저항성에서와 달리 선충에 대한 저항성은 식물에뿌리혹선충병이 발생하지 않는 immune이 아니고, 선충의 reproduction을 억제하는 것 즉 뿌리 혹에 선충의 난낭(egg mass) 형성이 억제되는 것으로 정의하고 있다(Trudgill, 1991). 토마토 품종에 있어서 뿌리혹선충에 대한 저항성 유전자는 야생 토마토 품종 *Solanum peruvianum*에서 보고된 단일 우성유전자 *Mi*을 도입한 것이다(Bailey, 1941; Gilbert and McGuire, 1956). 이 *Mi* 유전자는 주요 뿌리혹선충 중 *M. incognita*, *M. javanica* 및 *M. arenaria*에는 저항성을 나타내나, *M. hapla*에는 저항성을 나타내지 못한다(Barham and Winstead, 1957; Gilbert and McGuire, 1956; Roberts and Thomason, 1986). 이들 뿌리혹선충은 *Mi* 저항성과 감수성 토마토 모두를 침입할 수 있으나, 저항성 품종에서는 침입 이후에 기주의 저항성 반응(HR, hypersensitive reaction)에 의하여 선충은 feeding site를 만들지 못하고 더 이상 병 진전이 일어나지 않는다(Dropkin, 1969; Ho et al., 1992; Paulson and Webster, 1972). 그리고 이 저항성 반응은 접종 12시간 후에 볼 수 있으며, 선충에 대한 기주의 감수성 혹은 저항성은 접종 후 2-3일 이내에 결정된다고 알려져 있다(Dropkin, 1969; Paulson and Webster, 1972). 또한 토마토의 *Mi* 저항성은 28℃ 이상의 토양 온도에서는 뿌리혹선충에 대한 저항성이 발현되지 않는다(Dropkin,

1969).

이 *Mi* 저항성 유전자는 많은 가공용 및 생식용 토마토 품종에 도입되어 60년 이상 사용되어왔으나 저항성이 크게 무너지지 않아 상당히 안정적인 저항성 유전자로 평가되어 왔다 (Medina-Filho and Stevens, 1980; Sorribas et al., 2005). 그러나 최근에 *Mi* 저항성 토마토를 침해하는 *Meloidogyne* spp.의 자연 발생(Bost and Triantaphyllou, 1987; Kaloshian et al., 1996; Riggs and Winstead, 1959; Roberts et al., 1990; Tzortzakakis and Gowan, 1996)과 실내 및 포장에서 *Mi* 저항성 품종에 지속적으로 *M. incognita*를 넣어 줌으로써 이 저항성 품종을 가해할 수 있는 *Mi*-virulent 선충이 발생하였다는 보고들이 있다(Castagnone-Sereno et al., 1993; Tzortzakakis et al., 1999). 따라서 *Mi* 저항성 토마토 품종의 뿌리혹선충에 대한 저항성은 안심할 수 없는 실정이다. 하지만 우리나라에서 *Mi* 저항성 토마토를 감염하는 *M. incognita*에 관한 보고는 없었다.

본 연구는 2012년에 우리나라 부여 지방에서, 뿌리혹선충에 대한 저항성 품종으로 판매되고 있는 토마토 품종인 '유니콘'에 뿌리혹선충병이 발생한 것을 발견하고 이를 채집하여 뿌리혹선충을 분리하고 동정하였다. 그리고 이 뿌리혹선충(*M. incognita*)에 대한 감수성 1개 및 저항성 3개 토마토 품종의 저항성을 발병 온도를 달리하여 조사하였다. 또 시판 품종 33개(저항성으로 판매되는 25개와 감수성 8개)를 구입하여 이 선충에 대한 저항성 정도를 조사하였다. 그리고 이 *Mi*-virulent 선충에 대한 새로운 저항성 육종 소재를 개발하기 위한 효율적인 뿌리혹선충병 저항성 검정 방법을 확립하고자 접종원 농도, 토마토 생육 시기 및 이식 시기 등의 발병 조건에 따른 토마토 4개 품종들의 뿌리혹선충병 발생을 조사하였다.

나. 재료 및 방법

뿌리혹선충의 채집 및 분리

2012년 충남 부여에서 뿌리혹선충 저항성 유전자 *Mi*를 가지는 토마토 '유니콘' 품종에서 뿌리혹선충병이 심하게 발생하였다. 여기에서 채집한 토마토로부터 뿌리혹선충을 분리하기 위하여 토마토 뿌리의 혹을 흐르는 물로 잘 씻은 후에 개량된 sodium hypochloride 방법을 사용하여 뿌리혹선충의 알을 분리하였다(Kim and Lee, 2008). 간단히 설명하면 깨끗이 씻은 뿌리를 1cm 간격으로 잘라서 200mL의 1% sodium hypochlorite(NaOCl) 용액이 들어있는 믹서기에 넣고 고속으로 1분간 회전시켰다. 그리고 믹서기 내의 뿌리 찌꺼기, 알 및 유충을 75 μ m와 28 μ m 체에 통과시키고 28 μ m 체에 걸린 알을 수확하여 부화할 때까지 25 $^{\circ}$ C 상온에서 배양하였다.

뿌리혹선충의 동정

채집한 뿌리혹선충의 동정을 위하여, 알에서 부화한 유충으로부터 DNA를 추출하고 *M. incognita*의 특이적인 프라이머 2종을 사용하여 PCR 증폭을 통하여 동정하였다. 분리한 유충에 2mL CATB buffer를 넣고 막자 사발을 이용하여 마쇄하여 60 $^{\circ}$ C에서 1시간 정도 배양한 후 동량의 phenol:chloroform:isoamyl alcohol(25:24:1, v/v/v)를 넣고 잘 섞어 13,000rpm에서 15분 동안 원심분리하여 상정액을 취하였다. 상정액에 0.7vol의 isopropyl alcohol을 넣고 여러 번 업다운한 후 13,000rpm에서 15분간 원심분리하여 DNA pellet을 얻었다. 유충으로부터 얻은 DNA는 PCR-premix(iNtRON Biotechnology, Korea)와 혼합한 후에 종 특이적 프라이머인 Sec 1-F(5'-GGGCAAGTAAGGATGCTCTG-3')와 Sec

1-R(5'-GCACCTCTTTCATAGCCACG-3')(Tesarova et al., 2003) 프라이머와 Mi-F(5'-GTGAGGATTCAAGCTCCCAAG-3')와 Mi-R(5'-ACGAGGAACATACTTCTCCGTCC-3')(Meng et al., 2004)를 iCycler(Bio-RAD, USA)로 증폭하였다. PCR 증폭은 initial denaturation을 94°C에서 5분간 실시하고 denaturation(94°C) 1분, annealing(60°C) 1분, extention(72°C) 1분 30초로 40 cycle을 실시한 후 final extention을 72°C에서 10분간 실시하였다. 그리고 증폭 산물의 크기를 1% agarose gel에서 확인하였다.

뿌리혹선충의 증식

분리한 뿌리혹선충은 '서광'(몬산토코리아) 품종의 토마토 유묘를 이용하여 온실(25 ± 5°C)에서 증식하였다. 원예용 상토(쑥쑥이, 농우바이오)와 멸균한 모래의 비율(v/v)이 1:1이 되도록 혼합한 토양을 플라스틱 포트(직경 10.0cm, 높이 9.0cm)에 넣고, 파종 후 원예용 상토에서 21일 동안 재배한 토마토 유묘를 이식하고 7일 동안 더 재배한 토마토에 뿌리혹선충의 알을 주 당 10,000개씩 접종하였다. 접종한 토마토는 온실에서 45-60일 동안 재배한 후에 토마토 뿌리에 흑이 형성된 것을 확인하고 접종원으로 사용하였다.

접종원 준비

뿌리혹선충병이 발생한 토마토 뿌리를 수거하여 개량된 sodium hypochlorite 방법(Barker et al., 1985)을 사용하여 *M. incognita*의 알을 분리하였다. 깨끗이 씻은 뿌리를 1cm 이하 간격으로 잘라서 250mL의 0.5% sodium hypochlorite 용액이 들어있는 분쇄기에 넣고 90초간 마쇄하였다. 그리고 이를 65µm 체에 걸러 뿌리 찌꺼기를 걸러내고 그것을 통과한 알들을 25µm 체에 수집한 후에 sodium hypochlorite 성분을 제거하기 위하여 수돗물로 충분히 씻어 주었다. 수확한 *M. incognita* 알의 농도는 해부현미경을 통해 측정하였으며, 접종원 농도에 따른 뿌리혹선충병 발생 실험을 제외한 모든 실험에서는 *M. incognita* 알을 mL 당 5,000개가 되도록 멸균수로 희석하여 접종원으로 사용하였다. 접종원 농도에 따른 토마토 뿌리혹선충병 발생을 위해서는 mL 당 500, 1,000, 5,000, 10,000 및 30,000개가 되도록 준비하였다.

식물체 준비

다양한 조건에 따른 *M. incognita*의 뿌리혹선충병 발생을 위해서는 감수성 품종인 '서광'(몬산토코리아) 그리고 뿌리혹선충에 대한 저항성 품종으로 판매되고 있는 '롱런'(몬산토코리아), '도태랑마스터'(다이끼종묘) 및 '텐텐'(코레곤종묘)을 구입하여 실험에 사용하였다.

5×8 육묘용 연결포트(70mL/pot, 범농)에 원예용 상토(쑥쑥이, 농우바이오)를 채워 넣고 토마토 종자를 파종하여 온실(25 ± 5°C)에서 3주일 동안 재배하였다. 이 토마토 유묘를 플라스틱 포트(직경 9cm, 높이 8cm)로 원예용 상토(쑥쑥이, 농우바이오)와 멸균한 모래를 1:1(v/v) 비율로 혼합한 토양을 사용해 이식하고 온실에서 7일 동안 더 재배한 토마토를 실험에 사용하였다.

토마토 생육 시기에 따른 뿌리혹선충병 발생 조사를 위해서는 4개 품종의 종자를 파종하고 온실에서 2주, 3주 및 4주 동안 재배한 것을 앞에서와 마찬가지로 혼합 토양에 이식하고 1주일 동안 더 재배한 토마토 유묘를 접종실험에 사용하였다. 그리고 혼합 토양에 토마토를 이식하고 접종할 때까지의 재배 기간에 따른 즉 이식 시기에 따른 뿌리혹선충병 발생은 선충을

접종하기 0, 3, 9일 전에 각각 앞에서와 같은 방법으로 토마토를 이식하고 온실에서 재배한 유묘에 선충을 접종하였다.

그리고 시판 중인 토마토 품종들의 이 *M. incognita* 선충에 대한 저항성 차이를 조사하기 위해서는 뿌리혹선충에 대한 저항성 품종으로 표기된 25개 품종('하우스첼린지', '텐텐', '슈퍼도태랑', '큐티', '스위트', '도태랑프로', '도태랑레굴러', '도태랑골드', '도태랑챔피온', '도태랑마스터', '도태랑다이아', '핑크히트', '포세이돈', '유니콘', '롱런', '제우스42', '조이폴', '서건', '로꾸산마루', '토사마', '마이로꾸', '하드랑', '키스꿀', '큐피랑')과 감수성 8개 품종('첼린지틴틴', '첼린지스페셜', '호용', '서광', '슈퍼선로드', '풍영', '미니찰미니', '요요캡틴')을 시중에서 구입하여 앞에서와 동일한 방법으로 파종하고 3주 동안 재배한 후 큰 포트에 이식하여 재배한 토마토 유묘를 실험에 사용하였다.

접종 및 발병

준비한 토마토 유묘에 *M. incognita* 알을 주 당 5,000개씩 토양 3cm 깊이에 접종하였다. 접종한 토마토 유묘는 25°C 생육실에서 하루에 12시간씩 광을 조사하면서 1주일 동안 재배한 후에 온실(25 ± 5°C)로 이동하여 재배하였다.

접종원 농도에 따른 뿌리혹선충병 발생 실험에서는 포트 당 *M. incognita* 알을 각각 500개, 1,000개, 5,000개, 10,000개 및 30,000개씩을 접종하고 앞에서와 동일한 방법으로 재배하여 뿌리혹선충병 발생을 유도하였다. 그리고 접종 후 생육 온도에 따른 뿌리혹선충병 발생을 위해서는 *M. incognita*를 접종하고 25°C 생육실에서 하루에 12시간씩 광을 조사하면서 각각 0, 7, 14, 21일 동안 재배한 후에 온실로 이동하여 관행으로 수분관리를 하면서 재배하였다.

병 조사

선충에서의 저항성은 뿌리혹 형성을 저해하는 것이 아니라 후세대를 생산하는 것을 억제하는 것으로 정의하고 있다(Trudgill, 1991). 따라서 접종 45일 후에 토마토 유묘의 뿌리를 수거해 흙을 제거하고 물로 씻은 후에 뿌리에 형성된 난낭(egg mass)의 수를 조사하였다. 난낭 수 조사는 잘 씻은 토마토 뿌리를 erioglaucine disodium 용액(15mg · L⁻¹)에 30분 동안 침지하여 염색한 후에 뿌리에 형성된 난낭의 수를 측정하였다(Umesh et al., 1994). 토마토 품종의 저항성 판정은 Taylor and Sasser(1978)의 방법을 참고하여 뿌리에 생긴 주 당 난낭의 수에 따라 결정하였다. 저항성은 주 당 0-10개, 중도저항성은 11-30개 그리고 감수성은 31개 이상으로 하였다. 그리고 혹 지수도 함께 조사하였는데, 토마토 뿌리에 혹이 생긴 정도에 따라 0-10의 지수를 사용하여 11단계로 조사하였다. 0=0%, 1=1-10%, 2=11-20%, 3=21-30%, 4=31-40%, 5=41-50%, 6=51-60%, 7=61-70%, 8=71-80%, 9=81-90%, 10=91-100% (Bridge and Page, 1980; Fassuliotis, 1985; Taylor and Sasser, 1978).

모든 실험은 3반복으로 2회 실시하였으며, 통계 분석은 SAS(SAS Institute, Inc., 1989, Cary, NC) 프로그램을 이용하여 ANOVA 분석을 하였으며, 처리 평균간 비교를 위하여 Duncan's multiple range test ($P=0.05$)를 실시하였다.

다. 결과 및 고찰

뿌리혹선충의 동정

부여 토마토 재배 포장에서 채집하여 분리한 뿌리혹선충을 동정하기 위하여 유충으로부터 얻은 DNA를 *M. incognita*에 특이적인 프라이머인 Sec 1-F/R과 Mi-F/R을 이용하여 증폭하였다(Meng et al., 2004; Tesarova et al., 2003). 그 결과, 특이적인 프라이머인 Sec 1-F/R를 이용하여 증폭한 경우에는 500bp 정도의 증폭 산물을 얻었고, Mi-F/R를 이용하여 증폭하였을 때에는 1,000bp 정도의 증폭 산물을 얻었다. 따라서 부여 토마토 재배 포장에서 분리한 뿌리혹선충은 *M. incognita*의 특이적인 프라이머인 Sec 1-F/R와 Mi-F/R에서 기 보고된 바와 같이 각각 500bp와 1,000bp의 증폭 산물을 보여 *M. incognita*로 동정되었다(Meng et al., 2004; Tesarova et al., 2003).

접종 후 재배 온도에 따른 뿌리혹선충병 발생

부여에서 채집한 *M. incognita*를 저항성 3개 품종과 감수성 1개 품종에 접종하고 온도를 달리하여 재배한 후에 토마토 품종들의 뿌리혹선충병 발생을 조사하기 위하여, *M. incognita*의 알을 토마토 유묘 당 5,000개씩 접종하고 생육실(25°C)에서 각각 0, 1주, 2주 및 3주 동안 배양한 후에 온실(25 ± 5°C)로 이동하고 재배하여 뿌리혹선충병 발생을 조사하였다. 그 결과, 접종하고 온실로 바로 이동한 토마토나 저항성 발현을 촉진하기 위하여 25°C 생육실에서 1주일, 2주일 및 3주일 동안 재배한 후에 온실로 이동하여 재배한 토마토 모두 저항성과 감수성 품종에 관계없이 높은 감수성을 보였다(Table 1). 즉, 재배 온도에 관계없이 그리고 품종에도 관계없이 많은 난낭이 형성되었으며, 또한 높은 혹 지수를 보였다. 이들 결과로부터 부여에서 채집한 뿌리혹선충 *M. incognita*는 Mi 저항성 토마토 품종을 감염할 수 있는 선충으로 생각되었다.

Table 1. Development of root-knot on tomato seedlings of four cultivars according to incubation conditions after inoculating with *Meloidogyne incognita*.

Tomato cultivar	Incubation period in a growth chamber (25°C)			
	0	1 week	2 weeks	3 weeks
Seogwang	99±3.3 ^y a ^x (8.3±0.3 ^w b ^x)	97±4.1a (8.5±0.5b)	98±2.9a (9.0±0.2ab)	108±6.7a (9.5±0.7a)
Dotaerangmaster	9±8.7ab (8.0±0.2ab)	71±2.9bc (7.5±0.6b)	62±5.0c (7.8±0.4b)	100±5.2a (9.2±0.3a)
Longrun	73±5.7a (9.2±0.7a)	58±5.4a (8.8±0.2ab)	54±4.8a (7.5±0.5b)	70±7.6a (8.2±0.6ab)
Tenten	87±12a (8.3±0.5ab)	79±7.6a (9.2±0.4a)	66±2.6a (7.5±0.5b)	75±2.4a (8.5±0.2ab)
Mean	88 (8.5)	76 (8.5)	70 (8.0)	88 (8.9)

^zOne week after transplanting, the potted 28-day-old seedlings were inoculated with *M. incognita*. The inoculated plants were incubated in a growth chamber with 12-hr light a day for 0, 1, 2, and 3 weeks and then transferred to a greenhouse (25 ± 5°C). Forty five days after inoculation, disease severity of the seedlings was rated on the number of egg masses and gall index of a scale 0 to 10.

^yThe number of egg masses/plant. Each value represents the mean ± standard deviation of

two runs with three replicates each.

^xValues in the labeled with the same letter in each line are not significantly different in Duncan's multiple range test at $P=0.05$.

^wEach value represents the mean gall index \pm standard deviation of two runs with three replicates each.

많은 가공용 및 생식용 토마토 품종들의 뿌리혹선충(*M. incognita*)에 대한 저항성은 *S. peruvianum*로부터 도입된 *Mi* 유전자에 의한 것으로 알려져 있다(Dropkin, 1969; Holtzmann, 1965; Philis and Vakis, 1977, Noling, 2000). 그리고 1940년대에 도입된 이후부터 오늘날까지 토마토의 뿌리혹선충에 대한 저항성 품종 육성에 사용되어온 *Mi* 유전자는 상당히 안정적인 저항성을 나타낸다고 알려져 왔으나(Medina-Filho and Stevens, 1980; Sorribas et al., 2005), 최근에 *Mi* 저항성 토마토를 침해하는 *Meloidogyne* spp.의 자연 발생이 그리스 Crete와 미국 캘리포니아 등에서 보고되고 있다(Berthou et al., 1989; Bost and Triantaphyllou, 1987; Kaloshian et al., 1996; Riggs and Winstead, 1959; Roberts et al., 1990; Tzortzakakis and Gowan, 1996).

토마토의 뿌리혹선충병 저항성 정도에 관한 국내 연구결과로, 당근 뿌리혹선충(*M. hapla*)에 대하여 '강육토마토' 등 107개 품종이 감수성으로 조사 되었고(Cho et al., 1986), 땅콩 뿌리혹선충(*M. arenaria*)에 대해 감수성을 보이는 '선명' 및 '홍도' 토마토 품종과 중도저항성으로 판별된 '알찬'과 '홍영' 품종이 보고되었다(Kim and Choi, 2001). 그리고 *M. incognita*에 대한 완숙토마토 32종, 방울토마토 11종, 대목토마토 8종의 저항성 검정을 통해서 '홈런킹', '레드체리', '부킹하계' 및 '스페셜'이 저항성 품종으로 보고되었다(Kim et al., 2010). 따라서 부여에서 채집한 *M. incognita* isolate는 국내에서 기존의 저항성 품종 개발을 위한 병리검정에 사용되어진 뿌리혹선충 집단과 다르며, 우리나라 부여 지방에 *Mi* 저항성 토마토를 감염할 수 있는 *M. incognita*가 발생하였다고 생각되었다. 따라서 이는 우리나라 토마토 재배지역에서 *Mi*-virulent *M. incognita*의 발생을 처음으로 보고하는 것이다.

시판 중인 33개 토마토 품종들의 저항성

부여 지방에서 채집한 *M. incognita*에 대한 시판 중인 토마토 33개(뿌리혹선충 저항성 25개와 감수성 8개) 품종의 저항성 정도를 조사하기 위하여, 파종하고 28일 재배한 토마토 유묘에 *M. incognita* 알을 주 당 5,000개씩 접종하고 25°C 항온항습실에서 1주일 동안 배양한 후에 온실(25 \pm 5°C)에서 재배하여 뿌리혹선충병 발생을 조사하였다. 감수성 8개 품종에 형성된 주 당 난낭 수는 평균 109개였다(Table 2). '요요캡틴'에서는 다소 낮은 주 당 난낭 수가 76개였으나, 나머지 7개 품종에서는 주 당 98-132개의 난낭이 형성되었다. 그리고 저항성 품종 25개는 주 당 102-137개 그리고 평균 121개의 난낭이 형성되었다. 한편 뿌리에 형성된 혹 형성 정도를 나타내는 혹 지수(gall index)는 감수성 8개 품종들은 5.8-9.0을 그리고 저항성 25개 품종들은 7.0-9.2를 보였다. 따라서 부여 지방에서 채집한 *M. incognita*에 의한 감수성 및 저항성 품종의 뿌리혹선충병 발생은 차이가 없음을 알 수 있었다.

Table 2. Resistance degree of thirty-three commercial tomato cultivars to *Meloidogyne incognita*.

Tomato cultivar	Trait	No. of egg mass	Resistance reaction ^y
Cutie	R ^x	117 ± 7.0 ^w (8.2 ^y ±0.2)	S
Dotaerangchampion	R	109 ± 2.6 (8.7 ± 0.4)	S
Dotaerangdia	R	128 ± 6.5 (9.2 ± 1.3)	S
Dotaeranggold	R	127 ± 8.7 (9.2 ± 0.2)	S
Dotaerangmaster	R	102 ± 2.9 (9.0 ± 0.6)	S
Dotaerangpro	R	142 ± 3.6 (9.0 ± 0.0)	S
Dotaerangregular	R	131 ± 5.4 (8.7 ± 0.5)	S
Gwangmoung	R	113 ± 6.9 (8.2 ± 0.3)	S
Hardrang	R	126 ± 8.2 (8.3 ± 0.2)	S
Housechallenge	R	122 ± 7.6 (8.8 ± 0.4)	S
Joyful	R	109 ± 5.7 (8.8 ± 0.4)	S
Kewpierang	R	117 ± 8.0 (8.3 ± 0.3)	S
Kissggul	R	107 ± 2.4 (7.5 ± 0.7)	S
Longrun	R	102 ± 3.6 (6.8 ± 0.2)	S
Mairokku	R	137 ± 7.5 (9.0 ± 0.2)	S
Pinkhit	R	131 ± 4.5 (9.2 ± 1.3)	S
Poseidon	R	116 ± 8.4 (9.2 ± 0.3)	S
Rokkusanmaru	R	130 ± 5.9 (8.5 ± 0.4)	S
Seogun	R	121 ± 6.5 (7.8 ± 0.6)	S
Superdotaerang	R	118 ± 7.8 (8.8 ± 0.4)	S
Sweet	R	129 ± 7.5 (8.7 ± 0.2)	S
Tenten	R	125 ± 4.9 (7.0 ± 0.0)	S
Tosama	R	125 ± 2.9 (9.0 ± 0.0)	S
Unicorn	R	129 ± 8.5 (8.8 ± 0.3)	S
Zeus42	R	110 ± 7.6 (8.7 ± 0.6)	S
Challengtintin	-	107 ± 6.8 (8.5 ± 0.5)	S
Challengespecial	-	132 ± 6.0 (9.0 ± 0.3)	S
Hoyong	-	103 ± 5.0 (8.2 ± 0.4)	S
Minichalmini	-	98 ± 5.9 (6.7 ± 0.7)	S
Pungyoung	-	119 ± 7.4 (8.8 ± 0.2)	S
Seogwang	-	117 ± 8.7 (9.0 ± 0.3)	S
Supersunroad	-	124 ± 7.8 (8.0 ± 0.9)	S
Yoyocaptin	-	76 ± 5.9 (5.8 ± 1.2)	S

^zOne week after transplanting, the potted 28-day-old seedlings were inoculated with *M. incognita*. The inoculated plants were incubated in a growth chamber at 25°C for 7 days with 12-hr light a day and then transferred to a greenhouse (25 ± 5°C). Forty five days after inoculation, disease severity of the seedlings was rated on the number of egg masses and gall index of a scale 0 to 10.

^yResistance reaction of tomato cultivar was determined by the number of egg masses per

plant. R, resistant, 0-10; MR, moderately resistant, 10-30; S, susceptible, more than 31.

^xR, resistant cultivar to root-knot nematode commercialized by seed company.

^wThe number of egg masses/plant. Each value represents the mean \pm standard deviation of two runs with three replicates each.

^vEach value represents the mean gall index \pm standard deviation of two runs with three replicates each.

이상의 결과로부터 부여 지방에서 분리한 *M. incognita*는 뿌리혹선충병 저항성 토마토를 감염할 수 있는 선충임을 알 수 있었다(Tables 1 and 2). 그리고 25개 저항성 품종의 뿌리혹선충병 발생이 감수성 품종과 거의 차이가 없으므로(Table 2), 이미 보고된 바와 같이 *Mi* 유전자는 단인자 우성 유전자임을 알 수 있었다(Gilbert and McGuire, 1956; Roberts and Thomason, 1986). 그리고 여러 종자회사에서 뿌리혹선충 저항성 품종으로 판매되고 있는 25개 토마토 품종들은 품종 간에 뿌리혹선충병 발생이 거의 차이가 없었다(Table 2). 그러므로 토마토의 뿌리혹선충병 저항성을 위해 도입한 유전자는 거의 동일한 것으로 생각되었다. *Mi* 유전자는 1940년대에 *S. peruvianum*으로부터 이종교잡에 의해 도입된 이후 오늘날까지 지속적으로 뿌리혹선충 저항성 품종 육성을 위해 사용해 온 저항성 유전자인데(Medina-Filho and Stevens, 1980; Smith, 1944), *Mi* 저항성을 무너뜨리는 새로운 레이스의 선충이 발견됨에 따라 앞으로 저항성 육종에 사용할 새로운 저항성 육종 소재를 탐색하는 것이 필요하다. 따라서 부여에서 채집한 *Mi* 저항성 토마토를 감염하는 이 선충은 새로운 저항성 육종 소재를 탐색하는 연구에 유용할 것으로 생각된다. 따라서 이 선충을 이용한 체계적이고 효율적인 뿌리혹선충병 저항성 검정 방법의 확립이 필요하다.

접종원 농도에 따른 뿌리혹선충병 발생

접종원 농도에 따른 토마토 뿌리혹선충병 발생을 조사하기 위하여, 과중하고 21일 동안 재배한 토마토를 큰 포트에 이식하고 7일간 더 재배한 4개 품종의 토마토 유묘에 *M. incognita*의 알을 주 당 500개, 1,000개, 5,000개, 10,000개 및 30,000개씩을 접종하였다. 접종 45일 후에 4개 토마토 품종들에 형성된 주 당 난낭(egg mass)의 수 및 뿌리혹 지수를 조사한 결과, 실험한 모든 품종에서 접종원의 농도가 증가함에 따라 난낭 수와 혹 지수는 증가하였다(Table 3). 주 당 *M. incognita*의 알을 500개와 1,000개씩을 접종한 토마토 품종들에서는 접종원 농도 증가에 따른 난낭 수 및 혹 지수는 각각 8-17개 그리고 0.5-2.0으로 상당히 낮았다. 하지만 알을 5,000개를 접종하였을 때에는 500개나 1,000개를 접종하였을 때보다 난낭 수와 혹 지수는 모두 크게 증가하였다(Table 3). 알을 10,000개나 30,000개 접종하였을 때에는 난낭 수 및 혹 지수가 약간 증가할 뿐이었다. 따라서 접종원 준비를 고려할 때 효율적인 토마토의 뿌리혹선충병 저항성 검정에 적합한 접종원의 농도는 주 당 *M. incognita* 알을 5,000개씩 접종하는 것이라고 생각되었다.

Table 3. Development of root-knot on tomato seedlings of four cultivars according to inoculum concentration of *Meloidogyne incognita*.

Tomato cultivar	Inoculum concentration (the number of eggs)				
	500	1,000	5,000	10,000	30,000
Seogwang	15 ± 1.6 ^y c ^x (1.8 ± 0.9 ^w b ^x)	17 ± 2.9c (1.8 ± 0.2b)	106 ± 3.3b (8.2 ± 0.5a)	102 ± 6.5b (9.4 ± 0.2a)	137 ± 17a (9.5 ± 0.3a)
Dotaerangmaster	7 ± 0.4c (0.5 ± 0.0d)	17 ± 5.0c (1.5 ± 0.2c)	80 ± 6.2b (8.7 ± 0.5ab)	73 ± 3.3b (8.2 ± 0.3b)	122 ± 2.7a (9.2 ± 0.4a)
Longrun	8 ± 0.8c (0.5 ± 0.0b)	12 ± 2.9c (2.0 ± 0.0b)	57 ± 5.4b (7.5 ± 0.8a)	69 ± 1.2b (8.8 ± 0.4a)	99 ± 2.9a (8.8 ± 0.7a)
Tenten	8 ± 1.6d (1.0 ± 0.1b)	13 ± 4.5d (1.9 ± 0.1b)	59 ± 6.0c (8.0 ± 0.4a)	83 ± 2.0b (8.7 ± 0.6a)	111 ± 9.9a (9.0 ± 0.5a)
Mean	10 (1.0)	15 (1.8)	75 (8.1)	82 (8.8)	117 (9.1)

^zOne week after transplanting, the potted 28-day-old seedlings were inoculated with *M. incognita*. The inoculated plants were incubated in a growth chamber at 25°C for 7 days with 12-hr light a day and then transferred to a greenhouse (25 ± 5°C). Forty five days after inoculation, disease severity of the seedlings was rated on the number of egg masses and gall index of a scale 0 to 10.

^yThe number of egg masses/plant. Each value represents the mean ± standard deviation of two runs with three replicates each.

^xValues in the labeled with the same letter in each line are not significantly different in Duncan's multiple range test at *P*=0.05.

^wEach value represents the mean gall index ± standard deviation of two runs with three replicates each.

토마토 생육 시기 및 이식 시기에 따른 뿌리혹선충병 발생

토마토 4개 품종을 파종한 후 온실에서 각각 2주, 3주, 4주 동안 재배한 토마토 유묘를 접종 1주일 전에 큰 포트에 이식하고 재배한 후에 *M. incognita* 알을 5,000개씩 접종하여 토마토 생육 시기에 따른 뿌리혹선충병 발생을 조사하였다. 파종 후 3주, 4주 및 5주된 토마토 유묘에 선충을 접종하여 형성된 4개 품종의 평균 난낭 수는 각각 79, 76 및 73으로 토마토의 생육 시기가 증가할수록 뿌리혹선충병 발생은 약간 감소하였다(Table 4). 특히 감수성 품종인 '서광'에서는 재배 기간이 3주, 4주 및 5주로 길어짐에 따라 토마토 뿌리에 형성된 난낭 수가 116, 105, 87로 약간 감소하였다. 하지만 통계적으로 유의성 있는 차이는 없었다. 따라서 토마토의 생육 시기에 따른 *M. incognita*의 뿌리혹선충병 발생은 실험한 생육 시기 내에서는 크게 영향을 받지 않는다고 생각되었다.

한편, 토마토 유묘를 큰 포트에 이식하고 재배하는 시간에 따라 뿌리의 발근 및 활착 정도에 차이가 있으리라 생각되어 *M. incognita*를 접종하기 0, 3, 9일 전에 각각 큰 포트에 이식하였다. 그 결과, 접종하기 0, 3, 9일 전에 이식한 토마토 4개 품종의 평균 난낭 수는 각각 52,

54, 54이고, 흑 지수는 7.3, 7.5, 7.7로 이식한 후의 재배 기간에 상관없이 뿌리혹선충병 발생은 거의 차이가 없었다(Table 5).

따라서 토마토 뿌리혹선충병 발생에 토마토의 생육 시기 및 이식 후 재배 기간 등은 큰 차이가 없으나, 토마토 재배를 고려할 때, 효율적인 토마토 뿌리혹선충병 저항성 검정을 위해서는 토마토 종자를 원예용 상토에 파종하고 약 3주 동안 재배한 후에 모래와 원예용 상토를 동량으로 섞은 혼합 토양을 사용하여 큰 포트에 이식하고 1주일 후에 *M. incognita* 알을 5,000개씩 접종하고 25°C 생육상에서 하루에 12시간씩 광을 조사하면서 1주일 동안 배양한 후에 온실에서 재배하고, 접종 45일 후에 토마토 뿌리에 형성된 난낭의 수를 조사하는 것이 효과적일 것으로 생각되었다.

Table 4. Development of root-knot on tomato seedlings of four cultivars according to growth stage of plant^z.

Tomato cultivar	Growth stage of plants (days after sowing)		
	21	28	35
Seogwang	116 ± 10 ^y a ^x (9.2 ± 0.3 ^w a ^x)	105 ± 7.1a (8.7 ± 0.3a)	87 ± 31a (8.5 ± 0.5a)
Dotaerangmaster	79 ± 10a (8.8 ± 0.1a)	79 ± 9.0a (6.8 ± 0.2b)	81 ± 4.9a (7.0 ± 0.0b)
Longrun	58 ± 16a (8.0 ± 0.2a)	52 ± 15a (5.8 ± 0.4a)	57 ± 2.9a (8.2 ± 0.1a)
Tenten	61 ± 19a (7.8 ± 0.5ab)	67 ± 13a (7.2 ± 0.6b)	65 ± 1.6a (8.8 ± 0.2a)
Mean	79 (8.5)	76 (7.1)	73 (8.1)

^zOne week after transplanting, the potted seedlings were inoculated with *Meloidogyne incognita*. The inoculated plants were incubated in a growth chamber with 12-hr light a day for 7 days and then transferred to a greenhouse (25 ± 5°C). Forty five days after inoculation, disease severity of the seedlings was rated on the number of egg masses and gall index of a scale 0 to 10.

^yThe number of egg masses/plant. Each value represents the mean ± standard deviation of two runs with three replicates each.

^xValues in the labeled with the same letter in each line are not significantly different in Duncan's multiple range test at $P=0.05$.

^wEach value represents the mean gall index ± standard deviation of two runs with three replicates each.

Table 5. Development of root-knot on seedlings of four tomato cultivars according to cultivation period after transplant of seedlings to inoculation of *Meloidogyne incognita*.

Tomato cultivar	Cultivation period after transplanting		
	0 day	3 days	9 days
Seogwang	82± 7.1 ^y a ^x (7.5 ^w ± 0.3a ^x)	68 ± 2.2ab (8.2 ± 0.5a)	53 ± 7.0b (7.8 ± 0.4a)
Dotaerangmaster	48 ± 5.4a (7.0 ± 0.0a)	63 ± 4.9a (7.8 ± 0.6a)	64 ± 2.4a (8.3 ± 0.3a)
Longrun	40 ± 4.6b (7.8 ± 0.2a)	37 ± 1.2b (6.7 ± 0.4a)	54 ± 2.2a (7.0 ± 0.5a)
Tenten	37 ± 3.7a (7.0 ± 0.0a)	48 ± 2.9a (7.5 ± 0.3a)	46 ± 3.3a (7.5 ± 0.2a)
Mean	52 (7.3)	54 (7.5)	54 (7.7)

^zOne, three, and nine days after transplanting, the potted 28-day-old seedlings were inoculated with *M. incognita*, respectively. The inoculated plants were incubated in a growth chamber with 12-hr light a day for 7 days and then transferred to a greenhouse (25 ± 5°C). Forty five days after inoculation, disease severity of the seedlings was rated on the number of egg masses and gall index of a scale 0 to 10.

^yThe number of egg masses/plant. Each value represents the mean ± standard deviation of two runs with three replicates each.

^xValues in the labeled with the same letter in each line are not significantly different in Duncan's multiple range test at $P=0.05$.

^wEach value represents the mean gall index ± standard deviation of two runs with three replicates each.

2. 오이 뿌리혹선충병에 대한 효율적인 저항성 스크리닝 체계 확립

가. 서론

토양에 서식하는 선충은 주로 유기물이 풍부한 토양에 널리 분포하고 있다. 그 중 식물의 뿌리에 구침을 찔러 넣어 영양분을 섭취하거나 뿌리 조직 안으로 들어가 식물체에서 서식하는 식물기생성 선충이 농작물에 문제시 되고 있다(Taylor과 Sasser, 1978; Thorne, 1961). 식물기생 선충은 전 세계적으로 약 2,000여종이 보고되어 있고 작물에 미치는 경제적 손실이 계속 증가하고 있는 추세이다(Abad 등, 2008; Boina 등, 2008; Jung과 Wyss, 1999). 식물 기생성 선충은 식물에 기생하여 피해를 주기 때문에 외관상 봤을 때 양분의 부족이나 생리적인 장애로 진단되는 경우가 많다. 식물기생성 선충류 중 *Meloidogyne* 속에 속하는 뿌리혹선충류는 오이와 토마토, 메론, 딸기를 포함하는 많은 작물에 기생하여 생산량의 감소와 품질 저하로 인한 경제적 손실을 가져오는 대표적인 식물 기생성 선충의 한 종류이다. 또한 뿌리혹선충류는 토양병원균들의 식물체 침입을 증대시키기 때문에 2차적인 병으로 인한 식물의 피해를 가져오게 된다(van der Putten 등, 2006). 국내에서 뿌리혹선충에 의해 가장 큰 피해를 받고 있는 작물로는

고구마, 감자, 오이, 참외, 수박, 메론, 토마토, 고추, 당근, 상추 등이 있다. 그 중 박과 작물에 속하는 오이(*Cucumis sativus*)의 시설재배 규모가 대형화되고 생산량이 증가하는 추세로 동일한 장소에서의 동일 작물의 연작 년 수가 길어지고, 연중재배의 원인으로 인해 시설재배지 토양 내 뿌리혹선충 밀도가 높아져 병해 발생 문제가 야기 되고 있다(Cho 등, 2000a, b; Kim 등, 1998; Kim과 Han, 1998)

뿌리혹선충병의 방제는 화학적방제(살선충 약제방제), 물리적방제(태양열소독, 온탕침지법), 경종적방제(토양개량, 객토, 답전운환, 저항성 품종의 육종, 저항성 윤작, 유인식물 재배), 생물적방제(살선충 천적) 등의 여러 방법들이 제시되었고(Chen 등, 1996; Han과 Kim, 1997; Heald과 Robinson, 1987; Kim과 Han, 1998; Park 등, 1995b) 포장상태, 방제 효율 및 경제성 등을 고려하여 적합한 방제 방법들을 선택하게 된다(Chon 등, 1996; Park 등, 1995a). 화학적 방제법에 있어, 최근 약효가 우수한 살선충제의 연구 개발로 선충에 대한 방제가 이루어지고 있지만 토양 및 물의 이동, 유묘, 농기구 등에 의한 재오염과 살선충제에 대한 독성 및 잔류기간이 길고, 토양 미생물에 대해 영향을 미치는 범위가 넓기 때문에 토양생태계 불균형과 같은 환경문제가 지속적으로 발생되고 있어 근본적인 방제 방법으로 인식되지 못하고 있다(Birch 등, 1993; Kim과 Choi, 2001). 최근에는 환경친화적인 측면에서 저항성 품종을 재배하던가, 천적을 이용한 생물적 방제, 경종적 방제, 살선충 물질을 함유한 식물추출물을 이용하여 방제하는 방법 등 친환경적이고 특이한 작용기작을 가진 새로운 살선충물질의 탐색을 강구하고 있으며(Boina 등, 2008; Gurr, 1992; Prakash과 Rao, 1997), 장기적인 환경친화적 방제방법으로 저항성 대목이나 품종을 통한 윤작이 유용하게 이용 될 수 있을 것이다(Kinloch과 Hinson, 1972; Rhoades, 1976). 최근까지 과채류 작물에서의 뿌리혹선충의 저항성 품종 연구가 진행되고 있지만 강한 저항성을 지닌 계통은 그리 많지 않은 것으로 보고 되어 있으며 작물에서의 저항성을 이용한 뿌리혹선충 방제에 관한 방법은 토마토 품종 스크리닝을 통해 저항성 작물을 이용한 윤작으로 친환경적 방제에 대한 연구가 이루어지고 있다(Cho 등, 1986; Choi 등, 2006; Han과 Kim, 1997; Kim, 2001; Park 등 1995a; Rhoades, 1976). 하지만 뿌리혹선충은 선충의 종과 race에 따라 저항성품종에 대한 저항성 반응이 상이하고 기주범위가 매우 넓어 경제성이 높은 저항성 윤작 작물을 찾기가 어렵다는 단점이 있다.

본 연구는 오이 품종의 저항성 연구 및 새로운 저항성 육종 소재를 개발하는데 있어서 *Meloidogyne incognita*로 동정된 뿌리혹선충(Hwang 등, 2013)으로 집중원 농도, 오이의 생육시기 및 이식 시기 등의 발병 조건에 따른 오이 4개 품종들의 뿌리혹선충병 발생을 조사하였고, 이를 통해 효율적인 뿌리혹선충병 저항성 검정 방법을 확립하고자 하였다. 또한 뿌리혹선충병 발생의 적정 조건에서 시관중인 45개 오이 품종의 뿌리혹선충병 저항성 정도를 조사하여 저항성 품종을 육성하는 기반을 구축하고 기초 자료를 제공하기 위해 연구를 수행하였다.

나. 재료 및 방법

토마토 뿌리혹 선충의 채집, 분리 및 동정

토마토 뿌리혹 선충은 부여 토마토 재배 포장에서 뿌리혹이 발생한 ‘유니콘’ 토마토 품종의 뿌리를 샘플링 하였다. 뿌리 혹을 흐르는 물로 잘 씻어서 뿌리속의 뿌리혹선충의 알과 유충을 개량된 sodium hypochloride 방법을 사용하였다. 분리방법은 깨끗이 씻은 뿌리를 1 cm 간격으로 잘라서 200 ml의 1% NaOCl 용액이 들어있는 믹서기에 넣고 고속으로 1분간 회전시켰

다(Kim과 Lee, 2008). 그리고 믹서기 내의 뿌리 찌꺼기, 알, 유충은 75 μm 와 28 μm 체를 통시키고 28 μm 체에 걸린 알이 부화할 때까지 25°C 상온에서 보관하였다. 분리한 알과 유충으로부터 추출한 DNA와 *M. incognita* 특이적 프라이머를 혼합하여 PCR 증폭하였고 산물의 크기를 1% agarose gel에서 확인하였다(Hwang 등, 2013).

식물체 준비

다양한 조건(접종원 농도, 오이 이식 시기 및 생육 시기)에서의 뿌리혹선충에 대한 저항성 검정 실험에는 4품종인 ‘드레곤삼척’(코레곤종묘), ‘아시아스트라이크’(아시아종묘), ‘네박자’(신젠타), ‘하늘백다다기’(신젠타)을 이용하였고, 적합한 조건에서 대목 품종으로 시판중인 6품종(‘눈부서’, ‘뉴타입’, ‘서포트’, ‘슈퍼흑종’, ‘유니온’, ‘쓰야까EX’)과 39품종(‘계대백과’, ‘구월반백’, ‘글로리삼척’, ‘낙동청장’, ‘네박자’, ‘노다지백다다기’, ‘녹야청청’, ‘대선’, ‘드레곤삼척’, ‘러스보이’, ‘무진장’, ‘미니사엽’, ‘미니큐’, ‘미인백다다기’, ‘백미백다다기’, ‘백침맛짱’, ‘신세대’, ‘신정풍’, ‘싱싱백다다기’, ‘아시아노각’, ‘아시아스트라이크’, ‘아시아은천’, ‘아시아청장’, ‘오대백다다기’, ‘월하삼척’, ‘웰빙맛짱’, ‘은미에스’, ‘은천백다다기’, ‘일동청장’, ‘정선삼척’, ‘젤루존백침’, ‘중복삼척’, ‘청록맛짱’, ‘청화흑진주’, ‘통일백다다기’, ‘하늘백다다기’, ‘한성백다다기’, ‘호동청장’, ‘흑룡삼척’)들의 뿌리혹선충병 저항성 대해 검정하였다.

식물체 생육

오이 종자를 5×8 육묘용 연결포트(70 ml/pot, 범농사)에 원예용상토 쭉쭉이(농우바이오)를 채워 넣고 파종하여 유리온실(25 ± 5°C)에서 21일 동안 재배하였다. 21일 재배한 이후 육묘용 오이를 원예용 상토(쭉쭉이, 농우바이오)와 멸균 모래가 혼합(1:1 v/v)된 플라스틱 포트(직경 9.0 cm, 높이 8.0 cm)에 이식하여 7일이 지난 이후에 접종원을 접종하였고 유리온실(25 ± 5°C)에서 45일간 재배하였다. 유리온실(25 ± 5°C)에서 생육시기와 이식시기 조건에 따른 실험을 위해 오이의 이식 및 접종시기를 동일하게 하고 파종 이후 2주, 3주, 4주 동안 재배한 것과 9일 전, 3일 전, 접종 직전에 이식한 식물체를 사용하였다.

뿌리혹선충 증식

오이 품종의 저항성을 검정하기 위해 사용된 뿌리혹선충 (*Meloidogyne incognita*)은 유리온실에서 서광 품종의 토마토 유묘를 이용해서 증식하였다. 원예용 상토(쭉쭉이, 부농)와 멸균된 모래의 비율(v/v)이 1:1인 혼합 상토가 들어있는 플라스틱 포트(직경 10.0 cm, 높이 9.0 cm)에 파종한지 21일된 토마토(‘서광’, 몬산토코리아) 유묘를 이식하여 7일이 지난 이후에 접종하였고 45 - 60일 동안 뿌리혹이 형성 되도록 관리하였다. 증식 실험에 이용된 접종원은 뿌리혹선충 알을 포기당 10,000개를 이용하였다.

접종원 준비

뿌리혹선충에 대한 뿌리 혹 지수(Gall index)가 높은 증식용 토마토의 뿌리를 수거하여 뿌리혹선충 알을 분리하기 위해 개량된 sodium hypochlorite 방법(Barker 등, 1985)을 사용하였다. 알 분리 방법으로 깨끗이 씻은 뿌리를 1 cm 이하 간격으로 잘라서 250 ml 의 0.5% sodium hypochlorite 용액이 들어있는 분쇄기에 넣고 90초간 고속 회전시켰다. 그리고 혼합 용액을 0.065 mm 체에 걸러 뿌리 찌꺼기와 같은 잔여물을 걸러내고 그것을 통과한 알들은 0.025

mm 체에 수집하여 잔존하는 sodium hypochlorite 성분이 없어지게 수돗물로 충분히 씻어 준다. 이렇게 수집된 뿌리혹선충 알의 농도는 실체현미경을 통해 측정하였고 접종원 농도에 따른 조건 실험을 제외한 모든 실험에서 접종 농도가 포기당 알 5000개가 되도록 멸균수로 희석하여 접종원으로 사용하였다.

접종 및 저항성 검정

오이 품종별 유묘가 이식 되어 있는 원예용상토와 멸균모래가 혼합된(1:1 v/v)포트(직경 9.0 cm, 높이 8.0 cm)에 포기당 뿌리혹선충 알 5000개의 농도로 3 cm 깊이에 접종하였고 접종원 농도에 따른 실험조건에서는 뿌리혹선충 알의 접종농도(500개, 1000개, 5000개, 10000개, 30000개)에 따라 조정하여 실험하였다. 접종한 유묘는 유리온실(25 ± 5°C)에서 관행으로 수분관리를 하면서 재배하였다. 접종 45일 후에 오이 품종들의 뿌리를 수거해 흙을 제거하고 물로 씻은 후에 뿌리에 발생한 난낭수(Egg mass)와 뿌리 혹 지수(Gall index)를 조사하였다. 난낭수 조사는 접종원 접종 이후 뿌리혹선충의 감염에 의해 난낭이 형성된 오이 뿌리를 Erioglaucine disodium 용액(15 mg/l)에 30분간 침지하여 염색한 후 조사하였다(Umesh 등, 1994).

저항성 판정은 뿌리혹선충의 감염으로 뿌리에 형성된 난낭수가 가장 많은 품종과 비교하여 난낭수가 10% 이하이면 저항성(R), 11~25% 사이면 중간 저항성(M), 26% 이상이면 감수성(S)으로 판정하였고 뿌리에 혹이 생긴 정도에 따라 혹 지수(0=0%, 1=10%, 2=20%, 3=30%, 4=40%, 5=50%, 6=60%, 7=70%, 8=80%, 9=90%, 10=100%)를 조사하였다(Bridge과 Page, 1980; Fassuliotis, 1985; Taylor과 Sasser, 1978). 모든 실험은 3반복으로 2회 실시하였으며, 통계 분석은 SAS(SAS Institute, Inc., 1989, Cary, NC) 프로그램을 이용하여 ANOVA 분석을 하였으며, 처리 평균간 비교를 위하여 Duncan's multiple range test (P=0.05)를 실시하였다.

다. 결과 및 고찰

뿌리혹선충병 저항성 검정의 접종원 농도에 따른 영향

온실에서 파종 후 21일 동안 재배되고 이식 후 7일간 배양한 4품종('드레곤삼척', '아시아 스트라이크', '네박자', '하늘백다다기') 유묘에 여러 가지 접종원 농도에 따른 뿌리혹선충 저항성의 영향을 알아보기 위하여 접종원인 뿌리혹선충 알의 다섯 가지(포기당 500개, 1000개, 5000개, 10000개, 30000개) 농도의 현탁액을 접종시켰다. 접종일로부터 45일 이후, 4종 오이 품종들의 뿌리 혹 및 난낭 형성은 모든 품종에서 접종원의 농도가 증가함에 따라 뿌리혹선충 감염으로 증가하였다. 특히, 접종원 농도 500개와 1000개의 접종구에서 접종된 4개 품종들은 접종원 농도 증가에 따른 뿌리혹선충병 발병도가 미미하였던 반면에 접종원 농도 5000개, 10000개 및 30000개 접종구의 경우는 농도 증가에 의존적으로 뿌리 혹 및 난낭의 형성이 증가됨을 알 수 있었고 5000개 이상의 농도에서 뿌리 혹 및 난낭의 수가 거의 일정하게 나타남을 확인 할 수 있었다. 따라서 오이품종들의 뿌리혹선충병 검정에 있어 접종원 농도에서의 뿌리혹선충병 발병도 차이가 가장 큰 5000개 정도로 접종하는 것이 효과적임을 알 수 있었다(Table 1).

Table 1. Root-knot nematode severity of four cucumber cultivars according to inoculum concentration of *Meloidogyne incognita*.

Cultivar	Inoculum concentration (the number of eggs)				
	500	1,000	5,000	10,000	30,000
Dragonsamchuk	17 ± 2.1 ^y d ^x (0.7 ± 0.2 ^w d ^x)	51 ± 5.3c (1.8 ± 0.2c)	123 ± 5.7b (6.0 ± 0.0b)	137 ± 6.5ab (8.7 ± 0.2a)	145 ± 7.1a (8.7 ± 0.2a)
Asiastrike	13 ± 1.2b (0.5 ± 0.0c)	26 ± 3.3b (1.2 ± 0.2c)	110 ± 2.5a (6.0 ± 0.8b)	123 ± 11.1a (8.7 ± 0.5a)	122 ± 3.1a (9.3 ± 0.2a)
Nebakja	19 ± 2.1c (0.5 ± 0.0c)	53 ± 3.9b (1.3 ± 0.2c)	124 ± 5.0a (6.5 ± 0.4b)	130 ± 8.7a (8.2 ± 0.6a)	137 ± 7.4a (8.5 ± 0.4a)
Hanelbakdadaki	15 ± 4.3c (0.7 ± 0.2c)	50 ± 7.9b (0.8 ± 0.2c)	116 ± 7.0a (6.2 ± 0.6b)	126 ± 6.5a (7.5 ± 0.4ab)	132 ± 9.0a (8.2 ± 0.2a)
Mean	16 (0.6)	45 (1.3)	118 (6.2)	129 (8.3)	134 (8.7)

^zOne week after transplanting, the potted 28-day-old seedlings were inoculated with *M. incognita*. The inoculated plants were incubated in a greenhouse (25 ± 5 °C). Forty five days after inoculation, disease severity of the seedlings was rated on the number of egg masses and gall index of a scale 0 to 10.

^yThe number of egg masses/plant. Each value represents the mean ± standard deviation of two runs with three replicates each.

^xValues in the labeled with the same letter in each line are not significantly different in Duncan's multiple range test at P=0.05.

^wEach value represents the mean gall index ± standard deviation of two runs with three replicates each.

뿌리혹선충 저항성 검정에 오이의 생육조건(이식시기, 재배시기)이 미치는 영향

과종 후 21일 동안 재배된 4품종(‘드레곤삼척’, ‘아시아스트라이크’, ‘네박자’, ‘하늘백다다기’) 오이의 생육조건에 따른 뿌리혹선충병 저항성 정도를 알아보았다. 온실에서 4품종을 과종한 후 오이 뿌리의 발근 및 활착에 따른 뿌리혹선충병 발생 정도를 알아보기 위해 품종들의 이식시기별로 접종 9일전, 3일전, 접종직전과 생육시기에 따라 14일, 21일, 28일 동안 재배한 오이 유묘의 이식 및 접종을 통해서 45일 후에 병 조사하였다. 그 결과 재배시기 및 이식시기의 생육 조건에 관계없이 뿌리혹선충의 감염으로 4품종간 유사하게 증가된 뿌리 혹과 난낭을 볼 수 있었다(Table 2, 3). 결론적으로, 앞서의 접종원의 접종 농도와 두가지 생육조건에서의 결과를 바탕으로 뿌리혹선충의 기주에 대한 감염과 뿌리혹선충병 발생 정도에 따른 저항성을 검정하기 위해서는 온실(25 ± 5°C)에서 과종한 오이 품종을 21일 동안 재배하고 이식한 다음 7일간 배양 후 5000개의 뿌리혹선충 알 접종으로 45일 동안 온실 재배 이후에 조사하는 것이 일반적인 것으로 생각되었다.

Table 2. Root-knot nematode severity of four cucumber cultivars according to growth stage of plant^z.

Cucumber cultivar	Growth stage of plants (days after sowing)		
	14	21	28
Dragonsamchuk	119 ± 8.2 ^y a ^x (8.8± 0.6 ^w a ^x)	133 ± 7.0a (8.7 ± 0.5a)	114 ± 7.1a (8.8 ± 0.2a)
Asiastrike	105 ± 5.2a (8.5 ± 0.4a)	106 ± 11.0a (9.2 ± 0.2a)	92 ± 4.1a (9.2 ± 0.2a)
Nebakja	138 ± 5.3a (9.2 ± 0.2a)	131 ± 5.4a (9.0 ± 0.4a)	132 ± 8.6a (9.2 ± 0.5a)
Hanelbakdadaki	117 ± 14.2a (8.7 ± 0.5a)	117 ± 7.8a (8.2 ± 0.2a)	125 ± 5.7a (8.7 ± 0.2a)
Mean	120 (8.8)	122 (8.8)	116 (9.0)

^zOne week after transplanting, the potted seedlings were inoculated with *Meloidogyne incognita*. The inoculated plants were incubated in a greenhouse (25 ± 5 °C). Forty five days after inoculation, disease severity of the seedlings was rated on the number of egg masses and gall index of a scale 0 to 10.

^yThe number of egg masses/plant. Each value represents the mean ± standard deviation of two runs with three replicates each.

^xValues in the labeled with the same letter in each line are not significantly different in Duncan's multiple range test at P = 0.05.

^wEach value represents the mean gall index ± standard deviation of two runs with three replicates each.

Table 3. Root-knot nematode severity of four cucumber cultivars according to days after transplant of seedlings to inoculation of *Meloidogyne incognita*^z.

Cucumber cultivar	Days after transplanting		
	0 day	3 day	9 day
Dragonsamchuk	120 ± 9.5 ^y a ^x (7.7 ^w ± 0.5a ^x)	115 ± 10.2ab (7.0 ± 0.8a)	109 ± 9.9b (8.8 ± 0.2a)
Asiastrike	79 ± 6.0a (8.0 ± 0.4a)	88 ± 4.2a (8.7 ± 0.5a)	79 ± 7.9a (8.3 ± 0.5a)
Nebakja	105 ± 25.7a (7.5 ± 0.7a)	116 ± 11.8a (7.3 ± 0.5a)	119 ± 12.5a (7.2 ± 0.2a)
Hanelbakdadaki	108 ± 4.5a (8.0 ± 0.8a)	110 ± 13.1a (7.3 ± 0.2a)	103 ± 8.7a (7.5 ± 0.4a)
Mean	103 (7.8)	107 (7.6)	103 (8.0)

^zOne, three, and nine days after transplanting, the potted 28-day-old seedlings were inoculated with *M. incognita*, respectively. The inoculated plants were incubated in a greenhouse (25 ± 5 °C). Forty five days after inoculation, disease severity of the seedlings was rated on the number of egg masses and gall index of a scale 0 to 10.

^yThe number of egg masses/plant. Each value represents the mean ± standard deviation of two runs with three replicates each.

^xValues in the labeled with the same letter in each line are not significantly different in Duncan's multiple range test at P = 0.05.

^wEach value represents the mean gall index ± standard deviation of two runs with three replicates each.

replicates each.

일정 조건에서 시판중인 오이 품종들의 저항성 검정

시판 중인 오이 45개 품종의 뿌리혹선충병에 대한 저항성 정도를 앞서의 적합한 실험 조건을 바탕으로 오이 뿌리에 형성된 난낭수와 혹 지수를 조사하여 품종간 차이를 조사하였다. 그 결과 100개 이상의 난낭수를 나타내는 대다수의 오이 품종과는 달리 대목 품종인 ‘눈부서’, ‘슈퍼혹종’, ‘유니온’의 난낭수는 각각 50개, 55개, 24개로 다소 낮은 발병도를 보여 주었고 난낭수가 가장 많은 품종(‘러스보이’)과의 비교를 통한 저항성 판정으로 ‘유니온’ 대목 품종이 중간 저항성임을 확인하였다. 그 외의 품종들은 저항성 판정법으로 품종간에 저항성과 감수성 정도의 차이가 없는 감수성 반응을 나타내었고 여러 종자회사에서 판매되고 있는 오이 품종 간에 뿌리혹선충 발생이 거의 차이가 없었다(Table 4).

오이의 뿌리혹선충병 발생에 관해서 Kim 등(2012)에 의한 21품종의 *M. incognita*에 대한 뿌리혹선충병 저항성 검정을 통해 유묘 접종 45일 후 백침계오이인 ‘백봉다다기’가 중도저항성을 나타낸다는 연구결과로 박과작물에 있어서 뿌리혹선충병에 대한 검정법 확립을 위한 연구가 점차 진행되고 있지만, 뿌리혹선충과 같은 연작에 의한 토양전염성 병해충의 피해를 줄이기 위해 가장 환경 친화적인 방법으로 인식되고 있는 육종단계에서의 저항성 품종과 저항성 대목의 개발을 포함한 유기재배와 관련된 연구가 여전히 미흡한 실정이다. 따라서 뿌리혹선충의 종에 의한 저항성 차이를 알기 위함과 오이 품종에 따른 저항성 및 감수성 정도의 지속적인 변화에 대응하기 위해서는 체계적이고 효율적인 저항성 검정 방법이 필수적으로 요구된다.

Table 4. Root-rot nematode severity of forty-five commercial cucumber cultivars to *Meloidogyne incognita*.

Cucumber cultivar	No. of egg mass	Resistance reaction ^y
Gyedaebaekgwa	112 ± 9.6 ^w (9.5±0.0 ^v)	S
Septembersemigreen	114 ± 5.8 (8.0 ± 0.4)	S
Glorysamcheok	113 ± 9.0 (8.2 ± 0.2)	S
Nakdongcheongjang	120 ± 12.4 (8.3 ± 0.5)	S
Nebakja	120 ± 8.0 (8.5 ± 1.1)	S
Nodajibaekdadagi	119 ± 8.0 (8.7 ± 0.2)	S
Nokyacheongcheong	118 ± 6.6 (8.5 ± 0.0)	S
Daesun	102 ± 7.4 (8.3 ± 0.2)	S
Dragonsamcheok	105 ± 12.0 (7.8 ± 0.6)	S
Russboy	140 ± 6.8 (9.3 ± 0.2)	S
Mujinjang	120 ± 4.1 (8.7 ± 0.2)	S
Minisayeop	134 ± 4.9 (8.7 ± 0.2)	S
Minicue	102 ± 8.2 (9.0 ± 0.0)	S
Miinbaekdadagi	114 ± 5.1 (8.0 ± 0.4)	S
Baekmibaekdadagi	123 ± 3.9 (8.0 ± 0.4)	S
Baekchimjatjang	112 ± 5.3 (7.8 ± 0.2)	S
Sinsedae	128 ± 7.4 (8.7 ± 0.2)	S
Sinjeongpum	93 ± 8.5 (7.7 ± 0.6)	S

Singsingbaekdadagi	129 ± 4.8 (8.8 ± 0.2)	S
Asianogak	106 ± 16.0 (8.2 ± 0.2)	S
Asiastrike	105 ± 9.3 (8.0 ± 0.4)	S
Asiaeuncheon	109 ± 16.2 (8.2 ± 0.2)	S
Asiacheongjang	132 ± 7.8 (9.2 ± 0.2)	S
Ohdaebaekdadagi	102 ± 3.7 (8.2 ± 0.2)	S
Wolhasamcheok	137 ± 6.6 (9.2 ± 0.2)	S
Wellbeingmatjjang	124 ± 15.5 (8.2 ± 1.2)	S
EunmiS	85 ± 10.3 (7.5 ± 0.7)	S
Unchunbaekdadagi	119 ± 5.9 (8.2 ± 0.2)	S
Ildongcheongjang	104 ± 24.6 (8.3 ± 0.5)	S
Jungsunsamcheok	117 ± 5.4 (8.7 ± 0.2)	S
Jellujonbaekchim	100 ± 10.5 (8.5 ± 0.4)	S
Jungboksamcheok	100 ± 9.3 (7.5 ± 0.2)	S
Cheongnokmatjjang	112 ± 3.9 (8.0 ± 0.4)	S
Cheonghwaheukjinju	137 ± 8.7 (8.8 ± 0.2)	S
Tongilbaekdadagi	125 ± 7.5 (8.3 ± 0.2)	S
Haneulbaekdadagi	112 ± 6.5 (8.0 ± 0.4)	S
Hansungbaekdadagi	113 ± 5.8 (8.3 ± 0.2)	S
Hodongcheongjang	113 ± 10.9 (8.8 ± 0.2)	S
Heukryongsamcheok	105 ± 26.0 (7.7 ± 1.3)	S
Nunbusher (Root-Stock)	50 ± 15.0 (4.3 ± 0.8)	S
Newtype (Root-Stock)	73 ± 7.0 (4.7 ± 0.2)	S
Support (Root-Stock)	65 ± 4.8 (5.0 ± 0.4)	S
Superheukjong (Root-Stock)	55 ± 9.2 (3.7 ± 0.5)	S
Union (Root-Stock)	24 ± 3.4 (2.2 ± 0.6)	MR
TsuyakaEX (Root-Stock)	96 ± 6.4 (6.3 ± 0.2)	S

^zOne week after transplanting, the potted 28-day-old seedlings were inoculated with *M. incognita*. The inoculated plants were incubated in a greenhouse (25 ± 5 °C). Forty five days after inoculation, disease severity of the seedlings was rated on the number of egg masses and gall index of a scale 0 to 10.

^yResistance reaction of cucumber cultivar was determined by the number of egg masses per plant. R, resistant, 0-10; MR, moderately resistant, 10-30; S, susceptible, more than 31.

^wThe number of egg masses/plant. Each value represents the mean ± standard deviation of two runs with three replicates each.

^vEach value represents the mean gall index ± standard deviation of two runs with three replicates each.

제 5절. 분자마커 병리검정 체계 확립

1. 기개발 분자마커 분석 기술의 확립

분자마커 분석 기술을 확립하기 위하여 이미 개발이 완료되어 출판된 논문에 기술된 정보와 본 연구진의 연구 성과를 기초로 병 저항성 분자마커 분석 시스템을 확립했다. 기개발된 대부분의 분자마커는 Gel-based 분자마커로 자동화된 분석에 부적합한 면이 있기 때문에 자동화된 분석이 가능한 real time 기반 분자마커로 전환하였다. 이렇게 정립된 분자마커는 분리집단이나 저항성/이병성 품종의 *in vivo* 병리 검정 결과와 비교하여 검증했다.

가. 가지과(고추, 토마토, 감자) 병 저항성 분자마커 기술 확립

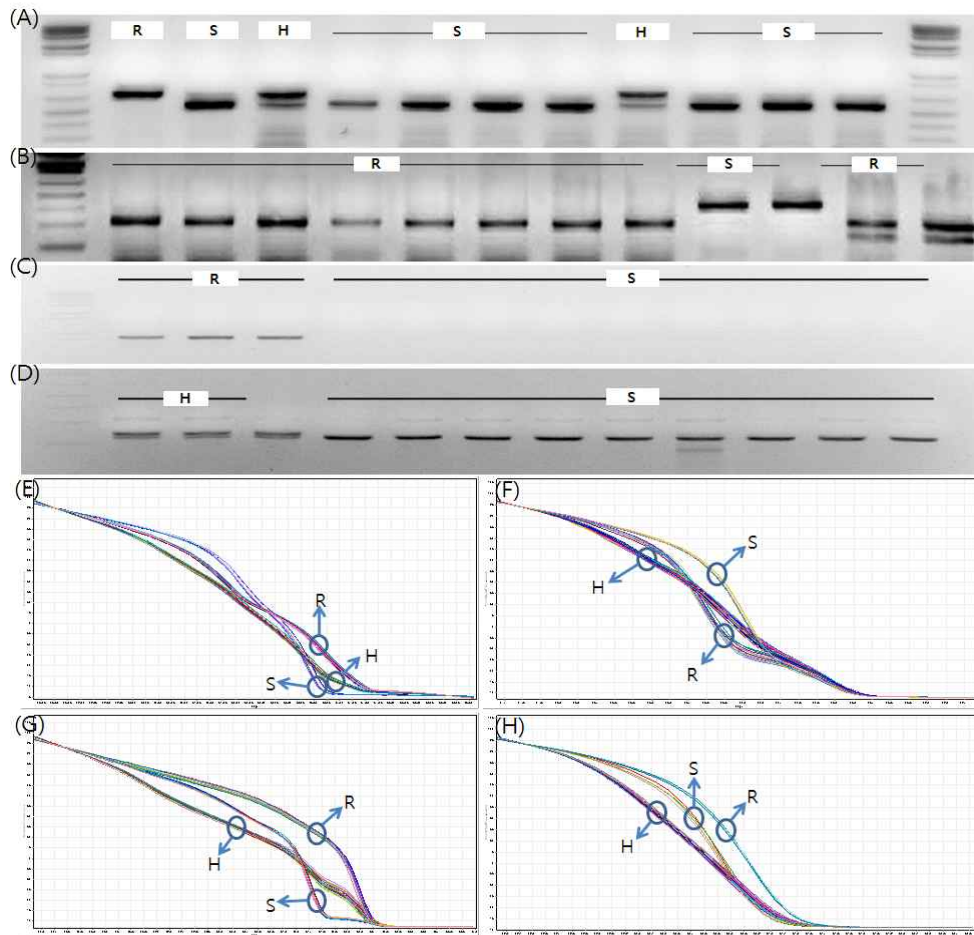
(1) 고추, 토마토 바이러스 병 저항성 분자마커 개발(제 1차년도)

제 1차년도에는 고추에서 국내에서 피해가 심각하거나 점차 피해가 확대되고 있어 중요한 육종 목표가 되고 있는 바이러스인 *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), *Potyvirus*, *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Cucumber mosaic virus* (CMV)와 세균성 점무늬병 저항성을 대상으로 하였으며(Tomita et al. 2008), 분자마커 분석이 용이한 PCR-based marker인 CAPS, SCAR, HRM 분자마커 분석 기술을 이용했다(Table 1, Fig. 1).

바이러스 병인 PMMoV, Potyvirus, TSWV, CMV, 세균 병은 세균성 점무늬병을 대상으로 분자마커 분석 기술을 확립했다. PMMoV 병 저항성 분석에 사용하는 분자마커는 189D23M, 087H3T7HRM이다. 이 가운데 189D23M이 087H3T7HRM보다 해리곡선의 차이를 구별하기 용이했다. CMV 병 저항성 분석에 사용하는 분자마커는 240H02SP6, CaTm-int3HRM marker를 사용하는데 240H02SP6가 보다 해리곡선의 차이를 구별하기 용이했다. Potyvirus 병 저항성 분석은 Pvr1-S를 사용하여, TSWV 병 저항성 분석은 SCAR568을 사용하여 CAPS 분자마커 분석 기술을 확립했다. 세균성 점무늬병은 S2, S45를 이용해 SCAR 분자마커 분석 기술을 확립했다(Fig. 2).

<Table 1> 1차년도에 확립한 고추 병 저항성 분자마커 기술

병	분자마커	분자마커 종류	유전적 거리
PMMoV	189D23M, 087H3T7	HRM	0.5 cM, 1 cM
CMV	CaTm-int3HRM, 240H02SP6	HRM	1.5 cM
Potyvirus	Pvr1-S	CAPS	0 (유전자)
TSWV	SCAR568	CAPS	1 cM
세균성 점무늬병	S45, S2	SCAR	0.5 cM, 2 cM



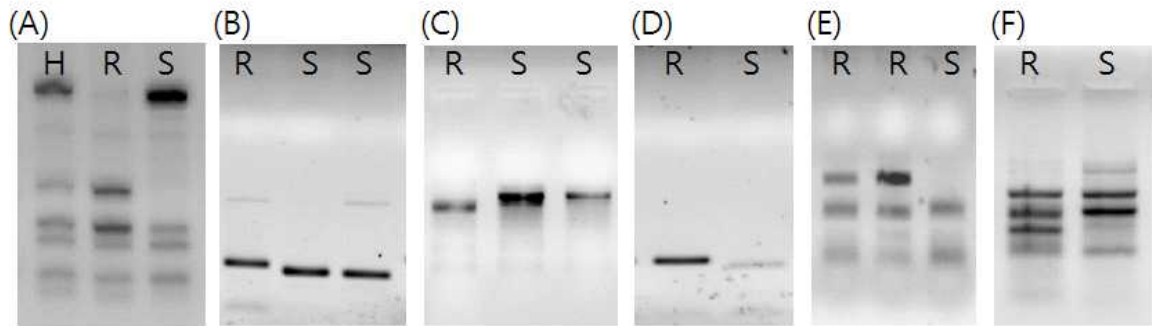
<Fig. 1> 고추 병 저항성 분자마커 분석 기술 확립
 (A)Pvr1-S (B)SCAR568 (C)S45 (D)S2 (E)189D23M (F)187H3T7
 (G)240H02SP6 (H)CaTm-itr3HRM (R:homozygous resistance H:heterozygous,
 S:homozygous susceptible)

토마토에서는 논문에 보고된 정보를 바탕으로 저항성, 이병성 품종의 gDNA를 이용해 다형성을 검정했다(Table 2). 잎 곰팡이병, 흰가루병은 알려진 이병성 품종이 없어 Glamor A, VFN 8을 이병성 대조군으로 사용했다. 확보한 병 저항성 품종에 따라 ToMV, TSWV, 잎 곰팡이병(*CLD*), 근부위조병, 시들음병(*F-1*, *F-2*), 반신위조병, 흰가루병, (고구마)선충뿌리혹병 총 9가지 병 저항성 분자마커를 이용해 다형성이 있는지 검정했다.

총 9가지 병 저항성 분자마커를 저항성 품종에 검정했다. 이 가운데 3 종류의 병 저항성 분자마커는 저항성 품종과 이병성 품종 사이에 다형성을 찾지 못했지만, 나머지 6 종류의 병 저항성 분자마커로는 뚜렷한 다형성을 찾았다. 바이러스 병인 TSWV, TYLCV, ToMV, 곰팡이 병인 반신위조병, 시들음병, 선충 병인 (고구마)선충뿌리혹병을 대상으로 분자마커 분석 기술을 확립했다. TSWV 병 저항성 분석에는 SW5-YP2 분자마커를 사용했고, ToMV 병 저항성 분석에는 SW5-YP2 분자마커를, TYLCV 병 저항성 분석에는 Ty-seminis 분자마커를 사용했다. 반신위조병 저항성 분석에는 Ve-4 분자마커, 시들음병 저항성 분석에는 I3-2 분자마커, (고구마)선충뿌리혹병에는 REX-SAI 분자마커를 사용했다(Fig. 2).

<Table 2> 1차년도에 사용한 품종 재료의 병 저항성 및 이병성 정보

품종명	저항성	이병성
Poseidon	ToMV, 잎 곰팡이병(<i>CD</i>), 근부위조병, 시들음병(<i>F-1</i> , <i>F-2</i>), 반신위조병, (고구마)선충뿌리혹병,	
Captiva	시들음병(<i>F-3</i>)	
Glamor A		시들음병(<i>F-1</i> , <i>F-2</i> , <i>F-3</i>), 반신위조병, (고구마)선충뿌리혹병
Stevens	TSWV	
Gardel	ToMV, 잎 곰팡이병(<i>CD</i>), 근부위조병, 시들음병(<i>F-1</i> , <i>F-2</i>), 반신위조병, TYLCV (<i>Ty-1</i>)	
Laurica	흰가루병 (<i>Leveillula</i>)	
VFN 8		근부위조병, ToMV



<Fig. 2> 토마토 병 저항성 분자마커 분석 기술 확립

(A) I2-YP1 (B)SW5-YP2 (C)Ty-seminis (D)Ve4 (E)Y3 (F)REX-SAI (R:homozygous resistance H:heterozugous, S:homozygous susceptible)

(2) 고추, 토마토 바이러스 병 저항성 분자마커 개발(제 2차년도)

2차년도에는 고추의 PMMoV 저항성 분자마커를 2개 이상 추가 확립했다. 새로 추가한 분자마커 분석 기술은 HRM 방법을 이용했다. 또한 1차년도에 확립한 ToMV, TYLCV, TSWV, Verticilium wilt, Fusarium wilt, root not nematode와 같은 6가지 병 저항성 연관 분자마커를 real-time based 분자마커로 전환하였다.

고추의 PMMoV 병 저항성을 분석하기 위하여 L4segF&R, LARP-3 이렇게 2가지 추가적인 분자마커 분석 기술을 확립했다. 고추의 PMMoV 저항성은 *L* 유전자좌에 의해 유전된다. 이 *L* 유전자좌는 크게 *L1*, *L2*, *L3*, *L4* 4가지의 대립 유전자로 이루어져 있는데, 이 중 *L4* 대립유전자는 가장 넓은 저항성 스펙트럼을 갖고 있어 병 저항성 육종에는 매우 매력적인 대립 유전자이다. L4segF&R 분자마커는 *L4*를 특이적으로 선발할 수 있어 매우 유용하다. LARP-3 분자마커는 *L1*, *L2*, *L3*, *L4*를 구별할 수 있는 HRM 분자마커로 육종 소재의 평가나 유전자원의 평가에 매우 유용하다(Yang et al. 2012). 토마토 병 저항성 분자마커는 6 종류의 병 저항성 분자마커 가운데 4 종류의 병 저항성 분자마커를 real-time based HRM 분자마커로 전환하였다. 2차년도에는 6개의 새로운 분자마커 분석 기술을 추가하여 총 20종류의 병 저항성 분자마커 분석 기술을 확립했다(Table 3).

<Table 3> 확립한 가지과 병 저항성 분자마커 기술

작물	병	분자마커	분자마커 종류	유전적 거리	비고
고추	PMMoV	189D23M	HRM	1cM	1차년도
		087H03T7	HRM	1.5cM	1차년도
		L4segF&R	HRM	0.5cM	2차년도
		L4RP-3	HRM	0.5cM	2차년도
	CMV	CaTm-int3HRM	HRM	1.5cM	1차년도
		240H02SP6	HRM	1.5cM	1차년도
	Potyvirus	Pvr1-S	CAPS	0 (유전자)	1차년도
		Pvr1-S1R	HRM	0 (유전자)	1차년도
	TSWV	SCAC568	CAPS	1cM	1차년도
		HRM SCAC568	HRM	1cM	1차년도
세균성 점무늬병	S45	SCAR	0.5cM,	1차년도	
	S2	SCAR	2cM	1차년도	
토마토	ToMV	Y3	CAPS	0.1cM	1차년도
		HRM ToMV	HRM	0.1cM	2차년도
	TYLCV (<i>Ty-1</i>)	Ty-seminis	CAPS	-	1차년도
		HRM TYLCV(<i>Ty-1</i>)	HRM	-	2차년도
	TSWV	SW5-YP2	SCAR	0.1cM	1차년도
	Verticilium wilt	Ve	SCAR	0.6cM	1차년도
	Fusarium wilt	I3-2	CAPS	유전자	1차년도
		HRM Fusarium	HRM	유전자	2차년도
	Root Knot nematode	REX-SAI	CAPS	-	1차년도
		HRM RK nematode	HRM	-	2차년도

(3) 고추, 토마토, 감자 바이러스 병 저항성 분자마커 개발(제 3차년도)

제 3차년도에는 새로 토마토의 *Tobacco mottle virus* (ToMV) 저항성 분자마커를 자체 개발했다. ToMV 저항성 유전자는 이미 동정되어 두 개의 저항성 대립유전자인 *Tm-2*와 *Tm-22*와 이병성 대립유전자인 *tm-2*의 염기서열이 공개되었다. 총 3개의 염기서열을 수집하고 비교하여 특이적인 SNP를 찾은 다음 분자마커를 개발했다.

감자갈쪽병은 감자의 덩이줄기 부위가 길고 가늘어지며 수확량을 감소되는 병으로 감자에서 가장 큰 피해를 입히는 병 중 하나이다. 이 병은 바이로이드인 Potato spindle tuber viroid (PSDvd)에 의해 발병되며 감염된 감자로부터 손이나 기구를 통해 전염되기 때문에 이 병주를 빠르게 제거해야 한다. 본 세부과제에서는 건전주로부터 이병주를 찾을 수 있도록 RT-PCR based kit를 이용해 PSDvd를 검출할 수 있는 분자마커 기술을 확립했다. 총 6 종류의 새로운 가지과 저항성 연관 분자마커 분석 기술/바이로이드 검출 기술을 추가하여 총 28가지 분석 기술을 확립했다(Table 4).

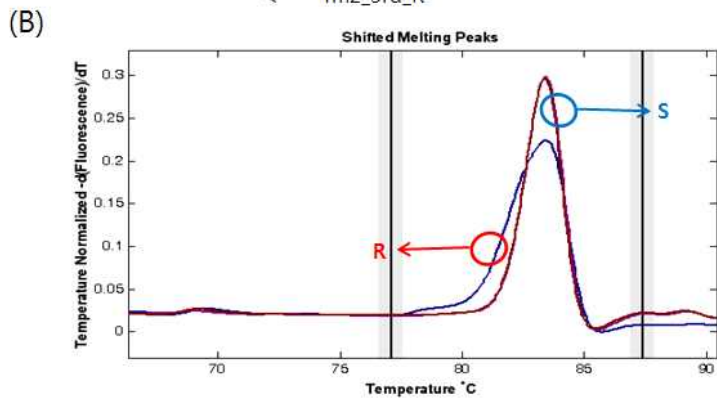
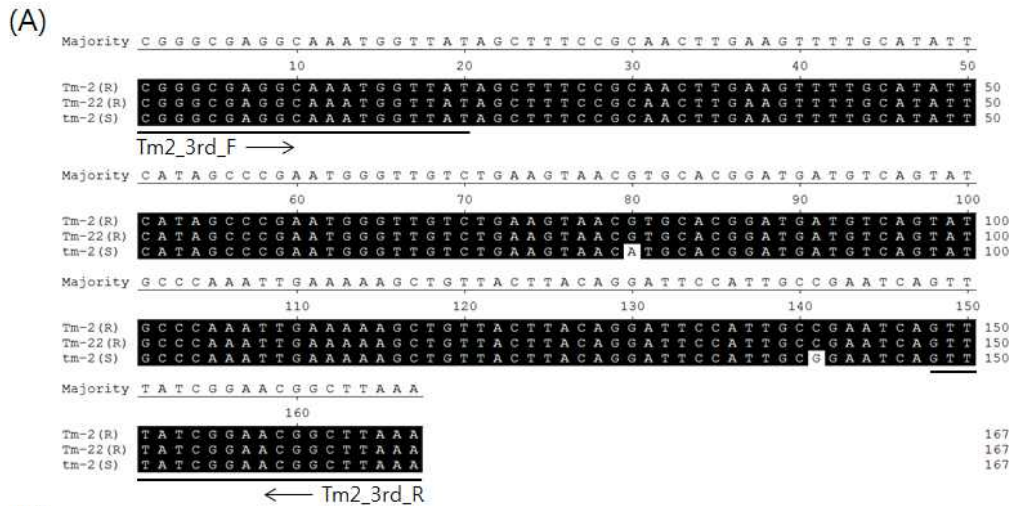
Genbank DB에서 토마토 ToMV 저항성 대립유전자인 *Tm-2*, *Tm-22*와 이병성 대립유전자인 *tm-2*의 염기서열인 AF536200.1, AF536199.1, AF536201.1를 각각 수집했다. 3 종류의 대립유전자 사이의 SNP를 탐색하기 위해 multiple alignment tool인 Megalign 프로그램을 사용했고, 이 가운데 SNP가 있는 DNA 염기서열을 target으로 총 3가지 primer set를 design했다. 3 가지의 primer set 가운데 한 개의 primer set인 Tm2_3rd는 저항성/이병성 계통 사이에 다

형성을 확인할 수 있었다(Fig. 3). Tm2_3rd는 2가지 저항성 대립유전자와 한 가지 이병성 대립 유전자를 구별할 수 있는 분자마커로 어떤 대립유전자의 저항성도 탐지할 수 있을 것으로 기대된다.

감자의 감자갈썩병을 일으키는 PSDvd를 검출하기 위하여 감자로부터 total RNA를 추출하여 PSDvd 특이적인 프라이머로 RT-PCR 하는 키트를 이용한 분석 기술을 확립했다. PSDvd에 감염된 이병주에서는 약 342bp 크기의 단일 밴드가 증폭되고, 건전주에서는 어떠한 밴드도 증폭되지 않았다(Fig. 4).

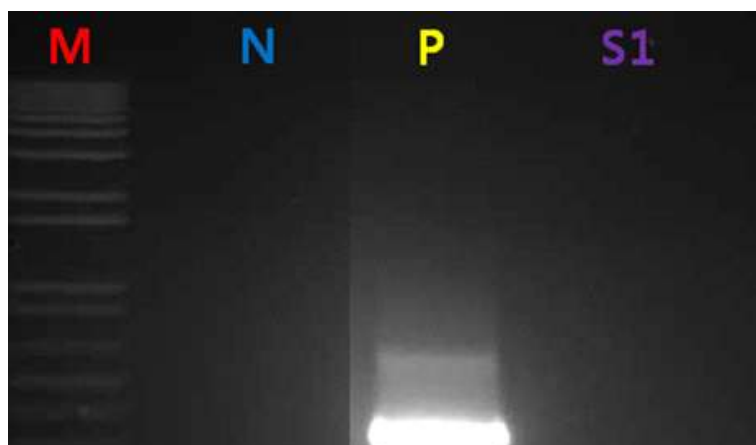
<Table 4> 3차년도에 확립한 가지과/배추과 병 저항성 분자마커 기술

작물	병	분자마커	분자마커 종류	유전적 거리	비고
고추	PMMoV	189D23M	HRM	1cM	1차년도
		087H03T7	HRM	1.5cM	1차년도
		L4segF&R	HRM	0.5cM	2차년도
		L4RP-3	HRM	0.5cM	2차년도
	CMV	CaTm-int3HRM	HRM	1.5cM	1차년도
		240H02SP6	HRM	1.5cM	1차년도
	Potyvirus	Pvr1-S	CAPS	0 (유전자)	1차년도
		Pvr1-S1R	HRM	0 (유전자)	1차년도
	TSWV	SCAC568	CAPS	1cM	1차년도
		HRM SCAC568	HRM	1cM	1차년도
		7399-6	HRM	0.7cM	3차년도
		9546-2	HRM	0.7cM	3차년도
	세균성 점무늬병	S45	SCAR	0.5cM,	1차년도
		S2	SCAR	2cM	1차년도
역병	PhytoSNP5	HRM	8cM	3차년도	
토마토	ToMV	Y3	CAPS	0.1cM	1차년도
		HRM ToMV	HRM	0.1cM	2차년도
		Tm2_3rd	HRM	유전자	3차년도
	TYLCV (<i>Ty-1</i>)	Ty-seminis	CAPS	-	1차년도
		HRM TYLCV(<i>Ty-1</i>)	HRM	-	2차년도
	TSWV	SW5-YP2	SCAR	0.1cM	1차년도
	Verticilium wilt	Ve	SCAR	0.6cM	1차년도
	Fusarium wilt	I3-2	CAPS	유전자	1차년도
		HRM Fusarium	HRM	유전자	2차년도
		gPTI	HRM	0.1cM	3차년도
	Root Knot nematode	REX-SAI	CAPS	-	1차년도
HRM RK nematode		HRM	-	2차년도	
배추	TuMV	trs_HRM	HRM	0cM	3차년도
감자	PSDvd	PSDvd 검출 키트	RT-PCR	-	3차년도



<Fig. 3> 토마토 ToMV 저항성 분자마커 Tm2_3rd 개발

(A) *Tm-2*, *Tm-2²*, *tm-2* 대립 유전자의 Tm2_3rd의 염기서열 비교했고, 80번, 141번째 염기에서 저항성 대립유전자와 이병성 대립유전자 특이적인 SNP를 대상으로 Tm2_3rd 분자마커를 개발했다. (B) Tm2_3rd 분자마커를 HRM 분석한 결과 저항성, 이병성 계통 사이의 다형성을 확인했다.



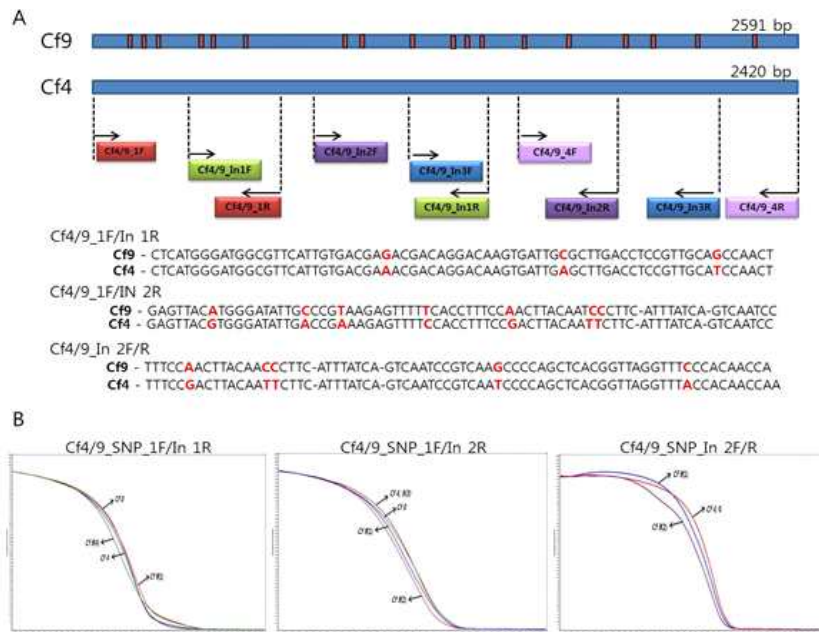
<Fig. 4> 감자잘쪽병 PSDvd 검출 RT-PCR 결과
M: DNA marker, N: Negative control, P: positive control,
S1-2: 감자 시료.

(4) 가지과, 배추과, 박과 병 저항성 분자마커 개발(제 4차년도)

(가) 가지과 병 저항성 분자마커 기술 확립(4차년도)

제 4차년도에는 새로 토마토의 잎곰팡이병(leaf mold) 저항성 분자마커를 자체 개발했다. 잎곰팡이 병 저항성 유전자인 *Cf4*, *Cf9*는 이미 동정되어 이병성 대립유전자인 *Cf0*의 염기서열과 함께 공개되어 있다. 이 3개의 유전자 염기서열을 이용하여 저항성 연관 분자마커를 개발했다.

Genebank DB에서 토마토 *Fusarium wilt* 저항성 대립유전자인 *Cf4*, *Cf9*와 이병성 대립유전자인 *Cf0*의 염기서열을 각각 수집했다. 3 종류의 대립유전자 사이의 SNP, Indel 또는 제한효소 인식 부분을 탐색하기 위해 multiple alignment tool인 Megaline 프로그램을 사용하여, 대립유전자간에 SNP와 Indel 부분을 포함한 DNA 염기서열을 target으로 총 12개의 primer set을 design했다. 12 조합의 primer set 가운데 Indel 부분을 target으로 한 5개의 primer set은 저항성/이병성 계통 사이에서 다형성을 확인 할 수 없었다. 나머지 7개의 primer set 중 3개의 조합(*cf4/9_SNP1F/In 1R*, *2R*와 *In 2F/2R*)에서 2가지 저항성(*Cf4*, *Cf9*)/이병성(*Cf0*) 계통 사이에서 다형성을 확인 할 수 있었다(Fig. 5). 개발된 3개의 분자마커를 이용하여 다양한 토마토 품종에서 *Fusarium wilt* 저항성 품종을 선발하는데 이용될 것으로 기대된다.



<Fig. 5> 토마토 Leaf mold 저항성 분자마커 cf4/9-SNP 1F/In 1R, cf4/9-SNP 1F/In 2R와 cf4/9-SNP In 2F/2R 개발

(A) *Cf4*, *Cf9*, *Cf0* 대립 유전자의 염기서열을 비교했고, 동일 염기서열 상에서 저항성 대립유전자와 이병성 대립유전자 특이적인 SNP를 대상으로 3개의 분자마커를 개발했다.

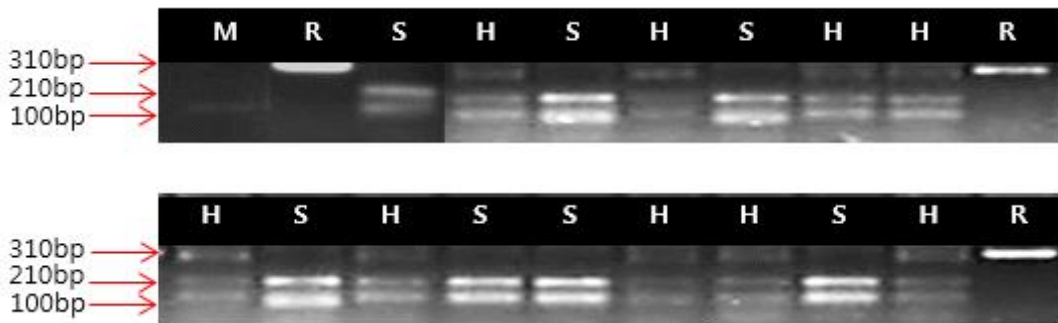
(B) Cf4/9-SNP 1F/In 1R, Cf4/9-SNP 1F/In 2R와 Cf4/9-SNP In 2F/2R 분자마커를 HRM 분석한 결과 저항성, 이병성 계통 사이에 다형성을 확인했다.

고추 흰가루병은 *Leveillula taurica* 병원체에 의해 발생하는 병으로 온난, 습윤 기후에서 모두 발생하고, 온실, 노지에서 모두 발병하는 등 환경 적응력이 뛰어나 전 세계 고추 생산단지에서는 모두 발병

하는 병이다. 흰가루병이 발병한 고추는 생산성이 떨어지고, 상품성도 떨어져 큰 피해를 불러 일으켜 문제가 되고 있지만, 국내에는 아직 강한 저항성을 가진 품종이 출시되지 않고 중간 저항성 고추 품종만이 출시되었다. 동아프리카에서 발견된 H3 고추가 흰가루병에 매우 강한 저항성을 가지고 있는 것으로 보고되고 있으며, H3를 이용한 흰가루병 유전 분석 결과 고추에서 흰가루병 저항성은 QTL에 의해 유전된다는 연구 결과가 보고되었다. 강한 저항성 고추 품종의 육성이 필요하지만 아직까지 육종에 실용적으로 활용할 수 있는 분자마커는 개발되지 않아, 실용적인 분자마커 분석 기술의 확립이 필요하다.

제 4차년도에는 농우바이오에서 출시된 중도 저항성 품종 PM신강을 자가교배하여 F₂ 분리집단을 작성했다. F₂ 집단을 이용하여 육종회사로부터 제공받은 분자마커로 유전형을 분석하고, 병리검정사업단에 집단을 제공하여 흰가루병 저항성을 *in vivo* 병리 검정으로 분석하고자 했다.

F₂ 종자 100립을 파종하여 gDNA를 추출하고, 육종회사로부터 제공받은 CAPS 분자마커 AHJ324를 이용하여 유전형을 분석했다(Fig. 6). 저항성 동형접합체는 310bp에 단일 밴드가 나타나고, 이병성 동형접합체는 100bp, 210bp 두 개 밴드가 나타나 다형성이 보였다. F₂ 집단에서는 유전형의 분리가 확인되었다. 또 다른 100개의 종자를 파종하여 병리검정사업단에 흰가루병 접종 실험을 의뢰했다. 그러나 기상 등 환경적인 영향으로 분리집단에서 흰가루병이 거의 발병하지 않아, 분자마커 유전형과 *in vivo* 저항성 표현형 사이의 상관관계를 분석하지 못했다. 총 13 종류의 새로운 가지과 저항성 연관 분자마커 분석 기술을 추가하여 총 42가지 분석 기술을 확립했다(Table 5).



<Fig. 6> PM신강 F₂ 분리집단의 AHJ324 분자마커 유전형 분석

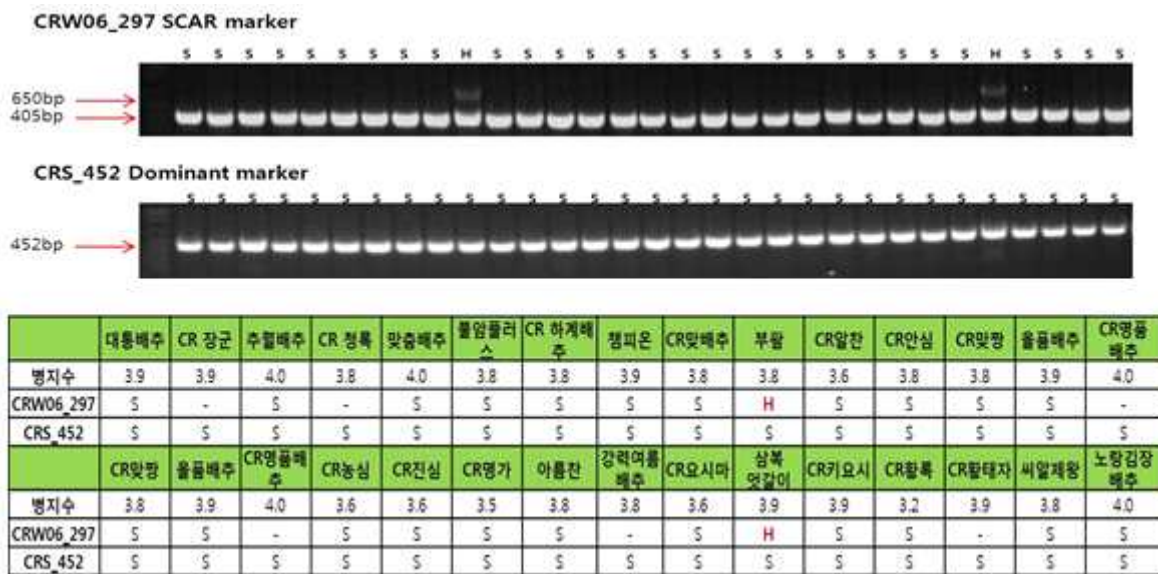
<Table 5> 4차년도 확립한 가지과/배추과 병 저항성 분자마커 기술

작물	병	분자마커	분자마커 종류	유전적 거리	비고
고추	PMMoV	189D23M	HRM	1cM	1차년도
		087H03T7	HRM	1.5cM	1차년도
		L4segF&R	HRM	0.5cM	2차년도
		L4RP-3	HRM	0.5cM	2차년도
	CMV	CaTm-int3HRM	HRM	1.5cM	1차년도
		240H02SP6	HRM	1.5cM	1차년도
	Potyvirus	Pvr1-S	CAPS	0 (유전자)	1차년도
		Pvr1-S1R	HRM	0 (유전자)	1차년도
	TSWV	SCAC568	CAPS	1cM	1차년도
		HRM SCAC568	HRM	1cM	1차년도
		7399-6	HRM	0.7cM	3차년도
		9546-2	HRM	0.7cM	3차년도
	세균성 점무늬병	S45	SCAR	0.5cM,	1차년도
		S2	SCAR	2cM	1차년도
역병	PhytoSNP5	HRM	8cM	3차년도	
흰가루병	AHJ324 F1 & R1	CAPS	-	4차년도	
토마토	ToMV	Y3	CAPS	0.1cM	1차년도
		HRM ToMV	HRM	0.1cM	2차년도
		Tm2_3rd	HRM	유전자	3차년도
	TYLCV (Ty-1)	Ty-seminis	CAPS	-	1차년도
		HRM TYLCV(Ty-1)	HRM	-	2차년도
	TSWV	SW5-YP2	SCAR	0.1cM	1차년도
		SW5-YP2	HRM	0.1cM	4차년도
	Verticilium wilt	Ve	SCAR	0.6cM	1차년도
	Fusarium wilt	I3-2	CAPS	유전자	1차년도
		HRM Fusarium	HRM	유전자	2차년도
		gPTI	HRM	0.1cM	3차년도
	Root Knot nematode	REX-SAI	CAPS	-	1차년도
		HRM RK nematode	HRM	-	2차년도
	Leaf mold	cf4/9_SNP 1F/In 1R	HRM	유전자	4차년도
		cf4/9_SNP 1F/In 2R	HRM	유전자	4차년도
		cf4/9_SNP In2F/ 2R	HRM	유전자	4차년도
배추	TuMV	trs_HRM	HRM	0cM	3차년도
	뿌리혹병	CRW06-297	SCAR	-	4차년도
		CRW-452	SCAR	-	4차년도
감자	PSDvd	PSDvd 검출 키트	RT-PCR	-	3차년도
멜론	흰가루병	PM1	SCAR	-	4차년도
		PM2	CAPS	4.2cM	4차년도
		PM3	CAPS	2.4cM	4차년도
		PM4	dCAPS	3.8cM	4차년도
		PM5	CAPS	-	4차년도
		PM6	SCAR	-	4차년도

(나) 배추과(배추) 병 저항성 분자마커 기술 확립(4차년도)

기존 연구를 통해 국내 배추 육종 및 생산 규모에 대해 피해가 확대되고 있는 배추 뿌리혹병을 대상으로 저항성 분자마커 분석 기술을 확립하기 위해 문헌 조사를 통해 개발된 배추 뿌리혹병(race 4) 병 저항성 분자마커 확보하였다. 분자마커를 이용하여 배추 품종에 배추 뿌리혹병(race 4) 저항성 검정을 수행하고, *in vivo* 병리검정 결과와 비교 분석하여 배추 뿌리혹병(race 4)에 대한 저항성 및 이병성 품종을 수집하고 분자마커 분석 기술을 확립하였다.

국내 연구를 통해 개발된 배추 뿌리혹병(race 4)에 대한 2개의 저항성 분자마커 CRW06_297, CRS_452를 확보하여 국내 시판되고 있는 30개의 배추 품종의 유전형을 분석하고, *in vivo* 병리검정 결과와 비교 분석했다. *in vivo* 병리 검정 결과 30개의 배추 시판종이 모두 3.8 이상의 병지수를 보여 뿌리혹병(race 4)에 이병성으로 분석되었다(Fig. 7). CRW06_297는 저항성 동형접합체 유전형에서 650 bp, 이병성 동형접합체 유전형에서 405 bp의 밴드가 증폭되는 분자마커로 28개의 품종은 이병성 동형접합체로, 2개의 품종은 이형접합체 유전형을 가진 것으로 분석되었다. CRS_452는 이병성 동형접합체에서 452 bp의 밴드가 증폭되는 분자마커로 30개의 품종 모두가 이병성 동형접합체 혹은 이형접합체 유전형을 가진 것으로 분석되었다. 이번 실험을 통해 2개의 분자마커로 분석한 유전형과 병 저항성이 비교적 일치하는 것을 확인할 수 있었지만, 저항성 대조군이 포함되지 않았기 때문에, race 4에 저항성이 배추 품종 및 계통의 DNA를 이용한 추가 분석이 필요하다.



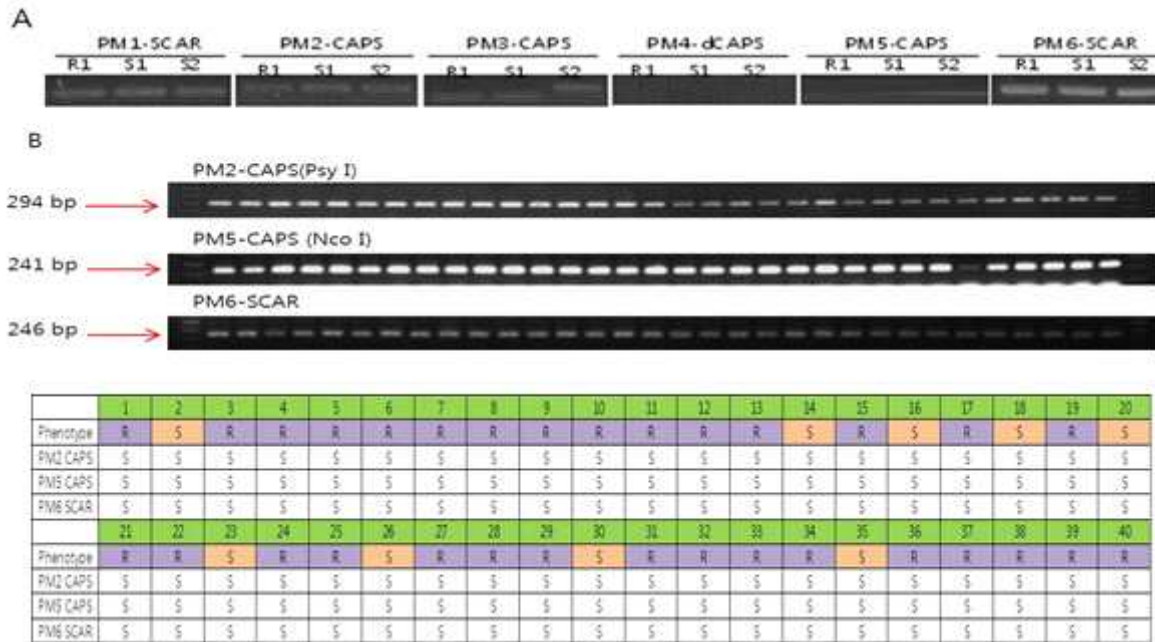
<Fig. 7> 배추 뿌리혹병 분자마커 분석 기술 확립

(다) 박과(멜론) 병 저항성 분자마커 기술 확립(4차년도)

국내에서 점차 피해가 확대 되고 있거나 중요한 육종 목표가 되는 멜론 흰가루병 저항성을 대상으로 관련 분자마커 분석 기술을 확립하기 위해 1차년도에 문헌 조사를 통해 확보된 개발된 멜론 흰가루병 저항성 분자마커를 이용하여 다수의 멜론 F2 집단에 적용해 보았다.

1차년도 선행 연구를 통해 확립된 멜론 흰가루병 분자마커의 실제적인 적용을 위해 멜론 품종의 F2 집단 40개체를 작성하여 *in vivo* 병리 검정을 수행하고 6개의 분자마커 PM1-SCAR, PM2-CAPS, PM3-CAPS, PM4-dCAPS, PM5-CAPS, PM6-SCAR로 유전형을 분

석하여 결과를 비교했다. 40개체로 구성된 F2 집단은 저항성 개체가 31, 이병성 개체가 9개로 3:1로 분리되어 흰가루병 저항성이 단일 우성 유전자에 의해 분리되는 것을 확인할 수 있었다 ($P=0.7153$). 6개의 분자마커로 40개체의 유전형을 분석한 결과 6개의 분자마커 모두 집단에서 다형성이 나타나지 않아 6개의 분자마커와 저항성 유전자 사이의 유전적 거리를 분석할 수 없었다(Fig. 8).



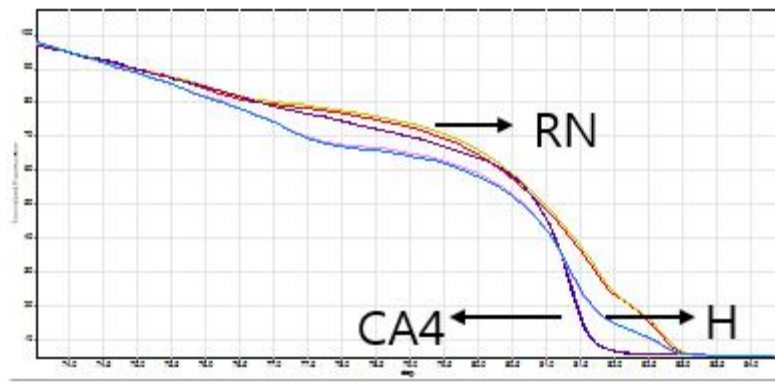
<Fig. 8> 멜론 흰가루병 분자마커 분석 기술 확립

(5) 가지과, 배추과, 박과 분자마커 개발(제 5차년도)

(가) 가지과 병 저항성 분자마커 기술 확립(5차년도)

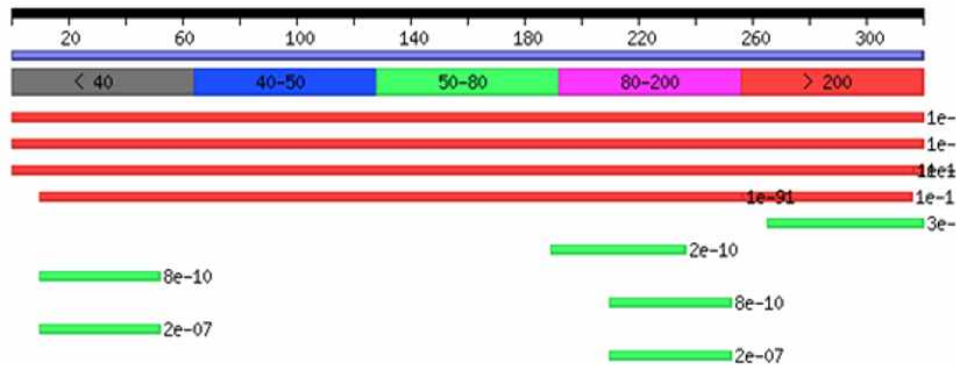
고추 흰가루 병에서 제 5차년도에는 육종회사로부터 제공받은 분자마커를 AC99 연관지도에 mapping하여 유전지역을 확인하고자 했고, 분자마커 서열을 분석하여 고추 전체 유전체 염기서열 DB 상에서의 물리적인 위치를 확인하고자 했다.

본 세부연구기관은 자체적인 고추 유전체 지도 AC99을 보유하고 있으며, AHJ324 분자마커의 유전적인 위치를 분석하기 위하여 AHJ324 CAPS 분자마커를 분석한 결과 다형성이 나타나지 않았다. 그러나 HRM으로 분석한 결과 AC99 집단에서 다형성이 나타났고, 이를 이용하여 AC99 집단의 개체 별로 유전형을 분석했다(Fig. 9). 유전형 결과를 바탕으로 유전자 지도를 분석한 결과, AHJ324 분자마커는 기존의 어떠한 연관군(linkage group)과도 연관되지 않았고, 따라서 AHJ324 분자마커의 유전지역을 확정짓지 못했다.



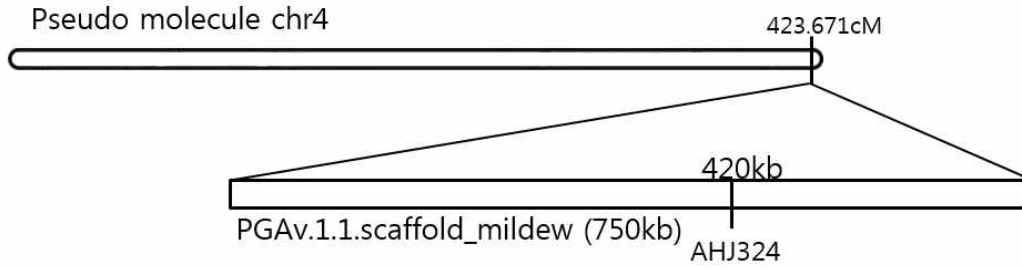
<Fig. 9> AC99 집단에서 AHJ324 HRM 분자마커 분석

본 사업단의 세부과제 책임자인 최도일 교수님의 고추 전체 유전체 염기서열(WGS)을 이용하여 AHJ324 분자마커의 물리적인 위치를 찾고자 했다. AHJ324 분자마커의 염기서열을 분석하고, 고추 WGS DB에서 유사한 염기서열을 분석했다. AHJ324 분자마커의 염기서열은 하나의 위치가 아닌 다양한 지역에서 유사한 염기서열이 확인되었다(Fig. 10). 이로 미루어보아 AHJ324 분자마커의 염기서열은 다양한 위치에서 반복되는 서열이 존재하는 것으로 보인다.



<Fig. 10> AHJ324 분자마커 염기서열의 고추 WGS DB BLAST 결과

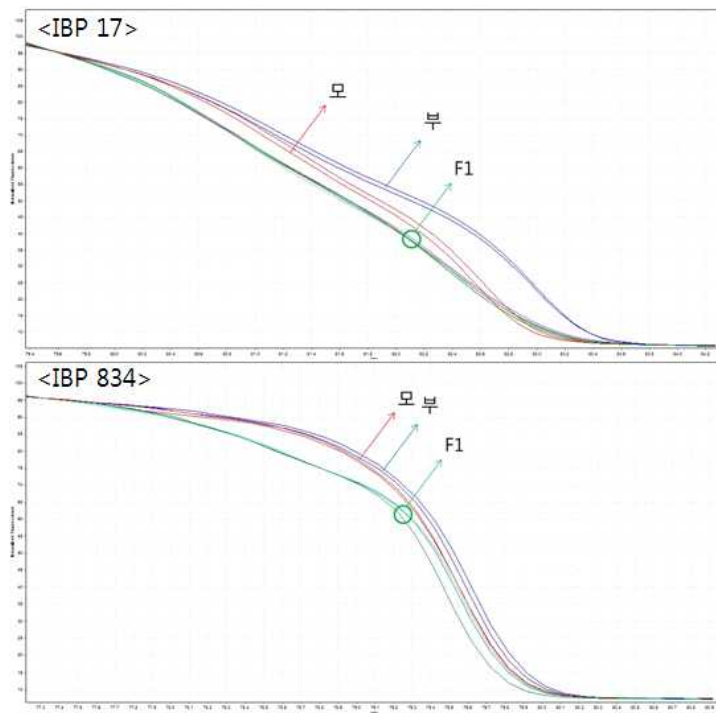
그 가운데에서 AHJ324 분자마커 염기서열과 가장 높은 상동성(98%)을 보이는 염기서열은 고추 WGS 가운데 pseudo molecule chr4의 끝부분(423.671cM)에 존재했고, 약 750kb 길이의 PGAv1.1.scaffold_mildew에서는 약 420kb 부분에 위치했다(Fig. 11). PGAv1.1.scaffold_mildew 염기서열을 이용한다면 흰가루병 분자마커를 보다 신속하게 개발할 것으로 기대한다.



<Fig. 11> AHJ324 분자마커의 WGS 상의 물리적인 위치 분석

(나) 고추 순도 검정용 분자마커 개발(5차년도)

고추 F₁ 종자의 순도 검정을 위하여 24개의 IBP 마커를 스크리닝하였다. 그 결과 HRM 분석을 통해 A사의 부, 모, F₁간의 이형성을 보이는 IBP 17 마커를 선발하였으며(Fig. 12), 추가적으로 부모간의 이형성은 보이지 않으나 F₁을 구분할 수 있는 IBP 834를 이용하였다(Fig. 12). 112개의 F₁ 종자로부터 DNA를 추출하여 HRM 분석을 수행하였으며, 이 중 111개 샘플은 F₁ 형태를 보였다. 1개의 샘플은 F₁의 그래프 형태와 약간 차이를 보여 IBP834 마커를 이용해 추가실험을 진행하였다. 그 결과 112개 F₁ 종자 모두 이형접합성임을 확인할 수 있었다.



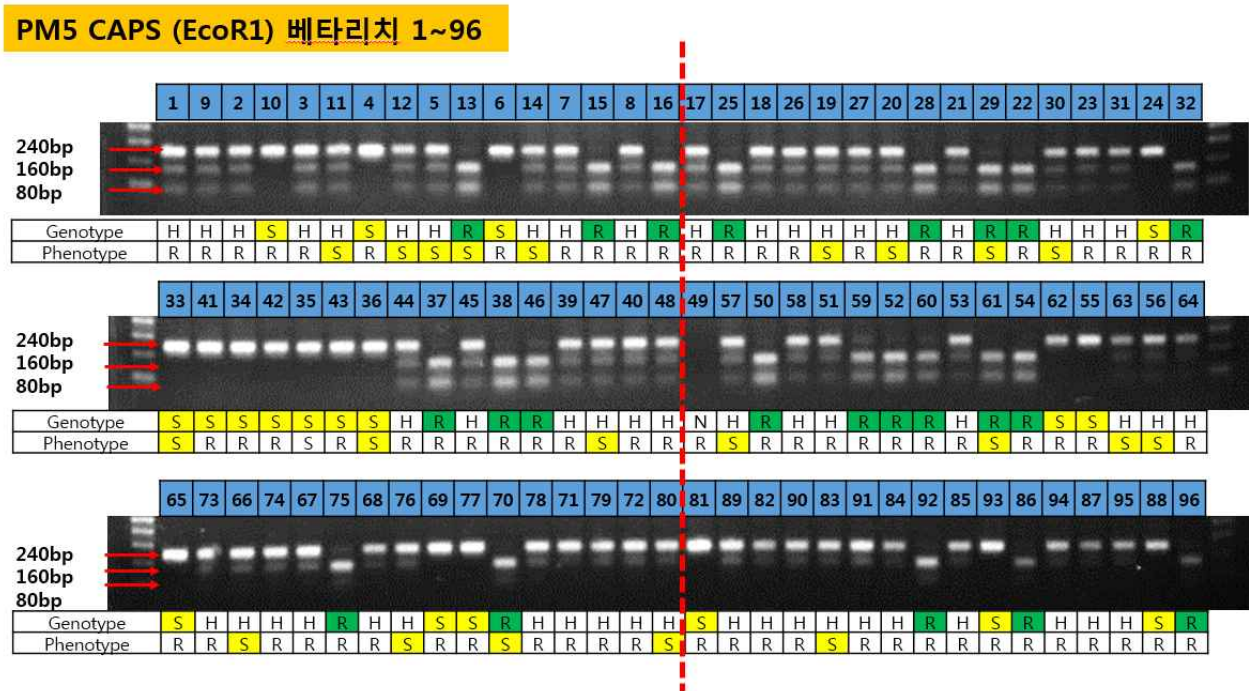
<Fig. 12> IBP 17, IBP834 마커를 이용하여 HRM 분석을 수행한 결과

IBP 17 마커는 부, 모, F₁ 간 이형성을 보였으며 IBP 834의 경우 부, 모는 같은 형태의 그래프를 지니지만 F₁은 구분이 가능하였다.

(다) 박과(멜론) 병 저항성 분자마커 기술 확립(5차년도)

5차 년도에는 멜론 흰가루병 분자마커 기술 확립을 위해 다양한 문헌 조사를 통해 기개발된 분자 마커의 확보 및 SNP 분자마커 전환을 통해 병에 대한 저항성 및 이병성 품종을 수집하고, 집단 적용 실험을 수행하였다.

문수멜론, 베타리치, 얼스해피, E.울트라 총 4품종의 멜론의 F₂ DNA를 각 100개체에 해당하는 샘플을 추출하고 각각의 멜론 F₂ 집단마다 4개의 시료에 대하여 참고문헌을 통해 확보된 PM1-SCAR, PM2-CAPS, PM4-dCAPS, PM5-CAPS, PM6-SCAR 총 마커 5개를 우선 적용하여 polymorphism test 를 시행하였고, 확보된 표현형 정보와 유전형 정보를 비교 분석한 결과 전형을 분석한 결과 베타리치 품종의 후대에서 PM5-CAPS의 다형성을 확인하였다. 베타리치 F₂ 집단 96개체에 대한 DNA 시료를 PM5-CAPS로 적용하여 실험을 수행하였고 집단의 유전형 분석 결과 저항성 개체가 22, 이형접합성 저항성 개체가 54, 이병성 개체가 19개체로 분리되었고, 이 결과를 표현형분석결과와 비교하였을 때 일치하는 개체가 60, 불일치 하는 것이 35개체로 63%의 일치율을 나타내어 이 마커는 저항성 품종을 구분하는데 활용하기 어려운 것으로 나타났다 (Fig. 13). 이는 외국의 흰가루병 균주과 국내의 흰가루병 균주의 차이에 의한 것으로 판단되며 향후 마커 개발이 추가로 필요할 것으로 판단된다.



<Fig. 13> 멜론 흰가루병 분자마커 PM5-CAPS를 베타리치 F₂집단 96개의 시료에 적용

(라) Fluidigm사 BioMark™ HD system 구축(5차년도)

SNP 분자마커는 단 하나의 염기서열 차이를 구별할 수 있기 때문에 유전체 전체에 골고루 분포 된 다양한 위치의 마커를 개발할 수 있다. SNP를 분석할 수 있는 다양한 기술이 개발되었고, DNA 칩 기술을 통한 신속/대량 분석을 통해 대량의 시료를 한 번에 분석 (high-throughput)하면서 기존의 기술보다 저렴한 가격으로 분자마커 분석이 가능해졌다. 고추의 전체 유전체의 유전적 거리는 약 1,800 cM으로 알려져 있는데, 20 cM 마다 하나의 SNP를

분석할 때는 90개, 10 cM마다 하나의 SNP를 분석할 때는 180개의 분자마커가 필요하다. Fluidigm 사의 Biomark™ HD system은 (48 시료 × 48 SNP), (96 시료 × 96 SNP) 등의 분석틀을 제공함으로써 고추의 유전체 분석에 매우 효율적인 시스템이다. 48 × 48 system과 96 × 96 system 구축을 통해 대량의 시료 분석이 가능해 졌으며 Marker-Assisted Breeding (MAB), QTL study, 다형성 survey 등 다양한 용도로 활용이 가능해 질 것이다(Fig. 14). 총 3 종류의 새로운 가지과 저항성 연관 분자마커 분석 기술을 추가하여 총 44가지 분석 기술을 확립했다(Table 6).



<Fig. 14> BioMark™ HD system과 유전형 분석 결과. 48개의 시료와 48개의 SNP 분자마커 또는 96개의 시료와 96개의 SNP 분자마커 유전형 분석 결과를 한 번의 실험을 통해 얻을 수 있다.

<Table 6> 5차년도 확립한 가지과/배추과 병 저항성 분자마커 기술

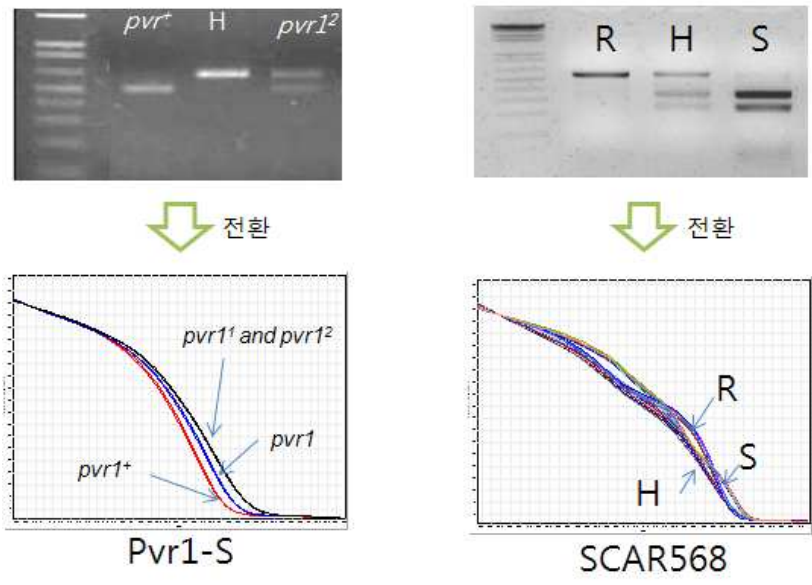
작물	병	분자마커	분자마커 종류	유전적 거리	비고
고추	PMMoV	189D23M	HRM	1cM	1차년도
		087H03T7	HRM	1.5cM	1차년도
		L4segF&R	HRM	0.5cM	2차년도
		LARP-3	HRM	0.5cM	2차년도
	CMV	CaTm-int3HRM	HRM	1.5cM	1차년도
		240H02SP6	HRM	1.5cM	1차년도
	Potyvirus	Pvr1-S	CAPS	0 (유전자)	1차년도
		Pvr1-S1R	HRM	0 (유전자)	1차년도
	TSWV	SCAC568	CAPS	1cM	1차년도
		HRM SCAC568	HRM	1cM	1차년도
		7399-6	HRM	0.7cM	3차년도
		9546-2	HRM	0.7cM	3차년도
	세균성 점무늬병	S45	SCAR	0.5cM,	1차년도
		S2	SCAR	2cM	1차년도
역병	PhytoSNP5	HRM	8cM	3차년도	
흰가루병	AHJ324 F1 & R1	CAPS	-	4차년도	
순도검정	IBP17	HRM	-	5차년도	
MAB	48개 SNP 마커	SNP	-	5차년도	
토마토	ToMV	Y3	CAPS	0.1cM	1차년도
		HRM ToMV	HRM	0.1cM	2차년도
		Tm2_3rd	HRM	유전자	3차년도
	TYLCV (Ty-1)	Ty-seminis	CAPS	-	1차년도
		HRM TYLCV(Ty-1)	HRM	-	2차년도
	TSWV	SW5-YP2	SCAR	0.1cM	1차년도
		SW5-YP2	HRM	0.1cM	4차년도
	Verticilium wilt	Ve	SCAR	0.6cM	1차년도
	Fusarium wilt	I3-2	CAPS	유전자	1차년도
		HRM Fusarium	HRM	유전자	2차년도
		gPTI	HRM	0.1cM	3차년도
	Root Knot nematode	REX-SAI	CAPS	-	1차년도
		HRM RK nematode	HRM	-	2차년도
	Leaf mold	cf4/9_SNP 1F/In 1R	HRM	유전자	4차년도
cf4/9_SNP 1F/In 2R		HRM	유전자	4차년도	
cf4/9_SNP In2F/ 2R		HRM	유전자	4차년도	
배추	TuMV	trs_HRM	HRM	0cM	3차년도
	뿌리혹병	CRW06-297	SCAR	-	4차년도
		CRW-452	SCAR	-	4차년도
감자	PSDvd	PSDvd 검출 키트	RT-PCR	-	3차년도
멜론	흰가루병	PM1	SCAR	-	4차년도
		PM2	CAPS	4.2cM	4차년도
		PM3	CAPS	2.4cM	4차년도
		PM4	dCAPS	3.8cM	4차년도
		PM5	CAPS	-	5차년도
		PM6	SCAR	-	4차년도

2. 대량/고속분석이 가능한 분자마커로의 전환

가. 1차년도

Real-time based 분자마커인 HRM 분석 방식은 PCR 후 해리곡선의 pattern을 분석을 통해 유전형을 분석하는 기술이다. 이 방법은 종래의 gel을 이용한 PCR-based 분자마커인 SSR, CAPS, SCAR 분자마커에 비해 더 빠르고 간편하게 분석할 수 있는 장점이 있다. 고추에서 확립한 4개의 바이러스 병 저항성 분자마커 가운데 PMMoV, CMV 저항성은 HRM 분자마커 분석이 가능하지만 TSWV, Potyvirus 병 저항성 분자마커는 CAPS 분자마커로 개선의 여지가 남아있었다. TSWV와 Potyvirus 병 저항성 분자마커 분석을 HRM 분자마커로 전환하기 위해 CAPS 분자마커에 사용하던 primer set를 이용해 다형성을 검정했다. TSWV 저항성 분자마커는 TSWV 저항성 분리 집단을, 그리고 Potyvirus는 저항성 품종을 대조군으로 사용했다.

기존에 CAPS 분자마커로 사용하던 primer set를 이용해 HRM 분석을 해도 서로 다른 유전형 사이에서 해리곡선의 차이를 찾을 수 있었다. Potyvirus 저항성 분석은 Pvr1-S 분자마커를 이용했는데, 이 분자마커는 단순히 Potyvirus에 대한 저항성, 감수성을 구별할 뿐만 아니라 pvr1과 그 대립유전자인 pvr11, pvr12를 구별할 수도 있었다. TSWV 저항성 분석은 SCAR568 분자마커를 사용했는데, R, H, S 유전형을 명확하게 구별할 수 있었다(Fig. 15).



<Fig. 15> Potyvirus, TSWV 저항성 분자마커를 real-time based 분자마커로 전환

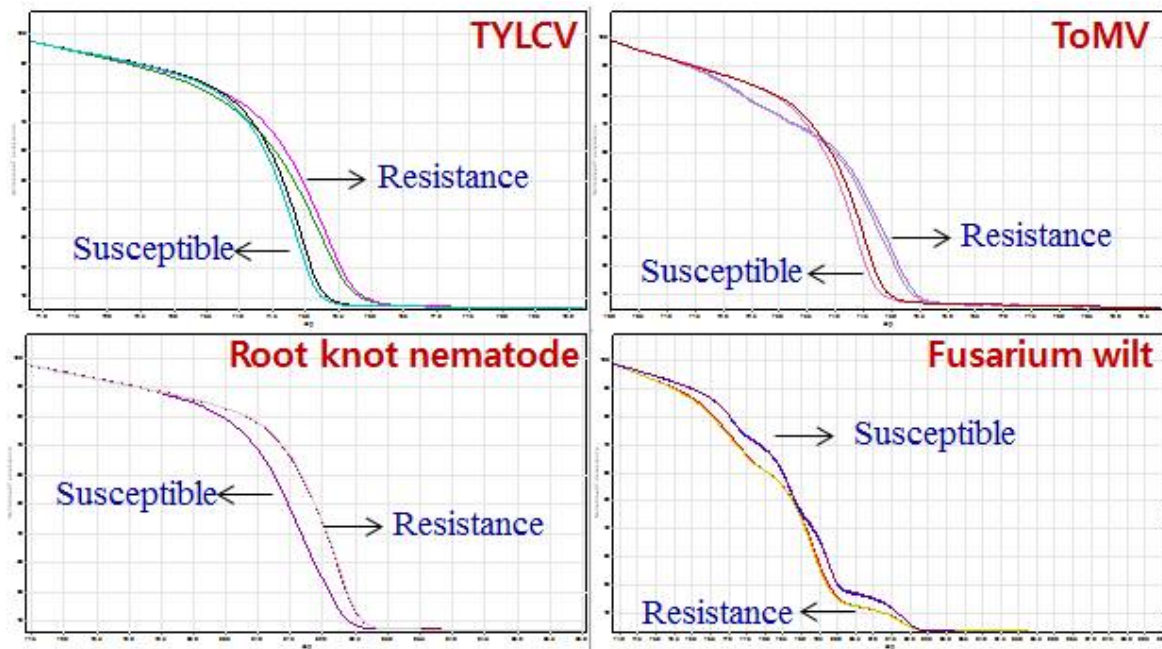
(R:homozygous resistance, H:heterozygous, S:homozygous susceptible)

나. 2차년도

2차년도에는 6가지의 토마토 standard PCR based 병 저항성 분자마커를 real-time based 분자마커로 전환하고자 했다. 6가지 종류의 토마토 병 저항성 분자마커로 저항성 및 이병성 품종에서 PCR을 하고 그 product의 염기서열을 분석하여 저항성 품종과 이병성 품종사이의

차이를 보이는 SNP를 선발하여 새로 HRM 분석 용 프라이머를 design한 뒤, HRM 분석을 통해 저항성과 이병성 사이에서 해리곡선의 다형성이 있는지 확인했다.

ToMV, TSWV, TYLCV, Verticillium wilt, Fusarium wilt, root knot nemato 저항성 분자마커는 standard PCR based 분자마커로 SCAR 또는 CAPS 분자마커였다(Mutlu et al. 2008). 이들 분자마커의 프라이머를 이용하여 우선 HRM 분석을 해 저항성 품종과 이병성 품종 사이의 다형성이 나오는 지 검정했다. 그 결과 Fusarium wilt 저항성 분자마커인 I3-2에서는 HRM의 다형성을 확인했지만 나머지 다섯 종류의 분자마커에서는 HRM의 다형성이 나타나지 않았다. 이 다섯 종류의 분자마커를 HRM 분자마커로 전환하기 위하여 SNP를 찾기 위해 저항성 및 이병성의 염기서열을 분석하였다. CAPS 분자마커인 ToMV, TYLCV, root knot nematode 저항성 분자마커에서는 SNP를 찾을 수 있었지만, SCAR 분자마커인 TSWV, Verticillium wilt 저항성 분자마커에서는 SNP를 찾지 못했다. 저항성 및 이병성 품종 사이에 차이가 있는 SNP를 이용해 새로 primer를 design했다. 새로운 primer set를 이용해 HRM 분석을 한 결과 저항성과 이병성 품종의 해리곡선이 뚜렷한 차이를 보였다(Fig. 16). 총 6개의 standard PCR based 토마토 병 저항성 분자마커 가운데 4개를 HRM 분자마커로 전환시켰다.



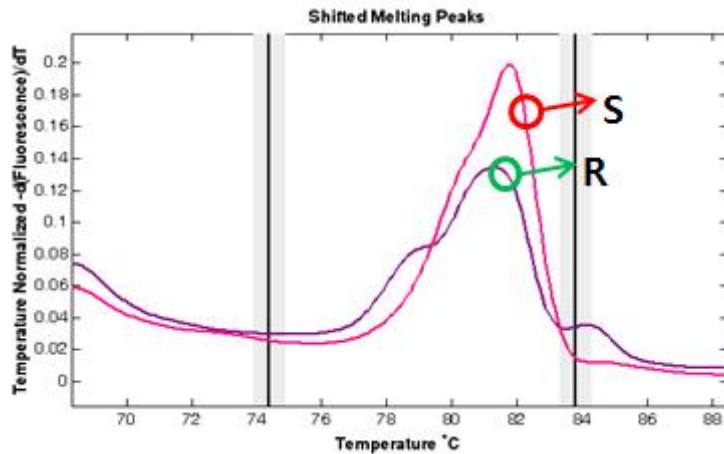
<Fig. 16> Real-time based 분자마커로 전환한 토마토 병 저항성 분자마커의 해리곡선

다. 3차년도

3차년도에는 *I-3* 저항성 유전자를 중심으로 약 1cM의 유전적 거리에 있는 염기서열을 이용해 개발한 분자마커를 이용하여 보다 많은 저항성 연관 분자마커를 선발하고 이를 대량/고속 분석이 가능한 분자마커인 real-time based 분자마커로 전환했다.

Lim et al. (2008)은 *I-3* 저항성 유전자를 중심으로 하는 high-resolution map을 만들기 위하여 약 5cM에 해당하는 토마토 유전지역에 약 60개의 분자마커를 개발해 보고한 바 있다. 이 가운데 *I-3*를 중심으로 약 1cM의 유전적 거리에 있는 9개의 분자마커인 SLG-1k, gPTI, bA9h, bL7g, bB6h, bP16, Sy-At2g42770m, Sy-At2g42760m, Got-Bf를 선발했다. 이들 분자마

커는 CAPS 분자마커로 amplicon의 길이는 약 250-800bp이다. I-3 저항성 및 이병성 계통/품종을 이용하여 각 분자마커의 다형성을 검정한 결과 gPTI 분자마커에서 다형성이 나타났다 (Fig. 17). 이 분자마커는 이전에 개발한 HRM Fusarium 분자마커로 증폭하지 못한 개체에서도 모두 성공적으로 증폭이 되었다. 유전적 거리도 0.1cM으로 목적 유전자인 *I-3* 유전자에 매우 가깝게 연관되어 있어 앞으로 Fusarium HRM과 함께 유용하게 사용될 것으로 예상된다.

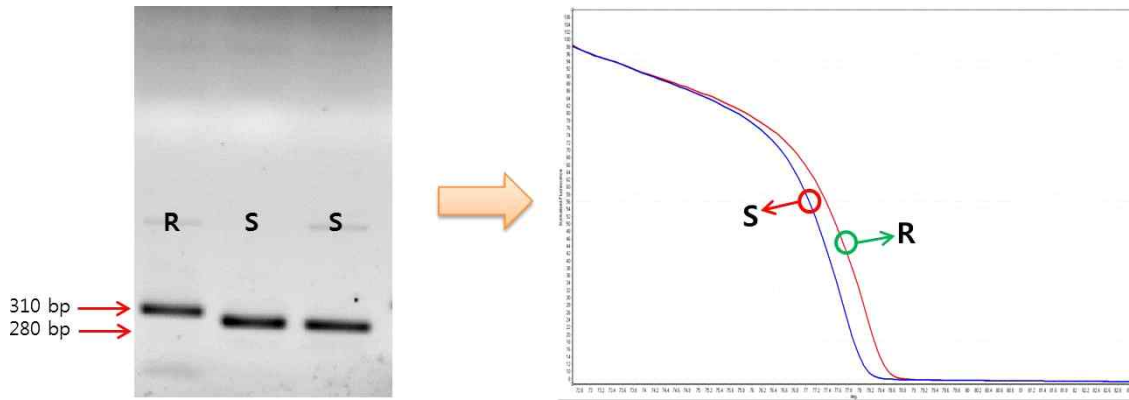


<Fig. 17> gPTI 분자마커의 다형성

라. 4차년도

4차년도에는 현재까지 real-time based로 전환되지 않은 standard PCR based 분자마커를 전환하고자 했다. 한 가지 종류의 토마토 병 저항성 분자마커로 저항성 및 이병성 품종에서 PCR을 하고, PCR 산물의 염기서열을 분석하여 저항성 품종과 이병성 품종 사이에서 차이를 보이는 SNP를 조사하여 새로운 HRM 분석 용 primer를 design한 뒤, HRM 분석을 통해 저항성과 이병성 사이에서 해리곡선의 다형성이 있는지를 확인하였다.

기존에 토마토에서 TSWV 저항성을 검정하기 위해 사용해 왔던 SCAR 분자마커를 SNP 분자마커로 전환하기 위해 TSWV 저항성 Stevens와 이병성 Glamor A accession 사이에서 다형성을 확인하기 위해 염기서열 분석을 실시하였고, multiple alignment tool인 Megaline 프로그램을 사용하여 저항성/ 이병성 대립유전자간에 SNP를 확인하였고, SNP이 있는 부분을 중심으로 새로운 primer를 design했다. 새로운 primer set을 이용해 HRM 분석을 한 결과 저항성과 이병성 품종의 해리곡선이 뚜렷한 차이를 보였다(Fig. 18).

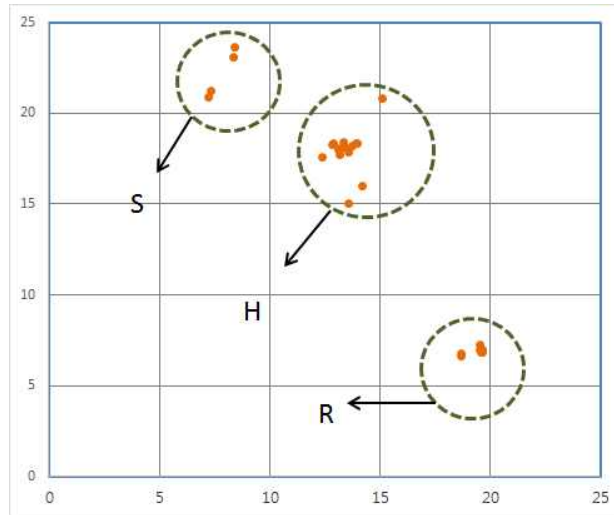


<Fig. 18> Real-time based 분자마커로 전환한 토마토 TSWV 병 저항성 분자마커의 해리곡선

마. 5차년도

5차년도에는 기존의 HRM marker의 실험간 변이가 큰 단점을 극복하기 위해 KASP genotyping 기법을 도입하였다. Real-time based 분자마커는 기존의 PCR based 분자마커 보다 빠르고 간편하게 분석 할 수 있다는 장점이 있지만, SNP의 염기서열이나 증폭서열의 특성에 따라서 HRM의 해리곡선을 명확하게 구분하는 것이 쉽지 않다는 단점이 있다. 또한 HRM은 InDel을 가지고 있는 개체에서는 분자마커를 개발 할 수 없다. 최근 들어서 대량 데이터 분석에 많이 이용되는 KASP genotyping system의 경우, InDel을 포함한 SNP의 마커 전환율이 90% 이상이며, end point로 결과를 확인할 수 있으므로 다형성의 구분이 매우 명확하다는 장점이 있다. 또한 real-time based 분자마커에 비해서 적은 양의 DNA(5 - 50ng)를 사용하고, 384 well plate 사용이 가능하여 한번 많은 수의 샘플을 분석 할 수 있다. 그러므로 5차 년도에는 real-time based 분자마커를 KASP genotyping system을 이용한 분자 마커로 전환하였다.

기존에 고추에서 CMV 저항성을 검정하기 위해 사용해 왔던 real-time based 분자마커를 KASP genotyping system으로 전환하기 위해 염기서열을 분석하였다. 저항성/이병성 대립 유전자간의 SNP를 포함한 100bp 정도의 염기서열을 이용하여 KASP genotyping 프라이머를 주문, 제작 하였다. 새로 제작한 KASP 프라이머를 이용하여 genotyping을 수행한 결과, R, S, H의 유전형에서 명확하게 다형성을 확인할 수 있었다(Fig. 19).



<Fig. 19> KASP genotyping 분자마커로 전환한 고추 CMV 저항성 분자마커의 다형성 그래프

3. 병저항성 마커 개발

가. 고추 TSWV 저항성 분자마커 개발(1~5차년도)

TSWV는 전세계적으로 고추, 토마토와 같은 가지과 작물에서 큰 피해를 입히는 바이러스다. 국내에도 TSWV가 발생한 이후 꾸준히 그 피해가 증가하고 있어 저항성 품종의 필요성이 점차 커지고 있어, 분자마커의 개발 및 활용을 통한 신속한 품종 개발이 요구되고 있다. 지금까지 논문으로 보고된 TSWV 병 저항성 분자마커는 일부의 저항성 계통이나 저항성 품종만을 판별할 수 있다는 단점이 있었다. 또한 TSWV 병 저항성 계통으로 알려진 것은 PI159236과 PI152225인데, PI159236으로부터 유래한 계통의 병 저항성을 판별할 수 있는 실용적인 분자마커는 아직 발표되지 않았다. 현재 논문에는 SCAR568(약 1cM)가 가장 가까운 분자마커로 보고되었지만, RAPD 방법을 이용해 찾은 분자마커이기 때문에 유전자 지도 상에서의 위치가 불분명하며, 보다 정확한 유전형 분석을 하기 위하여 유전적 거리가 더 가까운 분자마커를 개발할 필요가 있다. 본 세부과제에서는 고추 유전자 지도, 고추 유전체 서열정보, 고추 전사체 서열 정보를 이용하여 가까운 분자마커를 개발하고자 했고, 또한 *Tsw* 후보 유전자를 발굴하는 연구를 수행했다.

(1) BAC과 COSII 분자마커를 이용한 *Tsw* 연관 분자마커 개발(제 1차년도)

Tsw 저항성 유전자좌는 CT57 분자마커 아래, CD72 분자마커 위에 위치하며 TG420 분자마커 근처에 존재하는 것으로 알려졌다(Jahn et al., 2000). 우선은 실험실에서 유전자지도를 구축하고 있는 AC99 집단에서 *Tsw* 저항성 유전자좌의 위치를 확인하고자 했다.

제2-1 세부과제책임자인 최도일 교수로부터 TG420 분자마커를 이용해 screening한 BAC clone의 염기서열 정보를 제공받아 TG420의 위치를 확인하고자 했다. 추가로 분자마커를 찾기 위하여 CT57 아래에 존재하는 고추 COSII marker의 다형성을 확인하고자 했고, TG420과 CD72 사이에 존재하는 토마토 COSII marker의 다형성을 확인하고자 했다. 토마토 COSII marker는 고추에 그대로 적용하기 어렵기 때문에 토마토 COSII marker의 염기서열을 이용해 우선 고추 EST database에 BLAST search를 통해 candidate 고추 EST를 우선 발굴하고

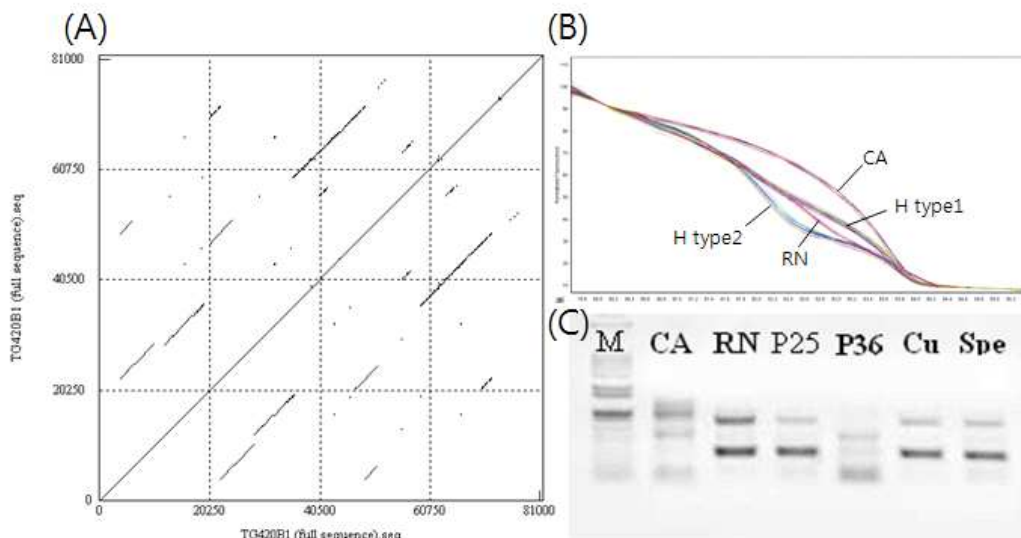
Intron Finder program (<http://solgenomics.net/>)을 통해 찾은 후보 인트론을 대상으로 intron-based 분자마커를 개발 하고자 했다.

제2-1 세부과제책임자인 최도일 교수로부터 제공 받은 BAC clone TG420B1로부터 분자마커를 개발하기 위해 우선 dot plot으로 분석했다(Fig. 20-A). TG420B1 sequence에는 길게는 약 10kbp, 짧게는 약 5kbp 정도의 크고 작은 repeat이 고루 분포되어 있다는 것을 알 수 있었다. 분자마커를 개발하기 위해서 우선 repeat이 없는 BAC sequence를 찾았다. 전체 약 81kbp 중 5' 서열로부터 약 11.5kbp, 19.5kbp, 46.9kb, 53.1kb 떨어진 곳에 약 2 ~ 5kbp 정도의 repeat이 없는 sequence를 발견했고, 4개의 sequence로부터 amplicon의 size가 3 ~ 400bp가 되도록 primer를 각각 1 set씩 design하였다. 4개의 primer set를 AC99 집단의 부·모친인 RNaky와 CA4, 그리고 TSWV 저항성 계통인 PI159236, PI152225와 이병성 품종인 Special F2 gDNA를 control로 사용해 다형성을 검정했다. TG420-11558은 RNaky와 CA4 사이에서 HRM 분자마커 다형성이 있고, TG420-53095은 SCAR 분자마커로 RNaky와 CA4 사이에 다형성이 있을 뿐만 아니라 PI159236 저항성 계통과 이병성 품종 사이에도 다형성이 존재한다(Fig. 20-B, C). TSWV 저항성 유전자좌로부터 이들 분자마커의 유전적 거리를 구하기 위해 TSWV 저항성 유전자좌에서 약 1cM 떨어진 SCAR568 분자마커와 함께 AC99 집단에 mapping 했다. Mapping은 carthagene1.0 (<http://www.inra.fr/mia/T/CarthaGene/>) mapping program을 이용해 수행했다. TG-11558은 SCAR568 분자마커로부터 약 26 cM 아래쪽에 위치하며, CD72 분자마커에서 약 19.1cM 떨어진 것으로 나타났다.

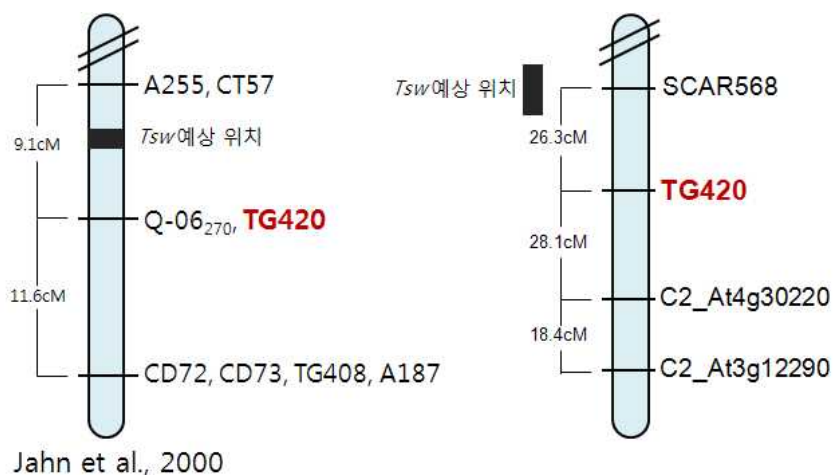
Pepper COSII map (Wu et al. 2009)의 CT57 분자마커 아래에는 3개의 COSII 분자마커가 존재한다. TSWV 저항성 유전자좌는 CT57 아래쪽에 위치하는 것으로 알려졌다. 3개의 COSII 분자마커 가운데 CT57에 가까운 2개의 COSII 분자마커를 선정해 RNaky와 CA4, 저항성 계통과 감수성 품종 사이의 다형성을 검정했다. C2_At3g58470 분자마커로는 PCR이 되지 않았고, C2_At4g30220에서 HRM 분자마커 다형성을 발견했다.

토마토 COSII map에 위치한 COSII marker 역시 다형성을 검정했다. 우선 TG420과 CD72 사이에 있는 8개의 COSII marker를 선정했다. 토마토의 COSII 분자마커를 바로 고추에 적용하기는 어렵기 때문에 토마토의 COSII 분자마커의 sequence로 고추 EST DB에 blast를 했다. 그 결과 6개의 고추 EST를 발굴했다. 다시 이 고추 EST를 Intron Finder program (<http://solgenomics.net/>)을 이용해 candidate intron을 찾고, 그 intron을 target으로 primer를 design 해 intron based 분자마커를 개발하려 했다. 3개의 EST에서 candidate intron을 발견했고, 그 중 하나의 EST에서 다형성 있는 분자마커를 개발 할 수 있었다.

먼저 개발한 TG420B1에서 개발한 분자마커와 2개의 COSII 분자마커, 그리고 SCAR568 분자마커를 AC99 집단에 mapping하여 그 유전적 거리를 비교했다(Fig. 21). carthagene program의 특성상 유전적 거리가 더 과장되어 나오기 때문에, 유전적 거리를 그대로 신뢰할 수는 없지만, 분자마커 사이의 상대적인 위치는 신뢰할 수 있다. TG420을 기준으로 SCAR568은 위쪽에 C2_At4g30220과 C2_At3g12290은 아래쪽에 위치한다. SCAR568은 TSWV 저항성 유전자좌로부터 약 1cM 떨어져 있는 분자마커이다. 이로 미루어 보아 TSWV 저항성 유전자좌는 TG420으로부터 보다 위쪽에 있는 것으로 보인다.



<Fig. 20> TG420B1 sequence dot plot 분석 및 분자마커 개발 (A)염기서열 분석 자료 (B) TG420-11558 (C) TG420-53095 (RN:RNaky, CA:CA4, H:heterozygous, P25:PI152225, P36:PI159236, Cu:Cupra, Spe:Special)



<Fig. 21> TSWV 저항성 유전자(*Tsw*) 주변의 유전자 지도

(2) F₂ 집단 작성 및 비교유전체 전략을 활용한 분자마커 개발(제 2차년도)

1차 년도에 mapping한 COSII 분자마커를 바탕으로 보다 가까운 분자마커를 찾기 위하여 고추, 토마토 COSII 분자마커와 AC99에 mapping 된 Intron-based 분자마커로 우선 다형성 검정을 하고, 다형성이 있는 분자마커를 Telmo F₂ 집단에 mapping하여 보다 가까운 *Tsw* 연관 분자마커를 개발했다. 또한 토마토의 유전체 염기서열과 고추의 유전체 염기서열, 고추의 EST 정보를 활용하여 새롭게 분자마커를 개발하여 Telmo F₂ 집단에 mapping 했다. 또한 UC DAVIS에서 작성한 고추 유전자지도를 활용하기 위하여 고추의 full genome sequence와 연관시켜 분자마커를 개발하고자 했다.

Telmo F₂ 집단에서는 *Tsw* 저항성 유전자로부터 6cM 이내의 유전적 지역에서 더 이상 다형성 있는 분자마커를 개발할 수 없었다. Telmo F₂ 집단이 아닌 새로운 분리집단을 작성하기 위하여 지금까지 알려진 저항성 계통인 PI159236과 PI152225를 이병성 계통 및 품종과 교배하여 F₁ 세대의 개체를 얻었고, F₂ 세대의 종자를 받아 3차년도 실험에 활용하고자 했다.

TSWV 저항성 검정을 위하여 우선적으로 효율적이고 안정적인 접종 조건을 확립했다. 접종 조건은 온도, 식물의 생육 상태, 습도, 광 조건으로 나누어 실험했다. 실험은 walk-in-chamber에서 수행했다. 생육 상태는 제 1, 제 2 본엽이 발생한 뒤, 제 3, 제 4 본엽이 발생하기 전 떡잎에 접종할 때가 가장 효율적이었다. 온도의 경우에는 30°C 이상에서는 접종이 잘 되지 않았고, 24°C 이하에서는 병의 진전속도가 느려 병징이 늦게 나타난다. 24-26°C의 온도에서는 접종 효율도 좋고 병징도 늦게 나타나지 않아 효율적인 접종이 가능했다. 광 조건의 경우에는 강한 할로젠 등보다는 약한 형광등 아래에서 병 접종이 더 효율적이었다. 마지막으로 습도는 40-60% 상대습도에서는 병 접종에 성공할 수 있었다.

TSWV 저항성 분리집단을 작성하기 위하여 TSWV 저항성 유전자인 *Tsw*를 갖고 있는 것으로 알려진 파프리카 품종 Telmo, Jairan, Gandal F₁ 품종을 선택하여 자가 수분을 통해 F₂ 분리 종자를 품종으로부터 약 1,800립, 1,500립, 2,000립을 얻을 수 있었다. 우선 TSWV 저항성 검정 예비 실험을 수행했다. Telmo, Jairan, Gandal F₂ 종자와 더불어 대조군으로 사용하기 위하여 PI152224, PI159234, Rnaky Perennial, Yolo Wonder, ECW, Special, Cupra를 함께 검정했다. 예비 실험 결과 저항성 대조군으로는 PI 152225를 이병성 대조군으로는 Special과 RNaky를 선발했고, 저항성 분리 집단으로는 Telmo F₂ 집단으로 선발했다.

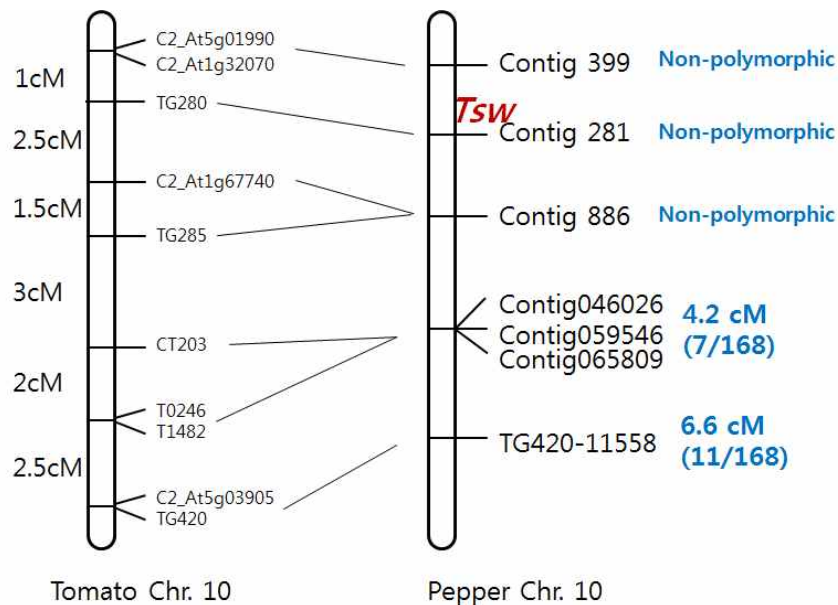
집단 크기를 늘려 Telmo F₂ 집단을 다시 TSWV 저항성 검정을 수행했다. 총 168개체를 접종한 결과 저항성은 134개체, 이병성은 34개체로 3:1 분리비를 만족하여($\chi^2=2.03$, $P=0.1542$) TSWV 저항성이 하나의 우성 저항성 유전자에 의해 유전된다는 것을 확인했다(Table 7). 우선 기개발된 분자마커를 mapping하여 Telmo F₂ 집단에서의 *Tsw* 저항성 유전자좌의 위치를 확인하고자 했다. 지금까지 보고된 분자마커 가운데 가장 가까운 분자마커인 SCAC568 분자마커의 다형성을 검정한 결과 F₂ 집단에서 다형성이 없었다. SCAC₅₆₈ 분자마커 염기서열을 분석한 결과 Telmo F₂ 집단의 저항성 개체와 이병성 개체 사이에서 SNP를 발견할 수 없었다. 1차년도에 사용한 TG420B1 BAC clone에서 개발한 TG420-11558은 Telmo F₂ 집단에서 다형성을 보였고, co-segregation 분석 결과 168개체 가운데 11개가 재조합형(recombinants)으로 나타나 이 분자마커가 *Tsw* 저항성 유전자좌로부터 약 6.6cM에 떨어진 곳에 위치한다는 사실을 확인했다. 마지막으로 AC99에 mapping된 intron-based 분자마커의 다형성 검정을 했지만 TG420-11558보다 가까운 다형성 있는 분자마커는 없었다.

<Table 7> Telmo F₂ 집단의 TSWV 저항성 검정 결과

집단 및 계통	예상되는 비율 (저항성 : 감수성)	개체수		X ²	P
		저항성	감수성		
Rnaky	0 : 1	0	10	-	-
PI 159234	1 : 0	10	0	0	-
F ₂	3 : 1	134	34	2.03	0.1542

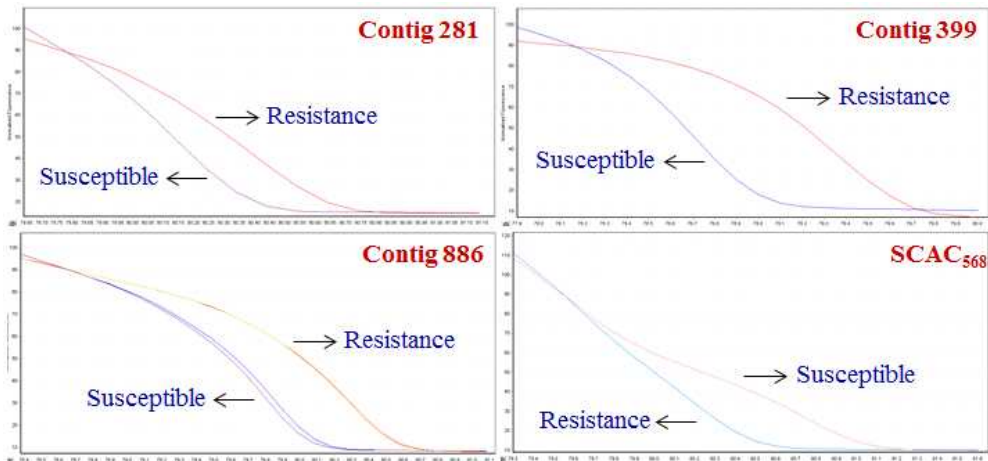
TG420-11559 분자마커를 기준으로 더 *Tsw* 유전자좌에 더 가까운 분자마커를 개발하기 위하여 토마토의 유전정보를 활용하였다. 고추와 토마토의 COSII 유전자지도를 비교한 Wu et al. (2009)에 따르면 고추의 10번 염색체는 토마토의 10번 염색체와 서로 syntenic한 관계에 있다. TG420-11559 분자마커와 가까이 위치한 토마토의 TG420를 포함하는 유전지역의 토마토 유전체 염기서열인 약 7,841kbp 길이의 SL1.50sc06504를 찾았다. TG420 분자마커로부터 토마토의 유전적 거리로 약 13.5cM 거리에 위치한 C2_At5g01990 분자마커까지를 *Tsw* 저항성 유전자의 corresponding region으로 가정했다. 두 분자마커를

포함하여 그 사이에 있는 C2_At1g32070, TG280, C2_At1g67740, C2_At1g67740, TG285, CT203, T0246, T1482, T0743를 선발했다. 이들 분자마커 염기서열을 Sol Genome Network (<http://solgenomics.net>)에서 확보한 뒤, 고추의 유전체 염기서열에 BLAST하여 similarity가 높은 고추 염기서열 단편을 선발했다. 고추 염기서열 단편을 다시 고추의 EST DB에 BLAST 검색을 하여 고추의 coding region을 예측했다. 고추 염기서열 단편에서 coding region을 제외한 나머지 부분을 intergenic region으로 가정하고 이 지역에서 약 1,000bp 길이의 PCR product를 증폭하도록 프라이머를 design했다. 동시에 coding region에서 Intron Finder 프로그램을 이용하여 intron 부위를 예측하고, intron을 증폭할 수 있도록 exon 부분에서 프라이머를 design했다. Telmo F₂ 개체가운데 표현형이 저항성이고 TG420-11559 분자마커의 유전형이 저항성 동형접합인 개체를 저항성 대조군으로 표현형이 이병성이고 TG420-11559 분자마커의 유전형이 이병성 동형접합인 개체를 이병성 대조군으로 삼아 각 프라이머로 증폭한 PCR product의 염기서열을 분석했다. 이 가운데 토마토 분자마커 CT203, T0246, T1492, T0743과 높은 상동성이 높은 고추 염기서열인 Contig026, Contig546, Contig809에서 design한 프라이머로 증폭한 PCR 산물에서 SNP를 찾아 다형성 있는 분자마커를 개발하는 데 성공했다. 이 분자마커들은 168개체 가운데 7개체의 재조합체를 확인할 수 있었다(4.2cM). 그러나 다른 유전지역에서는 다형성 있는 분자마커를 개발할 수 없었다(Fig. 22).



<Fig. 22> 토마토 유전정보를 이용한 Telmo F₂ 집단에서의 T_{sw} 연관 분자마커 개발. T_{sw}(빨간색)은 예상되는 T_{sw} 저항성 유전자의 위치를 나타냄

Telmo F₂ 집단에서는 더 이상 다형성이 있는 분자마커를 개발하기 어렵다고 판단하여 새로운 분리집단을 만들기 위해 새로운 교배조합을 작성했다. 저항성 친으로는 PI 152225와 PI 159234를 사용했고, 이병성 친으로는 Special, Rnaky, 유월초를 사용했다. Telmo F₂ 집단과는 다르게 새로운 교배 집단에서 다형성이 나타나는 지 확인하기 위하여 저항성 친과 이병성 친의 각 식물로부터 gDNA를 추출하여 Telmo F₂ 집단에서는 다형성을 보이지 않았던 분자마커의 다형성을 검정했다. 그 결과 Contig 399, Contig 281, Contig 886에서 개발한 분자마커와 SCAC568 분자마커에서 다형성이 발견되었다(Fig. 23). 따라서 새롭게 작성한 집단에서는 보다 수월하게 T_{sw} 연관 분자마커를 개발할 수 있을 것으로 기대한다.



<Fig. 23> 새로운 TSWV 저항성 집단의 부·모친을 이용한 분자마커의 다형성 검정. Telmo F₂ 집단에서는 다형성이 없었던 분자마커에서도 다형성이 나타남을 확인할 수 있다.

(3) 고추 WGS를 이용한 분자마커 개발(제 3차년도)

제 3차년도에는 성공한 중간 교잡인 ‘Special’ X ‘PI152225’ F₂ 집단을 보다 가깝게 연관된 분자마커를 개발하는 데 사용했다. 분자마커를 개발하기 위하여 비교유전학인 방법을 활용했고, 제 2-1 세부과제 책임자인 최도일 교수의 도움을 받아 고추 whole genome sequence (WGS) database의 염기서열을 이용하여 분자마커를 개발하고자 했다. 현재 T_{sw} 저항성 유전자를 중심으로 위쪽(north direction), 아래쪽(south direction)에서 모두 약 0.7cM의 분자마커를 성공적으로 개발했다.

T_{sw} 저항성 유전자 주변 지역에서 NBS-LRR이 발견되었으며, 이로 미루어볼 때, T_{sw}가 NBS-LRR gene cluster 안에 존재할 가능성이 높다. 고추의 WGS DB는 next-generation 방법으로 sequencing 되었기 때문에, gene cluster 안에 존재하는 multigene copy를 assemble하기 매우 어렵다. T_{sw} 저항성 유전자 fine mapping을 하기 위하여 *C. chinense* ‘PI152225’의 전사체를 분석했다.

새로운 mapping 집단을 만들기 위하여 저항성 계통인 *C. chinense* ‘PI152225’, *C. chinense* ‘PI159234’와 이병성 계통/품종인 *C. annuum* ‘RNaky’, *C. annuum* cv. ‘Special’를 정역교배(reciprocal cross)했다. *C. annuum* cv ‘Special’을 모친으로, *C. annuum* ‘PI152225’를 부친으로 한 교배 조합에서만 F₁ 종자를 얻을 수 있었고, F₁ 식물체를 다시 자가교배하여 ‘Special’ X ‘PI152225’ F₂ 분리집단을 작성했다.

‘Special’ X ‘PI152225 (SP)’ F₂ 분리집단의 각 개체마다 TSWV 저항성을 평가하기 위하여 TSWV_{Pap}를 각 개체마다 접종했다. 접종 뒤 약 1주일 후부터 병징이 발생했으며, 3-4주 후 병 저항성을 평가했다. 병에 걸린 개체는 잎에 황화 현상이 나타나기도 하고, 신초가 검게 죽으면서 줄기가 검게 말라 죽기도 했다. 병 저항성은 병징의 유/무로 판단했고, ELISA 분석으로 다시 한 번 확인했다. 저항성 대조군으로 사용한 PI152225는 20개체가 모두 저항성으로, 이병성 대조군으로 사용한 Specail은 20개체가 모두 이병성으로 나타나 접종 실험이 훌륭하게 성공했음을 알 수 있었다. 총 293개의 개체를 접종한 결과 저항성 개체는 207개, 이병성 개체는 86개체로 저항성:이병성 = 3:1로 단일 우성 저항성에 의한 분리비로 나타났다($\chi^2 = 2.96$, $P = 0.09$) (Table 8).

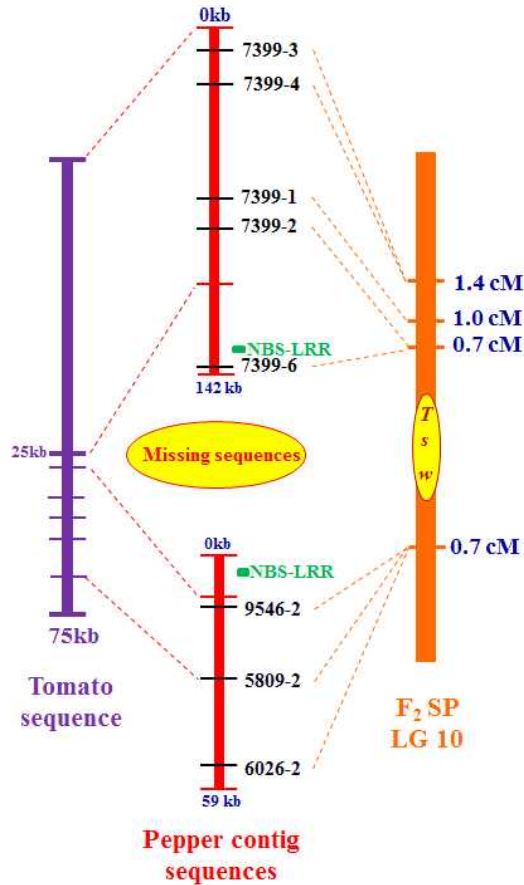
<Table 8> ‘Special’ X ‘PI152225’ F2 집단의 저항성 및 이병성 분리비

집단 및 계통	예상되는 비율 (저항성 : 감수성)	개체수		X ²	P
		저항성	감수성		
Special	0 : 1	0	20	-	-
PI 152225	1 : 0	20	0	-	-
F ₂ (‘Speical’ X ‘PI152225’)	3 : 1	207	86	2.959	0.0854

Tsw 연관 분자마커를 개발하기 위하여 토마토와 고추의 비교유전학적인 방법을 사용했다 (Fig. 24). *Tsw* 유전 지역에 상응하는 토마토 scaffold 염기서열을 찾았고, BLAST 프로그램을 이용해 토마토 염기서열과 homology가 높은 고추의 contig 염기서열을 찾아 contig 염기서열을 assembly했다. 하지만, 고추 contig 염기서열은 하나의 sequence로 assembly되지 않고, 두 개의 큰 염기서열로 assembly되었다. north direction에 위치하는 염기서열에서는 총 5개의 다형성 있는 분자마커인 7399-1, 7399-2, 7399-3, 7399-4, 7399-6을 개발했고, 아랫 쪽에 위치하는 염기서열에서는 총 3개의 다형성 있는 분자마커인 9546-2, 5809-2, 6026-2를 개발했다. 이들 분자마커는 2차년도에 사용한 mapping 집단인 Telmo F₂ 집단에서는 다형성을 보이지 않았다. 7399-3와 7399-4 분자마커는 293 개체 가운데 4개체가 재조합체 (recombinants)로 나타나 1.4cM으로, 7399-4 분자마커는 3개체가 재조합체로 나타나 1.0cM으로, 다른 5개의 분자마커인 7399-2, 7399-6, 9546-2, 5809-2, 6026-2는 2개체만이 재조합체로 나타나 0.7cM의 유전적 거리인 것으로 분석했다. 각 분자마커 별 재조합체를 분석해 보면 north direction 염기서열에서 개발한 5개의 분자마커인 7399-3, 7399-4, 7399-1, 7399-2, 7399-6는 공통적으로 5-1, 26번 개체가 공통적으로 재조합체이지만, south direction 염기서열에서 개발한 3개의 분자마커인 9546-2, 5809-2, 6026-2는 공통적으로 8, 40번 개체가 공통적으로 재조합체로 나타났다. 이러한 차이는 north direction의 염기서열과 south direction의 염기서열이 *Tsw* 저항성 유전자를 중심으로 서로 다른 방향에 존재한다는 것을 알 수 있다 (Table 9).

<Table 9> 재조합체의 TSWV 저항성 및 연관 분자마커의 유전형 (각 분자마커 별로 재조합체는 회색 음영으로 표시함)

분자마커	재조합체의 유전형					
	5-1	26	40	6-1	8	18
7399-3	H	H	S	H	S	H
7399-4	H	H	S	H	S	H
7399-1	H	H	S	S	S	H
7399-2	H	H	S	S	S	S
7399-6	H	H	S	S	S	S
9546-2	S	S	H	S	H	S
5809-2	S	S	H	S	H	S
6026-2	S	S	H	S	H	S
표현형	S	S	S	S	S	S



<Fig. 24> 토마토, 고추 염기서열을 이용한 TSWV 저항성 연관 분자마커 개발

고추의 WGS를 이용하여 *Tsw* 저항성 유전자의 양 쪽으로 각각 0.7cM의 분자마커를 개발했지만, 더 안쪽의 고추 염기서열을 얻을 수 없었다(Fig. 24). 하지만 염기서열이 비어 있는(missing sequence로 표시) 유전 지역의 양 경계에서는 NBS-LRR 유전자가 발견되었다. NBS-LRR은 대표적인 식물의 우성 저항성 유전자로, 많은 경우 유전체 안에서 gene cluster를 이루고 있다. 이로 미루어 볼 때, *Tsw*가 NBS-LRR 유전자일 가능성이 있고, 그렇지 않더라도 NBS-LRR gene cluster 안에 위치할 가능성이 매우 높다. NBS-LRR gene cluster는 비교적 homology가 높은 여러 paralog/pseudogene이 모여 있는 유전 지역으로 NGS(next-generation sequencing) 방법으로 얻은 short read를 assembly하는 방식으로는 그 염기서열을 모두 얻기가 매우 어렵다. *Tsw* 저항성 유전자의 fine mapping을 하기 위하여 SP F₂ 집단의 저항성 친인 PII52225의 total RNA를 추출하여 전사체를 분석하였다.

(4) 전사체 분석을 통한 *Tsw* 유전지역 delimitation (제 4차년도)

제 4차년도에는 ‘Special’ X ‘PII52225’ F₂ 중간 분리 집단의 크기를 늘려 분자마커의 유전적 거리를 보다 정확하게 분석하고자 했다. 또한 추가적으로 분자마커를 개발하기 위하여 저항성 pool(bulk)와 이병성 pool를 만들고, 전사체(transcriptome)의 염기서열을 분석했다. 제 3차년도에서 0.7cM 분자마커를 개발한 scaffold에서 찾은 NBS-LRR을 reference로 삼아 저항성 pool와 이병성 pool의 digital expression 분석을 통해 발현량의 차이가 있는 후보유전자(candidate gene)를 찾았다. 또한 후보유전자가 위치한 고

추 WGS scaffold에서 분자마커를 개발하여 ‘Special’ x ‘PI152225’ F2 집단에서 0cM 분자마커를 개발했다.

또한 다른 TSWV 저항성 계통인 AC09-207을 이용하여 ‘Jeju’ x ‘AC09-207’ 교배 조합의 F₂ 집단과 (Jeju x AC09-207) x Jeju BC₁ 집단을 작성했고, 지금까지 개발한 T_{SW} 연관 분자마커를 이용하여 공동분리 분석을 한 결과 TSWV 저항성 유전자의 위치를 delimitation하는 데 성공했다.

3차년도에 교배한 *C. annuum* cv. ‘Special’ x *C. chinense* ‘PI152225’ F₁ 종자를 자가교배하여 F₂ 집단의 크기를 기존의 293개체에서 843개체로 증가시켰다. 또 다른 TSWV 저항성 계통인 *C. chinense* ‘AC09-207’을 이용하여 새로운 분리집단을 작성했다. 우선 *C. annuum* ‘Jeju’ x *C. chinense* ‘AC09-207’을 교배하여 F₁을 만들고, F₁을 자가교배하여 104개의 F₂ 집단을 작성했다. 또한 F₁을 다시 *C. annuum* ‘Jeju’와 여교배하여 140개의 BC₁ 집단을 작성했다.

새로운 집단 및 개체의 병 저항성을 평가하기 위하여 TSWV_{Pap}를 각 개체에 접종했다. 접종 후 1주일 뒤에서는 병징이 나타나기 시작하지만, 보다 정확하게 병 저항성을 평가하기 위하여 3주 후에 병징의 유/무를 확인하고 병 저항성 여부를 결정했다. 각 개체의 병 저항성을 한 번 더 확인하기 위하여 ELISA분석을 수행했다. ‘Special’ x ‘PI152225’ F₂ 집단의 전체 843개체 가운데 병 저항성 개체는 598, 이병성 개체는 245개로 3:1 보다는 이병성 개체가 많이 나타남을 알 수 있었다(P=0.0064). ‘Jeju’ x ‘AC09-207’ F₂ 집단은 저항성 74, 이병성 30개체로 3:1 분리비를 보였고(P=0.3652), (‘Jeju’ x ‘AC09-207’) x ‘Jeju’ BC₁ 집단은 저항성 72, 이병성 68개체로 1:1 분리비를 보였고(P=0.7356) (Table 10). AC09-207에서 유래한 F₂, BC₁ 집단은 모두 단일 우성 유전자에 의한 유전 분리비를 보였지만, ‘Special’ x ‘PI152225’ F₂ 집단에서는 3:1 보다 이병성 개체가 많이 나타났다. 그러나 단일 분자마커에 의해 병 저항성을 설명할 수 있다는 점에서 TSWV 저항성 유전자가 단일 유전자좌에 있다고 볼 수 있다.

<Table 10> ‘Special’ X ‘PI152225’ F2, ‘Jeju’ X ‘AC09-207’ F2, (‘Jeju’ X ‘AC09-207’) X ‘Jeju BC1 집단의 저항성 및 이병성 분리비

집단 및 계통	예상되는 비율 (저항성 : 감수성)	개체수		P
		저항성	감수성	
Special	0 : 1	0	20	-
PI152225	1 : 0	20	0	-
AC09-207	1 : 0	20	0	
F2(‘Speical’ X ‘PI152225’)	3 : 1	598	245	0.0064
F2(‘Jeju’ X ‘AC09-207’)	3 : 1	74	30	0.3652
BC1(‘Jeju’ X ‘AC09-207’) X ‘Jeju)	1 : 1	72	68	0.7356

TSWV 저항성 후보 유전자를 찾기 위하여 RNA-SEQ 분석을 수행했다. ‘Speical’ X ‘PI152225’ F2 집단에서 0.7cM의 연관 분자마커 7399-6, 9546-2를 이용하여 동형접합체 저항성, 동형접합체 이병성 개체를 각각 10개체 선발하고 잎 조직에서 GeneAll Hybrid-RTM 키트(GeneAll, Korea)를 사용하여 total RNA를 추출했다. 추출한 total RNA는 nanodrop, Agilent 2100 Bionalyzer를 이용하여 quality 분석을

수행했고, RIN값이 7 이상인 RNA를 뽑아 Illumina NGS 장비로 전사체 염기서열 분석을 NICEM에 분석을 의뢰했다.

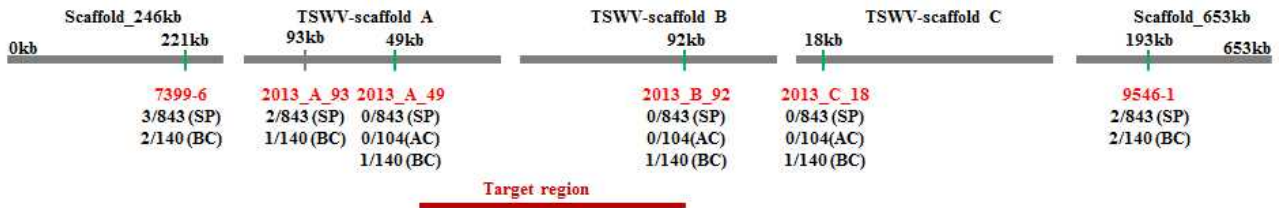
RNA-Seq 분석은 NICEM에 의뢰했다. 우선 R pool의 발현체 서열을 이용하여 de novo assembly를 통해 레퍼런스(reference) 염기서열을 만들고, R pool와 S pool의 digital expression 분석으로 두 개의 pool 사이의 발현량에 차이가 나는 염기서열을 선별했다. 이 가운데, 7399-6, 9546-1 분자마커 주변에 위치한 NBS-LRR 염기서열로 BLAST를 하여, 상동성을 보이는 염기서열을 선별했다. 마지막으로, 염기서열의 길이가 2000bp 이상의 transcript 염기 서열 21개를 선별했다(Table 11). 이 가운데 13개의 transcript 서열은 저항성 pool에서 2배 이상 발현량이 확인되었다.

<Table 11> TSWV 저항성 candidate transcripts의 digital expression 결과

Contig Num,	Contig length	R pool		S pool		Normalized Data(RPKM)		Log2 Ratio
		Reads	Coverage	Reads	Coverage	R	S	
Contig_02364	3689	166	4.47	90	2.45	0.724558	0.335182	-1.11216
Contig_05376	3661	379	10.25	126	3.4	1.666914	0.472843	-1.81775
Contig_05906	3626	254	6.95	109	2.93	1.127924	0.412995	-1.44947
Contig_05104	3617	212	5.82	93	2.54	0.943759	0.353249	-1.41773
Contig_06226	3614	451	12.38	112	3.07	2.00938	0.425771	-2.2386
Contig_05615	3610	230	6.33	156	4.29	1.025875	0.593696	-0.78906
Single_04598	3577	150	4.17	129	3.54	0.675221	0.49547	-0.44656
Single_01776	3570	160	4.48	73	2.04	0.721648	0.280932	-1.36108
Contig_01956	3538	181	5.07	106	2.94	0.823748	0.411618	-1.0009
Contig_05375	3507	440	12.44	172	4.88	2.020183	0.673813	-1.58407
Contig_05374	3483	241	6.87	229	6.47	1.114134	0.903293	-0.30266
Contig_05372	3479	197	5.64	126	3.63	0.911771	0.49758	-0.87374
Contig_05647	3478	343	9.82	141	4	1.587955	0.556975	-1.51149
Contig_05127	3359	414	12.16	351	10.27	1.984559	1.435633	-0.46713
Contig_05173	3234	251	7.73	215	6.6	1.249705	0.913366	-0.45232
Single_05140	3124	402	12.8	63	1.99	2.071995	0.277061	-2.90274
Contig_06227	3053	180	5.84	142	4.63	0.949335	0.63901	-0.57108
Contig_02365	2989	81	2.68	73	2.43	0.436348	0.335539	-0.379
Single_01774	2986	115	3.84	64	2.11	0.620129	0.294467	-1.07446
Contig_05907	2951	117	3.94	58	1.92	0.638396	0.270026	-1.24136
Contig_06225	2287	342	14.82	54	2.33	2.407874	0.324395	-2.89194

21개의 transcript 염기서열을 고추 WGS 염기서열 DB에 BLAST를 했을 때, 지금까지 발견하지 못했던 새로운 3개의 scaffold를 찾아 각각 TSWV-scaffold A, TSWV-scaffold B, TSWV-scaffold C로 명명했다. 3개의 scaffold를 대표하는 분자마커를 디자인하고, 3개의 분리집단에서 총 6개의 다형성 있는 분자마커로 공분리 분석을 수행했다(Fig. 25). TSWV-scaffold A에서 개발한 2013_A_49 분자마커, TSWV-scaffold B에서 개발한 2013_B_92 분자마커, TSWV-scaffold C에서 개발한 2013_C_18 분자마커는 'Special' x 'PI152225' F2, 'Jeju' x 'AC09-207' F2에서 모두 재조합형과 나타나지 않아 TSWV 저항성

유전자로부터 0cM의 유전적 거리로 분석되었다. 그러나 ('Jeju' X 'AC09-207') X 'Jeju BC1' 집단에서는 모두 각각 1개의 재조합형이 나타났는데, 2013_A_49 분자마커와 2013_B_92 분자마커 사이에서 재조합형의 pattern이 변해 TSWV 저항성 유전자가 2개의 분자마커 사이에 존재함을 알 수 있었다(Table 12).

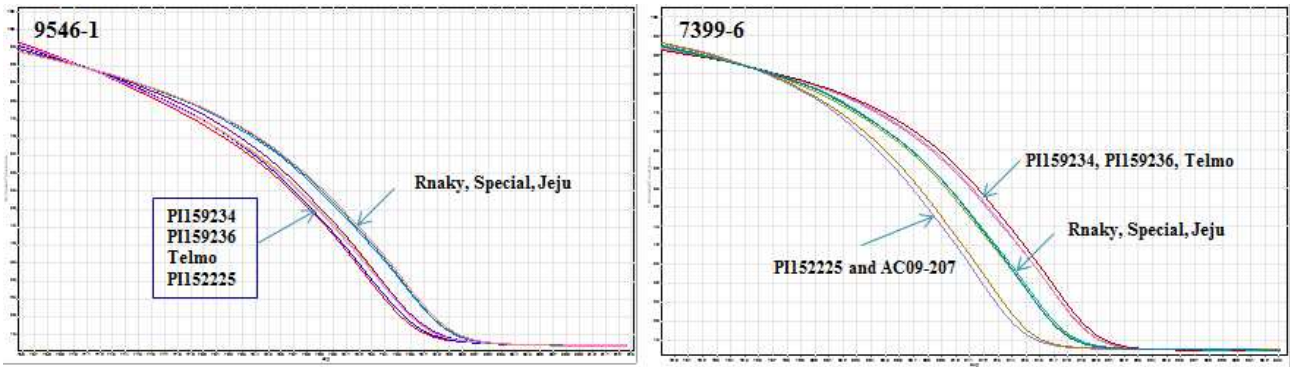


<Fig. 25> TSWV 저항성 유전 지역의 delimitation. 총 5개의 scaffold(회색으로 표시)에서 6개의 다형성 있는 분자마커(붉은 색으로 표시)를 개발했고, 3개의 분리집단 'Special' x 'PI152225' F2(SP), 'Jeju' x 'AC09-207' F2(AC), ('Jeju' X 'AC09-207') X 'Jeju BC1(BC)에서 공분리 분석

<Table 12> ('Jeju' X 'AC09-207') X 'Jeju BC1'의 병 저항성 및 분자마커의 유전형 (재조합체는 회색 음영으로 표시)

개체번호	6	56	75	113
병 저항성	R	R	R	R
7399-6	H	S	H	S
2013_A_93	H	S	H	H
2013_A_49	H	S	H	H
2013_B_92	S	H	H	H
2013_C_18	S	H	H	H
9546-1	S	H	S	H

기개발된 TSWV 저항성 연관 분자마커인 SCAC568(Moury et al. 2000)은 모든 저항성 및 이병성 계통에서 다형성을 보이지 않았다. 본 연구과제에서 개발한 7396-6과 9546-1 분자마커가 다양한 저항성 및 이병성 계통s를 구분할 수 있는지 확인하기 위하여 7399-6 분자마커와 9546-1 분자마커를 이용하여 PI159234, PI159236, PI152225, Telmo (Enza Zaden 품종)을 저항성 대조군(control)으로, Rnaky, Jeju, Special (Enza Zaden 품종)을 이병성 대조군으로 사용하여 분자마커의 유전형을 분석했다(Fig. 26). 9546-1 분자마커는 이병성과 저항성 대조군 각각이 하나의 해리곡선 그룹을 이루었다. 반면 7399-6 분자마커는 이병성이 하나의 해리곡선 그룹으로 구분되지만, 저항성 계통이 PI159234, PI159236, Telmo 와 PI15225, AC09-207 해리곡선 그룹으로 나누어진다. 두 개의 분자마커 모두 이병성과 저항성을 구별할 수 있기 때문에 보다 범용적으로 육종에 활용할 수 있을 것으로 보인다.



<Fig. 26> 9546-1, 7399-6 분자마커의 저항성 및 이병성 계통 유전형 분석. 저항성과 이병성 계통의 해리곡선이 뚜렷하게 구별이 된다.

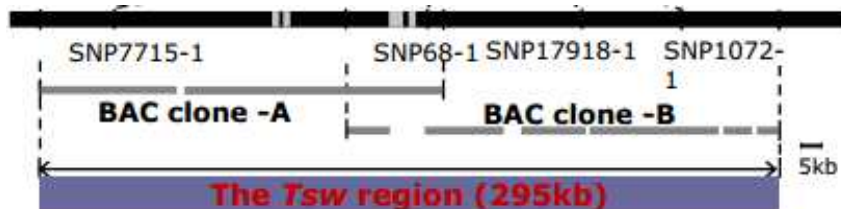
(5) 고추 TSWV 저항성 분자마커 개발 및 후보유전자 동정 (제 5차년도)

제 4차년도에는 ‘Special’ X ‘PI152225’ F₂ 중간 분리 집단의 크기를 증가시켜 분자마커의 유전적 거리를 보다 정확하게 분석했고, 저항성 및 이병성 전사체 pool의 digital expression 분석을 통해 후보유전자(candidate gene)을 찾고, 더 나아가 후보유전자가 포함된 고추 WGS scaffold에서 0cM 분자마커를 개발하고, Tsw 저항성 유전자의 유전범위를 delimitation 한 바 있다.

제 5차년도에는 delimitation 된 유전지역 내에 있는 고추 WGS의 gap을 채워 온전한 염기서열 정보를 수집하고자 했다. 또한 고추의 reference 유전체 서열이 *C. annuum* ‘CM334’에서 유래했기 때문에 TSWV 저항성이 없고, PI152225가 *C. chinense*에 속해 유전체의 gene contents나 염색체 구조 등이 동일하지 않기 때문에, 동일한 *C. chinense*에 속하면서 TSWV 저항성을 갖고 있는 PI159236 유래 집단의 저항성 및 이병성 pool의 전사체 분석을 통해 후보 유전자를 찾고자 하였다.

TSWV 저항성 유전자가 있을 것으로 예상되는 유전지역의 gap을 채우기 위해 TSWV 저항성 유전자에 가깝게 연관된 2013_A_93, 2013_A_49, 2013_B_92, 2013_C_18, 9546-1 분자마커를 이용하여 CM334로부터 유래한 BAC library screening을 통해 gap filling을 시도했다. 그 결과 총 5개의 BAC clone을 선별했고 각 BAC clone의 양 쪽 끝 염기서열을 분석했다.

고추 WGS scaffold 염기서열 DB가 업데이트되면서 scaffold sequence가 더 길게 확장되었고, 총 5개의 scaffold가 3개의 scaffold로 압축되었다. 고추 WGS scaffold 염기서열과 비교분석한 결과 2개의 BAC 클론이 A, B scaffold 사이의 gap을 채울 수 있었다. 3개의 scaffold와 2개의 BAC 클론의 염기서열을 이용하여 하나의 긴 염기서열을 완성했다 Fig. 27).



<Fig. 27> 고추 WGS(검은 막대)에 존재하는 gap(회색 부분)을 2개의 BAC 클론 A, B 염기서열로 채움

나. 고추 역병 저항성 분자마커 개발(1-5차년도)

고추 역병은 국내 고추에 가장 큰 피해를 주는 병 중 하나로 고추 병저항성은 QTL에 의해 유전되는 것으로 알려졌다. 연구 그룹에 따라 그리고 저항성 계통의 종류에 따라 QTL의 수 및 위치는 다르지만, 공통적으로 염색체 5번에 주동 QTL이 존재하는 것으로 밝혀졌다. QTL의 mapping을 위해 많은 분자마커가 개발되었지만 AFLP, RFLP, RAPD 인 경우가 많아 실제 육종에는 많은 어려움이 있다.

(1) BC₁F₁ 집단 작성 및 유전자지도를 활용한 연관 분자마커 개발(제1차년도)

육종에 활용할 수 있는 분자마커를 개발하기 위해서 염색체 5번에 위치하는 주동 QTL에 연관된 분자마커를 개발하려 하였다. 역병 저항성 분리집단은 N 종묘 회사로부터 제공받은 BC₁F₁ 세대의 집단을 사용했다. 또한 N 종묘 회사는 BC₁F₁ 집단 200개체에 3×10⁵ zoospore/ml 농도로 역병을 접종하였고, 표현형을 분석했다. 표현형은 1(저항성)부터 5(이병성)까지 병 지수로 나타냈다. BC₁F₁ 집단의 200개체와 그 부친, 모친으로부터 잎 시료를 채취하고, CTAB 방법을 통해 gDNA를 추출했다. 현재 실험실에서 만들고 있는 유전자지도에 있는 염색체 5번의 intron based marker를 이용해 부친 및 모친 사이에 다형성을 검정했다. 다형성이 있는 분자마커는 다시 BC₁F₁ 집단 176개체에 공분리비를 분석하였다.

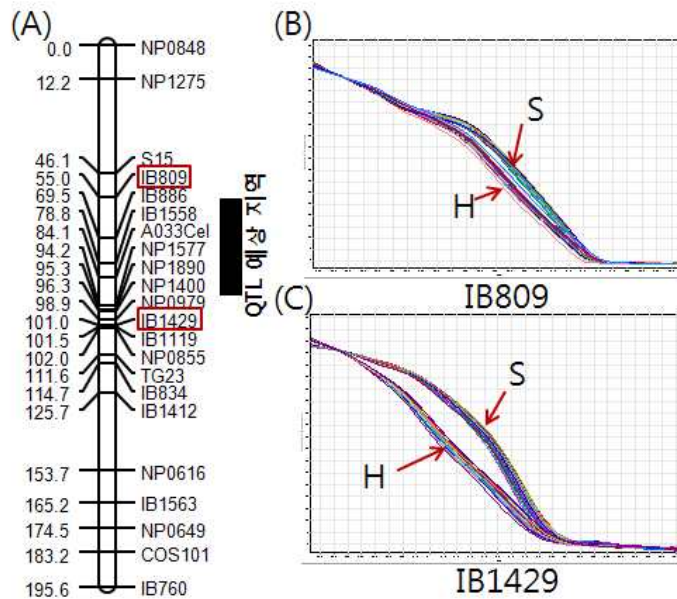
BC₁F₁의 표현형은 병 지수 1과 병 지수 5에 속하는 개체수가 가장 많으며 병 지수 2, 3, 4는 20개체 미만인 반면 부·모친인 P1, P2의 표현형은 명확하게 지수 1과, 지수 5에 속하는 양상을 보인다(Fig. 28). 이론적으로는 BC₁F₁ 세대이기 때문에 저항성:이병성 개체의 비율이 1:1이 나와야 하지만 저항성(1)이 이병성(5)에 비해 상대적으로 적은 양상을 보인다.

5번에 위치하는 역병 저항성 주동 QTL 연관 분자마커를 개발하기 위해 우선은 염색체 5번에 있는 역병 저항성 연관 분자마커로 논문에서 발표된 P5-SNAP-CM, P5-SNAP-Chil, P5-SNAP-R을 이용해 부·모친 사이에 다형성이 있는지 확인해 보았지만, 뚜렷한 다형성은 찾을 수 없었다. 다음으로 이 분자마커를 개발한 BAC clone의 염기서열 정보를 제2-1세부과제 책임자로부터 제공받아 분자마커를 개발하려 했다. 이 BAC clone은 repeat가 많이 존재하는데, 이 repeat가 없는 4개의 지역에서 primer set를 design 했지만, 부·모친 사이에 다형성이 있는 분자마커를 개발할 수 없었다.

다음으로는 염색체 5번에 존재하는 기개발된 SSR, Intron-based 분자마커, COSII 분자마커 등을 이용해 부·모친 사이의 다형성이 있는지 검정했다. 총 10개의 intron-based 분자마커, 13개의 토마토 COSII 분자마커, 5개의 SSR 분자마커, 이 가운데 2개의 intron-based 분자마커인 IB1429, IB809에서 부·모친 사이에서 다형성을 발견할 수 있었다(Fig. 29). 이 2개의 intron-based 분자마커를 176개의 BC₁F₁개체와 co-segregation analysis를 수행했다. 그 결과 IB809에서는 176개 중 65개, IB1429에서는 77개의 재조합형을 확인했다. 이로 미루어 5번 염색체에 있는 주동 QTL은 IB809와 IB1429 사이에 있는 것으로 추측할 수 있었다.



<Fig. 28> 부친 및 모친, BC₁F₁의 병 접종 결과. (A)부친, (B)모친, (C)BC₁F₁의 병 지수 별 개체수



<Fig. 29>. 고추 염색체 5번 유전자 지도 및, 다형성 있는 2개의 intron-based 분자마커

(2) 비교유전체 정보 및 BSA-SFP를 활용한 분자마커 개발(제 2차년도)

집단과 RIL 집단에서 주동 QTL 연관 분자마커를 개발하기 위하여 AC99에 있는 Intron-based 분자마커의 다형성 검정을 수행하고, 다형성 있는 분자마커를 선발하여 집단의 전 개체의 유전형을 분석하여 가깝게 연관된 분자마커를 개발했다. 또한 UC DAVIS의 pepper Affymetrix chip을 이용하여 BSA-SFP 방법을 통해 새로운 분자마커의 개발을 시도했다. RIL 집단의 저항성 20개체와 이병성 20개체로부터 각각 gDNA를 추출하여 같은 농도로 희석한 뒤 섞어 저항성 pool과 이병성 pool을 만들었다. 각 pool에 DNase를 처리하고 Affymetrix chip에 처리하여 유의성 있게 차이가 나는 EST sequence를 확보하고 고추의 상동성이 높은 full genome sequence를 이용하여 분자마커를 개발했다.

저항성 대조군으로는 일당백, 일월산천, 무한질주를 사용했고, 이병성 대조군으로는 부강을 사용했다. 일당백과 일월산천의 F₂ 집단과 “YCM334 X Tean” RIL 집단의 역병 저항성을 검정을 3×10⁴ zoospore/ml의 농도로 접종했다. 병 저항성 지수는 0-3으로 4단계로 이루어져 있는데, F₂ 집단에서는 병 저항성 지수 0을 저항성으로, 나머지 1, 2, 3을 이병성으로 분류했다. RIL 집단은 한 계통 당 10개체를 검정했는데, 모든 개체에서 0이 나오는 계통은 고정된 저항성으로 모든 개체에서 3이 나오는 계통은 고정된

이병성으로, 여러 병 저항성 지수가 섞여 있는 계통은 분리하는 저항성 계통으로 분류했다. 일당백 F₂는 저항성:이병성 분리비가 3:1로 하나의 저항성 유전자에 의해 분리되는 유전 양상을 보였지만 일월산천 F₂는 저항성:이병성 분리비가 3:1을 만족하지 않았다(Table 13). 3:1로 분리되는 일당백 F₂는 염색체 5번의 major QTL의 역할이 극대화 된 집단으로 판단하여 이후의 분자마커 개발에 활용했다. "YCM334 × Tean" RIL 집단의 경우는 고정된 저항성과 고정된 이병성은 1:1의 분리비를 보였고, 이들을 선발하여 이후 분자마커 개발에 활용했다(Table 13).

5번 주동 QTL과 연관된 분자마커를 개발하기 위하여 AC99 유전자 지도의 염색체 5번에 위치한 Intron-based 분자마커와 FA-COSII 유전자 지도의 염색체 5번에 위치한 COSII 분자마커의 다형성 검정을 수행했다. 총 12개의 분자마커 가운데 intron-based 분자마커인 IB1558과 C2_At2g01770에서 다형성을 확인했다. 일당백 F₂에서는 IB1558과 C2_At2g01770에서 모두 다형성을 보였고, "YCM334 × Tean" RIL 집단에서는 IB1558 분자마커만이 다형성을 보였다. 이 두 종류의 분자마커를 이용해 일당백 F₂ 집단과 "YCM334 × Tean" RIL 집단에서 co-segregation analysis를 수행했다. C2_At2g01770 분자마커는 일당백에서는 155개체 중 26개체에서 재조합형으로 나타났다. IB1558 분자마커는 일당백에서는 162개체 중 32개체가, "YCM334 × Tean" RIL 집단에서는 143개체 중 20개체가 재조합형으로 나타났다(Table 14).

<Table 13> 일당백 F₂ 집단, "YCM×Tean" RIL 집단, 상품품종에서의 co-segregation analysis

분자마커	재조합 개체/총 집단수		
	일당백(F ₂)	상품종자	YCM x TEAN (RIL)
Contig000716	50/162	-	55/143 = 38.5cM
IB 1558	32/162	31/82	8620/143 = 14cM

<Table 14> 일당백, 일월산천 F₂ 집단과 "YCM334×Tean" RIL 집단에서의 표현형 검정

집단	예상되는 비율 (저항성 : 감수성)	개체수		X ²	P
		저항성	감수성		
일당백 F ₂	3 : 1	149	45	0.34	0.56
일월산천 F ₂	3 : 0	110	15	11.27	0.0008
"YCM334 x TEAN" RILs	1 : 1	65	78	1.18	0.28

5번 주동 QTL 연관 분자마커를 개발하기 위해 BSA-SFP 실험도 수행했다. "YCM334 × Tean" RIL 집단의 고정된 저항성 19개체와 YCM334의 gDNA를 같은 비율로 합쳐 저항성 bulk를 만들고, 고정된 이병성 19개체와 태안재래의 gDNA를 같은 비율로 섞어 이병성 bulk를 만들었다. 각 gDNA의 bulk를 DNase로 처리한 뒤 Affymetrix chip에 처리했다. 총 10개의 probe는 bulk 사이에 유의미한 차이가 인정되어 BLAST 검색을 통해 각 probe를 annotation했다(Table 15). 그 결과 10개 중 8개는 pepper의 유전 정보가 아닌 난균, 곰팡이, 조류 등의 유전정보로 annotation되었고, 단 2개의 CAPS_CONTIG.11101과

CAPS_CONTIG.3667 probe만이 고추의 유전정보로 annotation되었다. 이 2개의 probe는 각각 receptor-like protein kinase와 SAR82A gene promoter region와 높은 상동성을 보였는데, 모두 병 저항성과 연관이 있다는 연구 결과가 발표된 바 있다. 이 2개의 probe를 이용해 분자마커를 개발하기 위하여 고추의 전체 유전체 서열 DB에 BLAST 검색을 하여 상동성이 높은 고추 유전체 서열을 찾았다. CAPS_CONTIG.11101 probe로는 CONTIG049087과 CONTIG000716을 찾았고, CAPS_CONTIG.3667로는 CONTIG002466을 찾았다. CAPS_CONTIG.11101에서 찾은 CONTIG000716에서는 일당백 F₂ 집단과 "YCM × Tean" RIL 집단에서 다형성이 있는 분자마커의 개발에 성공했다. 그러나 co-segregation analysis 결과 기존에 개발한 IB 1558 보다 유전적 거리가 더 먼 것으로 확인되었다(Table 15). CAPS_CONTIG.3667와 높은 상동성을 보이는 CONTIG002466에서 개발한 분자마커는 일당백 F₂ 집단과 "YCM × Tean" RIL 집단에서 다형성을 확인하지는 못했지만, AC99 집단에서 mapping한 결과 IB1558 분자마커와 가깝게 위치하는 것을 확인할 수 있었다.

5번 주동 QTL과 가깝게 연관된 분자마커인 IB1558, SNP-002466가 육종 계통에서도 활용가능한지 알아보기 위하여 3개 육종회사 신젠타종묘, 농우바이오, 사카타코리아의 역병 저항성 34품종 및 이병성 19품종으로 총 53품종을 수집하여 분자마커로 검정했다(Table 16). IB1558 분자마커로는 53품종 중 6품종이 재조합형로 확인되었고, SNP-002466 분자마커로는 53품종 가운데 2품종이 재조합형로 확인되었다. 단 하나의 재조합형만이 IB1558, SNP-002466에서 모두 recombinant로 분석되었고, 다른 재조합형은 하나의 분자마커에서만 재조합형으로 분석되었다. SNP-002466 분자마커로 확인한 재조합형 2개는 모두 이병성 품종에서만 확인되었고, 저항성 품종에서는 단 하나의 재조합형도 확인되지 않았다. 반면 IB1558은 저항성 2 품종과 이병성 4 품종에서 모두 재조합형이 확인되었다. 이 결과로 미루어 보아 IB1558보다는 SNP-002466이 5번 역병 저항성 주동 QTL에 더 가까운 분자마커로 보이며, 육종에의 활용도도 더 높을 것으로 판단된다.

<Table 15> BSA-SFP 실험 결과 저항성 및 이병성 bulk에서 유의미한 차이를 보이는 Probe 리스트

Probe sets (Dstat)≥3 or ≤-3	Annotation
KS01002A01	Fungi rRNA
KS13044H11	Phytophthora rRNA intergenic spacer region
KS13069H05	Oomycetes and algae rRNA
KS13071A09	Oomycetes mitochondrion
KS13072H02	Oomycetes rRNA
KS13074A10	Oomycetes rRNA
CAPS_CONTIG.3688	Oomycetes rRNA
CAPS_CONTIG.3394	Phytophthora cytochrome oxidase subunit II (cosII)
CAPS_CONTIG.11101	Receptor-like protein kinase mRNA (<i>C. annuum</i>)
CAPS_CONTIG.3667	SAR82A gene promoter region

<Table 16> 역병 저항성 분자마커 SNP-002466과 IB1558로 분석한 유전형

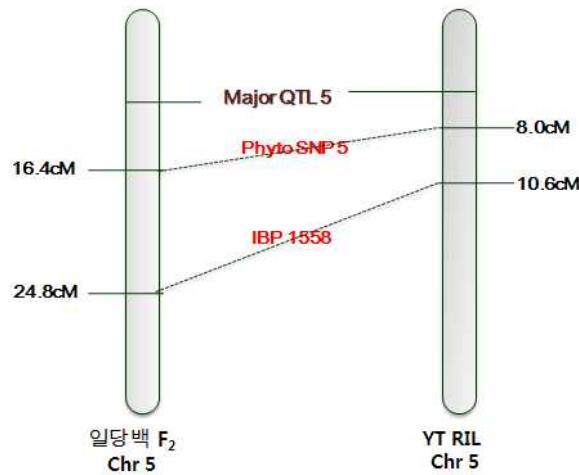
번호	품종명	회사명	병 저항성	유전형	
				SNP-002466	IB1558
1	군계일학	신젠타종묘	역병,바이러스	H	H
2	금빛	신젠타종묘	바이러스	S	S
3	금향	신젠타종묘	바이러스	S	S
4	기립박수	신젠타종묘	역병,바이러스	H	H
5	대장부	신젠타종묘	바이러스	S	S
6	독야청청	신젠타종묘	역병,바이러스	H	H
7	만사형통	신젠타종묘	역병,바이러스	H	H
8	무한질주	신젠타종묘	역병,바이러스,청고병	H	H
9	박장대소	신젠타종묘	역병,바이러스	H	H
10	불맛	신젠타종묘	바이러스	S	S
11	선구자	신젠타종묘	역병	H	H
12	일등공신	신젠타종묘	역병,바이러스	H	H
13	일송정	신젠타종묘	역병,바이러스	H	H
14	일인자	신젠타종묘	역병,바이러스	H	H
15	천년만년	신젠타종묘	역병,바이러스	H	H
16	축제	신젠타종묘	바이러스	S	S
17	한손	신젠타종묘	바이러스	S	S
18	행운	신젠타종묘	바이러스	S	S
19	강력태양	농우바이오	바이러스(TMV-P3,CMV-fny)	S	-
20	당찬	농우바이오	바이러스(TMV-P4,CMV-fny)	S	H
21	마니따	농우바이오	바이러스(TMV-P6,CMV-fny)	S	S
22	베로따	농우바이오	역병,바이러스(CMV-fny)	H	H
23	슈퍼마니따	농우바이오	바이러스(CMV-fny)	S?	H
24	영양맛	농우바이오	바이러스(CMV-fny)	H	S
25	오복	농우바이오	바이러스(CMV-fny)	S	S
26	조생후담	농우바이오	역병	H	S
27	진미	농우바이오	바이러스(TMV-P3,CMV-fny)	S	S
28	탄탄대목	농우바이오	역병	H	H
29	태산	농우바이오	역병,	H	S
30	참마니	농우바이오	바이러스(TMV-Po,	S	H
31	참조은	농우바이오	바이러스(CMV-fny)	S	S
32	한반도	농우바이오	바이러스(TMV-Po,	S	S
33	한관승	농우바이오	역병	R	R
34	홍미인	농우바이오	역병,바이러스(CMV-fny)	H	H
35	홍진주	농우바이오	바이러스(CMV-fny)	S	S
36	희망봉	농우바이오	바이러스(CMV-fny)	H	H
37	PR금맥	농우바이오	역병,바이러스(CMV-fny)	H	H
38	PR대춘	농우바이오	역병	H	H
39	PR마니따	농우바이오	역병	H	H
40	PR만세	농우바이오	역병,바이러스(CMV-fny)	H	H
41	PR상생	농우바이오	역병,바이러스(CMV-fny)	H	H
42	PR썬	농우바이오	역병	H	R
43	PR신나라	농우바이오	역병,바이러스(CMV-fny)	H	H
44	PR어울림	농우바이오	역병,바이러스(CMV-fny)	H	H
45	PR열정	농우바이오	역병,바이러스(CMV-fny)	H	H
46	PR과워	농우바이오	역병	H	H
47	독불왕	사카타코리아	역병	H	H
48	불세출	사카타코리아	역병,바이러스	H	H
49	미팅(대목)	사카타코리아	역병,청고병,바이러스(TMV-L1)	H	H
50	수비역	사카타코리아	역병	H	H
51	신세계	사카타코리아	역병,바이러스	H	H
52	안전벨트	사카타코리아	역병,바이러스	H	H
53	카타구루마	사카타코리아	역병,바이러스(TMV)	H	H

(3) 후보유전자를 이용한 분자마커 개발 및 QTL 분석(제 3차년도)

3차년도에는 2차년도에 찾은 2개의 candidate gene의 염기서열을 확보하고, 분자마커를 개발해 YT RIL 및 AC99 집단에 mapping했다. 2개의 candidate에서 개발한 분자마커 가운데 하나인 PhytoSNP5는

일당백 F₂, YT RIL 집단에서 모두 염색체 5번에 있는 주동 QTL에 가깝게 연관되었다. PhytoSNP5 분자 마커가 다른 육종재료에서도 활용가능한지 알아보기 위하여 3개의 육종회사의 계통을 분석했다. 또한 100 개의 역병 저항성/이병성 품종을 virulence가 다른 4개의 균주에 접종하고, 그 결과와 PhytoSNP5의 유전형형을 비교했다. 마지막으로 고추의 WGS를 이용해 4개의 분자마커를 더 개발한 뒤, PhytoSNP5의 phenotypic variation을 계산했다.

2차년도에 BSA-SFP 방법으로 찾은 2개의 candidate gene의 염기서열을 이용해 Contig_Phyto001 과 Contig_Phyto002 분자마커를 개발했다. Contig_Phyto001을 일당백 F₂ 집단과 YT RIL집단에 적용한 결과 각각 16.4cM, 8.0cM의 유전적 거리에 위치하는 것으로 분석되었다. Contig_Phyto001 분자마커는 지금까지 개발한 분자마커 가운데 5번 주동 QTL에 가장 가깝게 연관되었기 때문에 그 이름을 PhytoSNP5 로 개명했다(Fig. 30). PhytoSNP5와 2차년도에 개발한 가장 가까운 분자마커인 IBP 1558의 재조합체의 유전형형을 비교해 볼 때, 138-1, 193-2, 196-1, 265, 273-2, 354-2, 146-1, 153-2, 214-2 이렇게 9개체가 두 개의 분자마커에서 모두 재조합체이기 때문에, 2개의 분자마커는 주동 QTL로부터 한 쪽 방향에 있을 것으로 예상된다(Table 17).



<Fig. 30> 일당백 F₂, YT RIL 집단에서의 PhytoSNP5 mapping

<Table 17> YT RIL 집단 재조합체의 역병 저항성 및 분자마커의 유전형 (분자마커 별 재조합체는 회색 음영으로 표시함)

분자마커	재조합체의 유전형													
	138-1	193-2	196-1	265	273-2	354-2	146-1	153-2	214-2	50-1	357	26	228-1	228-1-1
PhytoSNP5	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S
IBP1558	S	S	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R
병지수	0	0	3	0	3	3	2	0	0	3	3	0	3	3

PhytoSNP5 분자마커의 효용성을 검증하기 위하여 일당백 F₂, YT RIL이 아닌 다른 집단 및 계통에 적용했다. 3개의 육종 회사로부터 각각 57, 34, 576 개체를 분양받아 PhytoSNP5의 유전형을 분석해 역병 저항성과 비교했다. 3개의 육종회사 가운데 2개 회사에서는 약 90% 이상의 표현형을 예측할 수 있었지만 1개의 육종회사에서는 약 70% 정도에 그쳤다. 역병이 QTL에 의해 유전되는 점을 생각해 볼 때, PhytoSNP5의 효용성은 매우 높다고 볼 수 있다. 그러나 육종 회사에 따라 사용하는 역병 저항성의 유전적인 배경이 다를 경우에는 PhytoSNP5 분자마커의 정확성이 떨어질 우려가 있다.

<Table 18> 3개 육종 회사의 계통을 이용한 PhytoSNP5의 효용성 평가 (재조합형은 빨간색으로 표시함)

육종 회사	병 지수	총 개체수	Phyto SNP5 유전형		
			R	H	S
가	R	34	0	32	2
	S	23	0	17	6
	재조합체수/집단크기		19/57 (67%*)		
나	R	34	23	11	0
	S	0	0	0	0
	재조합체수/집단크기		0/34 (100%*)		
다	R	536	223	263	21
	S	86	4	35	30
	재조합체수/집단크기		60/576 (89.5%*)		

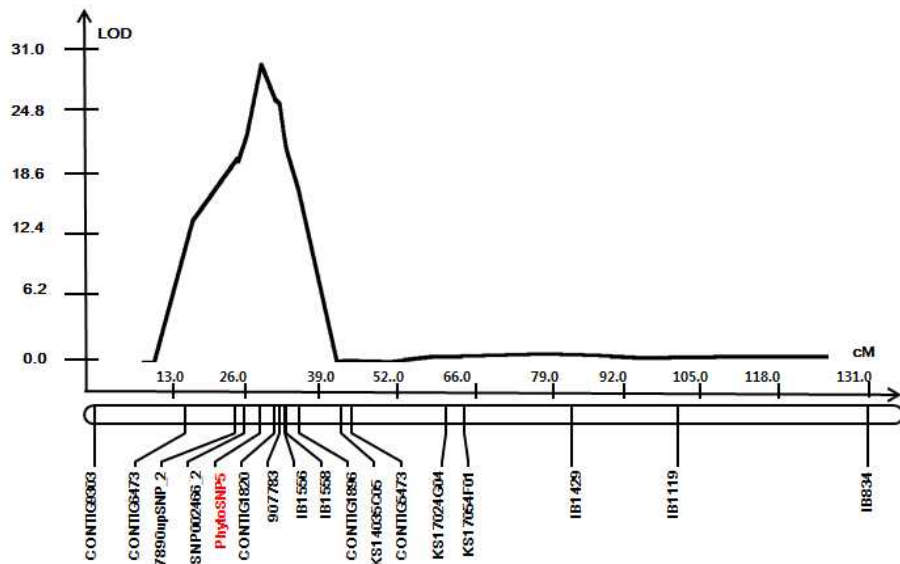
다시 한 번 PhytoSNP5의 효용성을 검증하기 위하여 100개의 역병 저항성/이병성 품종을 골라 병원성(virulence)이 다른 4개의 *Phytophthora* isolates인 MY-1, KPC-1, JHAI1-7, KPC-7 (왼쪽보다 오른쪽 strain의 virulence가 더욱 강함)로 각각 접종하여 병 저항성을 평가하고, PhytoSNP5의 유전형을 분석했다(Table 18.). 100개의 품종의 유전형은 모두 heterozygous (H) 또는 susceptible (S)로 분석되었다. 병원성이 약한 strain인 MY-1으로 접종한 결과는 0% 혹은 100% disease severity에 가까워 저항성과 이병성이 매우 뚜렷한 양상을 보이고, 균주의 병원성이 강해질수록 다양한 disease severity spectrum을 보인다. Disease severity를 PhytoSNP5의 유전형과 비교할 때에도 병원성이 약한 균주로 접종했을 때에 표현형과 유전형이 맞게 나타났다(MY-1 균주로 접종했을 때, 93%가 서로 맞게 분석됨). 병원성이 약한 균주로 접종할 때는 주동 QTL에 의한 저항성 기여도가 높기 때문인 것으로 보인다. PhytoSNP5는 주동 QTL을 탐지하기에는 매우 좋은 분자마커라는 결론을 다시 한 번 얻을 수 있었다. 그러나 PhytoSNP5로 선발을 해도 minor QTL이 없다면 강한 병원성 균주에 의해 병원성이 깨질 수 있기 때문에 minor QTL을 선발할 수 있는 분자마커를 시급히 개발할 필요가 있다.

(4) 초고밀도 유전자 지도를 이용한 QTL 분석(제 4차년도)

4차년도에는 보다 정확한 QTL 분석을 하기 위하여 UC-DAVIS의 초고밀도 유전자 지도 (high-resolution map)을 이용하여 고추 5번 염색체에 약 40cM 유전지역에 해당하는 8개의 분자마커를 개발했고, 3차년도까지 개발한 9개의 분자마커를 포함하여 총 17개의 분자마커를 이용하여 QTL 분석을 수행했다.

UC-DAVIS의 초고밀도 유전자 지도의 대부분의 분자마커는 고추의 EST를 바탕으로 디자인되어 있다. 역병 저항성 주동 유전자에서 가장 가깝게 연관된 PhytoSNP5 분자마커에서 약 4.5 cM 떨어진 IB1558은 UC-DAVIS의 유전자 지도에도 공통적으로 존재하기 때문에 YT-RIL의 유전자 지도와 비교할 수 있는 기준(common marker)으로 삼았다. YT-RIL 집단에서 분자마커를 개발하기 위하여 IB1558과 같은 EST에서 개발한 UC-DAVIS의 분자마커를 기준으로 위 아래쪽으로 새로운 분자마커를 선발하고, 해당 분자마커의 EST 염기서열을 확보했다. EST는 엑손(exon)으로 구성된 염기서열로 인트론(intron)이나 유전자 간 염기서열(intergenic sequence)에 비해 다형성이 적다. EST 양 쪽에 존재하는 유전자 간 염기서열을 얻기 위하여 고추의 WGS DB에 BLAST를 수행하여 유사성(homology)이 높은 유전체 염기서열을 확보했다.

확보한 유전체 염기서열에서 프라이머를 디자인하고 YT-RIL 집단의 부모인 *C. annuum* 'YCM334', *C. annuum* 'Tean'에서 PCR을 수행하여 염기서열을 분석하고, 두 부모 사이의 SNP를 찾아 다시 HRM 분자마커 프라이머를 디자인했다. 두 부모를 대조군으로 HRM 분석을 수행하여 다형성이 있는 분자마커를 찾고, 전체 YT-RIL 집단의 유전형을 분석했다. PhytoSNP5를 기준으로 위쪽 방향(north direction)으로 4.1cM 위치에 7890upSNP_2, 2.5cM 위치에 SNP002466_2를 개발했고, 아래쪽 방향(south direction)으로 2.5cM 위치에 CONTIG1820, 3.3cM 위치에 907783, 6.6cM 위치에 CONTIG1896, 13.5cM 위치에 KS14035C05, 30.1cM 위치에 KS17024G04, 33.1cM 위치에 KS17054F01 분자마커를 개발했다. 최종적으로 총 131cM 유전지역의 17개 분자마커를 확보했고, 특히 PhytoSNP5 주변의 약 27.3cM 유전지역에 11개의 분자마커를 개발하여 평균 분자마커 사이의 거리가 2.4cM로 saturation시켰다. 17개의 분자마커를 이용하여 QTL cartographer 프로그램을 이용하여 분석한 결과 CONTIG6473으로부터 CONTIG1896까지 약 20cM의 유전지역에 해당하는 분자마커에서 LOD 값이 주변 유전지역에 비해 높게 나타났고, 특히 PhytoSNP5 분자마커에서는 LOD가 30.14로 가장 높은 값을 나타내 PhytoSNP5를 중심으로 역병 저항성 주동 유전자가 위치함을 확인할 수 있었다(Fig. 31, Table 19).



<Fig. 31> YT-RIL의 composite interval mapping (CIM) 분석 결과. 총 17개의 분자마커로 QTL 분석을 수행한 결과 PhytoSNP5 분자마커를 중심으로 약 20cM에 해당하는 유전지역에서 LOD 값이 높게 나타났다.

<Table 19> PhytoSNP5을 중심으로 한 유전지역의 LOD, R², additive effect(Add)

Trait	Chromosome	Markera	Position (cM)	Composite interval mapping results		
				LOD	R ² (%)	Add
Root	5	CONTIG6473	14.8	14.98	40.55	0.64
		7890upSNP_2	22.9	20.31	51.86	0.72
		SNP002466_2	24.5	23.07	57.03	0.76
		PhytoSNP5	27	30.14	67.68	0.82
		CONTIG1820	29.5	26.56	62.10	0.79
		907783	30.3	26.23	60.63	0.78
		IB1556	31.1	22.80	55.55	0.75
		IB1558	31.5	21.49	53.59	0.73
		CONTIG1896	33.6	17.51	46.80	0.69

(5) 분자마커 개발과 상업품종으로의 적용 및 기존마커와 비교(제 5차년도)

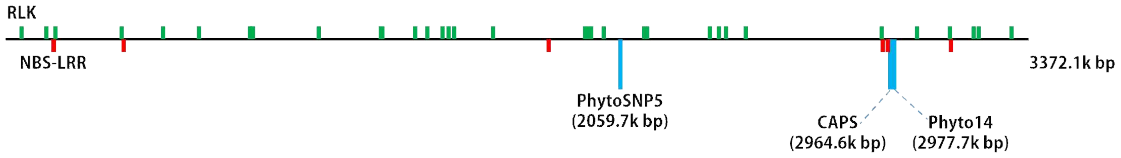
제 5차년도에 고추 역병 저항성 분자마커 개발의 최종 목적은 상업품종 F₁에서 역병 저항성 품종을 선발하는데 있다. 따라서 상업품종 F₁에서 역병 저항성 표현형과 PhytoSNP5를 이용한 유전형이 일치되어야 한다. 100개의 상업품종 F₁을 대상으로 표현형과 유전형 조사를 실시한 결과 약 14% 정도의 불일치 결과가 확인되었다. 따라서 QTL 분석 결과 LOD 값이 가장 높은 scaffold상에서 PhytoSNP5를 중심으로 인근 지역의 분자마커의 개발이 필요하다고 판단하였다.

대상 scaffold를 FGENESH를 이용하여 gene prediction을 실시하여 총 538개의 후보 유전자를 발견하였다. 후보 유전자들이 어떤 종류의 유전자인지 확인하기 위하여 후보 유전자들을 대상으로 NCBI에서 blastx를 수행한 결과 총 34개의 Receptor Like Kinase (RLK)와 8개의 Nucleotide-Binding Site - Leucine-Rich Repeat (NBS-LRR)를 확인할 수 있었다. NBS-LRR domain을 NCBI에서 blastx를 하였을 때 identity값이 가장 높은 두 개의 NBS-LRR을 역병 저항성 후보 유전자로 선택하였다. 두 개의 NBS-LRR은 scaffold 상에서 PhytoSNP5의 양 옆에 위치하고 있으며 SNP를 찾기 위하여 domain의 양 옆 UTR을 대상으로 시퀀싱을 진행하였다. 두 개의 NBS-LRR 중 아래쪽 방향(south direction)에 위치한 NBS-LRR의 5'-UTR에서 역병 저항성 계통과 이병성 계통간의 SNP를 찾을 수 있었으며 CAPS 마커로 디자인 하였다.

기존의 연구를 통해 역병 저항성 계통인 YCM334와 태안재래의 전사체 염기서열을 얻을 수 있었다. PhytoSNP5가 있는 scaffold를 reference로 한 뒤 두 종류의 전사체 염기서열을 alignment 시켰을 때 총 69개의 SNP를 찾을 수 있었다. 서울대학교 원예작물유전체학연구실의 BAC Database (<http://cab.pepper.snu.ac.kr/>)를 활용하여 repeat이 없는 SNP 지역을 15개 찾았으며 그 중 identity 값이 가장 높은 두 개의 NBS-LRR 후보 지역 근처에 위치한 두 개의 SNP를 대상으로 HRM 마커 primer를 디자인 하였다.

하나의 CAPS 분자마커와 두 개의 HRM 분자마커를 활용하여 100개의 상업품종 F₁과 143개의 YCM x Tean RIL에 genotyping을 진행하였다. YT-RIL에서 진행한 유전형 분석 결과를 표현형과 비교하였을 때 3개의 분자마커 PhytoSNP5, CAPS, Phyto14 모두에서 15개의 교차가 나타나 교차율이 10.5%로 나타났다. 상업품종 F₁에서는 4 종류의 강도로 역병을 접종하여 표현형 결과를 얻었다. 따라서 품종별로 역병에 저항성인지와 이병성인지 여부는 구분이 명확하지 않아 유전형 결과와 확실한 비교가 어렵지

만 경향성을 비교하였을 때 PhytoSNP5가 가장 교차율이 적었으며 그 다음으로 CAPS, Phyto14 순서대로 교차율이 증가하였다(Fig. 32, Table 20, Table 21).



<Fig. 32> 역병 QTL 분석 결과 LOD 값이 가장 높은 scaffold에서 RLK와 NBS-LRR 후보지역을 각각 초록색과 빨간색 막대로 위치를 표시

<Table 20> YT-RIL에 3가지 분자마커로 표현형과 유전형을 비교하여 교차율을 분석한 결과.

분자마커	YT-RIL sample 수	교차형 배우자 수	교차율(%)
PhytoSNP5			
CAPS	143	15	10.5%
Phyto14			

<Table 21> 상업품종에 3가지 분자마커로 표현형과 유전형을 비교한 결과.

Cultivar	Genotype by Marker			Phenotype by Phytophthora isolate			
	PhytoSNP5	CAPS	Phyto14	MY-1	KPC-1	JHAI1-7	KPC-7
PR shinnara	H	H	H	0	0	0	0
Dokyachungchung	H	H	H	0	0	0	6
Ilsongjeong	H	H	H	0	0	0	23
Giribarksoo	H	H	H	0	0	0	35
PR power	H	H	H	0	0	3	33
Heemangbong	H	H	H	0	0	3	35
PR awoollim	H	H	H	0	0	5	25
Bakjangdaeso	H	H	H	0	0	5	91
Muhanjilju	H	H	H	0	0	7	3
Chunyunmannyun	H	H	H	0	0	7	25
PR kummaek	H	H	H	0	0	10	35
PR sangsaeng	H	H	H	0	0	15	55
PR yeoljeong	H	H	H	0	0	15	67
PR hongdukkae	H	H	H	0	0	50	57
PR manitta	H	H	H	0	5	7	42
Shinsegae	H	H	H	0	5	8	0
Man sahyeongtong	H	H	H	0	5	14	92
Meeting	H	H	H	0	5	25	76
Anjeonbelt	H	H	H	0	5	44	30
Ilinja	H	H	H	0	7	16	58
Gungyeilhak	H	H	H	0	10	0	10
Ildeongkongshin	H	H	H	0	10	0	25
PR mansei	H	H	H	0	10	2	63
Taesang	H	H	H	0	10	52	100
PR jangwonkubje	H	H	H	0	10	70	82
PR ukmankem	H	H	H	0	23	22	47
Seonkuja	H	H	H	0	24	8	60
PR daechon	H	H	H	0	40	18	52
Dokbulwang	H	H	H	0	43	42	83
Josangshintop	H	H	H	0	52	72	48

PR hwanhosung	H	H	H	1	10	14	24
Hongmeein	H	H	H	1	10	19	81
PR keosang	H	H	H	1	22	13	50
PR sanghanga	H	H	H	2	9	27	51
PR bulrocho	H	H	H	2	17	27	63
PR kuggadaepyo	H	H	H	2	28	45	83
PR sadaecheonwang	H	H	H	2	32	26	57
Subiyeok	H	H	H	2	32	22	89
PR jijon	H	H	H	3	14	32	42
PR bultina	H	H	H	3	24	30	54
Baerodda	H	H	H	4	37	18	45
Youkganghongjangkun	H	H	H	4	20	21	43
PR heemangchan	H	H	H	5	30	65	80
Kemmedal	H	H	H	6	30	27	87
Bulsechul	H	H	H	8	10	2	33
PR youkbalsan	H	H	H	11	33	55	76
PR manjangilchi	H	H	H	16	53	37	60
PR bulmyul	H	H	H	16	57	99	93
Hot	H	H	H	42	83	100	100
Shintongil	H	H	H	50	60	100	100
Tantandaemok	H	R	R	0	0	0	0
PR sun	H	R	S	0	50	65	100
Katakuruma	H	R	R	2	3	18	25
Papipedepimang	H	R	R	5	87	100	100
Kangryukjosangkun	H	H	H	0	48	73	93
PR machom	H	H	H	49	90	100	100
Morningput	H	H	H	14	83	100	97
Hanpansung	R	R	S	2	80	100	100
Super manitta	S	H	H	55	80	95	100
Dangchan	S	H	H	58	100	100	100
Hanbando	S	H	H	87	100	100	100
Hongjangkun bigarim	S	H	H	94	80	97	100
Youngyangmat	S	H	H	100	90	100	100
Kemhyang	S	H	H	100	100	100	100
Johyang	S	H	H	100	100	100	100
Chammani	S	H	H	100	100	100	100
Papi yellow	S	R	R	53	100	100	100
Bukang	S	R	R	98	100	100	100
Newwavepimang	S	R	R	100	100	100	100
Jjang	S	S	S	2	10	40	82
Hankaram	S	S	S	12	17	42	82
Hongiljeom	S	S	S	14	32	52	88
Kangryuktaeyang	S	S	S	17	70	100	100
Dabotab	S	S	S	65	100	100	100
Chamjoeun	S	S	S	70	100	95	100
Ohbok	S	S	S	72	50	92	100
Kembit	S	S	S	80	100	98	97
Hongjinju	S	S	S	83	100	100	98
Maekomdalkom	S	S	S	83	100	100	100
Mansukgun	S	S	S	85	100	100	100
Daechon	S	S	S	90	70	100	100
Daedelbo	S	S	S	90	100	97	100
Chukje	S	S	S	90	100	100	100
Manitta	S	S	S	92	100	100	100
Gukbo	S	S	S	93	100	100	100
Hanson	S	S	S	94	100	100	100
Euddeum	S	S	S	94	100	100	100
Jinmi	S	S	S	95	100	100	90

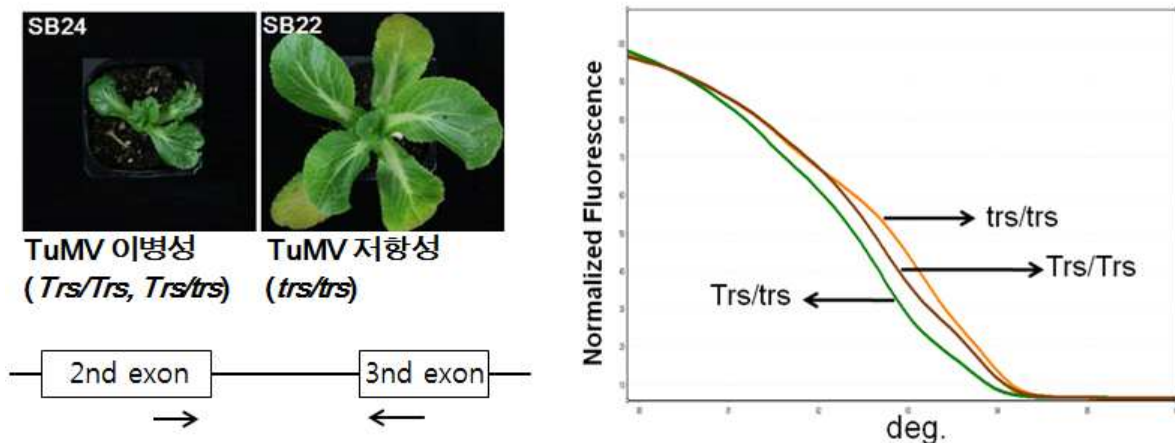
Wanggun	S	S	S	95	100	100	100
Matkkalchan	S	S	S	95	100	100	100
Hongbosuk	S	S	S	97	100	100	70
Hangwoon	S	S	S	97	100	100	100
Hongshimii	S	S	S	97	100	100	100
Daejangbu	S	S	S	99	93	100	100
Imkemnim	S	S	S	99	100	100	100
Bulmat	S	S	S	100	93	100	100
Boochon	S	S	S	100	100	100	100
Shinjokwang	S	S	S	100	100	100	100
Gangkun	S	S	S	100	100	100	100
Ongolchan	S	S	S	100	100	100	100

다. 배추 TuMV 분자마커 개발(3-5차년도)

TuMV는 전세계적으로 발생하고 있으며, 특히 한국, 중국 등 아시아 지역에서 배추과 작물에 큰 피해를 주는 바이러스이다. 특히 TuMV는 진딧물에 의해 전이(transmission)되기 때문에 노지에서 주로 재배되는 배추에는 큰 피해를 입힌다. 배추에서는 TuMV에 대한 우성 저항성 유전자와 열성 저항성 유전자가 보고되었는데, 열성 저항성 유전자는 우성 유전자에 비해 더 다양한 TuMV strain에 대해 저항성을 보이고 보다 안정적(durable)이다. 고전 육종 방법으로 열성 저항성 유전자를 이용해 품종을 육성하기 위해서는, 이형접합유전형의 저항성을 판별할 때 세대를 내려 저항성/이병성 분리비를 분석해야 하는 어려움이 있다. 그러나 분자마커를 이용하여 품종을 육성하면 이형접합유전형을 바로 분석하여 선발할 수 있기 때문에 보다 효율적인 품종 육성이 가능하다. 본 세부과제 책임자는 TuMV 저항성 배추 품종을 육성하는 데 사용할 수 있는 분자마커 분석 기술을 확립하고자 candidate gene approach 전략을 사용하여 TuMV 열성 저항성 연관 분자마커를 개발했다.

(1) 후보유전자를 이용한 분자마커 개발(제3차년도)

TuMV 열성 저항성 유전자 *trs*의 후보 저항성 유전자 dml 2번째와 3번째 exon 사이의 intron을 기초로 개발한 분자마커는 열성 저항성 계통인 SB22와 이병성 계통인 SB24 사이에서 뚜렷한 다형성을 보였다(Fig. 33). 이 분자마커는 SB22 계통과 SB24 계통을 부모로 삼아 작성한 57개의 F₂ 분리집단에서 모두 co-segregation 되는 것을 확인했다.



<Fig. 33> 고추 TuMV 분자마커 분석 기술 확립

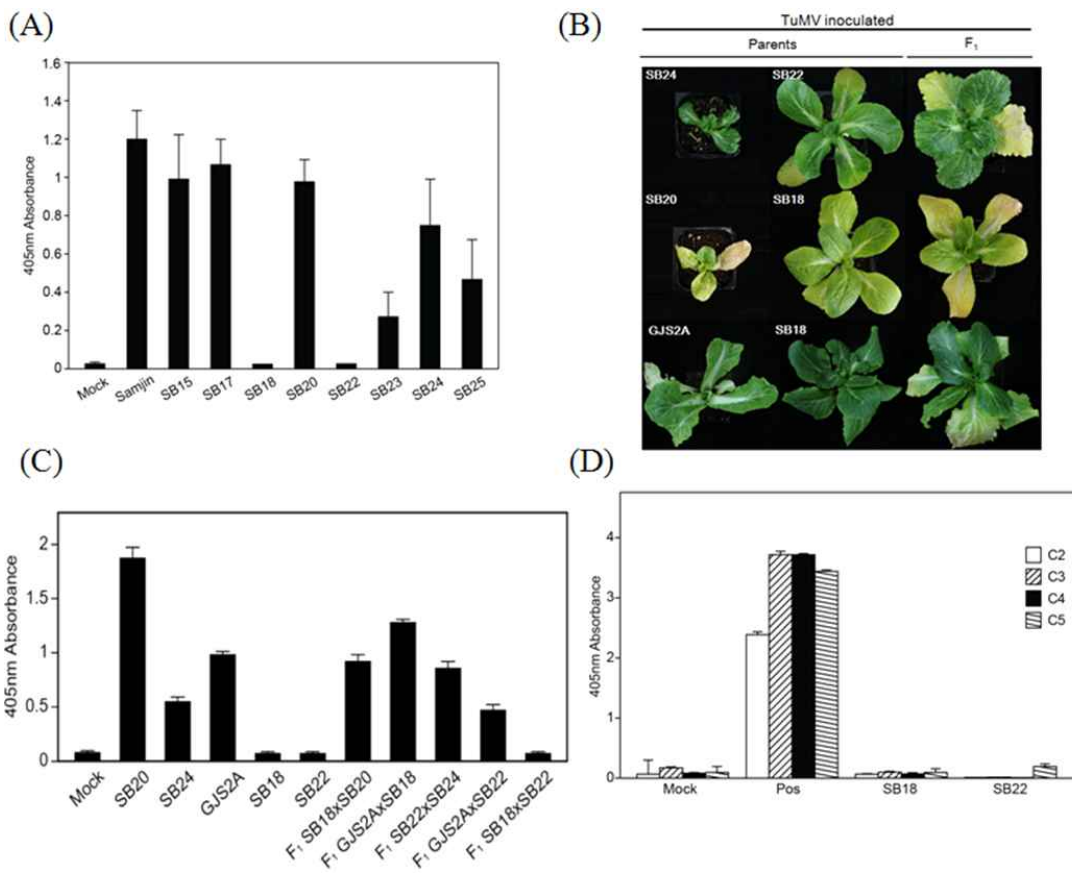
(2) TuMV 저항성 배추 계통 선발 및 저항성 유전자 동정(제4차년도)

(가) TuMV 저항성 배추 계통 선발 및 저항성 유전 분석

원예작물특작과학원에서 분양한 배추 계통(SB15, SB17, SB18, SB20, SB22, SB23, SB24, SB25)에 TuMV CHN5(*Turnip mosaic virus*, 순무 모자이크 바이러스)를 접종하여 SB18과 SB22이 강한 저항성을 보이는 것을 확인하였다(Fig. 34A).

SB18과 SB22의 저항성이 같은 저항성 유전자로 조절됨을 확인하기 위하여 allelism test를 수행하였다. 저항성 계통과 감수성 계통들을 각각 교배하여 얻은 F₁(SB18 × 22, SB18 × 20, GJS2A × SB18, SB22 × 24, GJS2A × SB22)을 TuMV C5로 접종하여 확인한 결과, SB18xSB22에서만 균일한 저항성을 확인할 수 있었다(Fig. 34B,C).

선발한 저항성 계통(SB18과 SB22)에 4가지 TuMV 종인 CHN2, 3, 4, 5를 각각 접종하여 저항성 범위를 확인할 결과 접종한 모든 균주에 강한 저항성을 보임을 확인하였다(Fig. 34D).



<Fig. 34> 배추 저항성 후보 계통들의 TuMV 저항성 검정

새로운 TuMV 저항성 유전자의 유전 양상을 분석하기 위해 SB18과 SB22 계통들을 감수성 계통인 SB20 및 SB24 및 GJS2A와 교배하여 F₁을 얻었으며, 이를 자가교배하여 F₂ 집단을 구축하였다.

TuMV CHN5 바이러스 접종 실험 결과, F₁은 모두 감수성을 보였으며 SB18xSB20 F₂ 집단(총 71개체), GJS2A × SB18 집단(총 155개체) 및 SB22 × 24 집단(총 57개체)에서 저항성 유전자를 분석한 결과, 저항성은 단일 열성으로 유전됨을 확인하였다(Table 22). 저항성 유전자는 *trs*(TuMV resistance discovered at Seoul National University)로 명명하였다.

<Table 22> 배추 F₂ 집단의 TuMV 저항성 유전분석

F ₂ population	TuMV strain	No. of F ₂ plants	Phenotype (R:S)	Expected ration (R:S) ^a	χ^{2b}	P ^c
SB18(R)x20(S)	CHN5	71	8:63	1:3	7.141	0.0075
SB22(R)x24(S)	CHN5	57	14:43	1:3	0.006	0.938
GJS2A(S)xSB18(R)	CHN5	155	41:114	1:3	0.174	0.676

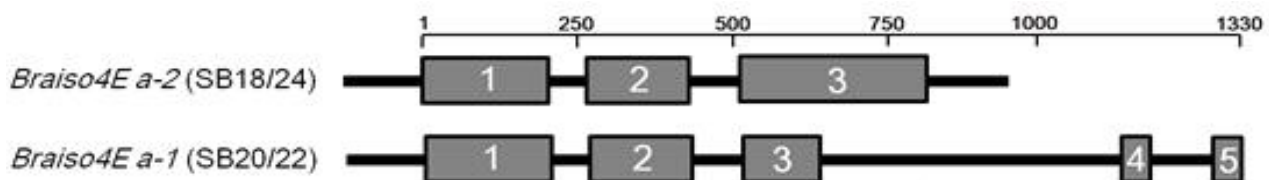
^a Resistant plants(R) versus susceptible plants (S)

^b Chi-square test

^c Probability value

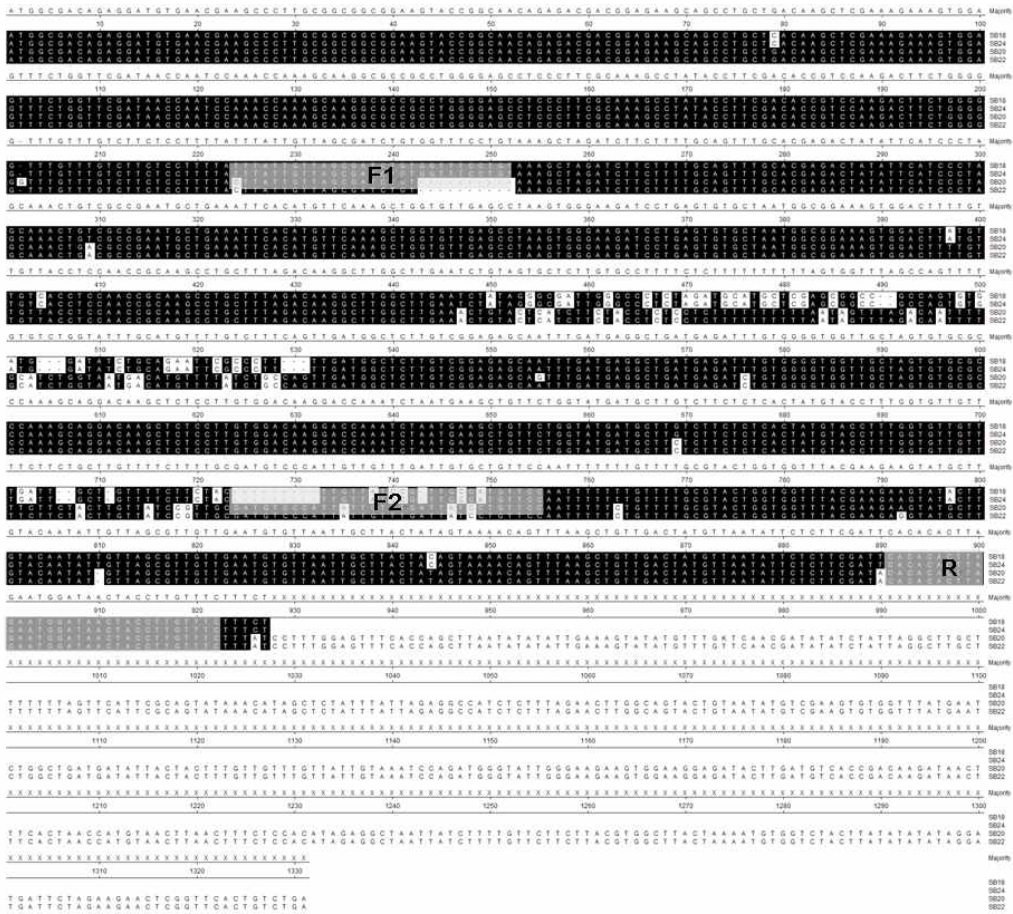
(나) *trs* 저항성 유전자와 *eIF(Iso)4E* copy의 linkage analysis

배추 *eIF(iso)4E* copy들의 시퀀스 분석 결과, 3 가지 종류의 copy들을 확인할 수 있었으며 각각 *Braiso4Ea(a-1*과 *a-2* allele), *Braiso4Eb*, *Braiso4Ec*라 명명하였다. NCBI 배추 시퀀스와 blast한 결과, *Braiso4Eb*는 *BraA. eIF(iso)4E b*와 99%의 identity를 보였고 *Braiso4Ec*는 *BraA.eIF(iso)4E c*와 96%의 identity를 보였으며 *Braiso4Ea-1*과 *Braiso4Ea-2*는 *BraA. eIF(iso)4E a*와 각각 96과 97%의 identity를 보였다 (BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). SB20(감수성)과 SB22(저항성) 계통은 *Braiso4Ea-1* allele을, SB18(저항성)과 SB24(감수성) 계통은 *Braiso4Ea-2* allele을 보유한 것으로 확인하였다(Fig. 35).



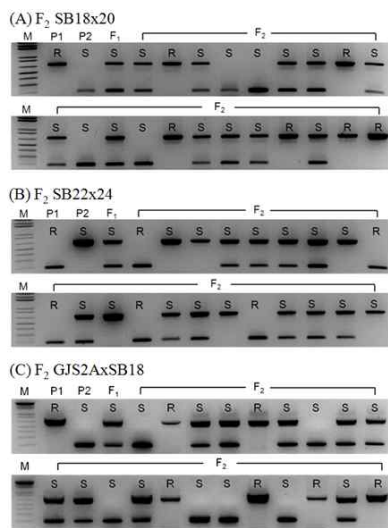
<Fig. 35> *Braiso4Ea* allele 서열 비교

Linkage analysis을 통해 *Braiso4Eb*와 *Braiso4Ec*는 *trs*와 연관되지 않음을 확인하였다. *Braiso4Ea-1*과 *a-2* allele의 시퀀스 차이를 이용하여 *trs*SCAR 마커를 개발하였다(Fig. 36).



<Fig. 36> *Braiso4Ea-1*과 *a-2* allele의 시퀀스 분석 및 trsSCAR 마커 개발

다음의 세 F₂ 집단(SB18 x SB20, GJS2A x SB18 및 SB22 x SB24)에 적용하였다. 그 결과, 적용한 집단 모두에서 *trs* 저항성과 trsSCAR 마커가 완전히 연관되었음을 확인하였다 (Fig. 37, Table 23).



<Fig. 37> trsSCAR 유전자형과 TuMV 저항성 형질의 공분리 분석

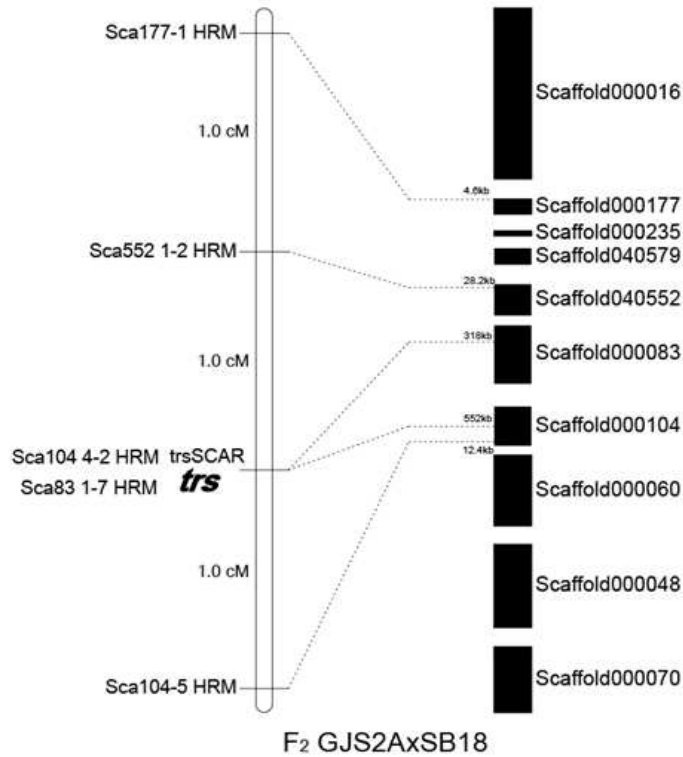
<Table 23> trsSCAR 유전자형과 TuMV 저항성 형질의 공분리 분석

F2population	Phenotype	trsSCAR marker genotype		
	S:R	S	R	
		TRS/TRS	TRS/trs	trs/trs
SB18x20	63:8	18	45	8
SB22x24	43:14	18	25	14
GJS2AxSB18	114:41	38	76	41

^a Resistant plants (R) versus susceptible plants (S)

(다) *trs* 저항성 유전자 mapping

MEGA program ver.5를 이용해 phylogenetic 분석을 수행한 결과 배추에 여러 개의 eIF4E와 eIF(iso)4E가 존재함을 확인하였으며 *Braiso4Ea*는 배추 염색체 A04에 있는 scaffold 000104(Bra035393) 위에 존재할 것으로 추정되었다. 기존에 A04에서 확인된 10개의 scaffold에서 마커를 개발하여 F₂ 집단 SB22 x SB24와 GJS2A x SB18을 이용해 *trs* 저항성과의 linkage analysis를 수행하였다. SB22 x SB24 F₂ 집단에서는 다음과 같은 완전한 연관관을 보이는 4개의 마커를 확인하였다(Sca104 10-5 HRM (754.7 kb, scaffold 000104), Sca104-1 HRM (543.2 kb, scaffold 000104), Sca83 1-2 HRM (56.2 kb, scaffold 000083), Sca552 2-8 HRM (403.2 kb, scaffold 040552)). GJS2A x SB18 F₂ 집단에서는 5개의 다형성을 보이는 마커를 개발하였으며 그 중 Sca104 4-2 HRM marker 와 Sca83 1-7 HRM 마커가 *trs* 저항성 유전자와 완전한 연관관을 보였다. 이러한 결과를 통해 *trs*는 염색체 A04번 위에 Sca104-5 HRM (12.4 kb, scaffold 000104)와 Sca552 1-2 HRM (28.2 kb, scaffold 040552) 사이에 위치할 것으로 결론 내렸다 (Fig. 38).



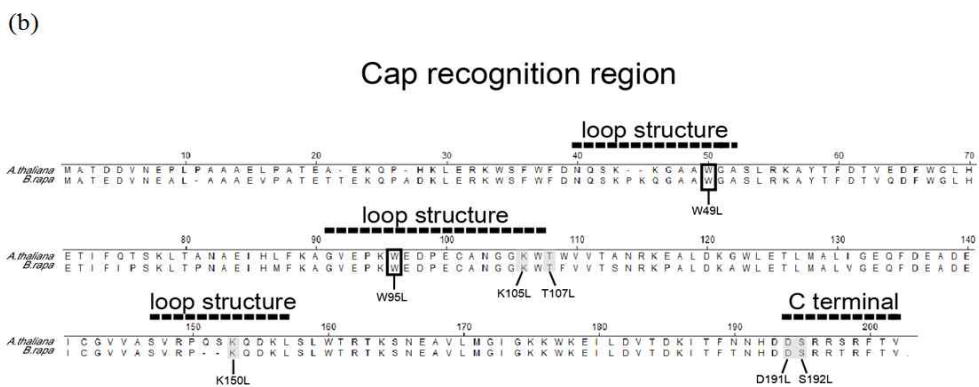
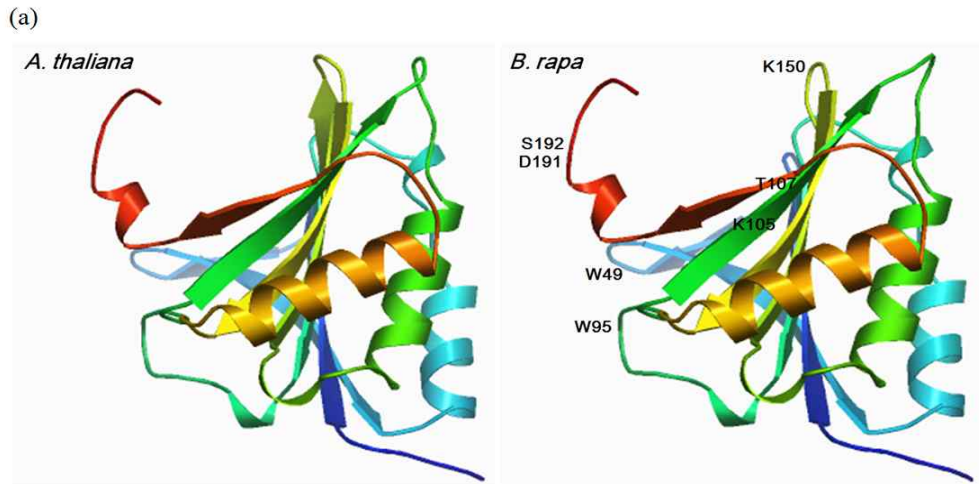
<Fig. 38> TuMV 저항성 유전자 *trs*의 유전자 연관 지도

(1) 배추 eIF(iso)4E 돌연변이 형질전환체 유도 및 저항성 분석(제5차년도)

(가) 배추 eIF(iso)4E cap binding pocket 후보 아미노산 선정 및 돌연변이 유도

식물 eIF4E나 eIF(iso)4E의 cap binding pocket은 potyvirus VPg와 상호작용을 하며 이 과정이 바이러스 저항성과 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 있다(Hwang et al. 2013, Kim, J.H. et al. 2013, Kim, J.H. et al. 2014).

TuMV 저항성 유전자와 강한 연관을 보인 eIF(iso)4E *Braiso4Ea* copy의 cDNA 시퀀스를 확보하여 아미노산 서열을 확인하였다(Fig. 39b). 배추 eIF(iso)4E 아미노산 서열을 애기장대 eIF(iso)4E 아미노산과 비교하였으며 밀의 eIF4E 단백질을 주형으로 하여 3D 단백질 구조를 예측하였다(Protein Data Bank 계통 no. 2IDR). 단백질 구조 결과 및 기존 cap binding pocket에 대한 연구(Miyoshi et al., 2006)를 토대로 7개의 후보 아미노산(Trp49, Trp95, Lys105, Lys150, Thr107, Ser192, Asp191)을 지정하였으며 site directed metagenesis를 통해 8개의 eIF(iso)4E mutant를 개발하였다(Fig. 39a, b).

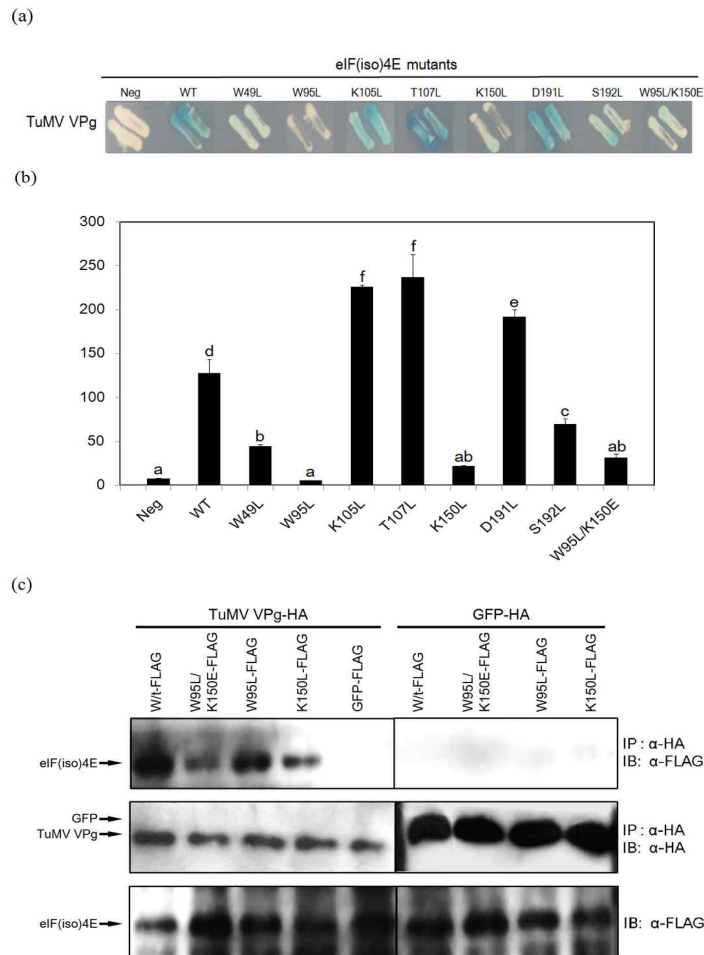


<Fig. 39> 배추의 eIF(iso)4E의 5' cap 결합 부위 후보 아미노산

(나) 배추 eIF(iso)4E mutant와 TuMV VPg와의 단백질 상호작용 분석

*In vitro*로 eIF(iso)4E와 TuMV VPg의 상호작용 양상을 분석하기 위해 yeast two-hybrid 시스템을 이용하였으며 eIF(iso)4E mutant들 중 W49L, W95L, K150L, S192L이 다른 mutant들에 비해 VPg 상호작용 이 현저히 감소함을 확인하였다. β -galactosidase activity 분석 결과, W95L와 K150L의 상호작용 정도가 가장 낮았다 (Fig. 40a, b).

*In vivo*로 yeast two hybrid 결과를 검정하기 위해 co-immunoprecipitation (co-IP) 실험이 수행되었으며 그 결과, eIF(iso)4E w/t은 VPg와 강한 상호작용을 보였으나 W95L/K150E 및 K150L는 뚜렷한 상호작용 감소를 보였다. W95L의 경우도 상호작용 정도가 다소 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 40c).

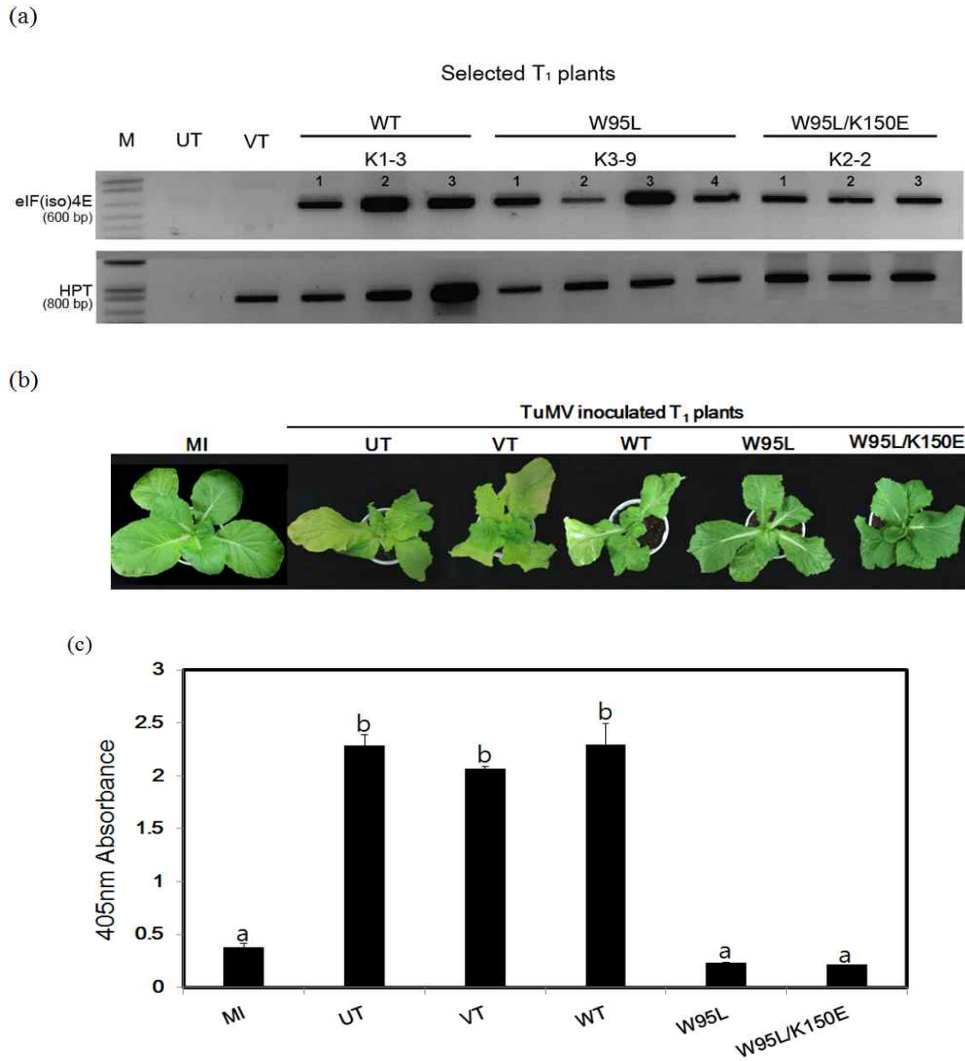


<Fig. 40> 순무 모자이크 바이러스 VPg와 배추 eIF(iso)4E의 상호작용 결과

(다) eIF(iso)4E 돌연변이를 과다발현한 배추 형질전환체에서의 TuMV 저항성 유도

eIF(iso)4E w/t, W95L, W95L/K150E 돌연변이들을 감수성 배추 품종 '서울'에 over expression하였다. 도입 유전자는 PCR로 확인하였으며 single copy가 확인된 T₁ 개체들을 선발하여 TuMV CHN5를 접종하였다 (Fig. 37a, b).

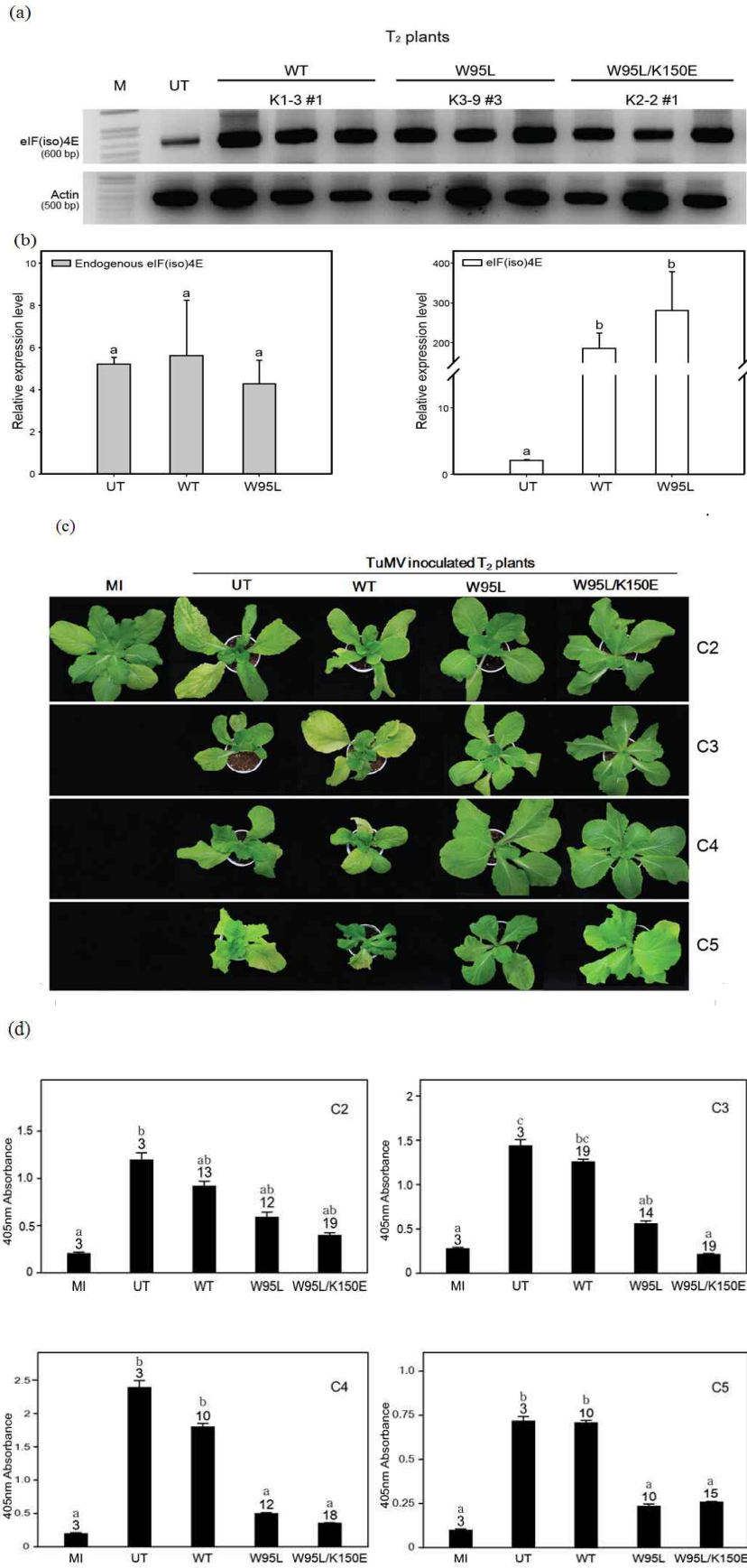
대조군과 비교하여 w/t eIF(iso)4E가 과다발현된 T₁ 개체의 병징은 더 강하게 나타났으며 그에 비해 W95L나 W95L/K150E를 과다발현시킨 T₁ 개체의 경우 뚜렷한 병징이 없었다 (35 dpi). 접종 결과는 DAS-ELISA로 재확인하였다. (Fig. 41c).



<Fig. 41> eIF(iso)4E가 과다발현된 배추 형질전환체 T₁의 TuMV 접종 결과

도입된 eIF(iso)4E와 endogenous eIF(iso)4E의 발현은 semi-quantitative RT-PCR 및 quantitative real-time RT-PCR로 확인하였다. 형질전환체에서 도입된 eIF(iso)4E이 endogenous eIF(iso)4E와 비교하여 그 발현량이 현저히 증가함을 확인하였다. endogenous eIF(iso)4E의 발현량은 형질전환체와 대조군 모두 차이가 없었다(Fig. 42a, b).

T₂ 집단은 저항성 범위를 확인하기 위하여 4개의 TuMV 균주(CHN2, 3, 4, 5)들로 접종하였으며 eIF(iso)4E 돌연변이가 형질전환된 T₂에서 대조군과 비교하여 바이러스 증식이 효과적으로 억제됨을 확인하였다. 특히 CHN3, 4, 5에서의 증식 억제 효과가 CHN2보다 더 큰 것으로 확인하였다. 본 연구 결과는 eIF(iso)4E 돌연변이를 과다발현 시킨 배추에서 넓은 기주 범위의 TuMV 저항성을 유도할 수 있음을 보여주며, 기존의 연구 결과에서도 같은 결과를 보여준다(Zhao et al. 2013). 이는 저항성 유전자를 찾지 않아도 후보 유전자의 변이를 인위적으로 유도하여 저항성 품종을 개발할 수 있다는 것을 보여준다(Fig. 42c, d).



<Fig. 42> eIF(iso)4E가 과다발현된 배추 형질전환체 T₂의 TuMV 집중 결과

제 6절. 다양한 주요 병 저항성 마커의 신속·정확한 분석을 위한 DNA Chip 기술 개발

1. DNA chip 설계 및 단일염기다형성 분석법 개발

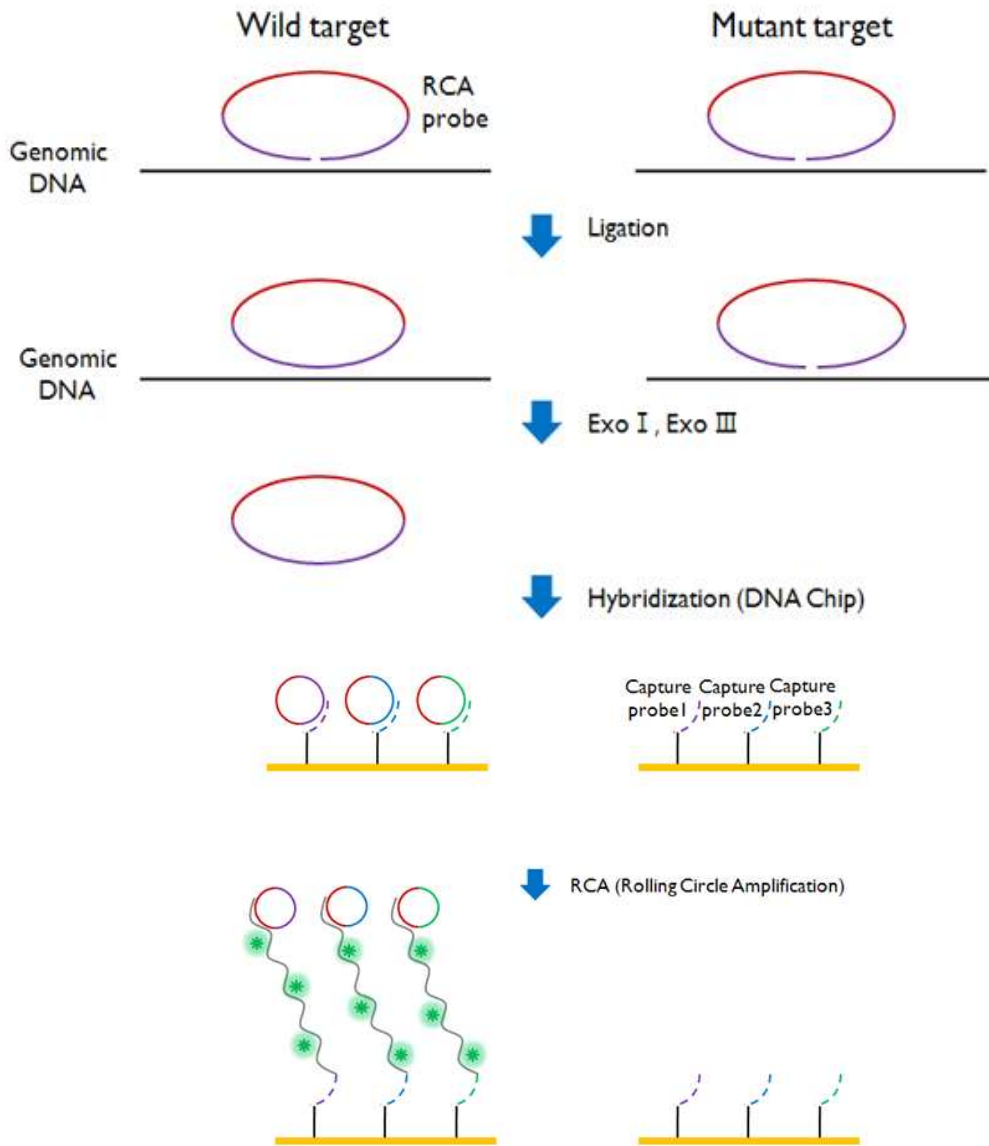
분자마커에 대한 육종가의 수요가 점차 커짐에 따라 일반적인 PCR과 같은 단일 반응 기반의 분자마커 분석 기술로는 수요를 충족시키기 어렵게 되었다. 본 위탁연구기관에서는 한번에 다양한 분자마커의 유전형을 분석할 수 있는 기술을 개발하고자 RCA (Rolling Circle Amplification) 반응을 활용한 분자마커 분석법을 개발했고, 이 기술의 효율성을 증대시키기 위하여 두 번의 RCA를 연속적으로 반응시키는 HL (Highly localized)-RCA 기술과 ligation을 이용한 다양한 분자마커 분석 기술인 SDL-PCR (Separation of Displaced Ligation probe based-Polymerase Chain Reaction) 기술을 개발했다. 개발한 기술을 바탕으로 실제 병 저항성 분자마커 및 품종구별 분자마커 기술을 적용하기 위하여 다양한 반응 조건 및 농도를 이용하여 검정을 수행했고, 최종적으로 고추의 품종구별 분자마커와 병저항성 분자마커 기반의 probe를 제작하여 실제 고추 gDNA 샘플을 분석하여 검증했다.

가. 제 1차년도

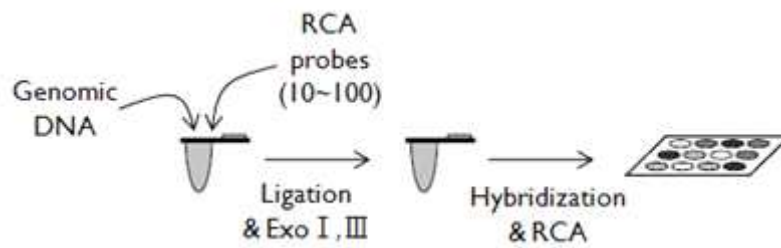
(1) L-RCA (Ligation-Rolling Circle Amplification) 기술 개발

분석하고자 하는 genomic DNA의 특정 단일염기다형성 (SNP) 마커가 wild type인지 mutant type인지 구분하기 위해 target이 wild type일 경우에 RCA probe가 ligation 되도록 디자인하였다. 95 °C에서 10분간 가열 한 후 50 °C에서 30분간 ligation 반응을 시킨 후 genomic DNA와 반응하지 않은 RCA probe를 제거하기 위해서 6-12시간 동안 Exonuclease I (single strand specific 3'-exonuclease) 20 U 과 Exonuclease III (double strand specific 3'-exonuclease) 100 U 을 동시에 처리하였다. Exonuclease 효소의 처리 과정을 거치면 이후의 반응에서 비 특이적 반응을 획기적으로 감소시킬 수 있다. Exonuclease 처리 이후에 90 °C에서 10분간 가열하여 효소의 반응 능력을 상실시킨 이후에 capture probe가 고정된 DNA Chip에 혼성화 반응 (hybridization)을 수행한다. 그 이후, DNA Chip에 고정된 capture probe들이 RCA primer 역할을 하여 RCA 반응이 일어나도록 하였다. RCA 반응을 수행할시 Cy3-dCTP를 dCTP와 1 : 3의 비율로 사용하여 RCA 반응 이후에 형광 신호를 측정하였다(Fig. 1).

본 연구진이 개발한 L-RCA 기술은 다양한 SNP 마커의 Ligation 반응과 Exonuclease 반응이 모두 하나의 튜브에서 일어나며 RCA 반응 또한 하나의 DNA Chip 상에서 반응하기 때문에 전체적으로 사용되는 효소의 양을 최소화 할 수 있다(Fig. 2). L-RCA 기술은 SNP 마커의 분석 방법의 가격을 결정하는 가장 중요한 요인인 효소의 양을 최소화했기 때문에 기존의 기술들에 비해 가격경쟁력 면에서 매우 뛰어날 것으로 판단된다. 또한 L-RCA 기술은 PCR 방법을 사용하지 않기 때문에 primer들의 nonspecific amplification이 발생하지 않는다는 장점을 갖고 있다.



< Fig. 1> L-RCA 방법을 통한 DNA Chip SNP 마커 분석 기술



< Fig. 2> L-RCA 반응을 통한 DNA Chip SNP 마커 분석 기술의 전체 반응 단계

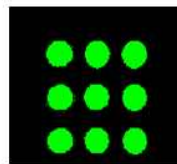
(2) DNA Chip 상에서 L-RCA (Ligation-Rolling Circle Amplification) 반응조건 확립

전체적인 반응이 잘 이루어지는지 파악하기 위해 target DNA의 양이 10^{11} copy수 일 때 L-RCA 반응을 DNA Chip 위에서 12시간 수행하였다(Fig. 3). Target DNA가 wild type일 경우에만 ligation 및 RCA 반응이 일어나기 때문에 형광 신호를 측정할 수 있다. RCA 반응을 보내는 시간에 따라 형광의 신호를 측정 한 결과 12시간 이후가 가장 높은 형광 신호를 나타냈다. LOD (Limit of detection)를 결정하기 위해 10^5 - 10^{11} copy수의 target DNA를 사용해서 ligation 반응을 수행하였다. 그 결과 L-RCA 반응은 PCR 방법에 비해서 많은 분석시간이 필요하며, LOD가 낮기 때문에 (10^7 copy) 실제 샘플에는 적용하기 어려운 단점이 나타났다. 따라서 이 두 가지 단점을 극복하기 위한 새로운 증폭기술 개발이 필요하다고 판단된다.

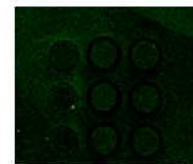
RCA reaction result

- Target DNA concentration : 10^{11} copy

- Reaction time : 12h incubation

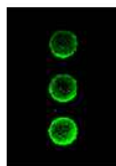


Wild target

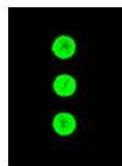


Mutant target

RCA reaction time - Target DNA concentration : 10^{11} copy



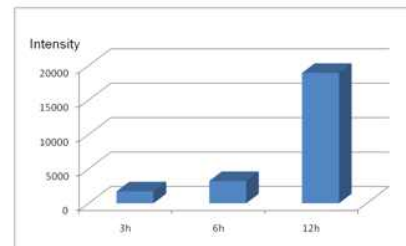
3h



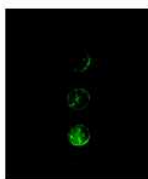
6h



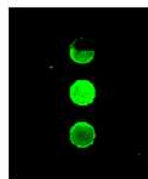
12h



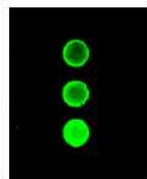
LOD test - Reaction time : 12h incubation



10^5 copy



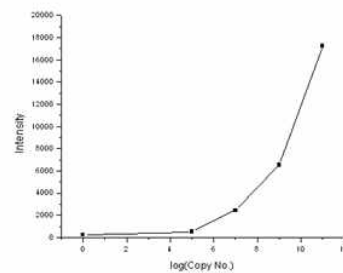
10^7 copy



10^9 copy



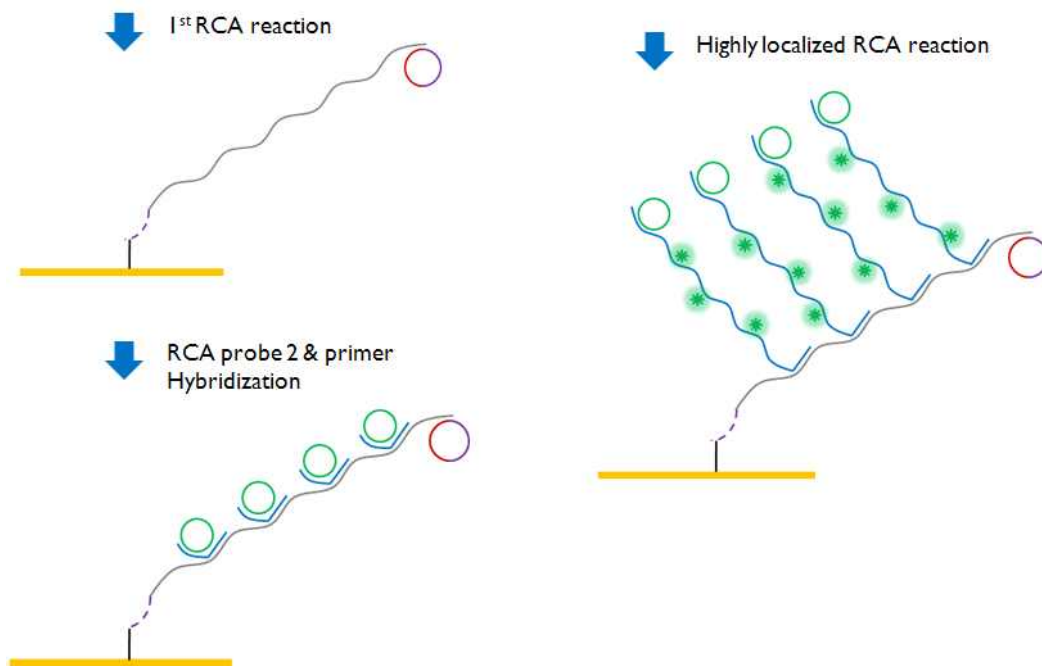
10^{11} copy



< Fig. 3 > L-RCA 반응을 통한 DNA Chip SNP 마커 분석 결과

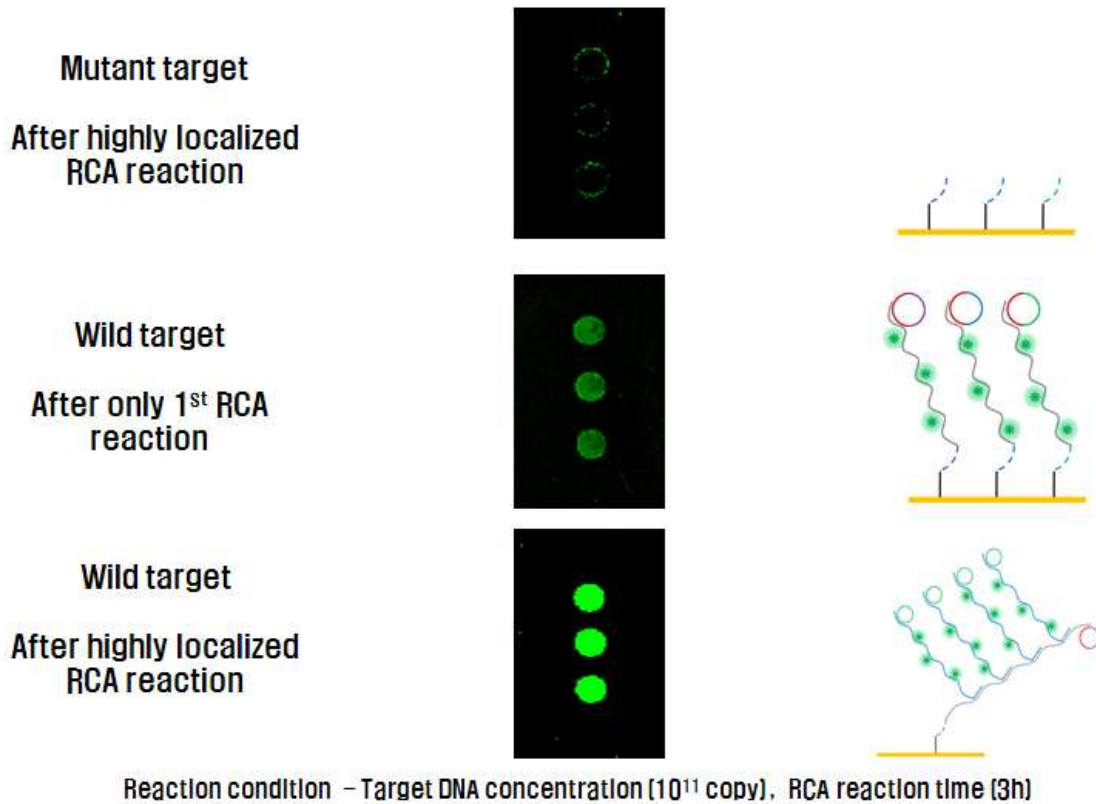
(3) HL-RCA (Highly Localized-Rolling Circle Amplification) 기술 개발 및 LOD (Limit of detection) 테스트

본 연구진은 L-RCA 반응의 LOD 향상을 위해 DNA Chip 상에서 exponential하게 증폭되는 RCA 기술을 독자적으로 개발하였다. 특정 SNP 마커에 해당하는 SNP probe가 ligation 되었을 때만 첫 번째 RCA 반응이 일어나게 하는 방식이며, 각각의 RCA probe에는 동일한 염기서열이 존재하게 디자인했기 때문에 첫 번째 RCA 반응이 일어났을 경우에만 특정 염기서열이 반복적으로 합성된다. 첫 번째 RCA 반응으로부터 합성된 동일한 염기서열과 상보적으로 결합하는 두 번째 RCA primer와 RCA probe가 혼성화 반응 (hybridization)을 일으키며 두 번째 RCA 반응이 동시에 일어도록 하였으며, 결과적으로 DNA Chip상에서 특정 capture probe 부분에서만 RCA 반응이 exponential하게 일어나게 하는 HL-RCA (Highly-Localized Rolling Circle Amplification) 방식을 구축하였다(Fig. 4).

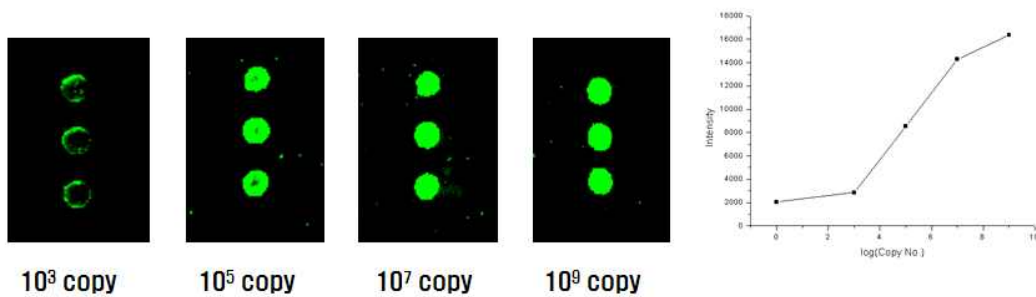


< Fig. 4> HL-RCA 반응을 통한 DNA Chip SNP 마커 분석 기술

Target DNA의 양을 10^{11} copy 사용했을 때 일반적인 RCA 반응을 3시간 수행하였을 경우 약한 신호를 보였다. 이에 본 연구진이 개발한 HL-RCA 기술을 사용하였을 경우, PCR 방법을 사용하지 않고도 10^5 copy의 target DNA를 사용하여 충분히 신뢰할 수 있는 형광 신호를 얻을 수 있었다. 10^5 copy의 target DNA 양은 실제 샘플의 DNA를 정제 할 경우에도 충분히 얻을 수 있는 양이기 때문에 HL-RCA 기술은 실제 샘플에도 적용이 가능하다고 판단된다(Fig. 5).



LOD test - Reaction time : 3h incubation



< Fig. 5 > HL-RCA 반응을 통한 DNA Chip SNP 마커 분석 결과

(4) Multiplex 테스트를 통해서 각각의 probe들의 특이도 확인

고추의 종별 구분 마커 3개를 선택하여 T_m 값이 49-50 °C가 되도록 RCA probe를 디자인하였다. 10^7 copy의 target DNA를 사용하여 HL-RCA 반응을 3시간 수행하여 multiplex 테스트를 수행한 결과, T_m 값이 비슷하게 디자인된 각각의 probe들이 높은 특이도를 나타냈다(Fig. 6 & 7).

RCA probe

Pp6

CGG ACA GGAAGT CGT C GGT CGT TTC GAA GAC TCT **GGT TGG TGC TGT TGC TAC** CGT TGA GGT CAT
CGC

Pp28

TCA GCA CGC CTA AGC GGT CGT TTC GAA GAC TCT **GGT TGG TGC TGT TGC TAC** ATA ATT CTT GAT TTT
AAA TCT CAG

Pp99

TTA ATT TGT GGC TCT GAC GGT CGT TTC GAA GAC TCT **GGT TGG TGC TGT TGC TAC** AGT CCT TTG TTT
TTT ATG ATA TG

RCA capture

Pp6

NH₃-AAAAAAAAAAAAACG ACT TCC TGT CCG

Pp28

NH₃-AAAAAAAAAAAAGCT TAG GCG TGC TGA

Pp99

NH₃-AAAAAAAAAAAAGTC AGA GCC TCT AAT TAA

RCA probe (Universal)

GAC CAAAAAACC CAA CCC GCC CTA CCC AAA ACC CAA CCC GCC CTA CCC CAT CAA GGT TAT

RCA primer (Universal)

GGT TGG TGC TGT TGC TAC GATG GTC

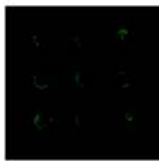
< Fig. 6> 본 연구에서 사용된 oligo DNA 염기서열

Multiplex test

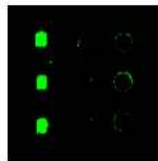
- Reaction time : 3h incubation

- Wild or Mutant target DNA concentration : 10⁷ copy

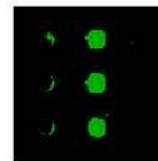
Pp6(M) Pp28(M) Pp99(M)



Pp6(W) Pp28(M) Pp99(M)



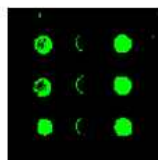
Pp6(M) Pp28(W) Pp99(M)



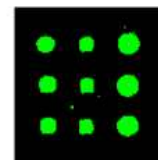
Pp6(M) Pp28(M) Pp99(W)



Pp6(W) Pp28(M) Pp99(W)



Pp6(W) Pp28(W) Pp99(W)



< Fig. 7> HL-RCA 반응을 통한 Multiplex 테스트

나. 제 2차년도

(1) SDL-PCR 분석에 사용 할 SNP probe와 Universal primer 그리고 DNA Chip에 고정화하는 Capture probe 디자인

(가) 각각의 SNP site에 해당하는 probe 디자인

품종식별 분석에 필요한 다양한 SNP site들의 염기서열을 토대로 false positive 반응이 발생하지 않는 SNP probe를 디자인하였다. 본 연구에서 사용하는 ligation을 이용한 SNP 분석 방법에서는 ligase의 비 특이적 반응을 최소화하도록 probe를 디자인하는 것이 매우 중요

하다. 따라서 ligase의 비 특이적 반응을 최소화하기 위해서 probe들 간의 비슷한 염기서열을 피하고, 반복되는 염기서열이 없고, ligation 반응이 일어나는 부분에 구아닌 (G) 또는 시토신 (C)의 비율이 낮도록 probe를 디자인하였다. 또한 각각의 probe들의 T_m 값이 비슷하도록 디자인하여 단일 튜브에서 다양한 SNP probe들이 동시에 반응하도록 하였다. 각각의 probe의 3' 부분에 인위적인 mutation을 주어서 ligation 반응이 보다 특이적으로 일어나도록 하였고, 디자인된 각각의 probe들에 대하여 ligation 전후의 melting curve analysis를 수행하여 비 특이적 반응이 일어나지 않는 최적의 probe들을 선별하도록 고안하였다(Table 1).

(나) 유전자 마커 분석에 사용될 universal primer 선정

본 연구에서는 다양한 SNP site를 동시에 분석하기 위해 한 개의 튜브에서 한 쌍의 primer를 사용하여 PCR을 수행하는 것이 목표이다. 따라서 PCR에서 사용될 한 쌍의 primer를 선정하는 것이 매우 중요하다. Zip-code DNA, Human gDNA, *E. coli* 16s rDNA등의 염기서열과 고추의 염기서열을 비교 분석하여 고추에 존재하지 않는 염기서열을 토대로 universal primer 후보군들을 선별하였다. 우선 분석하고자 하는 SNP site들에 해당하는 probe들의 염기서열과 선별된 universal primer 들의 염기서열을 비교해서 비 특이적 PCR이 일어나지 않을 후보들을 프로그램 분석을 통해 1차 선별하였다 (Auto Dimer 프로그램 사용). 그리고 1차로 선별된 후보들 중에서 실제로 PCR을 수행하였을 때 비 특이적 PCR이 일어나지 않은 universal primer 들을 2차로 선별하였고, 이 후보들 중에서 primer dimer 형성을 최소화하고 PCR 효율이 가장 좋은 universal primer를 최종 선정하였다(Fig. 8).

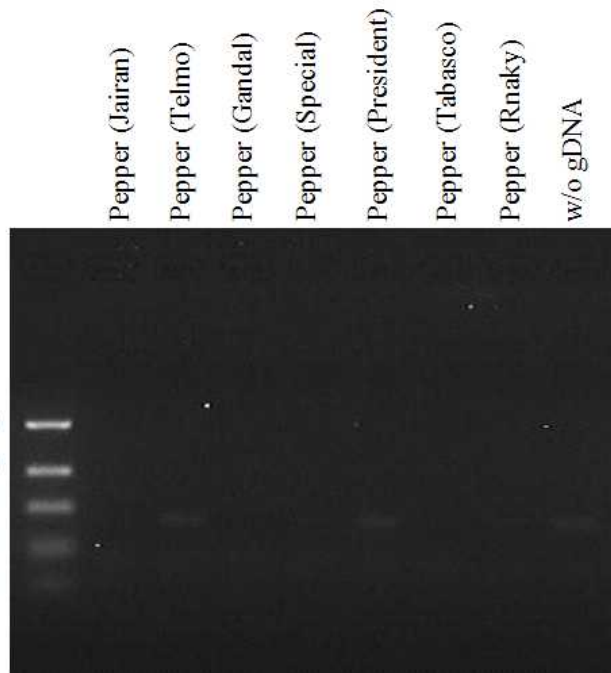
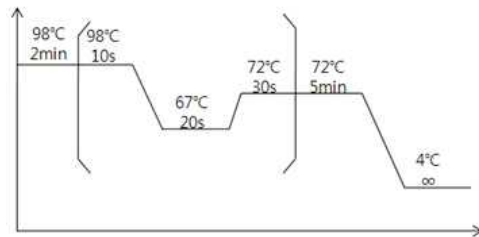
(다) DNA Chip에 고정화하는 capture probe의 디자인 및 선별

DNA Chip에 사용되는 capture probe는 DNA chip probe 디자인을 위하여 개발된 OligoArray 2.1 (Rouillard et al., 2003)을 주로 사용한다. Stand-alone 소프트웨어인 OligoArray 2.1 에서 올리고 디자인을 위해 고려되는 사항들은 T_m range, Blast (로컬 Blast DB 이용)를 통해 확인되는 염기서열의 specificity, GC content, cross-hybridization 가능성 여부, OligoArrayAux (MFOLD package)를 이용해 확인되는 secondary structure의 존재여부, 특정한 반복 염기서열의 존재 여부 등이 있다. OligoArray 2.1은 각 입력 염기서열 상에서 위의 조건들을 통과한 올리고 염기서열들을 간단한 텍스트 형식의 결과 파일로 제공한다. OligoArray 2.1은 로컬 Blast DB를 사용하기 때문에 Blast를 위해 사용할 염기서열 DB 구성을 자유롭게 최적화 할 수 있다는 장점과 올리고 선정에 있어 실제 혼성화 반응시 중요한 thermodynamic condition에 대한 고려가 잘 반영되어 있다. OligoArray 2.1을 사용해 선별된 capture probe 들의 비 특이적 상호반응의 유무를 확인하기 위해 형광을 표지한 target oligonucleotide를 혼성화 반응을 시킨 이후에 1차선별 과정을 수행하였다. 형광을 표지한 target oligonucleotide가 아닌 실제 SDL-PCR 반응의 product를 사용해서 비 특이적 상호반응을 보이지 않고 높은 형광 신호를 보이는 capture probe의 2차선별 과정을 수행하였다.

Universal F primer
TGT CTA TTG TTT GTG TGC TTG TTT T

Universal R primer
GTG AAAAAT CCAAT AAC CTT GAT G

SDL-PCR probe 3
GTG AAAAAT CCAAT AAC CTT GAT G
G GCT CCT TTT TAA GAC TGA



<Fig. 8> 고추의 genomic DNA에서 non-specific amplification이 발생하지 않는 universal primer 및 universal probe 선별

<Table 1> SDL-PCR에 사용된 probe의 염기서열

종 류	염기 서열	
Pp6	probe 1	TGT CTA TTG TTT GTG TGC TTG TTT T <u>CGT TGA GGT CAT CGC</u>
	probe 2	<u>CGG ACA GGA AGT CGT C</u> AGT TGT <u>TCA GTC TTA AAA AGG AGC C</u> AAA AAA AAA AAA
	Wild target	AAA AAA AAA <u>G ACG ACT TCC TGT CCG</u> <u>GCG ATG ACC TCA ACG</u> AAA AAA AAA
	Mutant target	AAA AAA AAA <u>G ACG ACT TCC TGT CCG</u> <u>ACG ATG ACC TCA ACG</u> AAA AAA AAA
	Capture	AAA AAA AAA AAA <u>CGT TGA GGT CAT CGC</u>
Pp21	probe 1	TGT CTA TTG TTT GTG TGC TTG TTT T <u>CCT GTT CAA GTG ATC TTT TG</u>
	probe 2	<u>TTC AAA TTT TGT GAT GAC C AGT TGT</u> <u>TCA GTC TTA AAA AGG AGC C</u> AAA AAA AAA AAA
	Wild target	AAA AAA AAA <u>G GTC ATC ACA AAA TTT GAA</u> <u>CA AAA GAT CAC TTG AAC AGG</u> AAA AAA AAA
	Mutant target	AAA AAA AAA <u>G GTC ATC ACA AAA TTT GAA</u> <u>AA AAA GAT CAC TTG AAC AGG</u> AAA AAA AAA
	Capture	AAA AAA AAA AAA <u>CCT GTT CAA GTG ATC TTT TG</u>
Pp28	probe 1	TGT CTA TTG TTT GTG TGC TTG TTT T <u>ATA ATT CTT GAT TTT AAA TCT CAA</u>
	probe 2	<u>TCA GCA CGC CTA AGC AGT TGT</u> <u>TCA GTC TTA AAA AGG AGC C</u> AAA AAA AAA AAA
	Wild target	AAA AAA AAA <u>GCT TAG GCG TGC TGA</u> <u>TIG AGA TTT AAA ATC AAG AAT TAT</u> AAA AAA AAA
	Mutant target	AAA AAA AAA <u>GCT TAG GCG TGC TGA</u> <u>CTG AGA TTT AAA ATC AAG AAT TAT</u> AAA AAA AAA
	Capture	AAA AAA AAA AAA <u>ATA ATT CTT GAT TTT AAA TCT CAA</u>
Pp99	probe 1	TGT CTA TTG TTT GTG TGC TTG TTT T <u>TCC TTT GTT TTT TAT GAT CTG</u>
	probe 2	<u>TTA ATT TGT GGC TCT GAC C AGT TGT</u> <u>TCA GTC TTA AAA AGG AGC C</u> AAA AAA AAA AAA
	Wild target	AAA AAA AAA <u>G GTC AGA GCC ACA AAT TAA</u> <u>CA T ATC ATA AAA AAC AAA GGA</u> AAA AAA AAA
	Mutant target	AAA AAA AAA <u>G GTC AGA GCC ACA AAT TAA</u> <u>GA T ATC ATA AAA AAC AAA GGA</u> AAA AAA AAA
	Capture	AAA AAA AAA AAA <u>TCC TTT GTT TTT TAT GAT CTG</u>
Pp134	probe 1	TGT CTA TTG TTT GTG TGC TTG TTT T <u>AGT GGA TCT TCT GTC TTT TT</u>
	probe 2	<u>CTT GTC AGT AGA GTT CNA TAA TAN TAG GA</u> <u>TCA GTC TTA AAA AGG AGC C</u> AAA AAA AAA AAA
	Wild target	AAA AAA AAA <u>TC CTA NTA TTA TNG AAC TCT ACT GAC AAG</u> <u>AA AAA GAC AGA AGA TCC ACT</u> AAA AAA AAA
	Mutant target	AAA AAA AAA <u>TC CTA NTA TTA TNG AAC TCT ACT GAC AAG</u> <u>CA AAA GAC AGA AGA TCC ACT</u> AAA AAA AAA
	Capture	AAA AAA AAA AAA <u>AGT GGA TCT TCT GTC TTT TT</u>
Pp164	probe 1	TGT CTA TTG TTT GTG TGC TTG TTT T <u>TTT GCG AAA ATC ACT GTA C</u>
	probe 2	<u>GCA TTT TTC GCT ATG TGT AGT TGT</u> <u>TCA GTC TTA AAA AGG AGC C</u> AAA AAA AAA AAA

	Wild target	AAA AAA AAA ACA CAT AGC GAA AAA TGC G TAC AGT GAT TTT CGC AAA AAA AAA AAA
	Mutant target	AAA AAA AAA ACA CAT AGC GAA AAA TGC A TAC AGT GAT TTT CGC AAA AAA AAA AAA
	Capture	AAA AAA AAA AAA TTT GCG AAA ATC ACT GTA C
Pp190	probe 1	TGT CTA TTG TTT GTG TGC TTG TTT T TTA TTT TAA TTA AAG CAA TGT GGA
	probe 2	TGG AAT ATA ATC AGT ATG AAA AAG T AGT TGT TCA GTC TTA AAA AGG AGC C AAA AAA AAA AAA
	Wild target	AAA AAA AAA A CTT TTT CAT ACT GAT TAT ATT CCA TCC ACA TTG CTT TAA TTA AAA TAA AAA AAA AAA
	Mutant target	AAA AAA AAA A CTT TTT CAT ACT GAT TAT ATT CCA CCC ACA TTG CTT TAA TTA AAA TAA AAA AAA AAA
	Capture	AAA AAA AAA AAA TTA TTT TAA TTA AAG CAA TGT GGA
Pp201	probe 1	TGT CTA TTG TTT GTG TGC TTG TTT T ATT TTA AGG TAT CGT CTA AGT TAT T
	probe 2	CTT TTG TGT TAC TCT TTG GTT AGT TGT TCA GTC TTA AAA AGG AGC C AAA AAA AAA AAA
	Wild target	AAA AAA AAA AAC CAA AGA GTA ACA CAA AAG A ATA ACT TAG ACG ATA CCT TAA AAT AAA AAA AAA
	Mutant target	AAA AAA AAA CAA AGA GTA ACA CAA AAG C ATA ACT TAG ACG ATA CCT TAA AAT AAA AAA AAA
	Capture	AAA AAA AAA AAA ATT TTA AGG TAT CGT CTA AGT TAT T
Pp237	probe 1	TGT CTA TTG TTT GTG TGC TTG TTT T GGC GGT CTA GGT TG
	probe 2	CCA TGT AGC TGA AAG GG AGT TGT TCA GTC TTA AAA AGG AGC C AAA AAA AAA AAA
	Wild target	AAA AAA AAA CC CTT TCA GCT ACA TGG CA ACC TAG ACC GCC AAA AAA AAA
	Mutant target	AAA AAA AAA CC CTT TCA GCT ACA TGG AA ACC TAG ACC GCC AAA AAA AAA
	Capture	AAA AAA AAA AAA GGC GGT CTA GGT TG
Pp328	probe 1	TGT CTA TTG TTT GTG TGC TTG TTT T TGA CTG ATG TAA GTT TTT GAA TA
	probe 2	TGT AGG CAG ACA GAG AG AGT TGT TCA GTC TTA AAA AGG AGC C AAA AAA AAA AAA
	Wild target	AAA AAA AAA CT CTC TGT CTG CCT ACA TA TTC AAA AAC TTA CAT CAG TCA AAA AAA AAA
	Mutant target	AAA AAA AAA CT CTC TGT CTG CCT ACA CA TTC AAA AAC TTA CAT CAG TCA AAA AAA AAA
	Capture	AAA AAA AAA AAA TGA CTG ATG TAA GTT TTT GAA TA
Pp507	probe 1	TGT CTA TTG TTT GTG TGC TTG TTT T AAA AGA GCA TAT CTG CTT GA
	probe 2	GAA AAG GGT AAG ACA ATC TCT AGT TGT TCA GTC TTA AAA AGG AGC C AAA AAA AAA AAA
	Wild target	AAA AAA AAA AGA GAT TGT CTT ACC CTT TTC TC AAG CAG ATA TGC TCT TTT AAA AAA AAA
	Mutant target	AAA AAA AAA AGA GAT TGT CTT ACC CTT TTC CC AAG CAG ATA TGC TCT TTT AAA AAA AAA
	Capture	AAA AAA AAA AAA AAA AGA GCA TAT CTG CTT GA
Pp573	probe 1	TGT CTA TTG TTT GTG TGC TTG TTT T CCC ATC TTT ATA CCC ATA AGC
	probe 2	TGN TAA TGT CAG TTG CTA GAA TAG AGT TGT TCA GTC TTA AAA AGG AGC C AAA AAA AAA AAA
	Wild target	AAA AAA AAA CTA TTC TAG CAA CTG ACA TTA NCA GCT TAT GGG TAT AAA GAT GGG AAA AAA AAA
	Mutant target	AAA AAA AAA CTA TTC TAG CAA CTG ACA TTA NCA ACT TAT GGG TAT AAA GAT GGG AAA AAA AAA
	Capture	AAA AAA AAA AAA CCC ATC TTT ATA CCC ATA AGC

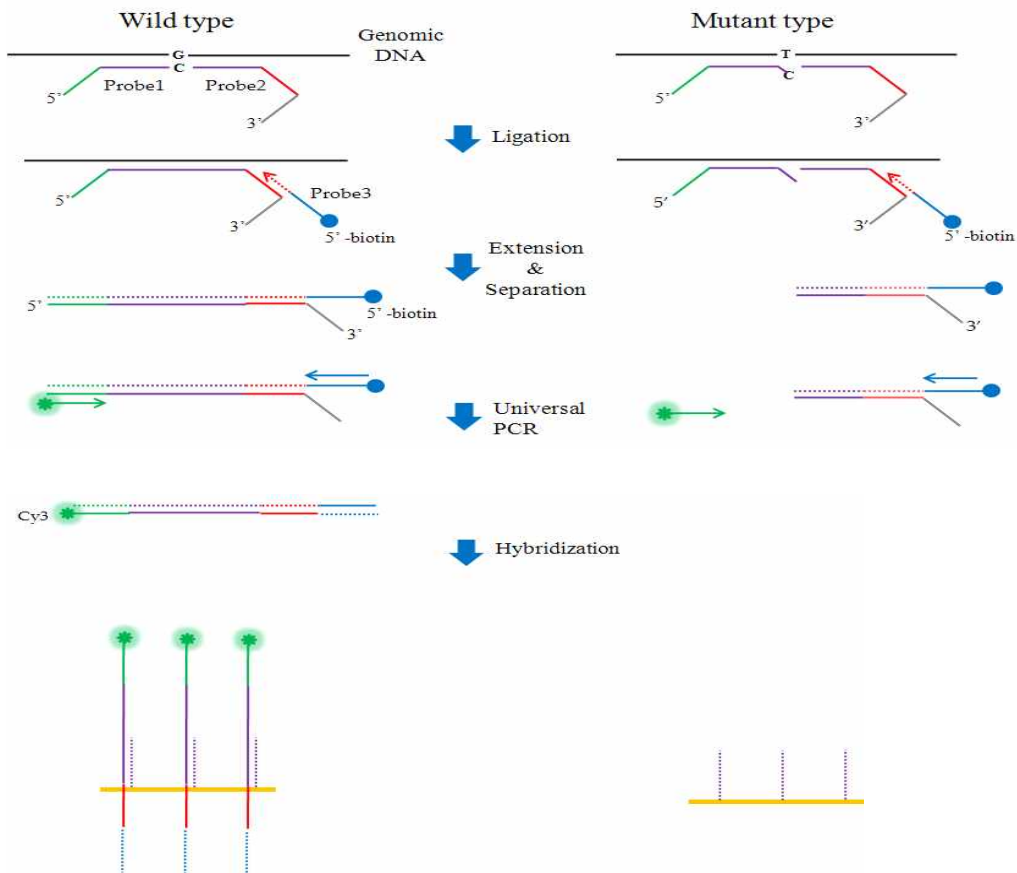
(2) SDL-PCR (Separation of Displaced Ligation probe based-Polymerase Chain Reaction) 기술 개발

(가) SDL-PCR 기술을 통한 다양한 SNP site의 genotype을 동시에 분석

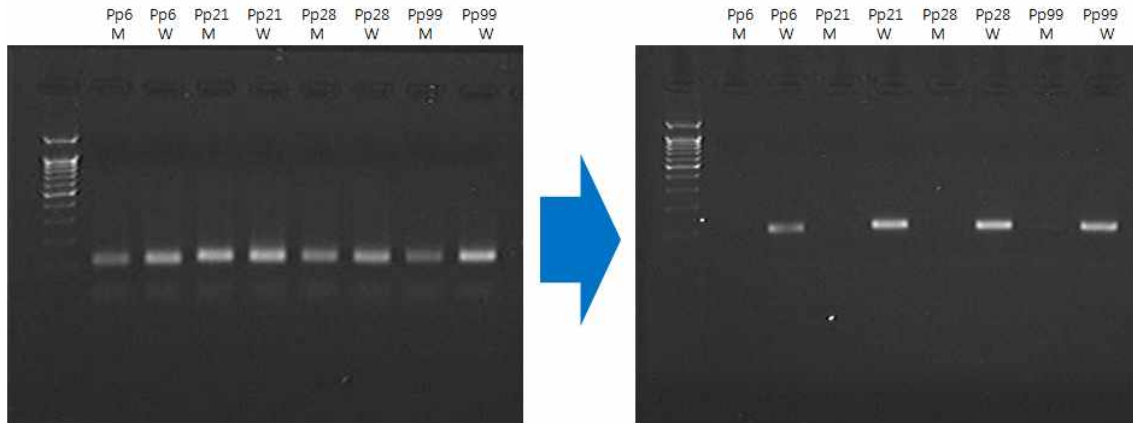
Fig. 9는 SDL-PCR (Separation of Displaced Ligation probe based-Polymerase Chain Reaction) 기술의 원리를 나타낸 것이다. 먼저 분석하고자 하는 genomic DNA의 특정 SNPs 마커가 wild type인지 mutant type인지 구분하기 위해 wild type일 경우에만 SDL-PCR probe 1과 2가 ligation 되도록 디자인한다. Ligation 반응을 보낸 이후에는 SDL-PCR probe 2의 적색 부분과 혼성화 반응이 되는 SDL-PCR probe 3을 반응용액에 추가로 넣어준다. Displacement activity가 있는 DNA Polymerase로 연장을 한 이후에 SDL-PCR probe 3의 5'-biotin을 이용하여 streptavidin-coated 자성 비드로 정제한다. 정제 과정에서 genomic DNA와 함께 ligation 반응이 일어나지 않은 SDL-PCR probe 1이 제거된다. 정제 과정을 거치고 나면, 이후의 반응에서 universal PCR의 nonspecific amplification을 획기적으로 감소시킬 수 있다. SDL-PCR probe 1의 녹색 부분, SDL-PCR probe 3의 청색 부분과 각각 동일한 염기서열을 갖는 universal forward primer와 universal reverse primer를 반응용액에 넣고

universal PCR을 수행한다. Ligation 반응이 일어난 wild type 샘플은 SDL-PCR probe 3이 SDL-PCR probe 1의 끝부분까지 연장되었기 때문에 증폭이 이루어지고, ligation 반응이 일어나지 않은 mutant type 샘플은 증폭이 이루어지지 않는다. Cy3 형광이 표시된 universal forward primer를 사용하여 PCR을 수행하고 DNA Chip에 혼성화한 이후에 형광 스캐너로 결과를 확인한다. 본 연구진이 개발할 SDL-PCR 반응에 사용되는 probe 1, 2, 3에서 보라색 부분 (Fig. 9)만 특정 SNP site에 specific한 유전자 서열이고, 그 이외의 부분들은 모두 universal한 유전자 서열로 디자인한다. 따라서 본 기술은 매우 다양한 SNP site를 단 하나의 튜브 반응을 통해 분석 가능하며 (ligation과 separation 반응, 그리고 마지막 PCR 또한 universal primer를 사용하여 하나의 튜브에서 진행), SNP 마커의 분석 방법에서 가격을 결정하는 가장 중요한 요인인 효소의 양을 최소화했기 때문에 기존의 기술들에 비해서 가격경쟁력 면에서 매우 뛰어나다고 판단된다. 마지막으로 Multiplex PCR 방법을 사용하지 않기 때문에 primer들의 nonspecific amplification이 발생하지 않는다.

앞서 합성한 probe 들을 이용하여 SDL-PCR을 실시하였다. 먼저 SDL-PCR이 제대로 실행되는지 확인하기 위하여 고추의 품종 식별에 사용되는 4가지의 SNP 마커 (Pp6, Pp21, Pp28, Pp99)에 대하여 SDL-PCR을 수행하고 그 결과를 2% Agarose Gel electrophoresis를 통하여 확인하였다. 이때, 각각의 형질에 대한 wild/mutant set를 2개를 준비하여 하나의 세트는 separation 과정을 거치게 하였고, 나머지 하나는 separation 과정을 하지 않은 상태로 universal PCR을 진행하였다. 다음 사진은 separation 과정을 거친 세트와 separation 과정을 거치지 않은 세트들을 각각 Gel electrophoresis를 수행한 뒤 얻은 사진이다(Fig. 10).



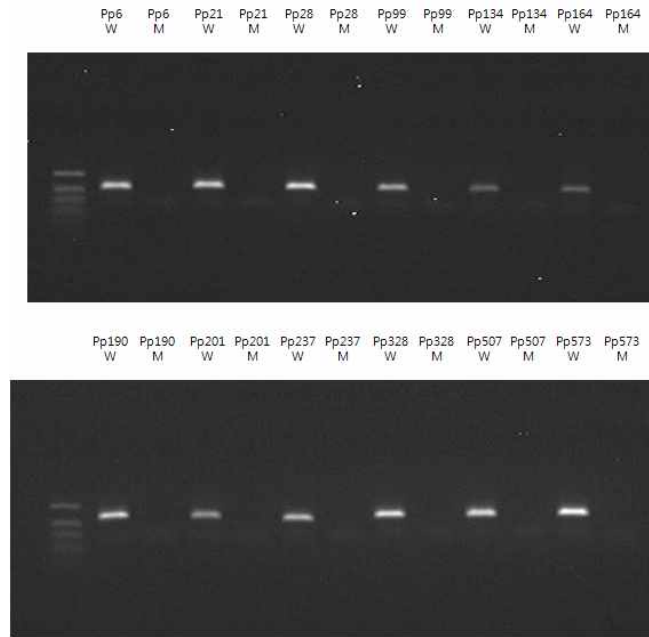
<Fig. 9> SDL-PCR 방법을 통한 DNA Chip SNP 마커 분석 기술



<Fig. 10> Separation 여부에 따른 결과차이 (좌 : Separation (X) 우 : Separation (O))

각 형질에 대하여 위의 밝은 band들은 PCR을 통하여 얻어진 PCR product이고, 밑의 상대적으로 희미한 band는 처음에 넣어주었던 primer이다. Separation 과정을 거치지 않은 세트의 sample들의 경우, 모든 형질에서 wild target과 mutant target의 구분 없이 밝은 band가 생겼다. 반대로, separation 과정을 거친 세트의 sample들에서는 모든 형질에서 wild target을 넣어주었던 sample에서만 band가 뜨는 것을 확인할 수 있었다. 이처럼 separation 과정을 거친 sample들과 separation 과정을 거치지 않은 sample들을 gel electrophoresis 사진으로 비교함으로써, SDL-PCR 기술에서 separation 과정의 필요성을 확인할 수 있었다. 또한 SDL-PCR이 제대로 일어나는 것을 확인할 수 있었다.

SDL-PCR이 제대로 이루어지는 것을 확인한 후에는, Pp6, Pp21, Pp28, Pp99, Pp134, Pp164, Pp190, Pp201, Pp237, Pp328, Pp507, Pp507 12가지의 서로 다른 sample에 대하여 SDL-PCR을 수행하였다. 12가지 sample에 대한 SDL-PCR 결과는 다음과 같다(Fig. 11). 2% Agarose Gel electrophoresis를 통해 확인한 결과, 이처럼 12개의 sample에 대하여서도 SDL-PCR이 제대로 이루어짐을 알 수 있었다.

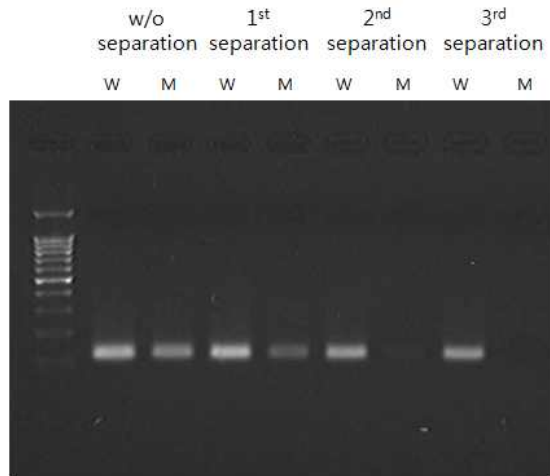


<Fig. 11> 12개 Sample에 대한 SDL-PCR 결과

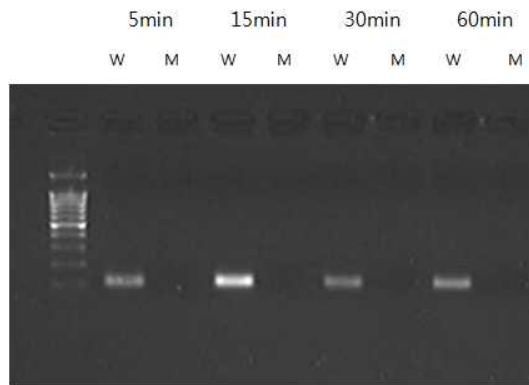
(나) SDL-PCR 기술을 통한 다양한 SNP site의 genotype을 동시에 분석

SDL-PCR 방법에서, separation 과정은 상당히 중요한 역할을 차지한다. Fig. 10에서 볼 수 있듯이, separation 과정을 거치지 않을 경우 mutant target에서도 nonspecific한 signal이 생기게 된다. 따라서 제대로 된 실험결과를 얻기 위해서는 separation 과정이 필수적이다. 하지만 separation 과정을 거칠 경우 그 과정에서 product의 유실이 생길 수 있다는 단점이 존재한다. 이에 streptavidin-coated 자성 비드와 extension product의 binding time, 그리고 washing의 횟수를 조절함에 따라서 최상의 separation이 이루어질 수 있는 조건을 찾고자 하였다.

먼저, washing의 횟수를 조절해 본 결과, 2번 이상의 washing 과정을 거쳤을 때 mutant target에서의 signal이 사라지는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 12). Streptavidin-coated 자성 비드와 extension product의 binding time을 조절하였을 때에는, 시간에 따라 큰 차이는 보이지 않았으나 15분간 binding을 시켰을 때 결과가 가장 좋은 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 13). 이에 15분간의 binding time과 2번의 washing으로 Separation 과정을 확립하였다.



< Fig. 12> Washing 횟수에 따른 Separation 결과

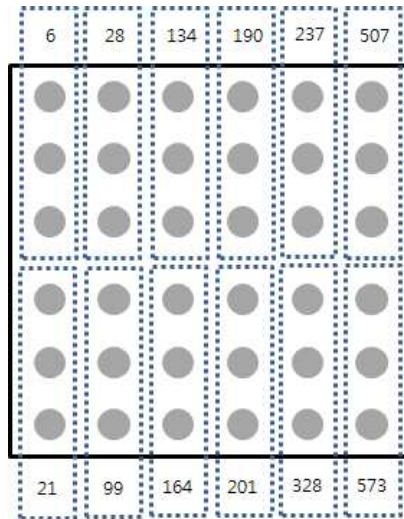


< Fig. 13> Binding time에 따른 Separation 결과

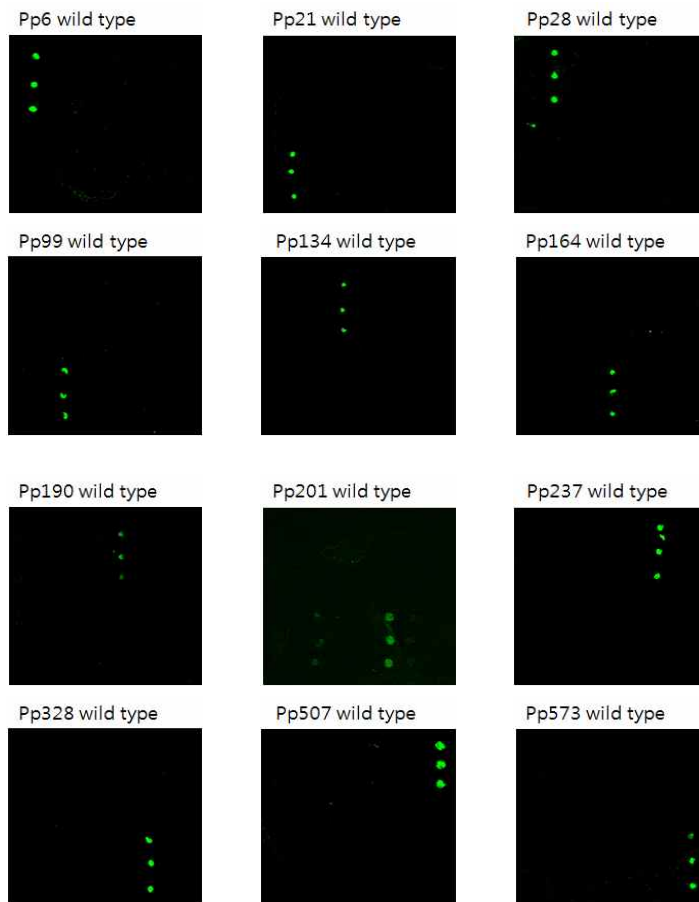
(다) DNA Chip test를 통한 최종 검증

최종적으로 SDL-PCR 기술을 사용한 SNP 분석법을 만들 때, DNA Chip 형태로 SNP site가 진단이 되게 된다. 이에 SDL-PCR 기술이 실제로 Chip에서 진행되는 것이 가능한지에 대한 확인을 하기위해 Chip assay를 진행하였다. Chip assay의 실험방법과 반응 조건은 위의 실험방법에 서술되어 있다. DNA Chip은 한 번에 여러 개의 SNP site를 포함할 수 있도록 설계되었다. Chip assay에 사용한 Chip 디자인은 Fig. 14와 같다.

Fig. 15는 각각의 형질의 type에 대한 Chip assay 결과이다. 12개의 SNP site에 해당하는 probe 1, probe 2 모두와 Pp6의 wild type sample과 나머지 11개의 mutant type 샘플을 섞어서 SDL-PCR을 수행한 결과 Pp6의 capture probe에서만 형광 신호가 나타났다. 나머지 11개의 경우에서도 모두 정확한 결과를 얻을 수 있었다. 따라서 이 결과는 SDL-PCR 기술로 다양한 SNP site에 대한 유전자형 검사가 DNA Chip 상에서 가능함을 증명한다.



<Fig. 14> DNA Chip 디자인



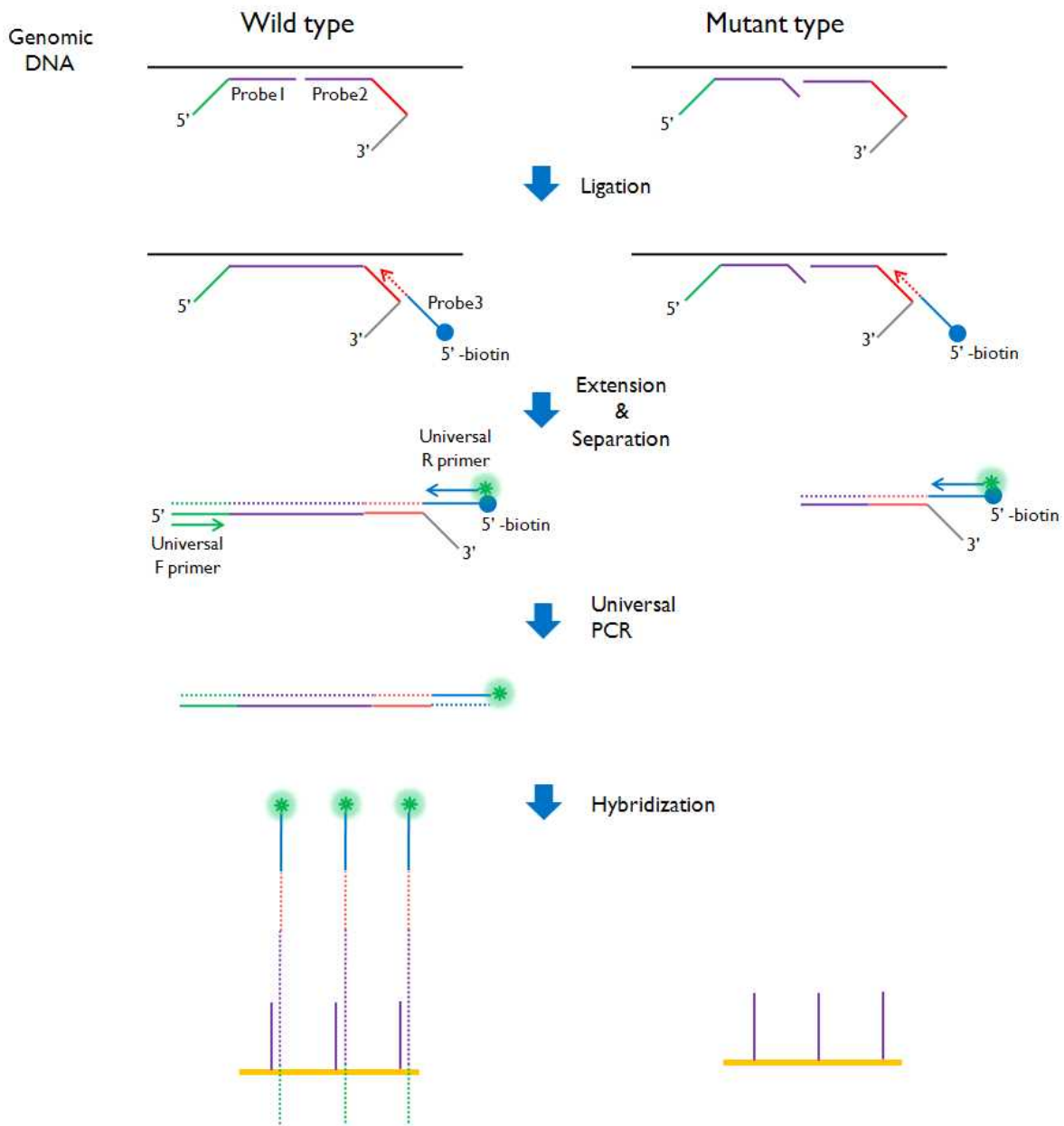
<Fig. 15> 각각의 형질에 대한 Chip Assay 결과

다. 제 3차년도

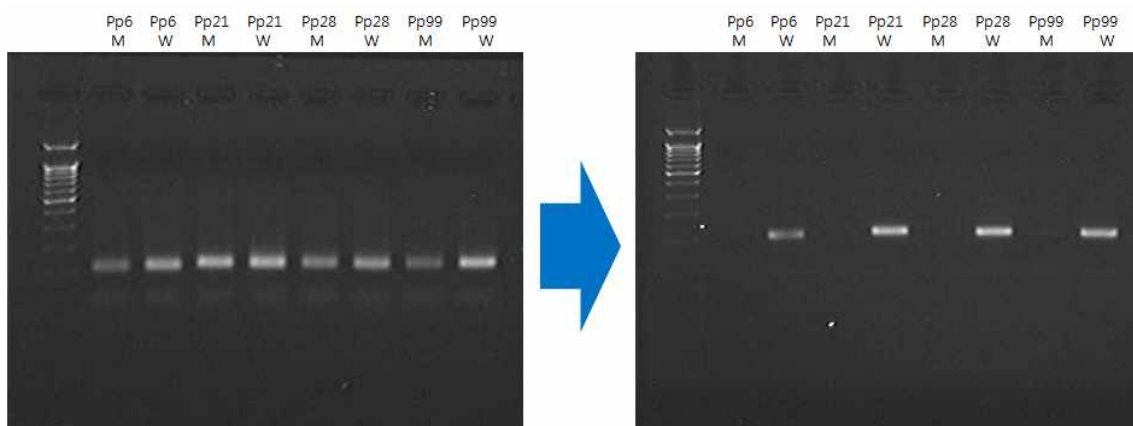
(1) SDL-PCR (Separation of Displaced Ligation probe based-Polymerase Chain Reaction)을 이용한 DNA Chip SNP 분석법

Fig. 16는 SDL-PCR (Separation of Displaced Ligation probe based-Polymerase Chain Reaction) 기술의 원리를 나타낸 것이다. 먼저 분석하고자 하는 genomic DNA의 특정 SNP 마커가 wild type인지 mutant type인지 구분하기 위해 wild type일 경우에만 SDL-PCR probe 1과 2가 ligation 되도록 디자인한다. Ligation 반응을 보낸 이후에는 SDL-PCR probe 2의 적색 부분과 혼성화 반응이 되는 SDL-PCR probe 3을 반응용액에 추가로 넣어준다. Displacement activity가 있는 DNA Polymerase로 연장을 한 이후에 SDL-PCR probe 3의 5'-biotin을 이용하여 streptavidin-coated 자성 비드로 정제한다. 정제 과정에서 genomic DNA와 함께 ligation 반응이 일어나지 않은 SDL-PCR probe 1이 제거된다. 정제 과정을 거치고 나면, 이후의 반응에서 universal PCR의 nonspecific amplification을 획기적으로 감소시킬 수 있다. SDL-PCR probe 1의 녹색 부분, SDL-PCR probe 3의 청색 부분과 각각 동일한 염기서열을 갖는 universal forward primer와 universal reverse primer를 반응용액에 넣고 universal PCR을 수행한다. Ligation 반응이 일어난 wild type 샘플은 SDL-PCR probe 3이 SDL-PCR probe 1의 끝부분까지 연장되었기 때문에 증폭이 이루어지고, ligation 반응이 일어나지 않은 mutant type 샘플은 증폭이 이루어지지 않는다. Cy3 형광이 표시된 universal forward primer를 사용하여 PCR을 수행하고 DNA Chip에 혼성화한 이후에 형광 스캐너로 결과를 확인한다. 본 연구진이 개발할 SDL-PCR 반응에 사용되는 probe 1, 2, 3에서 보라색 부분 (Fig. 16)만 특정 SNP site에 specific한 유전자 서열이고, 그 이외의 부분들은 모두 universal한 유전자 서열로 디자인한다. 따라서 본 기술은 매우 다양한 SNP site를 단 하나의 튜브 반응을 통해 분석 가능하며 (ligation과 separation 반응, 그리고 마지막 PCR 또한 universal primer를 사용하여 하나의 튜브에서 진행), SNP 마커의 분석 방법에서 가격을 결정하는 가장 중요한 요인인 효소의 양을 최소화했기 때문에 기존의 기술들에 비해서 가격경쟁력 면에서 매우 뛰어나다고 판단된다. 마지막으로 Multiplex PCR 방법을 사용하지 않기 때문에 primer들의 nonspecific amplification이 발생하지 않는다.

먼저 SDL-PCR이 제대로 실행되는지 확인하기 위하여 고추의 품종 식별에 사용되는 4가지 SNP 마커 (Pp6, Pp21, Pp28, Pp99)에 대하여 SDL-PCR을 수행하고 그 결과를 2% Agarose Gel electrophoresis를 통하여 확인하였다. 이때, 각각의 형질에 대한 wild/mutant set를 2개를 준비하여 하나의 세트는 separation 과정을 거치게 하였고, 나머지 하나는 separation 과정을 거치지 않은 상태로 universal PCR을 진행하였다. 다음 사진은 separation 과정을 거친 세트와 separation 과정을 거치지 않은 세트들을 각각 Gel electrophoresis를 수행한 뒤 얻은 사진이다(Fig. 17)



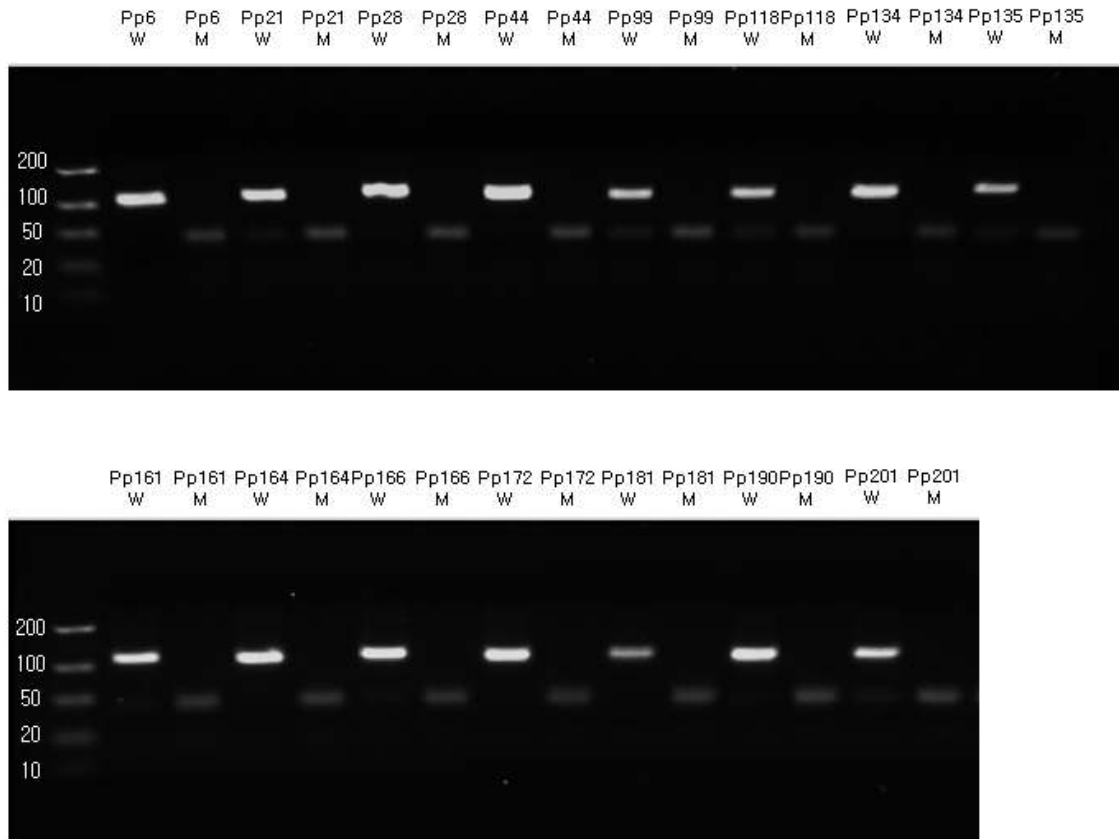
<Fig. 16> SDL-PCR 방법을 통한 DNA Chip SNP 마커 분석 기술



< Fig. 17> Separation 여부에 따른 결과차이(좌 : Separation (X) 우 : Separation (O))

(2) 실제 샘플 실험을 통해서 SDL-PCR을 이용한 DNA Chip SNP 분석 조건 최적화

SDL-PCR이 제대로 이루어지는 것을 확인한 후에는, Pp6, Pp21, Pp28, Pp44, Pp99, Pp118, Pp134, Pp135, Pp161, Pp164, Pp166, Pp172, Pp181, Pp190, Pp201 15가지의 고추의 품종 식별용 SNP 마커에 대하여 SDL-PCR을 수행하였다. 15종의 SNP 마커에 대한 SDL-PCR 결과는 다음과 같다(Fig. 18).



<Fig. 18> 15개 Sample에 대한 SDL-PCR 결과

2% Agarose Gel electrophoresis를 통해 확인한 결과, 이처럼 15개의 sample에 대해서도 SDL-PCR이 제대로 이루어짐을 알 수 있었다. 샘플로 DNA Chip 테스트를 실시하였다. 각각의 15종의 샘플을 DNA Chip 실험을 통해 확인하였다(Fig. 19).

(3) 실제 샘플을 이용한 Multiplex 테스트 실행 및 실제 분석 의뢰 시료 분석을 통한 최적의 저항성 마커 분석법 선정

15개의 단일염기다형성 (SNP) 마커를 가지고 있는 4종의 실제 샘플로 DNA Chip 테스트를 수행하였다. 이 4종의 실제 샘플 유전자형은 Table 2와 같다.

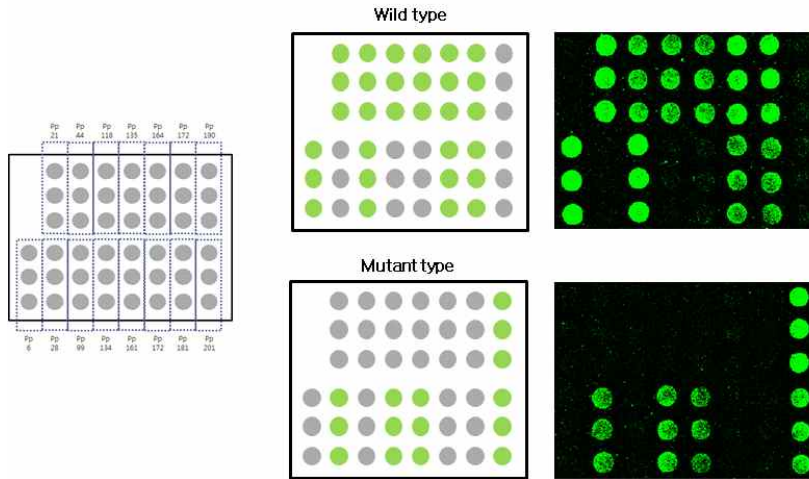
<Table 2> 15개의 단일염기다형성(SNP)을 가지는 4종의 유전자형

	Pp6	Pp21	Pp28	Pp44	Pp99	Pp118	Pp134	Pp135	Pp161	Pp164	Pp166	Pp172	Pp181	Pp190	Pp201
<i>C. annuum</i> (Perennial)	W	W	M	W	W	W	M	W	M	W	W	W	W	M	M
<i>C. annuum</i> (Demsey)	M	M	W	M	M	M	W	M	W	M	M	M	M	W	W
<i>C. annuum</i> (Tabasco)	M	W	M	M	M	W	M	W	W	M	M	W	W	M	M
<i>C. annuum</i> (PI159234)	W	W	M	M	M	W	M	W	M	M	M	M	W	M	M

***annuum* (Perennial)** : *C. annuum* (Perennial) 샘플을 이용해 DNA Chip 실험한 결과 wild type과 mutant type이 잘 구분됨을 확인할 수 있다(Fig. 20).

	Pp6	Pp21	Pp28	Pp44	Pp99	Pp118	Pp134	Pp135	Pp161	Pp164	Pp166	Pp172	Pp181	Pp190	Pp201
<i>C. annuum</i> (Perennial)	W	W	M	W	W	W	M	W	M	W	W	W	W	M	M

(a) *C. annuum* (Perennial)

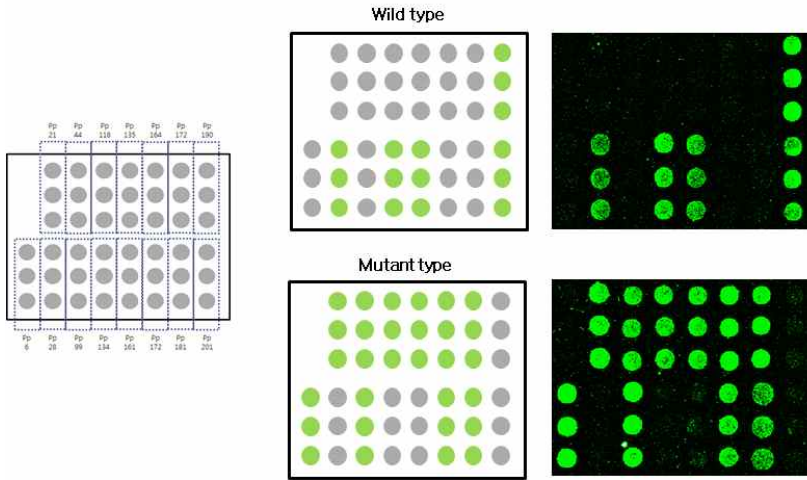


<Fig. 20> *C. annuum* (Perennial) 샘플 DNA Chip 결과

***annuum* (Dempsey)** : *C. annuum* (Demsey) 샘플을 이용해 DNA Chip 실험한 결과 wild type과 mutant type이 잘 구분됨을 확인할 수 있다(Fig. 21).

	Pp 6	Pp 21	Pp 28	Pp 44	Pp 99	Pp 118	Pp 134	Pp 135	Pp 161	Pp 164	Pp 166	Pp 172	Pp 181	Pp 190	Pp 201
<i>C. annuum</i> (Demsey)	M	M	W	M	M	M	W	M	W	M	M	M	M	W	W

(b) *C. annuum* (Demsey)

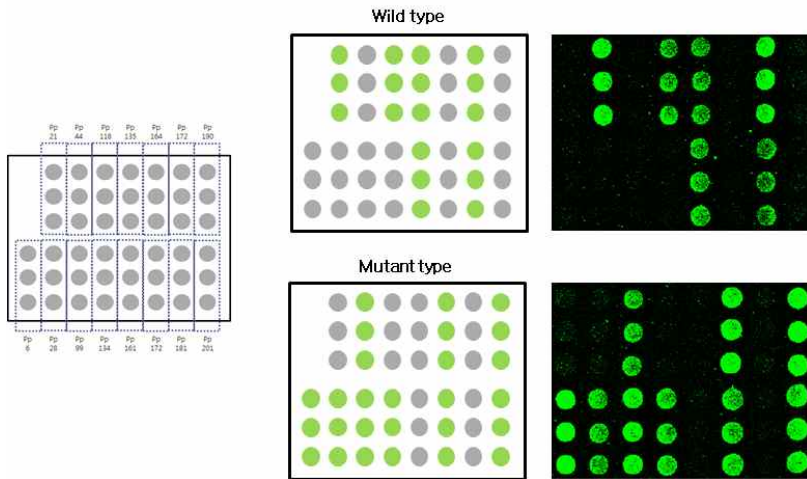


<Fig. 21> *C. annuum* (Demsey) 샘플 DNA Chip 결과

***frutescens* (Tabasco)** : *C. frutescens* (Tabasco) 샘플을 이용해 DNA Chip 실험한 결과 wild type과 mutant type이 잘 구분됨을 확인할 수 있다(Fig. 22).

	Pp 6	Pp 21	Pp 28	Pp 44	Pp 99	Pp 118	Pp 134	Pp 135	Pp 161	Pp 164	Pp 166	Pp 172	Pp 181	Pp 190	Pp 201
<i>C. frutescens</i> (Tabasco)	M	W	M	M	M	W	M	W	W	M	M	W	W	M	M

(c) *C. frutescens* (Tabasco)

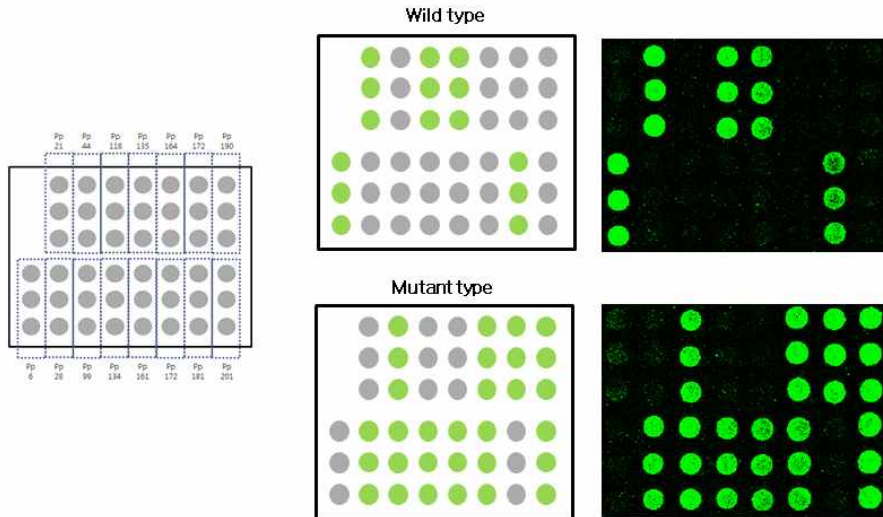


<Fig. 22> *C. frutescens* (Tabasco) 샘플 DNA Chip 결과

chinense (PI 159234) : *C. chinense* (PI 159234) 샘플을 이용해 DNA Chip 실험한 결과 wild type과 mutant type이 잘 구분됨을 확인할 수 있다(Fig. 23).

	Pp 6	Pp 21	Pp 28	Pp 44	Pp 99	Pp 118	Pp 134	Pp 135	Pp 161	Pp 164	Pp 166	Pp 172	Pp 181	Pp 190	Pp 201
<i>C. chinense</i> (PI 159234)	W	W	M	M	M	W	M	W	M	M	M	M	W	M	M

(d) *C. chinense* (PI 159234)



<Fig. 23> *C. chinense* (PI 159234) 샘플 DNA Chip 결과

위 4종의 실제 샘플을 이용해서 15 종의 SNP 마커에 대한 genotyping을 수행한 결과 민감도 및 특이도가 99% 이상인 결과를 얻을 수 있었으며, 이 결과는 본 위탁과제에서 개발한 SDL-PCR 기술이 최적의 병 저항성 SNP 마커 분석법으로 사용 가능함을 증명한다.

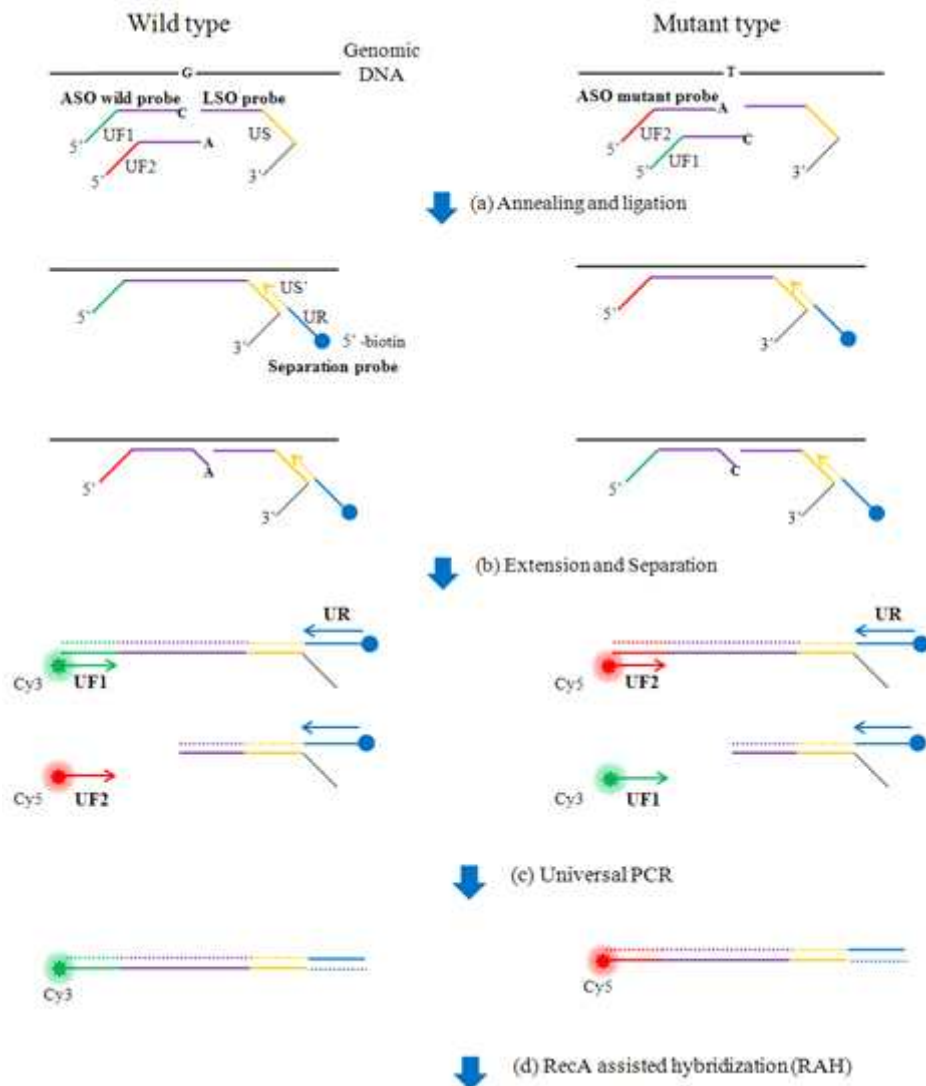
다. 제 4차년도

(1) 다양한 주요 병 저항성 마커의 신속/정확한 분석을 위한 DNA Chip 기술 개발

(가) SDL-PCR (Separation of Displaced Ligation probe based-Polymerase Chain Reaction) 기술 단점 보완

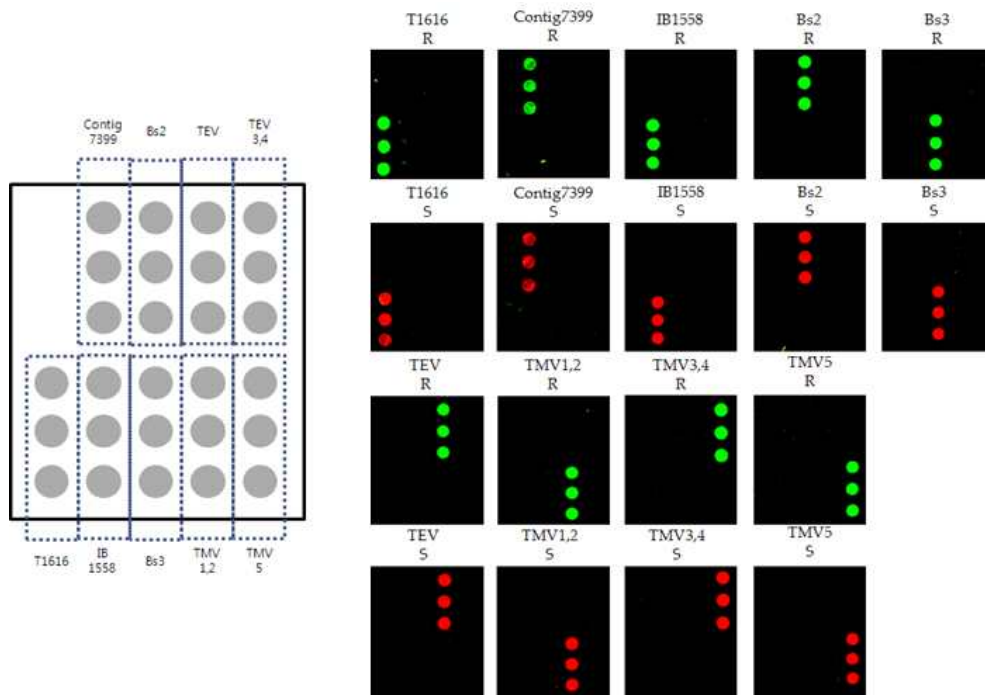
2, 3차 년도에 개발한 SDL-PCR 기술은 실제 샘플을 분석하기 위해서 두 개의 튜브에서 SDL-PCR을 수행하고 두 개의 Chip에서 실험을 수행해야 했다. 만약 wild type과 mutant type의 target DNA를 하나의 튜브와 하나의 Chip에서 분석할 수 있다면 비용을 절반으로 줄일 수 있다. 이에 본 연구진은 기존의 SDL-PCR 기술을 수정하여 하나의 튜브와 하나의 Chip에서 동시에 두 종류의 genotype을 분석할 수 있도록 했다. 수정된 실험 방법에서는 universal forward primer 1 (UF1)을 포함하고 있는 ASO wild probe와 universal forward primer 2 (UF2)를 포함하고 있는 ASO mutant probe를 하나의 튜브에서 LSO probe와 동시에 반응시킨다. 만약 target DNA가 wild type일 경우에는 ASO wild probe가 LSO probe와 ligation되어 결과적으로 Cy3가 표지된 PCR product가 만들어지고, 반대로 target DNA가 mutant type일 경우에는 ASO mutant probe가 LSO probe와 ligation되어 Cy5가 표지된 PCR product가 만들어진다. Target DNA의 genotype에 따라 각기 다른 형광 물질이 표지된 PCR product가 생성되기 때문에 하나의 Chip으로 분석이 가능하다. 또한 2,3차 년도와는 다르게 4차 년도에 개발한 RAH 기술을

사용해 DNA Chip 혼성화 반응을 수행하였다(Fig. 24).



<Fig. 24> SDL-PCR 방법을 통한 DNA Chip SNP 마커 분석 기술

서울대학교 연구진의 연구를 통해 개발된 병 저항성 마커 중에서 최종적으로 선정된 9개의 SNP 마커에 대한 probe를 제작하고 2,3차년도와 마찬가지로 DNA Chip을 통해 최종적으로 검증하였다. Target DNA가 저항성인 경우에는 Cy3신호, 이병성인 경우에는 Cy5 신호를 관찰할 수 있었다. 4차 년도에는 9개의 SNP 마커에 대한 genotype 분석에 필요한 probe들을 성공적으로 선정하였으며, 이를 토대로 실제 샘플의 분석 실험을 수행하였다(Fig. 25).

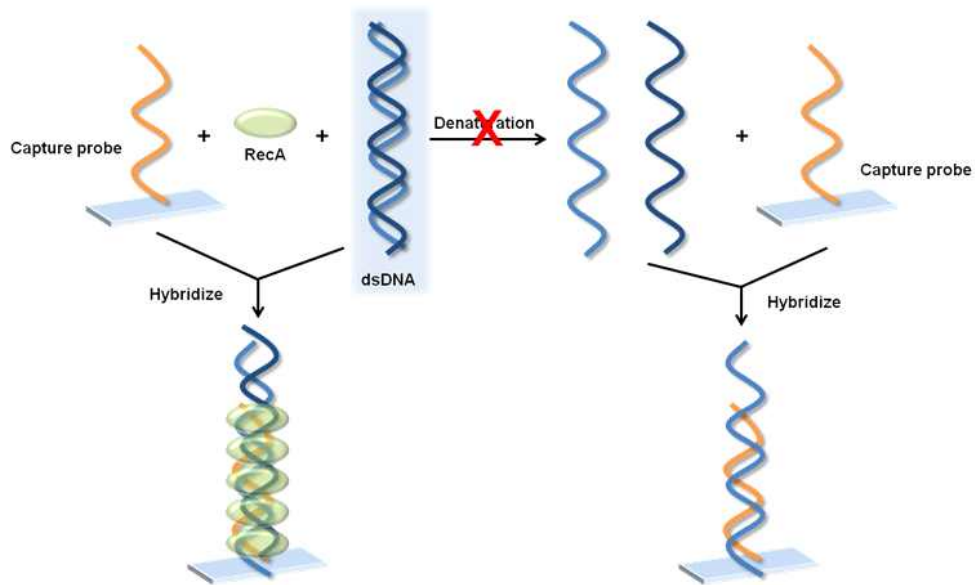


<Fig. 25> DNA Chip을 통해 최종 선정된 병 저항성 마커 probe 검증

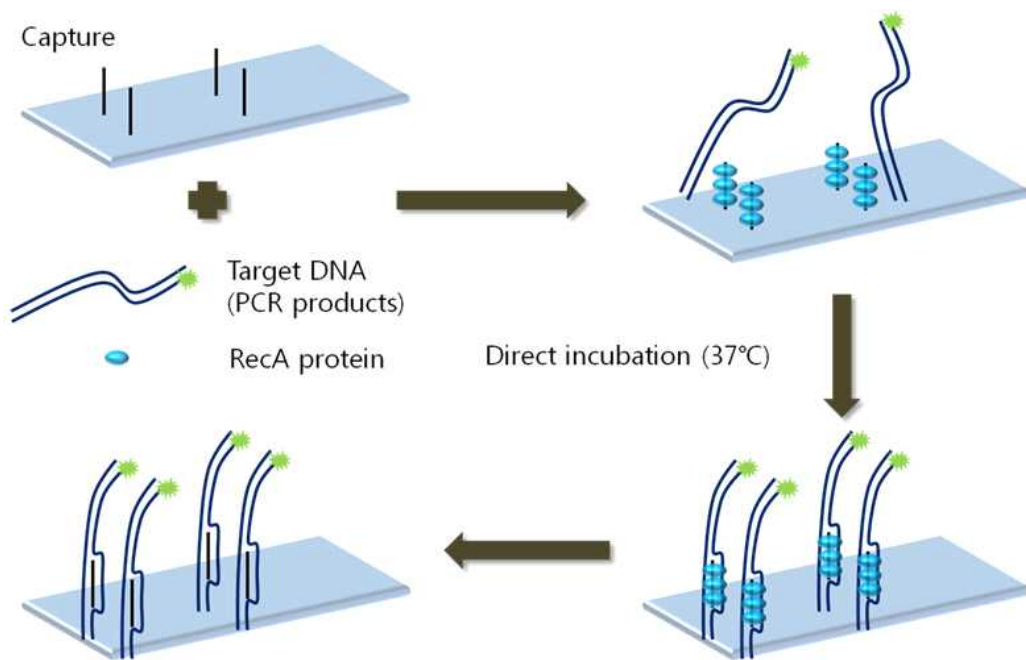
(나) RecA 단백질을 이용한 새로운 혼성화 방법 개발

본 연구에서는 변성단계를 거치지 않고 이중가닥 target DNA를 capture probe에 혼성화 시키기 위해서 RecA 단백질을 사용하였다. RecA 단백질은 이중가닥 target DNA를 단일가닥으로 만들어서 capture probe에 혼성화 시키는 것이 아니라 RecA 단백질이 단일가닥으로 되어있는 capture probe와 결합함으로써, capture probe와 상보적인 DNA 가닥을 가진 target DNA와 혼성화 결합할 수 있도록 하는 것이다. 이러한 특성을 가지고 있는 RecA 단백질을 사용하게 되면 변성과정을 거치는 기존의 혼성화 방법과는 달리 온도를 높여주고 낮춰주는 과정을 생략할 수 있기 때문에 분석 시간이 단축되고 분석 절차가 간편하다는 장점이 있다(Fig. 26).

Fig. 27은 RecA 단백질이 단일가닥 capture probe DNA와 결합함으로써 상보적인 target DNA의 변성과정 없이 이중가닥 형태에서도 target DNA를 혼성화 결합하는 과정을 보여주는 개략도이다. RecA 단백질을 target DNA와 섞어서 슬라이드글라스 위에 가한 후 capture probe DNA와 결합할 수 있도록 한다. Target DNA의 혼성화 정도를 확인하기 위해서 target DNA에 형광을 달아 형광의 세기를 측정해 혼성화 정도를 확인했다.



<Fig. 26> RecA를 사용한 dsDNA 혼성화 방법과 변성과정을 필요로 하는 기존의 혼성화 방법 비교

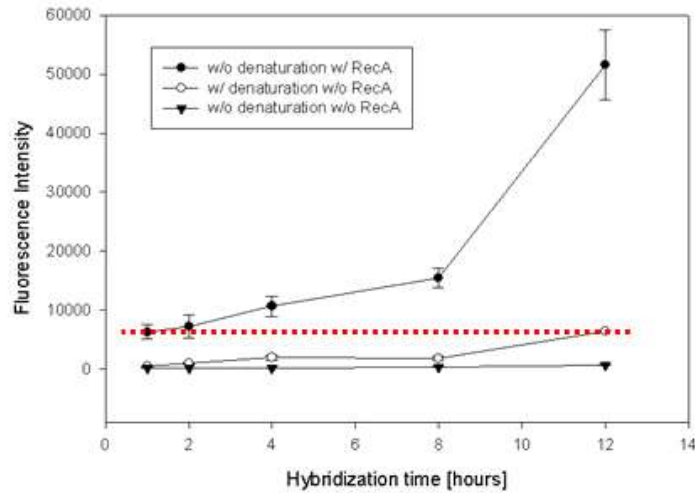


<Fig. 27> RecA assisted hybridization(RAH) 계략도

(다) RecA Assisted Hybridization (RAH) 기술 최적화

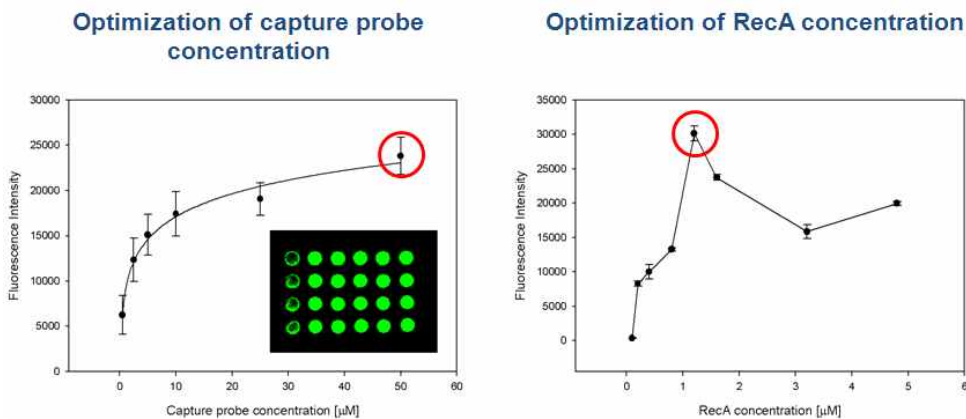
Fig. 28에서 보듯이 기존의 혼성화 기술로 12시간동안 혼성화 반응을 진행했을 때 관찰된 형광 신호의 세기와 비슷한 신호의 세기가 RecA를 사용하여 1시간 동안 반응시켰을 경우에 관찰되었다. 결론적으로 혼성화 시간을 기존의 12시간에서 1시간으로 획기적으로 단축함으로써 DNA Chip 기술의 가장 큰 단점이라고 할 수 있는 분석시간 문제를 해결 할 수 있게 되었다. 또한 RAH 기술을 민감도를 크게

향상시킬 수 있기 때문에 소량의 DNA를 분석해야 하는 실험에도 적용할 수 있으며 혼성화 반응을 필요로 하는 모든 기술에 광범위하게 사용될 수 있다는 장점이 있다(Woo et al. 2013).



<Fig. 28> 혼성화 시간 최적화 실험

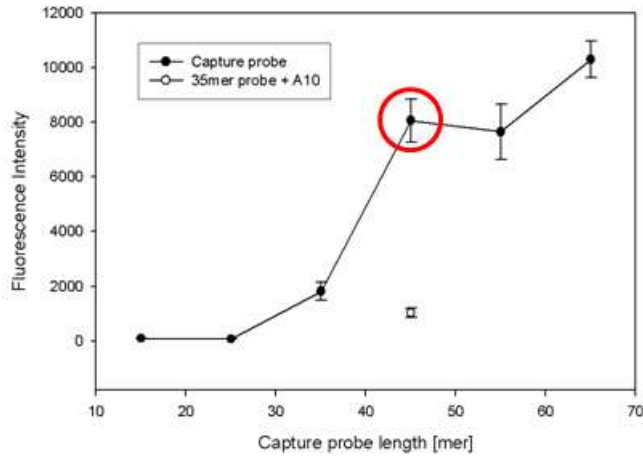
RecA 단백질이 기능을 하기 위해서는 입체장해(steric hindrance)를 최소화 하는 것이 좋다고 판단하여(Jung et al. 2013) 캡처탐침의 농도를 일반적으로 사용되는 50uM부터 2uM까지 낮추어서 실험을 수행하였다. 하지만 Fig. 29의 왼쪽 그래프에서 보듯이 일반적으로 사용되는 50 uM농도에서 가장 좋은 효율을 보였으며, 입체장해는 큰 문제가 되지 않았다. 따라서 capture probe의 농도는 일반적으로 사용되는 50 uM 농도로 정했다. 또한 RecA 단백질의 농도에 따른 형광 신호의 세기를 측정하였으며 최종 RecA 단백질의 농도는 1.2 uM로 결정되었다.



<Fig. 29> RecA 및 Capture probe 농도 최적화 실험

마지막으로 캡처탐침의 길이에 따른 형광신호를 측정하였다. RecA 단백질은 30 mer이상의 단일 가닥 DNA에서 필라멘트를 형성하는 것으로 알려져 있다. 따라서 15mer, 25mer의 캡처탐침을 사용했을 경우 혼성화 반응이 잘 되지 않는 것을 알 수 있다. 35mer 부터는 RecA 단백질이 기능을 수행하여 혼성화 반응이 잘 일어나는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 30). 45 mer 이상에서는 비슷한 효율을 보였기 때문에 capture probe의 길이를 45 mer로 결정하였다. 흥미로운 점은 35 mer의 capture probe 끝에 poly

A를 달아서 실험을 했을 경우에는 RecA 단백질의 효과가 현저히 떨어졌다는 것이다. RecA 단백질이 단일가닥 DNA와 필라멘트를 잘 형성하더라도 형성된 필라멘트 전체 부분이 target DNA와 상보적이지 않으면 혼성화 반응이 잘 이루어지지 않는다는 것을 알 수 있었다.



<Fig. 30> Capture probe 길이 최적화

(다) 실제 샘플을 이용한 Multiplex 테스트 실행 및 실제 분석 의뢰 시료 분석을 통한 병 저항성 마커 분석법 검증

실제 샘플의 9개의 병저항성 단일염기다형성(SNP) 마커 분석을 DNA Chip으로 확인하였다. 실험에 사용된 병 저항성 유전자 그리고 사용한 샘플은 Table 3과 같다.

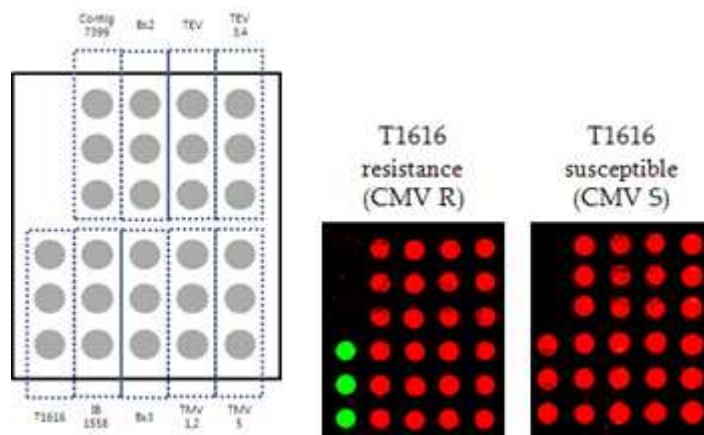
<Table 3> 병저항성 유전자 및 샘플명

Disease	Genes	Marker/Gene	저항성/이병성	DNA sample
CMV	<i>Cmr1</i>	T1616BAC	Resistance	CMV R
			Susceptible	CMV S
TSWV	<i>Tsw</i>	Contig7399	Resistance	PI 152225
			Susceptible	Special
역병(<i>Phytophthora</i>)	<i>Phytophthora major QTL</i>	IBP1558	Resistance	YCM334
			Susceptible	Tea
세균성 점무늬병(<i>Xanthomonas</i>)	<i>Bs2</i>	Gene(partial)	Resistance	ECW123
			Susceptible	ECW
세균성 점무늬병(<i>Xanthomonas</i>)	<i>Bs3</i>	Gene	Resistance	ECW30R
			Susceptible	ECW
TEV	<i>pvr1</i>	Gene	Resistance allele -1 (<i>pvr1</i>)	PI 159234
			Resistance allele -3 (<i>pvr1³</i>)	Dempsey
			Susceptible	ECW
TMV	<i>L</i>	Gene	Resistance allele -1 (<i>L¹</i>)	TMV L1
			Resistance allele -2 (<i>L²</i>)	TMV L1a
			Resistance allele -3 (<i>L³</i>)	Tabasco
			Resistance allele -4 (<i>L⁴</i>)	PI 159236
			Resistance allele -5 (<i>L⁵</i>)	PI260429
			Susceptible	ECW

(2) 병저항성 DNA chip 검정

(가) CMV (마커명 : T1616):

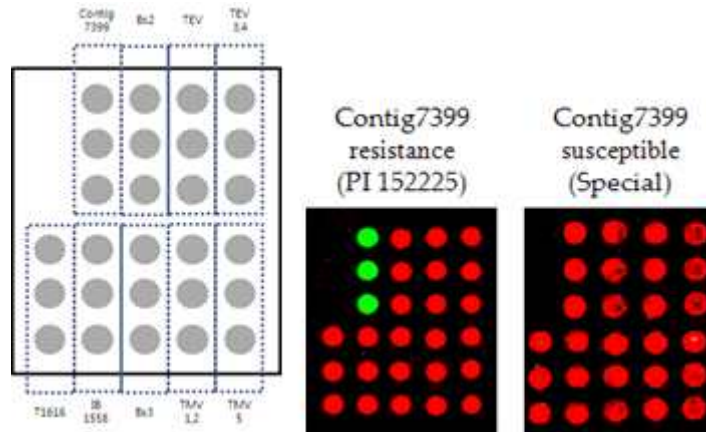
CMV 저항성인 샘플(CMV R)과 CMV 이병성인 샘플(CMV S)를 이용해 DNA Chip 실험한 결과 저항성과 이병성이 잘 구분됨을 확인할 수 있다(Fig. 31).



<Fig. 31> CMV 샘플 DNA Chip 결과

(나) TSWV (마커명 : Contig7399):

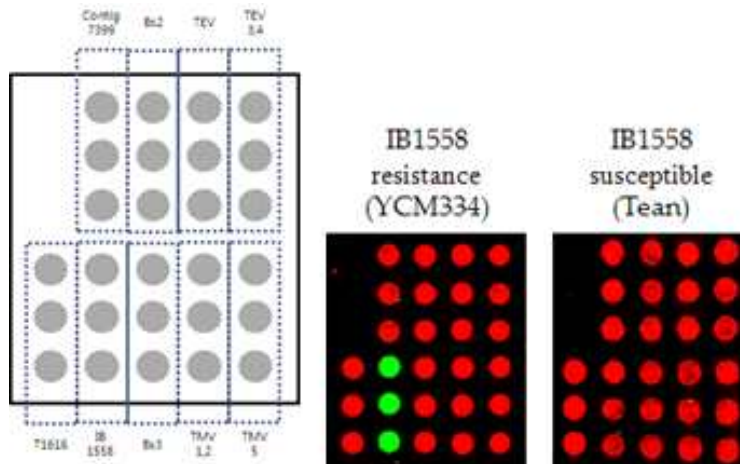
TSWV 저항성인 샘플(PI 152225)과 TSWV 이병성인 샘플(Special)를 이용해 DNA Chip 실험한 결과 저항성과 이병성이 잘 구분됨을 확인할 수 있다(Fig. 32).



<Fig. 32> TSWV 샘플 DNA Chip 결과

(다) 역병(*Phytophthora*) (마커명 : IBP1558):

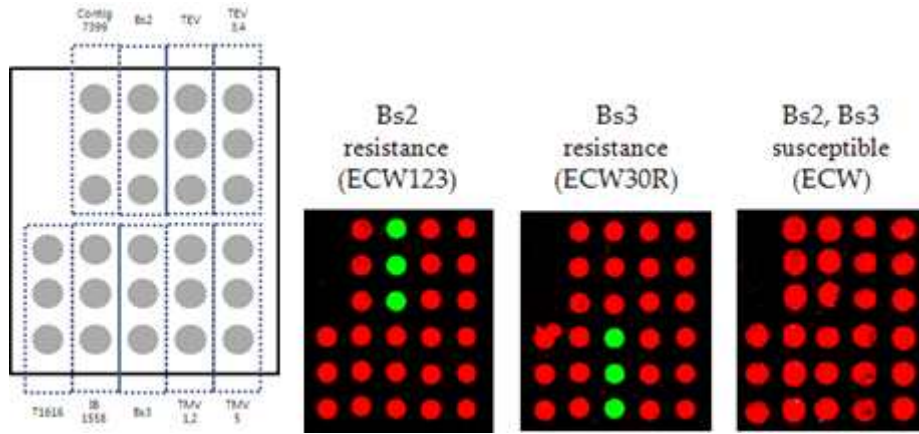
역병 저항성인 샘플(YCM334)과 역병 이병성인 샘플(Tean)를 이용해 DNA Chip 실험한 결과 저항성과 이병성이 잘 구분됨을 확인할 수 있다(Fig. 33).



<Fig. 33> 역병 샘플 DNA Chip 결과

(라) 세균성 점무늬병 (*Xanthomonas*) (마커명: Bs2, Bs3):

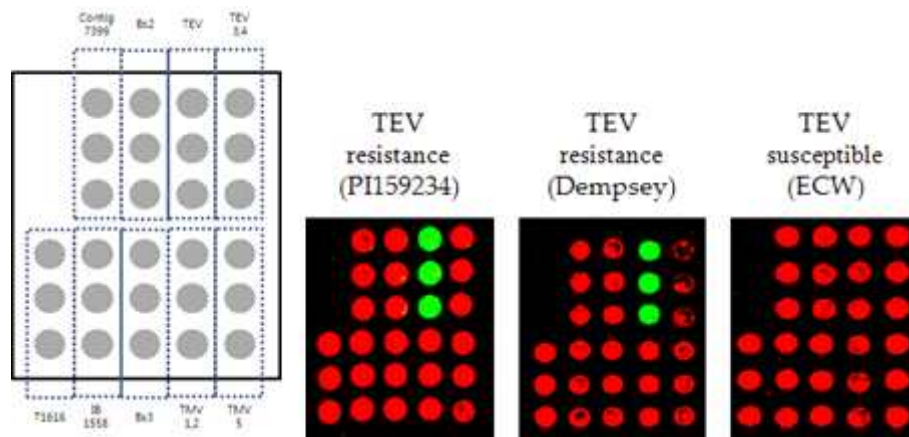
세균성 점무늬병 저항성인 실제 샘플 (ECW123, ECW30R)과 세균성 점무늬병 이병성인 실제 샘플 (ECW)을 이용해 DNA Chip 실험을 수행한 결과 저항성과 이병성이 잘 구분됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 34).



<Fig. 34> 세균성 점무늬병 (Xanthomonas) 샘플 DNA Chip 결과

(마) TEV (마커명: TEV):

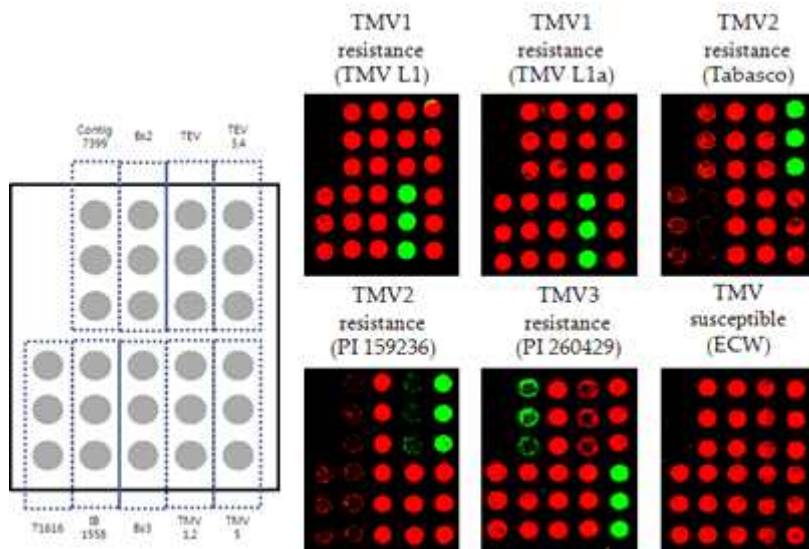
TEV 저항성인 실제 샘플 (PI159234, Dempsey)과 TEV 이병성인 실제 샘플 (ECW)을 이용해 DNA Chip 실험을 수행한 결과 저항성과 이병성이 잘 구분됨을 확인할 수 있었다(Fig. 35).



<Fig. 35> TEV 샘플 DNA Chip 결과

(바) TMV (마커명: TMV1, TMV2, TMV3):

TMV 저항성인 실제 샘플 (TMV L1, TMV L1a, Tabasco, PI 159236, PI 260429)과 TMV 이병성인 실제 샘플 (ECW)을 이용해 DNA Chip 실험을 수행한 결과 TMV L1, TMV L1a, ECW의 경우에는 저항성과 이병성이 잘 구분됨을 확인할 수 있었다. 그러나 Tabasco, PI 159236, PI 260429의 경우에는 TMV 마커에 대해서는 정확한 결과를 보였지만, 다른 병저항성 마커 중 일부분에 대해서는 저항성과 이병성을 구분하기 어려운 결과를 보였다 (Fig. 36). TMV 저항성인 실제 샘플의 경우에는 다른 병저항성 유전자에도 유전자 변이가 발생하였을 것으로 추정되며 염기서열 분석을 통해서 이를 입증하는 실험이 요구된다. 그렇지만 본 연구진이 선정한 세 종류의 TMV 마커로 해당 실제 샘플의 TMV 저항성 유무를 판단하는 데는 문제가 없는 것으로 사료된다.



<Fig. 36> TMV 샘플 DNA Chip 결과

제 7절. 포장 병리검정 체계 확립

1. 배추과 작물 주요 병의 육종현장 적용시험확립

가. 연구수행 방법

(1) 공시재료

본 시험은 강원도 강릉시 왕산면 대기리에 위치한 강릉원주대학교 실습농장에서 2009년 여름부터 2009년 가을까지 실시하였다. 본 실험에 사용된 식물개체는 배추는 CR계통 배추 21개, 일반배추 종자 8개 품종, (주)대농에서 분양해준 종자 20개 품종 및 기타 배추종자 4종 총 53개 품종을 162공 트레이에 종자를 공당 1립씩 파종하여 20-28℃ 비닐하우스에서 25일간 육묘하였다. 브로콜리는 21개 품종을 162공 트레이에 배추와 같은 방법으로 파종하였다. 품종 당 파종 종자수는 총 72개씩 파종을 하였으며 파종 후, 강릉원주대학교 유리온실에서 육묘를 관리하였다. 그 외 배추 뿌리혹병 race 판별을 위한 판별 기주인 양배추 2개 품종, 순무 2를 배추와 같은 방법으로 육묘하여 시험에 사용하였다.

(2) 처리방법

시험구 배치는 난괴법 3반복으로 수행하였다. 시험포장은 매년 배추 뿌리혹병이 상습적으로 발병되는 강릉시 왕산면 대기리에 위치한 강릉원주대학교 실험포장을 선정하였다. 시험포장 내에 병원균의 분포를 균일하게 만들기 위하여 2008년 채집한 배추 뿌리혹병에 감염된 병든 식물의 뿌리혹을 마쇄하여 1.4×10^5 spores/ml 농도의 휴면포자 현탁액 40L를 시험구 포장 전면에 골고루 뿌렸다. 25일간 육묘한 3-4엽기의 배추 및 브로콜리 유묘를 정식 재식거리 90×40cm로 정식하였다. 이때 시험구는 난괴법 3반복으로 처리하였다. 10a당 시비량을 질소, 인산, 칼리를 40-10-25kg 수준으로 시비하였고 정식 후 30일경에 추비하였다. 병해충 방제를 위하여 정식 후 노균병 방제약 2회, 배추좀나방 방제약을 3회 경엽살포하였다.

(3) 조사방법

품종 및 계통 별 배추의 내서성 조사는 정식 후 30일에 시험구 당 20주에 대하여 배추 지상부에 대한 시들음을 조사하였고, 정식 후 60일에 각 배추품종 및 계통에 대하여 뿌리를 채취하여 지하부에 대한 뿌리혹병 저항성을 조사하였다. 아울러 정식 후 60일에 각 배추품종에 대한 수량성을 알고자 생체중을 조사하였다. 뿌리혹병에 대한 조사 기준은 0=뿌리혹병 발생이 없음, 1=1-10%의 뿌리에 뿌리혹이 착생되며 비대정도가 적고 서로 독립하여 존재, 2=11-30% 뿌리에 뿌리혹이 착생되며 비대정도가 비교적 큼, 3=31-60% 뿌리에 뿌리혹이 착생되며 서로 접합되고 비대정도가 큼, 4=61% 이상의 뿌리에 뿌리혹이 착생되며 서로 접합되고 비대정도가 매우 큼으로 뿌리혹 발생 %에 따라 5단계로 세분화하여 조사하였다.

나. 연구결과

(1) 배추의 내서성 조사

배추품종 별 내서성을 알고자 정식 후 30일에 지상부의 시들음을 조사한 결과 배추품종에서는 불암플러스, 강력여름배추, 대통, CR 산촌배추, 진청, super CR Kimi 85, super CR Hiroki, 칠성배추, 개나리, CR 장군, 력광이, 계통에서는 SP-02, SP-05, SP-23, SP-27, CR DB 29, CR DB 50이 내서성 및 지상부에서 발생하는 배추 뿌리혹병 병징인 시들음 증상에 강한 것으로 나타났다(Fig. 2). 일반적으로 배추 지상부의 시들음 증상은 내서성이 떨어지거나 뿌

리혹병에 감수성일 때 주로 발생하는 것으로 뿌리혹병에 감염된 지상부의 배추 경우는 성장이 점차 쇠퇴하여 외소해지며, 잎이 시들고 심하면 황변 된다. 잔 뿌리털에 침입하여 발병하므로 뿌리털이 적어 수분과 양분의 흡수기능이 급격히 저하되며 가물고 일조가 강한 낮에는 계속적인 위조증상이 나타났다(Fig. 1). CR계통이지만 CR 명품 43.3%, CR 동풍 40.0%이고 CR 안심, CC808A이 각각 33.3%가 시들음 증상을 나타냈다(Fig. 2). 병에 걸린 기주식물은 일반적으로 배추 뿌리혹병에 대한 지상부의 생육에 대한 영향은 주근에 혹이 형성되는 경우보다는 다소 적지만 혹의 형성정도에 따라서는 발육불량, 잎의 퇴색, 시들음 등의 증상이 나타난다(Yeoung 등, 2003). 정식 직후 어린 묘 때 감염되면 주근에 대형 혹이 형성되는 경우가 많고, 이 때문에 양분과 수분의 흡수가 크게 방해를 받아 발육이 불량해지고 맑은 날 낮 동안에 시드는 지상부의 증상이 나타나고 심하면 고사하기에 이른다. 그러나 본 연구에서는 품종별 배추정식 후 시간이 지날수록 지상부의 시들음 증상이 점차로 호전되는 품종들이 있었는데 이것은 적절량의 강수를 받은 배추 품종들이 부족한 수분의 흡수를 받으면서 지상부 생육에 탄력을 받은 것으로 사료된다.



Fig. 1. Above-ground symptoms of wilting of Chinese cabbage at 30 days after transplanting.

A: Non-wilting , B: Wilting

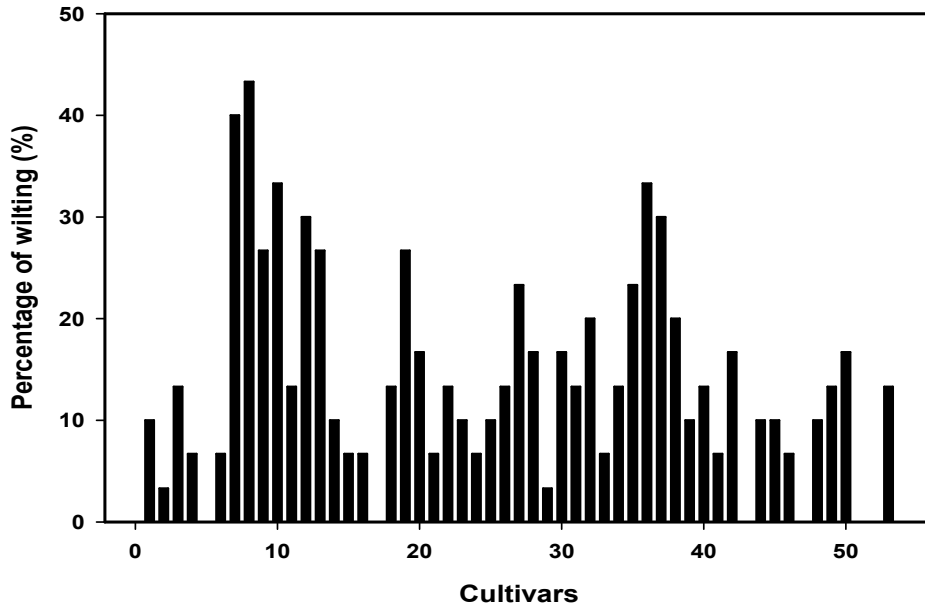


Fig. 2. Comparison of wilting rate of Chinese cabbage cultivars and strains in the field at 30 days after transplanting.

1-34 : Cultivars of Chinese cabbage, 35-53 : Strains of Chinese cabbage

1: Woldongdaechep, 2: Daetong, 3: Gohyangssam, 4: CR Sanchonbaechu, 5: Bulamplus, 6: Jincheong, 7: CR Dongpung, 8: CR Myeongpung, 9: Gyeouljinmyeong, 10: CR Ansim, 11: Sagang, 12: Chunryang, 13: Kiraboshi, 14: Hwangpa 90, 15: Super CR Kimi 85, 16: Super CR Hiroki, 17: Kangryeokyeoleumbaechu, 18: Garaksin lhobaechu, 19: Chamnorangbaechu, 20: Ganghanbaechu, 21: Chilseongbaechu, 22: Seoulbaechu, 23: Sanchonbaechu, 24: Gaenari, 25: Gohyangssam(coating), 26: CR Macbaechu, 27: CR Greenbaechu, 28: CR Hagyebaechu, 29: CR Janggun, 30: CR Yeoreummac, 31: CR Cheongok, 32: CR Daetong, 33: Ryeokgwang, 34: CR Chungwangbombaechu, 35: CC807A, 36: CC808A, 37: CC809A, 38: CC817A, 39: SP-03, 40: SP-25, 41: SP-22, 42: SP-23, 43: SP-05, 44: SP-07-1, 45: SP-21, 46: SP-27, 47: SP-02, 48: SP-28, 49: SP-01, 50: SP-30, 51: CR DB 50, 52: CR DB 29, 53: CR DB 30.

(2) 배추 뿌리혹병 발생조사

정식 30, 40, 50일째 지상부의 시들음에 근거하여 배추 뿌리혹병에 대한 이병주율을 조사한 결과 품종에 따라서 일관된 결과를 보이기도 하지만 그렇지 않은 경향을 보이는 품종도 있었다(Fig. 3).

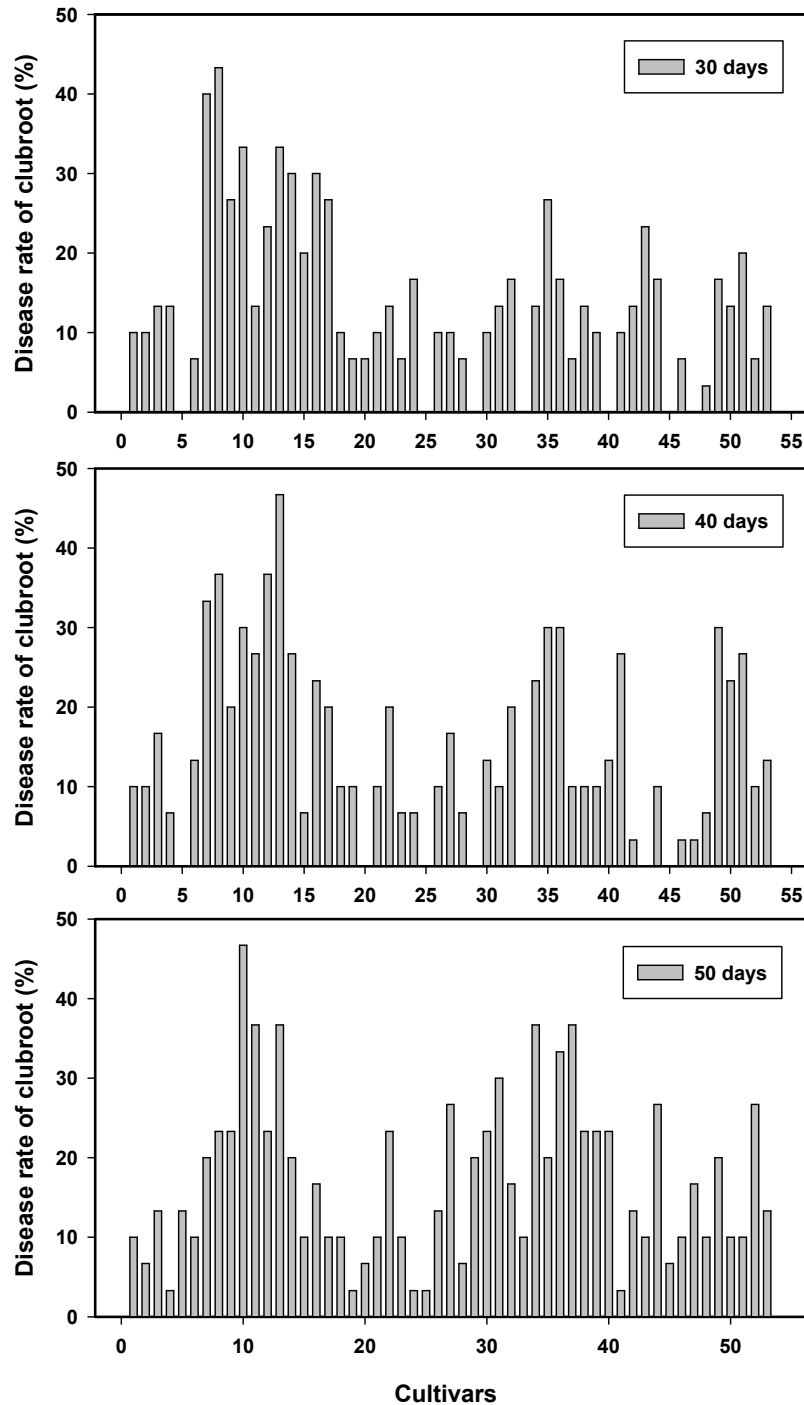


Fig. 3. Comparison of above-ground symptoms of clubroot among 30, 40 and 50 days after transplanting.

정식 60일 후에 뿌리혹병에 대한 배추 품종 및 계통 별 지하부의 저항성을 조사한 결과 대통, Super CR Kimi 85, Super CR Hiroki 품종이 뿌리혹병 발병율이 0로 가장 저항성이 높은 것으로 조사되었으며, 그 외 저항성 품종으론 고향쌈, CR 산촌배추, 황파, CR 장군, CR 여름맛, CR 청옥 품종이 저항성이 높았으며 계통으론 CC807A, CC809A, SP-03, SP-30, CR DB 50, CR DB 29, CR DB 30이 저항성인 것으로 나타났다. 뿌리혹병 발생이 심한 감수성 품종으론 강한배추, 개나리, 서울배추, 산촌배추 품종으로 조사되었다(Fig. 4). 뿌리혹은 형성된 후 얼

마 되지 않은 경우에는 표면이 희고 단단하지만 시간이 지남에 따라 표면은 갈변하고 거칠어진다. 뿌리털의 발육상태를 보면 정식 40일 이후에 갑자기 근장이 짧아지는 현상이 관찰되어 뿌리혹이 형성되면서 주근과 세근이 고사하는 것으로 알려져 있고 병든 포기 뿌리는 이상비대 되어, 뿌리에 크고 작은 부정형의 혹이 형성되고 시간이 지나면서 환경에 따라 혹의 상처부위로 세균이나 다른 균류가 침입하여 썩기도 한다(Yeoung 등, 2003). 기주식물의 뿌리혹병 발병 기작 연구에 대한 현재까지의 초점은 뿌리세포의 이상 비대 성장이 주요 원인이기 때문에 병원균 침입 시 식물체내 오옥신과 사이토키닌 대사 관련 유전자 발현 분석에도 최근에 관심을 가지고 있다(Devos 등, 2005). 또한 뿌리혹병 발생은 토질에 따라서도 차이가 나는데 일반적으로 부식질토나 점토함량이 많은 토양에서 발생이 많고 토양산도가 높아질수록 감소한다는 Davies와 Jones(2002)의 결과를 토대로 본 연구에서도 토양산도 등의 토양분석 실험이 추가 될 필요는 있다.

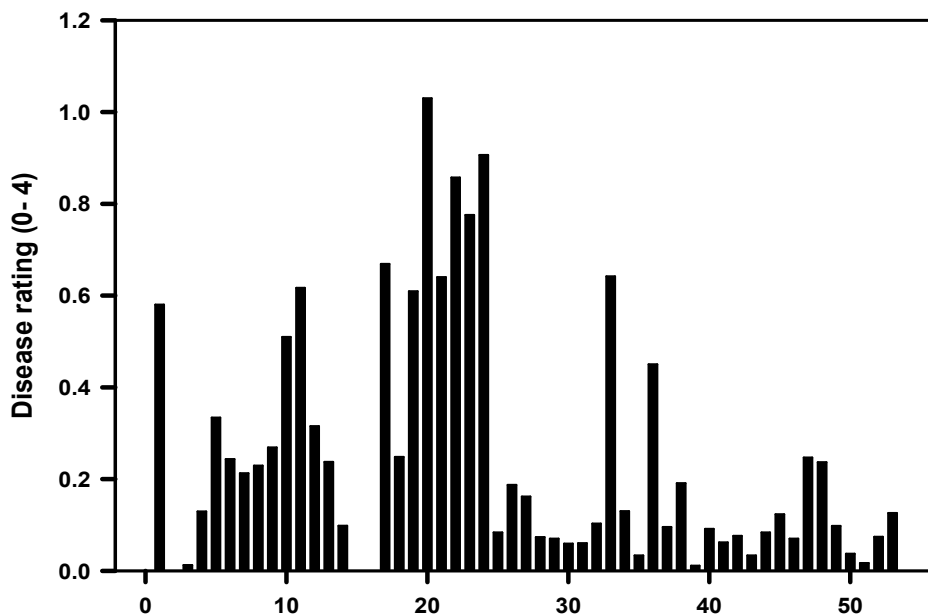


Fig. 4. Comparison of clubroot of Chinese cabbage cultivars depending on the disease severity at 60 days after transplanting.

Disease rating (0-4) :

0: no, 1: gall formed 1-10%, 2: gall formed 11-30%, 3: gall formed 31-60%, 4: gall formed 61-100%

1-34 : Cultivars of Chinese cabbage, 35-53 : Strains of Chinese cabbage

1: Woldongdaechep, 2: Daetong, 3: Gohyangssam, 4: CR Sanchonbaechu, 5: Bulamplus, 6: Jincheong, 7: CR Dongpung, 8: CR Myeongpung, 9: Gyeouljinmyeong, 10: CR Ansim, 11: Sagang, 12: Chunryang, 13: Kiraboshi, 14: Hwangpa, 15: Super CR Kimi, 16: Super CR Hiroki, 17: Kangryeokyeoleumbaechu, 18: Garaksin Ihobaechu, 19: Chamnorangbaechu, 20: Ganghanbaechu, 21: Chilseongbaechu, 22: Seoulbaechu, 23: Sanchonbaechu, 24: Gaenari, 25: Gohyangssam(coating), 26: CR Macbaechu, 27: CR Greenbaechu, 28: CR Hagyebaechu, 29: CR Janggun, 30: CR Yeoreummac, 31: CR Cheongok, 32: CR Daetong, 33: Ryeokgwang, 34: CR Chungwangbombaechu, 35: CC807A, 36: CC808A, 37: CC809A, 38: CC817A, 39: SP-03, 40: SP-25, 41: SP-22, 42: SP-23, 43: SP-05, 44: SP-07-1, 45: SP-21, 46: SP-27, 47: SP-02, 48: SP-28, 49: SP-01, 50: SP-30, 51: CR DB 50, 52: CR DB 29, 53: CR DB 30.

(3) 배추 생체중 조사

정식 60일 후에 배추 지하부의 뿌리혹병 발병을 조사함과 동시에 각 품종과 계통에 대한 생체중을 조사하기 위하여 포장에 심겨진 배추를 전수조사 하였다. 생체중이 무거운 품종으로 Super CR Hiroki가 2659.7g, 진청이 2255.5g, 黄波 90이 2190.2g, 서울배추가 2171.7g이었다 (Fig. 5, Table 1). 일반적으로 병원균에 감염되면 배추뿌리에 형성된 뿌리혹이 물관부의 통도 기능을 막아 양수분의 흡수를 방해하여 지상부의 생육이 지연되고 낮에는 잎이 위조 및 왜소화되는 전형적인 뿌리혹병 증상이 나타나면서 지상부의 생체중이 줄어든다. 발병 뿌리털에는 크고 작은 여러 개의 혹들이 형성되어 있는 것을 볼 수 있는데 형성된 혹의 세포들은 정상적인 세포들 보다 많은 영양분을 소모할 뿐만 아니라 식물지하부 뿌리전체의 영양분과 물의 이동을 간섭한다. 보통 뿌리혹병에 걸린 배추는 생체중이 낮으나 배추뿌리혹병 감수성 품종 중에서 강한배추 1776g, 서울배추 2171g, 산촌배추 1703g, 개나리 1759g로 생체중이 그다지 낮지 않았다(Fig. 5, Table 1). 이것은 배추육묘 초반기보다는 어느 정도 배추가 성장한 후반기에 뿌리혹병에 감염이 된 것으로 사료되며 이와 같은 결과는 Kim 등(2000a, 2000b)의 감염시기가 빠를수록 피해 정도가 심각하다는 결과와 유사한 것으로 정식 후 30일 이전에 병에 감염되면 수확이 불가능하므로 육묘기나 정식초기에 뿌리혹병에 감염되지 않도록 포장관리에 주의가 필요한 것으로 생각된다.

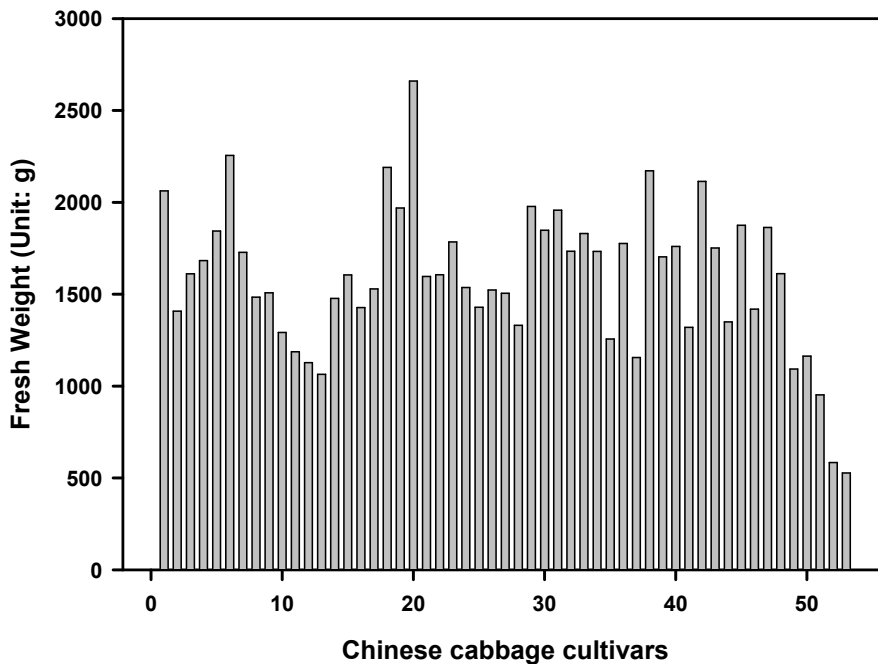


Fig. 5. Comparison of fresh weight of chinese cabbage cultivars in 60 days after transplanting.

Table 1. Comparison of fresh weight of chinese cabbage cultivars and strains at 60 days after transplanting.

Fresh weight of Chinese cabbages					
Cultivar	F.W (g)	Cultivar	F.W (g)	Cultivar	F.W(g)
1	2062.1abcde ^z	19	1255.9fghijk	37	1477.4cdefghij
2	1407.4defghij	20	1776.0bcdefghi	38	1605.0bcdefghij
3	1611.3bcdefghij	21	1155.2ghijkl	39	1596.2bcdefghij
4	1418.4defghij	22	2171.7abc	40	1606.3bcdefghij
5	1843.7bcdefgh	23	1703.2bcdefghi	41	1784.3bcdefghi
6	2255.2ab	24	1759.7bcdefghi	42	1536.5bcdefghij
7	1727.7bcdefghi	25	1320.0fghij	43	1429.2defghij
8	1483.9cdefghij	26	2114.2abcd	44	1522.9cdefghij
9	1501.4cdefghij	27	1751.6bcdefghi	45	1505.5cdefghij
10	1291.3fghij	28	1349.3efghij	46	1330.3fghij
11	1186.3ghijkl	29	1611.7bcdefghij	47	1977.2bcdef
12	1426.8defghij	30	1093.1ijkl	48	1847.7bcdefgh
13	1528.4cdefghij	31	1162.8ghijkl	49	1956.9bcdef
14	2190.2abc	32	952.1jkl	50	1733.8bcdefghi
15	1968.7bcdef	33	583.5kl	51	1875.1bcdefg
16	2659.7a	34	526.7l	52	1863.2bcdefg
17	1830.6bcdefgh	35	1127.4hijkl	53	1683.2bcdefghi
18	1733.2bcdefghi	36	1063.6ijkl		

^z Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level

1-34 : Cultivars of Chinese cabbage, 35-53 : Strains of Chinese cabbage

1: Woldongdaecheop, 2: Daetong, 3: Gohyangssam, 4: CR Sanchonbaechu, 5: Bulamplus, 6: Jincheong, 7: CR Dongpung, 8: CR Myeongpung, 9: Gyeouljinmyeong, 10: CR Ansim, 11: Sagang, 12: Chunryang, 13: Kiraboshi, 14: Hwangpa 90, 15: Super CR Kimi 85, 16: Super CR Hiroki, 17: Kangryeokyeoleumbaechu, 18: Garaksin Ihobaechu, 19: Chamnorangbaechu, 20: Ganghanbaechu, 21: Chilseongbaechu, 22: Seoulbaechu, 23: Sanchonbaechu, 24: Gaenari, 25: Gohyangssam(coating), 26: CR Macbaechu, 27: CR Greenbaechu, 28: CR Hagyebaechu, 29: CR Janggun, 30: CR Yeoreummac, 31: CR Cheongok, 32: CR Daetong, 33: Ryeokgwang, 34: CR Chungwangbombaechu, 35: CC807A, 36: CC808A, 37: CC809A, 38: CC817A, 39: SP-03, 40: SP-25, 41: SP-22, 42: SP-23, 43: SP-05, 44: SP-07-1, 45: SP-21, 46: SP-27, 47: SP-02, 48: SP-28, 49: SP-01, 50: SP-30, 51: CR DB 50, 52: CR DB 29, 53: CR DB 30.

배추 뿌리혹병 저항성 품종은 전통적 육종 방법을 사용하여 저항성 유전자를 도입하면서 저항성 품종을 만든다. 본 연구에서 선발된 일본의 두 품종 외에 CR 장군, 대통 품종과 CR DB 50과 CR DB 29 계통은 배추 뿌리혹병에 대하여 내서성 및 배추 뿌리혹병에 저항성이 높은 것으로 나타났다. 다만 대통 품종에서 문제가 되는 것은 생체중이 상대적으로 낮다는 것이

다. 생체중이 우수한 품종과 육종을 통하여 상호보완적인 품종 육성이 필요할 것으로 사료된다. 하지만 이러한 저항성 품종을 한 지역에서 연속하여 3~4년 연작을 할 경우 병원균의 변이에 의한 저항성 품종이 이병성화 하는 경우가 발생하므로 향후에는 배추품종에 따른 병원균 변이 기작 연구와 기주식물내에서 뿌리혹병 발병 기작 연구가 함께 수행되어야 할 것 같다. 저항성 배추계통으로 육성된 CR계 품종은 지역이나 재배시기에 따라 이병성, 중도저항성, 저항성 등으로 각기 다르게 나타나 저항성 정도에 일관성이 없는 것으로 알려져 있다(Kim 등, 2003). 본 연구에서의 대부분의 배추 뿌리혹병 저항성인 CR계통의 품종은 뿌리혹이 약간 형성되었지만 수확시 상품성에는 그다지 문제가 없는 것으로 나타났다. 그러나 뿌리혹병의 레이스가 빠른 속도로 증가하는 것을 보면 저항성 품종만으로 뿌리혹병을 예방하기에는 한계가 있는 것으로 생각되며 앞으로 좀 더 효과적인 방제를 위해서는 다각적인 방법이 모색되어야 할 것으로 생각된다.

(4) 배추 품종별 결구형태, tip-burn 및 해충 피해 조사

배추의 생육특성으로 결구여부는 중요한 생리적 특성이다. 정식 50일 후 조사한 결과는 품종에 따라서 다양하게 나타났다(Table 2). 또 고온기 여름배추 재배에서 많이 나타나는 생리적 장애인 tip-burn은 품종에 따라서 안쪽 잎과 바깥쪽 잎에 증상이 나타났다. Tip-burn은 Ca결핍에 의하여 나타나는 생리적 장애로 본 연구 결과 품종에 따라서 Ca시비 처방을 달리하여야 함을 보였다(Table 2).

Table 2. 배추의 결구형태, tip-burn 및 insect 피해 조사(정식 50일 후)

품 종	배추 형태 및 생육조사					
	결구 형태			Tip-brun		Insect
	결구	반결구	무결구	Inner-	Outer-	
1			-	2/30	2/30	normal
2	-			4/30		normal
3	-			3/30		normal
4	-				6/30	5/30
5	-				1/30	normal
6	-				7/30	normal
7			-	0/30	0/30	normal
8			-	4/30		6/30
9			-		1/30	normal
10			-		5/30	3/30
11	-				4/30	normal
12			-		1/30	4/30
13			-		2/30	normal
14			-	0/30	0/30	0/30
15	-			4/30	1/30	0/30
16	-			8/30	11/30	normal
17	-			1/30	40/30	30/30
18		-			2/30	normal

배추 형태 및 생육조사

품 종	결구 형태			Tip-brun		Insect
	결구	반결구	무결구	Inner-	Outer-	
19	-			4/30		normal
20	-			1/30		normal
21	-				2/30	3/30
22		-			2/30	normal
23	-				2/30	normal
24	-			0/30	0/30	normal
25	-		-	2/30		6/30
26			-	0/30	0/30	3/30
27			-	0/30	0/30	normal
28			-		2/30	30/30
29			-		3/30	normal
30			-	1/30	2/30	normal
31	-				5/30	3/30
32			-		6/30	normal
33	-				9/30	normal
34	-			6/30		normal
35		-		5/30		normal
36		-			2/30	normal
37		-			3/30	normal
38		cylindrical				normal
39	-			1/30		normal
40	-				6/30	normal
41	-			5/30		normal
42	-			3/30		0/30
43	-			10/30		9/30
44	-			6/30		normal
45	-				4/30	normal
46	-			2/30	2/30	normal
47			-	7/30		normal
48	-				1/30	normal
49	-			3/30		30/30
50			-		2/30	normal
51	-			5/30		normal
52			-	0/30	0/30	7/30
53			-	0/30	0/30	7/30

(5) 브로콜리 품종 별 병해 조사

21개 브로콜리 품종을 배추 뿌리혹병 상습 발병 포장에 정식하여 병 발생을 조사하였다. 브로콜리의 뿌리가 뿌리혹병에 감염되면 지상부가 시들게 된다. 지상부의 시들음 증상을 정식

30일 후 시험에 공시한 브로콜리 품종에 대하여 조사하였다. 공시 품종 중 액티브브로콜리, 브로콜리 녹국, 청광브로콜리, 에브리브로, 그린필드 브로콜리, 녹색 브로콜리, 그레이스, 코요시, Shaster는 지상부가 시들지 않았다(Fig. 6).

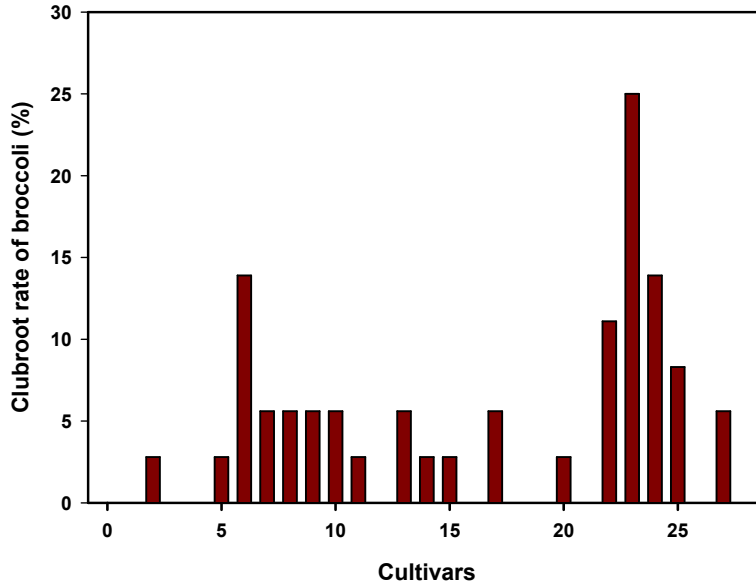


Fig. 6. Comparison of wilting by clubroot according to broccoli cultivars.

1: 액티브브로콜리, 2: 브로콜리 녹색, 3: 브로콜리 녹국, 4: 청광브로콜리 5: 청세, 6: 얼리유 브로콜리, 7: Any Bro, 8: 그린브리보 브로콜리, 9: 브로콜리 앳브로, 10: 브로콜리 킹덤, 11: 브로콜리 아메로, 12: 에브리브로, 13: 에쿠스 브로콜리, 14: 브로콜리 파트너, 15: 조생 그린포트, 16: 그린필드 브로콜리, 17: 청제 브로콜리, 18: 녹색 브로콜리, 19: 그레이스, 20: Pilgrim, 21: 코요시, 22: 바타비아, 23: 벨스타, 24: 앵톨, 25: 그린포트, 26: Shaster, 27: 나이스 그린.

정식 60일 후 지하부 뿌리에 발생한 흑을 조사한 결과 저항성 품종에서는 흑이 관찰되지 않았다. 그러나 에브리브로, 녹색 브로콜리, Shaster는 지상부가 시들지도 않았고, 뿌리에 흑이 관찰되지 않았으므로 브로콜리의 뿌리흑병 조사시 지상부의 시들음을 기준으로 저항성과 감수성을 판정하는 것은 부정확한 방법임을 알 수 있었다(Fig. 7).

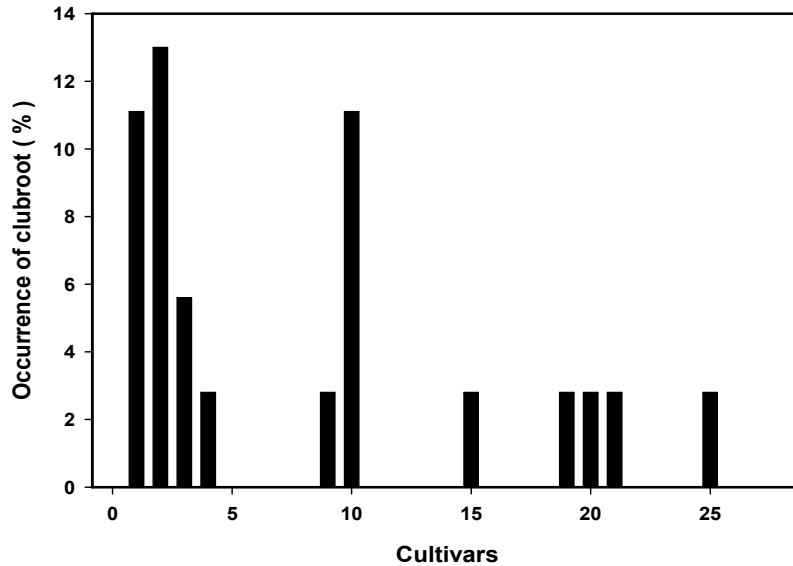


Fig. 7. The occurrence of below-ground clubroot among broccoli cultivars.

1: 액티브브로콜리, 2: 브로콜리 녹색, 3: 브로콜리 녹색, 4: 청광브로콜리 5: 청세, 6: 얼리유 브로콜리, 7: Any Bro, 8: 그린브리보 브로콜리, 9: 브로콜리 앳브로, 10: 브로콜리 킹덤, 11: 브로콜리 아메로, 12: 에브리브로, 13: 에쿠스 브로콜리, 14: 브로콜리 파트너, 15: 조생 그린포트, 16: 그린필드 브로콜리, 17: 청제 브로콜리, 18: 녹색 브로콜리, 19: 그레이스, 20: Pilgrim, 21: 코요시, 22: 바타비아, 23: 벨스타, 24: 앵톨, 25: 그린포트, 26: Shaster, 27: 나이스 그린.

브로콜리에 발생하는 또 다른 중요한 병은 *Xanthomonas campestris* p.v. *campestris*에 의하여 발생하는 검은썩음병이다. 검은썩음병은 십자화과 채소에 막대한 피해를 준다(Agrios, 2005; Williams, 1980). 이 병은 국내에서 십자화과 채소인 무, 배추, 양배추, 케일에 대하여 발생은 보고가 되었으나 꽃양배추(cauliflower, *B. oleracea* var. *botrytis*)와 브로콜리에 대한 병해발생은 보고된 바가 없었다(Kim, 1986; Kim 등, 1991). 그러나 Kim 등(1991)은 케일에서 분리한 *X. campestris* pv. *campestris*가 양배추뿐만 아니라 브로콜리와 꽃양배추에도 병원성이 있음을 보고했고, 최근에 Hong 등(2007)이 제주도에서 브로콜리에 발생하는 병해를 조사하였는데 노균병과 함께 검은썩음병이 많이 발생함을 보고하였다. 이 병의 방제 역시 저항성 품종을 이용이 환경친화적인 방제 수단이다. 이 병은 브로콜리에서 육묘상에서부터 수확기에 이르기까지 전 생육기간에 발생한다. 처음에는 잎 가장자리에서 엽맥을 중심으로 V자형으로 황색의 부정형 병반이 형성된다. 병이 진전되면 병반이 안쪽으로 확대되고, 병반 내의 잎맥은 흑색을 띠게 된다. 심하게 감염된 잎은 고사하고, 줄기의 경우는 도관부가 흑색으로 변한다.

본 연구는 브로콜리의 유기재배에 적합한 품종을 선발하기 위하여 원예적 특성이 우수하면서 검은썩음병에 저항성인 품종을 선발하기 위하여 실험을 수행하였다. 조사된 27개 브로콜리 품종 중 청광브로콜리, 청세, Any Bro, 그린브리보 브로콜리, 브로콜리 앳브로, 브로콜리 킹덤, 에브리브로, 조생 그린포트, 그레이스, Pilgrim, 코요시, 바타비아, 그리고 앵톨 품종이 병이 발생하지 않아 저항성 품종으로 판단되었다(Fig. 8).

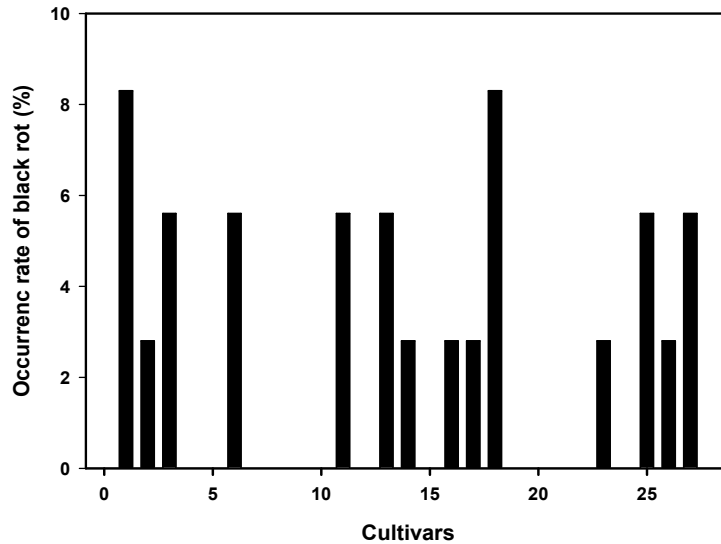


Fig. 8. Comparison of occurrence rate of black rot in broccoli.

1: 액티브브로콜리, 2: 브로콜리 녹색, 3: 브로콜리 녹색, 4: 청광브로콜리 5: 청세, 6: 얼리유 브로콜리, 7: Any Bro, 8: 그린브리보 브로콜리, 9: 브로콜리 앳브로, 10: 브로콜리 킹덤, 11: 브로콜리 아메로, 12: 에브리브로, 13: 에쿠스 브로콜리, 14: 브로콜리 파트너, 15: 조생 그린포트, 16: 그린필드 브로콜리, 17: 청제 브로콜리, 18: 녹색 브로콜리, 19: 그레이스, 20: Pilgrim, 21: 코요시, 22: 바타비아, 23: 벨스타, 24: 앵톨, 25: 그린포트, 26: Shaster, 27: 나이스 그린.

(6) 무 시들음병 조사

Fusarium oxysporium f. sp. *raphani*에 의해서 발생하는 무 시들음병은 무 생산에 치명적인 병이다. 이 병원균은 토양병원균이기 때문에 약제 방제가 어려워 저항성 품종의 재배가 효율적이다. 저항성 품종 선발을 위하여 13개의 무 품종을 병원균으로 오염시킨 포장에 파종하여 시험을 수행한 결과 YR 챔피언, YR 마지막, 양촌열무, 알타리무, 태광무가 발병하지 않아 시들음병 저항성으로 나타났다(Fig. 20).

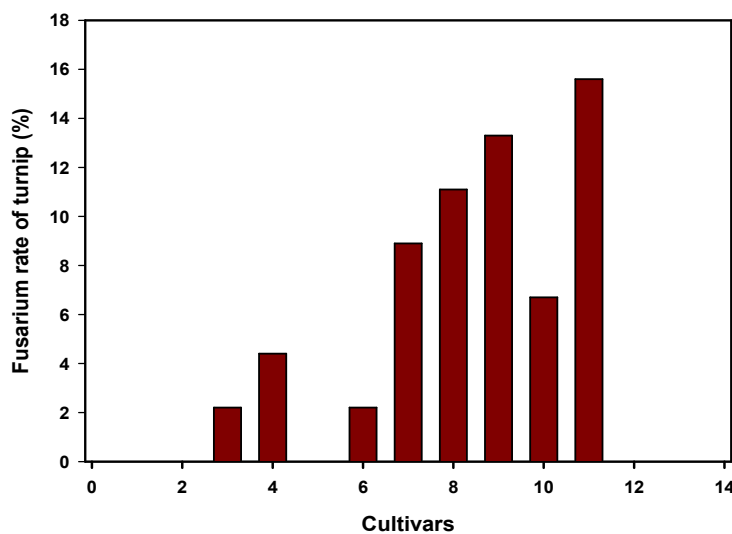


Fig. 9. Comparison of Fusarium wilt among radish cultivars.

1: YR 챔피언, 2: YR 마지막, 3: YR 흑보석, 4: YR 최강열무, 5: 양촌열무, 6: 장원무, 7: 진선미 열무, 8: 흑단여름열무, 9: 동남열무, 10: 슈퍼스타, 11: 고운열무, 12: 알타리무, 13: 태광무

2. 가지과 작물 주요 병의 육종현장 적용시험 확립

(1) 가지과 작물의 주요 균류병 스크리닝

(가) 토마토 흰가루병

총 9개의 토마토 계통을 이용하여 토마토 흰가루병 저항성 검정을 수행하였다. 그 결과 4 계통의 토마토는 10% 미만의 발병도를 나타냈고, 5계통의 토마토는 40%이상의 높은 발병도를 나타내는 것으로 조사되었다. 이에 따라 토마토 흰가루병에 저항성 반응을 나타내는 토마토 계통은 ‘KNU-8’을 비롯한 총 4개의 계통인 것으로 확인하였으며, ‘KNU-4’를 포함한 5개 계통의 토마토들은 감수성 반응을 나타내는 것으로 조사되었다.

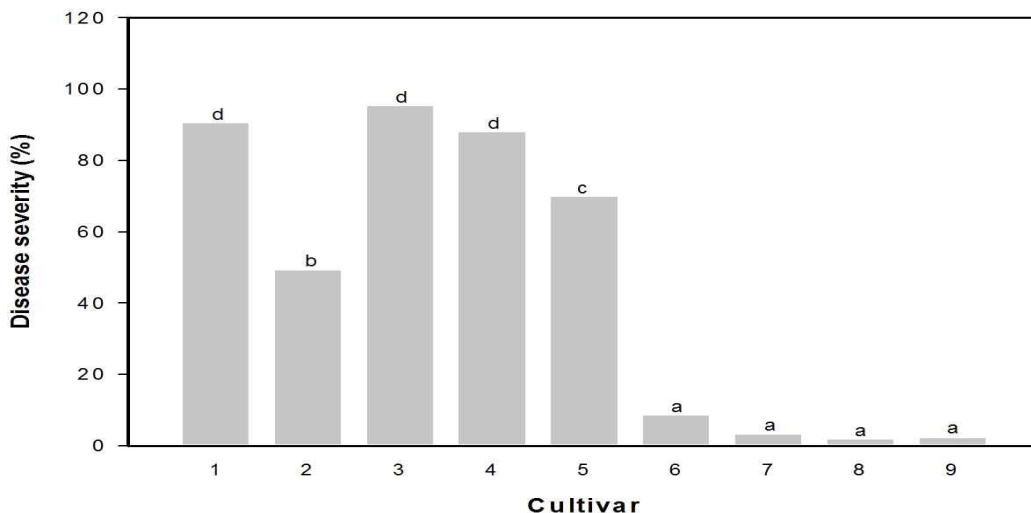


Fig. 10. The disease severity of powdery mildew on tomato.

1: 슈퍼도태랑, 2: KNU-4, 3: 스위트, 4: 초이스, 5: 디저트, 6: KNU-8, 7: KNU-9, 8: KNU-12, 9: KNU-17.

(나) 토마토 뿌리썩음병(근부병)

총 7개의 토마토 계통을 이용하여 토마토 뿌리썩음병 저항성 검정을 수행하였다. 그 결과 저항성 반응을 나타내는 계통은 ‘슈퍼도태랑’과 ‘레전드썸머’인 것으로 조사되었다. ‘도태랑레굴러’의 경우 중도저항성을 나타내는 것으로 조사되었고, ‘서광’을 포함한 4개의 품종이 감수성 반응을 나타내는 것으로 확인되었다.

(다) 토마토 잎곰팡이병

총 6개의 토마토 계통을 이용하여 토마토 잎곰팡이병 저항성 검정을 수행하였다. 그 결과 ‘미니찰’ 품종을 제외한 모든 품종이 40%이상의 발병도를 나타냈으며, ‘미니찰’ 품종의 경우 타 품종과 비교하여 현저히 낮은 발병도를 나타내는 것으로 확인되었다. 따라서 토마토 잎곰팡이병에 대하여 저항성 반응을 나타내는 품종은 ‘미니찰’ 품종인 것으로 확인하였다.



Fig. 11. The resistance assay of *Fulvia fulva* on tomato.

A: 미니찰 (R), B: Super beet Steak (S), C: Roma VFN (S), D: 도태랑 다이아(S), E: 큐피랑 (S), F: 키스쿨 (S).

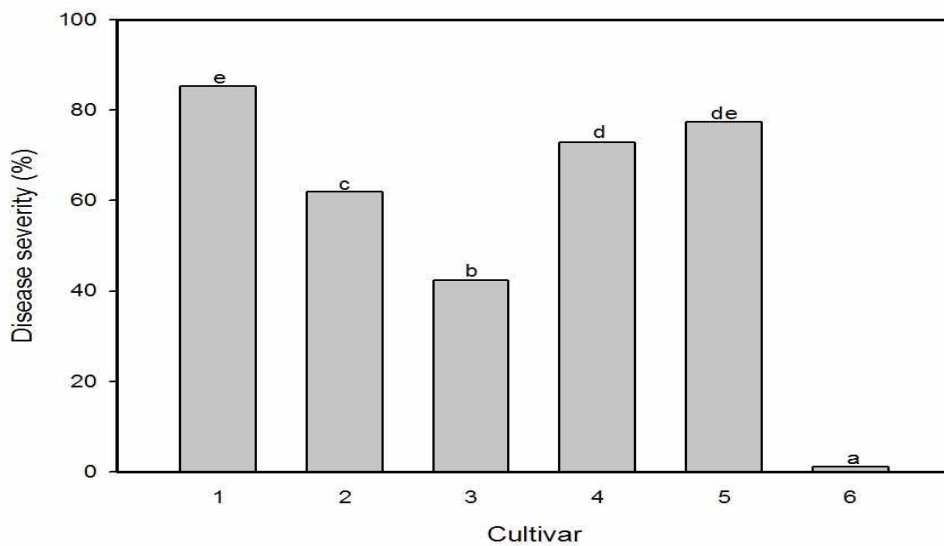


Fig. 12. The disease severity of *Fulvia fulva* on tomato.

1: 키스쿨, 2: Super beet Steak, 3: Roma VFN, 4: 도태랑 다이아, 5: 큐피랑, 6:미니찰.

(라) 고추 탄저병

총 6개의 고추 계통을 이용하여 고추 탄저병 저항성 검정을 수행하였다. 그 결과 저항성 반응을 나타내는 계통은 'Pendulum baccatum 3-4'와 'Aji Limon'인 것으로 조사되었다. 'Jalapeno M' 품종을 포함한 4개의 품종은 탄저병에 대하여 감수성 반응을 나타내는 것으로 확인되었다.

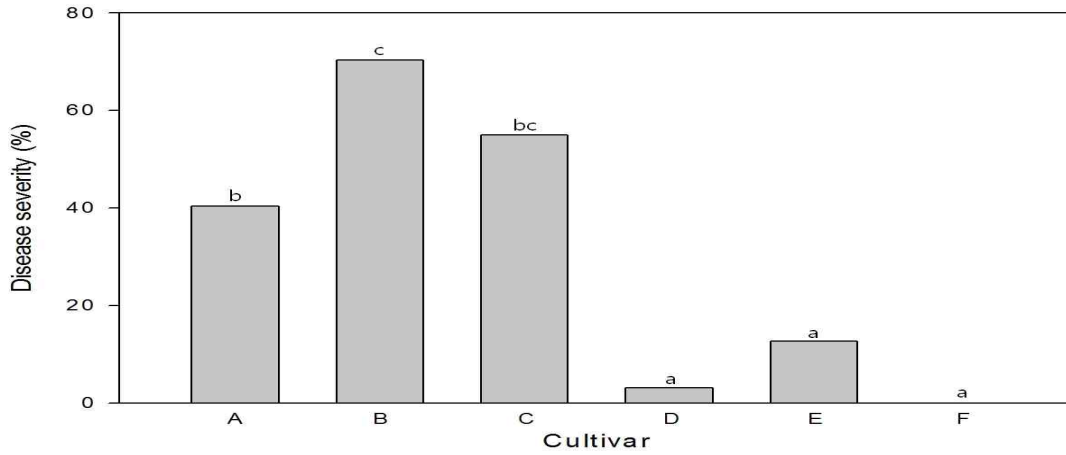


Fig. 13. The disease severity of anthracnose on pepper.

A: NuMex Joe. E. Parker, B: Jalapeno M, C: PR 무한질주, D: Pendelum Baccatum, E: Ancho, F: Aji Limon

(마) 고추 흰가루병

총 6개의 고추 계통을 이용하여 고추 흰가루병 저항성 검정을 수행하였다. 그 결과 저항성 반응을 나타내는 계통은 'Black Cuban', 'Orange Habanero'이 저항성 반응을 나타냈고, '슈퍼마니파' 품종은 중도저항성을 나타냈다. 국내 품종인 'PR상생', '독야청청', 'PR갈무리' 품종은 흰가루병에 대하여 감수성인 것으로 확인되었다.

(2) 가지과 작물의 바이러스병 저항성 검정 확립

(가) 검정용 바이러스 균주 확보

가지과작물 바이러스병 검정을 위하여 생명공학연구원, 농촌진흥청 고령지농업연구센터, 강원도농업기술원으로부터 바이러스 균주를 분양하여 검정에 사용하였다.

Table 3. 가지과 작물의 바이러스병 저항성 검정 균주

식물바이러스	분양기관	시료형태	검정식물	검정용도
PVY (1)	고령지농업연구센터	접종식물	고추, 토마토	저항성 검정
PVX	고령지농업연구센터	접종식물	토마토, 감자	저항성 검정
PVY (2)	생명공학연구원	접종식물	고추, 토마토	저항성 검정
TSWV	고령지농업연구센터	접종식물	고추, 토마토	저항성 검정
PepMoV	생명공학연구원	접종식물	고추, 토마토	저항성 검정
TMGMV	생명공학연구원	접종식물	고추, 토마토	저항성 검정
TMV	강원도농업기술원	동결건조 시료	고추, 담배	고추 종자감염 실험
CMV	강원도농업기술원	접종식물	고추, 오이	저항성 검정

(나) 바이러스 접종 시험

바이러스 접종을 위한 즙액은 냉동 이병엽을 0.1M pH7.0 인산 buffer에 넣고 마쇄한 후 4겹 거즈로 걸러서 제조하였다. 500mesh carborundum을 접종 대상 식물체 위에 도포한 후 면봉에 바이러스 현탁액을 묻혀 부드럽게 도말 접종하였고 흐르는 물로 가볍게 씻어내었다. 고추와 토마토에 TMV를 접종한 결과 접종된 식물체에 전형적인 mosaic 병징을 나타냈고, PVY와 CMV를 접종한 식물체에서도 전형적인 병징을 관찰할 수 있었다(Fig. 14).



Fig. 14. Symptoms of TMV on red pepper (A) and tomato (B), PVY on red pepper (C) and CMV (D).

(다) CMV저항성 포장검정

CMV에 대한 고추 품종 및 계통의 포장 저항성을 조사한 결과 품종 중 PR CEO, PR누네띠네가 저항성이었으며, 육성 계통 중 D27, D74, D134, D145가 저항성을 나타냈다(Table 4).

Table 4. Field resistant assay to CMV of red pepper

Cultivar or strain	Marker type			Resistance ^a	Remarks
	RR	Rr	rr		
거물고추		0		++	
PRCEO	0			++++	
신화창조		0		++	
PR터보			0	+++	
PR올찬		0		++	
PR독주역강		0		++	
PR누네띠네	0			+++	
PR거시기홍		0		++	
PR대촌		0		+++	
PR마니따		0		+++	
독야청청		0		+++	
역강홍장군			0	-	
빨리따			0	-	
PR무한길주		0		+++	

Cultivar or strain	Marker type			Resistance ^a	Remarks
	RR	Rr	rr		
홍보석			O	++	
천하통일		O		+++	
천하제일		O		+++	
대촌		O		+++	
대들보			O	++	
D27	O			++++	
D74	O			+++	
D120			O	+	
D134	O			+++	
D141		O		++	
D145	O			++++	
D233		O		++	
DNP53		O		++	
DNP56		O		++	

^a-: susceptible, +~++: moderately resistant, +++~++++: resistant.

(3) 가지과 작물의 뿌리혹선충병 저항성 검정 확립

(가) 검정용 뿌리혹선충(*Meloidogyne incognita*) 균주 확보

가지과작물 뿌리혹선충병 검정을 위하여 농촌진흥청 국립원예특작과학원과 한국화학연구원으로부터 선충 균주를 분양하여 검정에 사용하였다(Table 5).

Table 5. 가지과 작물의 뿌리혹선충병 저항성 검정 균주

뿌리혹선충	분양기관	시료형태	검정식물	검정용도
<i>M. incognita</i>	국립원예특작과학원	접종식물	고추, 토마토	저항성 검정
<i>M. incognita</i>	한국화학연구원	접종식물	고추, 토마토	저항성 검정

(나) 검정용 뿌리혹선충(*Meloidogyne incognita*)의 접종방법

검정을 위한 뿌리혹선충의 접종은 분양받은 감염식물의 뿌리로부터 체분리법으로 알과 유충을 분리하였다. 선충은 감염된 뿌리를 1% NaOCl에 넣고 2분정도 세게 흔든 다음 200 mesh와 500 mesh체를 겹쳐 걸른 다음 500mesh 체 위의 알을 물로 여러번 씻어 알을 수확하였다. 접종은 20cm 포트에 5,000개의 알+유충을 접종하였고 접종식물은 2개월동안 온실에서 생육을 유지시킨 후 발병을 조사하였다. 선충 접종식물은 경엽이 황화되고 생육이 억제되었고 뿌리에 많은 혹을 형성하였다(Fig. 15).

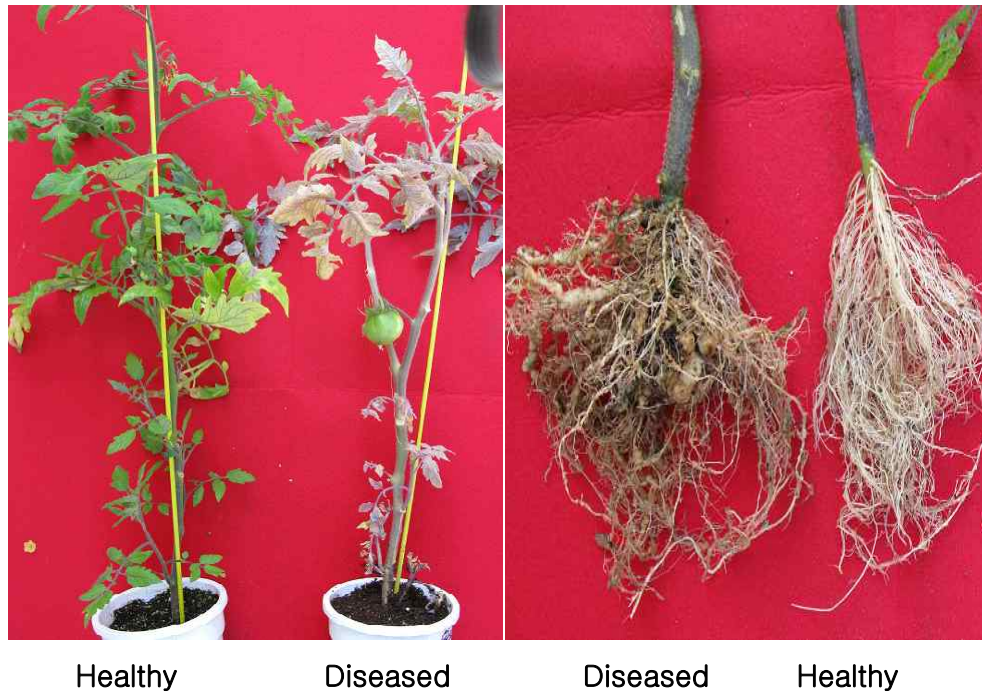


Fig. 15. Symptom of tomato plant inoculated with root-rot nematodes.

(4) 풋마름병(청고병) 저항성 검정 확립

(가) 검정용 풋마름병균(*Ralstonia solanacearum*) 균주 확보

가지과작물 풋마름병 검정을 위하여 동아대학교와 농촌진흥청 고령지농업연구센터로부터 세균 균주를 분양하여 검정에 사용하였다(Table 6).

Table 6. 가지과 작물의 풋마름병 저항성 검정 균주

풋마름병	분양기관	시료형태	검정식물	검정용도
<i>R. solanacearum</i>	동아대학교	Petri plate	고추, 토마토	저항성 검정
<i>R. solanacearum</i>	동아대학교	Petri plate	고추, 토마토	저항성 검정
<i>R. solanacearum</i>	고령지농업연구센터	Petri plate	토마토, 감자	저항성 검정

(나) 검정용 풋마름병균(*Ralstonia solanacearum*)의 접종

유묘검정을 위하여 40공 프로그트레이에 저항성 및 감수성 종자(고추, 토마토)를 파종하여 3주간 온실에서 육묘한 후 묘를 뽑아 뿌리끝을 잘라 상처를 내었다. 접종은 Nutrient broth에서 72시간(28℃) 진탕배양한 배양액(10^8 cfu/ml)에 상처를 낸 묘를 침지한 다음 다시 트레이에 심어 3주 후 발병을 조사하였다. 감수성 및 저항성 계통에 따라 뚜렷한 반응을 나타냈다(Fig. 16).



A Non-inoculated Inoculated B Non-inoculated Inoculated

Fig. 16. Evaluation on resistant and susceptible responses of red pepper cultivars (A) and tomato cultivars (B) to bacterial wilt.

검정을 위한 풋마름병균의 접종은 검정식물(고추, 토마토)을 파종 후 70일이 된 유묘를 상토를 제거하고 뿌리 끝을 1cm 가위로 자른 다음 Nutrient broth에서 72시간(28℃) 진탕배양한 배양액(10^8 cfu/ml)에 침지한 다음 비닐하우스에 정식하였다. 접종된 식물은 비닐하우스에서 재배하면서 발병 유무를 관찰하였다. 발병된 식물은 시들었으며 도관이 갈변되었고 시들은 줄기를 잘라 증류수에 넣었을 때 세균 유출을 관찰할 수 있었다.

3. 박과 작물 주요 병의 육종현장 적용시험 확립

가. 연구수행 방법

(1) 재료 및 방법

(가) 공시재료

본 실험은 강원도 강릉시 왕산면 대기리에 위치한 강릉원주대학교 비닐하우스와 교내 비닐하우스에서 2011년 여름과 가을에 실시하였다. 본 실험에 사용된 품종은 국내 시판되고 있는 백침계오이 ‘장백침다다기’, ‘청백침다다기’, ‘선호백침다다기’, ‘이화백침다다기’, ‘조은백다다기’, ‘싱싱백다다기’, ‘은성백다다기’, ‘백미백다다기’, ‘백춘다다기’, ‘백봉다다기’, ‘강력삼척’, ‘진녹삼척’, ‘신세대’, ‘청진한’, ‘대선’, ‘무진장’, ‘서울마디’, ‘신정품’, ‘네박자’, ‘남지흑진주’, ‘장형낙합’의 오이 21품종과 ‘오복꿀’, ‘태양꿀’, ‘리코핀꿀’, ‘홍수정꿀’, ‘달고나’, ‘초강삼복’, ‘참그린’, ‘우리꿀’, ‘스피드꿀’의 수박 9품종, ‘참이맛’, ‘크런치볼’, ‘은천’, ‘황금꿀은천’, ‘명월’, ‘황금도끼’, ‘금노다지’, ‘PMR터보’, ‘PMR빅토리’ 참외 및 멜론 9품종을 구입하여 흰가루병과 뿌리혹선충 저항성 검정에 이용하였다. 각 품종은 육묘상토(초록이, 농우바이오)가 담긴 50공 트레이에 종자 1립씩 파종하여 20-28℃ 비닐하우스에서 25일간 육묘한 후 정식하였다.

(나) 박과류 흰가루병 저항성 조사

흰가루병 발생은 매년 흰가루병이 발생하는 비닐하우스에서 자연발생을 유도하였다. 흰가

루병 발병조사는 0=병반면적율 0%, 1=병반면적율 1~5%, 2=병반면적율 5.1~20%, 3=병반면적율 20.1~40%, 4=병반면적율 40.1%이상으로 발병수준을 5단계로 하여 조사하였다.

(다) 박과류 뿌리혹선충 저항성 조사

뿌리혹선충의 접종을 위하여 접종원으로 보관중이던 고구마뿌리혹선충(*Meloidogyne incogita*)에 감염된 오이 뿌리와 토양으로부터 알과 유충을 분리하여 이용하였다. 분리방법은 개량된 sodiumhypochloride방법을 사용하였다(Barker 등, 1985). 분리방법은 세척된 뿌리를 1cm 간격으로 잘라서 200ml의 1% NaOCl 용액이 들어있는 믹서기에 넣고 고속으로 1분간 회전시켰다(Kim과 Lee, 2008). 그 다음 믹서기 내의 뿌리 찌꺼기, 알, 유충은 75 μ m와 28 μ m 체를 통시키고 28 μ m 체에 걸린 알이 부화할 때까지 25 $^{\circ}$ C 상온에서 보관하였다. 알이 부화하면 개량 깔때기법으로 유충을 분리하여, 박과류 품종별로 유묘가 심겨져 있는 1,300g의 사질양토가 들어 있는 직경 15cm 높이 18cm 플라스틱 포트에 유충(2령충)을 10,000마리 농도로 접종하였다. 뿌리혹선충 접종원은 뿌리혹과 이병토를 실온에 보관하였으며 필요시에 이용하였다. 유충을 접종한 후 관행으로 물관리를 하면서 45개월 후 뿌리혹 형성 정도를 조사하였다(Kim 등, 2010).

뿌리혹선충의 저항성 조사 기준은 난낭수의 정도와 크기에 따라 5단계 나누어 0=발생없음, 1=1-10%의 뿌리에 난낭이 착생되며 비대정도가 적고 서로 독립하여 존재, 2=11-30% 뿌리에 난낭이 착생되며 비대정도가 비교적 큼, 3=31-60% 뿌리에 난낭이 착생되며 비대정도가 큼, 4=61%이상 뿌리에 난낭이 착생되며 비대정도가 매우 큼으로 나누어 조사하였다.

나. 연구결과

(1) 박과류 흰가루병 저항성 조사

흰가루병 저항성 품종 조사를 위해 현재 시판중인 박과류 39종 종자를 시중에서 구입하여 유묘 정식 60일 후 인공접종하지 않은 자연 상태의 흰가루병 발병 양상을 조사하였다. 우리나라에서 재배되는 오이품종은 취청오이(청장계, 낙합계), 다다기오이(반백계), 가시오이(삼척계, 흑진주계, 사업계), 청풍오이(백침계)로 나뉘는데 공시된 오이는 백침계오이 4품종, 반백계오이 6품종, 가시오이계 3품종 포함한 21개 품종에 대한 흰가루병 저항성을 조사하였다. 흰가루병 조사 결과 청풍오이인 백침계 4품종 중에서는 ‘선호백침다다기’와 가시오이의 삼척계품종인 ‘강력삼척’이 중도저항성을 보였다. 다다기오이로 알려진 반백계 품종인 ‘조은백다다기’, ‘싱싱백다다기’, ‘은성백다다기’, ‘백미백다다기’, ‘백춘다다기’, ‘백봉다다기’ 6품종은 모두 감수성이었으며, 그밖에 오이 품종인 ‘신세대’, ‘대선’, ‘무진장’, ‘서울마디’, ‘청진한’, ‘진녹삼척’, ‘신정품’, ‘네박자’, ‘남지흑진주’, ‘장형낙합’ 모두 감수성으로 조사되었다(Fig. 17).

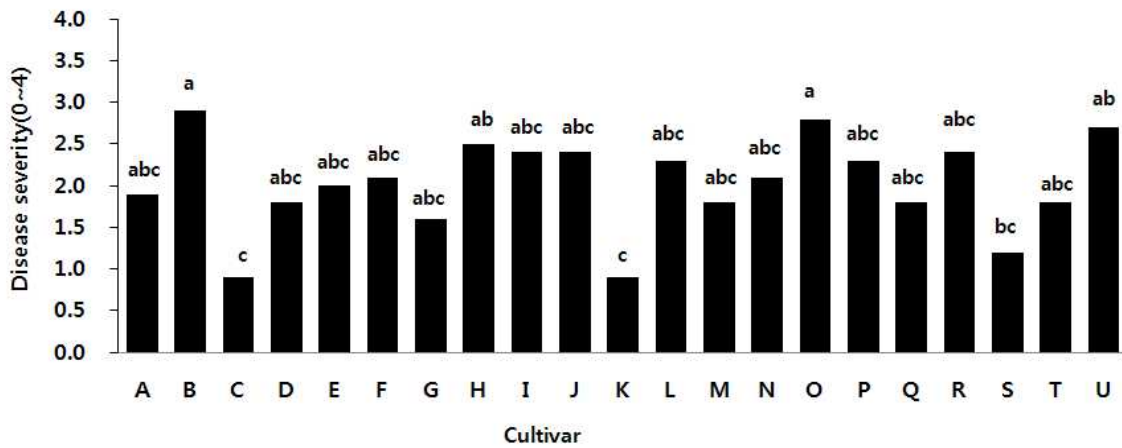


Fig. 17. The disease severity of powdery mildew on Cucumber cultivars.

A : Jangbaegchimdadagi, B : Cheongbaegbaegchimdadagi, C : Sunhobaegchimdadagi, D : Leehaebaegchimdadagi, E : Joeunbaegdadagi, F : Singsingbaegdadagi, G : Eunseongbaegsdadagi, H : Baegmibaegdadagi, I : Baegchundadagi, J : Baegbongdadagi, K : Gangryeogsamcheok, L : Jinnogsamcheok, M : Sinsedae, N : Cheongjinhan, O : Daeseon, P : Muhinjang, Q : Seoulmadi, R : Sinjeongpum, S : Nebagja, T : Namjiheugjinju, U : Janghyeongnaghab.

수박은 ‘오복꿀’, ‘태양꿀’, ‘리코핀꿀’, ‘홍수정꿀’, ‘달고나’, ‘초강삼복’, ‘참그린’, ‘우리꿀’, ‘스피드꿀’의 9품종을 조사한 결과 품종간에 병 발생은 다소 차이가 있으나 모두 감수성인 것으로 나타났다(Fig. 18).

참외도 시판종자인 ‘참이맛’, ‘크런치볼’, ‘은천’, ‘황금꿀은천’, ‘명월’, ‘황금도끼’, ‘금노다지’ 7품종의 흰가루병을 조사하였는데 조사된 모든 품종은 감수성이었으며, 대조로 사용한 멜론 품종인 ‘PMR터보’와 ‘PMR빅토리’는 저항성인 것으로 나타났다(Fig. 19).

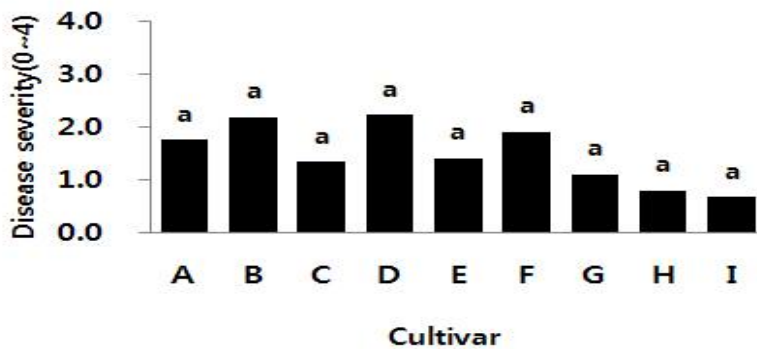


Fig. 18. The disease severity of powdery mildew on Watermelon cultivars.

A : Obogkkul, B : Taeyangkkul, C : Lycopenekkul, D : Hongsujeongkkul, E : Dalgonakkul, F : Chogangsambog, G : Chamgreen, H : Woorikkul, I : Speedkkul.

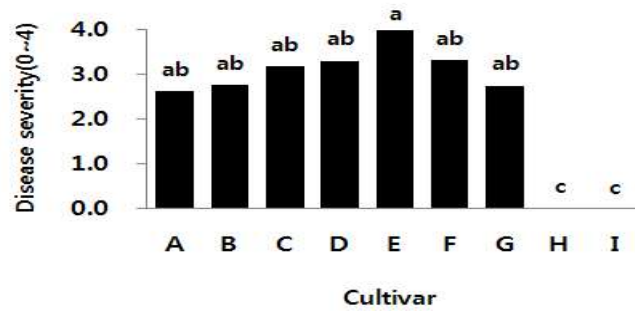


Fig. 19. The disease severity of powdery mildew on Oriental melon and melon cultivars.

A : Chamleemas, B : Keuleonchibol , C : Euncheon , D : Hwanggeumkkuleuncheon,
E : Myeongwol , F : Hwanggeumdokki, G : Geumnodaji , H : PMR Turbo, I : PMR Victory.

본 연구를 통하여 국내에 대부분 오이, 수박, 참외 상업용 종자는 흰가루병에 감수성인 것으로 나타나 저항성 품종 개발이 시급한 것으로 나타났다. 박과류 39종의 흰가루병 저항성 시험 중 노균병과 잿빛곰팡이병이 발생하였으나 시험 후기에 발생하여 조사에 크게 영향을 미치지 않았다. 이는 시험기간 중 시설 내 고온과 여름의 잦은 강우로 인한 과습이 원인인 것으로 생각된다. 시험 중 흰가루병이 많이 진행된 품종에 대해서 과실의 수량감소와 크기감소가 있었으며 이는 병 발생이 비교적 적은 경우보다 발병이 심한 경우에 더욱 뚜렷하게 나타났다(본문에 미보고). 이와 같이 발병정도가 심해짐에 따라 수량이 낮아지는 것은 Wright등(1990)과 Lee 등(2001)의 보고에서와 같이 흰가루병이 주로 잎에 발생하여 광합성과 호흡을 저해함으로써 동화작용과 증산작용을 감소시켜 생육과 과실의 품질저하를 초래하며, 또한 잎에 형성된 병반이 오래되면 인접병반과 융합하여 조기 낙엽되고 결과적으로 초세가 약화되면서 수량 감소를 가져오는 것으로 생각된다.

(2) 박과류 뿌리혹선충 저항성 조사

박과류 39종의 뿌리혹선충 저항성을 조사하기 위해 유묘 접종 45일 후 지하부를 조사한 결과 백침계오이로 ‘백봉다다기’가 중도저항성인 것으로 나타났고, 그밖에 ‘장백침다다기’, ‘청백침다다기’, ‘선호백침다다기’, ‘이화백침다다기’, 반백계오이 ‘조은백다다기’, ‘싱싱백다다기’, ‘은성백다다기’, ‘백미백다다기’, ‘백춘다다기’는 감수성이었다. 그밖의 품종인 ‘강력삼척’, ‘진녹삼척’, ‘신세대’, ‘청진한’, ‘대선’, ‘무진장’, ‘서울마디’, ‘신정품’, ‘네박자’, ‘남지흑진주’, ‘장형낙합’도 감수성이었다(Fig. 20).

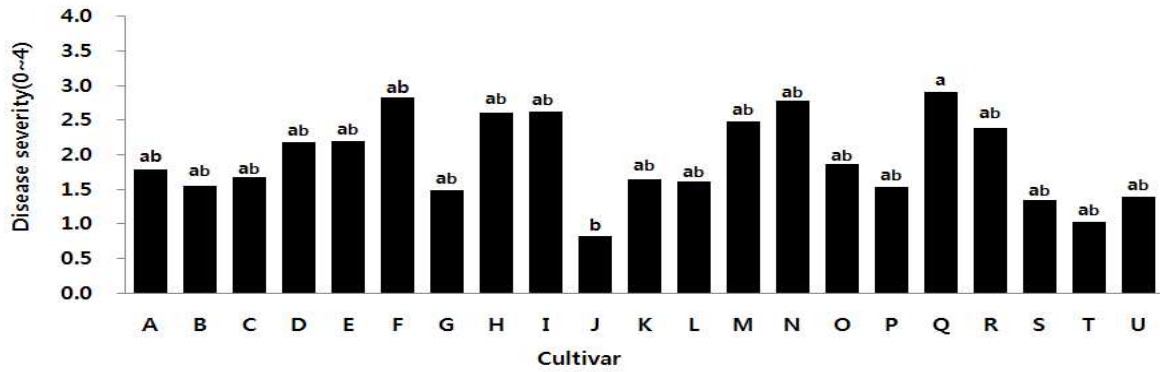


Fig. 20. The disease severity of rood-knot nematode on Cucumber cultivars.

A : Jangbaegchimdadagi, B : Cheongbaegbaegchimdadagi, C : Sunhobaegchimdadagi, D : Leehaebaegchimdadagi, E : Joeunbaegdadagi, F : Singsingbaegdadagi, G : Eunseongbaegsdadagi, H : Baegmibaegdadagi, I : Baegchundadagi, J : Baegbongdadagi, K : Gangryeogsamcheok, L : Jinnogsamcheok, M : Sinsedae, N : Cheongjinhan, O : Daeseon, P : Muhinjang, Q : Seoulmadi, R : Sinjeongpum, S : Nebagja, T : Namjiheugjinju, U : Janghyeongnaghab.

수박은 ‘달고나꿀’이 저항성인 것으로 나타났으며, ‘오복꿀’, ‘태양꿀’, ‘리코핀꿀’, ‘홍수정꿀’, ‘초강삼복’, ‘참그린’, ‘우리꿀’, ‘스피드꿀’의 수박 8품종은 중도 저항성이거나 감수성이었다 (Fig. 21).

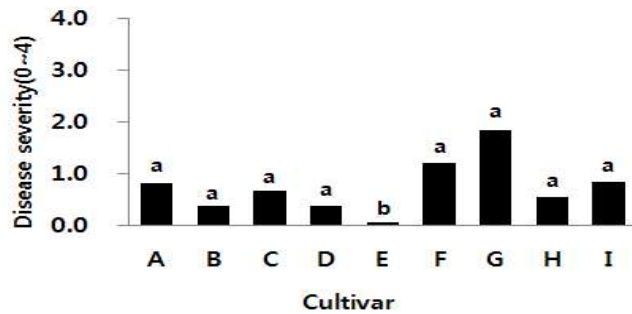


Fig. 21. The disease severity of rood-knot nematode on Watermelon cultivars.

A : Obogkkul, B : Taeyangkkul, C : Lycopenekkul, D : Hongsujeongkkul, E : Dalgonakkul, F : Chogangsambog, G : Chamgreen, H : Woorikkul, I : Speedkkul.

참외 및 멜론은 조사된 ‘참이맛’, ‘크런치볼’, ‘은천’, ‘황금꿀은천’, ‘명월’, ‘황금도끼’, ‘금노다지’, ‘PMR터보’, ‘PMR빅토리’ 모두 감수성을 나타내었다(Fig. 22).

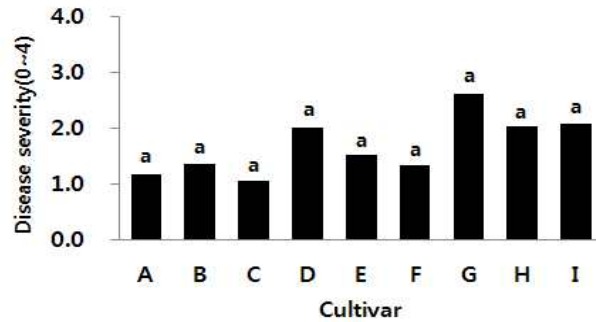


Fig. 22. The disease severity of rood-knot nematode on Oriental melon and melon.

A : Chamleemas, B : Keuleonchibol, C : Euncheon, D : Hwanggeumkkuleuncheon, E : Myeongwol, F : Hwanggeumdokki, G : Geumnodaji, H : PMR Turbo, I : PMR Victory.

박과류 39품종의 뿌리혹선충 저항성 조사 결과 저항성을 나타낸 박과류 품종은 ‘달고나 꿀’ 수박 한 품종이었다(Fig. 21). 따라서 뿌리혹선충 방제를 위한 저항성인 박과류 품종육성도 시급한 실정이다.

본 연구에서 검토한 39품종 중 흰가루병과 뿌리혹선충 모두에 저항성인 품종은 없었다. 최근 복합병저항성 품종육성이 친환경 재배농가를 중심으로 요구되고 있다.

세계적 인구증가는 더 많은 식량 생산을 필요로 하게 되었고, 식량 생산의 증가를 위해서는 제한된 면적에서의 집약적 재배인 연작재배를 필수로 가져오게 되었다. 뿌리혹선충의 경우에는 이 연작재배를 피해를 피할 수 없다. 예를 들어, 성주지역 참외는 뿌리혹선충의 피해로 약 50%의 수량 감수를 가져오는데(Kim 등, 2001), 주 방제법은 벼윤작, 객토, 살선충제 사용 등이다. 윤작 작물로 추천되는 벼재배는 낮은 소득과 일손부족으로 농민들이 기피하며, 농민들이 흔히 사용하는 살선충제는 환경에 미치는 악영향과 낮은 방제효과로 항구적인 방제법이 될 수 없으며, 객토는 주변 환경의 파괴와 고비용(200만원/10a/3-5년)의 문제가 있다(Kim, 2001). 이러한 문제로 선충 방제에는 한계가 있고 계속된 연작과 동일 병의 지속적인 발병으로 박과류 재배의 수량 감소와 경제적 피해를 가져오게 되어 장기적인 해결책이 될 수 없다. 따라서 보다 많은 저항성 품종과 저항성 대목의 개발이 필요하며 아울러 이러한 저항성 품종을 이용한 유기재배에 대한 연구가 많이 진행되어야 할 것으로 보인다.

본 시험 결과 흰가루병에 저항성을 보인 품종은 멜론 ‘PMR터보’와 ‘PMR빅토리’였고 뿌리혹선충에 저항성을 보인 품종은 ‘달고나’ 수박이 유일했다(Table. 7).

국내에 시판되는 주요 박과작물의 품종을 조사한 결과 모두 중도저항성이거나 감수성인 품종이 대부분이었으므로 저항성 품종 개발이 시급하다. 본 연구에서 선발된 저항성 품종은 박과작물의 유기재배에 이용 가능할 것으로 생각된다.

Table 7. The assay of disease resistance powdery mildew and root-knot nematode on cucurbits.

No.	Plant	Cultivar	Powdery mildew	Root-knot nematods
1		Jangbaegchimdadagi	S	S
2		Cheongbaegbaegchimdadagi	S	S
3		Sunhobaegchimdadagi	MR	S
4		Leehaebaegchimdadagi	S	S
5		Joeunbaegdadagi	S	S
6		Singsingbaegdadagi	S	S
7		Eunseongbaegdadagi	S	S
8		Baegmibaegdadagi	S	S
9		Baegchundadagi	S	S
10		Baegbongdadagi	S	MR
11	Cucumber	Gangryeogsamcheok	MR	S
12		Jinnogsamcheok	S	S
13		Sinsedae	S	S
14		Cheongjinhan	S	S
15		Daeseon	S	S
16		Muhinjang	S	S
17		Seoulmadi	S	S
18		Sinjeongpum	S	S
19		Nebagja	S	S
20		Namjiheugjinju	S	S
21		Janghyeongnaghab	S	S
22		Obogkkul	S	MR
23		Taeyangkkul	S	MR
24		Lycopenekkul	S	MR
25	Water melon	Hongsujeongkkul	S	MR
26		Dalgonakkul	S	R
27		Chogangsambog	S	MR
28		Chamgreen	S	S
29		Woorikkul	S	MR
30		Speedkkul	S	MR
31		Chamleemas	S	MR
32		Keuleonchibol	S	MR
33		Euncheon	S	MR
34	Oriental melon&	Hwanggeumkkuleuncheon	S	MR
35		Myeongwol	S	MR
36	Melon	Hwanggeumdokki	S	MR
37		Geumnodaji	S	MR
38		PMR Turbo	R	MR
39		PMR Victory	R	MR

R : resistance to disease, MR : moderate resistance to disease, S : susceptible to diseases.

4. 포장 병저항성 검정서비스 수행 및 고추 CMV 포장검정 확립

가. 연구수행 방법

(1) 재료 및 방법

(가) 공시재료

본 실험의 공시재료로 20점의 PR계통을 포함한 국내 시판 품종 56점, 미국 도입자원 31점, 농촌진흥청 유전자원센터로부터 분양받은 유전자원 112점을 공시하여 CMV-P1에 대한 저항성 여부를 조사하였다. 실험은 강릉시 지변동에 위치한 비닐하우스 내에서 2012년에 수행하였다. 실험에 사용된 고추 종자는 온실 내에서 육묘용 상토(초록이, 농우바이오사)가 담긴 50공 연결포트에 종자 5립씩 파종하여 25-28℃에서 발아를 유도하였다. 바이러스 접종원은 농우바이오에서 CMV-P1 균주를 분양 받아 -70℃ 초저온냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다. 접종원 조제를 위해 0.01M phosphate buffer(pH 7.0)를 사용하였으며 이병엽은 10배(W/V)가 되도록 유발을 이용해 마쇄한 후 2-3겹의 거즈를 이용해 걸러낸 후 그 즙액을 접종용 바이러스로 공시하였다.

(나) 바이러스 접종

파종한 고추 종자의 본엽이 1-2엽 전개되고 있는 떡잎에 carborundum(600mesh)과 면봉을 이용해 도말 접종하였다. 접종 방법은 carborundum을 고르게 뿌리고 공시한 바이러스 접종액을 면봉에 묻힌 후 가볍게 문질러주는 방법으로 접종하였다. 접종 후에는 25℃이상의 온도가 유지되는 온실에서 주변으로부터 감염을 차단하기 위해 망실 설치가 된 곳에 두고 병징을 관찰하였다. 4주 뒤 육묘검정을 거친 후 5주 후에는 식물체가 자라면서 병징의 발현과 진행정도를 조사하기 위해 시설하우스 내에 정식하여 조사하였다. 고추 유전자원의 육묘검정도 50공 연결포트에서 파종한 후 같은 방법으로 접종하고 유리온실 내에서 관주 관리만 하면서 육묘상태로 육안검정과 ELISA 검정만 조사하였다.

(다) 저항성 평가

ELISA 방법은 CMV capture antibody와 1x carbonate coating buffer(Na_2CO_3 1.59g/ NaHCO_3 2.93g/ NaN_3 0.29g/ pH 9.6/ mass up ddH₂O 1000mL)를 1:200의 비율로 희석하여 96well microplate에 각각 100μL씩 분주하여 4℃에서 16시간 반응 시킨 후, 1x PBST(NaCl 8.0g, Na_2HPO_4 1.15g, KH_2PO_4 0.2g, KCl 0.2g, Tween-20 0.5g, pH 7.4 mess up ddH₂O 1000mL)로 300μL씩 세척한다. 1g의 검정 시료를 1x general extraction buffer(NaSO_4 1.3g, PVP 20.0g, NaN_3 0.1g, powdered egg albumin 2.0g, Tween-20 20.0g, pH 7.4 mess up 1x PBST 1000mL)와 유발을 이용해 1:10의 비율로 마쇄하여 세척한 microplate에 100μL씩 분주하여 30℃ 습식상에서 2시간 반응시켰다. 반응 후 동일한 방법으로 세척하였고 enzyme conjugate를 1x ECI buffer(BSA 2.0g, PVP 20.0g, NaN_3 0.2g, pH 7.4 mess up 1x PBST 1000mL)에 1:200의 비율로 희석하여 100μL씩 분주하여 30℃ 습식상에서 2시간 반응시켰다. 반응 후 세척한 microplate에 발색 tablet을 첨가하여 암조건 에서 30분간 반응시켜 결과를 확인하였다. 모든 단계가 끝난 후에는 흡광도를 측정하기 위해 효소면역측정기(Multiskan EX, Thermo Fisher Scientific, USA) 405nm의 파장에서 그 값을 측정하였고 negative control과 건전 잎 시료의 흡광수치의 2배 이상을 양성으로 판독하였다. 흡광수치가 0.200 이하이면

저항성, 0.200-0.500 이면 중도저항성, 0.500 이상이면 감수성으로 표시하였다. 또한 1, 2차의 평균값이 0.200 이하지만 반복구 중 한 주 이상이 0.500 이상이면 양성으로 판단하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 시판 품종의 검정

국내 시판 고추 품종의 바이러스병 저항성 정도를 조사하기 위해 바이러스 접종원을 인위적으로 접종한 결과 접종 1주일 후 망실에서 관리한 고추 유묘의 상업(신초) 부위에서 전형적인 CMV 병징이 나타나기 시작하였다. 접종 2주 후에는 접종 1주차보다 접종엽을 제외한 개체의 진엽에 mosaic을 비롯한 잎 말림 현상이 관찰되었고 시간이 지나면서 그 구분이 뚜렷해지기 시작하였다. 접종 4주 후(24일 후)에 육안검정과 ELISA결과 품종 36점 가운데 ‘무한질주’ 품종이 저항성 품종으로 조사되었고, K11, Hot chilli, PA722 PE2010C223는 중도저항성을 ‘무한장수’ 품종을 포함한 나머지 32점은 모두 감수성으로 조사되었다(Fig. 23). 그중 접종 24일 후 유묘상태에서는 ‘무한장수’, ‘예쁜독야칭칭’, ‘배로파’, ‘PR금마루’ 품종이 ELISA 진단결과 음성으로 구분 되었으나 포장으로 이식 후(접종 51일 후)에는 양성으로 조사되었다(Fig. 23, 24). 반대로 접종 24일 후에는 ‘역강홍’, ‘PR 스마트’, ‘신화창조’, ‘카리스마’ 품종이 감수성으로 구분 되었으나 식물체 생육이 진행됨에 따라 성체저항성을 띠는 품종도 있었다(Fig. 23). 또한 품종간 유묘식물과 성체식물에서 바이러스 발현정도에 차이가 있는 것으로 보이며 이는 품종별 검정과 조사시점이 중요할 것으로 판단된다. 실험 결과 CMV-Fny 저항성 고추인 ‘배로파’, ‘PR 스마트’, ‘99.9’, ‘PR 싹쓸이’, ‘나잘난’, ‘천년약속’은 CMV-P1에는 감수성인 것으로 확인되었고, 저항성을 보인 ‘무한질주’의 경우 역병, 바이러스병과 청고병에도 내병성을 보이는 품종으로 실제로 CMV-P1에도 저항성을 보였다(Fig. 23). 자연발병에 의한 포장검정에서는 ‘독야칭칭’, ‘무한질주’, ‘예쁜독야칭칭’, ‘역강홍Ⅱ’, ‘배로파’, ‘PR싹쓸이’, ‘나잘난’, ‘천년약속’, ‘아폴로2호’, ‘대들보’의 10품종이 저항성을 보였고 나머지 품종은 감수성으로 조사되었다(Fig. 24). 또한 인위적 접종 실험과 자연발병에 의한 실험 모두에서 저항성을 보인 품종은 ‘무한질주’한 품종이었다. 본 조사에서 사용된 CMV항체는 polyclone antibody를 이용하였으므로 CMV-Fny 및 CMV-P1의 구분 없이 두 계통에 의한 감염을 조사한 것이었다. 조사 결과 CMV-Fny에 저항성이 보고된 몇몇 품종이 ELISA 양성 반응을 보인 것은 CMV-P1에 감염되었기 때문인 것으로 사료된다.

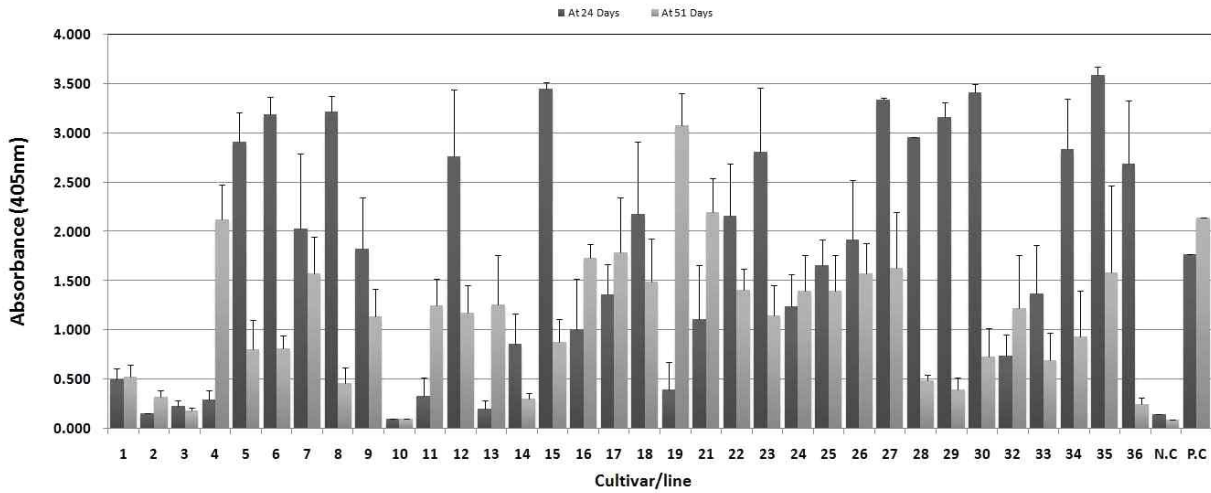


Fig. 23. The ELISA results of domestic pepper cultivars/ lines after CMV-P1 artificial inoculation. Error bars represent the standard deviation of five replications.

1: K11, 2: Hot chilli, 3: PA722 PE2010C223, 4: Muhangjangsu, 5: Songganghong, 6: Geumsugangsan, 7: Bugangbugye, 8: Yeokganghong, 9: Dokyacheongcheong, 10: Muhanjilju, 11: Yeppeundokyacheongcheong, 12: Yeokganghong II 13: Baerotta, 14: PR Smart, 15: 99.9, 16: PR Ssasseuli, 17: Najalnan, 18: Cheonnyeonyaksok, 19: PR Geummaru, 21: Gisedeungdeung, 22: Segyeil, 23: Powerspeed, 24: Anjeonbelt, 25: Yumangju, 26: Muhangjangsu II 27: Gukdae, 28: Sinhwachangjo, 29: Charisma, 30: Apollo 2ho, 32: Hwanhoseong, 33: Teojutdaegam, 34: Geomul, 35: Cheonhajeli, 36: Daedulbo.

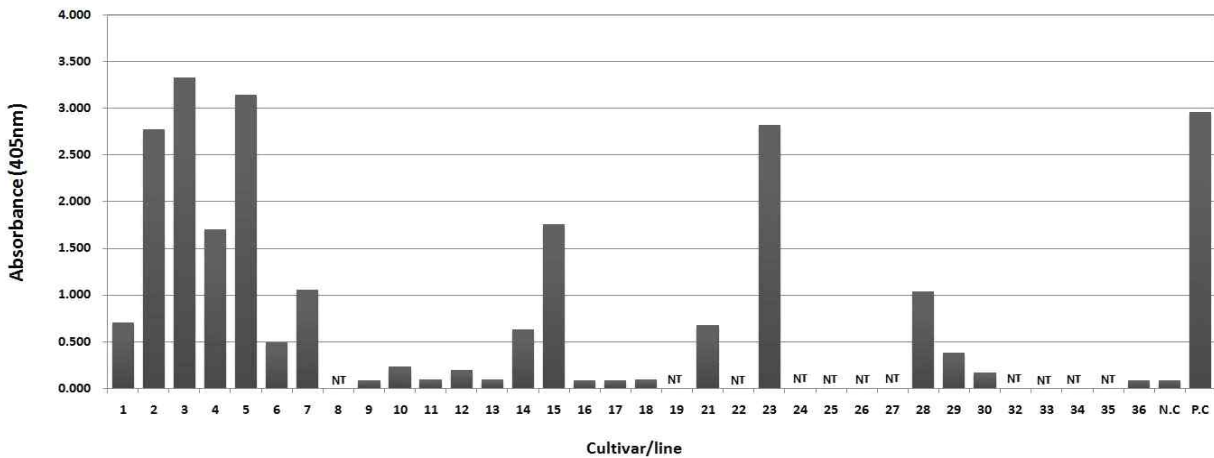


Fig. 24. ELISA domestic pepper cultivars/lines by natural infection according to field test.

1: K11, 2: Hot chilli, 3: PA722 PE2010C223, 4: Muhangjangsu, 5: Songganghong, 6: Geumsugangsan, 7: Bugangbugye, 8: Yeokganghong, 9: Dokyacheongcheong, 10: Muhanjilju, 11: Yeppeundokyacheongcheong, 12: Yeokganghong II 13: Baerotta, 14: PR Smart, 15: 99.9, 16: PR Ssasseuli, 17: Najalnan, 18: Cheonnyeonyaksok, 19: PR Geummaru, 21: Gisedeungdeung, 22: Segyeil, 23: Powerspeed, 24: Anjeonbelt, 25: Yumangju, 26: Muhangjangsu II 27: Gukdae, 28: Sinhwachangjo, 29: Charisma, 30: Apollo 2ho, 32: Hwanhoseong, 33: Teojutdaegam, 34: Geomul, 35: Cheonhajeli, 36: Daedulbo, NT was not tested.

(2) 국내육성품종과 도입자원의 저항성 평가

국내에서 고추 역병 방제를 위해 육성된 역병 저항성 품종인 PR 품종과 병 저항성 육종을 위하여 외국에서 도입한 고추자원의 CMV-P1 저항성 검정을 실시하였다. 20개의 역병 저항성

품종은 조사 결과 CMV-P1에 모두 감수성이었으며, 31개의 도입자원 중 ‘NuMex Twilight’, ‘Chaineese Giant’는 중도저항성으로 조사되었다. 대표적인 고추 역병 저항성 유전자원인 ‘SCM334’계통 역시 CMV-P1에 고도의 감수성을 나타내었다(Table 8, Fig. 25, 26D). 실험 결과 고추 역병 방제를 위해 육성된 역병 저항성 품종인 PR계통의 품종에서는 저항성인 품종이 존재하지 않았으며 도입한 고추자원에서도 중도저항성을 보이는 개체는 있었으나 저항성을 가진 개체는 존재하지 않았다.

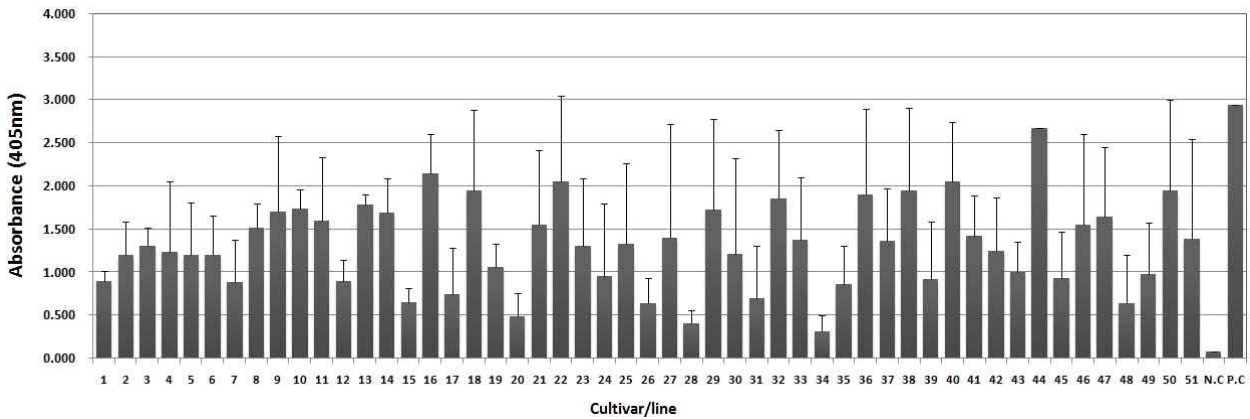


Fig. 25. The ELISA results of PR (Phytophthora resistance) pepper cultivars and foreign pepper cultivars/lines after CMV-P1 artificial inoculation. Error bars represent the standard deviation of five replications.

1:PR Galmuri, 2:PR Keumdong, 3:PR kiripaksu, 4:PR Datta, 5:PR Deachon, 6:PR Manitta, 7:Bobea, 8:PR Sangseang, 9:PR Ildeunggongsin, 10:PR Chambut, 11:PR Power, 12:PR Palgwang, 13:Kangreukjosanggun, 14:Dokyacungcung, 15:Mansahyungdong, 16:Bulsajo, 17:Yeokganghongjanggun, 18:Tantandaemok, 19:Taesan, 20:Hanpandeung, 21:NuMex Espanola improved, 22:Jalapèno Early, 23:Jalapèno M, 24:NuMexPinata, 25:NuMex Primavera, 26:Black Cuban, 27:NuMex Centennial, 28:NuMex Twilight, 29:Aji Limon, 30:Anaheim, 31:BhutJolokia, 32:Big Dipper, 33:Cascabella, 34:Chaineese Giant, 35:Guajillo, 36:Mulato, 37: Mesilla, 38:Negro, 39:NuMex Suave Orange, 40:Omni Color, 41: Orange Habanero, 42:Ornamental Pepper (U.S.A), 43:Ornamental Pepper (K.N.U), 44:Pobalno, 45:Puya, 46:Serrano, 47:SapinishPiquillo, 48:Sweet Banana, 49:Tabasco, 50:SCM334, 51:*Capsicum baccatum* var. *pendelum*3-4.

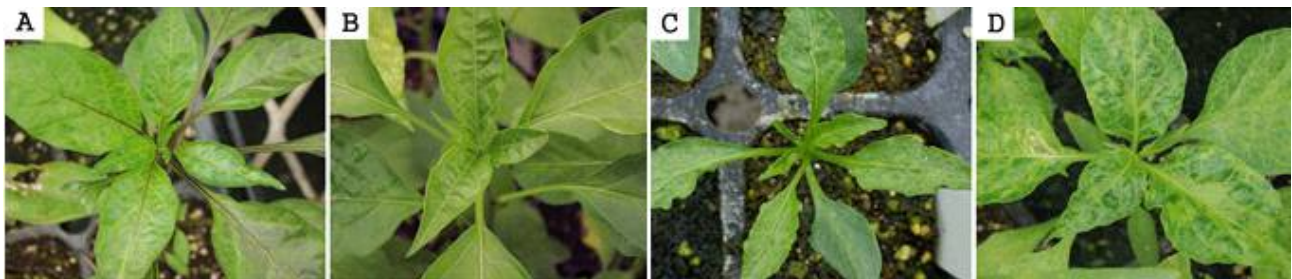


Fig. 26. The resistance assay of PR (Phytophthora resistance) cultivars and foreign pepper cultivars/lines after CMV-P1 artificial inoculation.

A and B: NuMex Twilight, Chaineese Giant (MR), C and D: PR Gumdong, SCM334 (S).

제 8절. 내병성관련 육종소재 선발

본 과제에서 확립한 병리검정 기술을 이용하여 다음과 같은 유전자원 1,079계통에 대하여 병리검정을 수행하고 내병성 육종소재 44종을 선발하였다.

표 3. 유전자원으로부터 내병성 육종 소재 선발

작물	식물병	병원균	검정 계통 수	저항성 계통 수
고추	TSWV	<i>Tomato spotted wilt virus</i>	500	2
	CMV-P1	<i>Cucumber mosaic virus-P1</i>	163	9
	뿌리혹선충병	<i>Meloidogyne incognita</i>	103	8
	탄저병	<i>Colletotrichum coccodes</i>	103	2
토마토	꽃마름병	<i>Ralstonia solanacearum</i>	52	10
	흰가루병	<i>Leveillula taurica</i>	9	4
양배추/ 브로콜리	시들음병	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i>	70	9
	뿌리혹병	<i>Plasmodiophora brassicae</i>	70	0
멜론	과실썩음병	<i>Acidovorax citrulli</i>	5	0
배추	무름병	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	4	0
합계			1,079	44

1. 고추 유전자원의 탄저병 저항성 검정

가. 서론

고추(*Capsicum* spp.)는 가지과에 속하는 한해살이 식물로 우리나라에서 주요한 경제작물 중의 하나이다(Bosland, 1996; Im and Lee, 2004). 이러한 이유로 인하여 농가에서는 고소득 작물인 고추를 계속적으로 수확하여 고추는 재배기간 동안에 다양한 병원균에 노출되어 피해를 입고 있으며 특히 공기전염성 병원균인 탄저병은 토양전염성 병원균인 역병균과 함께 고추에 가장 심각한 피해를 일으키는 것으로 알려져 있다(Kim and Park, 1998; Kim et al., 2004).

고추 생산에 많은 피해를 주는 고추 탄저병(*Colletotrichum* spp.)은 *C. gloesporioides*, *C. acutatum*, *C. dematium*, *C. coccodes*, *Glomerella cingulata* 등 5종이 보고 되어 있다(KSPP, 2009). 국내에서는 고추 탄저병으로 인하여 연간 총 고추 생산량의 약 10%에 해당하는 1 천억원 이상 피해를 받고 있으며 2000년 이후 우리나라 고추 포장에서 분리된 탄저균주의 약 90% 이상은 *C. acutatum*에 의해 발생했다(Kang, 2009; Kim et al., 2007). 또한, 포도, 사과, 구기자, 토마토 등 서로 다른 기주식물에서 분리된 탄저병균도 고추 탄저병의 전염원이 될 수 있기 때문에 더욱이 고추 탄저병균은 전염원으로서 중요하다(Park et al., 1986). 효과적으로 고추 탄저병을 방제하기 위해서는 수확 후 포장위생 철저, 종자소독을 통한 건전한 고추 유묘 재배, 포장에서 병든 식물체 제거, 살균제 살포 등이 있다(Tran Thi Phuong Chi et al., 2012). 또한 최근 소비자들은 유기농산물을 선호하고 있어 미생물 농약 및 천연물 농약 등과 같은 생물학적 방제에 대한 연구도 이루어지고 있지만, 바람직한 방제효과를 나타내기 어렵기 때문에 농

가의 입장에서는 저항성 품종을 육성, 재배하는 것이 가장 경제적이고 효율적인 방법이라고 할 수 있다(Hwang, 1995).

저항성 품종 개발을 위해서는 탄저병 저항성 유전자원 발굴, 저항성 유전자 규명 등의 연구가 필요하기 때문에 탄저병에 저항성을 가지고 있는 유전자를 확보하는 연구가 진행되어지고 있다(Kim, 1986; Kim and Hwang, 2002; Lee et al., 2001. Yoon et al., 2004). 현재까지 *C. chinense* 'PBC932'와 'PI594137', *C. baccatum* 'PBC80'과 'PBC81'이 저항성을 가지고 있는 것으로 보고되어있다(Kim et al., 2004; Kim et al., 2008; Mahasuk et al., 2009; Park et al., 2009; Sarath Babu et al., 2001; Yoon et al., 2004)

본 실험에서는 고추 탄저병 저항성 육종을 위한 재료를 확보하고자 103점의 고추 유전자원의 *C. coccodes*에 대한 저항성을 검정하였다.

나. 재료 및 방법

식물재배

고추 탄저병 저항성 평가를 위하여 서울대학교로부터 *Capsicum annum* 97점, *C. baccatum* 4점과 *C. chinense* 2점 등 총 103점을 분양받아 실험에 사용하였다. 고추 종자는 원예용 상토 쑥쑥이(농우바이오사)를 채운 일회용 포트(직경 5.0cm, 80mL)에 파종하여 온실에서 재배하였다. 고추 유묘는 3엽이 완전히 전개 되었을 때, 접종 실험에 사용하였다. 실험의 대조 품종으로 '부강(홍농종묘)'을 포함하여 실험하였다.

접종원 준비

실험에 사용된 병원균은 한국화학연구원에서 보관중인 *C. coccodes* 2-25 균주를 사용하였다. Potato dextrose agar(Becton, Dickinson and Co.) 배지에서 2주 동안 25℃에서 배양한 균사를 oatmeal agar (Becton, Dickinson and Co.)에 접종하여 25℃에서 1주일 동안 배양하였다. 멸균한 붓으로 균사를 제거한 후 3일 동안 항온항습실(25℃, 상대습도 80%)에서 하루에 12시간씩 광을 처리하며 포자 형성을 유도하였다. 배양한 탄저병균 plate에 멸균수를 넣고 멸균한 붓으로 포자를 수확하였으며, 균사를 제거하기 위하여 4겹의 가제로 여과하여 포자현탁액을 준비하였다. 포자 농도 5×10^5 spores \cdot mL⁻¹가 되도록 조정하여 접종원으로 사용하였다. 포자현탁액에 Tween 20을 250 μ g \cdot mL⁻¹ 농도가 되도록 첨가하여 탄저병균이 유묘에 부착하는데 도움을 주었다.

접종 및 병조사

각 품종들의 저항성 정도를 확인하기 위하여 3엽이 완전히 전개된 상태의 고추 유묘에 *C. coccodes*의 포자현탁액을 흘러내리기 직전까지 분무하여 접종한 후, 25℃ 습실상에서 암상태로 48시간 동안 배양하였다. 습실처리한 유묘는 항온항습실(25℃, 상대습도 80%)로 이동하여 1일 동안 12시간씩 광을 처리하며 재배하여 탄저병 발생을 유도하였다. 접종 3일 후에 각 유묘의 발병률을 조사하였다. 이 때 저항성 정도는 평균 발병률이 15% 이하인 경우에는 저항성, 16-34%는 중도저항성, 35% 이상은 감수성으로 판정하였다. 그리고 모든 실험은 4반복씩 실시하였다.

다. 결과 및 고찰

총 103자원의 고추 유묘에 대해 탄저병균을 분무 접종하여 발병률에 따라 저항성의 정도를 판별한 결과 4점이 저항성을 나타내었다(Table 1). 고추 종류별로는 *C. annuum*은 총 97점 중에서 11점이 중도저항성을 2점이 저항성을 보였다. *C. baccatum*은 실험에 사용되었던 4점이 모두 감수성을 나타내었다. 또한 *C. chinense* 역시 실험에 사용된 2점이 모두 중도저항성을 보였다. 특히 탄저병 저항성 계통으로 알려진 *C. baccatum* 'PBC 80'과 'PBC81'은 본 실험에서 감수성 반응을 나타내었다. Kim 등(2010)은 국내외적으로 가장 많이 재배되고 있는 *C. annuum* 중 내에는 안정적인 저항성을 보이는 유전자원이 없다고 하였으나 본 실험에서 *C. annuum* 'R11-48', 'R11-159'가 저항성을 보였으므로 탄저병 저항성 품종 육성을 위한 재료로 유익하게 쓰일 수 있을 것이라고 기대된다.

Table 1. The resistance of 103 peppers to anthracnose caused by *Colletotrichum coccodes*².

Name	Scientific name	Disease severity (%)	Response
R11-1	<i>Capsicum annuum</i>	37.5 ^y	S ^x
R11-2	<i>Capsicum annuum</i>	27.5	MR
R11-5	<i>Capsicum annuum</i>	80.0	S
R11-6	<i>Capsicum annuum</i>	70.0	S
R11-7	<i>Capsicum annuum</i>	57.5	S
R11-8	<i>Capsicum annuum</i>	30.0	MR
R11-11	<i>Capsicum annuum</i>	87.5	S
R11-13	<i>Capsicum annuum</i>	65.0	S
R11-14	<i>Capsicum annuum</i>	25.0	MR
R11-16	<i>Capsicum annuum</i>	75.0	S
R11-17	<i>Capsicum annuum</i>	77.5	S
R11-18	<i>Capsicum annuum</i>	85.0	S
R11-19	<i>Capsicum annuum</i>	75.0	S
R11-21	<i>Capsicum annuum</i>	82.5	S
R11-22	<i>Capsicum annuum</i>	80.0	S
R11-24	<i>Capsicum annuum</i>	85.0	S
R11-28	<i>Capsicum annuum</i>	77.5	S
R11-31	<i>Capsicum annuum</i>	87.5	S
R11-33	<i>Capsicum annuum</i>	32.5	MR
R11-34	<i>Capsicum annuum</i>	36.8	S
R11-36	<i>Capsicum annuum</i>	90.0	S
R11-38	<i>Capsicum annuum</i>	65.0	S
R11-39	<i>Capsicum annuum</i>	90.0	S

R11-40	<i>Capsicum annuum</i>	85.0	S
R11-41	<i>Capsicum annuum</i>	87.5	S
R11-42	<i>Capsicum annuum</i>	20.0	MR
R11-45	<i>Capsicum annuum</i>	67.5	S
R11-47	<i>Capsicum annuum</i>	90.0	S
R11-48	<i>Capsicum annuum</i>	13.8	R
R11-51	<i>Capsicum annuum</i>	70.0	S
R11-53	<i>Capsicum annuum</i>	80.0	S
R11-55	<i>Capsicum annuum</i>	40.0	S
R11-57	<i>Capsicum annuum</i>	42.5	S
R11-60	<i>Capsicum annuum</i>	90.0	S
R11-61	<i>Capsicum annuum</i>	21.3	MR
R11-62	<i>Capsicum annuum</i>	80.0	S
R11-65	<i>Capsicum annuum</i>	85.0	S
R11-67	<i>Capsicum annuum</i>	90.0	S
R11-68	<i>Capsicum annuum</i>	87.5	S
R11-69	<i>Capsicum annuum</i>	65.0	S
R11-70	<i>Capsicum annuum</i>	85.0	S
R11-73	<i>Capsicum annuum</i>	75.0	S
R11-74	<i>Capsicum annuum</i>	80.0	S
R11-77	<i>Capsicum annuum</i>	72.5	S
R11-78	<i>Capsicum annuum</i>	67.5	S
R11-79	<i>Capsicum baccatum</i>	52.5	S
R11-82	<i>Capsicum annuum</i>	32.5	MR
R11-83	<i>Capsicum annuum</i>	17.3	MR
R11-86	<i>Capsicum annuum</i>	41.3	S
R11-89	<i>Capsicum annuum</i>	68.8	S
R11-90	<i>Capsicum annuum</i>	85.0	S
R11-93	<i>Capsicum annuum</i>	82.5	S
R11-95	<i>Capsicum annuum</i>	92.5	S
R11-98	<i>Capsicum annuum</i>	90.0	S
R11-99	<i>Capsicum annuum</i>	55.0	S
R11-102	<i>Capsicum annuum</i>	92.5	S
R11-104	<i>Capsicum annuum</i>	90.0	S
R11-105	<i>Capsicum annuum</i>	82.5	S

R11-106	<i>Capsicum annuum</i>	85.0	S
R11-107	<i>Capsicum annuum</i>	85.0	S
R11-108	<i>Capsicum annuum</i>	90.0	S
R11-109	<i>Capsicum annuum</i>	90.0	S
R11-110	<i>Capsicum annuum</i>	72.5	S
R11-111	<i>Capsicum annuum</i>	90.0	S
R11-112	<i>Capsicum annuum</i>	80.0	S
R11-113	<i>Capsicum annuum</i>	92.5	S
R11-114	<i>Capsicum annuum</i>	80.0	S
R11-115	<i>Capsicum annuum</i>	50.0	S
R11-116	<i>Capsicum annuum</i>	92.5	S
R11-117	<i>Capsicum annuum</i>	82.5	S
R11-118	<i>Capsicum annuum</i>	30.0	MR
R11-119	<i>Capsicum annuum</i>	92.5	S
R11-126	<i>Capsicum annuum</i>	77.5	S
R11-127	<i>Capsicum annuum</i>	82.5	S
R11-130	<i>Capsicum annuum</i>	87.5	S
R11-133	<i>Capsicum annuum</i>	90.0	S
R11-137	<i>Capsicum annuum</i>	90.0	S
R11-138	<i>Capsicum annuum</i>	37.5	S
R11-139	<i>Capsicum annuum</i>	50.0	S
R11-144	<i>Capsicum annuum</i>	77.5	S
R11-145	<i>Capsicum annuum</i>	95.0	S
R11-152	<i>Capsicum annuum</i>	100.0	S
R11-153	<i>Capsicum annuum</i>	100.0	S
R11-154	<i>Capsicum annuum</i>	43.8	S
R11-156	<i>Capsicum annuum</i>	90.0	S
R11-157	<i>Capsicum annuum</i>	75.0	S
R11-159	<i>Capsicum annuum</i>	8.8	R
R11-161	<i>Capsicum annuum</i>	40.0	S
R11-162	<i>Capsicum annuum</i>	75.0	S
R11-165	<i>Capsicum baccatum</i>	100.0	S
R11-166	<i>Capsicum annuum</i>	70.0	S
R11-169	<i>Capsicum annuum</i>	60.0	S
R11-172	<i>Capsicum chinense</i>	17.5	MR

R11-174	<i>Capsicum chinense</i>	27.5	MR
R11-175	<i>Capsicum annuum</i>	80.0	S
R11-176	<i>Capsicum annuum</i>	40.0	S
R11-178	<i>Capsicum annuum</i>	30.0	MR
R11-180	<i>Capsicum annuum</i>	70.0	S
R11-181	<i>Capsicum annuum</i>	52.5	S
R11-191	<i>Capsicum annuum</i>	47.5	S
PBC80	<i>Capsicum baccatum</i>	100.0	S
PBC81	<i>Capsicum baccatum</i>	57.5	S
F ₁	<i>Capsicum annuum</i>	20.0	MR
Bukang		35.0	S

^zSeedlings of hot pepper species at 6- to 7- leaf stage were inoculated with *Colletotrichum coccodes* 2-25 by spraying spore suspension of the fungus at a concentration of 5.0×10^5 spores·mL⁻¹. The inoculated plants were incubated in a dew chamber at 25°C for 48 h and then transferred to growth chamber (25°C, RH 80%). After 1 days, disease severity of the plants was investigated.

^yEach value represents the mean of 4 replicates each.

^xResistance response, R = resistant (disease severity ≤ 15 %), MR = moderately resistant (15 % < disease severity ≤ 35 %), S = susceptible (disease severity > 35 %).

2. 고추 유전자원의 CMV-P1 저항성 검정

최근 국내 고추 시판 품종과 재배종에 대한 바이러스병 저항성이 무너지고 있다(Cho 등, 2006; Cho 등, 2008). 바이러스병에 대한 저항성도 재배환경과 온도 등 외부요인에 의해 변화가 생기고 있어 바이러스병에 저항성인 품종 육종 개발이 시급하다. 국내 시판 품종과 병 저항성 육종용 종자에서도 바이러스병에 강한 품종은 존재하여도 CMV-P1에 저항성인 품종은 없었다(Table 2). 따라서 국내 보유 유전자원에서 CMV-P1 저항성 탐색을 위해 농촌진흥청 유전자원센터에서 분양받은 112점의 고추 유전자원을 이용해 CMV-P1에 저항성을 가지는 자원을 조사하였다. 조사 결과 총 112점 가운데 6, 20, 26, 29, 30, 31, 36, 37, 94, 100, 110, 112, 113, 115, 147, 149, 150의 17점이 ELISA 결과 0.500(absorbance at 405nm)이하로 중도저항성으로 조사되었고 32, 33, 34, 35, 38, 39, 103, 116, 117의 9점이 0.200이하로 저항성으로 조사되었고, 나머지 86점은 모두 감수성으로 조사되었다(Table 2, Fig. 1). 또한 Fig. 23과 Fig. 24에서 보듯이 유묘상태의 결과와 포장에서의 성체식물에서의 바이러스 병징과 발현정도의 차이를 보인 것을 보아 고추 유전자원에 대한 시기별 추가 조사가 필요할 것으로 판단된다. 국내 고추재배는 제한된 경지면적과 대체소득작물의 부재로 인해 연작이 불가피하고 매년 동일 바이러스병의 출현과 연속적 감염 그리고 방제 시기의 조절 실패 등으로 발생 피해가 증가하고 있다. 이를 효과적으로 대처하기 위해서 저항성 품종의 개발이 요구되고

있는데 본 실험에서 CMV-P1계통에 저항성을 보인 유전자원을 이용해 바이러스 병 저항성 품종 개발을 위한 육종재료와 유전연구, 분자마크 연구에 좋은 소재로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

Table 2. The results of CMV-P1 resistance evaluation using ELISA of pepper genetics sources

Groups	No.of sample	S ^z	MR	R
Domestic pepper cultivars	56	52	3	1
Foreign pepper lines	31	29	2	-
Genetic pepper resources ^y	112	86	17	9
Total	199	167	22	10

^zS, susceptible; MR, moderately resistant; R, resistant.

^yGenetic pepper resources from RDA Genebank.

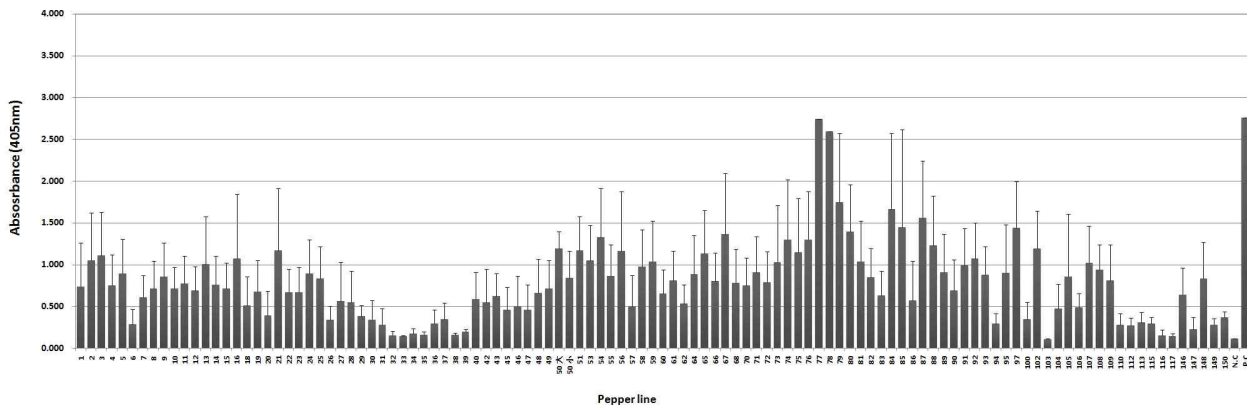


Fig. 1. The ELISA results of genetic pepper resources from RDA Genebank after CMV-P1 artificial inoculation. Error bars represent the standard deviation of five replications.

3. 토마토 유전자원 평가 결과

가. 토마토 자원 확보 및 풋마름병 저항성 검정

가지과 작물 풋마름병을 유발하는 *Ralstonia solanacearum* 균주 SL341을 이용하여 토마토 풋마름병 저항성 검정 시스템을 구축하여 국내 유전자원으로 먼저 토마토 계통 및 품종의 검정을 수행하였다. 국립농업유전자원센터로부터 보존중인 토마토 전 품종 52계통을 각 50립씩 분양받아 기존에 구축한 저항성 검정 방법으로 계통당 5-10 반복으로 저항성을 검정하였다. 검정 방법은 SL341 균주를 이용하여 기 구축한 토양 관주 방법을 사용하여 접종후 14일간 관찰하여 저항성/감수성 여부를 관찰하였다. 아래의 Table 6은 사용한 품종들의 정보와 그 저항성 검정 결과이다. 총 52품종 및 계통을 확보하여 품종 및 계통을 검정하였으며 그 결과 5의 저항성 육성품종, 5개의 저항성 계통 그리고 다수의 저항성 분리중인 계통이 확인되었으며 나머지는 감수성으로 나타났다. 일부의 품종에서 다수의 개체는 명확하게 감수성 다수의 개체가 명확하게 저항성으로 나타나는 경우의 품종이나 계통

은 저항성분리 로 구별하였다.

Table 3. 토마토 자원 및 저항성 평가 결과

번호	자원번호	자원명	품종/계통	저항성평가
1	IT 100500	대형복수	육성품종(시판)	저항성
2	IT 100501	영광	“	저항성
3	IT 100502	서광	“	저항성
4	IT 100503	내병장수	“	저항성
5	IT 100504	만수조생	“	저항성
6	IT 100505	강육	“	감수성
7	IT 100507	대풍대형	“	감수성
8	IT 100508	만수대형	“	저항성분리
9	IT 100509	광수	“	감수성
10	IT 100510	복수2호	“	감수성
11	IT 229370	핑키	“	감수성
12	IT 229371	보고파	“	저항성분리
13	IT 229707	ABC	“	감수성
14	IT 229708	Ailsa Craughp	육성계통(계통)	저항성
15	IT 229709	GCR26	“	감수성
16	IT 229711	Ponderose	“	감수성
17	IT 229712	Salad Master	“	감수성
18	IT 229713	VF48-IGS	“	감수성
19	IT 229714	시교1호	“	감수성
20	IT 229715	울원	“	저항성분리
21	IT 229716	Brodley	“	저항성분리
22	IT 229717	Donbito	“	감수성
23	IT 235573	Divisoria	“	저항성
24	IT 235574	Wake field	“	감수성
25	IT 235575	물야	“	저항성분리
26	IT 235576	시교6호	“	감수성
27	IT 235577	Enter Priser	“	감수성
28	IT 235578	Fareolog	“	감수성
29	IT 235579	KL-1	“	감수성
30	IT 235580	Mandel 502VFN	“	감수성
31	IT 235581	Osu 474	“	저항성
32	IT 235582	Peasen Improved	“	저항성분리
33	IT 235583	Red Top Uo 7	“	감수성
34	IT 235584	Stome	“	감수성
35	IT 235585	Tamusalatte	“	감수성
36	IT 236511	75-4-16-1-3-1-1	“	감수성
37	IT 236512	LA624-76L-1223-1	“	저항성
38	IT 236513	New Yoker	“	감수성

39	IT 236514	세계일	“	저항성분리
40	IT 236515	조생세계일	“	감수성
41	IT 236516	82-4-118-1-1-1-1	“	저항성분리
42	IT 236517	82-4-120-1-1-1-1	“	저항성분리
43	IT 236518	82-4-122-1-2-1-1	“	저항성분리
44	IT 236519	82-4-110-1-1-1-1	“	감수성
45	IT 236520	C125F2	“	감수성
46	IT 236521	Cast mart	“	감수성
47	IT 236522	Homested	“	감수성
48	IT 236523	84-4-267-2-2-1-1	“	감수성
49	IT 236524	L385Dwart	“	감수성
50	IT 236525	KA608-79L10743-1	“	감수성
51	IT 236526	Photomac	“	감수성
52	IT 236527	Satrum	“	저항성

4. 고추 유전자원의 뿌리혹선충병 병리검정 체계 확립

가. 서론

식물기생 선충은 전 세계적으로 약 2,000여종이 보고되어 있으며 작물에 미치는 경제적 손실이 계속 증가하고 있는 추세이다(Abad 등, 2008; Boina 등, 2008; Jung과 Wyss, 1999). 식물 기생성 선충의 하나인 뿌리혹선충류는 토양병원균들의 식물체 침입을 증대시키기 때문에 2차적인 병으로 인한 식물의 피해를 가져오게 된다(van der Putten 등, 2006). 국내에서 뿌리혹선충에 의해 가장 큰 피해를 받고 있는 작물로는 고구마, 감자, 오이, 참외, 수박, 메론, 토마토, 고추, 당근, 상추 등이 있다.

뿌리혹선충병의 방제는 화학적 방제(살선충 약제방제), 물리적 방제(태양열소독, 온탕 침지법), 경종적 방제(토양개량, 객토, 답전유환, 저항성 품종의 육종, 저항성 윤작, 유인식물 재배), 생물적 방제(살선충 천적) 등의 여러 방법들이 제시되고 있으며(Han과 Kim, 1997; Heald과 Robinson, 1987; Kim과 Han, 1998; Park 등, 1995b) 포장상태, 방제 효율 및 경제성 등을 고려하여 적합한 방제 방법들을 선택하게 된다(Chon 등, 1996; Park 등, 1995a). 최근 약효가 우수한 살선충제를 이용한 선충 방제가 이루어지고 있지만, 토양 및 물의 이동, 유묘, 농기구 등에 의한 재 오염이 지속적으로 발생되고 있어 근본적인 방제 방법으로 인식되지 못하고 있다. 따라서 장기적으로는 가장 환경 친화적 방제 방법인 저항성 품종이나 저항성 대목을 이용한 접목 재배가 효과적일 것이다(Kinloch and Hinson, 1972; Rhoades, 1976). 최근까지 과채류 작물에서의 뿌리혹선충의 저항성 품종 연구가 진행되고 있지만 강한 저항성을 지닌 계통은 그리 많지 않은 것으로 보고되어 있으며 작물에서의 저항성을 이용한 뿌리혹선충 방제에 관한 방법은 토마토 품종 스크리닝을 통해 저항성 작물을 이용한 윤작으로 친환경적 방제에 대한 연구가 이루어지고 있다(Cho 등, 1986; Choi 등, 2006; Han과 Kim, 1997; Kim, 2001; Park 등 1995a; Rhoades, 1976). 하지만 뿌리혹선충은 선충의 종과 race에 따라 저항성품종에 대한 저항성 반응이 상이하고 기주범위가 매우 넓어 경제성이 높은 저항성 윤작 작물을 찾기가 어렵다

는 단점이 있다.

본 연구는 고추 품종의 저항성 연구 및 새로운 저항성 육종 소재를 개발하기 위해 부여 지방에서 채집한 *Meloidogyne incognita* 뿌리혹선충에 대한 고추 유전자원 100개 품종의 저항성 정도를 조사하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 식물체 준비

적합한 조건에서 고추 유전자원 100품종(Table 1)들의 *M. incognita* 뿌리혹선충병에 대한 저항성 검정을 실시하였다.

(2) 식물체 생육

고추 종자를 5×8 육묘용 연결포트(70 ml/pot, 범농사)에 원예용 상토 쑥쑥이(농우바이오)를 채워 넣고 파종하여 유리온실(25 ± 5°C)에서 21일 동안 재배하였다. 21일 재배한 이후 육묘용 고추를 원예용 상토(쑥쑥이, 농우바이오)와 멸균 모래가 혼합(1:1 v/v)된 플라스틱 포트(직경 9.0 cm, 높이 8.0 cm)에 이식하여 7일이 지난 이후에 접종원을 접종하였고 유리온실(25 ± 5°C)에서 45일간 재배하였다.

(3) 뿌리혹선충 증식

고추 품종의 저항성을 검정하기 위해 사용된 뿌리혹선충 (*M. incognita*)은 유리온실에서 서광 품종의 토마토 유묘를 이용해서 증식하였다. 원예용 상토(쑥쑥이, 범농)와 멸균된 모래의 비율(v/v)이 1:1인 혼합 상토가 들어있는 플라스틱 포트(직경 10.0 cm, 높이 9.0 cm)에 파종한 지 21일된 토마토(‘서광’, 몬산토코리아) 유묘를 이식하여 7일이 지난 이후에 접종하였고 45 - 60 일 동안 뿌리혹이 형성 되도록 관리하였다. 증식 실험에 이용된 접종원은 뿌리혹선충 알을 포기당 10,000개를 이용하였다.

(4) 접종원 준비

뿌리혹선충에 대한 뿌리 혹 지수(Gall index)가 높은 증식용 토마토의 뿌리를 수거하여 뿌리혹선충 알을 분리하기 위해 개량된 sodium hypochlorite 방법(Barker 등, 1985)을 사용하였다. 알 분리 방법으로 깨끗이 씻은 뿌리를 1 cm 이하 간격으로 잘라서 250 ml 의 0.5% sodium hypochlorite 용액이 들어있는 분쇄기에 넣고 90초간 고속 회전시켰다. 그리고 혼합 용액을 0.065 mm 체에 걸러 뿌리 찌꺼기와 같은 잔여물을 걸러내고 그것을 통과한 알들은 0.025 mm 체에 수집하여 잔존하는 sodium hypochlorite 성분이 없어지게 수돗물로 충분히 씻어 준다. 이렇게 수집된 뿌리혹선충 알의 농도는 실체현미경을 통해 측정하였고 모든 실험에서 접종 농도가 포기당 알 5000개가 되도록 멸균수로 희석하여 접종원으로 사용하였다.

(5) 접종 및 저항성 검정

고추 품종별 유묘가 이식 되어 있는 원예용 상토와 멸균모래가 혼합된(1:1 v/v)포트(직경 9.0 cm, 높이 8.0 cm)에 포기당 뿌리혹선충 알 5000개의 농도로 3 cm 깊이에 접종하였다. 접종한 유묘는 유리온실(25 ± 5°C)에서 관행으로 수분관리를 하면서 재배하였다. 접종 45일 후에

고추 품종들의 뿌리를 수거해 흙을 제거하고 물로 씻은 후에 뿌리에 발생한 난낭 수(Egg mass)를 조사하였다. 난낭수 조사는 접종원 접종 이후 뿌리혹선충의 감염에 의해 난낭이 형성된 고추 뿌리를 Erioglaucine disodium 용액(15 mg/l)에 30분간 침지하여 염색한 후 조사하였다(Umesh 등, 1994).

저항성 판정은 뿌리혹선충의 감염으로 뿌리에 형성된 난낭수가 가장 많은 품종과 비교하여 난낭수가 10% 이하이면 저항성(R), 11-25% 사이면 중간 저항성(M), 26% 이상이면 감수성(S)으로 판정하였고(Fassuliotis, 1985) 또한 Taylor과 Sasser(1978)의 방법을 응용하여 뿌리에 생긴 난낭의 수가 0-2 = 고도저항성(highly resistant, HR), 3-10 = 저항성(resistant), 11-30 = 중도저항성(moderate resistant, MR), 31-100 = 중도감수성(moderate susceptible, MS), 101-300 = 감수성(susceptible, S), >301 = 고도감수성(very susceptible, VS)으로 판정하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) *M. incognita*에 대한 고추 유전자원 100개 품종들의 저항성 검정

부여 지방에서 채집한 *M. incognita*에 대한 100개 고추 유전자원 품종들의 저항성 정도를 조사하기 위하여, 파종하고 28일 재배한 고추 유묘에 *M. incognita* 알을 주 당 5,000개씩 접종하고 온실(25 ± 5°C)에서 재배하여 뿌리혹선충병 발생을 조사하였다. 고추 유전자원 100개 품종들에 있어서 Fassuliotis (1985)가 제시한 저항성 판정에 따라 세 가지 그룹으로 분류할 수 있었다. 'R11-145'을 포함한 25개(25%) 품종들은 저항성 반응(R)을 보였고 'R11-28'을 포함한 29개(29%) 품종들은 중간 저항성(M)을 나타냈다. 그리고 'R11-40'을 포함한 46개 (46%) 품종들은 감수성(S)을 보이는 품종이었다. 또한, Taylor과 Sasser(1978)의 판정법을 응용한 경우는 'R11-89'를 포함한 13개(13%)의 고도 저항성(HR) 품종, 'R11-69'를 포함한 9개(9%)의 저항성(R) 품종, 'R11-115'를 포함한 30개(30%)의 중도 저항성(MR) 품종, 'R11-14'를 포함한 44개(44%)의 중도 감수성(MS) 품종 그리고 'R11-40'을 포함한 4개(4%)의 감수성(S) 품종 등 다섯 가지 그룹으로 분류할 수 있었다(Table 1). 고추 유전자원 100개 품종 중에서 고도 저항성을 나타내는 9개 품종(난낭수 0개)을 최종적으로 선발하였고 효율적인 이것은 고추 뿌리혹선충병 저항성 검정에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각 된다.

Table 1. Root-knot nematode severity of one hundred pepper cultivars to *Meloidogyne incognita*.

Accession ID.		No. of egg mass	Resistance reaction ^y	Resistance reaction ^w
R11-01	<i>C. annuum</i>	76 ± 42.0 ^v	S	MS
R11-02	<i>C. annuum</i>	47 ± 23.6	S	MS
R11-05	<i>C. annuum</i>	26 ± 20.0	M	MR
R11-06	<i>C. annuum</i>	26 ± 21.8	M	MR
R11-07	<i>C. annuum</i>	20 ± 13.9	S	MS
R11-08	<i>C. annuum</i>	37 ± 41.3	S	MS
R11-11	<i>C. annuum</i>	5 ± 5.3	R	R
R11-13	<i>C. annuum</i>	1 ± 1.8	R	HR
R11-14	<i>C. annuum</i>	81 ± 37.1	S	MS
R11-16	<i>C. annuum</i>	5 ± 4.0	R	R

R11-17	<i>C. annuum</i>	3 ± 3.6	R	R
R11-18	<i>C. annuum</i>	0	R	HR
R11-19	<i>C. annuum</i>	65 ± 63.0	S	MS
R11-21	<i>C. annuum</i>	66 ± 39.7	S	MS
R11-22	<i>C. annuum</i>	24 ± 12.2	M	MR
R11-24	<i>C. annuum</i>	7 ± 9.6	R	R
R11-28	<i>C. annuum</i>	23 ± 30.4	M	MR
R11-31	<i>C. annuum</i>	45 ± 11.0	S	MS
R11-33	<i>C. annuum</i>	15 ± 20.4	M	MR
R11-34	<i>C. annuum</i>	12 ± 25.0	R	R
R11-36	<i>C. annuum</i>	0	R	HR
R11-38	<i>C. annuum</i>	45 ± 31.9	S	MS
R11-39	<i>C. annuum</i>	17 ± 6.1	M	MR
R11-40	<i>C. annuum</i>	125 ± 39.0	S	S
R11-41	<i>C. annuum</i>	77 ± 12.2	S	MS
R11-42	<i>C. annuum</i>	88 ± 35.3	S	MS
R11-45	<i>C. annuum</i>	41 ± 27.0	S	MS
R11-47	<i>C. annuum</i>	32 ± 22.8	S	MS
R11-48	<i>C. annuum</i>	0	R	HR
R11-51	<i>C. annuum</i>	41 ± 20.6	S	MS
R11-53	<i>C. annuum</i>	39 ± 53.8	S	MS
R11-55	<i>C. annuum</i>	54 ± 43.6	S	MS
R11-57	<i>C. annuum</i>	12 ± 5.4	R	MR
R11-60	<i>C. annuum</i>	33 ± 28.1	S	MS
R11-61	<i>C. annuum</i>	47 ± 29.3	S	MS
R11-62	<i>C. annuum</i>	108 ± 24.6	S	S
R11-65	<i>C. annuum</i>	4 ± 5.8	R	R
R11-67	<i>C. annuum</i>	27 ± 22.5	M	MR
R11-68	<i>C. annuum</i>	46 ± 22.5	S	MS
R11-69	<i>C. annuum</i>	6 ± 8.6	R	R
R11-70	<i>C. annuum</i>	4 ± 4.4	R	R
R11-73	<i>C. annuum</i>	64 ± 20.3	S	MS
R11-74	<i>C. annuum</i>	58 ± 31.6	S	MS
R11-77	<i>C. annuum</i>	23 ± 22.7	M	MR
R11-78	<i>C. annuum</i>	13 ± 8.3	M	MR
R11-79	<i>C. baccatum</i>	28 ± 24.3	M	MR
R11-82	<i>C. annuum</i>	71 ± 19.1	S	MS
R11-83	<i>C. annuum</i>	38 ± 42.6	S	MS
R11-86	<i>C. annuum</i>	42 ± 44.1	S	MS
R11-89	<i>C. annuum</i>	0	R	HR
R11-90	<i>C. annuum</i>	1 ± 1.3	R	HR
R11-93	<i>C. annuum</i>	40 ± 14.7	S	MS
R11-95	<i>C. annuum</i>	0	R	HR
R11-98	<i>C. annuum</i>	71 ± 21.0	S	MS
R11-99	<i>C. annuum</i>	24 ± 9.2	M	MR
R11-102	<i>C. annuum</i>	83 ± 17.4	S	MS
R11-104	<i>C. annuum</i>	29 ± 15.7	M	MR
R11-105	<i>C. annuum</i>	55 ± 40.4	S	MS
R11-106	<i>C. annuum</i>	61 ± 30.7	S	MS
R11-107	<i>C. annuum</i>	83 ± 19.0	S	MS

R11-108	<i>C. annuum</i>	109 ± 45.0	S	S
R11-109	<i>C. annuum</i>	23 ± 21.4	M	MR
R11-110	<i>C. annuum</i>	89 ± 45.3	S	MS
R11-111	<i>C. annuum</i>	79 ± 38.4	S	MS
R11-112	<i>C. annuum</i>	75 ± 23.9	S	MS
R11-113	<i>C. annuum</i>	72 ± 36.0	S	MS
R11-114	<i>C. annuum</i>	91 ± 17.0	S	MS
R11-115	<i>C. annuum</i>	21 ± 17.1	M	MR
R11-116	<i>C. annuum</i>	39 ± 27.5	M	MR
R11-117	<i>C. annuum</i>	32 ± 26.7	S	MS
R11-118	<i>C. annuum</i>	109 ± 38.1	S	S
R11-119	<i>C. annuum</i>	76 ± 52.1	S	MS
R11-126	<i>C. annuum</i>	103 ± 47.3	S	MS
R11-127	<i>C. annuum</i>	31 ± 21.4	M	MS
R11-130	<i>C. annuum</i>	85 ± 21.0	S	MS
R11-133	<i>C. annuum</i>	33 ± 27.4	S	MS
R11-137	<i>C. annuum</i>	0	R	HR
R11-138	<i>C. annuum</i>	37 ± 27.7	S	MS
R11-139	<i>C. annuum</i>	12 ± 11.0	R	MR
R11-144	<i>C. annuum</i>	31 ± 22.1	M	MS
R11-145	<i>C. annuum</i>	0	R	HR
R11-152	<i>C. annuum</i>	0	R	HR
R11-153	<i>C. annuum</i>	1 ± 1.3	R	HR
R11-154	<i>C. annuum</i>	0	R	HR
R11-156	<i>C. annuum</i>	17 ± 8.1	M	MR
R11-157	<i>C. annuum</i>	9 ± 11.0	R	R
R11-159	<i>C. annuum</i>	24 ± 19.0	M	MR
R11-161	<i>C. annuum</i>	34 ± 21.1	S	MS
R11-162	<i>C. annuum</i>	14 ± 17.6	M	MR
R11-165	<i>C. annuum</i>	42 ± 21.7	M	MR
R11-166	<i>C. baccatum</i>	23 ± 14.0	M	MR
R11-169	<i>C. annuum</i>	18 ± 7.3	M	MR
R11-172	<i>C. chinense</i>	22 ± 18.4	M	MR
R11-174	<i>C. chinense</i>	16 ± 6.1	M	MR
R11-175	<i>C. annuum</i>	11 ± 12.6	R	MR
R11-176	<i>C. annuum</i>	28 ± 13.5	M	MR
R11-178	<i>C. annuum</i>	23 ± 26.4	M	MR
R11-180	<i>C. annuum</i>	15 ± 17.0	M	MR
R11-181	<i>C. annuum</i>	13 ± 8.1	M	MR
R11-191	<i>C. annuum</i>	2 ± 2.9	R	HR
선충저항성		2 ± 4.0		
선충이병성		26 ± 590		

^zOne week after transplanting, the potted 28-day-old seedlings were inoculated with *M. incognita*. The inoculated plants were incubated in a greenhouse (25 ± 5 °C). Forty five days after inoculation, disease severity of the seedlings was rated on the number of egg masses.

^yResistance reaction of pepper cultivar was determined by the number of egg masses per plant. R, resistant, 0-13; MR, moderately resistant, 14-32; S, susceptible, more than 33.

^wResistance rating: Number of egg masses per root, 0-2 = HR (highly resistant), 3-10 = R (resistant), 11-30 = MR (moderately resistant), 31-100 = MS (moderate susceptible), 101-300 = S (susceptible), >300 = VS (very susceptible) (modified from Taylor and Sasser, 1978).

^vThe number of egg masses/plant. Each value represents the mean \pm standard deviation of five replicates each.

5. *Brassica oleracea*의 뿌리혹병 및 시들음병 병리 검정

가. 서언

현대 식생활에서 중요한 농업 작물 6속을 포함하는 Brassica 채소는 전세계적으로 많은 양이 소비되고 있다(Cartea 등, 2008). 그 중 Brassica 속 내의 *Brassica oleracea*는 양배추, 브로콜리, 컬리플라워 등의 경제적으로 매우 중요한 여러 작물을 포함한다(Jo 등, 2012). 국내에서도 양배추의 경우 건강에 대한 관심과 외식 수요 증가로 장기적으로 그 소비량이 많아지는 추세이며(Koh 등, 2013a), 브로콜리 또한 웰빙의 붐을 타서 소비가 급격히 증가하여 중요한 채소가 되었다(Koh 등, 2013b).

현재까지 양배추에 발생하는 병해로 국내에서 뿌리혹병, 시들음병 및 검은썩음병 등 14종이 보고되었다(The Korean Society of Plant Pathology, 2009). 그 중 양배추 뿐 아니라 다양한 작물에 침해하며 국내외 막대한 피해를 주는 뿌리혹병과 시들음병은 매우 중요한 병해이다.

토양전염성 순환물 기생체 *Plasmodiophora brassicae* Woron.에 의해 발생하는 뿌리혹병은 Brassica 작물의 배추, 양배추, 꽃양배추, 브로콜리, 무 등에 발병하여 전세계적으로 광범위하게 큰 피해를 주고 있다(Kim 등, 2003; Yoon 등, 2010; Zhang 등, 2005). *P. brassicae* 병원균에 의해 감염된 식물은 잔뿌리가 없어지고 뿌리의 이상증식으로 주근에 흑이 생성되므로 양분과 수분의 공급이 억제되어 생육이 저해되고 시드는 증상을 반복하다가 결국 고사한다(Arie 등 1998; Jo 등, 2012; Kim 등, 2003). 이를 방지하기 위해 화학적 처리뿐만 아니라 재배적 방법으로 윤작, pH 조절, 그리고 청결한 환경관리를 수행하여도 병원균이 토양 속에서 휴면포자로 오랜 기간 생존 가능하며 십자화과에 속하는 많은 식물체에 병원성을 가지는 특성으로 인해 작물 손실의 예방은 매우 어려운 실정이다(Dobson 등, 1983; Niwa 등, 2008; Voorrips, 1995). 따라서 작물 손실을 최소로 줄일 수 있는 저항성 품종의 개발에 대한 요구가 매우 높다.

Fusarium oxysporum f. sp. *conglutinans*에 의해 발생하는 양배추 시들음병은 병원균이 도관을 통해 이동하여 물관의 기능을 저해시키므로 잎이 황화되고 심하게 감염되면 시들고 도관이 변색되어 말라죽게 하는 병으로(Agrios, 1997; Moon 등, 2001; Peterson과 Pound, 1960), 특히 양배추의 연작지에서 발생하여 큰 피해를 주며 전세계적으로 생산되고 있는 양배추의 품질과 생산량을 크게 떨어뜨리고 있다(Lv 등, 2013; Moon 등, 2001). 이는 수년에서 수십년까지 토양에 존재 가능한 전형적인 토양 전염성병인 시들음병원균이 화학농약의 사용이나 윤작 같은 일반적인 방법을 통한 방제 효과를 기대하기 어렵기 때문으로 시들음병 방제에도 저항성 품종을 사용하는 것이 가장 효과적이라 보고되고 있다(Arden, 1979; Farnham 등, 2001; Keinath 등, 1998).

뿌리혹병과 시들음병과 같은 토양 전염성 병원균의 방제에 가장 효과적인 방법은 저항성 품종의 사용임은 분명하나, 뿌리혹병 저항성 양배추 품종은 일본에서 소수의 품종이 개발된 바

있지만 매우 드물며(Baggett와 Kean, 1985), 2개 이상의 유전자가 관여하는 양적 저항성으로 알려진 뿌리혹병 저항성 양배추의 저항성 유전자에 대한 관련 정보 또한 아직 부족하여 그 저항성 품종의 개발은 계속 지연되고 있는 실정이다(Hiral, 2006). 그리고 Fusarium 시들음병에 대한 양배추 저항성 품종은 A type과 B type 저항성이 알려졌고 그 중 A type 저항성 양배추 품종은 개발되어 사용된 바 있으며(Walker, 1930, 1958; Ramirez-Villupadua 등, 1985). 현재도 국내의 다수 회사에서 시들음병 저항성인 양배추 품종을 개발하여 판매하고 있다. 하지만 저항성 유전자 규명 및 분자마커 개발에 한 보고는 거의 없으며 새로운 저항성 유전자원 탐색이 부족한 현실이다(Baik 등, 2011). 따라서 *B. oleracea*에 속하는 양배추의 뿌리혹병과 시들음병 저항성 품종 개발에 필요한 유전자원을 탐색은 반드시 필요하다.

본 연구는 농업유전자원정보센터로부터 2012-13년 분양받은 양배추에 대한 뿌리혹병과 시들음병 저항성 검정을 수행하여 뿌리혹병과 시들음병 저항성 품종 육종을 위한 유전자원 연구의 활용 가능성을 확인하였고, 양배추와 같이 *B. oleracea*에 속하는 브로콜리의 뿌리혹병과 시들음병에 대한 저항성 정도를 조사하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 식물체 재배

*Brassica oleracea*의 뿌리혹병과 시들음병에 대한 저항성 육종 유전자원탐색을 수행하고자 농촌진흥청 국립농업과학원 농업유전자원정보센터로부터 2012년에 6품종의 브로콜리와 8품종을 양배추를, 그리고 2013년에 56품종의 양배추를 분양받았다. 브로콜리 6품종, 양배추 63품종을 이용하여 뿌리혹병에 대한 병원성 검정을 수행하고자 5 × 8 육묘용 연결 포트(70 ml/pot, 범농사)에 원예용상토 5호(부농사)를 넣고 각 종자를 포트 당 1립씩 파종하여 온실(25 ± 5℃)에서 14일 동안 재배한 유묘를 실험에 사용하였다. 시들음병에 대한 병원성 검정을 위해 브로콜리 6품종과 양배추 60품종의 종자를 원예용상토 5호(부농사)를 넣은 8 × 16 연결포트 (20 ml/pot, 범농사)에 넣고 종자를 1립씩 파종하여 동일한 온실조건에서 14일간 재배한 유묘를 실험하였다.

(2) 뿌리혹병균 접종원 준비 및 접종

강원도 강릉시 왕산면 대기리 배추포장에서 2009년 채집된 GN균주(race 9)의 이병조직 1 g을 취해 휴면포자를 수확한 후 온실에서 재배한 본엽 2엽기 배추에 접종하고 20 ℃ 항온항습실에서 1주일 동안 배양하였다. 이를 뿌리혹병이 발병한 적 없는 한국화학연구원 밭포장에 정식하고 60일 동안 통상적으로 관리하면서 재배하여 배추 이병조직을 수거하였다. 그리고 강원도 평창군 안흥면 상안리 배추포장에서 2010년 채집된 PC균주(race 9)의 이병조직 1 g에서 휴면포자를 수확하여 2엽기의 배추 유묘에 접종하였다. 접종된 유묘를 20 ℃ 항온항습실에서 1주일 동안 배양한 후 큰 포트에 이식하여 온실(20 ± 5 ℃)에서 60일 동안 재배하고 뿌리를 수확하였다. 각각의 방법으로 증식되어 수확된 균주는 -80 ℃ deep freezer에 보관되었으며, 보관 중인 GN균주와 PC균주를 꺼내어 흐르는 수돗물에 수차례 세척하여 이물질을 제거하고 각각의 균주를 1:1로 혼합하여 이를 Waring blender에 넣고 멸균수를 첨가한 후 마쇄하였다. 이를 2점의 거즈로 걸러 식물조직을 제거하여 최종 1 ml 당 발병조직 0.1 g이 포함된 현탁액으로 희석하여 준비된 포자현탁액을 포트 당 5 ml씩 관주 접종하였다. 광학현미경 하(300배)에서

hemocytometer를 이용하여 포자농도를 측정된 결과 8.5×10^8 spores/pot와 1.6×10^9 spores/pot의 농도로 2012년도 분양받은 품종과 2013년 분양받은 품종에 대하여 각각 접종되었다.

(3) 시들음병 접종원 준비 및 접종

장릉원주대학교로부터 분양받은 양배추 시들음병을 발생시키는 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* KR3균주를 potato dextrose agar(Becton, Dickinson and Co.)배지에 접종하고 25 °C에서 7일 동안 배양한 균사조각을 malt extract broth(Becton, Dickinson and Co.)배지에 접종하여 7일 동안 25 °C 암상태에서 150 rpm으로 진탕배양하였다. 배양한 KR3균주를 4겹 거즈로 걸러 균사를 제거하고 95320 g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 침전된 포자를 수거하였다. 수거된 포자를 멸균수로 희석하고 광학현미경 하에서 hemocytometer로 측정하여 최종 접종원의 포자 농도를 1.0×10^7 conidia/ml로 조정하였다. 온실에서 재배한 유묘의 뿌리를 수돗물로 세척하여 흙을 제거하고 준비된 포자현탁액에 30분 동안 침지 후, 5 × 8 육묘용 연결 포트(68 ml/pot, 범농사)에 원예용상토 5호(부농사)를 넣고 접종된 유묘를 이식하여 시들음병을 접종하였다.

(4) 발병 및 병조사

뿌리혹균을 접종한 유묘는 20 °C 항온항습실에서 하루 12시간 광처리하며 3-7일 동안 배양한 후 온실(20 ± 25 °C)로 옮겨 재배하였고, 접종 39-42일 후 뿌리를 수확하여 발생정도에 따라 발병도를 조사하였다. 뿌리혹병의 병조사 기준은 0=뿌리혹병 발생이 없음, 1=측근에 작은 혹이 착생되어 서로 독립하여 존재, 2=측근에 비교적 큰 혹이 착생됨, 3=주근에 큰 혹이 착생되어 서로 접합됨, 4=주근에 매우큰 혹이 착생됨 등의 5단계로 하였으며(Kuginuki 등, 1999; Suwabe 등, 2003), 평균발병도가 1.0이하인 경우 저항성, 1.0초과 2.0이하는 중도저항성, 2.0초과는 감수성으로 판정하였다.

시들음병균을 접종한 유묘는 24시간 동안 25 °C 습실상에서 배양한 후 25 °C 항온항습실로 이동하여 하루 12시간씩 광처리를 하며 재배하고, 접종 3주 후 식물체의 뿌리를 뽑아 도관을 잘라 발병도를 조사한다. 시들음병의 병조사 기준은 0=건전, 1=도관은 갈변되었으나 병징이 없는 것, 2=도관이 갈변되고 생육이 약간 억제된 것, 3=도관이 갈변되고 생육이 억제되며 약간 황화된 것, 4=도관이 갈변되고 생육이 억제되며 심하게 황화된 것, 5=고사 등의 6단계로 하였다. 평균 발병도가 1.0이하인 경우에는 저항성 1.0초과 2.5이하는 중도저항성, 2.5초과는 감수성으로 판정하였고, 모든 실험은 10반복으로 2회 실시하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) 뿌리혹병 저항성 유전자원 검정

배추의 유전자는 단인자 우성 유전을 한다고 알려진 것(James와 Williams, 1980; Kuginuki 등, 1999; Yoshikawa, 1993)과 달리 *B. oleracea*의 뿌리혹병 저항성의 경우 열성 유전자에 의해 관여된다고 보고된 바 있고(Crute 등, 1980; Hansen, 1989; Voorrips와 Visser, 1993), 다수의 우성 유전자가 저항성을 조절한다는 연구 결과 또한 있다(Laurence와 Thomas, 1993). 그리고 고전적인 유전 분석 및 분자마커 분석에서 몇몇의 *B. oleracea* 저항성 유전자들

의 저항성이 단인자가 아닌 다인자 유전을 한다고 알려져 있다(Figdore 등, 1993; Grandclement와 Thomas, 1996; Landry 등, 1992; Moriguchi 등, 1999; Nomura 등, 2005; Rocherieux 등, 2004; Voorrips 등, 1997). 따라서 저항성 품종의 육종이 가장 효과적인 방법임에도 뿌리혹병 저항성 유전자의 복잡한 유전 형질과 저항성 유전자원의 부족으로 *B. oleracea*의 유전자원 육종에 매우 어려움을 겪고 있는 현실에서 저항성 품종의 개발은 계속 지연되고 있다(Voorrips, 1995). 국내에서도 저항성 양배추 품종의 육종에 관한 연구가 진행되고 있음에도 저항성 품종이 시판되지 못하고 있으며 국내 외 저항성 유전자에 관련된 정보에 대한 연구의 요구가 점점 높아지고 있는 상황이다.

본 연구에서 *B. oleracea*의 뿌리혹병 저항성 유전자에 관련된 정보를 얻기 위해 2011-12년 농업유전자원정보센터로부터 분양받은 브로콜리 6품종과 양배추 63품종에 대한 뿌리혹병 저항성 검정을 수행한 결과, 6품종의 브로콜리 모두 뿌리혹병에 감수성을 나타내었으며(Table 1), 63품종의 양배추 중 5품종에서 중도저항성, 58품종에서 감수성이 확인되었다(Table 1, 2). 본 실험에서 뿌리혹병 저항성 검정에서 중도저항성을 보인 'IT227118', 'IT227113', 'IT100498', 'IT223342', 'K166220'는 양배추 뿌리혹병 육종 유전자원연구의 소재로서 고려해 볼 수 있을 것으로 보인다.

Table 1. Clubroot development on six line broccolis and eight line cabbages provided by National Agrobiodiversity Center in 2012^a.

Accession ID.	Scientific name	Disease index ^b	Response ^c
IT 238544	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	4.0 ± 0.0	S
IT 238543	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	3.8 ± 0.4	S
IT 238542	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	4.0 ± 0.0	S
IT 227101	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	3.7 ± 0.5	S
IT 227100	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	4.0 ± 0.0	S
IT 227099	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	4.0 ± 0.0	S
IT 227118	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	1.7 ± 0.7	MR
IT 227117	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 ± 0.0	S
IT 227116	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	3.7 ± 0.5	S
IT 227115	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	3.6 ± 0.5	S
IT 227114	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	3.1 ± 0.7	S
IT 227113	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	1.7 ± 0.8	MR
IT 227112	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	3.4 ± 0.8	S
IT 227111	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	3.7 ± 0.5	S
Equus	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	4.0 ± 0.0	S
Verydom	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	4.0 ± 0.0	S
Ahosima	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	4.0 ± 0.0	S
Ohjora	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	3.9 ± 0.3	S
Noranggimjang	<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i>	3.9 ± 0.3	S
CR-Hwangrok	<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i>	3.7 ± 0.5	S
Jersey Queen	<i>Brassica napobrassica</i>	0.8 ± 0.8	R
Badger Shipper	<i>Brassica napobrassica</i>	0.2 ± 0.4	R

^a14-day-old seedlings were inoculated with *Plasmodiophora brassicae* by drenching the roots with the spore suspension of each isolate to give inoculum density 8.5×10^8 spores \cdot pot⁻¹. The plants were incubated in a growth chamber at 20 °C for 4 days with 12 h

light a day and then transferred to greenhouse (20 ± 5 °C). Six weeks after inoculation, disease severity of the plants was investigated.

^bEach value represents the mean disease severity \pm standard deviation of two runs with ten replicates each.

^cR, MR, and S indicate resistant (disease index ≤ 1.0), moderate resistant ($1.0 <$ disease index ≤ 2.0), and susceptible (disease index > 2.0), respectively.

Table 2. Clubroot development of 55 line cabbages provided by National Agrobiodiversity Center in 2013^a.

Accession ID.	Scientific name	Disease index ^b	response ^c
IT100498	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	1.7 \pm 0.8	MR
IT100499	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	2.8 \pm 1.3	S
IT136508	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	2.3 \pm 1.1	S
IT136510	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	2.8 \pm 0.9	S
IT180722	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 \pm 0.0	S
IT188172	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 \pm 0.0	S
IT188173	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 \pm 0.0	S
IT188175	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	3.8 \pm 0.4	S
IT203326	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 \pm 0.0	S
IT203328	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 \pm 0.0	S
IT203329	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	3.8 \pm 0.6	S
IT206707	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 \pm 0.0	S
IT209939	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 \pm 0.0	S
IT211568	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 \pm 0.0	S
IT223333	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 \pm 0.0	S
IT223334	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 \pm 0.0	S
IT223335	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	3.6 \pm 1.0	S
IT223336	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	3.7 \pm 0.7	S
IT223337	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 \pm 0.0	S
IT223338	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 \pm 0.0	S
IT223339	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	2.7 \pm 1.1	S
IT223340	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 \pm 0.0	S
IT223341	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 \pm 0.0	S
IT223342	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	2.0 \pm 0.8	MR
IT223343	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 \pm 0.0	S
IT223344	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	3.9 \pm 0.3	S
IT223345	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 \pm 0.0	S
IT234356	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 \pm 0.0	S
IT267602	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	3.8 \pm 0.4	S
IT906781	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	3.5 \pm 0.7	S
K004537	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	2.8 \pm 1.4	S
K004549	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	3.8 \pm 0.6	S
K138775	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 \pm 0.0	S
K138934	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 \pm 0.0	S
K139017	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 \pm 0.0	S
K161791	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 \pm 0.0	S

K166207	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	3.7 ± 0.5	S
K166208	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	3.6 ± 0.7	S
K166210	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	3.6 ± 0.7	S
K166211	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 ± 0.0	S
K166212	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	2.8 ± 1.5	S
K166213	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	3.8 ± 0.6	S
K166214	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	3.9 ± 0.3	S
K166215	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	2.9 ± 1.0	S
K166217	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 ± 0.0	S
K166218	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 ± 0.0	S
K166219	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 ± 0.0	S
K166220	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	1.2 ± 1.0	MR
K167872	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 ± 0.0	S
K167874	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	3.4 ± 0.8	S
K167875	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 ± 0.0	S
K173350	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 ± 0.0	S
K173351	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	3.4 ± 0.7	S
K204445	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 ± 0.0	S
K204446	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 ± 0.0	S
Ohjora	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 ± 0.0	S
Ohgane	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	3.5 ± 0.8	S
Noranggimjang	<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i>	4.0 ± 0.0	S
CR-Alchan	<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i>	0.9 ± 1.5	R

^a14-day-old seedlings were inoculated with *Plasmodiophora brassicae* by drenching the roots with the spore suspension of each isolate to give inoculum density 1.6×10^9 spores \cdot pot⁻¹. The plants were incubated in a growth chamber at 20 °C for 7 days with 12 h light a day and then transferred to greenhouse (20 ± 5 °C). 39 days after inoculation, disease severity of the plants was investigated.

^bEach value represents the mean disease severity ± standard deviation of two runs with ten replicates each.

^cR, MR, and S indicate resistant (disease index ≤ 1.0), moderate resistant (1.0 < disease index ≤ 2.0), and susceptible (disease index > 2.0), respectively.

(2) 시들음병 저항성 유전자원 검정

유전자원센터로부터 분양받은 브로콜리와 양배추 품종에 대한 시들음병 저항성 검정을 수행한 결과, 브로콜리 6품종 중 1품종(IT238542)을 제외한 5품종 ‘IT238544’, ‘IT238543’, ‘IT227101’, ‘IT227100’, ‘IT227099’에서 저항성이 나타났다(Table 3). 그리고 양배추 60품종에 대한 시들음병 저항성 검정 결과는 저항성 17품종, 중도저항성 15품종 그리고 28품종에서 감수성이 확인되었다(Table 3, 4).

Fusarium oxysporum f. sp. *conglutinans*는 양배추를 포함한 배추과 작물에 시들음병을 일으키는 병원균으로서 기주에 따라 계통이나 레이스가 구별되었지만(Armstrong과 Armstrong, 1952, 1966, 1981; Ramirez-Villupadua, 1985), 이후 양배추와 무에 감염하는 균주를

나누어 각각 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*와 *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*로 구분되었다(Bosland와 Williams, 1987, 1988). 그리고 양배추에 병을 일으키는 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*균주에 레이스 1과 2가 존재하고(Bosland와 Williams, 1986), 레이스 1은 감수성 품종에만 병을 일으키며 레이스 2는 A type 양배추에 병원성을 보인다.

양배추 시들음병 저항성은 A type 저항성과 B type 저항성이 알려져 있으며(Blank, 1937), B type 저항성은 25°C 이하의 온도에서만 저항성을 보이므로 상업 육종에 이용하기 큰 어려움을 가지고 있어 모든 온도에 저항성을 보이는 단인자 우성유전자를 가지는 A type 저항성 양배추 품종만이 개발되어 50여년 동안 사용되었다(Walker, 1930, 1958). 하지만 저항성 A type의 양배추에 병원성을 나타내는 레이스의 보고가 있었으며(Ramirez-Villupadua 등, 1985), 양배추 시들음병을 방제하기 위한 새로운 저항성 유전자원 탐색은 필요한 시점에서 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*로 발생하는 시들음병에 대한 저항성이 확인된 양배추 17품종(IT227115, IT227114, IT227113, IT227111, IT100499, IT188172, IT188175, IT223335, IT223336, IT223338, IT223343, IT223345, IT906781, K161791, K166213, K166220, K173350)와 브로콜리 5 품종(IT238544, IT238543, IT227101, IT227100, IT227099)은 양배추와 브로콜리 시들음병 육종 유전자원으로 사용 가능할 것이다.

Table 3. Resistance degree of six line broccolis and eight line cabbages provided by National Agrobiodiversity Center in 2013 to *Fusarium* wilt^a.

Accession ID.	Scientific name	Disease index ^b	response ^c
IT238544	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	1.0 ± 1.9	R
IT238543	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	0.8 ± 1.6	R
IT238542	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	2.7 ± 2.5	S
IT227101	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	0.3 ± 0.7	R
IT227100	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	0.1 ± 0.3	R
IT227099	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	0.1 ± 0.3	R
IT227118	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	2.8 ± 0.9	S
IT227117	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	1.7 ± 1.6	MR
IT227116	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	2.4 ± 1.6	MR
IT227115	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	0.2 ± 0.6	R
IT227114	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	0.6 ± 0.8	R
IT227113	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	0.8 ± 1.8	R
IT227112	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	2.1 ± 1.0	MR
IT227111	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	0.5 ± 1.3	R
Nicegreen	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	0.0 ± 0.0	R
Grandur	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	0.5 ± 0.7	R
Verydom	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	1.6 ± 1.7	MR
YR-Honam	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	0.0 ± 0.0	R
Redmart	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	3.7 ± 1.7	S

^a14-day-old seedlings of each broccoli and cabbage cultivar were inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* by dipping the roots in spore suspension of 1.0×10^7

conidia • ml⁻¹ for 30 min. The inoculated plants were incubated in dew chamber at 25 °C for 24 hr and then transferred to a growth room at 25 °C with 12-hour light a day. After 3 weeks, disease severity of the plants was investigated.

^bEach value represents the mean disease severity ± standard deviation of two runs with ten replicates each.

^cR, MR, and S indicate resistant (disease index ≤ 1.0), moderate resistant (1.0 < disease index ≤ 2.5), and susceptible (disease index > 2.5), respectively.

Table 4. Resistance degree of 52 line cabbages provided by National Agrobiodiversity Center in 2013 to *Fusarium wilt*^a.

Accession ID.	Scientific name	Disease index ^b	response ^c
IT100499	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	0.7 ± 0.9	R
IT136508	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	3.2 ± 1.9	S
IT136510	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.2 ± 1.3	S
IT180722	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	3.6 ± 1.6	S
IT188172	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	0.8 ± 1.5	R
IT188173	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	3.3 ± 2.6	S
IT188175	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	0.7 ± 1.1	R
IT203326	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	1.4 ± 0.8	MR
IT203328	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	2.9 ± 1.4	S
IT203329	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	1.1 ± 1.6	MR
IT211568	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	1.5 ± 2.3	MR
IT223333	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	2.3 ± 1.6	MR
IT223334	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	1.6 ± 1.1	MR
IT223335	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	0.8 ± 1.0	R
IT223336	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	0.9 ± 1.0	R
IT223337	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	1.4 ± 0.7	MR
IT223338	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	0.6 ± 0.5	R
IT223339	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	1.6 ± 1.3	MR
IT223340	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	3.2 ± 1.7	S
IT223341	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.9 ± 0.3	S
IT223342	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.2 ± 1.1	S
IT223343	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	1.0 ± 1.2	R
IT223344	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	1.8 ± 1.1	MR
IT223345	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	1.0 ± 0.7	R
IT234356	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	2.6 ± 1.6	S
IT267602	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	2.9 ± 1.9	S
IT906781	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	0.8 ± 1.8	R
K004537	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	3.8 ± 1.9	S
K004549	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.8 ± 0.5	S

K138775	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	3.3 ± 2.1	S
K138934	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	1.4 ± 1.4	MR
K139017	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.2 ± 1.5	S
K161791	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	0.2 ± 0.4	R
K166207	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	2.9 ± 1.2	S
K166208	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	1.3 ± 1.2	MR
K166210	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	3.2 ± 1.0	S
K166211	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	5.0 ± 0.0	S
K166212	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	2.6 ± 1.9	S
K166213	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	1.0 ± 1.6	R
K166214	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	1.1 ± 0.7	MR
K166215	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	1.1 ± 0.9	MR
K166217	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.7 ± 0.7	S
K166218	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	3.4 ± 1.4	S
K166219	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.5 ± 0.5	S
K166220	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	0.6 ± 0.8	R
K167872	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	2.6 ± 1.8	S
K167874	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.5 ± 0.8	S
K167875	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.7 ± 0.7	S
K173350	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	0.4 ± 1.1	R
K173351	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	2.3 ± 2.2	S
K204445	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.3 ± 1.6	S
K204446	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	4.0 ± 1.6	S
YR-honam	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	0.2 ± 0.4	R
Redmat	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	3.7 ± 1.8	S

^a14-day-old seedlings of each broccoli and cabbage cultivar were inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* by dipping the roots in spore suspension of 1.0×10^7 conidia \cdot ml⁻¹ for 30 min. The inoculated plants were incubated in dew chamber at 25 °C for 24 hr and then transferred to a growth room at 25 °C with 12-hour light a day. After 3 weeks, disease severity of the plants was investigated.

^bEach value represents the mean disease severity \pm standard deviation of two runs with ten replicates each.

^cR, MR, and S indicate resistant (disease index \leq 1.0), moderate resistant ($1.0 <$ disease index \leq 2.5), and susceptible (disease index $>$ 2.5), respectively.

6. TSWV 저항성 유전자원 선발

가. TSWV 병 저항성 유전자원 탐색(제 3-4차년도)

병 저항성 품종을 육성하면 시간이 지나면서 기존의 병 저항성을 극복하는 새로운

strain이 등장한다. 따라서 새로운 strain에 저항성을 보이는 또 다른 유전자원을 찾을 필요가 있다. 본 세부연구기관에서는 고추에서 새로운 TSWV 병 저항성 유전자원을 찾기 위하여 *in vivo* 검정을 통해 저항성 유전자원을 선발했고, 선발한 저항성 유전자원의 병 저항성 유전양상을 분석했다.

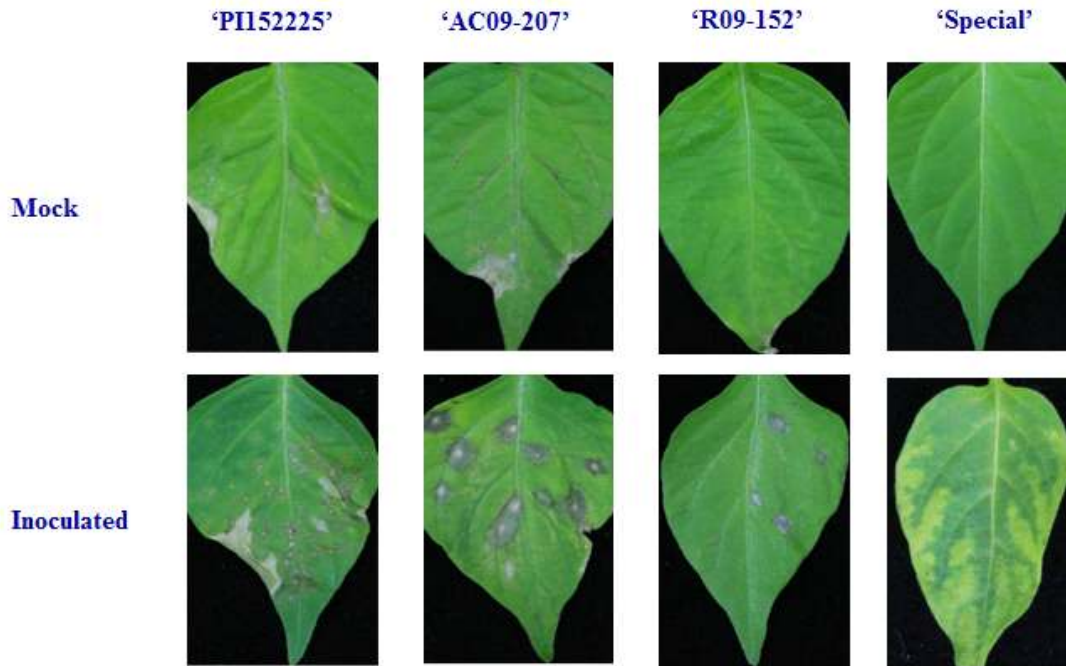
(1) 고추 유전자원에 대한 TSWV 검정(제 3차년도)

병 저항성은 매우 유용한 육종 형질이이지만 새로운 pathotype이나 strain의 출현에 따라 언제든지 무너질 수 있다. 따라서 새로운 저항성 유전자원은 육종가에게 있어 큰 자산이며, 육종의 세계 경쟁력을 결정짓는 요소이기도 하다. 본 세부연구 책임자는 이미 TSWV 저항성을 이번 3차년도에는 TSWV 저항성 유전자원을 찾고자, 436 계통에 TSWV_{Pep}을 접종하여 저항성인 7 계통을 선발한 바 있다. 3차년도에는 이들 7 계통의 병 저항성을 보다 자세하게 분석하고자 보다 많은 개체에 접종하고, 접종 후 60일 동안 병 저항성을 평가했다.

C. chinense 'PI152225'을 병 저항성 대조군으로, *C. annuum* cv. 'Special'을 이병성 대조군으로 사용했다. 1개의 *C. chinense* 계통과 6개의 *C. annuum* 계통마다 약 50개체를 과중하여 즙액 접종법으로 TSWV_{Pep}을 접종했다. 접종 후 60일 동안 병 저항성을 평가한 결과 *C. annuum*에 속하는 2개의 계통은 약 30% 이상의 개체에서 병징이 나타났고, *C. annuum*에 속하는 2개의 계통은 약 15%의 개체에서 병징이 나타났다. 하지만 *C. annuum* 'R09-152'와 *C. chinense* 'AC09-207'는 단 한 개의 개체에서도 병징이 나타나지 않았다(Table 1). 또한 이 2개의 계통에서는 PI152225와 같이 HR-like response가 공통적으로 나타나는 것도 확인할 수 있었다(Fig. 1).

<Table 1> TSWV 저항성 유전자원 검정

종	유전자원 번호	검정 개체수	접종 후 15일 계		접종 후 30일 계		접종 후 60일 계	
			저항성 개체 수	%	저항성 개체 수	%	저항성 개체 수	%
<i>C. annuum</i>	AC08-105	44	41	93.2	41	93.2	38	86.4
<i>C. annuum</i>	AC08-171	59	33	55.9	31	52.5	31	52.5
<i>C. annuum</i>	AC09-014	51	44	86.3	36	70.6	33	64.7
<i>C. annuum</i>	R09-127	59	57	96.6	52	88.1	52	88.1
<i>C. annuum</i>	R09-152	50	50	100	50	100	50	100
<i>C. chinense</i>	AC09-207	37	37	100	37	100	37	100



<Fig. 1> 저항성 계통인 *C. chinense* 'PI152225', *C. chinense* 'AC09-207', *C. annuum* 'R09-152'에서의 HR-like response.

(2) TSWV 병저항성 계통의 유전분석(제 4차년도)

제 4차년도에는 이 가운데 *C. chinense* 'AC09-207'의 유전분석을 수행하기 위하여 *C. annuum* 'Jeju'와 교배하여 F₂ 집단과 'Jeju'와 여교배를 한 BC₁ 집단을 작성했다. 또한 기존의 TSWV 저항성 계통인 *C. chinense* 'PI152225'와 *C. chinense* 'PI159234', *C. chinense* 'PI159236'과의 allelism test를 수행하기 위하여 각각 F₁과 F₂ 집단을 작성하여 *in vivo* 병리 검정을 수행했다.

C. chinense 'AC09-207'의 TSWV 저항성의 유전분석을 위하여 TSWV 이병성인 *C. annuum* 'Jeju'와 교배하여 F₁을 만들었다. F₁을 자가교배하여 104개체로 구성된 F₂ 집단을 작성하고, F₁을 다시 'Jeju'와 여교배하여 140개체로 구성된 BC₁F₁Jeju과 'AC09-207'과 여교배하여 55개체로 구성된 BC₁F₁AC09-207 집단을 작성했다(Table 2). 'Jeju'와 'AC09-207'을 각각 이병성, 저항성 대조군으로 사용하여 각 집단의 개체에 TSWVpap를 접종한 후 3주 후에 병 저항성/이병성을 분석했다. 이병성, 저항성 대조군은 30개체 모두 이병성, 저항성으로 나타나 실험이 성공적으로 수행되었음을 알 수 있었다. F₁ 집단은 82개체 모두 저항성을 나타냈고, BC₁F₁AC09-207집단은 55개체 모두 저항성을 나타냈다. 마지막으로 104개체의 F₂ 집단과 140개체의 BC₁F₁Jeju 집단은 각각 3:1(P=0.8205), 1:1(P=0.1143)로 분리되었다(Table 2). F₁, F₂, BC₁F₁ 집단의 유전분석 결과 'AC99-207'의 TSWV 저항성이 단일 우성 저항성 유전자에 의해 유전됨을 알 수 있었다(Hoang et al. 2013).

<Table 2> ‘AC09-207’ TSWV 저항성 유전자의 유전분석

Parent lines and populations	Number of plants			Expect edratio (R:S) ^a	X ^a	P ^b
	Total	Resistant	Susceptible			
‘Jeju’	30	0	30	0:1	-	-
‘AC09-207’	30	30	0	1:0	-	-
F ₁ ‘Jeju’ x ‘AC09-207’	82	82	0	1:0	-	-
F ₂ ‘Jeju’ x ‘AC09-207’	104	74	30	3:1	0.8205	0.37
BC ₁ F ₁ (‘Jeju’x‘AC09-207’) x ‘Jeju’	140	72	68	1:1	0.1143	0.74
BC ₁ F ₁ (‘Jeju’x‘AC09-207’) x ‘AC09-207’	55	55	0	1:0	-	-

‘AC99-207’의 TSWV 저항성 유전자가 기존의 저항성 계통인 ‘PI152225’, ‘PI159234’, ‘PI159236’과의 allelism test를 수행했다. ‘AC99-207’를 ‘PI159234’, ‘PI159236’와 교배하여 F₁과 F₂ 집단을 작성했고, ‘PI152225’와는 F₂ 집단뿐 아니라 BC₁F₁ 집단까지 작성했다. ‘Jeju’를 이병성 대조군, ‘PI152225’, ‘PI159234’, ‘PI159236’을 저항성 대조군으로 사용하여 각 집단을 *in vivo* 병리 검정을 수행한 결과 이병성 대조군을 제외한 모두 저항성 대조군과 집단이 저항성으로 나타났다(Table 3). 이 결과를 바탕으로 ‘AC99-207’의 TSWV 저항성 유전자가 ‘PI15222’, ‘PI159234’, ‘PI159236’의 TSWV 저항성 유전자(*Tswv*)의 대립유전자이거나 매우 가깝게 연관된 유전자일 것으로 생각된다.

<Table 3> ‘AC09-207’ TSWV 저항성 유전자의 allelism test

Parent lines and populations	Number of plants			Ratio (R:S)
	Total	Resistant (R)	Susceptible (S)	
‘Jeju’	50	0	50	0:1
‘PI152225’	54	54	0	1:0
‘PI159234’	45	45	0	1:0
‘PI159236’	63	63	0	1:0
‘AC09-207’	67	67	0	1:0
F ₁ ‘PI152225’x‘AC09-207’	178	178	0	1:0
F ₂ ‘PI152225’x‘AC09-207’	386	386	0	1:0
BC ₁ F ₁ (‘PI152225’x‘AC09-207’)x‘PI152225’	179	179	0	1:0
BC ₁ F ₁ (‘PI152225’x‘AC09-207’)x‘AC09-207’	89	89	0	1:0
F ₁ ‘PI159234’x‘AC09-207’	152	152	0	1:0
F ₂ ‘PI159234’x‘AC09-207’	197	197	0	1:0
F ₁ ‘PI159236’x‘AC09-207’	140	140	0	1:0
F ₂ ‘PI159236’x‘AC09-207’	168	168	0	1:0
F ₁ ‘PI152225’x‘PI159236’	67	67	0	1:0
F ₂ ‘PI152225’x‘PI159236’	186	186	0	1:0

제 9절. 병리검정 지원

본 과제에서 확립한 *in vivo* 병리검정, 분자마커 검정 및 포장 검정 기술을 이용하여 종자회사 및 육종학자가 의뢰한 다음과 같은 시료에 대하여 병리검정을 수행하고 결과를 제공하였다(Table 1-8).

Table 1. 채소병리검정지원사업단의 병리검정 지원

구 분	의뢰 건수 (개)	<i>In vivo</i> 병리검정 (주)	분자마커 검정 (점)	포장 검정 (계통)
1차년도	40	8,201	1,191	83
2차년도	60	17,600	15,194	235
3차년도	93	24,605	26,056	241
4차년도	91	30,441	22,844	293
5차년도	70	29,071	28,655	71
합계	354	109,918	93,940	923

Table 2. Screening service on *in vivo* assays for resistant plants to twenty-three fungal diseases 병리검정 지원(단위, 주)

작물	식물병	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	합계
배추	뿌리혹병	600	5,600	4,754	6,335	8,630	25,919
	시들음병	0	0	150	0	0	150
무	뿌리혹병	0	320	200	200	0	720
	시들음병	100	320	400	500	1,710	3,030
양배추/ 브로콜리	뿌리혹병	150	2,430	2,200	5,020	5,030	14,830
	시들음병	0	190	3,410	3,310	1,800	8,710
고추	역병	3,070	6,750	5,346	6,100	740	22,006
	흰가루병	0	0	0	0	130	130
토마토	잎곰팡이병	0	0	120	210	0	330
	잎마름역병	0	0	4,620	130	0	4,620
	뿌리썩음병	0	0	120	400	820	1,340
	흰가루병	0	0	0	0	660	660
박과작물	흰가루병	0	0	120	1,890	305	2,315
기타	역병	0	0	0	60	320	380
	잿빛곰팡이병	0	0	0	30	0	30
	늪온곰팡이병	3,500	550	575	1,225	1,025	6,875
합계		7,420	16,160	22,015	25,410	21,170	92,175

Table 3. 세균, 바이러스, 선충병에 대한 *in vivo* 병리검정 지원(단위, 주)

작물	식물병	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	합계
무	검은썩음병	0	0	0	0	65	65
	무름병	0	0	0	0	65	65
양배추/ 브로콜리	검은썩음병	0	1,150	0	4,226	4,170	9,546
	무름병	0	0	0	0	180	180
고추	뚫마름병	0	0	40	40	0	80
	PepMoV	0	0	0	15	0	15
	PMMoV	300	0	0	0	0	300
	CMV	0	200	658	15	2,442	3,315
	TSWV	0	0	1,413	0	0	1,413
	뿌리혹선충	0	0	0	0	157	157
토마토	뚫마름병	286	90	0	0	0	376
박과작물	CMV	195	0	479	0	0	674
	CGMMV	0	0	0	236	0	236
	ZYMV	0	0	0	499	450	949
	WMV2	0	0	0	0	450	450
합계		781	1,440	2,590	5,031	7,979	17,821
<i>In vivo</i> 총계		8,201	17,600	24,605	30,441	29,071	109,918

Table 4. 고추에 대한 분자마커 검정 지원(단위, 점)

작물	식물병	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	합계
고추	<i>Cmr1</i>	205	6,880	7,850	1,134	4,410	20,479
	<i>Cmr2</i>	-	-	42	0	0	42
	<i>pvr1</i>	205	637	3,083	1,134	0	5,059
	<i>pvr6</i>	-	-	92	0	0	92
	<i>L3</i>	30	0	0	1,050	49	1,129
	<i>L4</i>	30	637	1,676	4,584	585	7,512
	<i>Tsw</i>	155	637	1,547	20	910	3,269
	<i>Bs2</i>	205	637	1,547	187	4,045	6,621
	<i>PO</i>	0	0	0	74	0	74
	기타마커	0	1,384	21	2,679	1,040	5,124
	역병	0	0	2,971	3,631	5,812	12,414
	흰가루병	0	0	0	88	0	88
	ChiVM	0	0	96	0	0	96
	순도검정	0	0	0	0	100	100
	48개 세트	0	0	0	0	9,024	9,024
	합계		830	10,812	18,925	14,581	25,975

Table 5. 토마토 등에 대한 분자마커 검정 지원(단위, 점)

작물	식물병	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	합계
토마토	<i>I-2</i>	0	641	1,161	0	0	1,802
	<i>I-3</i>	0	0	0	0	536	536
	<i>Ty-1</i>	0	641	1,161	1,214	536	536
	<i>Ty-2</i>	0	0	1,141	0	0	1,141
	<i>Sw5</i>	0	0	20	3,572	536	4,128
	<i>Bs4</i>	0	0	20	0	0	20
	<i>Tm2a</i>	0	0	1,161	1,214	0	2,375
	<i>Ve-4</i>	0	0	20	0	0	20
	<i>Y3</i>	0	641	0	0	536	1,177
	<i>Pto</i>	0	641	1,161	1,214	536	3,552
	과색	0	0	0	49	0	49
순도검정	0	192	0	0	0	192	
배추	TuMV	0	0	686	0	0	686
오이/멜론	흰가루병	0	0	0	100	0	100
	순도검정	361	1,626	600	900	0	3,487
합계		361	4,382	7,131	8,263	2,680	19,801
분자마커 총계		1,191	15,194	26,056	22,844	28,655	93,940

Table 6. 포장 검정 지원(단위, 계통)

작물	식물병	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	합계
토마토	잎마름역병	0	63	0	0	0	63
	시들음병	0	63	19	0	0	82
	잎곰팡이병	0	5	1	0	0	6
	꽃마름병	0	5	0	0	0	5
	점무늬병	0	5	0	0	0	5
고추/ 파프리카	흰가루병	0	0	19	0	0	19
	CMV	0	0	0	52	0	52
배추	뿌리혹병	43	56	150	106	0	355
양배추	검은썩음병	9	0	0	0	0	9
브로콜리	뿌리혹병	0	0	0	0	31	31
무	시들음병	31	38	52	0	40	161
박과 작물	흰가루병	0	0	0	60	0	60
감자	역병	0	0	0	75	0	75
합계		83	235	241	293	71	923

Table 7. 종자병 감염 조사 지원(단위, 점)

작물	식물병	1차년도	2차년도	작물	4차년도	
당근	바이러스	410	멜론	CGMMV	1,232	
	무	200		SqMV	192	
호박	과실썩음병	6		KGMMV	192	
	CGMMV	196		MNSV	192	
	SqMV	192		ZYMV	192	
	KGMMV	192		WMV2	192	
	MNSV	192		PRSV	192	
	ZYMV	192		CMV	192	
	WMV2	192		감자	바이러스	50
	PRSV	192			PVX	91
	CMV	192	PVY		91	
	오이	세균성모무늬병	2			
수박	CGMMV	3				
합계			합계		4,989	

Table 8. 병리검정 의뢰내역

번호	의뢰날짜	작물	시료종류	수량	병리검정 종류
1	09-04-10	밀	균주	1500주	붉은곰팡이병
2	09-05-04	밀	균주	2000주	붉은곰팡이병
3	09-08-11	양배추	종자	30주	뿌리혹병
4	09-08-12	고추	식물	340주	역병
5	09-08-17	고추	종자	80주	역병
6	09-08-18	고추	종자	30점	<i>pvr1</i>
7				30점	<i>L3</i>
8				30점	<i>L4</i>
9				30점	<i>cmr1</i>
10				30점	<i>Tsw</i>
11				30점	<i>Bs2</i>
12	09-08-19	무	종자	6계통	시들음병
13	09-08-20	배추	종자	15계통	뿌리혹병
14	09-08-20	무	종자	25계통	시들음병
15	09-08-20	배추	종자	8계통	뿌리혹병

16	09-08-20	양배추	종자	9계통	검은씩음병
17	09-08-21	고추	종자	500주	고추역병
18	09-09-03	고추	식물	125점	<i>pvr1</i>
19				125점	<i>cmr1</i>
20				125점	<i>Tsw</i>
21				125점	<i>Bs2</i>
22	09-09-07	토마토	종자	186주	꽃마름병
23	09-09-17	고추	종자	150주	역병
24	09-09-24	배추	종자	20계통	뿌리혹병
25	09-09-29	무	종자	50주	시들음병
26	09-10-05	고추	식물	50점	<i>pvr1</i>
27				50점	<i>cmr1</i>
28				50점	<i>Bs2</i>
29	09-10-06	고추	종자	1500주	역병
30	09-10-08	고추	종자	500주	역병
31	09-10-08	무	종자	50주	시들음병
32	09-10-15	양배추	종자	120주	뿌리혹병
33	09-10-16	배추	식물	200주	뿌리혹병
34	09-11-04	오이	식물	195주	CMV(<i>in vivo</i>)
35	09-11-30	토마토	종자	100주	꽃마름병
36	10-01-05	멜론	식물	361점	순도검정
37	10-01-11	당근	종자	400점	바이러스병감염
38			식물	10점	바이러스병감염
39	10-01-13	고추	종자	300주	PMMoV
40	10-02-08	배추	종자	400주	뿌리혹병
41	10-03-02	고추	식물	1,430점	<i>cmr1</i>
42	10-03-05	고추	종자	240주	역병
43	10-03-24	배추	종자	2,060주	뿌리혹병
44	10-04-01	호박	종자	6점	과실씩음부패병감염
45	10-04-01	오이	종자	2점	세균성모무늬병감염
46	10-04-12	고추	종자	2,070주	역병
47	10-04-22	멜론	종자	226점	순도검정
48	10-04-22	밀	균주	250주	붉은곰팡이병
49	10-05-11	고추	식물	813점	<i>cmr1</i>
50	10-05-14	토마토	식물	192점	순도검정
51	10-06-01	멜론	식물	120점	순도검정

52	10-07-01	밀	균주	300주	밀붉은곰팡이병
53	10-07-05	고추	식물	2000점	<i>cmr1</i>
54	10-07-05	고추	식물	1384점	기타마커검정
55	10-07-09	무	종자	320주	시들음병
56	10-07-09	무	종자	320주	뿌리혹병
57	10-07-13	박	종자	4점	CGMMV감염
58	10-07-13	수박	종자	3점	CGMMV감염
59	10-07-23	오이	종자	120점	순도검정
60	10-08-13	양배추	종자	970주	뿌리혹병
61	10-08-13	양배추	종자	770주	검은썩음병
62	10-08-18	토마토	종자	90주	꽃마름병
63	10-09-01	고추	종자	637점	<i>L4</i>
64				637점	<i>cmr1</i>
65				637점	<i>Tsw</i>
66				637점	<i>Bs2</i>
67				637점	<i>pvr1</i>
68	10-09-01	토마토	종자	641점	<i>Ty-1</i>
69				641점	<i>Pto</i>
70				641점	<i>I2</i>
71				641점	<i>Y3</i>
72	10-09-02	토마토	종자	5계통	잎마름병
73				5계통	점무늬병
74				5계통	잎곰팡이병
75				5계통	시들음병
76				5계통	꽃마름병
77	10-09-27	양배추	종자	280주	검은썩음병
78	10-09-13	오이	종자	120점	순도검정
79	10-09-15	고추	식물	2000점	<i>cmr1</i>
80	10-09-17	토마토	종자	58계통	잎마름병
81				58계통	시들음병
82	10-09-30	배추	종자	3540주	뿌리혹병
83	10-09-30	양배추	종자	80주	뿌리혹병
84	10-09-30	양배추	종자	100주	시들음병
85	10-11-11	고추	종자	1000주	역병
86	10-11-12	양배추	종자	90주	시들음병
87	10-11-12	양배추	종자	100주	검은썩음병
88	10-11-12	양배추	종자	40주	뿌리혹병

89	10-11-28	멜론	종자	240점	순도검정
90	10-12-17	고추	종자	1000주	역병
91	10-12-23	멜론	종자	800점	순도검정
92	10-12-28	고추	종자	230주	역병
93	10-12-28	감자	종자	50점	바이러스감염
94	11-01-05	무	종자	32계통	시들음병
95	11-01-05	배추	종자	16계통	뿌리혹병
96	11-01-05	무	종자	6계통	시들음병
97	11-01-05	배추	종자	40계통	뿌리혹병
98	11-01-10	고추	종자	200주	CMV(in vivo)
99	11-01-12	고추	종자	2210주	역병
100	11-01-14	양배추	종자	1340주	뿌리혹병
101	11-02-16	고추	종자	1750주	역병
102	11-02-24	배추	종자	2254주	뿌리혹병
103	11-03-11	양배추	종자	260주	시들음병
104	11-03-11	양배추	종자	240주	뿌리혹병
105	11-03-15	고추	식물	1536점	<i>pvr1</i>
106	11-03-16	토마토	식물	20점	<i>Sw5</i>
107				20점	<i>Tm2a</i>
108				20점	<i>Ty1</i>
109				20점	<i>Pto</i>
110				20점	<i>Bs4</i>
111				20점	<i>I2</i>
112				20점	<i>Ve4</i>
113	11-03-23	감자	식물	10점	갈죽병(PSTVd)감염
114	11-03-28	고추	DNA	129점	<i>L4</i>
115	11-04-07	고추	식물	100점	역병(분자마커)
116		고추	식물	100점	<i>cmr1</i>
117	11-04-11	고추	식물	6150점	<i>cmr1</i>
118	11-04-25	고추	식물	1296점	역병(분자마커)
119	11-04-26	고추	식물	1547점	<i>pvr1</i>
120				1547점	<i>L4</i>
121				1547점	<i>cmr1</i>
122				1547점	<i>Tsw</i>
123				1547점	<i>Bs2</i>
124	11-04-26	토마토	식물	1141점	<i>Tm2a</i>

125				1141점	<i>Ty1</i>
126				1141점	<i>Ty2</i>
127				1141점	<i>Pto</i>
128				1141점	<i>I2</i>
129	11-04-27	밀	균주	300주	붉은곰팡이병
130	11-04-30	토마토	종자	1계통	잎곰팡이병
131		파프리카	종자	19계통	흰가루병
132		토마토	종자	19계통	시들음병
133	11-05-06	고추	종자	1296주	역병
134	11-05-12	오이	식물	400주	CMV(in vivo)
135	11-05-13	고추	식물	34점	역병(분자마커)
136	11-05-23	고추	종자	758주	TSWV(in vivo)
137	11-05-30	배추	종자	150계통	뿌리혹병
138	11-06-08	고추	종자	1150주	역병
139	11-06-14	고추	식물	96점	ChiVMV
140	11-07-01	고추	식물	655주	TSWV(in vivo)
141		고추	식물	658주	CMV(in vivo)
142	11-07-19	멜론	종자	500점	CGMMV감염
143	11-08-05	고추	식물	95점	역병(분자마커)
144	11-08-08	호박	종자	192점	CGMMV감염
145				192점	SqMV감염
146				192점	KGMMV감염
147				192점	MNSV감염
148				192점	ZYMV감염
149				192점	WMV2감염
150				192점	PRSV감염
151				192점	CMV감염
152		멜론	종자	192점	CGMMV감염
153				192점	SqMV감염
154				192점	KGMMV감염
155				192점	MNSV감염
156				192점	ZYMV감염
157				192점	WMV2감염
158				192점	PRSV감염
159				192점	CMV감염
160	11-08-17	고추	식물	264점	역병(분자마커)
161	11-08-23	고추	식물	398점	역병(분자마커)

162	11-08-23	오이	식물	79주	CMV(in vivo)
163	11-08-23	무	종자	52계통	시들음병
164	11-09-05	무	종자	200주	뿌리혹병
165		무	종자	200주	시들음병
166	11-09-12	고추	식물	21점	기타 rf
167	11-09-15	브로콜리	종자	1540주	뿌리혹병
168		브로콜리	종자	1590주	시들음병
169	11-09-19	배추	종자	2500주	뿌리혹병
170	11-09-27	멜론	종자	30주	흰가루병
171	11-09-29	배추	식물	343점	TUMV
172	11-10-04	배추	식물	343점	TUMV
173	11-10-07	오이	식물	300점	순도검정
174		멜론	식물	300점	순도검정
175	11-10-10	토마토	종자	2295주	잎마름병(in vivo)
176		토마토	종자	120주	뿌리썩음병(in vivo)
177	11-10-11	멜론	종자	300점	CGMMV감염
178		멜론	식물	240점	CGMMV감염
179	11-10-17	고추	종자	1150주	역병
180	11-10-18	브로콜리	종자	1140주	시들음병
181	11-10-19	고추	종자	40주	꽃마름병
182	11-10-26	무	종자	200주	시들음병
183	11-11-03	밀	균주	275주	붉은곰팡이병
184	11-11-14	배추	종자	150주	시들음병
185	11-12-12	토마토	종자	120주	잎곰팡이병
186	11-12-13	고추	식물	92점	<i>pvr6</i>
187	12-01-04	단호박	종자	90주	흰가루병
188	12-01-11	양배추	종자	420주	시들음병
189		양배추	종자	420주	뿌리혹병
190	12-01-17	고추	식물	43점	<i>cmr1</i>
191				42점	<i>cmr2</i>
192	12-01-25	고추	식물	784점	역병
193	12-01-31	토마토	종자	2325주	잎마름역병(in vivo)
194	12-02-01	밀	균주	325주	붉은곰팡이병
195	12-02-15	고추	종자	2970주	역병
196	12-02-23	양배추	종자	2866주	검은썩음병
197		양배추	종자	2090주	뿌리혹병

198		배추	종자	595주	뿌리혹병
199	12-03-05	고추	종자	1530주	역병
200	12-03-06	배추	종자	3320주	뿌리혹병
201	12-03-28	고추	식물	1343점	역병
202	12-04-09	밀	균주	600주	붉은곰팡이병
203	12-04-12	토마토	종자	400주	뿌리썩음병(in vivo)
204		토마토	종자	130주	역병(in vivo)
205	12-04-16	고추	식물	1343점	역병
206	12-05-03	고추	식물	3450점	L4
207		고추	식물	15주	CMV(in vivo)
208		고추	식물	15주	Potyvirus(in vivo)
209	12-05-08	파프리카	식물	24점	기타 과색관련
210	12-05-10	고추	종자	36계통	CMV
211	12-05-10	파프리카	잎	25점	기타 과색관련
212	12-05-25	고추	종자	40주	꽃마름병
213	12-05-31	고추	종자	1600주	역병
214	12-06-04	배추	종자	80계통	뿌리혹병
215	12-06-04	배추	종자	26계통	뿌리혹병
216	12-06-12	고추	종자	16계통	CMV
217	12-06-14	토마토	식물	584점	Sw5
218		토마토	식물	584점	Tm2a
219		토마토	식물	584점	Ty1
220		토마토	식물	584점	Pto
221		토마토	식물	2358점	TSWV
222	12-06-15	토마토	잎	630점	Sw5
223		토마토	잎	630점	Tm2a
224		토마토	잎	630점	Ty1
225		토마토	잎	630점	Pto
226	12-06-20	고추	식물	500점	pvr1
227		고추	식물	500점	L3
228		고추	식물	500점	L4
229		고추	식물	500점	cmr1
230	12-06-21	고추	식물	88점	Bs2
231	12-07-02	양배추	종자	1360주	검은썩음병
232	12-07-05	고추	식물	388점	역병
233	12-07-10	고추	식물	56점	역병
234		고추	식물	74점	P0

235		고추	식물	74점	<i>L3</i>
236		고추	식물	34점	<i>Bs2</i>
237	12-07-15	배추	종자	357점	뿌리혹병
238	12-07-23	토마토	종자	210주	잎곰팡이병
239	12-07-24	수박	종자	200주	흰가루병
240		멜론	종자	700주	흰가루병
241	12-08-20	고추	식물	88점	흰가루병
242	12-09-03	고추	식물	476점	<i>pvr1</i>
243		고추	식물	476점	<i>L3</i>
244		고추	식물	476점	<i>L4</i>
245		고추	식물	476점	<i>cmr1</i>
246		고추	식물	2660점	신미(매운맛)
247	12-09-04	무	종자	200주	시들음병
248		무	종자	200주	뿌리혹병
249	12-09-10	고추	DNA	384점	역병
250	12-09-13	배추	종자	2200주	뿌리혹병
251	12-09-20	감자	종자	60주	역병
252		감자	종자	30주	젓빛곰팡이병
253	12-09-27	멜론	종자	377주	ZYMV
254		참외	종자	205주	CGMMV
255		호박	종자	122주	ZYMV
256		수박	종자	31주	CGMMV
257	12-10-09	무	종자	300주	시들음병
258	12-10-12	고추	DNA	20점	<i>cmr1</i>
259		고추	DNA	20점	<i>L4</i>
260		고추	DNA	20점	<i>Tsw</i>
261		고추	DNA	20점	<i>pvr1</i>
262		고추	DNA	20점	<i>Bs2</i>
263		고추	DNA	20점	역병
264	12-10-15	고추	식물	138점	<i>cmr1</i>
265		고추	식물	138점	<i>L4</i>
266		고추	식물	138점	<i>pvr1</i>
267		고추	식물	19점	웅성불임(Rf)
268		고추	식물	97점	역병
269	12-10-23	브로콜리	종자	1840주	뿌리혹병
270		브로콜리	종자	1840주	시들음병
271	12-11-06	양배추	종자	550주	시들음병

272		양배추	종자	1090주	뿌리혹병
273		배추	종자	220주	뿌리혹병
274	12-11-06	감자	식물	29계통	역병
275	12-11-09	박과류	종자	60계통	흰가루병
276	12-11-16	호박	종자	410주	흰가루병
277	12-11-20	멜론	식물	100점	흰가루병
278	12-11-28	고추	종자	45점	<i>Bs2</i>
279	12-12-13	밀	균주	300주	붉은곰팡이병
280	12-12-19	브로콜리	종자	920주	시들음병
281	12-12-21	감자	식물	46계통	역병
282	13-01-07	멜론	종자	800점	순도검정
283	13-01-23	오이	종자	100점	순도검정
284	13-01-28	멜론	종자	580주	흰가루병
285	13-03-08	배추	종자	3900주	뿌리혹병
286	13-03-21	밀	균주	300주	붉은곰팡이병
287	13-04-09	토마토	종자	660주	뿌리썩음병(in vivo)
288		토마토	종자	660주	흰가루병(in vivo)
289	13-04-15	감자	구근	27점	PVX감염
290		감자	구근	27점	PVY감염
291	13-04-30	양배추	종자	1100주	검은썩음병
292	13-05-02	고추	식물	9,024점	48개 MAB 마커
293	13-05-06	고추	종자	600주	역병(in vivo)
294	13-05-20	감자	구근	100주	역병(in vivo)
295	13-05-27	토마토	식물	536점	<i>Y3</i>
296				536점	<i>Pto</i>
297				536점	<i>I3</i>
298				536점	<i>Ty1</i>
299				536점	<i>Tsw</i>
300	13-05-27	고추	식물	910점	<i>cmr1</i>
301				910점	<i>L4</i>
302				910점	<i>Bs2</i>
303				910점	<i>Tsw</i>
304				910점	신미(매운맛)
305	13-05-27	고추	종자	750주	CMV-FNY(in vivo)
306				1,500주	CMV-P1(in vivo)
307	13-05-28	감자	구근	64점	PVX감염

308		감자	구근	64점	PVY감염
309	13-06-05	무	종자	200점	검은무늬병감염
310	13-06-28	감자	구근	320주	역병
311	13-07-08	고추	종자	192주	CMV P-1
312	13-07-30	무	종자	800주	시들음병
313		무	종자	40계통	시들음병
314	13-08-02	호박	종자	100주	WMV2
315		호박	종자	100주	ZYMV
316	13-08-09	고추	식물	2,875점	<i>Bs2</i>
317				3,500점	<i>cmr1</i>
318				5,812점	역병
319	13-08-12	무	종자	300주	시들음병
320	13-08-13	파프리카	식물	49점	<i>L3</i>
321				49점	<i>L4</i>
322	13-08-23	고추	식물	130점	<i>Bs2</i>
323				130점	고추 신미 분석
324	13-09-10	배추	종자	2,680주	뿌리혹병
325	13-09-24	브로콜리	종자	1,120주	시들음병
326			종자	1,130주	뿌리혹병
327	13-09-24	감자	식물	10점	갈죽병(PSTVd)감염
328	13-09-27	고추	식물	130점	<i>Bs2</i>
329	13-10-29	무	종자	65주	검은씩음병
330				65주	무름병
331	13-10-30	고추	종자	100점	순도검정
332	13-11-21	호박	종자	305주	흰가루병
333	13-11-25	배추	종자	155주	뿌리혹병
334	13-11-25	양배추	종자	360주	뿌리혹병
335			종자	360주	시들음병
336			종자	360주	검은씩음병
337			종자	180주	무름병
338	14-01-23	고추	종자	140주	역병
339			종자	130주	흰가루병
340	14-02-03	밀	균주	300주	붉은곰팡이병
341	14-02-12	배추	종자	1,725주	뿌리혹병
342	14-02-03	토마토	종자	160주	뿌리씩음병
343	14-02-10	브로콜리	종자	31계통	뿌리혹병
344	14-02-15	호박	종자	350주	WMV2

345				350주	ZYMV
346	14-02-25	양배추	종자	3,540주	뿌리혹병
347			종자	2,710주	검은썩음병
348			종자	320주	시들음병
349	14-02-28	밀	균주	75주	붉은곰팡이병
350	14-03-03	밀	균주	50주	붉은곰팡이병
351	14-03-04	고추	종자	79주	뿌리혹선충병
352	14-03-11	무	종자	610주	시들음병
353		배추	종자	170주	뿌리혹병
354	14-03-12	밀	균주	300주	붉은곰팡이병

채소병리검정지원사업단에서는 종자회사에서 제공한 병리검정 결과가 육종가를 얼마나 만족시키는 것인지를 조사하고 차년도 계획에 이를 반영하기 위하여 각 년차 마지막에 만족도 조사를 실시하면서 과제를 수행하여 왔다. 시험을 의뢰한 대다수는 채소병리검정지원사업단의 병리검정 결과에 매우 만족하고 있었으며(표 3), 우리나라 종자산업의 국제 경쟁력 강화를 위하여 이 사업이 지속되기를 희망하고 있다.

표 3. 시험 결과에 대한 만족도 설문조사

항목	정도	1차년도 (%)	2차년도 (%)	3차년도 (%)	4차년도 (%)
진행 속도	빠름	56	82	68	85
	보통	44	18	26	15
	늦음	0	0	5	0
만족도	96-100점	19	12	26	25
	90-95점	69	65	58	55
	80-89점	-	18	11	20
	80점미만	-	5	5	0

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전에서의 기여도 등을 기술

제 1절. 목표달성도

연차	연구계획서상의 연구목표	연구 결과	달성도 (%)
1년차	-가지과 작물(고추, 착색단 고추, 토마토) 역병에 대한 병 저항성 검정 시스템 확립 -배추과 작물(배추, 양배추, 브로콜리) 뿌리혹병에 대한 병 저항성 검정 시스템 구축 -병리검정 서비스	-1차년도에 목표한 가지과 작물 역병과 배추과 작물 뿌리혹병에 대한 체계적이고 효율적인 병 저항성 검정 시스템을 구축하였음 -1차년도임에도 불구하고 약 8,201주 에 대한 병리검정을 수행하여 만족한 결과를 제공하였음	100
	-가지과 작물 풋마름병의 저항성 검정을 위한 검정 표준방법 확립(고추, 토마토) -병리검정 서비스	-1차년도에 계획한 고추 및 토마토 작물의 풋마름병 저항성 검정을 위한 표준 방법을 확립하기 위해 대조구 확보, 적정 검정용 균주 선발, 검정을 위한 적정 접종 방법을 고추 및 토마토에 대하여 각각 확립함 -의뢰 종자의 세균병 검정	100
	병리 검정 표준 시료 제작을 위한 국내 field isolate의 수집	-고추, 배추, 수박 등의 작물에 발생하는 바이러스 수집 -재배 환경에 따라 권역별로 수집된 바이러스의 분석 -표준 시료 제작에 적합한 바이러스 시료의 선발 -의뢰 종자 바이러스 병리 검정	100
	배추과(무, 배추, 브로콜리) 주요 병(시들음병, 뿌리혹병, 검은썩음병)의 육종현장 적용 시험확립	-배추 품종의 뿌리혹병 저항성 스크리닝 -무 품종의 시들음병 저항성 스크리닝 -브로콜리 품종의 주요 병(뿌리혹병, 검은 썩음병, 등) 저항성 스크리닝 -고랭지 및 평nan지(시설재배) 포장에서 검정	100
	-고추 EST 유래 병저항성 유전자 발굴 -유전체 분석을 통한 바이러스 저항성 마커 발굴 -가지과 식물의 병방어관련 유전자 발굴	-10개의 Resistant Gene Analogues (RGA) 분리 확보 -1256 BAC 서열로부터 41개 유전자 선발 -Pepper Mottle Virus 및 모용 연관 마커 발굴 -총 47개의 defense-related gene 발굴	100
-가지과 병 저항성 분자표지	-5개 고추의 병 저항성 분자표지 및 6개 토마토	100	

	<p>분석 기술 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> -새로운 분자표지의 개발 -분자표지 분석 서비스 -신속/간편 DNA chip 분석 기술의 확립 	<p>의 병 저항성 분석 기술 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> -고추 TSWV, 역병 병 저항성 분자표지 개발 -고추 병 저항성 및 멜론 종구별 분자표지를 이용해 1,191점을 분석 -Highly localized RCA 분석 기술의 개발 	
	<ul style="list-style-type: none"> -논문과 DB를 통한 배추과 작물 주요 병저항성 분자마커 탐색 -논문과 DB를 통한 박과 작물 주요 병저항성 분자마커 탐색 -배추 뿌리혹병 저항성 연관 분자마커 검정 시스템 확립 	<ul style="list-style-type: none"> -주요 병저항성에 대한 논문 및 DB 탐색을 통한 분자마커 및 대상유전자 확보(배추뿌리혹병, TuMV) -주요 병저항성에 대한 논문 및 DB 탐색을 통한 분자마커 및 대상유전자 확보(멜론 흰가루병, 덩굴쪄김병) -포장검정 실험을 거친 재료에 대하여 뿌리혹병 저항성 분자마커의 실효성 테스트 (<i>Plasmodiophora brassicae</i> race 4, 11) 	100
2차년도	<ul style="list-style-type: none"> -배추과 작물(무, 양배추) 시들음병에 대한 병 저항성 검정 시스템 확립 -박과 작물(오이, 멜론) 흰가루병에 대한 병 저항성 검정 시스템 구축 -병리검정 서비스 	<ul style="list-style-type: none"> -2차년도에 목표한 배추과 작물 시들음병과 박과 작물 흰가루병에 대한 체계적이고 효율적인 병 저항성 검정 시스템을 구축하였음 -1차년도보다 크게 증가한 약 17,600주 시료에 대한 병리검정을 수행하여 만족한 결과를 제공하였음 	100
	<ul style="list-style-type: none"> -배추 무름병 검정 시스템 확립 및 배추 검은 썩음병 검정 준비 -토마토 고추 풋마름병 내병성 품종 육성을 위한 병리검정 서비스 	<ul style="list-style-type: none"> -1차년도에 부족했던 고추 풋마름병 검정 시스템 구축 및 온도별 토마토 풋마름병 검정을 위한 발병 및 저항성 붕괴를 조사함 -2차년도에 계획한 배추 무름병 저항성 검정을 위한 표준방법 확립을 위해 표준 균주, 접종농도, 적정온도, 대조구 품종을 확보하며 접종방법 및 저항성 평가방법을 확립함 -2차년도에 배추 검은썩음병 검정을 위한 준비로 균주를 확보하여 동정하였으며 3차년도 검정 시스템을 구축할 예정임 -추가로 박과 과실썩음병원균을 확보 동정하였으며 종자에서 검출하는 방법을 확립함 -의뢰 종자의 세균병 검정 	100
	<p>Isolate에 포함된 quasi-species 유무 분석 및 표준 시료 제작</p>	<ul style="list-style-type: none"> -고추, 배추, 수박 등의 작물에 발생하는 바이러스의 수집 -표준 시료 제작에 적합한 바이러스 시료의 선발 및 isolate의 정성적인 변이 분석 -Quasi-species의 정성 분석에 의한 표준 시료 제작 -표준 시료에 의한 유전자원의 병징 발현 수준의 표준화 	100

		-고추, 배추, 수박의 바이러스 병리 검정 기술 표준화 -의뢰 종자 바이러스 병리 검정	
	가지과(고추, 토마토) 주요 병의 육종현장(포장) 적용시험 확립	-균류병 저항성 검정 확립 -바이러스병 저항성 검정 확립 -뿌리혹선충병 저항성 검정 확립 -세균성시들음병 저항성 검정 확립 -의뢰 종자 포장검정	90
	-고추 EST 유래 병저항성 유전자 발굴 -유전체 분석을 통한 모용과 PepMoV 저항성간의 상관관계 분석 -가지과 식물의 병방어 관련 유전자 발굴	-10개의 Resistant Gene Analogues (RGA) 분리 확보 -Pepper Mottle Virus 및 모용의 연관관계 확인 -총 47개의 defense-related gene 발굴	100
	-고추 및 토마토 병 저항성 분자마커 기술 확립 -대량/고속 분석이 가능한 분자마커로의 전환 -분자마커 분석 서비스 -DNA chip 분석 기술의 확립	-고추, 토마토 병 저항성 분자마커를 포함하여 2차년도까지 20개의 분자마커 분석 기술을 확립. 새로운 분자마커를 개발하기 위하여 고추의 TSWV, 역병 병 저항성 분자마커 개발중 -고추, 토마토 병 저항성 및 오이, 멜론 중구별 분자마커를 이용해 15,194점을 분석 -기개발된 standard PCR based 토마토 병 저항성 분자마커를 real-time based 분자마커인 HRM 분자마커로 전환함 -Highly localized RCA분석 기술의 개발	100
	-논문과 DB를 통한 박과 작물 주요 병저항성 분자마커 탐색 -멜론 덩굴쪼김병 저항성 연관 분자마커 검정 시스템 확립 -멜론 흰가루병 저항성 연관 분자마커 검정 시스템 확립	-실제 적용 가능한 PCR 기반 분자마커의 프라이어 확보 -저항성과 감수성 계통의 Fom-2 유전자 염기서열을 분석하고, 변이를 보이는 부분 동정 -PCR 기반 마커로 전환하여 신속 검정 방법 확립 -흰가루병 저항성 연관 PCR 기반 마커 프라이머를 확보하고, 저항성과 감수성 계통에 적용	100
3차년도	-박과 작물(오이, 수박, 멜론) 탄저병에 대한 병 저항성 검정 시스템 구축 -토마토 시들음병에 대한 병 저항성 검정 시스템 확립 -토마토 잎곰팡이병에 대한 병 저항성 검정 시스템 확립	-3차년도에 목표한 박과 작물 탄저병과 토마토 시들음병 및 잎곰팡이병에 대한 체계적이고 효율적인 병 저항성 검정 시스템을 구축하였음 -추가적으로 무 뿌리혹병 검정법도 확립하였음 -보다 효율적으로 병리검정을 지원하기 위하여 뿌리혹병균에 대한 배추 및 양배추의 저항성에 관한 연구를 수행하였음	100

<p>-<i>In vivo</i> 병리검정 서비스</p>	<p>-1, 2차년도보다 증가한 24,605주 시료에 대해 병리검정을 수행하여 만족한 결과를 제공하였음</p>	
<p>-배추 무름병 및 검은썩음병 저항성 검정 시스템 구축 -세균병 저항성 검정 서비스 -풋마름병균 병원성관련 새로운 요인의 분석</p>	<p>-배추 무름병 저항성 검정 시스템 확립 -검은썩음병 저항성 검정 시스템 확립함 -검정 의뢰 없어서 수행하지 못함 -저항성 자원 확보의 새로운 전략 도출을 위해 연구 진행함 -신규한 병원성 요인을 확인함</p>	100
<p>고추, 배추, 수박 등의 작물에 발생하는 바이러스의 수집 및 재배 환경에 따라 권역별로 수집된 바이러스의 분석</p>	<p>-고추, 배추, 수박 등의 작물에 발생하는 바이러스의 수집 -재배 환경에 따라 권역별로 수집된 바이러스의 분석 -이머징 바이러스의 발생 권역 조사 (DNA바이러스) -표준시료에 의한 유전자원의 병징 발현 수준의 표준화 -의뢰 종자 바이러스 병리 검정</p>	100
<p>-박과 작물 내병성 육종을 위한 포장 병리검정 기술 확립 -포장 병리검정 서비스</p>	<p>-박과작물(오이, 수박, 참외)의 흰가루병 저항성 스크리닝 -박과작물(오이, 수박, 참외) 뿌리혹선충병 저항성 스크리닝 -1, 2차년도보다 증가한 2,727점 시료에 대해 고랭지 및 평단지(시설재배) 포장에서 검정</p>	100
<p>-선발된 병저항성 유전자 발굴 및 기능 분석 -유전체 분석을 통한 PepMoV 저항성에 관여하는 유전자 분석</p>	<p>-65개의 NBS-LRR 저항성유전자를 발굴하고 CaR3aH유전자를 분석하여 비기주 관계의 콩역병균분비 단백질인 PsAvr1b와 상호작용함을 밝힘 -PepMoV에 저항성을 나타내는 유전자가 고추의 10번 크로모솜 telomere 약 20cM 안에 존재함을 밝힘</p>	100
<p>-가지과, 배추과 병 저항성 분자마커 기술 확립 -대량/고속 분석이 가능한 분자마커로의 전환 -병 저항성 유전자원 탐색 -분자마커 분석 서비스 -DNA chip 분석 기술의 확립</p>	<p>-고추의 역병, TSWV 저항성 분자마커 분석 기술을 개발함. 3차년도까지 총 20 여개의 분자마커 분석 기술을 확립 -기개발된 standard PCR based 토마토 병 저항성 분자마커를 real-time based 분자마커인 HRM 분자마커로 전환함 -TSWV에 강한 저항성을 보이는 2개의 유전자원을 선발함 -고추, 토마토, 감자 병 저항성 및 토마토, 오이, 멜론 순도 검정을 분자마커 분석 및 <i>in vivo</i></p>	100

		<p>병리 검정법을 이용해 총 26,056점 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> -Highly localized RCA 분석 기술의 개발 -SDL-PCR 방법을 이용하여 DNA Chip SNP 분석의 최적 조건을 성공적으로 확립함 -최적화 된 SDL-PCR 기술을 실제 샘플에 적용하여 특이도 적합성을 확인함 -실제 의뢰받은 시료를 최적화된 SDL-PCR 기술로 분석한 결과 기술이 시료를 분석하기에 충분한 민감도 적합성을 확인함 	
4차년도	<ul style="list-style-type: none"> -토마토 뿌리혹선충병에 대한 병 저항성 검정 시스템 구축 -양배추 검은썩음병에 대한 병 저항성 검정 시스템 확립 -<i>In vivo</i> 병리검정 서비스 -스크리닝을 통한 내병성 육종자원 발굴 -추가적인 병리검정 시스템 개선 	<ul style="list-style-type: none"> -4차년도에 목표한 토마토 뿌리혹선충병과 양배추 검은썩음병에 대한 체계적이고 효율적인 병 저항성 검정 시스템을 구축하였음 -1, 2, 3차년도보다 크게 증가한 30,441주 시료에 대해 병리검정을 수행하여 만족한 결과를 제공하였음 -고추 100계통에 대한 탄저병(<i>Colletotrichum coccodes</i>) 저항성을 검정하여 내병성 육종소재를 선발하였음 -추가적으로 토마토 시들음병 간편대량 검정법을 개발하였으며, 포장으로부터 <i>Cf-9</i> 저항성 품종에 잎곰팡이병을 일으키는 <i>Fulvia fulva</i> 균주를 확보하고 특성을 조사하였으며, 무 시들음병균이 생산하는 독소를 규명하고 특성을 조사하여 무 시들음병 저항성 검정 방법을 개선하였음. 그리고 병원성 정도가 다른 <i>Phytophthora capsici</i> 4개 균주에 대한 100개 품종의 저항성 정도를 조사하여 고추 역병 저항성 특성을 조사하였음 	100
	<ul style="list-style-type: none"> -토마토, 고추의 자원 확보 및 풋마름병 저항성 검정 -변이체를 이용한 토마토 저항성 품종: 기존 대조 품종의 평가 -저항성 검정 서비스 수행 -박과 과실썩음병 저항성 검정 시스템 구축 	<ul style="list-style-type: none"> -농업유전자원센터의 토마토 품종 전수 확보: 토마토 52품종(13품종, 49계통) 확보하여 5 반복으로 30품종 저항성 검정 완료함 -토마토 풋마름병균주 SL341을 이용하며 대조구 저항성 품종으로 Hawaii7996, 감수성 품종으로 Moneymaker 활용하여 토양관주법으로 검정함 -SL341의 EPS 생산 결핍 변이체인 P4와 P2 변이체를 분리하여 변이부위를 확인함(P2: 3차년도 보고, P4: 4차년도에 확인) -두 변이체를 이용하여 대조구 저항성 품종으로 Hawaii7996, 감수성 품종으로 Moneymaker 활용하여 토양관주법으로 검정함 -풋마름병 저항성을 발병 단계에 따라 구분할 수 있는 전략 확보 	100

	<ul style="list-style-type: none"> -고추 풋마름병 저항성의 검정 서비스를 수행함 (4계통 * 10개체 = 40개체) -박과 과실썩음병원 세균 4균주 확보 동정함 -수박에서 병원성 검증하고 적정 발병 조건을 확립함 -대조구 품종을 확보함 	
<ul style="list-style-type: none"> -복합 감염에 의한 고추의 바이러스 저항성 측정 지표 개발 	<ul style="list-style-type: none"> -박과 유전자원의 복합 저항성 측정 기술 개발 -이머징 바이러스의 발생 권역 조사(DNA 바이러스) -의뢰 종자 바이러스 병리 검정 	100
<ul style="list-style-type: none"> -포장 병저항성 검정방법 확립, 서비스 수행 -고추 CMV 포장검정 확립 	<ul style="list-style-type: none"> -배추과(무, 배추, 브로콜리) 주요 병의 포장검정 서비스 -가지과(토마토, 고추, 파프리카) 주요 병의 포장검정 서비스 -박과(참외, 오이, 수박) 주요 병의 포장검정 서비스 -고추 CMV 포장검정 확립 	100
<ul style="list-style-type: none"> -선발된 병저항성 유전자 발굴 및 기능 분석 -유전체 분석을 통한 PepMoV 저항성에 관여하는 유전자 분석 	<ul style="list-style-type: none"> -65개의 NBS-LRR 저항성유전자를 발굴하고 CaR3aH유전자를 분석하여 비기주 관계의 콩역병균분비 단백질인 PsAvr1b와 상호작용함을 밝힘 -PepMoV에 저항성을 나타내는 유전자가 고추의 10번 크로모솜 telomere 약 20cM 안에 존재함을 밝힘 	100
<ul style="list-style-type: none"> -가지과 병 저항성 분자마커 기술의 추가 기술 확립 -배추과, 박과 병 저항성 분자마커 기술의 추가 기술 확립 -병 저항성 유전자원 탐색 -병 저항성 분자마커 분석 서비스 -다양한 주요 병 저항성 마커의 신속/정확한 분석을 위한 DNA Chip 기술 개발 	<ul style="list-style-type: none"> -기개발된 분자마커, 동정된 병 저항성 유전자 정보를 이용하여 새로 Cf4/9, TSWV 2개의 토마토 real-time based 분자마커 분석 기술을 확립했고, 역병 QTL 분석을 수행하고, TSWV 분자마커를 성공적으로 개발하여 25개 이상의 분자마커 분석 기술을 성공적으로 확립함 -배추 뿌리혹병 분자마커 분석 기술을 확립하고, 수박의 흰가루병과 멜론의 흰가루병 저항성 분리집단을 작성함 -고추에서 새로운 TSWV 저항성 유전자원의 유전분석을 수행함 -고추, 토마토, 멜론 병 저항성 및 오이, 멜론 순도 검정을 분자마커 분석을 통해 총 22,844점의 분석 서비스를 수행함 -SDL-PCR 기술을 이용한 병 저항성 SNP 마커 분석법 개발 	100

		<ul style="list-style-type: none"> -RecA 단백질을 이용해서 DNA Chip 분석의 민감도 향상 -실제 분석 시료를 이용하여 SDL-PCR 기술을 이용한 병 저항성 마커 분석 	
5차년도	<ul style="list-style-type: none"> -오이 뿌리혹선충병에 대한 병 저항성 검정 시스템 구축 -멜론 덩굴쪄김병에 대한 병 저항성 검정 시스템 확립 -오이 덩굴쪄김병에 대한 병 저항성 검정 시스템 확립 -<i>In vivo</i> 병리검정 서비스 -스크리닝을 통한 내병성 육종자원 발굴 	<ul style="list-style-type: none"> -5차년도에 목표한 오이 뿌리혹선충병, 멜론 덩굴쪄김병, 오이 덩굴쪄김병에 대한 체계적이고 효율적인 병 저항성 검정 시스템을 구축하였음 -21,170주 시료에 대해 병리검정을 수행하여 만족한 결과를 제공하였음 -고추 100계통에 대한 뿌리혹선충병 (<i>Meloidogyne incognita</i>) 저항성을 검정하여 내병성 육종소재를 선발하였음 -농업유전자원센터로부터 분양받은 양배추 56점의 뿌리혹병 및 시들음병 저항성을 검정하여 내병성 육종 소재를 선발하였음 -포장으로부터 <i>Cf-9</i> 저항성 품종에 잎곰팡이병을 일으키는 <i>Fulvia fulva</i> 균주의 <i>Cf-2</i> 저항성 품종의 저항성 여부를 조사하였음 	100
	<ul style="list-style-type: none"> - 국내 토마토, 고추 야생형, 순계 자원들의 추가 확보 및 풋마름병 저항성 검정: 확립된 검정 시스템으로 검정 - 풋마름병, 배추(양배추) 검은 썩음병 저항성 검정 서비스 수행 - 박과 과실썩음병 저항성 검정 시스템 구축(수박, 메론) 	<ul style="list-style-type: none"> - 농촌진흥청 산하 국립유전자원센터의 토마토 52품종(13품종, 49계통)의 저항성 검정 완료, 고추 풋마름병 저항성 유전자 분석을 위한 RIL 풋마름병 검정(100계통) - 수박 과실썩음병 저항성 검정법 구축: 수박의 대조구 품종을 이용한 저항성 검정법 최종 결정 - 메론 과실썩음병의 접종방법별, 온도, 접종농도, 평가방법 확립 - 저항성 검정 서비스: 무 무름병, 검은썩음병, 양배추 무름병 - 병원세균 유전자원 10종 기탁완료 	100
	<ul style="list-style-type: none"> - TYLCV 접종 시스템 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - TYLCV 토마토 발병 지역에서 다양한 isolates 확보 - TYLCV clones 확보 및 Agrobacterium 매개 TYLCV 접종 방법 확립 <ul style="list-style-type: none"> o Bacteriophage DNA polymerase를 이용한 TYLCV clones 확보 o PCR-based TYLCV clones 확보 	100
	<ul style="list-style-type: none"> -고추, 배추, 수박의 바이러스 병리 검정 기술 표준화 -의뢰 종자 바이러스 병리 검정 	<ul style="list-style-type: none"> -가지과(고추), 십자화과(배추), 박과(수박)에 대한 바이러스 병에 대한 병리검정 기술 표준화 완료 -종자 업체로부터 의뢰 받은 호박 700점에 대한 병리검정 수행 	100

	<ul style="list-style-type: none"> -포장 병저항성 검정방법 확립, 서비스 수행 	<ul style="list-style-type: none"> - 포장 병 저항성 검정서비스 수행: 71개 품종 및 계통의 포장 검정 - 병저항성연구를 위한 유전자원 확보: 병리 검정을 위한 병원균 20종 유전자원센터에 기탁 	100
	<ul style="list-style-type: none"> - 가지과 작물의 병 저항성 분자마커 분석 기술 및 순도 검정 기술 확립 - 고추 병 저항성 분자마커 신규 개발 - 배추과 작물의 병 저항성 분자마커 분석 기술 확립 - 박과 작물의 병 저항성 분자마커 분석 기술 및 순도 검정 기술 확립 - 병 저항성 야생종 탐색 - 병 저항성 분자마커 분석 서비스 	<ul style="list-style-type: none"> - 토마토, 고추, 박과작물의 병저항성, 순도검정 등 총 40개 분자마커 분석 기술을 확립함 - 고추 흰가루병 저항성 분자마커 개발을 위해 저항성 분리 집단 작성 및 분자마커 다형성 검정함. PM 신강 F₁ 상용 품종을 자가교배하여 F₂ 집단 작성하였으며 AHJ324 마커(육종회사에서 제공)를 검정한 결과 F₂ 분리를 확인함. F₂ 집단 88개체는 <i>in vivo</i> 병리 검정 수행함 - 고추 TSWV 저항성 유전자 0 cM 분자마커 개발하기 위해 고추 WGS scaffold 염기서열 DB를 이용하여 TSWV 저항성 유전자를 포함하고 있는 scaffold sequence를 확보함 - 배추 뿌리혹병 중 Race 4 저항성 연관 분자마커를 활용하여 상용 품종 15종에 대하여 분자마커 검정을 수행함 - 멜론 흰가루병 저항성 분자마커를 개발하기 위해 멜론 상용품종 6개의 F₂ 분리집단의 병 저항성 검정 및 CAPS 마커를 개발함 - Tomato spotted wilt virus (TSWV) 저항성을 갖는 <i>C. annuum</i>과 <i>C. chinense</i> 에서 각각 1개의 계통 선발함 - 5차년도에는 고추, 토마토, 감자, 파프리카에 대해 병 저항성 분자마커 분석을 28,655점에 대해 수행함 	100
최종 목표	<ul style="list-style-type: none"> -채소작물 <i>in vivo</i> 병리검정 서비스 기반 구축 -채소작물 주요 식물병에 대한 <i>in vivo</i> 검정 기술 확립 -확립한 병리검정 기술을 이용한 저항성 검정 서비스 -채소 작물 주요 식물병에 대한 분자마커 검정 기술 확립 	<ul style="list-style-type: none"> -병리검정 의뢰를 효율적으로 하기 위한 사업단 홈페이지(www.scdr.re.kr)을 구축하였으며, 시험 의뢰서, 비밀유지계약서 등의 서비스를 기반을 구축하였음 -가지과, 박과, 배추과에 발생하는 주요 병해 46종(균류병 23종, 세균병 8종, 바이러스병 13종, 선충병 2종)에 대한 저항성을 효율적으로 검정하기 위한 <i>in vivo</i> 병리검정 기술을 확립했음 -종자회사 및 육종학자가 의뢰한 <i>in vivo</i> 병리검정 109,918주, 포장검정 923계통의 병리검정을 수행하였음 -내병성관련 신속/간편 분자마커 검정 기술을 고추의 병 저항성 유전자 10종, 토마토 9종, 배추 1종에 대하여 확립하였음 	100

-병저항성 유전자 확보 및 분자마커 개발	-고추의 병 저항성 유전자 유무를 확인할 수 있는 신규한 분자마커 3종(<i>Tsw</i> , <i>Pvr4</i> , 역병 <i>Phyto5</i>)을 개발하였음
-확립한 분자마커 병리검정 기술을 이용한 저항성 검정 서비스	-확립한 분자마커 검정 기술을 이용하여 종자회사 및 육종학자가 의뢰한 93,940점 의 시료의 병 저항성을 분자마커로 검정하였음
-유전자원 스크리닝을 통한 내병성 육종소재 확보	-확립한 병리검정 기술을 이용하여 농업유전자원센터 등으로부터 1,079계통을 분양받아 이들의 병 저항성을 검정하여 45개 내병성 계통 을 선발하였음

제 2절. 관련분야에의 기여도

1. 가지과, 박과 배추과 작물에 발생하는 주요 식물병 48종에 대한 효율적인 *in vivo* 병리검정 체계와 고추 등의 작물의 병 저항성을 검정할 수 있는 분자마커 20종에 대한 신속·정확한 검정 기술을 확립하여 종자회사의 병리검정을 지원할 수 있는 내병성 육종 기반을 갖추었다고 판단된다.
2. 국내의 종자산업 관련 육종회사 중 분자마커를 이용하여 품종육성을 진행하고 있는 농우바이오 등 몇몇 회사에서만 진행하고 있고 대부분의 회사의 경우 연구실, 분자마커 담당 전문가의 부족으로 인해 자체적으로 분석할 수 있는 기반이 아직 갖춰지지 않고 있다. 따라서 확립한 병리검정 기술을 이용하여 종자회사의 병리검정을 지원하여 내병성 품종을 개발하는 데 기여하였다. 이러한 분자마커 및 *in vivo* 서비스는 내병성 품종 개발 연한을 단축하고 선발효율을 증진함으로써 병저항성 품종에 대한 국제 경쟁력 확보할 수 있으며, 분자마커 및 육종기술의 산업재산권 획득에 의해 국내 종자산업 발전 및 로얄티 수입증대 가능하게 되었다. 이러한 병저항성 품종 개발은 안전 농산물 생산함으로써 최종적으로 국민 건강을 증진할 것으로 기대한다.
3. 과제에서 확립한 병리검정 기술은 논문으로 발표하여 후학들이 이용할 수 있도록 하였으며, 또한 매년 ‘육종가 교육’ 프로그램을 통해 *in vivo* 병리검정 뿐만 아니라 분자마커 병리검정 기술의 이론 및 실습을 교육하여 우리나라 종자기업의 국가 경쟁력 강화에 기여하였다.
4. 가지과 작물의 병 저항성 분자마커 개발 및 검정 기술 확립: 고추와 토마토의 바이러스, 세균, 곰팡이, 선충 등과 관련된 병저항성 유전자로부터 분자마커를 개발하여 검정해주는 기술을 확립하였다. 특히 확보된 유전 집단으로부터 고추의 TSWV 저항성 분자마커를 대량분석용이 가능한 SNP마커로 개발하였으며, 고추 역병의 경우 comparative genetics, RNA-SEQ 방법을 통해 매우 가깝게 연관된 분자마커를 개발하였다. 특히 역병의 경우 관행적 방법으로 육성이 어려운 양적형질에 대한 분자마커와 그 활용기술을 개발함으로써 신품종 개발 경쟁력을 강화하게 되고 이를 통해 국내 종자회사의 국제 경쟁력을 가질 수 있을 것으로 기대한다.

이러한 분자마커를 이용하여 가지과 작물의 병저항성 품종 선별 및 육성에 기여하였다.

가지과 작물의 병저항성 품종 육성을 위한 저항성 관련 유전자 및 마커의 확보는 이를 활용한 신규 저항성유전자원의 대량 확보가 가능하다. 병저항성 유전자의 선발 및 분자마커 개발로 인한 지적재산권(특허)을 확보하였으며 중소기업에 기술이전하여 그의 활용도는 높이고자 하였다. 본 과제를 통해서 수행된 국내의 중소기업 종자회사의 품종 개발 역량이 강화되고 이를 통해 국제 경쟁력이 있는 신품종 개발이 가능할 것이다.

5. 배추과 박과 작물의 병 저항성 분자마커 분석 기술 확립: 기존 연구를 통해 국내 배추 육종 및 생산 규모에 대해 피해가 확대되고 있는 배추 뿌리혹병 및 TuMV에 대한 저항성 분자마커 분석 기술을 확립하기 위해 문헌 조사, 유전집단 분석, 유전자원 screening등을 통해 병 저항성 분자마커 확보하였다. 분자마커를 이용하여 배추 품종에 배추 뿌리혹병(Race 4) 저항성 검정을 통해 병저항성 품종 선별을 통한 품종 육성에 기여하였으며, *in vivo* 병리검정 결과를 통해 저항성 및 이병성 품종을 수집하고 분자마커 분석 결과와 비교분석하여 신규 저항성 유전자원을 확보할 수 있도록 기여하였다.

국내에서 점차 피해가 확대 되고 있거나 중요한 육종 목표가 되는 멜론 흰가루병 저항성을 대상으로 문헌 조사 등을 통해 관련 분자마커 분석 기술을 확립하였다. 다양한 품종에 대한 병저항성 여부를 분석하여 기개발된 멜론 흰가루병 저항성 품종에 대한 정확한 저항성 여부를 조사하였다. 분자마커 및 육종기술의 산업재산권 획득에 의한 국내 종자산업 발전 및 로얄티 수입증대 가능.

6. 병 저항성 야생종 탐색: 다양한 바이러스의 경우 기후 변화 등에 의해 기존의 병 저항성을 극복하는 새로운 strain 등이 생성됨에 따라 다양한 균주에 저항성을 보이는 새로운 품종을 탐색하는 것이 매우 중요하다. 본 과제에서는 고추에서 새로운 TSWV 병 저항성 유전자원을 찾기 위하여 *in vivo* 검정을 통해 저항성 유전자원을 선발했고, 선발한 저항성 유전자원의 병 저항성 유전양상을 분석하여 새로운 TSWV 저항성 유전자원이 *Tsw*의 대립유전자를 갖고 있는 것을 분석하였다.

다양한 야생종 screening을 통해 선발된 내병성 유전자원을 종자회사에 분양함으로써 국내 종자회사에 새로운 육종 소재를 제공하고 이를 통해 신품종 개발을 촉진함으로써 국제 종자 시장을 선점하는 효과가 있을 것으로 기대된다.

7. 다양한 주요 병 저항성 마커의 신속/정확한 분석을 위한 DNA Chip 기술 개발: 고추의 바이러스 및 역병 등 병저항성 마커에 대해 신속 정확한 분석을 하기위해 DL-PCR 기술을 개발하여 9개의 병 저항성 마커를 분석하는 새로운 방법을 제시하였다. 소량의 양으로 신속하게 분석하기 위해 RecA 단백질을 이용해서 혼성화 효율을 10배 이상 향상시켰으며, 실제 샘플로 분석한 결과 SDL-PCR 기술과 RecA 단백질을 이용한 혼성화 방법을 사용하여 민감도 및 특이도가 향상되었다.

분자마커에 대한 육종가의 수요가 점차 커짐에 따라 일반적인 PCR과 같이 단일 반응 기반의 분자마커 분석 기술로는 수요를 충족시키기 어렵게 되었다. 이러한 DNA Chip 기술 개발은 한 번에 다양한 분자마커의 유전형을 분석할 수 있음으로써 많은 시료를 이용한 품종개발에 적용할 수 있을 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1절. 연차별 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분		특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
		출원	등록	품종명 명칭등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차년도	목표	0	0	0	0	0	0	12	0	0	
	달성	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2차년도	목표	2	0	0	0	0	0	13	4	4	
	달성	2	0	0	0	0	0	0	6	4	
3차년도	목표	4	0	0	0	0	0	17	5	6	
	달성	25	0	0	0	0	0	11	7+2*	5	
4차년도	목표	4	2	0	0	0	0	15	8	4	
	달성	5	1	0	0	2	0	0	5+4*	1	
5차년도	목표	2	4	0	0	0	0	15	8	3	
	달성	2	3	0	0	0	0	75	22+5*	3+1*	
계	목표	12	6	0	0	0	0	72	25	17	
	달성	34	4	0	0	2	0	86	40+11*	13+1*	

*표시된 것은 사사에는 표시되지 않았으나 사업단의 병리검정 결과가 포함된 논문으로 저자로만 참여

제 2절. 논문

SCI 40+11*편(*표시된 것은 사사에는 표시되지 않았으나 사업단의 병리검정 결과가 포함된 논문으로 저자로만 참여)

1. 배중환, 한 양, 정희진, 권진경, 채 영, 최학순, 강병철. 2010. 토마토 품종 구분을 위한 SNP 분자표지 개발. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 28: 627-637.
2. 김현정, 한정현, 권진경, 박민규, 김병동, 최도일. 2010. Fine mapping of pepper trichome locus 1 controlling trichome formation in *Capsicum annuum* L. CM334. Theor. Appl. Genet. 120: 1099-1106.
3. 김현정, 한정현, 김승일, 이홍렬, 신준성, 김정호, 조규옥, 김영호, 이희재, 최도일. 2010. Trichome density of main stem is tightly linked to PepMoV resistance in chili pepper (*Capsicum annuum* L.) Theor. Appl. Genet. DOI 10.1007/s00122-010-1510-7.
4. 윤철수, 용영록, 김병섭. 2010. The suppressive effects of calcium compounds against *Botrytis cinerea* in paprika. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 28: 1072-1077.
5. 김옥례, 조명철, 김병동, 허진희. 2010. A splicing mutation in the gene encoding phytoene synthase causes orange coloration in habanero pepper fruits. Mol. Cells 36:

DOI/10.1007/s10059-010-0154-4.

6. 백송이, 장경수, 최용호, 김진철, 최경자. 2011. 발병조건에 따른 무 품종들의 시들음병에 대한 저항성 차이. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 29: 48-52.
7. 조수정, 심선아, 장경수, 최용호, 김진철, 최경자. 2011. 국내 재배포장에서 수집한 뿌리혹병균(*Plasmodiophora brassicae*) 균주들에 대한 배추 품종들의 저항성 반응. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 29: 610-616.
8. 양희범, Wing-ye Liu, 강원희, 김진희, 조화진, 유재형, 강병철. 2011. Development and validation of the *L* allele specific markers in *Capsicum*. DOI 10.1007/s11032-011-9666-7.
9. Jinxia Shi, 염선인, 강원희, 박민규, 최도일, 권진경, 한정현, 이흥렬, 김병동, 강병철. 2011. Plant Biotechnol. Rep. 5: 331-344.
10. Moon Nam, Serry Koh, Sung Uk Kim, Leslie L. Domier, Jae Heung Jeon, Hong Gi Kim, Su-Heon Lee, Andrew F. Bent, and Jae Sun Moon. 2011. Arabidopsis TTR1 causes LRR-dependent lethal systemic necrosis, rather than systemic acquired resistance, to Tobacco ringspot virus. Mol. Cells 32: 421-429.
11. 이상준, 김병섭. 2012. 병저항성 육종을 위한 고추 유전자원의 저항성 평가. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 30: 185-191.
12. 김현정, 서은영, 김지현, 정희진, 강병철, 최도일. 2012. Morphological classification of trichomes associated with possible biotic stress resistance in the genus *Capsicum*. Plant Pathology J. 28: 107-113.
13. Moon Nam, eong-Seon Kim, Seok-Jin Park, Chung Youl Park, Jun-Seong Lee, Hong-Soo Choi, Jeong-Soo Kim, Hong Gi Kim, Seungmo Lim, Su-Heon Lee, and Jae Sun Moon. 2012. Biological and molecular characterization of Soybean yellow common mosaic virus, a new species in the genus Sobemovirus. Virus Research 163: 363-367.
14. 박명수, 정보람, 장경수, 최용호, 김진철, 최경자. 2012. 토마토 시들음병에 대한 효율적인 저항성 검정법 확립. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 30: 426-431.
15. 도위신, 이명환, 오청, 김남희, 김진철, 정은숙, 황을철, 이선우. 2012. Inactivation of chloramphenicol and florfenicol by a novel chloramphenicol hydrolase. Appl. Environ. Microbiol. 78: 6295-6301.
16. 이광열, 공현기, 이선우. 2012. Identificatin of a gene encoding adenylate kinase involved in antifungal activity expression of the biocontrol strain *Burkholderia pyrrocinia* CH-67. Plant Pathology J. 28: 373-380.
17. 박명수, 장경수, 최용호, 김진철, 최경자. 2013. 토마토 시들음병에 대한 간편 대량 저항성 검정법. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 31: 110-116.
18. 정예림, 정철희, 박정훈, 김문일, 박현규. 2013. Direct detection of unamplified genomic DNA based on photo-induced silver ion reduction by DNA molecules. Chemical Communications 49: 2350-2352.
19. 우민아, 김문일, 조대연, 박현규. 2013. Cell-based galactosemia diagnosis system based on a galactose assay using a bioluminescent *Escherichia coli* array. Anal. Chem. 85: 11083-11089.
20. Myung Soo Park, Kyoung Soo Jang, Yong Ho Choi, Jin-Cheol Kim, and Gyung Ja

- Choi. 2013. Simple mass-screening methods for resistance of tomato to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 31: 110-116.
21. Sun-Ah Shim, Kyoung Soo Jang, Yong Ho Choi, Jin-Cheol Kim, Heung Tae Kim and Gyung Ja Choi. 2013. Resistance degree of cucurbits cultivars to *Colletotrichum orbiculare*. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 31: 371-379.
 22. 심선아, 김진철, 장경수, 최용호, 김흥태, 최경자. 2013. Role of a phytotoxin produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* on pathogenesis of and resistance to the fungus. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 31: 626-632.
 23. 이지현, 박명수, 김진철, 장경수, 최용호, 김흥태, 최경자. 2013. Occurrence of leaf mold pathogen *Fulvia fulva* isolates infecting tomato Cf-9 cultivars in Korea). Kor. J. Hort. Sci. Technol. 31: 740-747.
 24. Sung Min Hwang, Dae Won Kim, Min Seok Woo, Hyeong Seop Jeong, Young Sim Son, Salina Akhter, Gyung Ja Choi and Jeong Dong Bahk. 2013. Functional characterization of *Arabidopsis* HsfA6a as a heat-shock transcription factor under high salinity and dehydration conditions. Plant, Cell and Environment doi: 10.1111/pce.12228
 25. Mei-Ai Zhao, 안송지, 이석찬, 김도선, 강병철. 2013. Overexpression of single-chain variable fragment (scFv) antibody confers unstable resistance to TuMV in Chinese cabbage. Plant Mol. Biol. Rep. DOI 10.1007/s11105-013-0577-0.
 26. 황지나, 오창식, 강병철. 2013. Translation elongation factor 1B (eEF1B) is an essential host factor for Tobacco mosaic virus infection in plants. Virology 439: 105 - 14.
 27. 자오푸메이, 임승모, 유란희, 임현섭, 권석훈, 문제선, 이수현. 2013. Complete genome sequence of a South Korea isolate *Brugmansia mosaic virus*. Arch. Virol. 158: 2019-2022.
 28. 김진희, 강원희, 양희범, 박수형, 유희주, 강병철. 2013. Identification of a broad-spectrum recessive gene in *Brassica rapa* and molecular analysis of the eIF4E gene family to develop molecular markers. Molecular Breeding doi:10.1007/s11032-013-9878-0.
 29. Ngoc Huy Hoang, Hee-Bum Yang, Byoung-Cheorl Kang. 2013. Identification and inheritance of a new source of resistance against Tomato spotted wilt virus (TSWV) in Capsicum. Scientia Horticulturae 161: 8 - 4.
 30. 신지은, 서생균, 김준영, 우제현, 김한길, 박용주, 홍세진, 김병섭. 2013. Enzyme-linked immunosorbent assay를 이용한 CMV-P1 저항성 고추 유전자원 평가. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 31:764-771.
 31. Younghoon Park, Jihyun Hwang, Kwanghwan Kim, Jumsoon Kang, Byungsup Kim, Shengjun Xu, and YulKyun Ahn. 2013. Development of the gene-based SCARs for the Ph-3 locus, which confers late blight resistance in tomato. Scientia Horticulturae 164: 9-16.
 32. Hae Young Um, Hyun Gi Kong, Hyoung Ju Lee, Hye Kyung Choi, Eun Jin Park, Sun Tae Kim, Senthilkumar Murugiyar, Eunsook Chung, Kyu Young Kang and Seon-Woo Lee. 2013. Altered gene expression and intracellular changes of the viable but nonculturable state in *Ralstonia solanacearum* by copper treatment. Plant Pathology J.

29: 374-385.

33. Vu, T. T., Kim, J.-C., Choi, Y. H., Choi, G. J., Jang, K. S., Choi, T. H., Yoon, T. M., and Lee, S.-W. 2013. Effect of gallotannins derived from *Sedum takesimensense* on tomato bacterial wilt. *Plant Dis.* 97: 1593-1598.
34. Moon Nam, Joo-Hee Lee, Hong Soo Choi, Hyoun-Sub Lim, Jae Sun Moon, and Su-Heon Lee. 2013. Complete genome sequence of keunjorong mosaic virus, a potyvirus from *Cynanchum wilfordii*. *Arch. Virol.* 158: 1817-1820.
35. 조수정, 심선아, 장경수, 최용호, 김진철, 최경자. 2014. *Phytophthora capsici* 균주들에 대한 고추 품종들의 저항성. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 32: 66-76.
36. 신성철, 김가희 양희범, 박관우, 강병철, 박현규. 2014. Application of the ASLP technology to a novel platform for rapid and noise-free multiplexed SNP genotyping. *Biosensors and Bioelectronics* 54: 687-694.
37. 황성민, 박명수, 김진철, 장경수, 최용호, 최경자. 2014. 뿌리혹선충 저항성 토마토를 감염하는 *Meloidogyne incognita*의 발생 및 이 선충을 이용한 효율적인 저항성 검정법 확립. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 32: 217-226.
38. Park, D.H., Y. Zkang, and B.S. Kim. 2014. Improvement of resistance to late blight in hybrid tomato plants. *Hort. Environ. Biotechnol.* 55: 120-124.
39. Seungmo Lim, Fumei Zhao, Ran Hee Yoo, Davaajargal Igori, Su-Heon Lee, Hyoun-Sub Lim, and Jae Sun Moon. Complete genome sequence Lettuce mosaic virus isolate infecting lettuce in Korea. *Plant Pathology J.* (in press)
40. 김진희, 강원희, 황지나, 양희범, 김도선, 오창식, 강병철. Transgenic *Brassica rapa* plants overexpressing eIF(iso)4E 1 variants show broad-spectrum TuMV resistance. *Molecular Plant Path.* (accepted)
- 41*. Hokyoung Son, Young-Su Seo, Kyunghun Min, Ae Ran Park, Jungkwan Lee, Jian-Ming Jin, Yang Lin, Peijian Cao, Sae-Yeon Hong, Eun-Kyung Kim, Seung-Ho Lee, Aram Cho, Seunghoon Lee, Myung-Gu Kim, Yongsoo Kim, Jung-Eun Kim, Jin-Cheol Kim, Gyung Ja Choi, Sung-Hwan Yun, Jae Yun Lim, Minkyun Kim, Yong-Hwan Lee, Yang-Do Choi, and Yin-Won Lee. 2011. A phenome-based functional analysis of transcription factors in the cereal head fungus, *Fusarium graminearum*. *PLoS Pathogens* 7(10): e1002310.
- 42*. Yang Lin, Hokyoung Son, Jungkwan Lee, Kyunghun Min, Gyung Ja Choi, Jin-Cheol Kim, and Yin-Won Lee. 2012. A putative transcription factor MYT1 is required for female fertility in the Ascomycete *Gibberella zeae*. *PLoS ONE* 6(10): e25586.
- 43*. 박애란, 조아람, 서정아, 민경훈, 손호경, 이정관, 최경자, 김진철, 이인원. 2012. Functional analyses of regulators of G protein signaling in *Gibberella zeae*. *Fungal Genet. Biol.* 49: 511-520.
- 44*. 민경훈, 신용인, 손호경, 이정관, 김진철, 최경자, 이인원. 2012. Functional analyses of the nitrogen regulatory gene *areA* in *Gibberella zeae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 334: 66-73.
- 45*. 손호경, 민경훈, 이정관, 최경자, 김진철, 이인원. 2012. Mitochondrial carnitine-dependent acetyl-coenzyme A transport is required for normal sexual and asexual development of

the ascomycete *Gibberella zeae*. Eukaryotic Cell 11: 1143-1152.

- 46*. 민경훈, 손호경, 이정관, 최경자, 김진철, 이인원. 2012. Peroxisome function is required for virulence and survival of *Fusarium graminearum*. Mol. Plant-Microbe Interact. 25: 1617-1627.
- 47*. Hokyong Son, Myung-Gu Kim, Kyunghun Min, Young-Su S대, Jae Yun Lim, Gyung Ja Choi, Jin-Cheol Kim, Suhn-Kee Chae and Yin-Won Lee. 2013. AbaA regulates conidiogenesis in the ascomycete fungus *Fusarium graminearum*. PLoS ONE 8:9 e72915.
- 48*. Sang-Keun Oh, Joonseon Yoon, Gyung Ja Choi, Hyun A Jang, Suk-Yoon Kwon and Doil Choi. 2013. *Capsicum annuum* homeobox 1 (CaHB1) is a nuclear factor that has roles in plant development, salt tolerance, and pathogen defense. Biochemical and Biophysical Research Communications 442: 116-121.
- 49*. Hokyong Son, Myung-Gu Kim, Kyunghun Min, Jae Yun Lim, Gyung Ja Choi, Jin-Cheol Kim, Suhn-Kee Chae, and Yin-Won Lee. 2014. *WetA* is required for conidiogenesis and conidium maturation in the Ascomycete fungus *Fusarium graminearum*. Eukaryotic Cell 13: 87-98.
- 50*. Junghoon Yu, Hokyong Son, Ae Ran Park, Seung-Ho Lee, Gyung Ja Choi, Jin-Cheol Kim and Yin-Won Lee. 2014. Functional characterization of sucrose non-fermenting 1 protein kinase complex genes in the Ascomycete *Fusarium graminearum*. Curr. Genet. 60: 35-47.
- 51*. Kyunghun Min, Hokyong Son, Jae Yun Lim, Gyung Ja Choi, Jin-Cheol Kim, Steven D. Harris and Yin-Won Lee. 2014. Transcription factor RFX1 is crucial for maintenance of genome integrity in *Fusarium graminearum*. Eukaryotic Cell 13: 427-436.

비SCI 14편

1. 백송이, 김진철, 장경수, 최용호, 최경자. 2010. 효율적인 무 시들음병 저항성 검정법 개발 및 무 품종들의 병 저항성 평가. 식물병연구 16: 148-152.
2. 조수정, 장경수, 최용호, 김진철, 최경자. 2010. 관주 접종법을 이용한 효율적인 배추 뿌리혹병 저항성 검정법. 식물병연구 16: 279-284.
3. 윤철수, 정은경, 이상준, 장 연, 이재은, 김병섭. 2010. 고랭지 배추재배를 위한 뿌리혹병 저항성 품종선발. 식물병연구 16: 59-65.
4. 안송지, 권진경, 양희범, 최혜정, 정희진, 김용재, 최경자, 강병철. 2010. 멜론 및 참외 순도 검정을 위한 SNP 마커 개발 및 F1 종자 순도 검정. 한국육종학회지 42: 397-406.
5. 백송이, 김진철, 장경수, 최용호, 최경자. 2011. 양배추 시들음병에 대한 효율적인 저항성 검정법 개발. 식물병연구 17: 13-18.
6. 조수정, 장경수, 최용호, 김진철, 최경자. 2011. 효율적인 무 뿌리혹병 저항성 검정법 확립. 식물병연구 17: 161-168.
7. 이형주, 조은정, 김남희, 채영, 이선우. 2011. 한국에서 분리된 *Ralstonia solanacearum*에 대한 순계 토마토의 병 반응과 고온에서의 발병. 식물병연구 17: 326-333.

8. 김성현, 신지은, 이경준, 서생군, 김병섭. 2012. 박과작물 주요 품종의 흰가루병 및 뿌리혹선충 저항성 평가. 식물병연구 18: 29-34.
9. 김병섭. 2012. 잎마름역병 저항성 육종을 위한 토마토 유전자원의 저항성 평가. 식물병연구 18: 35-39.
10. 조수정, 심선아, 김진철, 장경수, 최용호, 최경자. 2012. 양배추 및 브로콜리 뿌리혹병에 대한 효율적인 저항성 검정 방법 확립. 식물병연구. 18: 86-92.
11. 이지현, 김진철, 장경수, 최용호, 안경구, 최경자. 2013. 양배추 검은썩음병에 대한 효율적인 저항성 검정법. 식물병연구 19: 95-101.
12. 신지은, 이영규, 김병섭. 2013. 강원도 마늘 주산지 재배마늘의 바이러스 감염 실태. 식물병연구 19: 233-236.
13. Haeyoung Jeong, Seunghoon Lee, Gyung Ja Choi, Theresa Lee, and Sung-Hwan Yun. 2013. Draft genome sequence of *Fusarium fujikuroi* B14, the causal agent of the bakanae disease of rice. GenomeA e00035-13.
14. Li Liu, Yeong Deuk Jo, Won-Hee Kang, Dosun Kim, and Byoung-Cheorl Kang. 2013. Mitochondrial-targeted expression of orf456 causes male sterility in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.). Plant Breed. Biotech. 1: 196-204.

제 3절. 학회발표

국외발표 17편

1. Hee-Bum Yang, Won-Hee Kang, and Byoung-Cheorl Kang. Development of molecular markers linked to the L locus with high specificity only to the *L4* allele in pepper. SOL2010 the 7th Solanaceae Conference september 5-9: 170 (영국 Dundee)
2. Sungwoo Park, Jin-Kee Jung, Byoung-Cheorl Kang. Development of SNP markers using HRM analysis and construction of inter-specific linkage map in Capsicum. Solanaceae Genome Workshop. 인도 뉴델리. 2009년 11월 8일-13일.
3. Won-Hee Kang, Hoang Ngoc Hhuy, Hee-Bum Yang, Jin-Kyung Kwon, Sung-Hwan Jo, Doil Choi, Byung-Cheorl Kang. A single dominant gene controls CMV resistance in pepper (*Capsicum annuum* L). Solanaceae Genome Workshop. 인도 뉴델리. 2009년 11월 8일-13일.
4. Hye-Kyung Choi, Eun Jin Park, Ju Young Bae, Hyoung Ju Lee, Eun Jeong Jo, Hae Young Um, Hyun Gi Kong, and Seon Woo Lee. Sigma S regulator for bacterial virulence and survival in *Ralstonia solanacearum*. (International conference on Arabidopsis research: 일본 요코하마),
5. Seon-In Yeom, Hyang-Ku Baek, Sang-Keun Oh, Won-Hee Kang, Sang-Jik Lee, Eunyong Seo, Jocelyn K.C Rose, Byung-Dong Kim*, and Doil Choi* (2010). Yeast secretion trap in pepper following *Phytophthora capsici* infection identify novel function of plant secreted proteins. (SOL 2010, Dundee.)
6. Seon-In Yeom and Doil Choi. (2010) A pepper hybrid proline-rich protein 1 (HyPRP1) is a negative regulator in defense response against pathogens but a positive regulator

in cell death. The 7th Solanaceae Conference. Dundee.

7. Seon-in Yeom, Hyang-ku Baek, Sang-keun Oh, Won-hee Kang, Sang Jik Lee, Eunyong Seo, Jocelyn K.C Rose, Byung-dong Kim and Doil Choi (2010) Identification of novel secreted proteins using yeast secretion trap in pepper following *Phytophthora capsici* infection. The 7th Solanaceae Conference. Dundee
8. Saet-Byul Kim, Sang-Keun Oh, Hyun-Ah Lee, Sophien Kamoun, Doil Choi. Studies on nonhost interaction between *Phytophthora avrib* and chili pepper Canhr3a in *Nicotiana benthamiana*. 8th Solanaceae and 2nd Cucurbitaceae Genome Joint Conference (SOL & ICuGI 2011), Japan, 2011. 11.28-12.02.
9. Seon-Woo Lee, Eun-Jeong Jo, Hye Kyung Choi, Eun Jin Park, Hyun Gi Kong, and Byung Rae Jin. 2011. Sigma S of *Ralstonia solanacearum* regulates gene expression for bacterial viability and catabolic capacity in a nutrient limited condition. (International Union of Microbiological Society : IUMS2011 Sapporo:일본 사포르) 2011. 9. 6-10.
10. Byoung-Cheorl Kang, Hee-Bum Yang, Haejung Choi, Identification and validation of SNP markers linked to major QTLs for resistance to *Phytophthora capsici* in pepper. 8th Solanaceae and 2nd Cucurbitaceae Genome Joint Conference. 2011.11.28. - 2011.12.02.
11. Won-Hee Kang, Jang-Kyun Seo, Bong Nam Chung, Kook-Hyung Kim, and Byoung-Cheorl Kang. Helicase domain of the *Cucumber mosaic virus* RNA1 is essential for systemic infection of Cmr1 in peppers. 8th Solanaceae and 2nd Cucurbitaceae Genome Joint Conference. 2011.11.28. - 2011.12.02.
12. Sujeong Shin, Byoung Yeon Won, Cheulhee Jung, Sung Chul Shin, Dae Yeon Cho, Soo Suk Lee and Hyun Gyu Park, "Electrochemical detection of DNA mutations on a PNA-modified electrode utilizing single-stranded DNA specific endonuclease", Asian Congress on Biotechnology, Everbright Convention & Exhibition Center, May 11-15, Shanghai, China (2011)
13. Sung Chul Shin, Gahee Kim, Hee-Bum Yang, Byoung-Cheorl Kang and Hyun Gyu Park, "A novel method for multiplexed SNPs genotyping on DNA microarray", The 7th International Conference on Instrumental Methods of Analysis Modern Trends and Applications, Sept. 18-22, Chania Crete, Greece (2011)
14. Hyoung Ju Lee, Byung Kwon Kim, Myung Hwan Lee, Hyun Gi Kong, Eun Joo Jung, Hae Jin Joo, Jihyun Kim, Seon-Woo Lee. 2012. Rhizosphere bacterial communities of bacterial wilt resistant or susceptible tomato cultivars and a non-host baechu cultivar. (ISME 14 International Society for Microbial Ecology: 덴마크 코펜하겐) 2012. 08. 19-24.
15. Su-Jung Jo, Kyoung Soo Jang, Yong Ho Choi, Jin-Cheol Kim and Gyung Ja Choi. Resistance of chili pepper cultivars to *Phytophthora capsici* isolates at various plant growth stages and inoculum concentrations. 한국식물병리학회 한일공동심포지움 2012. 03. 27-29. (일본 후쿠오카)
16. Jung Hun Park, Ye Lim Jung, Yun Kyung Jung, Cheulhee Jung, Hyun Gyu Park. Mass spectrometry based multiplex BRCA gene mutations genotyping. 2012. the 22nd IUBMB and 38th FEBS Congress, 2012. 09. 04. - 2012. 09. 09.

17. Jung EJ, Lee HJ, Joo HJ, Lee SW. Isolation of *Flavobacterium* from rhizospheres of resistant or susceptible plants against bacterial wilt. (ICPP, 중국 북경, 2013년 8월 25-30)

국내발표 61편

1. 최경자 등. 내병성 작물육종을 위한 병리검정 지원 사업단 소개. 육종학회, 2009년 7월 1-3일.
2. Jo, S.-J., Kim, J.-C., Jang, K. S., Choi, Y. H. and Choi, G. J. Differential interactions of *Phytophthora capsici* JHAI1-7 with hot pepper cultivars at various plant growth stages and inoculum concentrations. 한국식물병리학회, 2009년 10월 28-31일.
3. Choi, H. K., Park, E. J., Um, H. Y., Murugaiyan, S., Moon, B. J. and Lee, S-W. The *rpoS* gene of *Ralstonia solanacearum* involved in long-term survival. 한국미생물학회, 2009년 5월 28-30일.
4. Um, H. Y., Lee, B. C., Choi, H. K., Murugaiyan, S., Moon, B. J. and Lee, S-W. Introduction of viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* by copper treatment and extracellular material production. 한국미생물학회, 2009년 5월 28-30일.
5. Um, H. Y., Choi, H. K., Moon, B. J. and Lee S-W. A chromosomal locus involved in extracellular polysaccharide production in *Ralstonia solanacearum* SL341. 한국식물병리학회, 2009년 10월 28-31일.
6. Bae, J. Y., Murugaiyan, S., Lee, S D., Wu, J., Kim, N. H., and Lee S-W. A filamentous bacteriophage with single stand DNA infecting *Ralstonia solanacearum* strains. 한국식물병리학회, 2009년 10월 28-31일.
7. Cheol Soo Yoon, Eun Kyung Jung, Lee Sang Jun, Zhang Yan, Jae Eun Lee and Byung Sup Kim. Resistant Cultivar screening to clubroot (*Plasmaodiophora brassicae*) for cultivation of Chinese cabbage in Gangwon alpine area. 한국식물병리학회, 2009년 10월 28-31일.
8. Seo et al. Isolation and characterization of a novel pathogen-responsive secreted protein (CaSD1) from pepper. 한국식물병리학회, 2009년 10월 28-31일.
9. Kim et al. Functional profiling of Phytophthora RXLR effectors in chili pepper and *Nicotiana benthamiana* plants. 식물과학협의회, 2009년 10월 26-27일.
10. 최경자, 이선우, 문제선, 김병섭, 최도일, 강병철, 허진희. 내병성 작물육종을 위한 채소병리검정지원사업단. 한국원예학회 2010. 5. 28-29. (경희대학교 국제캠퍼스, 원예과학기술지. 2010. 별호 I).
11. Su-jung Jo, Kyoung Soo Jang, Yong Ho Choi, Jin-Cheol Kim and Gyung Ja Choi. Race of *Plasmodiophora brassicae* field isolates, Chinese cabbage clubroot pathogen, in Korea and resistance of 26 CR F₁ cultivars to the pathogen. 한국식물병리학회 2010. 4. 22-23. (동아대학교).
12. Song-yi Baik, Kyoung Soo Jang, Jin-Cheol Kim, Yong Ho Choi and Gyung Ja Choi. Establishment of screening system for resistant radish to *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*. 한국식물병리학회 2010. 4. 22-23. (동아대학교).

13. Song-yi Baik, Jin-Cheol Kim, Kyoung Soo Jang, Yong Ho Choi and Gyung Ja Choi. Efficient method and evaluation of radish cultivars for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*. 한국육종학회 2010. 7.8-9. (충남대학교).
14. Su-jung Jo, Kyoung Soo Jang, Young Ho Choi, Jin-Cheol Kim and Gyung Ja Choi. Convenient screening method of Chinese cabbage for resistance to *Plasmodiophora brassicae* using soil-drenching inoculation. 한국육종학회 2010. 7.8-9. (충남대학교).
15. Song-Yi Baik, Kyoung Soo Jang, Jin-Cheol Kim, Yong Ho Choi and Gyung Ja Choi. Development of efficient screening method for resistant cabbage to *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*. 한국식물병리학회 2010. 10. 28-29. (전북대학교).
16. Hee-Bum Yang, Won-Hee Kang, and Byoung-Cheorl Kang. Development of SNP markers linked to the *L* locus with high specificity only to the *L*⁴ allele in *Capsicum* 양희범, 강원희, 강병철 2010 한국육종학회지 42권 1호: 85(충남대학교)
17. Hyoung Ju Lee, Eun Jeong Jo, Nam Hee Kim, Hae Young Um, Ju Young Bae and Seon Woo Lee. Disease response of tomato and pepper pure lines to Korean isolates of *Ralstonia solanacearum*. (한국식물병리학회 춘계학술발표회)
18. Eun Jeong Jo, Hye Kyung Choi, Eun Jin Park, Sum Tae Kim, Kyu Young Kang, and Seon Woo Lee. Regulation of bacterial viability by Sigma S in *Ralstonia solanacearum*. (한국식물병리학회 추계학술발표회)
19. Hyoung Ju Lee, Nam Hee Kim, Eun Jeong Jo, Ju Young Bae, and Seon Woo Lee. Comparison of virulence between *Ralstonia solanacearum* SL341 and SL2268 on tomato and pepper pure lines. (한국식물병리학회 추계학술발표회)
20. Eunyoung Seo, Seon-In Yeom and Doil Choi (2010). Characterization of a novel pathogen-responsive secreted protein (CaSD1) from pepper. The 22nd Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology, Seoul.
21. Seon-In Yeom, Hyang-Ku Baek, Won-Hee Kang, Sang-Keun Oh, Sang Jik Lee, Jocelyn K.C Rose, Byung-Dong Kim, and Doil Choi (2010). *Capsicum annuum* Secretoms identify defense responses to pathogen infection. Crop Functional Genomics 2010. Jeju, Korea.
22. Saet-Byul Kim, Sang-Keun Oh, Hyun-Ah Lee, Sophien Kamoun, Doil Choi (2010). Studies on nonhost interaction between *Phytophthora sojae* and chili pepper in *Nicotiana benthamiana*. The 22nd Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology, Seoul.
23. Cheol Soo Yoon, Sang Jun Lee, Zhang Yan, Jae Eun Lee, Soon-Bae Kwon and Byung Sup Kim. Resistant Cultivar screening of broccoli disease for cultivation. 한국식물병리학회 임시총회 및 춘계학술발표회, 2010년 4월 22-24일.
24. Su-Jung Jo, Jin-Cheol Kim, Kyoung Soo Jang, Young Ho Choi and Gyung Ja Choi. Convenient screening method for resistant radish to *Plasmodiophora brassicae* using soil-drenching inoculation. 한국식물병리학회 2011. 4. 22.
25. 조수정, 장경수, 최용호, 김진철, 최경자. 생육 시기, 접종원 농도 및 균주에 따른 고추 품종들의 역병 저항성. 고추연구회 국제심포지움. 2011. 9. 22-23.

26. Su-Jung Jo, Sun-Ah Shim, Kyoung Soo Jang, Yong Ho Choi, Jin-Cheol Kim and Gyung Ja Choi. Resistance of cultivars of Chinese cabbage to *Plasmodiophora brassicae* isolates of several races collected in Korea. 한국식물병리학회 2011 KSPP International Symposium, 2011. 10. 25-26.
27. Myung Soo Park, Boram Jeong, Kyoung Soo Jang, Yong Ho Choi, Jin-Cheol Kim and Gyung Ja Choi. Development of efficient screening methods for resistance of tomato to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. 한국식물병리학회 2011 KSPP International Symposium, 2011. 10. 25-26.
28. 김병섭. 2011. 고추 역병균의 분류학적 위치 및 병원성. 한국고추연구회 제 20주년 국제 심포지움, 2011. 9. 22-23.
29. Sung-Heun Kim, Ji-Eun Shin, Sheng-Jun Xu, Kyung-Jun Lee, Jun-Young Kim and Byung Sup Kim. Evaluation of disease resistance of cucurbits to powdery mildew and root-knot nematode. 한국식물병리학회 2011 KSPP International Symposium, 2011. 10. 25-26.
30. 권현욱, 김주형, 김아형, 박세정, 김가혜, 최영기, 이호택, 김홍태. The effect of cultivar and leaf stage of tomato and the inoculum density of *Fulvia fulva* on the disease severity of tomato leaf mold. 한국식물병리학회 2011 KSPP International Symposium, 2011. 10. 25-26.
31. Hyung Ju Lee, Eun Jeong Jo, Jing Wu, and Seon-Woo Lee. 2011. Isolation and characterization of an avirulent mutant of *Ralstonia solanacearum*. 한국식물병리학회. 2011. 4. 22.
32. Eun Jeong Jo, Hye Kyung Choi, Eun Jin Park, Byung Rae Jin, and Seon-Woo Lee. 2011. Sigma S as a regulator for bacterial viability in *Ralstonia solanacearum*. 한국식물병리학회 2011. 4. 22.
33. Hyun Gi Kong, Ju Young Bae, Eun Jeong Jo, and Seon Woo Lee. 2011. Development of artificial soil microcosm to investigate long-term survival of *Ralstonia solanacearum*. 한국식물병리학회 2011. 4. 22.
34. Eun Jeong Jo, Hye Kyung Choi, Eun Jin Park, Hyun Gi Kong, and Seon-Woo Lee. 2011. Regulation of organic acid production and carbon source utilization in *Ralstonia solanacearum* by sigma S in a nutrient limited condition. 2011. KSPP International Symposium, 2011. 10. 25-26.
35. Ngoc Huy Hoang, Hee-Bum Yang, Bong Nam Chung, and Byoung-Cheorl Kang. Molecular mapping of the *Tsw* locus for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in Capsicum. 고추연구회. 2011.09.22. - 2011.09.23.
36. Hee-Bum Yang, Won-Hee Kang, HwaJin Jo, Jae-Hyung Yoo, Nanne Faber, and Byoung Cheorl Kang. Development of allele-specific markers for the L locus conferring TMV resistance. 식물생명공학회. 2011.04.28. - 2011.04.29.
37. Gahee Kim, Sung Chul Shin, Yun Kyung Jung, and Hyun Gyu Park, "Microarray-based SNP Detection using RecA Protein", The 5th International Conference on Sensors (ASIASENSE 2011), Oct. 23-26, The Shilla Jeju, Jeju, Korea (2011)

38. Sun-Ah Shim, Kyoung Soo Jang, Yong Ho Choi, Jin-Cheol Kim and Gyung Ja Choi. Resistance degree of cucurbits cultivars to *Colletotrichum orbiculare*. 한국식물병리학회 50주년 국제심포지움 2012. 10. 24-26. (서울, 서울대학교)
39. Myung Soo Park, Kyoung Soo Jang, Yong Ho Choi, Jin-Cheol Kim and Gyung Ja Choi. Simple mass-screening methods for resistance of tomato to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Iycopersici*. 한국식물병리학회 50주년 국제심포지움 2012. 10. 24-26. (서울, 서울대학교)
40. Ji Hyun Lee, Myung Soo Park, Kyoung Soo Jang, Yong Ho Choi, Jin-Cheol Kim and Gyung Ja Choi. Occurrence of leaf mold pathogen *Fulvia fulva* strains infecting tomato Cf-9 cultivars in Korea. 한국식물병리학회 50주년 국제심포지움 2012. 10. 24-26. (서울, 서울대학교)
41. Ji-Eun Shin, Sheng-Jun Xu, Kyung-Jun Lee, Sung-Heun Kim, Jun-Young Kim, Jae-Hyoun Woo, Han-Gil Kim and Byung-Sup Kim. CMV1 Resistance evaluation using ELISA of pepper genetic sources (*Capsicum spp.*). 한국식물병리학회 2012 KSPP International Conference, 2012년 10월 24-27일.
42. Ji-Eun Shin, Yeong-Gyu Lee, Sheng-Jun Xu, Kyung-Jun Lee, Sung-Heun Kim, Jun-Young Kim, Jae-Hyoun Woo, Han-Gil Kim and Byung-Sup Kim. Degree of viral infection of main garlic growing areas of Gangwon province in Korea. 한국식물병리학회 2012 KSPP International Conference, 2012년 10월 24-27일.
43. Hyoung Ju Lee, Jing Wu, Myung Hwan Lee, Eun Joo Jung, and Seon-Woo Lee. 2012. Isolation and characterization of *Ralstonia solanacearum* mutant with reduced exopolysaccharide production. (한국미생물생명공학회: 부산 벅스코). 2012. 06. 27-29.
44. Hyoung Ju Lee, Byung Kwon Kim, Myung Hwan Lee, Hyun Gi Kong, Eun Joo Jung, Hae Jin Joo, Jihyun Kim, Seon-Woo Lee. 2012. Bacterial communities and diversities of rhizospheres of resistant or susceptible plants against bacterial wilt (한국미생물연합회: 서울) 2012. 10. 10-12.
45. Eun Joo Jung, Hae Jin Joo, Hyoung Ju Lee and Seon Woo Lee. 2012. Isolation and pathogenicity analysis of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* causing bacterial fruit blotch on watermelon. (한국식물병리학회 추계). 2012. 10. 24-27.
46. Hyun Gi Kong, Hae Jin Joo, Ju Young Bae, Eun Jeong Jo and Seon-Woo Lee. 2012. Survival of *Ralstonia solanacearum* at low temperature in artificial soil microcosm. (한국식물병리학회 추계). 2012. 10. 24-27.
47. Byoung-Cheorl Kang, Ngoc Huy Hoang, Hee-Bum Yang, Bong Nam Chung. Molecular mapping of the *Tsw* locus for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in *Capsicum*. 2012. 한국육종학회 · 식물분자유종사업단 공동 국제심포지움. 2012.07.05. - 2012.07.06.
48. Ngoc Huy Hoang, Hee-Bum Yang, Bong Nam Chung, Byoung-Cheorl Kang. Molecular mapping of the *Tsw* locus for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in *Capsicum*. 2012. 원예과학기술지 2012년 정기총회 및 제96차 춘계학술발표회. 2012.05.17. - 2012.05.19.
49. Jung Hun Park, Ye Lim Jung, Chuelhee Jung and Hyun Gyu Park. 2012. Multiplex

genotyping of BRCA gene mutation utilizing ligase chain reaction and nicking amplification by mass spectrometry. Korean Institute of Chemical Engineering (KIChE) spring meeting. 2012.04.25. - 2012.04.27.

50. Ji Hyun Lee, Jin-Cheol Kim, Kyoung Soo Jang, Yong Ho Choi, Kyoung Gu, and Gyung Ja Choi. Development of efficient screening method for resistance of cabbage cultivars to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. 한국식물병리학회 춘계학술발표회 2013. 4. 25-46(대전, 충남대학교)
51. Sung Min Hwang, Kyoung Soo Jang, Yong Ho Choi, Jin-Cheol Kim, and Gyung Ja Choi. Development of efficient screening methods for resistance of tomato cultivars to *Meloidogyne incognita*. 한국식물병리학회 춘계학술발표회 2013. 4. 25-46(대전, 충남대학교)
52. Yeon Lee, Sun Tae Kim, Jun Ho Song, Gyung Ja Choi, and Jeong Mee Park. Comparative proteomic analysis in clubroot-susceptible and resistant cabbage inbred lines. 한국식물병리학회 춘계학술발표회 2013. 4. 25-46(대전, 충남대학교)
53. Sung Min Hwang, Kyoung Soo Jang, Yong Ho Choi, Jin-Cheol Kim, and Gyung Ja Choi. Development of efficient screening methods for resistance of cucumber cultivars to *Meloidogyne incognita*. 한국식물병리학회 추계학술발표회 2013. 10. 17-18(순천, 순천대학교).
54. Won Jeong Lee, Jin-Cheol Kim, Kyoung Soo Jang, Yong Ho Choi, Heung Tae Kim and Gyung Ja Choi. Evaluation of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* in cucurbits. 한국식물병리학회 추계학술발표회 2013. 10. 17-18(순천, 순천대학교).
55. Ji Hyun Lee, Jin-Cheol Kim, Kyoung Soo Jang, Yong Ho Choi, and Gyung Ja Choi. Powdery mildew resistance of cucurbits to *Podosphaera xanthii* race 1. 한국식물병리학회 추계학술발표회 2013. 10. 17-18(순천, 순천대학교).
56. Hee-Jin Jeong, Jin-Kyung Kwon, Jung Hwan Bae, Meiai Zhao, Young-HeeJoung, Hak-sun Choi, Doil Choi, and Byoung-Cheorl Kang. 2013. Tomato male sterile gene, ms1035 regulates tapetum development and meiosis 한국식물생명공학회, GMO의 현재와 미래 2013. 12. 5-6.
57. Kong HG, Joo HJ, Bae JY, Jung EJ, Lee SW. Viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* in soil microcosm. (한국식물병리학회 춘계학술발표회, 대전, 2013년 4월 25-26)
58. Jung EJ, Lee HJ, Choi SY, Lee SY, Lee SW. Isolation of *Flavobacterium* spp. for potential biocontrol application. (한국미생물생명공학회, 평창, 2013년 7월 3-5일)
59. Lee MH, Tao W, Kim NH, Hwang EC, Lee JW, Lee SW. Soil metagenome-derived 3-hydroxypalmitic acid methyl ester (3-OH PAME) hydrolases reduce the exopolysaccharide production in *Ralstonia solanacearum*. (한국식물병리학회 추계학술발표회, 순천, 2013년 10월16-19)
60. Kong HG, Lee HJ, Wu J, Lee MH, Jung EJ, Lee SW. The multiple roles of glutamate dehydrogenase in *Ralstonia solanacearum*. (한국식물병리학회 추계학술발표회, 순천, 2013년 10월16-19)

61. Sheng-Jun Xu, Joon-Young Kim, Je-Hyeon Woo, Md. Aktaruzzaman, Byung-Sup Kim.
 First report of anthracnose of eggplant caused by *Colletotrichum acutatum* in Korea.
 2013 KSPP international Conference, 2013년 10월 13일.

제 4절. 특허

국내출원 32건, 국외출원 2건, 국내등록 4건

번호	산업 재산 권	출원 /등록	특허/출원명	등록/출원 번호	등록 /출원일자
1	특허	출원	PMMoV 저항성 고추 품종을 선발하기 위한 프라이머 세트, 방법 및 키트	10-2010-0048368	2010.05.25
2	특허	출원	SDL-PCR을 이용한 유전자 분석방법	10-2011-0019225	2011.03.04
3	특허	출원	PMMoV 저항성 고추 품종을 선발하기 위한 프라이머 세트, 방법 및 키트	10-2011-0049506	2011.05.25
4	특허	출원	고추 유래의 C a S D1 유전자 및 이의 용도	10-2011-0113279	2011.11.02
5	특허	출원	식물 바이러스를 진단 또는 검출하기 위한 프로브 세트 및 이의 용도	10-2011-0117385	2011.11.11
6	특허	출원	포티바이러스 속 바이러스를 진단 또는 검출하기 위한 프로브 세트 및 이의 용도	10-2011-0117601	2011.11.11
7	특허	출원	토마모바이러스 속 바이러스를 진단 또는 검출하기 위한 프로브 세트 및 이의 용도	10-2011-0117607	2011.11.11
8	특허	출원	카모바이러스 속 바이러스를 진단 또는 검출하기 위한 프로브 세트 및 이의 용도	10-2011-0117611	2011.11.11
9	특허	출원	TBSV를 진단 또는 검출하기 위한 프로브 세트 및 이의 용도	10-2011-0117615	2011.11.11
10	특허	출원	TYMV를 진단 또는 검출하기 위한 프로브 세트 및 이의 용도	10-2011-0117621	2011.11.11
11	특허	출원	SqMV를 진단 또는 검출하기 위한 프로브 세트 및 이의 용도	10-2011-0117624	2011.11.11
12	특허	출원	CPSMV를 진단 또는 검출하기 위한 프로브 세트 및 이의 용도	10-2011-0117631	2011.11.11
13	특허	출원	PSTVd를 진단 또는 검출하기 위한 프로브 세트 및 이의 용도	10-2011-0117658	2011.11.11
14	특허	출원	SBMV를 진단 또는 검출하기 위한 프로브 세트 및 이의 용도	10-2011-0117660	2011.11.11
15	특허	출원	AMV를 진단 또는 검출하기 위한 프로브 세트 및 이의 용도	10-2011-0117664	2011.11.11
16	특허	출원	ArMV를 진단 또는 검출하기 위한 프로브 세트 및 이의 용도	10-2011-0117668	2011.11.11

17	특허	출원	TRSV를 진단 또는 검출하기 위한 프로브 세트 및 이의 용도	10-2011-0117750	2011.11.11
18	특허	출원	BWV 2를 진단 또는 검출하기 위한 프로브 세트 및 이의 용도	10-2011-0117752	2011.11.11
19	특허	출원	CCMV를 진단 또는 검출하기 위한 프로브 세트 및 이의 용도	10-2011-0117758	2011.11.11
20	특허	출원	PSV를 진단 또는 검출하기 위한 프로브 세트 및 이의 용도	10-2011-0117760	2011.11.11
21	특허	출원	CMV를 진단 또는 검출하기 위한 프로브 세트 및 이의 용도	10-2011-0117763	2011.11.11
22	특허	출원	CPMMV를 진단 또는 검출하기 위한 프로브 세트 및 이의 용도	10-2011-0117784	2011.11.11
23	특허	출원	CVX를 진단 또는 검출하기 위한 프로브 세트 및 이의 용도	10-2011-0117788	2011.11.11
24	특허	출원	LRSV를 진단 또는 검출하기 위한 프로브 세트 및 이의 용도	10-2011-0117789	2011.11.11
25	특허	출원	TRV를 진단 또는 검출하기 위한 프로브 세트 및 이의 용도	10-2011-0117790	2011.11.11
26	특허	출원	TSWV를 진단 또는 검출하기 위한 프로브 세트 및 이의 용도	10-2011-0117791	2011.11.11
27	특허	출원	PLRV를 진단 또는 검출하기 위한 프로브 세트 및 이의 용도	10-2011-0117793	2011.11.11
28	특허	출원	RDV를 진단 또는 검출하기 위한 프로브 세트 및 이의 용도	10-2011-0117795	2011.11.11
29	특허	출원	콩에서 유용 유전자의 기능 분석을 위한 SYCMV 유래의 재조합 VIGS 벡터 및 이의 용도	10-2012-0037952	2012.04.12
30	특허	출원	역병 저항성 고추 품종을 선별하기 위한 특이 프라이머 및 이의 용도	10-2012-0074825	2012.07.10
31	특허	출원	TSWV 저항성 고추 품종을 선별하기 위한 프라이머 세트, 방법 및 키트	10-2012-0106892	2012.09.26
32	특허	출원	식물 바이러스 예방 또는 억제용 조성물 및 식물 바이러스 예방 또는 억제용 물질의 스크리닝 방법	10-2013-0120872	2013.10.10
33	특허	국외출원	Method for analyzing gene using SDL-PCR	PCT/KR2012/000695	2012.01.30
34	특허	국외출원	Gene analysis method using SDL-PCR.	US, 14/002662	2013.08.30
35	특허	등록	순무 모자이크 바이러스에 저항성인 배추 품종의 육종 방법 및 상기 방법에 의해 제조된 배추 품종	1011406180000	2012.04.20
36	특허	등록	PMMoV 저항성 고추 품종을 선별하기 위한 프라이머 세트, 방법 및 키트	10-1242426	2013.03.06
37	특허	등록	고추 유래의 CaSD1 유전자 및 이의 용도	10-1282409	2013.06.28

38	특허	등록	SDL-PCR을 이용한 유전자 분석방법	10-1322880	2013.10.29
----	----	----	-----------------------	------------	------------

제 5절. 실용화 · 산업화

기술이전 총 2건, 솔젠트㈜, 정액기술료 2,400만원

1. PMMoV 저항성 고추 품종을 선별하기 위한 프라이머 세트, 방법 및 키트
2. 역병 저항성 고추 품종을 선별하기 위한 특이 프라이머 및 이의 용도

제 6절. 품종 출원

감자 2품종(‘새알’, ‘오륜’) 출원, 등록 심사 중

출원인		발명실사관		발 명	실사관
품종보호출원서					
출원인	성명 (대표자)	강원도지사	생년월일 (외국인출국력)		
	주소	200-041 강원 춘천시 중앙로1가 강원도청	지 분	100	
	법인명칭	강원도	전화번호	033-242-8282	
대리인	성명 (대표자)		생년월일 (외국인출국력)		
	주소				
	법인명칭		전화번호		
출원자	성명 (대표자)	백민희 외 3명	생년월일 (외국인출국력)	1971년10월28일	
	주소	강원 강릉시 사천면 노봉리 488-2 차희마을시 별장	전화번호	033-610-8763	
	출원이 속하는 작물의 학명 및 일반명	감자 Solanum tuberosum L.	세부학명 (국립입력)		
품종의 명칭	새알 (Sana)				
국가산업법 제28조 제2항의 규정에 의한 출원인 구별	출원구별	출원일자	출원번호	출원서류 종류	비고
출원 의 의 상 설명	별첨				
출원유성사정의 설명	별첨				
국가산업법 제 28조 제1항 및 농업시행규칙 제28조의 규정에 의하여 허와 같이 출원합니다.					
2012년 12월 26일					
출원인(대리인) 강원도 (서명 또는 인)					
국립종자원장 귀하					
구비서류				수수료	
1. 품종보호출원서 1부				38,000원	
2. 출원통문의 사진 및 출원서류					
3. 품종보호출원 수수료 납부증명서 1부					
4. 우선권주장 수수료 납부증명서 1부 (우선권을 주장하는 경우에 한한다)					
5. 원리에 관한 기술을 증명하는 서류 1부 (지문이 약정되어 있는 경우에 한한다)					
6. 대리권을 증명하는 서류 1부 (대리인의 경우에 한한다)					

출원인		발명실사관		발 명	실사관
품종보호출원서					
출원인	성명 (대표자)	강원도지사	생년월일 (외국인출국력)		
	주소	200-041 강원 춘천시 중앙로1가 강원도청	지 분	100	
	법인명칭	강원도	전화번호	033-242-8282	
대리인	성명 (대표자)		생년월일 (외국인출국력)		
	주소				
	법인명칭		전화번호		
출원자	성명 (대표자)	백민희 외 3명	생년월일 (외국인출국력)	1971년10월28일	
	주소	강원 강릉시 사천면 노봉리 488-2 차희마을시 별장	전화번호	033-610-8763	
	출원이 속하는 작물의 학명 및 일반명	감자 Solanum tuberosum L.	세부학명 (국립입력)		
품종의 명칭	오륜 (Oran)				
국가산업법 제28조 제2항의 규정에 의한 출원인 구별	출원구별	출원일자	출원번호	출원서류 종류	비고
출원 의 의 상 설명	별첨				
출원유성사정의 설명	별첨				
국가산업법 제 28조 제1항 및 농업시행규칙 제28조의 규정에 의하여 허와 같이 출원합니다.					
2012년 12월 25일					
출원인(대리인) 강원도 (서명 또는 인)					
국립종자원장 귀하					
구비서류				수수료	
1. 품종보호출원서 1부				38,000원	
2. 출원통문의 사진 및 출원서류					
3. 품종보호출원 수수료 납부증명서 1부					
4. 우선권주장 수수료 납부증명서 1부 (우선권을 주장하는 경우에 한한다)					
5. 원리에 관한 기술을 증명하는 서류 1부 (지문이 약정되어 있는 경우에 한한다)					
6. 대리권을 증명하는 서류 1부 (대리인의 경우에 한한다)					

제 7절. 유전자원 기탁: 총 86종

가. 토마토 유전자원 기탁 11종(강릉원주대 김병섭)

국립농업과학원



국립농업과학원 농업유전자원센터



수신자 생명과학대학 식물생명과학과 김병섭 교수

(경유)

제목 토마토 유전자원 기탁내용 알림

1. 귀 기관의 무궁한 발전을 기원드리며, 식물생명과학과-6(2012.02.05.)호와 관련된 사항입니다.
2. 귀 기관에서 기탁한 병저항성 토마토 유전자원의 기탁내용을 아래와 같이 알려드리오니 업무에 참고하시기 바랍니다.

- 아 래 -

- 가. 기탁자명 : 병저항성 토마토 유전자원
- 나. 접수번호 : 0612042(2012.02.15)
- 다. 관리번호 : 토마토 기탁 11종(K157095 ~ K157095)
- 라. 관련과제 : 농림수산식품부 차소병저항성지질사업단 과제
- 마. 기탁자 : 강릉원주대학교 김병섭 교수

붙임. 기탁자명 상세정보(엑셀) 1부, 끝.

농업유전자원센터소장



농업유전자원센터 (2012. 02. 17.) 접수
 경기도 수원시 팔달구 서둔동 20-20 농업과학기술관 401호 / www.genbank.go.kr
 전화 031-299-1831 / 팩스 031-299-1893 / e-mail: rda.go.kr / 부보번호(8)

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	일시번호	학명	기탁종	재주종	지속종	본원유종	공개유종	원산지	자속주종	유형	주요기탁목적	기탁국	
2	1	K157093	Solanum lycopersicum var. lycopersi 토마토			KNU-4(11915)	본원가능	공개제한	USA	육성가능	이학	출가	25-07 KDR
3	2	K157094	Solanum lycopersicum var. lycopersi 토마토	탈출토마토		KNU-8	본원가능	공개제한	USA	육성가능	이학	출가	25-07 KDR
4	3	K157095	Solanum lycopersicum var. lycopersi 토마토	탈출토마토		KNU-9	본원가능	공개제한	USA	육성가능	이학	출가	25-07 KDR
5	4	K157096	Solanum lycopersicum var. lycopersi 토마토	탈출토마토		KNU-11	본원가능	공개제한	USA	육성가능	이학	출가	25-07 KDR
6	5	K157097	Solanum lycopersicum var. lycopersi 토마토	탈출토마토		KNU-13	본원가능	공개제한	USA	육성가능	이학	출가	25-07 KDR
7	6	K157098	Solanum lycopersicum var. lycopersi 토마토	탈출토마토		KNU-14-1	본원가능	공개제한	USA	육성가능	이학	출가	25-07 KDR
8	7	K157099	Solanum lycopersicum var. lycopersi 토마토	탈출토마토		KNU-14-2	본원가능	공개제한	USA	육성가능	이학	출가	25-07 KDR
9	8	K157090	Solanum lycopersicum var. lycopersi 토마토	탈출토마토		KNU-15	본원가능	공개제한	USA	육성가능	이학	출가	25-07 KDR
10	9	K157091	Solanum lycopersicum var. lycopersi 토마토	탈출토마토		KNU-17	본원가능	공개제한	USA	육성가능	이학	출가	25-07 KDR
11	10	K157092	Solanum lycopersicum var. lycopersi 토마토	탈출토마토		KNU-19-1	본원가능	공개제한	USA	육성가능	이학	출가	25-07 KDR
12	11	K157095	Solanum lycopersicum var. lycopersi 토마토	탈출토마토		KNU-ADK	본원가능	공개제한	USA	육성가능	이학	출가	25-07 KDR

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	제출자	제출자주소	제출자성명	제출자직책	제출자직업	제출자직업	제출자직업	제출자직업	제출자직업	제출자직업	제출자직업	제출자직업	제출자직업
2	농업유전자원센터	74 09-25	농업유전자원센터	25-07	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)
3	농업유전자원센터	74 09-25	농업유전자원센터	25-07	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)
4	농업유전자원센터	74 09-25	농업유전자원센터	25-07	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)
5	농업유전자원센터	74 09-25	농업유전자원센터	25-07	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)
6	농업유전자원센터	74 09-25	농업유전자원센터	25-07	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)
7	농업유전자원센터	74 09-25	농업유전자원센터	25-07	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)
8	농업유전자원센터	74 09-25	농업유전자원센터	25-07	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)
9	농업유전자원센터	74 09-25	농업유전자원센터	25-07	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)
10	농업유전자원센터	74 09-25	농업유전자원센터	25-07	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)
11	농업유전자원센터	74 09-25	농업유전자원센터	25-07	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)
12	농업유전자원센터	74 09-25	농업유전자원센터	25-07	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)	농업유전자원센터	2011.7.21-9.5(제72)

나. 고추 유전자원 기탁 15종(서울대 강병철)

정부3.0, 국민과의 약속



국립농업과학원 농업유전자원센터



수신 강병철 교수
(경유)

제목 고추 유전자원 기탁내용 알림

1. 산학협력단-278159(2013.11.29)호와 관련됩니다.
2. 위 호와 관련하여, 귀 기관에서 기탁하신 고추자원이 아래와 같은 내용으로 접수되어 '임시관리번호'를 부여하였습니다.
3. 이후, 기탁자원의 종자량, 발아율 및 자원내력(내력정보)이 국가등록번호(IT 번호) 부여 기준에 부합되면 '농업생명자원등록심의회' 심의를 거쳐 국가등록번호를 부여합니다. 위 기준에 부합하지 않는 자원에 대해서는 농업유전자원센터 또는 관련기관 중식을 통하여 국가등록번호 부여기준에 맞도록 조건을 갖추어서 번호를 부여하므로 최종 국가등록번호 획득에는 상당한 시일이 소요됨을 알려드립니다.

- 아 래 -

- 가. 기탁자원 : 고추 15점
- 나. 기탁자 : 서울대학교 강병철 교수
- 다. 기탁(접수)번호 : GB13144(2013.12.10)
- 라. 자원(임시)번호 : K226589~K226603
- 마. 관련과제 : 가지과, 배추과, 박과 작물의 병저항성 유전자 분자마커 분석 (과제번호:609002)
- 마. 상세내용 : 불임참조

불임. 기탁자원 상세내용(엑셀). 끝.

농업유전자원센터장

농업유전자원센터 2013. 12. 16.
 농업유전자원센터 김연규
 사장
 농업연구관 이성영
 농업연구사 김정숙
 협조자
 시행 농업유전자원센터-3300 접수
 우 441-853 경기도 수원시 권선구 서호로 34 국립농업과학원 농업유전자원센터(서둔동) / www.genebank.go.kr
 전화번호 031-299-1831 팩스번호 031-299-1893 / sjs7861@rda.go.kr / 대국민 공개
 정보의 개방과 공유로 일자리는 늘고 생활은 편리해집니다

	임시번호	학명	작물명	자원명	처리구분	원산지
1	K226589	Capsicum annuum	고추	Lungo di chivasso	신규	ESP
2	K226590	Capsicum chacoense	고추야생종	13A-215	신규	ESP
3	K226591	Capsicum annuum	고추	13A-217	신규	ESP
4	K226592	Capsicum annuum	고추	Red Boy	신규	ESP
5	K226593	Capsicum annuum	고추	Paprika Gewurz	신규	ESP
6	K226594	Capsicum annuum	고추	DEL COUTO	신규	ESP
7	K226595	Capsicum annuum	고추	Yellow Oshkosh	신규	ESP
8	K226596	Capsicum annuum	고추	Nose Gay	신규	ESP
9	K226597	Capsicum annuum	고추	GUINDILLA DULCE	신규	ESP
10	K226598	Capsicum annuum	고추	DEL TERRENO	신규	ESP
11	K226599	Capsicum annuum	고추	Violetta	신규	ESP
12	K226600	Capsicum annuum	고추	Rioseco	신규	ESP
13	K226601	Capsicum annuum	고추	Negral	신규	ESP
14	K226602	Capsicum annuum	고추	Agel dulce	신규	ESP
15	K226603	Capsicum annuum	고추	KozijRozi	신규	ESP

다. 식물병원균팡이 기탁 15종(한국화학연구원 최경자)

Korean Agricultural Culture Collection (KACC)
 농업미생물은행
 농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물과, 수원, 441-707
 Tel. 031-299-1866, Fax. 031-299-1869
 Homepage <http://www.genebank.go.kr>, e-mail: kacc@korea.kr

KACC 등록번호 고지서

도입번호 : F13-08
 도입일자 : 2013-04-16
 송변일자 : 2013-04-30

최 경 자 귀하

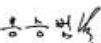
농업미생물은행(KACC)에 균주를 기탁해 주셔서 감사드립니다. 귀하께서 기탁하신 균주는 최선의 보존방법으로 아래와 같이 보존되었음을 알려드립니다. 장기보존된 균주에 대하여 새롭게 생성된 정보는 지속적으로 추가될 예정이니 변경 또는 추가사항이 있을 시에는 연락을 당부드립니다. 기탁하신 균주가 안정적으로 보존되어 많은 연구자들에게 이용될 수 있도록 노력하겠습니다.

----- 아 래-----

번호	학명	기탁시 번호	KACC 번호	보존방법	비고
1	<i>Passalora fulva</i>	TD-2	47114	LN ₂ , DF, MO	
2	<i>Passalora fulva</i>	TD-3	47115	LN ₂ , DF, MO	
3	<i>Passalora fulva</i>	TQ-1	47116	LN ₂ , DF, MO	
4	<i>Passalora fulva</i>	TQ-2	47117	LN ₂ , DF, MO	
5	<i>Passalora fulva</i>	TR-2	47118	LN ₂ , DF, MO	
6	<i>Passalora fulva</i>	TR-4	47119	LN ₂ , DF, MO	
7	<i>Passalora fulva</i>	TU-1	47120	LN ₂ , DF, MO	
8	<i>Passalora fulva</i>	TU-3	47121	LN ₂ , DF, MO	

번호	학명	기탁시 번호	KACC 번호	보존방법	비고
9	<i>Colletotrichum orbiculare</i>	C1-1	47122	LN ₂ , DF, MO	

* LN₂:액체질소보존, DF:저온냉동고보존(-80°C), MO:광유 보존

농업미생물은행(KACC) 진균 큐레이터  응승범

KACC 등록번호 고지서

도입번호 : F13-46
 도입일자 : 2013-12-19
 송변일자 : 2014-01-23

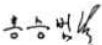
최경자 님 귀하

농업미생물은행(KACC)에 균주를 기탁해 주셔서 감사드립니다. 귀하께서 기탁하신 균주는 최선의 보존방법으로 아래와 같이 보존되었음을 알려드립니다. 장기보존된 균주에 대하여 새롭게 생성된 정보는 지속적으로 추가될 예정이니 변경 또는 추가사항이 있을 시에는 연락을 당부드립니다. 기탁하신 균주가 안정적으로 보존되어 많은 연구자들에게 이용될 수 있도록 노력하겠습니다.

----- 아 래-----

번호	학명	기탁시 번호	KACC 번호	보존방법	비고
1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i>	KR3	47615	DF, LN ₂ , MO	
2	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>	KR1	47614	DF, LN ₂ , MO	

DF:저온냉동고보존(-80°C), LN₂:액체질소보존, MO:광유보존

농업미생물은행(KACC) 진균 큐레이터 

KACC 등록번호 고지서

도입번호 : F14-05
 도입일자 : 2014-02-13
 송변일자 : 2014-03-11

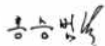
최경자 님 귀하

농업미생물은행(KACC)에 균주를 기탁해 주셔서 감사드립니다. 귀하께서 기탁하신 균주는 최선의 보존방법으로 아래와 같이 보존되었음을 알려드립니다. 장기보존된 균주에 대하여 새롭게 생성된 정보는 지속적으로 추가될 예정이니 변경 또는 추가사항이 있을 시에는 연락을 당부드립니다. 기탁하신 균주가 안정적으로 보존되어 많은 연구자들에게 이용될 수 있도록 노력하겠습니다.

----- 아 래-----

번호	학명	기탁시 번호	KACC 번호	보존방법	비고
1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	HA	47666	LN ₂ , DF, MO	
2	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	CJ	47667	LN ₂ , DF, MO	
3	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	1	47668	LN ₂ , DF, MO	
4	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	GR	47669	LN ₂ , DF, MO	

* LN₂:액체질소보존, DF:저온냉동고보존(-80°C), MO:광유보존

농업미생물은행(KACC) 진균 큐레이터 

라. 식물병원세균 기탁 10종(동아대 이선우)



Korean Agricultural Culture Collection (KACC)

National Agrobiodiversity Center
National Academy of Agricultural Science
88-20 Seodun-dong Gwonseon-gu
Suwon 441-853, Republic of Korea

Phone : +82-31-299-1860
Fax : +82-31-299-1869
E-mail : swkwon1203@korea.kr
Homepage : www.genebank.go.kr

To 동아대학교 이선우 교수님

Thank you for depositing the strains to KACC.

This has been accessioned as the followings :

Species name	Strain name	KACC No.
<i>Ralstonia solanacearum</i>	CS2	17905
<i>Ralstonia solanacearum</i>	CS1	17906
<i>Ralstonia solanacearum</i>	DJ2	17907
<i>Ralstonia solanacearum</i>	DJ1	17908
<i>Acidovorax citrulli</i>	YA7	17909
<i>Acidovorax citrulli</i>	YA6	17910
<i>Acidovorax citrulli</i>	KA7-1	17911
<i>Acidovorax citrulli</i>	KA5	17912
<i>Acidovorax citrulli</i>	DBH1	17913
<i>Burkholderia pyrocinia</i>	CH67	17914

Thank you for your help and your collaboration.

Sincerely yours,

S. W. Kwon

3 March 2014

Curator responsible for the strain(s)

마. 식물병원 곰팡이 및 세균 기탁 20종(강릉원주대 김병섭)

Korean Agricultural Culture Collection (KACC)

농업미생물은행

농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물과, 수원, 441-707

Tel. 031-299-1866. Fax. 031-299-1869.

Homepage <http://www.genebank.go.kr>, e-mail:kacc@korea.kr

KACC 등록번호 고지서

도입번호 : F14-10

도입일자 : 2014-02-28

송번일자 : 2014-04-07

김 병 섭 님 귀하

농업미생물은행(KACC)에 균주를 기탁해 주셔서 감사드립니다. 귀하께서 기탁하신 균주는 최선의 보존방법으로 아래와 같이 보존되었음을 알려드립니다. 장기보존된 균주에 대하여 새롭게 생성된 정보는 지속적으로 추가될 예정이니 변경 또는 추가사항이 있을 시에는 연락을 당부드립니다. 기탁하신 균주가 안정적으로 보존되어 많은 연구자들에게 이용될 수 있도록 노력하겠습니다.

----- 아 래-----

번호	학명	기탁시 번호	KACC 번호	보존방법	비고
1	<i>Colletotrichum acutatum</i>	A-2	47693	DF, LN ₂ , MO	
2	<i>Colletotrichum acutatum</i>	EA-7	47694	DF, LN ₂ , MO	
3	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	TA-1	47695	DF, LN ₂ , MO	
4	<i>Colletotrichum acutatum</i>	PK-1	47696	DF, LN ₂ , MO	
5	<i>Colletotrichum coccodes</i>	PA-2	47697	DF, LN ₂ , MO	
6	<i>Phytophthora capsici</i>	KPC-1	47698	DF, LN ₂ , MO	
7	<i>Phytophthora capsici</i>	KPC-6	47699	DF, LN ₂ , MO	
8	<i>Phytophthora cactorum</i>	KP-1	47700	DF, LN ₂ , MO	
9	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>	GW-2	47701	DF, LN ₂ , MO	

번호	학명	기탁시 번호	KACC 번호	보존방법	비고
10	<i>Botrytis cinerea</i>	SB-2	47702	Ly, DF, LN ₂	
11	<i>Botrytis cinerea</i>	TB-2	47703	Ly, DF, LN ₂	
12	<i>Fulvia fulva</i>	TF-1	47704	DF, LN ₂ , MO	
13	<i>Fulvia fulva</i>	TF-2	47705	DF, LN ₂ , MO	
14	<i>Rhizoctonia solani</i>	KR-1	47706	DF, LN ₂ , MO	
15	<i>Phytophthora infestans</i>	TH-1	47707	DF, LN ₂ , MO	
16	<i>Phytophthora infestans</i>	PB-40	47708	DF, LN ₂ , MO	
17	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	GB-1	47709	DF, LN ₂ , MO	
18	<i>Phytophthora infestans</i>	PD-57	47710	DF, LN ₂ , MO	
19	<i>Phytophthora infestans</i>	PH-26	47711	DF, LN ₂ , MO	

* Ly:동결건조보존, DF:저온냉동고보존(-80°C), LN₂:액체질소보존, MO:광유 보존



Korean Agricultural Culture Collection (KACC)
 National Agrobiodiversity Center
 National Academy of Agricultural Science
 88-20 Seodun-dong Gweonseon-gu
 Suwon 441-853, Republic of Korea

Phone : +82-31-299-1860
 Fax : +82-31-299-1869
 E-mail : swkwon1203@korea.kr
 Homepage : www.genebank.go.kr

To Prof. B. S. Kim, Gangneung-Wonju National University

(강릉원주대학교 김병섭 교수님)

Thank you for depositing the strains to KACC.

This has been accessioned as the followings :

Species name	Strain name	KACC No.
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	BX-1	17966

Thank you for your help and your collaboration.

Sincerely yours,

S. W. Kwon

1 April 2014

Curator responsible for the strain(s)

사. 식물병원 바이러스 기탁 15종(한국생명공학연구원 문제선)

No.	학명	채집 일자	채집 장소	채집 식물명	Test 기주	Isolate	Accession No.
1	Tomato spotted wilt virus (TSWV)	11.05.14	수원 (Suwon)	토마토	토마토	TSWV-SW	KJ139671
2	Brugmansia mosaic virus (BruMV)	11.06.16	대전 (Daejeon)	엔젤트럼펫	<i>N. benthamiana</i>	BruMV SK-SS	KJ139668
3	Watermelon mosaic virus 2 (WMV2)	11.06.23-25	예산 (Yesan)	호박	호박	WMV2-YS	KJ139663
4	Soybean mosaic virus (SMV)	11.07	봉화 (Bonghwa)	콩-흑태	Soybean	SMV-BH	KJ139670
5	Lettuce mosaic virus (LMV)	11.08.04	무주 (Muju)	상추	<i>N. benthamiana</i>	LMV-MJ	KJ139669
6	Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)	11.09.01	칠곡 (Chilgok)	멜론	호박	ZYMV-CG2	KJ139667
7	Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)	11.09.01	칠곡 (Chilgok)	참외	호박	ZYMV-CG1	KJ139666
8	Turnip mosaic virus (TuMV)	11.11.18	봉화 (Bonghwa)	무우	무	TuMV-BH	KJ139662
9	Watermelon mosaic virus 2 (WMV2)	13.07.13	진천 (Jincheon)	참깨	호박	WMV2-JC	KJ139665
10	Watermelon mosaic virus 2 (WMV2)	13.1	춘천 (Chuncheon)	호박	호박	WMV2-CC	KJ139664
11	Turnip mosaic virus (TuMV)	13.1	대전 (Daejeon)	열무	무우	TuMV-DJ	KJ139661
12	Potato virus Y (PVY)	13.6	칠곡 (Chilgok)	감자	<i>N. benthamiana</i>	PVY-CG	KJ139660
13	Cucumber mosaic virus (CMV)	13.06.10	대전 (Daejeon)	고추	고추	CMV-DJ	KJ139658
14	Cucumber mosaic virus (CMV)	13.09.20	칠곡 (Chilgok)	멜론	멜론	CMV-CG	KJ139657
15	Potato virus Y (PVY)	11.06.09	청송 (Cheongsong)	담배	<i>N. benthamiana</i>	PVY-CS	KJ139659

제 8절. 교육·지도

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기간	교육시간	교육인원
1	제 7기 육종가 교육 및 제 1회 작물육종지원 사업단 전문가 교육 훈련 「식물 분자표지 이용 육종기술」	-이론 수업: 분자표지 활용 및 원리 -실기 수업: 분자표지 검정	2009.11.30 - 2009.12.03	32시간	26명
2	제 2회 작물육종지원 사업단 전문가 교육 훈련 「식물 분자표지 이용 육종기술 워크샵」	-이론 수업 : 분자 마커 활용 및 원리에 대한 -실기 수업 : 분자 마커 분석 실기 수업	2010.11.15 - 2010.11.19	21시간	21명
3	제 8기 육종가 교육 및 제 2회 작물육종지원 사업단 전문가 교육 훈련 「식물 분자표지 이용 육종기술」	-이론 수업 : 식물 분자표지의 종류 및 활용방법	2010.11.15 - 2010.11.19	2시간	25명
4	유전체시대 채소육종 전문가 과정	채소에 발생하는 주요 균류병에 대한 저항성 검정의 이론 및 실습	2011.06.27	3시간	30명
5	유전체시대 채소육종 전문가 과정	세균병 저항성 검정 방법	2011.06.27	3시간	30명
6	유전체시대 채소육종 전문가 과정	채소작물의 주요병에 대한 포장검정법	2011.06.28	3시간	30명
7	유전체시대 채소육종 전문가 과정	가지과 작물의 유전체 개발 현황 및 전망	2011.06.29	1시간	30명
8	유전체시대 채소육종 전문가 과정	-이론 수업 : 분자마커 활용 및 원리 -실기 수업 : 분자마커 분석 실기 수업	2011.06.27 - 2011.07.01	45시간	30명
9	식물 분자표지 이용 육종기술 교육	분자표지 이용 육종기술	2012.06.25 - 2012.06.29	40시간	20명
10	식물 내병성 육종기술 교육	식물병리학 개론 및 균류병 저항성 검정 방법	2013.06.24	3시간	20명
11	식물 내병성 육종기술 교육	세균병 저항성 검정 방법	2013.06.24	2시간	20명

12	식물 내병성 육종기술 교육	채소작물의 주요병에 대한 포장 검정법	2013.06.25	2시간	20명
13	식물 내병성 육종기술 교육	식물내병성 육종 개론 및 분자표지 이론 및 실습	2013.06.26 - 2013.06.28	20시간	20명
14	채소육종가협의회 교육	신품종 개발을 위한 병리검정	2014.02.21	1시간	50명

제 9절. 홍보

종 류	홍보 내역
대의 홍보	<ul style="list-style-type: none"> -한국육종학회, 채소병리검정지원사업단 소개 포스터 발표 (2009.07.01-03 대전컨벤션센터) -채소병리검정지원사업단 사업설명회 (2009.07.07 국립종자원) -한국식물병리학회, 사업단 홍보 브로셔 배포 (2009.10.28-10.31 제주도 칼호텔) -한국종자연구회 정기총회 및 심포지엄, 사업단 홍보 브로셔 배포 (2009.12.04 농업연수원) -종자강국 실현을 위한 종자산업 경쟁력강화 방안 심포지엄, 사업단 홍보 브로셔 배포 (2009.12.10 경북대학교) -농림수산식품기술기획평가원 iPET웹진 18호, 채소병리검정지원사업단 소개 게재 (2010.05.13 R&D 동향) -한국원예학회, 채소병리검정지원사업단 소개 포스터 발표(2010.05.28~29 경희대학교 국제캠퍼스) -한국종자연구회 내병성 육종가교육, 사업단 브로셔 배포(2010.06.07~09 국립원예특작과학원) -농업연구사업단 성과발표회 및 전시회 (2011. 5. 28, aT센터) -고추연구회 20주년 국제심포지움 개최(2011. 9. 22~23, 충북대학교 개신문화원) -한국종자연구회지 '종자과학과 산업', 채소병리검정지원사업단의 성과를 소개하는 글 게재(2012년 10월, 9권 3호 10-18) -한국종자협회 회원 대상 채소병리검정지원사업단 소개 강연 (2012년 4월 12일) -네이버 뉴스(2013. 5. 9, 농림축산식품부 채소병리검정지원사업단이 민간육종가에게 병리검정 전문교육을 실시할 예정이고 병리검정을 지원하고 있음) -아시아투데이(2013. 5. 10, 채소병리검정지원사업단은 확립한

	<p>병리검정 기술을 이용하여 육종가에게 병리검정을 지원하고 또한 병리검정 전문교육을 추진하고 있음)</p> <p>-농림축산식품부 보도자료(2013. 5. 10, 한국화학연구원 농과대학 협력연구를 통한 One-Stop 병리검정 지원)</p> <p>-공감코리아 정책정보(2013. 5. 10), 민간육종 활성화를 위한 One-Stop 병리검정 지원)</p> <p>-소비자를 위한 신문(2013. 5. 10, 한국화학연구원·농과대학 협력연구를 통한 원스톱 병리검정지원)</p> <p>-2013생명산업대전 사업단 성과 전시 및 발표(2013. 9. 27, aT센터)</p> <p>-농림축산식품부 보도자료(2013. 9. 26, 농림축산식품 발전에 기여한 과학기술인 포상: 한국화학연구원 최경자박사는 채소병리검정지원사업단장직을 수행하면서 채소작물물 45종 병해에 대한 병리검정기술 개발과 민간육종회사의 병리검정 지원을 통해 종자 기업의 내병성 품종 사업화에 기여한 공로로 국무총리표창)</p>
<p>학술지 광고</p>	<p>-한국종자연구회지, 사업단 홍보 광고(6-4호, 7-1호~7-4호, 8-1호~8-4호, 9-1호~9-4호, 10-1~10-4호 게재)</p> <p>-한국식물병리학회 학술지 ‘식물병연구’, 사업단 홍보 광고(2011년 1~3호, 2012년 1호~4호, 2013년 1호~4호)</p> <p>-한국원예학회 2010년 정기총회 및 춘계발표회 초록집, 사업단 홍보 광고</p>
<p>홍보 이메일 발송 (종자회사 및 개인육종가)</p>	<p>-사업단 소개 및 설문요청 (2009.07.27)</p> <p>-고추역병 무료검정에 관한 안내 공문 (2009.07.31)</p> <p>-분자마커 시험료 할인에 관한 안내 공문 (2009.08.11)</p> <p>-시험료에 관한 안내문 우편발송 (2010.01.04)</p> <p>-고추역병 검정 시험료 할인 및 종자순도 검정 항목 추가에 관한 공문 (2010.04.13)</p>
<p>DM 발송 (종자회사 및 개인육종가)</p>	<p>-사업단 소개 브로셔 발송 (2009.10.30)</p> <p>-검정시험료 안내장 발송 (2010.01.04)</p> <p>-고추역병 검정 시험료 할인행사와 분자마커 종자순도 검정 항목 추가에 관한 소개 및 2차년도 병리검정 서비스에 관한 안내장 발송(2010.04.21)</p>
<p>홈페이지 구축 및 관리 (www.scdr.re.kr)</p>	<p>-사업단 소개, 검정시험료 안내, 홍보자료, 공지사항 등 (2009.09 오픈)</p> <p>-병리검정서비스: 병리검정 항목 등 변경사항 지속적 업데이트</p> <p>-홍보실: 사업단 행사 및 새롭게 update되는 병리검정서비스 항목 소개 등 공지</p>

사업단 현판식 개최	-한국화학연구원 5연구동 (2009.11.20)
---------------	----------------------------

제 10절. 추가연구, 타연구에 활용

- 사업단에 확립한 *in vivo* 병리검정 기술은 골든씨드 프로젝트 GSP 채소종자사업단의 기반과제 ‘병리검정 서비스(연구책임자 최경자)’ 프로젝트 과제를 통하여 종자회사의 병리검정을 지원하는데 이용되고 있다.
- 사업단에서 개발한 내병성관련 분자마커 검정 기술은 골든씨드 프로젝트 GSP 채소종자사업단의 기반과제 ‘성분분석 및 분자마커검정 서비스’ 프로젝트 과제의 위탁과제(연구책임자 권진경)를 통하여 종자회사의 병리검정을 지원하는데 이용되고 있다.
- 사업단에서 개발 중인 고추 내병성관련 분자마커 개발은 골든씨드 프로젝트 GSP 채소종자사업단의 ‘고추 육종 효율성 향상을 위한 기반기술 개발’ 프로젝트의 ‘MAB 및 양적형질(흰가루병, 매운맛 등) MAS를 위한 분자표지 이용기술 개발’ 세부과제(연구책임자 강병철)에서 분자마커 개발을 지속적으로 수행할 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1) 배추의 뿌리혹병 저항성

배추(*Brassica rapa subsp. pekinensis*)의 뿌리혹병 저항성 품종은 *European turnip*(*B. rapa*)인 'Siloga', 'Milan White', 'Gelria R', 'Debra'의 병 저항성 유전자를 도입하여 만들어졌다. 'Siloga'에서는 major gene으로 *Crr1*과 *Crr2* 그리고 QTL 유전을 하는 *Crr4*가 보고되어 있으며, 'Milan White'에는 major gene인 *Crr3*가 알려져 있으며, 'Gelria R'에는 major gene인 *CRb*가 그리고 '136-8'에는 *CRA*가 보고되어 있다. 하지만 어느 저항성 품종이 어느 유전자가 도입되어 있는지에 대한 정보는 잘 알려져 있지 않다. 회사의 정보로는 'CR-Shinki'와 'Yuki'가 'Siloga'로부터 저항성 유전자를 도입하여 만들었으며, 우리나라 배추 품종도 대부분 'Siloga'의 뿌리혹병 저항성 유전자가 포함된 것이라고 알려져 있다. 본 연구에서도 2009년부터 2011년까지 수집한 40개 품종은 동일한 병 저항성 유전자가 도입된 것으로 확인되었다. 일본에서는 90년대 말에 이미 이들 뿌리혹병 저항성 품종에 뿌리혹병을 일으키는 균주들이 발생하였다고 보고하였다. 우리나라에서도 동일한 뿌리혹병 저항성 유전자가 들어 있는 대부분의 CR(*clubroot resistance*) 품종이 포장에서 저항성이 무너지는 일이 발생하고 있다. 이들 배추 품종과 다른 저항성 유전자가 도입된 '천하장군(사카타코리아사)' 품종이 2011년에 출시되었으며, 중국에는 일본에서 수입하여 판매하는 '항근중병대배추(상흥중업사)'가 판매되고 있다. 이들 품종은 MS(*male sterile*) 품종이며 11개의 뿌리혹병 균주로 실험한 결과 이들 품종은 기존 CR 품종과 다른 뿌리혹병 저항성 유전자가 도입된 품종이며, 두 품종은 서로 다른 뿌리혹병 저항성 유전자가 도입된 것으로 확인되었다.

2) 멜론의 덩굴쪄김병 저항성

박과 작물 중 멜론의 덩굴쪄김병은 *Fusarium oxysporum f. sp. melonis*에 의해 발생하는데, 이 병에 대한 멜론의 저항성 유전자는 *Fom-1*과 *Fom-2*가 보고되었다. 이들 병 저항성 유전자를 포함하는 멜론 품종의 덩굴쪄김병 발생에 따라 *race*를 구분하는데, 병 저항성 유전자가 있지만 하면 병을 일으키지 못 하는 균주는 *race 1*, *Fom-1*을 가지는 품종을 감염할 수 있고 *Fom-2*를 가지는 품종에서는 병을 일으키지 못 하는 균주는 *race 2*, 그리고 *Fom-1*과 *Fom-2*를 모두 가진 품종도 병을 일으킬 수 있는 균주는 *race 1,2*(예전에는 *race 3*으로 불렀음)로 구분한다. 현재 *race 1*에 대한 저항성 품종, *race 2*에 대한 저항성 품종 그리고 *race 1*과 *2* 모두에 대하여 저항성인 품종이 개발되었으나, *race 1,2*에 대한 저항성 품종은 개발되지 않았다. 미국에서는 1976년에 *race 1,2* 출현이 보고되었으나 *race 2*가 널리 존재하고 있으며, 유럽에서는 *race 1*이 많이 존재한다고 알려져 있다. 하지만 우리나라는 멜론 덩굴쪄김병균의 *race* 분포에 대해 보고된 바 없다.

3) TYLCV 저항성 품종 개발을 위한 병리검정

Geminivirus의 경우, single strand DNA 바이러스로 기후온난화와 더불어 전 세계적으로 문제가 되기 시작하는 대표적인 식물 병원성 바이러스이다. 이 중에서 특히 *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV)는 전 세계 토마토 재배 지역에서 막대한 피해를 주는 대표적인 바이러스병으로, 한국에는 2000년 초에 보고가 되고 나서 최근에 남부 지역을 중심으로 매우 심각한 문제를 일으키고 있다. 하지만, 이에 대한 병 방제는 거의 전무하며, 가장 좋은 방법이 저항

성 품종의 육종이다. 이 저항성 품종을 육종하기 위해서는 곤충을 매개로 하는 방법은 시간, 비용, 그리고 노력이 많이 들어가기에 간단한 방법이 필요하다. 이에 *Agrobacterium*-매개 접종이 있는데, 이 경우에 TYLCV의 genome을 cloning을 해야 하는데, 주로 PCR에 의존해서 cloning을 하고 있다. 최근에 몇 연구 그룹에서 Bacteriophage DNA polymerase RCA(rolling circle amplification)으로 매우 효과적으로 동물 병원성 바이러스와 식물 바이러스의 중에서 single strand DNA의 유전체를 가진 경우, 이 방법을 통해 쉽게 cloning을 한 연구 보고가 있다. 이에 본 연구팀은 이 방법을 통해서 문제가 되는 TYLCV를 매우 효과적으로 cloning을 하는 것을 제시하였다.

4) 세균병 병리검정 체계 확립

본 연구를 통해 풋마름병 저항성 품종의 활용에 대한 최신 동향을 획득한 결과 토마토 저항성 품종인 Hawaii 7996에서 이미 1990년대 말과 2000년대 초에 토마토 풋마름병 저항성이 6번 염색체의 3개, 4번 염색체에 2개의 QTL에 의해 발현됨을 보고 하였으며 더불어 3번과 8번 염색체에도 또 다른 QTL의 저항성 유전자가 있을 수 있음이 최근에 밝혀졌다. 더불어 또 다른 염색체에도 저항성 유전자가 존재할 것으로 알려져 있어서 풋마름병 저항성 유전자를 분리하기가 대단히 어려울 수 있음이 보고되었다. 그러나 최근 토마토와 고추의 표준 유전체가 분석이 되어 있어서 향후 다양한 고추와 토마토 품종의 비교 유전체가 연구되면 저항성 유전자를 분석하는 전략이 도출 될 것으로 여겨진다. 풋마름병 저항성 탐색을 위해 기존의 *in vivo* 스크리닝을 벗어나 유전자원의 근접 마커나 유전자 자체의 분자마커가 유전체 정보로부터 개발되면 대량의 유전자원으로부터 분자마커를 이용한 유전자원 평가가 가능할 것으로 여겨진다. 분자마커가 유용해지기 전까지는 다양한 유전자원의 *in vivo* 저항성 평가 자료를 축적하면 풋마름병 저항성 자원의 활용이 수월해질 수 있다.

한편 풋마름병을 야기하는 *Ralstonia solanacearum*의 그 병원균의 유전적 다형성으로 인해 종이하의 수준에서 다양한 분화형이 제안 되었는데 최근에는 다수 분화형의 유전체 분석을 토대로 *R. solanacearum* species complex 가 제안되었다. 이에 따르면 아시아에 다범성인 기존 phylotype I은 *R. sequeirae* 로 새로운 종으로 제안되고 있으며 아메리카 대륙에서 유래한 phylotype II를 주로 *R. solanacearum* 으로 제안하고 있는 실정이다. 이는 기존의 기주범위의 분화형을 뛰어넘는 새로운 경향이라고 할 수 있다. 그 외에 국내에서 발견되지 않으며 바나나 등에 풋마름병을 야기하는 분화형은 *R. haywardii*로 여러 개의 아종이 제안되고 있는 실정이다.

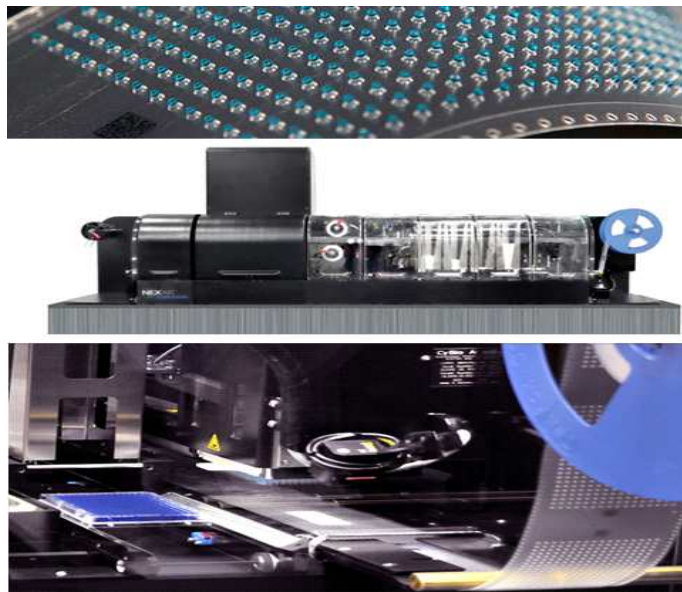
무름병 저항성 탐색의 과정에서 당초 저항성 유전자원으로 평가되던 코넬대학에서 육성된 C3-26, C3-28, C3-29 품종은 순계가 아닌 형질이 고정되지 않은 중간계통으로 판명되었다. 현재까지 무름병 저항성 품종은 전 세계적으로 확보되어 있지 않으므로 무름병을 제어하기 위해서 저항성 탐색보다는 다른 방제수단을 강구할 필요가 있다고 생각된다. 더불어 채소 특히 십자화과 채소에 검은썩음병을 유발하는 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 의 경우 다양한 판별품종을 이용하기 시작하면서 그 병원균 레이스가 기존의 4개의 레이스에서 추가하여 6개로 최근에는 9개의 레이스까지로 늘어난 것으로 보고되고 있으며 이에 상응하는 저항성 유전자도 다수 존재하는 것으로 예상된다. 전 세계적으로 가장 병원성이 강하고 확산되어 있는 레이스는 1번 과 4번 레이스로 확인되었다.

박과 과실썩음병은 최근 국내에서 메론과 수박에 문제가 되고 있는데 전 세계적으로 최근에 문제가 되는 작물병으로 주로 종자전염으로 보고되어 있으나 병든 식물의 잔재, 잡초 등에서 월동이 가능한 보고가 나타나고 있다. 병원형 레이스는 아직 확립되지 않고 있으며 수박과 멜론을 기주로 하는 병원체가 서로 다른 분화형일 가능성이 제기되고 있는 실정이다.

5) DNA 추출 및 유전자형 분석

LGC genomics 사에서는 최근 magnetic particle manipulators 라는 기계를 출시하였다 이 기계는 소프트웨어를 통하여 DNA 추출 과정에서 사용되는 액체를 핸들링 할 수 있고, 온도 조절도 20도부터 55도까지 할 수 있어, 거의 전 과정을 자동화 할 수 있음. 추출하려는 식물 샘플은 96well x 0.2ml 와 72well x 1.4ml 두 개의 sepTM 박스 중 원하는 용량에 맞춰서 넣고, 해당 사의 sbeadex®라는 plant kit를 이용하여 순도가 높은 high quality의 DNA 추출할 수 있다. DNA 추출 과정은 식물조직의 마쇄, DNA binding, 두 번의 washing 스텝으로 간단하고 빠른 장점이 있다.

Douglas Scientific사는 Array Tape이라는 0.3mm의 두께를 가지고 384well이 들어가는 plate를 개발하였는데, 유연하여 감을 수 있는 특징이 있음. 또한 이 plate에 자동으로 mixture를 분주 할 수 있고, mixture의 volume도 5ul로 획기적으로 작아졌기 때문에 시료 비용이 80-90%까지 절감할 수 있다(Fig. 1, 2).



<Fig. 1> Douglas Scientific의 Array Tape과 분석기계

	Plates per Day	Individual Plate and Seal Cost	Daily Plate and Seal Cost	Reaction Volumes	Daily Reagent Cost*	Daily Operational Cost
Microtiter Plate Solution	150	\$3.50	\$525	5 uL	\$8,640	\$9,165
Array Tape™ Solution	400	\$2.25	\$900	800 nL	\$3,686	\$4,586

* At a reagent cost of \$0.03/uL

<Fig. 2> Array Tape을 이용한 비용 절감 효과

Array Tape을 감아 PCR을 수행할 수 있는데, 한번의 run에 최대 230,400개의 reaction이 수행될 수 있으며, 분석할 수 있는 기계까지 자동화 되어 있어, 노동력 절감에 탁월하다.

6) 대량 분자마커 검정

최근 분자유종기술은 기존 관행육종에 어떻게 활용할지 그 가능성을 시험하는 단계를 지나 이제는 육종과정에 없어서는 안 될 필수 도구로 자리잡고 있다. 규모가 큰 다국적 종자회사에서는 기본적인 주요 질적형질에 대한 분자표지 이용을 비롯하여 많은 비용을 MAB에 투자하고 있다. 하지만 MAB를 이용한 여교배 세대단축은 분자표지 분석 비용이 많이 드는 점이 여전히 제한요소가 되고 있어 규모가 작은 국내 종자회사의 경우 실용화하기에는 아직 어려움이 있는 것이 현실이다.

가. 몬산토

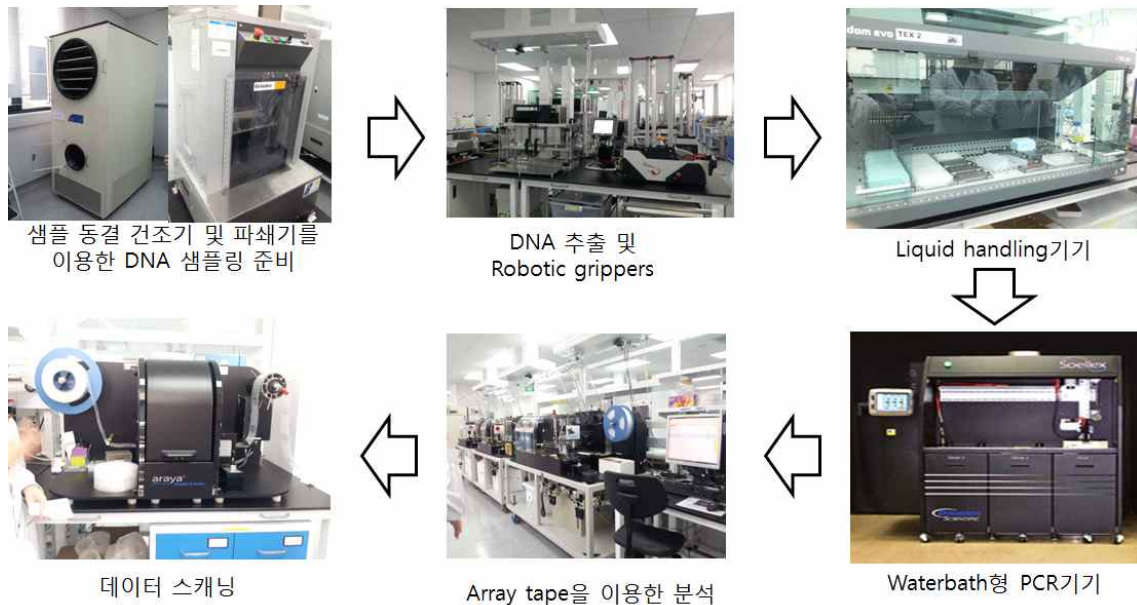
몬산토의 경우 매출의 약 10%를 R&D 투자에 사용함. 몬산토는 R&D 투자를 2004년 약 5억 달러에서 2009년 약 11억 달러(한화 약 1조 4천억 원)로 연평균 19.3%씩 늘려 왔다. 이것은 5년간(2005~2009년) 국내 종자 R&D 투자액(3,224억 원)의 4배가 넘는 액수이며, 5년간 농림수산식품 전체 R&D 투자액(1조 4,883억 원)과 맞먹는 큰 액수이다. 최근에는 종자 칩퍼(Seed Chipper)와 같은 첨단기술의 도입으로 하루 수천 개의 종자에 대한 다양한 유전자 분석을 통하여 파종 이전의 종자 상태에서 특징을 분석함으로써 시간 및 효율성 증진시켰다. 첨단 자동화 분석시스템(High Throughput)을 갖춘 유전자분석센터를 구축하여 일 년에 수천만 개의 샘플 분석이 가능해졌다.

몬산토가 2005년 세미니스를 인수합병한 후 첨단육종기술을 기반으로 채소종자 R&D를 전환하는 전략을 수립하였다. 고추(5,000개), 토마토(4,500개), 십자화과, 멜론, 오이, 상추, 양파 등 주요 작물에서 25,000 개 이상의 분자 마커를 개발하여 활용하고 있다. 첨단 장비 및 시스템 구축으로 인수합병 이후 지난 7년간 마커 분석의 data point가 100배 이상 증가, 현재 분자 마커 분석량이 연간 수천만 data point이며, 이러한 분자 마커 활용으로 맛, 질감, 색 뿐 아니라 복합내병성 같은 우수 형질을 갖춘 품종 개발이 가능했다.

나. 신젠타 사례(싱가포르 Marker Lab)

지역 내 육종프로그램을 지원하기 위하여 북미, 남미, 유럽 및 아시아태평양 4개 지역에 지원서비스 센터 하고 있으며 기존에 인도에 위치한 Marker lab을 싱가포르에 이전하여

2010년 4월에 개소하였다. 유전형 분석을 Arraytape로 기기를 전환하면서 연간 수천만 Data point를 분석함에도 불구하고 17명 정도의 연구원으로 운영을 하고 있다(Ph. D급 2명, 행정인력 4명, 생물학 및 생명공학 전공 테크니션 11명). 이 센터는 아시아태평양 5개국, 18개 연구소, 약 80명의 육종 팀에 대한 지원을 하고 있으며, 벼, 옥수수, 해바라기, 고추, 토마토, 양배추 및 멜론, 주요 7개 작물에 대한 분자 마커 분석, 유전자형 분석, 순도검정 등 DNA기반의 실험실 검정서비스 제공하고 있다. 작물에 따라서는 옥수수가 전체의 50%이상을 차지하고 있으며, 벼(15%)가 그 뒤를 잇고 있다. DNA 추출 능력은 하루 2만개 정도를 대량으로 추출할 수 있으며, 샘플이 도착한 이후 1주일 정도면 결과를 확인할 수 있다(Fig. 3). Applied Biosystems의 TagMan 시스템에서 Douglas Scientific의 Array Tape 시스템으로 전환하여 2009년도에 1백만 Data point의 서비스를 수행하였으나 2012년에는 1천 4백만 Data point를 분석하였으며, 2013년에는 7천만 Data point의 분석을 계획(1일 평균 대략 5천-2만 Data point)하였다.



<Fig. 3> 신젠타 분자마커 분석 시스템 Flow chart

다. 국제 미작 연구소(The International Rice Research Institute, IRRI)

IRRI에서는 벼의 수량과 품질에 관련한 주요 농업적 형질을 대상으로 QTL 및 유용 유전자를 발굴하여, 분자 육종 시스템을 이용해 우수 형질을 도입하려는 연구가 진행되고 있다. 특히, 점차 관심이 높아지는 기후 변화에 대응하기 위하여 가뭄저항성, 침수내성, 저온 및 고온저항성, 내염성, 인산결핍 내성에 강한 벼를 육종하고자 하는 지속적인 노력이 이루어지고 있다. 이를 위하여 다양한 식물 재료와 분자마커를 매개로 한 Marker-assisted breeding(MAB)을 이용해 육종의 정확도와 속도를 높이고 있으며 최근 첨단 장비를 도입하여 SNP 마커 개발에 필요한 비용과 시간을 획기적으로 단축시키고, 첨단 SNP genotyping 장비를 이용한 육종 시스템을 구축하였다(Fig. 4).

Cost comparison across SNP platforms

SNP platform	Multiplex level	Number of samples	Cost per sample	Cost per SNP
KBiosciences (outsourced)	10	10,000	\$1.50	\$0.15
Fluidigm	24	192 x 10 plates (1,920)	\$3	\$0.12
Fluidigm	96	96 x 10 plates (960)	\$10	\$0.10
BeadXpress	384	96 x 15 plates (1,440)	\$35	\$0.09
GoldgenGate	1536	96	\$100	\$0.06
Affymetrix 44k	44,000	1 per slide	\$325	\$0.007

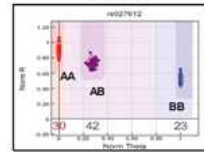
384-plex SNP genotyping at IRRI

IRRI



Illumina BeadXpress Reader

96 samples x 384 SNP markers per run



Automated marker scoring

Susan McCouch (Cornell University) has designed 7 custom SNP sets for different subgroups in rice:

- Sets of SNPs informative within and between germplasm pools
- For diversity analysis, mapping and MAS applications

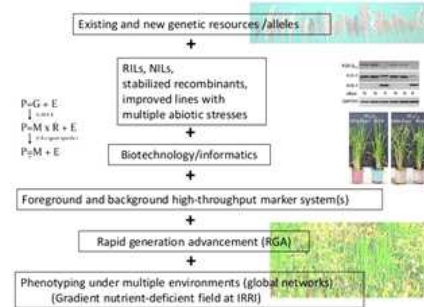
Future thrusts:

- Developing functional SNPs
- Integrating SNPs into the breeding programs



Breeding strategy to develop varieties for multiple abiotic stress tolerance

IRRI



<Fig. 4> 첨단 장비를 이용한 비용 절감과 이를 통한 첨단 육종 프로그램 도입

제 7 장 연구시설·장비 현황

* 도입·개발한 연구시설·장비 현황 및 국가과학기술종합정보시스템 장비 등록번호를 기술

연 차	품 명	규격	단위	수량	국가과학기술종합정보시스템 장비 등록번호
1차년도	습실상	LS-705D	개	2	
	컴퓨터		set	1	
	온습도기록기	Sigma-11, SATO	개	3	
	프린터	HP CP3525	개	1	
	Freeze drying system	450W*420D*440H	set	1	
	단일염기서열분석기	Roter Gene 6500 HRM	set	1	
	저온BOD배양기	HB-603CM	개	1	
	회전식진탕기	HB-203S	개	1	
	냉장플로어원심분리기	Gyro1580MGR	개	1	
	PCR최적화제품	MyCycler	개	1	
	건조캐비닛또는오븐	HB-502M	개	1	
	수소이온농도지수미터 (pH측정기)	PHI510	개	1	
	2차년도	CFX96 optical reaction	BR184-5096	set	1
유전자증폭기계 (super cycler)		SC-200	set	1	
가열판(Heating block)		HB-48P	개	1	
실험실용초저온냉동고		DF8514	개	1	
분광광도계		DU-730	개	1	
비닐하우스(비가림)		35평	동	1	
3차년도	종자보관 냉장고	VS-1302LPR	개	1	
	대용량 냉장원심분리기	Sspra 22K	대	1	
	컴퓨터	KPS-SGT440	대	3	
	모니터	W2453V-PF	대	3	
4차년도	종자보관 냉장고	VS-1302LPR	개	1	
	냉장고	FC-B53HMS	개	1	

제 8 장 참고문헌

제 1절 균류병 *in vivo* 병리검정법 확립 참고문헌

- Abbas, H.K., Boyette, C.D., Hoagland, R.E. and Vesonder, R.F. 1991. Bioherbicidal potential of *Fusarium moniliforme* and its phytotoxin, fumonisin. *Weed Sci.* 39:673-677.
- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology* 5th ed. Elsevier Academic Press, USA.
- Ahn, I.P., Chung, H.S., Lee, Y.H. 1998. Vegetative compatibility groups and pathogenicity among isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Plant Dis.* 82:244-246.
- Akaba, M., Kaneko, Y., Hatakeyama, K., Ishida, M., Bang, S.W. and Matsuzawa, Y. 2009. Identification and evaluation of clubroot resistance of radish chromosome using a *Brassica napus* - *Raphanus sativus* monosomic addition line. *Breeding Science* 59:203-206.
- Akito, K., Masato, T., Nakao, K., Takeshi, H., Ning, W., Tatsuhito, F. and Masashi, H. 2010. QTL mapping of clubroot resistance in radish. *Theor. Appl. Genet.* 120:1021-1027.
- Alabouvette, C., Schippers, B., Lemanceau, P. and Bakker, P.A.H.M. 1998. Biological control of *Fusarium* wilts, p. 15-36. In: G.J. Boland and L.D. Kuykendall (eds.). *Plant-microbe interactions and biological control*. Marcel Dekker, New York.
- Alexander, L.J. and Hoover, M.M. 1955. Disease resistance in wild species of tomato. *Ohio Agric. Exp. Stn. Res. Bull.* 752:1-76.
- Alexander, L.J. and Tucker, C.M. 1945. Physiologic specialization in the tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *J. Agric. Res.* 70:303-313.
- Amalfitano, C., Pengue, R., Andolfi, A., Vurro, M., Zonno, M.C. and Evidente, A. 2002. HPLC analysis of FA, 9, 10-dehydrofusaric acid, their methyl esters, toxic metabolites from weed pathogenic *Fusarium* species. *Phytochem. Analysis* 13:277-282.
- Amin, K.S. and Ullasa, B.A. 1981. Effect of thiophanate on epidemic development of anthracnose and yield of watermelon. *Phytopathology* 71:20-22.
- Ares, J.L., Martinez, A.R. and Paz, J.F. 2005. Resistance of pepper germplasm to *Phytophthora capsici* isolates collected in northwest Spain. *Span. J. Agric. Res.* 3:429-436.
- Armstrong, G.M. and Armstrong, J.K. 1952. Physiological races of the fusaria causing wilts of the Cruciferae. *Phytopathology* 42:255-257.
- Armstrong, G.M. and Armstrong, J.K. 1966. Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*; race 4, new race; and a new host for race 1, *Lychnis chalconica*. *Phytopathology* 56:525-530.
- Armstrong, G.M., Armstrong, J.K., and Netzer, D. 1978. Pathogenic races of the cucumber-wilt *Fusarium*. *Plant Dis.* 62: 824-828.
- Armstrong, G.M. and Armstrong, J.K. 1981. *Formae speciales and races of Fusarium oxysporum causing wilt diseases*. In: *Fusarium Diseases, Biology and Taxonomy*. ed. by Nelson, P.E., Toussoun, T.A. and Cook, R.J. pp. 391-399. The Pennsylvania State University Press, University Park, USA.
- Arnold, D.L., Blakesley, D. and Clarkson, J.M. 1996. Evidence for the growth of

- Plasmodiophora brassicae* in vitro. Mycol. Res. 100:535-540.
- Ashizawa, M., Yoshikawa, H. and Hida, K. 1980. Studies on the breeding of clubroot-resistance in cole crop. II. Screening of cole crops of clubroot-resistance (2). Bull. Vegetable and Ornamental Crops Res. Stn. A. 7:35-75.
- AVRDC. 1999. Studies on pepper anthracnose. p. 27-30. In: AVRDC Report 1998, Shanhua, Taiwan: AVRDC-the WORLD Vegetable Center.
- AVRDC. 2003. Host resistance to pepper anthracnose. p. 29-30. In: AVRDC Report 2002, Shanhua, Taiwan: AVRDC-the WORLD Vegetable Center.
- Ayers, G.W. 1957. Races of *Plasmodiophora brassicae*. Can. J. Bot. 35:923-932.
- Bacon, C.W., Potter, J.K., Norred, W.P. and Leslie, J.F. 1996. Production of fusaric acid by *Fusarium* species. Appl. Environ. Microbiol. 63:4039-4043.
- Baggett, J.R. and Kean, D. 1985. Clubroot-resistant broccoli breeding lines OSU CR-2 to OSU CR-8. HortScience 20:784-785.
- Baik, S.Y., Jang, K.S., Choi, Y.H., Kim, J.C. and Choi, G.J. 2011. Resistance degree of radish cultivars to *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* according to several conditions. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 29:48-52.
- Baik, S.Y., Kim, J.C., Jang, K.S., Choi, Y.H. and Choi, G.J. 2010. Development of effective screening method and evaluation of radish cultivars for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*. Res. Plant Dis. 16:148-152.
- Bain, D.C. 1952. Reaction of *Brassica* seedlings to black rot. Phytopathology 42:497-500.
- Bain, D.C. 1955. Resistance of cabbage to black rot. Phytopathology 45:35-37.
- Bardin, M., Dogimont, C., Nicot, P. and Pitrat, M. 1999. Genetic analysis of resistance of melon line PI 124112 to *Sphaerotheca fuliginea* and *Erysiphe cichoracearum* studied in recombinantion breedlines. ActaHortic. 492:163-168.
- Bardin, M., Nicot, P.C., Normand, P. and Lemaire, J.M. 1997. Virulence variation and DNA polymorphism in *Sphaerotheca fuliginea*, causal agent of powdery mildew of cucurbits. Eur. J. Plant Pathol. 103:545-554.
- Barksdale, T.H., Papavizas, G.C. and Johnston, S.A. 1984. Resistance to foliar blight and crown rot of pepper caused by *Phytophthora capsici*. Plant Dis. 68:506-509.
- Barnes, W.C. and Epps, W.M. 1956. Powdery mildew resistance in South Carolina cucumbers. Plant Dis. Rptr. 40:1093.
- Bertrand, E. and Pitrat, M. 1989. Screening of a muskmelon germplasm for susceptibility to 5 pathogens of powdery mildew, p. 140-142. In: Proc. Cucurbitaceae 89: Evaluation and enhancement of cucurbit germplasm. Charleston, SC, USA.
- Bertrand, F. 1991. Les Oïdiums des Cucurbitacées: Maintien en culture pure, étude de leur variabilité et de la sensibilité chez le melon. PhD. Diss., Univ. of Paris XI, Orsay, France.
- Bohn, G.W. and Tucker, C.M. 1939. Immunity to *Fusarium* wilt in the tomato. Science 89:603-604.
- Bosland, P.W. 1993. An effective plant field cage to increase the production of genetically

- pure chilli (*Capsicum* spp.) seed. HortScience 29:1182–1183.
- Bosland, P.W. and Lindsey, D.L. 1991. A seedling screen for Phytophthora root rot of pepper, *Capsicum annuum*. Plant Dis. 75:1048–1050.
- Bosland, P.W. and Williams, P.H. 1987. An evaluation of *Fusarium oxysporum* from crucifers based on pathogenicity, isozyme polymorphism, vegetative compatibility, and geographic origin. Can. J. Bot. 65:2067–2073.
- Bosland, P.W. and Williams, P.H. 1988. Pathogenicity of geographic isolates of *Fusarium oxysporum* from crucifers on a differential set of crucifer seedlings. J. Phytopathol. 123:63–68.
- Bost, S.C. 2001. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Tennessee. Plant Dis. 85:802.
- Both, C. 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- Bouhot, D. 1981. Some aspects of the pathogenic potential in formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* on Cucurbitaceae. pp. 318–326. In: *Fusarium: Disease, Biology, and Taxonomy*. P.E. Nelson, T.A. Toussoun, and R.J. Cook, eds. Pennsylvania State University Press, University Park.
- Boukema, I.W. 1981. Races of *Cladosporium fulvum* Cooke (*Fulvia fulva*) and genes for resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Eucarpia Tomato Meeting, Avignon, France p. 287–292.
- Bournival, B.L. and Vallejos, C.E. 1991. New sources of genetic resistance to race 3 of *Fusarium* wilt of tomato. Plant Dis. 75:281–284.
- Bournival, B.L., Scott, J.W. and Vallejos, C.E. 1989. An isozyme marker for resistance to race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. Theor. Appl. Genet. 78:489–494.
- Bowers, J.H. and Mitchell, D.J. 1991. Relationship between inoculum level of *Phytophthora capsici* and mortality of pepper. Phytopathology 81:178–184.
- Boyhan, G.E., Norton, J.D., Abrahams, B.R. and Wen, H.H. 1994. A new source of resistance to anthracnose (race 2) in watermelon. Hort Science 29:112–112.
- Braselton, J. 1995. Current status of plasmodiophodids. Crit. Rev. Microbiology 21:263–275.
- Buczacki, S.T., Toxopeus, H., Mattusch, P., Johnston, T.D., Dixon, G.R. and Hobolth, L.A. 1975. Study of physiologic specialization in *Plasmodiophora brassicae*: Proposals for attempted rationalization through an international approach. Trans. Br. Mycol. Soc. 65:295–303.
- Burgess, L.W. 1981. General ecology of the Fusaria, pp. 225–235. In: Nelson, P.E., Toussoun, T.A., and Cook, R.J. eds. *Fusarium: Disease, Biology, and Taxonomy*. Pennsylvania State University Press, University Park, P.A.
- Burmeister, H.R., Grove, M.D., Peterson, R.E., Weisleder, D. and Plattner, R.D. 1985. Isolation and characterization of two new fusaric acid analogs from *Fusarium*

- moniliforme* NRRL 13,163. Appl. Environ. Microbiol. 50:311–314.
- Cafri, D., Katan, J., and Katan, T. 2005. Cross-pathogenicity between *formae speciales* of *Fusarium oxysporum*, the pathogens of cucumber and melon. J. Phytopathol. 153:615–622.
- Cai, G., Gale, L.R., Schneider, R.W., Kistler, H.C., Davis, R.M., Elias, K.S. and Miyao, E.M. 2003. Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* at a single site in California. Phytopathology 93:1014–1022.
- Capasso, R., Evidente, A., Cutignano, A., Vurro, M., Zonno, M.C. and Bottalico, A. 1996. Fusaric and dehydrofusaric acids and their methyl esters from *Fusarium nygamai*. Phytochem. 41:1035–1039.
- Carlsson, M., Von Bothmer, R. and Merker, A. 2004. Screening and evaluation of resistance to downy mildew (*Peronospora parasitica*) and clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) in genetic resources of *Brassica oleracea*. Hereditas 141:293–300.
- Cartea, M.E., Velasco, P., Obregon, S., Padilla, G. and Haro, A.D. 2008. Seasonal variation in glucosinolate content in *Brassica oleracea* crops grown in northwestern Spain. Phytochemistry 69:403–410.
- Chala, A. and Tronsmo, A.M. 2012. Evaluation of ethiopian sorghum accessions for resistance against *Colletotrichum sublineolum*. Eur. J. Plant Pathol. 132:179–189.
- Cheah, L.H. and Page, B.B.C. 1995. *Trichoderma* spp. for potential biocontrol of clubroot of vegetable brassicas. Proc. 50th N. Z. Plant Protection Conf. 150–153.
- Cheah, L.H., Veerakone, S. and Kent, G. 2000. Biological control of clubroot on cauliflower with *Trichoderma* and *Streptomyces* spp. N. Z. Plant Protection 53:18–21.
- Chen F., Wang, M., Zheng, Y., Luo, J.M., Yang, X.R., Wang, X.L. 2010. Quantitative changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber Fusarium wilt by *Bacillus subtilis* B579. World J. Microbiol. Biotechnol. 26:675–684.
- Cho, K.S., Hong, S.Y., Han, Y.H., Yoon, B.K., Ryu, S.R. and Woo, J.G. 2008. Genetic analysis of clubroot resistance in Chinese cabbage using single-spore isolates of *Plasmodiophora brassicae* and development of RAPD markers linked to its resistance gene. J. CropSci. Biotech. 11:101–106.
- Cho, M.C., Om, Y.H., Huh, Y.C., Cheong, S.R., Kim, D.H. and Mok, I.G. 2009. Breeding of powdery mildew resistant squash 'Kwangmyeong'. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 27:332–335.
- Cho, W.D., Kim, W.G. and Takahashi, K. 2003. Occurrence of clubroot in cruciferous vegetable crops and races of the pathogen in Korea. Plant Pathol. J. 19:64–68.
- Chun, J. 1995. Computer-assisted classification and identification of Actinomycetes. Ph. D. thesis., University of Newcastle, Newcastle upon Tyne, UK.
- Cirulli, M. and Alexander, L.J. 1966. A comparison of pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and different sources of resistance in tomato. Phytopathology 56:1301–1304.
- Cohen, R., Katan, T., Katan, J., and Cohn, R. 1989. Occurrence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1, 2 on muskmelon in Israel. Phytoparasitica 17:319–322.

- Cohen, R., Leibovich, D., Shtienberg, D. and Paris, H.S. 1993. Variability in the reaction of zucchini (*Cucurbita pepo*) to inoculation with *Sphaerotheca fuliginea* and methodology of breeding for resistance. *Plant Pathol.* 42:510-516.
- Cohen, S. and Cohen, Y. 1986. Genetics and nature of resistance to race 2 of *Sphaerotheca fuliginea* in *Cucumis melo* PI124111. *Phytopathology* 76:1165-1167.
- Cohen, Y. and Eyal, H. 1988. Pathogenicity of *Erysiphe cichoracearum* to cucurbits. *CucurbitGenet. Coop. Rep.* 11:87-88.
- Cohen, Y. and Eya, H.I. 1995. Differential expression of resistance to powdery mildew incited by race 1 or 2 of *Sphaerotheca fuliginea* in *Cucumis melo* genotypes at various stages of plant development. *Phytoparasitica* 23:223-230.
- Cohen, Y., Baider, A., Petrov, L., Sheck, L. and Voloisky, V. 2000. Cross-infectivity of *Sphaerotheca fuliginea* to watermelon, melon, and cucumber. *ActaHort.* 510:85-88.
- Crisp, P., Crute, I.R., Sutherland, R.A., Angell, S.M., Bloor, K., Burgess, H. and Gordon, P.L. 1989. The exploitation of genetic resources of *Brassica oleracea* in breeding for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*). *Euphytica* 42:215-226.
- Crute, I.R. and Pink, D.A.C. 1989. The characteristic and inheritance of resistance to clubroot in *Brassica oleracea*. *Aspect. Appl. Biol.* 23:57-60.
- Davis, A.R., Bruton, B.D., Pair, S.D. and Thomas, C.E. 2001. Powdery mildew: An emerging disease of watermelon in the United States. *Cucurbit Genet. Coop. Rep.* 24:42-48.
- Davis, A.R., Tomas, C.E., Levi, A., Bruton, B.D. and Pair, S.D. 2002. Watermelon resistance to powdery mildew race 1, p. 192-198. In: D.N. Maynard (ed.). *Cucurbitaceae '02*. ASHS Press, Alexandria, Va.
- Davis, D. 1966. Cross-infection in Fusarium wilt diseases. *Phytopathology* 56:825-828.
- Davis, D. 1969. Fusaric acid in selective pathogenicity. *Phytopathology* 59:1391-1395.
- Davis, R.M., Kimble, K.A. and Farrar, J.J. 1988. A third race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* identified in California. *Plant Dis.* 72:453.
- Day, P.R. 1954. Physiologic specialization of *Cladosporium fulvum* in England and Wales. *Plant Path.* 3:35-39.
- Deese, D.C. and Stahmann, M.A. 1962. Pectic enzymes and cellulase formation by *Fusarium oxysporum* and *F. cubense* on stem tissues from resistant and susceptible banana plants. *Phytopathology* 52:247-255.
- Desjardins, A.E. and Hohn, T.M. 1997. Mycotoxins in plant pathogenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10:147-152.
- Dickson, M.H. and Hunter, J.E. 1987. Inheritance of resistance in cabbage seedlings to black rot. *Hort. Sci.* 22:108-109.
- du Toit, L.J. and Pelter, G.Q. 2003. Wilt of radish caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* in Washington State. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2003-0616-01-HN.
- Dutta, S.K., Hall, C.V. and Heyne, E.G. 1960. Observations on the physiological races of

- Colletotrichum lagenarium*. Bot. Gaz. 121:163-170.
- El Mohtar, C.A., Atamian, H.S., Dagher, R.B., Abou-Jawdah, Y., Salus, M.S. and Maxwell, D.P. 2007. Marker-assisted selection of tomato genotypes with the I-2 gene for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2. Plant Dis. 91:758-762.
- Enya, J., Ikeda, K., Takeuchi, T., Horikoshi, N., Higashi, T., Sakai, T., Iida, Y., Nishi, K. and Kubota, M. 2009. The first occurrence of leaf mold of tomato caused by races 4.9 and 4.9.11 of *Passalora fulva* (syn. *Fulvia fulva*) in Japan. J. Gen. Plant Pathol. 75:76-79.
- Erwin, D.C. and Ribeiro, O.K. 1996. Phytophthora diseases worldwide. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Eum, H.L., Lee, Y.H., Hong, S.J., Shin, I.S. and Yeung, Y.R. 2012. Quality change during harvest time and storage of various cabbages grown on high land by different transplanting times. J. Bio-Environ. Control 21:95-101.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evol. 39:783-791.
- Figdore, S.S., Ferreira, M.E., Slocum, M.K. and Williams, P.H. 1993. Association of RFLP markers with trait loci affecting clubroot resistance and morphological characters in *Brassica oleracea* L. Euphytica 69:33-44.
- Foster, J.M. and Hausbeck, M.K. 2010. Resistance of pepper to Phytophthora crown, root, and fruit rot is affected by isolate virulence. Plant Dis. 94:24-30.
- Freeman, S., Zveibil, A., Vintal, H., and Maymon, M. 2002. Isolation of nonpathogenic mutants of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* for biological control of Fusarium wilt in cucurbits. Phytopathology 92:164-168.
- Fuchs, H. and Sacristán, M.D. 1996. Identification of a gene in *Arabidopsis thaliana* controlling resistance to clubroot (*Plasmodiophorabrossicae*) and characterization of the resistance response. Mol. Plant-Microbe Interact. 9:91-97.
- Gabe, H.L. 1975. Standardization of nomenclature for pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Trans. Br. Mycol. Soc. 64:156-159.
- Gaumann, E. 1957. Fusaric acid as a wilt toxin. Phytopathology 47:342-357.
- Geiser, D. M., del Mar Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., Zhang, N., Kuldau, G. A. and O'Donnell, K. 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying Fusarium. In Molecular Diversity and PCR-detection of Toxigenic *Fusarium*. Euro. J. Plant Pathol. 110:473-479.
- Gerlagh, M. and Blok, W.J. 1988. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucurbitacearum* n. f. embracing all formae speciales of *F. oxysporum* attacking cucurbitaceous crops. Neth. J. Plant Pathol. 94:17-31.
- Gil Ortega, R.G., Palazon-Espanol, C. and Cuartero-Zueco, J. 1991. Genetics of resistance to *Phytophthora capsici* in the pepper line 'SCM-334'. Plant Breed. 107:50-55.
- Glosier, B.R., Ogundiwin, E.A., Sidhu, G.S., Sischo, D.R. and Prince, J.P. 2008. A differential series of pepper (*Capsicum annuum*) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. Euphytica 162:23-30.

- Goncalves-Vidigal, M.C., Cruz, A.S., Garcia, A., Kami, J., Vidigal Filho, P.S., Sousa, L.L., McClean, P., Gepts, P. and Pastor-Corrales, A. 2011. Linkage mapping of the Phg-1 and Co-1⁴ genes for resistance to angular leaf spot and anthracnose in the common bean cultivar AND 277. *Theor. Appl. Genet.* 122:893-903.
- Goncalves-Vidigal, M.C., Meirelles, C., Poletine, J.P., De Sousa, L.L., Cruz, A.S., Nunes, M.P., Lacanallo, G.F. and Vidigal Filho, P.S. 2012. Genetic analysis of anthracnose resistance in 'Pitanga' dry bean cultivar. *Plant Breed.* 131:423-429.
- Goode, M.J. 1958. Physiological specialization in *Colletotrichum lagenarium*. *Phytopathology* 48:79-83.
- Grandclement, C. and Thomas, G. 1996. Detection and analysis of QTLs based on RADP markers for polygenic resistance to *Plasmodiophora brassicae* Woron in *Brassica oleracea* L. *Theor. Appl. Genet.* 93:86-90.
- Grattidge, R. and O'Brien, R.G. 1982. Occurrence of a third race of Fusarium wilt of tomatoes in Queensland. *Plant Dis.* 66:165-166.
- Greenberg, J.T. and Yao, N. 2004. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell. Microbiol.* 6:201-211.
- Griesbach, E., Loptien, H. and Miersch, U. 2003. Resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson in cabbage *Brassica oleracea* L. *J. Plant Dis. Prot.* 110:461-475.
- Grigoriu, A.C. and Georgopoulos, S.G. 1984. Measurement of the degree and extent of metalaxyl resistance of *Pseudoperonospora cubensis* in Greece. *ISPP Chemical Control Newsl.* 4:12-14.
- Guo, H., Dickson, M.H. and Hunter, J.E. 1991. *Brassica napus* sources of resistance to black rot of crucifers and inheritance of resistance. *Hort. Sci.* 26:1545-1547.
- Hall, C.V., Dutta, S.K., Kalia, H.R. and Rogerson, C.T. 1960. Inheritance of resistance to the fungus *Colletotrichum lagenarium* (Pass.) Ell. and Halst. in watermelons. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 75:638-643.
- Hatakeyama, K., Fujimura, M., Ishida, M. and Suzuki, T. 2004. New classification method for *Plasmodiophora brassicae* field isolates in Japan based on resistance of F₁ cultivars of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) to clubroot. *Breed. Sci.* 54:197-201.
- Hershenhorn, J., Park, S.H., Stierle, A. and Strobel, G.A. 1992. Fusarium avenaceum as a novel pathogen of spotted knapweed and its phytotoxins, acetamido-butenolide and enniatin B. *Plant Sci.* 86:155-160.
- Hirai, M. 2006. Genetic analysis of clubroot resistance in *Brassica* crops. *Breed. Sci.* 56:223-229.
- Hirai, M., Harada, T., Kubo, N., Tsukada, M., Suwabe, K. and Matsumoto, S. 2004. A novel locus for clubroot resistance in *Brassica rapa* and its linkage markers. *Theor. Appl. Genet.* 108:639-643.
- Holliday, P. and Mulder, J.L. 1976. Fulvia fulva No. 487 In: CMI descriptions of pathogenic

- fungi and bacteria. CMI, Kew, Surrey, UK.
- Hollomon, D.W. and Wheeler, I.E. 2002. Controlling powdery mildews with chemistry, p. 249–255. In: R.R. Bélanger, W.R. Bushnell, A.J. Dik, and T.L.W. Carver (eds.). The powdery mildews: A comprehensive treatise. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Homa M, Shobana CS, Singh YR, et al.. 2013. *Fusarium keratitis* in South India: causative agents, their antifungal susceptibilities and a rapid identification method for the *Fusarium solani* species complex. *Mycoses*. 56:501–511.
- Hosoya, K., Kuzuya, M., Murakami, T., Kato, K., Narisawa, K. and Ezura, H. 2000. Impact of the resistant melon cultivars on *Sphaerotheca fuliginea*. *PlantBreed*. 119:286–288.
- Hosoya, K., Narisawa, K., Pitrat, M. and Ezura, H. 1999. Race identification in powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) on melon (*Cucumis melo* L.) in Japan. *PlantBreed*. 118:259–262.
- Huang, C.C. and Lindhout, P. 1997. Screening for resistance in wild *Lycopersicon* species to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1 and race 2. *Euphytica* 93:145–153.
- Huh, Y.C., Hong, K.H., Ko, C.K., Park, K.S., Park, D.K., Lee, J.S., Cho, M.C., Lee, S.Y., Ko, K.D. and Lee, W.M. 2010. Breeding of mid maturing watermelon cultivar, 'Hangyel' with resistance to anthracnose race 3. *Kor. J. of Breed. Sci.* 42:695–698.
- Hunter, J.E., Dickson, M.H. and Ludwig, J. 1987. Source of resistance to black rot of cabbage expressed in seedlings and adult plants. *Pl. Dis.* 71:263–266.
- Hwang, B.K. 2002. Studies of resistance of pepper to *Phytophthora* blight and its control. *Res. Plant Dis.* 8:131–145.
- Hwang, B.K., de Cock, A.W.A.M., Bahnweg, G., Prell, H.H. and Heitefuss, R. 1991. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA among *Phytophthora capsici* isolates from pepper (*Capsicum annuum*). *Systematic Appl. Microbiol.* 14:111–116.
- Idris, A.E., Abouzeid, M.A., Boari, A., Vurro, M. and Evidente, A. 2003. Identification of phytotoxic metabolites of a new *Fusarium* sp. inhibiting germination of *Striga hemonthica* seed. *Phytopathol. Mediterr.* 42:65–70.
- Ignatov, A., Kuginuki, Y. and Hida, K. 1998. Race-specific reaction of resistance to black rot in *Brassica oleracea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 104:821–827.
- Ikegami, H., Ito, T., Imuro, Y. and Naiki, T. 1981. Growth of *Plasmodiophora brassicae* in the root and callus of Chinese cabbage. In: Chinese Cabbage, ed. by N. S. Talekar and T. D. Griggs, pp. 81–90. Asian Vegetable Research and Development Center, Taiwan.
- James, R.V. and Williams, P.H. 1980. Clubroot resistance and linkage in *Brassica campestris*. *Phytopathology* 70:776–779.
- Jang, S.J., Heo, S.H., Jang, C.S. and Kim, H.G. 2007. Races and dominant population of Chinese cabbage clubroot pathogen, *Plasmodiophora brassicae* in Korea. *Plant Dis. Res.* 13:45–49. (In Korean)
- Jenkins, S.F., Winstead, N.N. and McCombs, C.L. 1964. Pathogenic comparison of three new

- and four previously described races of *Glomerella angulata* var. *orbiculare*. Plant Dis. Rep. 48:619–623.
- Jensen, B.D., Massomo, S.M.S., Swai, I.S., Hockenhull, J. and Andersen, S.B. 2005. Field evaluation for resistance to the black rot pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in cabbage (*Brassica oleracea*). Eur. J. Plant Pathol. 113:297–308.
- Jo, S.J., Kyoung, J.S., Choi, Y.H., Kim, J.C. and Choi, G.J. 2010. Convenient screening method of Chinese cabbage for resistance to *Plasmodiophora brassicae* using soil-drenching inoculation. Res. Plant Dis. 16:279–284.
- Jo, S.J., Shim, S.A., Jang, K.S., Choi, Y.H., Kim, J.C. and Choi, G.J. 2012. Development of efficient screening method for resistant cabbage and broccoli to *Plasmodiophora brassicae*. Res. Plant Dis. 18:86–92.
- Jo, S.J., Shim, S.A., Jang, K.S., Choi, Y.H., Kim, J.C. and Choi, G.J. 2011. Resistance of cultivars of Chinese cabbage to *Plasmodiophora brassicae* isolates of several races collected in Korea. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 29:610–616. (In Korean)
- Johnston, T.D. 1968. Clubroot in Brassicae: A standard inoculation technique and the specification of races. Plant Pathol. 17:184–187.
- Jones, D.R., Ingram, D.S. and Dixon, G.R. 1982. Characterization of isolates derived from single resting spores of *Plasmodiophora brassicae* and studies of their interaction. Plant Pathol. 31:239–246.
- Jones, J.B., Jones, J.P., Stall, R.E. and Zitter, T.A. 1991. Compendium of Tomato Diseases. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Jones, J.P. and Overman, A.J. 1971. Control of Fusarium wilt of tomato with limes and soil fumigation. Phytopathology 61:1415–1417.
- Jones, J.P. and Woltz, S.S. 1972. Effect of soil pH and micro-nutrient amendments on Verticillium and Fusarium wilt of tomato. Plant Dis. Rep. 56:151–153.
- Jones, J.P., Overman, A.J. and Geraldson, C.M. 1972. The effect of mulching on the efficacy of DD-MENCS for control of Fusarium wilt of tomato. Plant Dis. Rep. 56:953–956.
- Kamoun, S., Kadmar, H.V., Tola, E. and Kado, C.I. 1992. Incompatible interaction between crucifers and *Xanthomonas campestris* involve a vascular hypersensitive response: role of the hrpX locus. Mol. Plant-Microbe Interact. 5:22–33.
- Kang, B.R., Ko, S.J., Kim, D.I., Choi, D.S. and Kim, S.G. 2011. Determination of proper application timing and frequency for management of tomato leaf mold disease by commercially available microbial preparations. Res. Plant Dis. 17:142–147.
- Kanno, T., Han, X., and Tabei, Y. 1991. Genetic analysis of resistance in cucumber to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. Bulletin of Vegetable Breeding Department, National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea 4:27–30.
- Karling, J.S. 1968. The Plasmodiophorales. Hafner Publ. Co., USA, New York. p. 239.
- Katan, T. 1982. Cross resistance of metalaxyl-resistant *Pseudoperonospora cubensis* to

- other acylalanine fungicides. *Can. J. Plant Pathol.* 4:387-388.
- Keinath, A.P. 2000. Effect of protectant fungicide application schedules on gummy stem blight epidemics and marketable yield of watermelon. *Plant Dis.* 84:254-260.
- Kelly, J.D. and Vallejo, V. 2004. A Comprehensive review of the major genes conditioning resistance to anthracnose in common bean. *Hort. Sci.* 39:1196-1207.
- Kendric, J.B. and Snyder, W.C. 1936. A vascular *Fusarium* disease of radish. *Phytopathology* 26:98.
- Kenigsbuch, D. and Cohen, Y. 1992. Inheritance and allelism of genes for resistance to races 1 and 2 of *Sphaerotheca fuliginea* in muskmelon. *Plant Dis.* 76:626-629.
- Kern, H. 1972. Phytotoxins produced by *Fusaria*. p. 35-48. In: R.K.S. Wood, A. Balili, and A. Graniti (eds.). *Phytotoxins in Plant Disease*. Academic Press, New York.
- Khadar, A.S. and Abdou, Y.A. 1972. Comparison of systemic and contact fungicides for control of powdery mildew on squash and cucumber. *Plant Dis. Rep.* 56:878-881.
- Kim, B.R., Kang, H.W., Yu, S.H., Itho, Y. and Kohmoto, K. 1998. RAPD analysis of host-specific toxin (HST) producing *Alternaria* species. *Korean J. Plant Pathol.* 14:92-98.
- Kim, B.S., Kwon, T.R., Hwang, J.E., Lee, J.M., Park, D.G., Ahn, J.H. and Kim, H.Y. 2010. Resistance to *Phytophthora* blight of commercial pepper cultivars in Korea. *Res. Plant Dis.* 16:141-147.
- Kim, C.H. 1992. Vegetable products disease control focus research (7) tomato. *Agrochem. Plant Protec.* 13:80-88.
- Kim, J.T. 2000. Pathogenicity and ecophysiological characteristics of *Fusarium oxysporum* causing tomato wilt disease. The degree of Doctor. Chungnam National University.
- Kim, S.D. 1993. Studies on the mode of action of HC-toxin (I). *Korean Biochem. J.* 26:51-53.
- Kim, Y.J., Hwang, B.K. and Park, K.W. 1989. Expression of age-related resistance in pepper plants infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Dis.* 73:745-747.
- Kim, Y.S, Park, K.S., Yu, S.H. and Lee, M.H. 2011. Species of tomato 2011. Center for Tomato Research and Service (CTRS), Cheonan, Korea.
- Kimble, K.A. and Grogan, R.G. 1960. Resistance to *Phytophthora* root rot in pepper. *Plant Dis. Rep.* 44:872-873.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequence. *J. Mol. Evol.* 16:111-120.
- Kocks, C.G., Ruissen, M.A., Zadoks, J.C. and Duijkers, M.G. 1998. Survival and extension of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in soil. *Eur. J. Plant Pathol.* 104:911-923.
- Kolte, S.J., Bordoloi, D.K. and Awarhi, R.P. 1991. The search for resistance to major diseases of rapeseed and mustard in India. *GCIRC Rapeseed Congr.* 6: 219-225.
- Komyoji, T., Sugimoto, K., Mitani, S., Matsuo, N. and Suzuki, K. 1995. Biological properties of a new fungicide, fluazinam. *J. Pestic. Sci.* 20:129-135.
- Kooistra, E. 1968. Powdery mildew resistance in cucumber. *Euphytica* 17:236-244.
- Křístková, C., Leveda, A. and Sedláková, B. 2004. Virulence of Czech cucurbit powdery

- mildew isolates on *Cucumis melo* genotypes MR-1 and PI124112. *Scientia Hort.* 99:257-265.
- Ku, K.H., Lee, K.A., Kim, Y.L. and Lee, Y.W. 2006. Quality characteristics of hot-air dried radish (*Raphanus sativus* L.) leaves. *J. Korea Soc. Food Sci. Nutr.* 35:780-785.
- Kuc, J. 1987. Plant immunization and its applicability for disease control. In: *Innovative approaches to plant disease control*, ed. by I. Chet, pp. 255-274. John Wiley, New York.
- Kuc, J. 1994. Induced systemic resistance, a non-pesticide technology for disease control in plant, p. 511-518. In: D. L. Weigmann (ed.). *Proc. 4th. Nat. Conf. Pesticides*. Blacksburg, Virginia.
- Kuginuki, Y., Ajisaka, H., Yui, M., Yoshikawa, H., Hida, K. and Hirai, M. 1997. RAPD markers linked to a clubroot-resistance locus in *Brassica rapa* L. *Euphytica* 98:149-154.
- Kuginuki, Y., Yoshikawa, H. and Hirai, M. 1997. RAPD markers linked to a clubroot-resistance locus in *Brassica rapa* L. *Euphytica* 98:149-154.
- Kuginuki, Y., Yoshikawa, H. and Hirai, M. 1999. Variation in virulence of *Plasmodiophora brassicae* in Japan tested with clubroot resistance cultivars of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Eur. J. Plant Pathol.* 105:327-332.
- Kuzniak, E. 2001. Effects of fusaric acid on reactive oxygen species and antioxidants in tomato cell cultures. *Phytopathology* 149:575-582.
- Kuzuya, M., Yashiro, K., Tomita, K. and Ezura, H. 2006. Powdery mildew (*Podosphaera xanthii*) resistance in melon is categorized into two types based on inhibition of the infection processes. *J. Exp. Bot.* 57:2093-2100.
- Landry, B.S., Hubert, N., Crete, R., Chiang, M.S., Lincoln, S.E. and Etoh, T. 1992. A genetic map for *Brassica oleracea* based on RFLP markers detected with expressed DNA sequences and mapping of resistance gene to race 2 of *Plasmodiophora brassicae* (Woronin). *Genome* 35:409-420.
- Laterrot, H. 1981. First results of the study of the effectiveness against *Cladosporium fulvum* 24 new origins resistant tomato. *Eucarpia Tomato Meeting*, Avignon, France p. 293-298.
- Laterrot, H. 1986. Race 2.5.9, a new race of *Cladosporium fulvum* (*Fulvia fulva*) and sources of resistance in tomato. *Neth. J. Pl. Path.* 92:305-307.
- Laterrot, H. and Clerjeau, M. 1979. Determination of *Fulvia fulva* (= *Cladosporium fulvum*) pathotypes existing on tomato in French glasshouses. *Ann. Amélior. Plantes* 29:447-462.
- Laterrot, H. and Philouze, J. 1984. Recombination between resistance to pathotype 1 (I-2 allele) and susceptibility to pathotype 0 (I+ allele) of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Pages 70-74 in: *Synop. Meet. Eucarpia Tomato Working Group*, IXth. Institute for Horticultural Plant Breeding, Wageningen, the Netherlands.
- Laterrot, H., Gerlagh, M., Ester, A. and Stamova, L. 1985. Race 2.5, a new race of

- Cladosporium fulvum* (*Fulvia fulva*) on tomato. Neth. J. Pl. Path. 91:45–47.
- Latin, R. X., and Snell, S. J. 1986. Comparison of methods for inoculation of muskmelon with *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. Plant Dis. 70:297–300.
- Laurens, F. and Thomas, G. 1993. Inheritance of resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Wor.) in kale (*Brassica oleracea* ssp. *acephala*). Hereditas 119:253–262.
- Lee, J.D., Hong, J.H., Do, J.W. and Yoon, J.B. 2010. Identification of QTLs for resistance to anthracnose to two *Colletotrichum* species on pepper. J. Crop Sci. Biotech. 13:227–233.
- Lee, J.G. and Kim, J.S. 2010. Variation of glucosinolate content in the root of susceptible and resistant Chinese cabbage cultivars during development of clubroot disease. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 20:200–208.
- Lee, S.B., Lee, C.S., Kim, S.K., Hong, S.S., Choi, J.K., Lee, J.H. and Kim, C.H. 2001. Screening result varieties of crucifer crops to clubroot disease caused by *Plasmodiophora brassicae* in Korea. Plant Pathology J. 17:369–370.
- Lee, S.G. and Lee, W.H. 1994. Control of Fusarium wilt of watermelon with the root–stock grafting of *Sicyos angulatus* L. Korean J. Plant Pathol. 10: 240–244.
- Lee, S.J. and Kim, B.S. 2012. Evaluation of pepper genetic sources (*Capsicum* spp.) for disease resistance breeding. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 30:185–191.
- Lee, S.J., Kim, M.H., Oh, S.S. and Chun, H.S. 2012. Trends in researches of Fusarium mycotoxins, T-2 toxin and HT-2 toxin in domestic and foreign countries. J. Fd Hyg. Safety 27:1–17.
- Lee, S.J., Park, Y.J., Kim, H.T. and Kim, B.S. 2010. The race differentiation of *Phytophthora capsici* in Korea. Res. Plant Dis. 16:153–157.
- Lee, S.O. 2007. Agricultural products story (21) Cabbage. Agrochemical News Magazine 28:48–48.
- Lee, S.S., Suh, H.B. and Choi, W.J. 2001. Population improvement for multi–resistance to *Turnip mosaic virus* and clubroot disease by recurrent selection in Chinese cabbage. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 42:685–688.
- Lefebvre, V. and Palloix, A. 1996. Both epistatic and additive effects of QTLs are involved in polygenic induced resistance to disease: a case study, the interaction pepper–*Phytophthora capsici* Leonian. Theor. Appl. Genet. 93:503–511.
- Lefebvre, V., Pflieger, S., Thabuis, A., Caranta, C., Blattes, A., Chauvert, J.C., Daubeze, A.M. and Palloix, A. 2002. Towards the saturation the pepper linkage map by alignment of three intraspecific maps including known–function genes. Genome 45:839–845.
- Lind, J. 1909. Tomato varieties are not affected by the disease of tomato leaf mold. Gardner Tidende. 25:201.
- Lindhout, P., Korta, W., Cislik, M., Vos, I. and Gerlagh, T. 1989. Further identification of races of *Cladosporium fulvum* (*Fulvia fulva*) on tomato originating from the Netherlands, France and Poland. Neth. J. Pl. Path. 95:143–148.
- Luz, J.M., Paterson, R.R.M. and Brayford, D. 1990. Fusaric acid and other metabolite production in *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Lett. Appl. Microbiol. 11:141–144.

- Manzanares-Dauleux, M.J., Divaret, I., Baron, F. and Thomas, G. 2000. Evaluation of French *Brassica oleracea* landraces for resistance to *Plasmodiophora brassicae*. *Euphytica* 113:211–218.
- Marasas, W.F., Nelson, P.E. and Toussoun, T.A. 1984. Toxigenic *Fusarium* species. The Pennsylvania State University Press, University Park.
- Marlatt, M.L., Correll, J.C., Kaufmann, P. and Cooper, P.E. 1996. Two genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in the United States. *Plant. Dis.* 80:1336–1342.
- Marthe, F., Scholze, P., Griesbach, E. and Ryschka, U. 2002. New resistances to black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*), clubroot (*Plasmodiophora brassicae*), blackleg and leaf spots (*Phoma lingam*) from genus *Brassica* to enhance resistance in cabbage (*Brassica oleracea*). 13. Crucifer Genetics Workshop, Davis, USA p.88.
- Martyn, R.D. and McLaughlin, R.J. 1983. Susceptibility of summer squash to the watermelon wilt pathogen (*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*). *Plant Dis.* 67:263–266.
- Matsumoto, E., Yasui, C., Ohi, M. and Tsukada, M. 1998. Linkage analysis of RFLP markers for clubroot resistance and pigmentation in Chinese cabbage. *Euphytica* 104: 79–86.
- Matsumoto Y, Ogawara T, Miyagi M, Watanabe N, Kuboyama T. 2011. Response of wild cucumis species to inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1,2y. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 80:414–419.
- Mattush, P. 1977. Epidemiology of clubroot of crucifers caused by *Plasmodiophora brassicae*. In: Woronin 100 International Conference on Clubroot, ed. by S. T. Buczacki and P. H. Williams, pp. 22–28. University of Wisconsin, Madison, WI.
- McCreight, J.D. 2006. Melon–powdery mildew interactions reveal variation in melon cultigens and *Podosphaera xanthii* races 1 and 2. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 131:59–65.
- McGrath, D.J., Gillespie, D. and Vawdrey, L. 1987. Inheritance of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races 2 and 3 in *Lycopersicon pennellii*. *Aust. J. Agric. Res.* 38:729–733.
- McGrath, M.T. 2001a. Fungicide resistance in cucurbit powdery mildew: Experiences and challenges. *Plant Dis.* 85:236–245.
- McGrath, M.T. 2001b. Distribution of cucurbit powdery mildew races 1 and 2 on watermelon and muskmelon. *Phytopathology* 91:197–197.
- McGrath, M.T. and Thomas, C.E. 1996. Powdery mildew, p. 28–30. In: T.A. Zitter, D.L. Hopkins, and C.E. Thomas (eds.). Compendium of cucurbit diseases. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
- McMillan, R.T. 1986. Cross pathogenicity studies with isolates of *Fusarium oxysporum* from either cucumber or watermelon pathogenic to both crop species. *Ann. Appl. Biol.* 109:101–105.
- Mes, J.J., Weststeijn, E.A., Herlaar, F., Lambalk, J.J.M., Wijbrandi, J., Haring, M.A. and

- Cornelissen, B.J.C. 1999. Biological and molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* divides race 1 isolates into separate virulence groups. *Phytopathology* 89:156-160.
- Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (MIFAFF). 2007. Crop production, p. 112-113. In: *Agricultural & Forestry Statistical Yearbook*.
- Mitani, S., Sugimoto, K., Hayashi, H., Takii, Y., Ohshima, T. and Matsuo, N. 2003. Effects of cyazofamid against *Plasmodiophora brassicae* Woronin on Chinese cabbage. *Pest Manag. Sci.* 59:287-293.
- Monakhos, G.F. and Djalilov, F.S. 2000. Genetic sources and methods for estimation of brassicas resistance to black rot. *J. Russ. Phytopathol. Soc.* 1:83-88.
- Moon, Y.G., Kim, W.G., Cho, W.D. and Sung, J.M. 2001. Occurrence of Fusarium wilt on cruciferous vegetable crops and pathogenic differentiation of the causal fungus. *Res. Plant Dis.* 7:93-101.
- Moriguchi, K., Kimizuka-Takagi, C., Ishii, K. and Nomura, K. 1999. A genetic map based on RAPD, RFLP, isozyme, morphological markers and QTL analysis for clubroot resistance in *Brassica oleracea*. *Breed. Sci.* 49:257-265.
- Morishita, M., Sugiyama, K., Saito, T. and Sakata, Y. 2003. Powdery mildew resistance in cucumber. *JARQ* 37:7-14.
- Moriwaki, J., Tsukiboshi, T. and Sato, T. 2002. Grouping of *Colletotrichum* species in Japan based on rDNA sequences. *J. Gen. Plant Pathol.* 68:307-320.
- Murakami, H., Tsushima, S., Akimoto, T., Murakami K., Goto, I. and Shishido, Y. 2000. Effects of growing leafy daikon (*Raphanus sativus*) on population of *Plasmodiophora brassicae* (Clubroot). *Plant Pathol.* 49:584-589.
- Na, J.h. 2008. Cabbage and broccoli. In: *The Recent History of Vegetable Seed Industry in Korea*, ed. by Park, H.G., Kwon, O.H., Kim, H.T., Na, J.H., Park, Y., Park, J.Y., Park, C.S. and Cho, Y.C. pp. 271-280. Seoul National University Press, Seoul, Korea. (In Korean)
- Nakata, K. and Takimoto, K. 1928. List of disease of cultivated plants in Korea. *J. Agric. Exp. Stn., Govern-Gen. Chosen* 15:77-78 (In Japanese).
- Nam, S.H. 1994. PhD Diss., ChungNam Natl. Univ., Daejeon, Korea.
- Narisawa, K., Shimura, M., Usuki, F., Fukuhara, S. and Hashiba, T. 2005. Effects of pathogen density, soil moisture, and soil pH on biological control of clubroot in Chinese cabbage by *Heteroconium chaetospora*. *Plant Dis.* 89:285-290.
- Netzer, D., Niego, S., and Galun, E. 1977. A dominant gene conferring resistance to Fusarium wilt in cucumber. *Phytopathology* 67:525-527.
- Nirenberg, H.I., Feiler, U. and Hagedorn, G. 2002. Description of *Colletotrichum lupini* comb. nov. in modern terms. *Mycologia* 94:307-320.
- Nomura, K. and Ishii, K. 1989. Effect of environmental conditions on pathogenicity and host

- range of yellow fusaria, *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* and f. sp. *raphani*. Bulletin of the College of Agriculture and Veterinary Medicine Nihon University, Japan. No. 46: 48–56.
- Nomura, K., Minegishi, Y., Kimizuka-Takagi, C., Fujioka, T., Moriguchi, K., Shishido, R. and Ikehashi, H. 2005. Evaluation of F₂ and F₃ plants introgressed with QTLs for clubroot resistance in cabbage developed by using SCAR markers. *Plant Breed.* 124:371–375.
- Norton, J. 1914. Resistance to *Cladosporium fulvum* in tomato varieties. *Phytopathology* 4:398.
- O'Donnell, K. O., Cigelnik, E., and Casper, H. H. 1998. Molecular phylogenetic, morphological and mycotoxin data support reidentification of the Quorn mycoprotein fungus as *Fusarium venenatum*. *Fungal Genet. Biol.* 23:57–67.
- Oelke, L.M., Bosland, P.W. and Steiner, R. 2003. Differentiation of race specific resistance to Phytophthora root rot and foliar blight in *Capsicum annuum*. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 128:213–218.
- Oh, I.N., Choi, S.H., Park, S.Y., Lim, Y.P. and An, G.H. 2011. Effect of season, tissue position and color on content of amino acids in cabbage (*Brassica oleracea*). *CNU J. Agr. Sci.* 38:79–86.
- Owen, J.H. 1955. Fusarium wilt of cucumber. *Phytopathology* 45:435–439.
- Owen, J.H. 1956. Cucumber wilt, caused by *Fusarium oxysporum* f. *cucumerinum* n.f. *Phytopathology* 46:153–157.
- Pakdeevaporn, P., Wasee, S., Taylor, P.W.J. and Mongkolporn, O. 2005. Inheritance of resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum capsici* in Capsicum. *Plant Breed.* 124:206–208.
- Park, H.G. et al. 2008. The recent history of vegetable seed industry in Korea. Seoul National University Press, Seoul.
- Park, K.S. and Kim, C.H. 1992. Identification, distribution and etiological characteristics of anthracnose fungi of red pepper in Korea. *Korean J. Plant Pathol.* 8:61–69.
- Park, M.S., Jeong, B., Jang, K.S., Choi, Y.H., Kim, J.C. and Choi, G.J. 2012. Development of efficient screening methods for resistance of tomato to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 30:426–431.
- Park, M.S., Seo, G.S., Bae, K.S. and Yu, S.H. 2005. Characterization of *Trichoderma* spp. associated with green mold of oyster mushroom by PCR-RFLP and sequence analysis of ITS regions of rDNA. *Plant Pathology J.* 21:229–236.
- Percheviel, L., Bardin, M., Dogimont, C. and Pitrat, M. 2005. Relationship between loci conferring downy mildew and powdery mildew resistance in melon assessed by quantitative trait loci mapping. *Phytopathology* 95:556–565.
- Pérez-García, A., Olalla, L., Rivera, E., delPino, D., Canovas, I., de Vicented, A. and Torés, J.A. 2001. Development of *Sphaerotheca fusca* on susceptible, resistant, and

- temperature-sensitive resistant cultivars Mycol. Res. 105:1216-1222.
- Peterka, H., Budahn, H., Schrader, O., Ahne, R. and Schutze, W. 2004. Transfer of resistance against the beet cyst nematode from radish (*Raphanus sativus*) to rape (*Brassica napus*) by monosomic chromosome addition. Theor. Appl. Genet. 109:30-41.
- Peterson, J.L. and Pound, G.S. 1960. Studies on resistance in radish to *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*. Phytopathology 50:807-816.
- Pflieger, S., Palloix, A., Caranta, C., Blattes, A. and Lefebvre, V. 2001. Defense response genes co-localize with quantitative disease resistance loci in pepper. Theor. Appl. Genet. 103:920-929.
- Piao, Z., Ramchiary, N. and Lim, Y.P. 2009. Genetics of clubroot resistance in *Brassica* species. J. Plant Growth Regul. 28:252-264.
- Piao, Z.Y., Deng, Y.Q., Choi, S.R., Park, Y.J. and Lim, Y.P. 2004. SCAR and CAPS mapping of *CRb*, a gene conferring resistance to *Plasmodiophora brassicae* in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). Theor. Appl. Genet. 108:1458-1465.
- Piao, Z.Y., Park, Y.J., Choi, S.R., Hong, C.P., Park, J.Y. and Lim, Y.P. 2002. Conversion of AFLP marker linked to clubroot resistance gene into SCAR marker. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 43:653-659.
- Placinta, C.M., D'Mello, J.P.F. and Macdonald, A.M.C. 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. Anim. Feed Sci. Technol. 78:21-37.
- Polach, F.J. and Webster, R.K. 1972. Identification of strains and inheritance of pathogenicity in *Phytophthora capsici*. Phytopathology 62:20-26.
- Porter, J.K., Bacon, C.W. and Norred, W.P. 1990. Effects of *Fusarium moniliforme* and corn associated with equine leukoencephalomalacia on rat neurotransmitters and metabolites. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 194:265-269.
- Pound, G.S. 1959. Red Prince is new radish. Wis. Univ. Agric. Exp. Sta. Bull. 538:93.
- Pound, G.S. and Fowler, D.L. 1953. *Fusarium* wilt of radish in Wisconsin. Phytopathology 43:277-280.
- Quazi, M.H. 1988. Interspecific hybrids between *Brassica napus* and *Brassica oleracea* L. developed by embryo culture. Theor. Appl. Genet. 75:309-318.
- Ramirez-Villupadua, J., Endo, R.M., Bosland, P. and Williams, P.H. 1985. A new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* that attacks cabbage type A resistance. Plant Dis. 69:612-613.
- Rhodes, B.B. 1979. Race 2 anthracnose resistance in a watermelon line with a pale leaf character. Cucurbit Genet. Coop. 2:29-30.
- Risser, G., Banihashemi Z, Davis, D. W. 1976. A proposed nomenclature of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* races and resistance genes in *Cucumis melo*. Phytopathology 66:1105-1106.
- Robinson, R.W. and Provvidenti, R. 1975. Susceptibility to powdery mildew in *Citrullus lanatus* (Thunb.). J. Am. Soc. Hort. Sci. 100:328-330.

- Rocherieux, J., Glory, P., Giboulot, A., Boury, S., Barbeyron, G., Thomas, G. and Manzaneres-Dauleux, M.J. 2004. Isolate-specific and broad-spectrum QTLs are involved in the control of clubroot in *Brassica oleracea*. *Theor. Appl. Genet.* 108:1555-1563.
- Schaad, N.W. and Dianese, J.C. 1981. Cruciferous weeds as sources of inoculum of *Xanthomonas campestris* in black rot of crucifers. *Phytopathology* 71:1215-1220.
- Scheijgrond, W. and Vos, H. 1954. Investigation on the susceptibility to clubroot. *Euphytica* 3:125-139.
- Scot, E.S. and Loh, C.S. 1985. Inoculation of secondary embryos of oilseed rape with single resting spores of *Plasmodiophora brassicae*. *Cruciferae Newsletter* 8:28-29.
- Scott, J.W. and Jones, J.P. 1989. Monogenic resistance in tomato to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3. *Euphytica* 40:49-53.
- Shahin, E.A. and Spivey, R. 1986. A single dominant gene for Fusarium wilt resistance in protoplast-derived tomato plants. *Theor. Appl. Genet.* 73:164-169.
- Sharma, B.R., Swarup, V. and Chatterjee, S.S. 1972. Inheritance of resistance to black rot in cauliflower. *Can. J. Genet. Cytol.* 14:363-370.
- Sherf, A.F. and Macnab, A.A. 1986. Anthracnose. In : *Vegetable Diseases and Their Control* 2nd ed., pp. 316-320. John Wiley & Sons, New York.
- Sherf, A.F. and Macnab, A.A. 1986. Yellows, p. 264-265. In: *Vegetable diseases and their control*. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Sherriff, C., Whelan, M.J., Arnold, W.G., Lafay, J.F., Brygoo, Y. and Bailey, J.A. 1994. Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. *Exp. Mycol.* 18:121-138.
- Shimotori, H., Yanagida, H., Enomoto, Y., Igarashi, K., Yoshinari, M. and Umemoto, M. 1996. Evaluation of benzenesulfonanilide derivatives for the control of crucifers clubroot. *J. Pestic. Sci.* 21:31-35.
- Shin, H.D. 1994. Powdery mildew fungi and their host plants from Kangwon province. *Korean J. Mycol.* 22:229-246.
- Shin, H.D. and La, Y.J. 1993. Morphology of edge lines of chained immature conidia on conidiophores in powdery mildew fungi and their taxonomic significance. *Mycotaxon* 46:445-451.
- Sitterly, W.R. 1973. Cucurbits. In: R.R. Nelson (ed). *Breeding plants for disease resistance, concepts and application*. Penn State University Press, University Park.
- Sitterly, W.R. 1978. Powdery mildews of cucurbits, p. 360-379. In: D.M. Spencer (ed.). *The powdery mildews*. Academic Press, London.
- Sitterly, W.R. and Keinath, A.P. 1996. Anthracnose. p. 24-25. In: T.A. Zitter, D.L. Hopkins, and C.E. Thomas (eds.). *Compendium of cucurbit diseases*. The American Phytopathological Society, USA.
- Slusarenko, A.J., Fraser, R.S.S. and van Loon, L.C. 2000. Mechanisms of resistance to plant diseases p.21-52. In: A. M. Alvarez. *Black rot of crucifers*. Kluwer Academic Publishers.

Netherlands.

- Smith E.F. 1911. Bacteria in relation to plant diseases, Vol. 2, p.300–334. Carnegie Inst, Washington D.C.
- Smith, P.G. 1948. Powdery mildew resistance in cucumber. *Phytopathology* 38:1027–1028.
- Smith, P.G., Kimble, K.A., Grogan, R.G. and Millett, A.H. 1967. Inheritance of resistance in peppers to *Phytophthora* root rot. *Phytopathology* 57:377–379.
- Smith, T.K. and Sousadias, M.G. 1993. Fusaric acid content of swine feedstuffs. *J. Agric. Food Chem.* 41:2296–2298.
- Snyder, W.C. and Hansen, H.N. 1940. The species concept in *Fusarium*. *Am. J. Bot.* 27:64–67.
- Soengas, P., Hand, P., Vicente, J.G., Pole, J.M. and Pink, D.A.C. 2007. Identification of quantitative trait loci for resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Brassica rapa*. *Theor. Appl. Genet.* 114:637–645.
- Song, H.H., Kim, J. and Lee, C. 2006. A review of mycotoxins from *Fusarium* species. *Safe Food* 1:19–28.
- Song, J.O., Kim, Y.W. and Cho, J.H. 1996. Varietal difference and inheritance of cabbage yellows (*Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* Snyder et Hansen) resistance in cabbage. *Korean J. Breed.* 28:171–177.
- Sowell, G., Jr., Rhodes, B.B. and Norton, J.D. 1980. New sources of resistance to watermelon anthracnose. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105:197–199.
- Stall, R.E., and Walter, J.M. 1965. Selection and inheritance of resistance in tomato to isolates of race 1 and 2 of the *Fusarium* wilt organism. *Phytopathology* 55:1213–1215.
- Staub, T. and Williams, P.H. 1972. Factors influencing black rot lesion development in resistant and susceptible cabbage. *Phytopathology* 62:722–728.
- Stewart, F.C. and Harding, H.A. 1903. Combating the black rot of cabbage by the removal of affected leaves. *New York State Agricultural Experiment Station Bulletin* 232:43–65.
- Strandberg, J.Q. and Williams, P.H. 1967. Inheritance of clubroot resistance in Chinese cabbage. *Phytopathology* 57:330.
- Sutton, M.D. and Williams, P.H. 1970. Relation of xylem plugging to black rot lesion development in cabbage. *Can. J. Bot.* 48:391–401.
- Suvanprakorn, K. and Norton, J.D. 1980. Inheritance of resistance to race 2 anthracnose in watermelon. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105:862–865.
- Suwabe, K., Tsukada, H., Iketani, H., Hatakeyama, K., Fujimura, M., Nunome, T., Fukuoka, H., Matsumoto, S. and Hirai, M. 2003. Identification of two loci for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in *Brassica rapa* L. *Theor. Appl. Genet.* 107:997–1002.
- Suzuki, S. 1978. Growth of radishes as influenced by the high temperatures above the optimum range. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 47: 375–381.
- Sy, O., Steiner, R. and Bosland, P.W. 2008. Recombinant inbred line differential identifies race-specific resistance to *Phytophthora* root rot in *Capsicum annuum*. *Phytopathology*

98:867-870.

- Takada, K., Kanazawa, K. and Takatuka, K. 1974. Studies on the breeding of melon for resistance to powdery mildew. I. Difference of resistance among varieties and the breeding of the resistant variety 'Sunrise'. Bull. Natl. Res. Inst. Veg. Ornam. Plants Tea Jpn. p. 59-91.
- Takada, K., Kanazawa, K. and Takatuka, K. 1975. Studies on the breeding of melon for resistance to powdery mildew. II. Inheritance of resistance to powdery mildew and correlation of resistance with other characters. Bull. Natl. Res. Inst. Veg. Ornam. Plants Tea Jpn. p. 11-31.
- Takken, F.L.W., Schipper, D., Nijkamp, H.J.J. and Hille, J. 1998. Identification and Ds-tagged isolation of a new gene at the *Cf-4* locus of tomato involved in disease resistance to *Cladosporium fulvum* race 5. Plant J. 14:401-411.
- Tamietti, G. and Valentino, D. 2001. Physiological characterization of a population of *Phytophthora capsici* Leon. from northern Italy. J. Plant Pathol. 83:1101.
- Tanaka, S., Fujiyama, S., Shigemori, S., Nakayama, A., Ito, S. and Kameya, I.M. 1998. Pathogenesis of isolates of *Plasmodiophora brassicae* from Japan. (1) Race and pathogenesis in clubroot resistant cultivars. Proc. Assoc. Plant Protect. Kyushu 44:15-19.
- Tanaka, S., Kochi, S., Kunita, H., Ito, S. and Kameya, I.M. 1999. Biological mode of action of the fungicide, flusulfamide, against *Plasmodiophora brassicae* (clubroot). Eur. J. Plant Pathol. 105:577-584.
- Tanaka, S., Mido, H. and Ito, S. 2006. Colonization by two isolates of *Plasmodiophora brassicae* with differing pathogenicity on a clubroot-resistant cultivar of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis*). J. Gen. Plant Pathol. 72:205-209.
- Taylor, J.D., Conway, J., Roberts, S.J., Astley, D. and Vicente, J.G. 2002. Sources and origin of resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Brassica* genomes. Phytopathology 92:105-111.
- Tetteh, A.Y., Wehner, T.C. and Davis, A.R. 2013. Inheritance of resistance to the new race of powdery mildew in watermelon. Crop Sci. 53:880-887.
- Teunissen, H.A.S., Boer, Y., Verkooijen, J., Cornelissen, B.J.C. and Haring, M.A. 2003. A near-isogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* strain with a novel combination of avirulence characteristics. Phytopathology 93:1360-1367.
- Thabuis, A., Lefebvre, V., Bernard, G., Daubeze A.M., Phaly, T., Pochard, E. and Palloix, A. 2004. Phenotypic and molecular evaluation of a recurrent selection program for a polygenic resistance to *Phytophthora capsici* in pepper. Theor. Appl. Genet. 109:342-351.
- Thabuis, A., Palloix, A., Pflieger, S., Daubeze, A.M., Caranta, C. and Lefebvre, V. 2003. Comparative mapping of *Phytophthora* resistance loci in pepper germplasm: Evidence for conserved resistance loci across Solanaceae and for a large genetic diversity. Theor. Appl. Genet. 106:1473-1485.
- Thang, J.H., Wang, W. and Wang, Y.C. 2006. Molecular Detection of *Colletotrichum*

- orbiculare*. Sci. Agric. Sin. 39:2028–2035.
- The Korean Society of Plant Pathology (KSPP). 2009. Vegetables, p. 99–103. In: W.-G. Kim and H.M. Koo (eds.). List of plant disease in Korea. 5th ed. KSPP, Suwon, Korea.
- Thomas, C.E., Kishaba, E., McCreight, J.D. and Nugent, P.E. 1984. The importance of monitoring races of powdery mildew on muskmelon. Cucurbit Genet. Coop. Rep. 7:58–59.
- Thomas, C.M., Dixon, M.S., Parniske, M., Golstein, C. and Jones, J.D.G. 1998. Genetic and molecular analysis of tomato *Cf* genes for resistance to *Cladosporium fulvum*. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 353:1413–1424.
- Thomma, B.P.H.J., van Essee, H.P., Crous, P.W. and de Wit, P.J.G.M. 2005. *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic Mycosphaerellaceae. Mol. Plant Pathol. 6:379–393.
- Thompson, D.C. and Jenkins, S.F. 1985. Influence of cultivar resistance, initial disease, environment, and fungicide concentration and timing on anthracnose development and yield loss in picking cucumbers. Phytopathology 75:1422–1427.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 24:4876–4882.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22:4673–4680.
- Tonguc, M., Earle, E.D. and Griffiths, P.D. 2003. Segregation distortion of *Brassica carinata* derived black rot resistance in *Brassica oleracea*. Euphytica 134:269–276.
- Toshimitsh, Y. and Noguchi, T. 1975. Inheritance of resistance to Fusarium wilt in cucumber. Proceedings of the Meeting of the Japanese Horticultural Society, 150–1.
- Toxopeus, H. and Janssen, A.M.P. 1975. Clubroot resistance in turnip II. The 'slurry' screening method and clubroot races in the Netherlands. Euphytica 24:751–755.
- Vakalounakis, D.J. 1993. Inheritance and genetic linkage of fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* race 1) and scab (*Cladosporium cucumerinum*) resistance genes in cucumber (*Cucumis sativus*). Ann. appl. Biol. 123:359–365.
- Vakalounakis, D.J. 1995. Inheritance and linkage of resistance in cucumber line SMR-18 to races 1 and 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. Plant Pathol. 44:169–172.
- Vakalounakis, D.J. 1996. Allelism of the *Fcu-1* and *Foc* genes conferring resistance to Fusarium wilt in cucumber. Eur. J. Plant Pathol. 102, 855 – 858.
- Vakalounakis, D.J. and Klironomou, E. 1995. Race and mating type identification of powdery mildew on cucurbits in Greece. Plant Pathol. 44:1033–1038.
- Vakalounakis, D.J. and Klironomou, E. 2001. Taxonomy of *Golovinomyces* on cucurbits. Mycotaxonomy 80:489–491.
- Vakalounakis, D.J., Klironomou, E. and Papadakis, A. 1994. Species spectrum, host range and distribution of powdery mildews on Cucurbitaceae in Crete. Plant Pathol. 43:813–818.

- Vakalounakis, D.J., Smardas, K. 1995. Genetics of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* races 1 and 2 in cucumber line Wisconsin-2757. *Ann. Appl. Biol.* 127: 457-461.
- Van Asch, M.A.J., Rijkenberg, F.H.F. and Coutinho, T.A. 1992. Phytotoxicity of fumonisin B₁, moniliformin and T-2 toxin in corn callus cultures. *Phytopathology* 82:1330-1332.
- van den Ackerveken, G.F.J.M., van Kan, J.A.L. and de Wit, P.J.G.M. 1992. Molecular analysis of the avirulence gene *avr9* of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* fully supports the gene-for-gene hypothesis. *Plant J.* 2:359-366.
- van Kan, J.A.L., van den Ackerveken, G.F.J.M. and de Wit, P.J.G.M. 1991. Cloning and characterization of cDNA of avirulence gene *avr9* of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, causal agent of tomato leaf mold. *Mol. Plant Microbe Interact.* 4:52-59.
- Van Peer, R., Xu, T., Rattink, H. and Schippers, B. 1988. Biological control of carnation wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in hydroponic system. *ISOSC Proc.* 361-373.
- Van Poucke, K., Monbaliu, S., Munaut, F., Heungens, K., De Saeger, S. and Van Hove, F. 2012. Genetic diversity and mycotoxin production of *Fusarium lactis* species complex isolates from sweet pepper. *J. Food Microbiol.* 153:28-37.
- Vesonder, R.E. and Golinski, P. 1989. Metabolites of *Fusarium*. p. 1-39. In: *Fusarium-Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*, J. Chelkowski (ed.). Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Vicente, J.G., Conway, J., Roberts, S.J. and Taylor, J.D. 2001. Identification and origin of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races and related pathovars. *Phytopathology* 91:492-499.
- Volin, R.B. and Jones, J.P. 1982. A new race of *Fusarium* wilt of tomato in Florida and sources of resistance. *Proc. Fla. State Hortic. Soc.* 95:268-270.
- Voorrips, R.E. 1995. *Plasmodiophora brassicae*: Aspects of pathogenesis and resistance in *Brassica oleracea*. *Euphytica* 83:139-146.
- Voorrips, R.E. 1996. Production and characterization of single-spore isolates of *Plasmodiophora brassicae*. *Eur. J. Plant Pathol.* 102:377-383.
- Voorrips, R.E. and Kanne, H.J. 1997. Genetic analysis of resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) in *Brassica oleracea*. I. Analysis of symptom grades. *Euphytica* 93:41-48.
- Voorrips, R.E., Jongerius, M.C. and Kanne, H.J. 1997. Mapping of two genes for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) in a population of doubled haploid lines of *Brassica oleracea* by means of RFLP and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 94:75-82.
- Wagacha, J.M., Steiner, U., Dehne, H.W., Zuehlke, S., Spiteller, M., Muthomi, J. and Oerke, E.C., 2010. Diversity in mycotoxins and fungal species infecting wheat in Nakuru District, Kenya. *J. Phytopathol.* 158:527-535.
- Wakulinski, W. 1989. Phytotoxicity of *Fusarium* metabolites in relation to pathogenicity. p.

- 257–268. In: *Fusarium–Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*, J. Chelkowski (ed.). Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Walker, J.C. 1930. Inheritance of *Fusarium* resistance in cabbage. *Jour. Agr. Res.* 40:721–745.
- Walker, J.C. 1958. Progress and problems in controlling plant disease by host resistance. In: *Plant Pathology Problems and Progress 1908–1958*. ed. Holton, C.S., Fischer, G.W., Fulton, R.W., Hart, H. and McCallan, S.E.A. pp. 32–41. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 588 pp.
- Walker, J.C. 1971. *Fusarium* wilt of tomato. Monogr. 6. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Wasilwa, L.A., Correll, J.C., Morelock, T.E. and McNEW, R.E. 1993. Reexamination of races of the cucurbit anthracnose pathogen *Colletotrichum orbiculare*. *Phytopathology* 83:1190–1198.
- Westman, A., Kresovich, S. and Dickson, M.H. 1999. Regional variation in *Brassica nigra* and other weedy crucifers for disease reaction to *Alternaria brassicicola* and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Euphytica* 106:253–259.
- Weststeijin, G. 1973. Soil sterilization and glasshouse disinfection to control *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomatoes in Netherlands. *Neth. J. Pl. Path.* 79:36–40.
- Williams, P.H. 1966. A system for the determination of races of *Plasmodiophora brassicae* that infect cabbage and rutabaga. *Phytopathology* 56: 624–626.
- Williams, P.H. 1980. Black rot: A continuing threat to world crucifers. *Plant Dis.* 64:736–742.
- Williams, P.H., Staub, T. and Sutton, J.C. 1972. Inheritance of resistance in cabbage to black rot. *Phytopathology* 62:247–252.
- Winstead, N.N., Goode, M.J. and Barham, W.S. 1959. Resistance in watermelon to *Colletotrichum lagenarium* races 1, 2, and 3. *Plant Dis. Rep.* 43:570–577.
- Wolpert, T.J., Dunkle, L.D. and Ciuffetti, L.M. 2002. Host-selective toxins and avirulence determinants: what's in a name? *Annu. Rev. Phytopathol.* 40:251–285.
- Woltz, S.S. and Jones, J.P. 1973. Tomato *Fusarium* wilt control by adjustments in soil fertility. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 86:157–159.
- Yabuta, T., Kambe, K. and Hayashi, T. 1937. Biochemistry of the bakanae fungus. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.* 10:1059–1068.
- Yagi, K., Williams, J., Wang, N.Y. and Cicerone, R.J. 1993. Agricultural soil fumigation as a source of atmospheric methyl bromide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8420–8423.
- Yang, S.S. and Kim, C.H. 1994. Studies on cross protection of *Fusarium* wilt of cucumber III. selection of nonpathogenic isolates and their protective effects in the greenhouse. *Korean J. Plant Pathol.* 10:29–33.
- Yang, S.S., Sung, N.K., Choi, D.I. and Kim, C.H. 1989. Pathogenic variation of *Phytophthora capsici* Leonian on red-pepper in Korea. *Korean J. Plant Pathol.* 5:370–376.
- Yarwood, C.E. 1978. History and taxonomy of powdery mildews, p. 1–37. In: D.M. Spencer

- (ed.). The powdery mildews. Academic Press, London.
- Yoon, J.B., Yang, D.C., Lee, W.P., Ahn, S.Y. and Park, H.G. 2004. Genetic resources resistant to anthracnose in the genus *Capsicum*. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 45:318-323.
- Yoshikawa, H. 1981. Breeding for clubroot resistance in Chinese cabbage. In : *Chinese Cabbage*, ed. by Talekar, N.S. and Griggs, T.D. pp. 405-413. AVRDC, Tainan.
- Yoshigawa, H. 1983. Breeding for clubroot resistance of crucifer crop in Japan. Jpn. Agr. Res. Quart. 17:6-11.
- Yoshikawa, H. 1993. Studies on breeding of clubroot resistance in cole (Cruciferae) crops. Bull. Natl. Res. Inst. Veg. Ornam. Plants Tea. Japan. Ser. A. 7:1-16.
- Zhang, L. X., Song, J. H., Shen, J. T., Tan, G. J., Li, S. S., and Ding, F. 2013. First report of stem canker on phoenix tree (*firmiana simplex*) caused by *Fusarium oxysporum* in China. J. Phytopathol. 161:128-130.
- Zhou, X. G., and Everts, K. L. 2007. Characterization of a regional population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* by race, cross pathogenicity, and vegetative compatibility. Phytopathology 97:461-469.
- Zijlstra, S., Jansen, R.C. and Groot, S.P.C. 1995. The relationship between powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) resistance and leaf chlorosis sensitivity in cucumber (*Cucumis sativus*) studied in single seed descent lines. Euphytica 81:193-198.
- Zonno, M.C., Vurro, M., Evidente, A., Capasso, R., Cutignano, A. and Sauerborn, J. 1996. Phytotoxic metabolites produced by *Fusarium nygamai* from *Striga hermonthica*. p. 223-226. In: Proc. IX. Int. Symp. on biological control of weeds. Stellenbosch, South Africa.
- 구경형, 이경아, 김영립, 이명기. 2006. 전처리 방법이 무청의 표면 미생물 변화에 미치는 영향. 한국식물영양과학회지 35:511-672.
- 김충희, 조원대, 김홍모. 2000a. 배추 뿌리혹병균의 토양 내 분포. 식물병연구 6:27-33.
- 김충희, 조원대, 김홍모. 2000b. 봄 배추 뿌리혹병균의 포장감염 시기와 피해. 식물병연구 6:23-26.
- 김충희, 조원대, 이상범. 2003. 우리나라 배추 뿌리혹병 연구 현황과 향후 과제. 식물병연구 9:57-63.
- 나종현. 2008. 채소 품종 발달사: 양배추와 브로콜리. 한국채소종자산업발달사, pp. 271-280. 서울대학교출판부.
- 남상현. 1994. 무 *Fusarium* 시들음병의 저항성 유전 및 육종에 관한 연구. 충남대학교 박사학위 논문.
- 농림수산식품부. 2007. 작물생산량, 농림통계연보. pp. 112-113.
- 농촌진흥청. 2002. 무 재배기술, 표준영농교본-126. pp. 136-137.
- 농촌진흥청. 2009. 토마토, 표준영농교본-106(개정). 농촌진흥청. p. 333
- 문윤기, 김완규, 조원대, 성재모. 2001. 십자화과 채소작물에서의 후사리움 시들음병 발생과 그 원인균의 병원성 분화. 식물병연구 7:93-101.
- 백송이, 장경수, 최용호, 김진철, 최경자. 2011. 발병조건에 따른 무 품종들의 시들음병에 대한 저항성 차이. 원예과학기술지 29:48-52.

- 백송이, 김진철, 장경수, 최용호, 최경자. 2011. 양배추 시들음병에 대한 효율적인 저항성 검정법 개발. 식물병연구 17:13-18.
- 백송이, 김진철, 장경수, 최용호, 최경자. 2010. 효율적인 무 시들음병 저항성 검정법 개발 및 무 품종들의 병 저항성 평가. 식물병연구 16:148-152.
- 송준호, 김영옥, 조준형. 1996. 양배추 위황병 저항성의 품종간 차이 및 유전. 한국육종학회지 28:171-177.
- 심홍식, 박진우, 이정운, 성재모. 1998. 배추 뿌리혹병 피해양상과 약제방제에 관한연구. 농진청 작물보호논문집 40:23-28.
- 이시우, 허남환, 주균영, 이장하, 김봉규. 2003. 위황병 저항성 계통육성, 수출증대를 위한 고품질, 위황병 무 품종 육성. (주)농우바이오. 130 p.
- 이지현, 박명수, 김진철, 장경수, 최용호, 김홍태, 최경자. 2013. 토마토 Cf-9 저항성 품종에 잎 곰팡이병을 일으키는 *Fulvia fulva* 균주의 국내 발생. 원예과학기술지 31:740-747.
- 이희정, 이유정, 양덕조. 2008. 새로운 세포질 웅성불임 계통 무(*Raphanus sativus* L.)의 미토콘드리아 DNA 유전적 특성. 자연과학연구 22:107-118.
- 장석원, 김희동, 김성기, 이은섭, 노용택. 2008. 정식 후 초기 관수횟수에 따른 배추 뿌리혹병 발생 억제효과. 식물병연구 14:85-89.
- 장세정, 허승환, 장창순, 간성우, 임용표, 김흥기. 2007. 국내 배추 뿌리혹병균, *Plasmodiophora brassicae*의 race와 그 우점 양상. 식물병연구 13:45-49.
- 장현철, 이선옥, 김점순, 윤여순, 최근숙, 김학기, 김병섭. 2005. Flusulfamide 입제에 의한 배추 무사마귀병의 방제효과. 식물병연구 11:43-47.
- 조광수, 한영환, 이정태, 허은주, 양태진, 우종규. 2002. 고령지 지역 배추 무사마귀병원균의 생리형 분화와 저항성 품종 선발. 한국육종학회지 34:168-173.
- 조광연, 정영륜, 김병섭, 최경자, 서영식, 한기란, 장부영. 1990. 살균제 2차 스크리닝 체제 확립: 무 위황병(Radish Yellows), 신규 농약개발을 위한 스크리닝 체제 확대발전. 한국화학연구소. pp. 490-498.
- 조수정, 장경수, 최용호, 김진철, 최경자. 2010. 관주 접종법을 이용한 효율적인 배추 뿌리혹병 저항성 검정법. 식물병연구 16:279-284.
- 조영환. 2008. 내병성 무 품종 육성: 무. 한국채소종자산업발달사, 서울대학교출판부, pp. 271-280.
- 차환수, 이선아, 권기현, 김병삼, 최덕주, 윤예리. 2013. 초기 저장온도 및 PA 필름 포장재가 머스크멜론의 저장 중 품질에 미치는 영향. 한국식품저장유통학회지 20:14-22.
- 채희정, 김루미, 문석식, 안중웅, 정영륜. 2004. *Colletotrichum orbiculare*에 대한 길항세균 *Pseudomonas aurantiaca* YC4963의 분리 동정 및 항균물질 phenazine-1-carboxylic acid의 생산. 한국미생물학회지. 40:342-347.
- 최효원, 홍성기, 이영기, 김완규. 2013. 수수 이삭곰팡이 증상에서 분리한 *Fusarium* 속 균의 다양성 및 병원성. 한국균학회지 41:142-148.
- 표현구, 최정일. 1989. 채소원예학각론. 향문사. 610 p.
- 한국식물병리학회. 2009. 한국식물병목록 제5판. pp. 130-132.
- 한국식물병리학회. 2009. 한국식물병목록 제5판. pp. 99-103.
- 한국작물보호협회. 2008. 농약사용지침서. 1084 p.

제 2절 세균병 *in vivo* 병리검정법 확립 참고문헌

- Agrama, H.A. and Scott, J.W. 2006. Quantitative trait loci for tomato yellow leaf curl virus and tomato mottle virus resistance in tomato. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 131:267-272.
- Alvarez, A.M., Benedict, A.A., Mizumoto, C.Y., Hunter, J.E. and Gabriel, D.W. 1994. Serological, pathological and genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* infecting crucifers. *Phytopathology* 84:1449-1457.
- Arias, R.S., Nelson, S.C. and Alvarez, A.M. 2000. Effect of soil-matric potential and phylloplanes of rotation-crops on the survival of a bioluminescent *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Eur. J. Plant Pathol.* 106:109-116.
- Bahar, O., Efrat, M., Hadar, E., Dutta, B., Walcott, R.R. and Burdman, S. 2008. New subspecies-specific polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Plant Pathol.* 57:754-763.
- Balatero, C.H., Hautea, D.M., Narciso, J.O. and Hanson, P.M. 2005. QTL mapping for bacterial wilt resistance in Hawaii 7996 using AFLP, RGA, and SSR markers. In : Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex, ed. by C. Allen, P. Prior and A. C. Hayward, pp. 301-307. APS press, St. Paul, USA.
- Berg, T., Tesoriero, L. and Hailstones, D.L. 2006. A multiplex real-time PCR assay for detection of *Xanthomonas campestris* from brassicas. *Lett. Appl. Microbiol.* 42, 624 - 630.
- Buell, C.R. and Somerville, S.C. 1997. Use of Arabidopsis recombinant inbred lines reveals a monogenic and a novel digenic resistance mechanism to *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. *Plant J.* 12:21-29.
- Camargo, L.E.A., Williams, P.H. and Osborn, T.C. 1995. Mapping of quantitative trait loci controlling resistance of *Brassica oleracea* to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the field and greenhouse. *Phytopathology* 85:1296-1300.
- Castañeda, A., Reddy, J.D., El-Yacoubi, B. and Gabriel, D.W. 2005. Mutagenesis of all eight avr genes in *Xanthomonas camplestris* pv. *campestris* had no detected effect on pathogenicity, but one avr gene affected race specificity. *Mol. Plant - Microbe Interact.* 18:1306-1317.
- Crall, J.M. and Schenck, N.C. 1969. Bacterial fruit rot of watermelon in Florida. *Plant Dis. Rep.* 53:74-75.
- Dannon, E., and Wydra, K.. 2004. Interaction between silicon amendment, bacterial wilt development and phenotype of *Ralstonia solanacearum* in tomato genotypes. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 64:233-243.
- Denesh, D., Aarons, S., McGill, G.E. and Young, N.D. 1994. Genetic dissection of oligogenic resistance to bacterial wilt in tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7:464-471.
- Dickson, M.D. and Hunter, J.E. 1987. Inheritance of resistance in cabbage seedlings to black rot. *HortScience* 22:108-109.
- Dutta, B., Avci, U., Hahn, M.G. and Walcott, R.R. 2012. Location of *Acidovorax citrulli* in

- infested watermelon seeds is influenced by the pathway of bacterial invasion. *Phytopathology* 102:461-468.
- Dutta, B., Scherm, H., Gitaitis, R.D. and Walcott, R.R. 2012. *Acidovorax citrulli* seed inoculum load affects seedling transmission and spread of bacterial fruit blotch of watermelon under greenhouse conditions. *Plant Dis.* 96:705-711.
- Evans, T.A. and Mulrooney, R.P. 1991. First report of watermelon fruit blotch in Delaware. *Plant Dis.* 75:1074.
- Fargier, E. and Manceau, C. 2007. Pathogenicity assays restrict the species *Xanthomonas campestris* into three pathovars and reveal nine races within *X. campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathol.* 56:805-818.
- Fargier, E., Saux, M.F.L. and Manceau, C. 2011. A multilocus sequence analysis of *Xanthomonas campestris* reveals a complex structure within crucifer-attacking pathovars of this species. *Syst. Appl. Microbiol.* 34:156-165.
- Feng, J.J., Schuenzel, E.L., Li, J.Q. and Schaad, N.W. 2009. Multilocus sequence typing reveals two evolutionary lineages of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Phytopathology* 99:913-920.
- Genin, S. and T.P. Denny. 2012. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annu. Rev. Phytopathol.* 50:67-89.
- Graham, T., Sequeira, L. and Huang, T. 1977. Bacterial lipopolysaccharides as inducers of disease resistance in tobacco. *Appl. Environ. Microbiol.* 34:424-432.
- Grimault, V., Gélie, B., Lamattre, M., Prior, P. and Schimidt, J. 1994. Comparative histology of resistant and susceptible tomato cultivars infected by *Pseudomonas solanacearum*. *Physiol. Mol. Pathol.* 44:105-123
- Grimault, V., Prior, P. and Anaïs, G.. 2008. A monogenic dominant resistance of tomato to bacterial wilt in Hawaii 7996 is associated with plant colonization by *Pseudomonas solanacearum*. *J. Phytopathol.* 143:349-352.
- Guo, H., Dickson, M.H. and Hunter, J.E. 1991. Brassica napus sources of resistance to black rot in crucifers and inheritance of resistance. *Hortscience* 26:1545-1547.
- Ha, Y., Fessehaie, A., Ling, K.S., Wechter, W.P., Keinath, A.P. and Walcott, R.R. 2009. Simultaneous detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and *Didymella bryoniae* in cucurbit seedlots using magnetic capture hybridization and real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology* 99:666-678.
- Hayward, A.C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 29:65-87.
- Hayward, A.C. 1994. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: *Bacterial Wilt: the Disease and its Causative Agent Pseudomonas solanacearum*. ed. By A. C. Hayward, and G. L. Hartman, pp. 127-135. CAB International, Oxford, UK.
- He, Y.Q., Zhang, L., Jiang, B.L., Zhang, Z.C., Xu, R.Q., Tang, D.J., Qin, J., Jiang, W., Zhang, X., Liao, J., Cao, J.R., Zhang, S.S., Wei, M.L., Liang, X.X., Lu, G.T., Feng, J.X.,

- Chen, B., Cheng, J. and Tang, J.L. 2007. Comparative and functional genomics reveals genetic diversity and determinants of host specificity among reference strains and a large collection of Chinese isolates of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Biol.* 8:R218.
- Hopkins, D., C. Thompson, J. Hilgren and B. Lovic. 2001. Wet seed treatment with peroxyacetic acid for the control of bacterial fruit blotch and other seedborne diseases of watermelon. *Plant Dis.* 87:1495-1499.
- Hopkins, D.L. and C.M. Thompson. 2002. Seed transmission of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in cucurbits. *Hortscience* 37:924-926.
- Hopkins, D.L. and Thompson, C.M. 2002. Evaluation of *Citrullus* sp. germ plasm for resistance to *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Plant Dis.* 86:61-64.
- Hopkins, D.L., Cucuzza, J.D. and Watterson, J.C. 1996. Wet seed treatments for the control of bacterial fruit blotch of watermelon. *Plant Dis.* 80:529-532.
- Hunter, J.E., Dickson, M.H. and Ludwig, J.W. 1987. Source of resistance to black rot of cabbage expressed in seedlings and adult plants. *Plant Dis.* 71:263-266.
- Ignatov, A., Kuginuki, Y. and Hida, K. 1998. Race-specific reaction of resistance to black rot in *Brassica oleracea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 104:821-827.
- Ignatov, A., Kuginuki, Y. and Hidam, K. 2000. Distribution and inheritance of race-specific resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Brassica rapa* and *B. napus*. *J. Russ. Phytopathol. Soc.* 1:89-94.
- Isakeit, T., Black, M.C., Barnes, L.W. and Jones, J.B. 1997. First report of infection of honeydew with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Plant Dis.* 81: 694.
- Jeong, Y., Cheong, H., Choi, O., Kim, J., K., Kang, Y., Kim, J., Lee, S., Koh, S., Moon, J.S. and Hwang, I. 2011. An HrpB-dependent but type III-independent extracellular aspartic protease is a virulence factor of *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Plant Pathol.* 12:373-380.
- Jeong, Y., Kim, J., Kang, Y., Lee, S. and Hwang, I. 2007. Genetic diversity and distribution of Korean isolates of *Ralstonia solanacearum*. *Plant Dis.* 91:1277-1287.
- Kamoun, S. and Kado, C.I. 1990. A plant-inducible gene of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* encodes an exocellular component required for growth in the host and hypersensitivity on nonhosts. *J. Bacteriol.* 172:5165-5172.
- Kamoun, S., Kamdar, H.V., Tola, E. and Kado, C.I. 1992. Incompatible interactions between crucifers and *Xanthomonas campestris* involve a vascular hypersensitive response: role of the *hrpX* locus. *Mol. Plant - Microbe Interact.* 5:22-33.
- Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44:693-695.
- Langston, Jr., D.B., Walcott, R.R., Gitaitis, R.D. and Sanders, Jr., F.H. 1999. First report of a fruit rot of pumpkin caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Georgia. *Plant Dis.* 83:199.
- Latin, R.X. and D.L. Hopkins. 1995. Bacterial fruit blotch of watermelon: The hypothetical exam question becomes reality. *Plant Dis.* 79:761-765.

- Lema, M., M.E. Cartea, T. Sotelo, P. Velasco and P. Soengas. 2012. Discrimination of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races among strains from northwestern Spain by Brassica spp. genotypes and rep-PCR. *Eur. J. Plant Pathol.* 133:159–169.
- Lopes, C.A., Carvalho, S.I.C. and Boiteux, L.S. 2005. Search for resistance to bacterial wilt in a Brazilian *Capsicum* germplasm collection. In : *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum* Species Complex, ed. by C. Allen, P. Prior and A.C. Hayward, pp. 247–251. APS press, St. Paul, USA.
- Makizumi, Y., Igarashi, M., Gotoh, K., Murao, K., Yamamoto, M., Udonsri, N., Ochiai, H., Thummabenjapone, P. and Kaku, H. 2011. Genetic diversity and pathogenicity of cucurbit-associated *Acidovorax*. *J. Gen. Plant Pathol.* 77:24–32.
- Marco, Y., Trigalet, A., Vasse, J., Oliver, J., Feng, D.X. and Deslandes, L. 2005. Host resistance to *Ralstonia solanacearum*. In : *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum* Species Complex, ed. by C. Allen, P. Prior and A.C. Hayward, pp. 275–283. APS press, St. Paul, USA.
- Martin, H.L. and O'Brien, R.G. 1999. First report of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as a pathogen of cucumber. *Plant Dis.* 83:965.
- Min, J.S., Park, J.H., Han, K.S, Kim, D.H, Lee, J.S, Kim, H.H. 2009. Screening of tomato cultivars resistant to bacterial wilts. *Res. Plant Dis.* 15:198–201.
- Nonomurai, T., Matsuda, Y., Tsuda, M., Uranaka, K., Toyoda, H. 2001. Susceptibility of commercial tomato cultivars to bacterial wilt in hydroponic system. *Gen. Plant Pathol.* 67:224–227.
- Park, Y.H., Lee, Y.J., Choi, Y.W., Son, B.G. and Kang, J.S. 2008. Evaluations of PCR primers used in the detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* causing bacterial fruit blotch (BFB) in cucurbits. *Hort. Environ. Biotechnol.* 49:325–331.
- Parkinson, N., Cowie, C., Heeney, J. and Stead, D. 2009. Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59:264–274.
- Park, E.J., Lee, S.D., Chung, E.J., Lee, M.H., Um, H.Y., Murugaiyan, S., Moon, B.J. and Lee, S-W. 2007. MicroTom-A model plant system to study bacterial wilt by *Ralstonia solanacearum*. *Plant Pathology J.* 23:239–244.
- Pflieger, S., Lefebvre, V., Caranta, C., Blattes, A., Goffinet, B. and Palloix A.. 1999. Disease resistance gene analogs as candidates for QTLs involved in pepper-pathogen interactions. *Genome* 42:1100–1110.
- Rane, K.K. and Latin, R.X. 1992. Bacterial fruit blotch of watermelon—association of the pathogen with seed. *Plant Dis.* 76:509–512.
- Roberts, P.D., Denny, T.P. and Schell, M.A. 1988. Cloning of the *egl* genes of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in phytopathogenicity. *J. Bacteriol.* 170:1445–1451.
- Saile, E., McGarvey, J.A., Schell, M.A. and Denny, T.P. 1997. Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* 87:1264–1271.

- Sakata, Y., Kubo, N., Morishita, M., Kitadani, E., Sugiyama, M., and Hirai, M. 2006. QTL analysis of powdery mildew resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Theor Appl Genet* 112:243–250.
- Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 3rd ed. APS press, St. Paul, USA.
- Schaad, N.W., G. Sowell, R.W. Goth, R.R. Colwell, and R.E. Webb. 1978. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bact.* 28:117–125.
- Schaad, N.W., Postnikova, E., Sechler, A., Clafflin, L.E., Vidaver, A.K., Jones, J.B., Agarkova, I., Ignatov, A., Dickstein, E. and Ramundo, B.A. 2008. Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. avenae* (Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb. nov., *A. citrulli* (Schaad et al., 1978) comb. nov., and proposal of *A. oryzae* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 31:434–446.
- Schell, M.A. 2000. Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Ann. Rev. Phytopathol.* 38:263–292.
- Soengas, P., Hand, P., Vicente, J.G., Pole, J.M. and Pink, D.A.C. 2007. Identification of quantitative trait loci for resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Brassica rapa*. *Theor. Appl. Genet.* 114:637–645.
- Somodi, G.C., J.B. Jones, D.L. Hopkins, R.E. Stall, T.A. Kucharek, N.C. Hodge, and J.C. Watterson. 1991. Occurrence of a bacterial watermelon fruit blotch in Florida. *Plant Dis.* 75:1053–1056.
- Takabatake, R., Seo, S., Mitsuhara, I., Tsuda, S. and Ohashi, Y. 2006. Accumulation of the two transcripts of the *N* gene, conferring resistance to *Tobacco Mosaic Virus*, is probably important for *N* gene-dependent hypersensitive cell death. *Plant Cell Physiol.* 47:254–261.
- Taylor, J.D., Conway, J., Roberts, S.J., Astley, D. and Vicente, J.G. 2002. Sources and origin of resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Brassica* genomes. *Phytopathology* 92:105–111.
- Thoquet, P., Oliver, J., Sperisen, C., Rogowsky, P., Laterrot, H. and Grimsley, N. 1996. Quantitative trait loci determining resistance to bacterial wilt in tomato cultivar Hawaii 7996. *Mol. Plant–Microbe Interact.* 9:826–836.
- Vasse, J., Frey, P. and Trigalet, A. 1995. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasions of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Plant–Microbe Interact.* 8:241–251.
- Vincente, J.G., J. Conways, S. J. Roberts and J. D. Taylor. 2001. Identification and origin of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races and related pathovars. *Phytopathology* 91:492–499.
- Vicente, J.G., Taylor, J.D., Sharpe, A.G., Parkin, I.A.P., Lydiate, D.J. and King, G.J. 2002. Inheritance of race-specific resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Brassica* genomes. *Phytopathology* 92:1134–1141.
- Walcott, R.R., A. Fessehaie, and A.C. Castro. 2004. Differences in pathogenicity between

- two genetically distinct groups of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* on cucurbit hosts. J. Phytopathology 152:277-285.
- Walcott, R.R. and Gitaitis, R.D. 2000. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction. Plant Dis. 84:470-474.
- Walcott, R.R., Langston, Jr., D.B., Sanders, Jr., F.H. and Gitaitis, R.D. 2000. Investigating intraspecific variation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* using DNA fingerprinting and whole cell fatty acid analysis. Phytopathology 90:191-196.
- Walcott, R.R., Castro, A.C., Fessehaie, A. and Ling, K. 2006. Progress towards a commercial PCR-based seed assay for *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Seed Sci. Technol. 34:101-116.
- Wallis, F.M. and Truter, S.J. 1978. Histopathology of tomato plants infected with *Pseudomonas solanacearum*, with emphasis on ultrastructure. Physiol. Plant Pathol. 13:307-317.
- Wang, J.F., Hanson, P. and Barnes, J.A. 1998. World wide evolution of an international set of resistance source to bacterial wilt in tomato. In: Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects. ed, P. Prior, C. Allen and J. Elphinstone, pp 269-275. INRA Springer.
- Webb, R. E. and R.W. Goth. 1965. A seedborne bacterium isolated from watermelon. Plant Dis. Rep. 49:818-821.
- Willems, A., M. Goor, S. Thielemans, M. Gillis, K. Kersters, and J. DeLey. 1992. Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*. Int. J. Syst. Bact. 42:107-119.
- Yao, J. and Allen, C. 2006. Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. J. Bacteriol. 188:3697-3708.

제 3절 바이러스병 *in vivo* 병리검정법 확립 참고문헌

- Abdul-Razzak, A., T. Guiraud, M. Peypelut, J. Walter, M.C. Houvenaghel, T. Candresse, O.L. Gall, and S. German-Retana. 2009. Involvement of the cylindrical inclusion (CI) protein in the overcoming of an eIF4E-mediated resistance against *Lettuce mosaic potyvirus*. Mol. Plant Pathol. 10:109-113.
- Allander, T., M.T. Tammi, M. Eriksson, A. Bjerkner, A. Tiveljung-Lindell and B. Andersson. 2005. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. Proc Natl Acad Sci USA 102:12891-12896.
- Allen, E., S. Wang and W.A. Miller. 1999. Barley yellow dwarf virus RNA requires a cap-independent translation sequence because it lacks a 5' cap. Virology 253:139-144.

- Anagnostou, K., M. Jahn, and R. Perl-Treves. 2000. Inheritance and linkage analysis of resistance to *Zucchini yellow mosaic virus*, *Watermelon mosaic virus*, *Papaya ringspot virus* and powdery mildew in melon. *Euphytica* 116:265-270.
- Atreya, C.D., P.L. Atreya, D.W. Thornbury, and T.P. Pirone. 1992. Site-directed mutations in the potyvirus HC-Pro gene affect helper component activity, virus accumulation, and symptom expression in infected tobacco plants. *Virology* 191:106-111.
- Atreya, C.D. and T.P. Pirone. 1993. Mutational analysis of the helper component-proteinase gene of a potyvirus: effects of amino acid substitutions, deletions, and gene replacement on virulence and aphid transmissibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:11919-11923.
- Ballut, L., M. Drucker, M. Pugniere, F. Cambon, S. Blanc, F. Roquet, T. Candresse, H.P. Schmid, P. Nicolas, O.L. Gall and S. Badaoui. 2005. HcPro, a multifunctional protein encoded by a plant RNA virus, targets the 20S proteasome and affects its enzymic activities. *J. Gen. Virol.* 86:2595-2603.
- Beuve, M., M. Stevens, H.Y. Liu, W.M. Wintermantel, S. Hauser and O. Lemaire. 2008. Biological and molecular characterization of an American sugar beet-infecting *Beet western yellows virus* isolate. *Plant Dis.* 92:51-60.
- Bos, L., N. Huijberts and C. Cuperus. 1994. Further observations on variation of *Lettuce mosaic virus* in relation to lettuce (*Lactuca sativa*), and a discussion of resistance terminology. *Eur. J. Plant Pathol.* 100:293-314.
- Chen, J., J. Chen and M.J. Adams. 2001. A universal PCR primer to detect members of the Potyviridae and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. *Arch Virol* 146:757-766.
- Chung B.Y., W.A. Miller, J.F. Atkins and A.E. Firth. 2008. An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:5897-5902.
- Damsteegt V.D., A.L. Stone, O.P. Smith, L. McDaniel, D.J. Sherman, C. Dardick, J. Hammond, R. Jordan and W.L. Schneider. 2013. A previously undescribed potyvirus isolated and characterized from arborescent *Brugmansia*. *Arch Virol* doi: 10.1007/s00705-012-1600-8
- Danin-Poleg, Y., H.S. Paris, S. Cohen, H.D. Rabinowitch, and Z. Karchi. 1997. Oligogenic inheritance of resistance to *Zucchini yellow mosaic virus* in melons. *Euphytica* 93:331-337.
- Daryono, B. S., S. Somowiyarjo, and K.T. Natsuaki. 2005. Screening for resistance to *Kyuri green mottle mosaic virus* in various melons. *Plant Breed.* 124:487-490.
- Diaz, J. A., C. Mallor, C. Soria, R. Camero, E. Garzo, A. Fereres, M.J. Alvarez, M.L. Gomez-Guillamon, M. Luis-Arteaga, and Moriones. 2003. Potential sources of resistance for melon to nonpersistently aphid-borne viruses. *Plant Dis.* 87:960-964.
- Diaz Pendon, J.A., R. Fernandez-Munoz, M.L. Gomez-Guillamon, and E. Moriones. 2005. Inheritance of resistance to *Watermelon mosaic virus* in *Cucumis melo* that impairs virus accumulation, symptom expression, and aphid transmission. *Phytopathology* 95:840-846.

- Diaz Pendon, J.A., V. Truniger, C. Nieto, J. Garcia-Mas, A. Bendahmane, and M.A. Aranda. 2004. Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. *Molecular Plant Pathology* 5:223-233.
- Dolja, V.V., H.J. McBride, and J.C. Carrington. 1992. Tagging of plant potyvirus replication and movement by insertion of beta-glucuronidase into the viral polyprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:10208-10212.
- Dreher, T.W., and W.A. Miller. 2006. Translational control in positive strand RNA plant viruses. *Virology* 344:185-197.
- German-retana, S., J. Walter, and O.L. Gall. 2008. *Lettuce mosaic virus*: from pathogen diversity to host interactors. *Mol. Plant Pathol.* 9:127-136.
- Gilbert, R.Z., M.M. Kyle, and H.M. Munger. 1994. Inheritance of resistance to *Watermelon mosaic virus* in *Cucumis melo* L. *HortScience* 29:107.
- Gimenez, C.M., J.M.A. Alvarez, and M. Luis Arteaga. 2003. Inheritance of resistance to systemic symptom expression of *Melon necrotic spot virus* (MNSV) in *Cucumis melo* L. 'Doublon'. *Euphytica* 134:319-324.
- Gonsalves, C., B. Xue, M. Yepes, M. Fuchs, K. Ling, and S. Namba. 1994. Transferring cucumber mosaic virus-white leaf strain coat protein gene into *Cucumis melo* L. and evaluating transgenic plants for protection against infections. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 119:345.
- Gubler U., B.J. Hoffman. 1983. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25:263-269.
- Haible, D., Kober, S. and Jeske, H. 2006. Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. *J. Virol. Methods.* 135:9-16.
- Harris, K.R., K.S. Ling, W.P. Wechter, and A. Levi. 2009. Identification and utility of markers linked to the *Zucchini yellow mosaic virus* resistance gene in watermelon. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 134:529.
- Hauser, S., M. Stevens, C. Mougel, H.G. Smith, C. Fritsch, E. Herrbach, and O. Lemaire. 2000. Biological, serological, and molecular variability suggest three distinct polerovirus species infecting beet or rape. *Phytopathology* 90:460-466.
- Kabelka, E., and R. Grumet. 1997. Inheritance of resistance to the *Moroccan watermelon mosaic virus* in the cucumber line TMG-1 and co segregation with *Zucchini yellow mosaic virus* resistance. *Euphytica* 95:237-242.
- Kadare´ G., A.L. Haenni. 1997. Virus-encoded RNA helicases. *J. Virol.* 71:2583-2590.
- Kahn R.P., R. Bartels. 1968. The Colombian datura virus—a new virus in the *Potato virus Y* group. *Phytopathology* 58:587-592.
- Kaplan, I.B., L. Lee, D.R. Ripoll, P. Palukaitis, F. Gildow, and S.M. Gray. 2007. Point mutations in the *Potato leafroll virus* major capsid protein alter virion stability and aphid transmission. *J. Gen. Virol.* 88:1821-1830.
- Klein, P.G., R.R. Klein, E. Rodriguez-Cerezo, A.G. Hunt and J.G. Shaw. 1994. Mutational analysis of the *Tobacco vein mottling virus* genome. *Virology* 204:759-769.

- Krause-Sakate, R., O.L. Gall, H. Fakhfakh, M. Peypelut, M. Marrakchi, C. Varveri, M.A. Pavan, S. Souche, H. Lot, F.M. Zerbini and T. Candresse. 2002. Molecular and biological characterization of *Lettuce mosaic virus* (LMV) isolates reveals a distinct and widespread type of resistance-breaking isolate: LMV-Most. *Phytopathology* 92:563-572.
- Krause-Sakate, R., H. Fakhfakh, M. Peypelut, M.A. Pavan, F.M. Zerbini, M. Marrakchi, T. Candresse, and O.L. Gall. 2004. A naturally occurring recombinant isolate of *Lettuce mosaic virus*. *Arch. Virol.* 149:191-197.
- Ling, K.S., K.R. Harris, J.D.F. Meyer, A. Levi, N.Guner, T.C. Wehner, A. Bendahmane, M.J. Havey. 2009. Non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the watermelon eIF4E gene are closely associated with resistance to *Zucchini yellow mosaic virus*. *Theoretical and Applied Genetics* 120:191-200.
- Lopez Sese, A.I., and M.L. Gomez-Guillamon. 2000. Resistance to *Cucurbit yellowing stunting disorder virus* (CYSDV) in *Cucumis melo* L. *HortScience* 35:110.
- Lucinda N., T. Nagata, A.K. Inoue-Nagata, R.B. Salaroli, E.W. Kitajima. 2008. *Brugmansia suaveolens mottle virus*, a novel potyvirus causing leaf mottling of *Brugmansia suaveolens* in Brazil. *Arch. Virol.* 153:1971-1976.
- Marco, C.F., J.M. Aguilar, J. Abad, M.L. Gomez-Guillamon, and M.A. Aranda. 2003. Melon resistance to *Cucurbit yellow stunting disorder virus* is characterized by reduced virus accumulation. *Phytopathology* 93:844-852.
- Moyer, J.W., G.G. Kennedy, and L.R. Romanow. 1985. Resistance to *Watermelon mosaic virus II* multiplication in *Cucumis melo*. *Phytopathology* 75:201.
- Nakhla, M.K., Maxwell, D.P., Martinez, R.T., Carvalho, M.G. and Gilbertson, R.L. 1994. Widespread occurrence of the eastern Mediterranean strain of *Tomato yellow leaf curl geminivirus* in tomatoes in the Dominican Republic. *Plant Dis.* 78:926.
- Nam M., S.M. Kim, L.L. Domier, S. Koh, J.K. Moon, H.S. Choi, H.G. Kim, J.S. Moon, S.H. Lee. 2009. Nucleotide sequence and genomic organization of a newly identified member of the genus Carmovirus, *Soybean yellow mottle mosaic virus*, from soybean. *Arch Virol* 154:1679-1684
- Nam, M., J.S. Kim, S. Lim, C.Y. Park, J.G. Kim, H.S. Choi, H.S. Lim, J.S. Moon, and S.H. Lee. 2014. Development of the large-scale oligonucleotide chip for the diagnosis of plant viruses and its practical use. *Plant Pathol. J.* (in Press)
- Nebreda, M., A. Moreno, N. Pérez, I. Palacios, V. Seco-Fernández, and A. Fereres. 2004. Activity of aphids associated with lettuce and broccoli in Spain and their efficiency as vectors of *Lettuce mosaic virus*. *Virus Res.* 100:83-88.
- Park, Y., Y. Park, N. Katzir, Y. Brotman, J. King, F. Bertrand, and M. Havey. 2004. Comparative mapping of ZYMV resistances in cucumber (*Cucumis sativus* L.) and melon (*Cucumis melo* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 109:707-712.
- Peypelut, M., R. Krause-Sakate, T. Guiraud, M.A. Pavan, T. Candresse, F.M. Zerbini, and O.L. Gall. 2004. Specific detection of lettuce mosaic virus isolates belonging to the "Most" type. *J. Virol. Methods* 121:119-124.

- Pink, D.A.C., H. Lot, and R. Johnson. 1992. Novel pathotypes of lettuce mosaic virus - breakdown of a durable resistance? *Euphytica* 63:169-174.
- Provvidenti, R. 1991. Inheritance of resistance to the Florida strain of *Zucchini yellow mosaic virus* in watermelon. *HortScience* 26:407.
- Redondo, E., R. Krause-Sakate, S.J. Yang, H. Lot, O.L. Gall, and T. Candresse. 2001. *Lettuce mosaic virus* pathogenicity determinants in susceptible and tolerant lettuce cultivars map to different regions of the viral genome. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14:804-810.
- Revers, F., S.J. Yang, J. Walter, S. Souche, H. Lot, O.L. Gall, T. Candresse, and J. Dunez. 1997a. Comparison of the complete nucleotide sequences of two isolates of lettuce mosaic virus differing in their biological properties. *Virus Res.* 47:167-177.
- Revers, F., H. Lot, S. Souche, O.L. Gall, T. Candresse, and J. Dunez. 1997b. Biological and molecular variability of lettuce mosaic virus isolates. *Phytopathology* 87:397-403.
- Riechmann J.L., S. Lain, J.A. Garcia. 1992. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J Gen Virol* 73:1-16.
- Salati, R., Nahkla, M.K., Rojas, M.R., Guzman, P., Jaquez, J., Maxwell, D.P. and Gilbertson, R.L. 2002. *Tomato yellow leaf curl virus* in the dominican republic: Characterization of an infectious clone, virus monitoring in whiteflies, and identification of reservoir hosts. *Phytopathology* 92:487-496.
- Soria, C., E. Moriones, A. Fereres, E. Garzo, and M.L. Gomez-Guillam. 2003. New source of resistance to mosaic virus transmission by *Aphis gossypii* in melon. *Euphytica* 133:313-318.
- Stevens, M., B. Freeman, H.Y. Liu, E. Herrbach, and O. Lemaire. 2005. Beet poleroviruses: close friends or distant relatives? *Mol. Plant Pathol.* 6:1-9.
- Sztuba-Solińska J., A. Urbanowicz, M. Figlerowicz, and J.J. Bujarski. 2011. RNA-RNA recombination in plant virus replication and evolution. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49:415-443.
- Tamura K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28:2731-739.
- Tavert-Roudet, G., A. Abdul-Razzak, B. Doublet, J. Walter, T. Delaunay, S. German-Retana, T. Michon, O.L. Gall, and T. Candresse. 2012. The C terminus of *Lettuce mosaic potyvirus* cylindrical inclusion helicase interacts with the viral VPg and with lettuce translation eukaryotic initiation factor 4E. *J. Gen. Virol.* 93:184-193.
- Thompson J.D., D.G. Higgins, T.J. Gibson. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680
- Wu, H.W., T.A. Yu, J.A.J. Raja, H.C. Wang, and S.D. Yeh. 2009. Generation of transgenic oriental melon resistant to *Zucchini yellow mosaic virus* by an improved cotyledon-cutting method. *Plant Cell Reports* 28:1053-1064.

- Wyatt, S.D. and Brown, J.K. 1996. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 86:1288-1293.
- Xiang H.Y., S.W. Dong, Q.X. Shang, C.J. Zhou, D.W. Li, J.L. Yu, and C.G. Han. 2011. Molecular characterization of two genotypes of a new polerovirus infecting brassicas in China. *Arch. Virol.* 156:2251-2255.
- Yeh, S.D., D. Gonsalves, and R. Provvidenti. 1984. Comparative studies on host range and serology of *Papaya ringspot virus* and *Watermelon mosaic virus I*. *Phytopathology* 74:1081.
- Yousif, M. T., A. Kheyr-Pour, B. Gronenborn, M. Pitrat, and C. Dogimont. 2007. Sources of resistance to *Watermelon chlorotic stunt virus* in melon. *Plant Breeding* 126:422-427.

제 4절 선충병 *in vivo* 병리검정법 확립 참고문헌

- Abad, P., Gouzy, J., Aury, J.M., Castagnone-Sereno, P., Danchin, E.G.J. and Deleury, E. 2008. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. Nat. Biotechnol. 26:909-915.
- Bailey, D.M. 1941. The seedling test method for root-knot-nematode resistance. Proc. Am. Soc. Hortic. Sci. 38:573-575.
- Barham, W.S. and Winstead, N.N. 1957. Inheritance of resistance to root-knot nematodes in tomatoes. Proc. Am. Soc. Hortic. Sci. 69:372-377.
- Barker, K.R., Schmitt, D.P. and Imbriani, J.L. 1985. Nematode population dynamics with emphasis on determining damage potential to crops. p. 135-148. In: Barker, K.R., Carter, C.C. and Sasser, J.N. (eds), An advanced treatise on *Meloidogyne*, Vol. II. North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, USA.
- Berthou, F., Badiallo, A., Demayer, L., Deguiran, G., Bruguier, N. and Dieng, M. 1989. Characterization of virulent (Mi-gene resistance breaking) biotypes of root-knot nematodes *Meloidogyne goeldi* (Tylenchida) in two vegetable growing areas of Senegal. J. Agronomie 9:877-884.
- Birch, A.N.E., Robertson, W.M. and Fellows, L.E. 1993. Plant products to control plant parasitic nematodes. Pestic. Sci. 39:141-145.
- Boina, D.R., Lewis, E.E. and Bloomquist, J.R. 2008. Nematicidal activity of anion transport blockers against *Meloidogyne incognita*, *Caenorhabditis elegans* and *Heterorhabditis bacteriophora*. Pest Manag. Sci. 64:646-653.
- Bost, S.C. and Triantaphyllou, A. 1987. Genetic basis of the epidemiological effects of resistance to *Meloidogyne incognita* in tomato cultivar Small Fry. J. Nematol. 44:540-544.
- Bridge, J. and Page, S.L.J. 1980. Estimation of root-knot nematode infestation levels on roots using a rating chart. Trop. Pest Manage. 26:296-298.
- Castagnone-Sereno, P., Bongiovanni, M. and Dalmasso, A. 1993. Stable virulence against the tomato resistance *Mi* gene in the parthenogenetic root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Phytopathology 83:803-805.
- Chen, Z.X., Dickson, D.W., McSorley, R., Mitchell, D.J. and Hewlett, T.E. 1996. Suppression of *Meloidogyne arenaria* race 1 by soil application of endospores of *Pasteuria penetrans*. J. Nematol. 28:159-168.
- Cho, H.J., Han, S.C. and Choi, D.G. 1986. Screening peanut, pepper, cucumber, and tomato varieties for resistance to root-knot nematode, *Meloidogyne hapla*. Res. Rept. RDA. 28:94-97.
- Cho, M.R., Lee, B.C., Kim, D.S., Jeon, H.Y., Yiem, M.S. and Lee, J.O. 2000a. Distribution of plant-parasitic nematodes in fruit vegetable production areas in Korea and identification of root-knot nematodes by enzyme phenotypes. Korean J. Appl. Entomol. 39:123-129.
- Cho, M.R., Na, S.Y. and Yiem, M.S. 2000b. Biological control of *Meloidogyne arenaria* by *Pasteuria penetrans*. J. Asia Pac. Entomol. 3:71-76.

- Choi, D.R., Lee, J.K., Park, B.Y. and Chung, M.N. 2006. Occurrence of root-knot nematodes in sweet potato fields and resistance screening of sweet potato cultivars. *Korean J. Appl. Entomol.* 45:211-216.
- Choi, Y.E. and Choo, H.Y. 1978. A study on root-knot nematodes affecting economic crops in Korea. *Kor. J. Plant Prot.* 17:89-98.
- Chon, H.S., Park, H.J., Yeo, S.G., Park, S.D. and Choi, Y.E. 1996. Technical development for control on soil nematodes (*Meloidogyne* spp.) of oriental melon in plastic film house. *RDA J. Agri. Sci.* 38 (C.P.):401-407.
- Dropkin, V.H. 1969. The necrotic reaction of tomatoes and other hosts resistant to *Meloidogyne*: Reversal by temperature. *Phytopathology* 59:1632-1637.
- Fassuliotis, G. 1985. The role of nematologist in the development of resistance cultivars. An advanced treaties on *Meloidogyne*. Vol. I: Biology and control edited by Sasser, J.N. and Cater. C.C., pp. 234-240.
- Gilbert, J.C. and McGuire, D.C. 1956. Inheritance of resistance to severe root knot from *Meloidogyne incognita* in commercial type tomatoes. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 68:437-442.
- Gurr, G.M. 1992. Control of potato cyst nematode (*Globodera pallida*) by host plant resistance and nematicide. *Ann. Appl. Biol.* 121:167-173.
- Han, S.C. and Kim, Y.G. 1997. Screening resistant red pepper varieties to *Meloidogyne hapla* and their resistance mechanisms. *Korean J. Appl. Entomol.* 36:185-191.
- Heald, C.M. and Robinson, A.F. 1987. Effects of soil solarization of *Rotylenchus reniformis* in the Lower Rio Grande Valley of Texas. *J. Nematol.* 19:93-103.
- Ho, J.Y., Weide, R., Ma, H.M., van Wordragen, M.F., Lambert, K.N., Koornneef, M., Zabel, P. and Williamson, V.M. 1992. The root-knot nematode resistance gene (Mi) in tomato: construction of a molecular linkage map and identification of dominant cDNA markers in resistant genotypes. *Plant J.* 2:971-982.
- Holtzmann, O.V. 1965. Effects of soil temperature on resistance of tomato to root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). *Phytopathology* 55:990-992.
- Hwang, S.M., Park, M.S., Kim, J.C., Jang, K.S., Choi, Y.H. and Choi, G.J. 2013. Occurrence of *Meloidogyne incognita* infecting tomato *Mi* cultivars and development of an efficient screening method for resistant tomato to the *Mi*-virulent nematode. *Korean J. Hort. Sci. Technol.* (Accepted) (In Korean)
- Jung, C. and Wyss, U. 1999. New approaches to control plant parasitic nematodes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:439-446.
- Kaloshian, I., Williamson, V.M., Miuao, G., Lawn, D.A. and Westerdahl, B.B. 1996. "Resistance-breaking" nematodes in California tomatoes. *Calif. Agric.* 50:18-19.
- Kim, D.G. 2001 Occurrence of root-knot nematodes on fruit vegetables under greenhouse conditions in Korea. *Res. Plant Dis.* 7:69 - 79. (In Korean)
- Kim, D.G. and Choi, S.K. 2001. Effects of incorporation method of nematicides on reproduction of *Meloidogyne arenaria*. *Korean J. Appl. Entomol.* 40:89-95.

- Kim, D.G. and Lee, J.H. 2008. Economic threshold of *Meloidogyne incognita* for greenhouse grown cucumber in Korea. Res. Plant Dis. 14:117-121. (In Korean)
- Kim, D.G., Lee, Y.G. and Park, B.Y. 2001. Root-knot nematode species distributing in greenhouses and their simple identification. Res. Plant Dis. 7:49-55.
- Kim, H.H., Cho, M.R., Kang, T.J., Jung, J.A. and Han, Y.K. 2010. Screening of tomato cultivars resistant to root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. Res. Plant Dis. 16:294-298.
- Kim, H.H., Choo, H.Y., Park, C.G., Lee, S.M. and Kim, J.B. 1998. Biological control of the northern root-knot nematode, *Meloidogyne hapla* with plant extract. Korean J. Appl. Entomol. 37:199-206.
- Kim, J.I. and Han, S.C. 1998. Effect of solarization for control of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). Korean J. Appl. Entomol. 27:1-5.
- Kim, S.H., Shin, J.E., Kyung, J.L., Sheng, J.X. and Kim, B.S. 2012. Evaluation of disease resistance of cucurbit cultivars to powdery mildew and root-knot nematode. Res. Plant Dis. 18:29-34. (In Korean)
- Kinloch, R.A. and Hinson, K. 1972. The Florida program for evaluating soybean (*Glycine max L. Merr.*) genotypes for susceptibility to root-knot nematode disease. Proc. Soil Crop Sci. Soc. Florida 32:173 - 176.
- Medina-Filho, H.P. and Stevens, M.A. 1980. Tomato breeding for nematode resistance: survey of resistant varieties for horticultural characteristics and genotype of acid phosphatase. Acta Hortic. 100:383-391.
- Meng, Q.P., Long, H. and Xu, J.H. 2004. PCR assays for rapid and sensitive identification of three major root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica* and *Meloidogyne arenaria*. Acta Phytopathol. Sinica 34:204-210.
- Mitkowski, N.A. and Abawi, G.S. 2003. Reproductive fitness on lettuce of *Meloidogyne hapla* from New York State vegetable fields. Nematology. 5:77-83.
- Noling, J.W. 2000. Effects of continuous culture of resistant tomato cultivars on *Meloidogyne incognita* soil population density and pathogenicity. J. Nematol. 32:452.
- Oka, Y., Ben-Daniel, B. and Cohen, Y. 2012. Nematicidal activity of the leaf powder and extracts of against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Plant Pathol. 61:1012-1020.
- Park, S.D., Kwon, T.Y., Choi, B.S., Lee, W.S. and Choi, Y.E. 1995a. Studies on integrated control against root-knot nematode of fruit vegetable (oriental melon and cucumber) in vinyl house. Korean J. Appl. Entomol. 34:75-81.
- Park, S.D., Kwon, T.Y., Jun, H.S. and Choi, B.S. 1995b. The occurrence and severity of damage by root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in controlled fruit vegetable field. RDA. J. Agri. Sci. 37:318 - 323.
- Paulson, R.E. and Webster, J.M. 1972. Ultrastructure of the hypersensitive reaction in roots of tomato, *Lycopersicon esculentum* L., to infection by the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. Physiol. Plant Pathol. 2:227-234.

- Philis, J. and Vakis, N. 1977. Resistance of tomato varieties to the root-knot nematodes *Meloidogyne javanica* in Cyprus. *Nematol. Mediterr.* 5:39-44.
- Prakash, A. and Rao, J. 1997. Botanical pesticides in agriculture. CRC Press Inc. Boca Raton. 461pp.
- Rhoades, H.L. 1976. Effects of *Indigofera hirsute* on *Belonolaimus longicaudatus*, *Meloidogyne incognita*, and *M. javanica* and subsequent crop yield. *Plant Dis. Rep.* 60:384-386.
- Riggs, R.D. and Winstead, N.N. 1959. Studies on resistance in tomato to root-knot nematodes and on occurrence of pathogenic biotypes. *Phytopathology* 49:716-724.
- Roberts, P.A. and Thomason, I.J. 1986. Variability in reproduction of isolates of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* on resistant tomato genotypes. *Plant Dis.* 70:547-551.
- Roberts, P.A., Dalmaso, A., Cap, G.B., and Castagnone-Sereno, P. 1990. Resistance in *Lycopersicon peruvianum* to isolates of *Mi* gene compatible *Meloidogyne* populations. *J. Nematol.* 22:585-589.
- Smith, P.G. 1944. Embryo culture of a tomato species hybrid. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 44:413-416.
- Sorribas, F.J., Ornat, C., Verdejo-Lucas, S., Galeano, M. and Valero, J. 2005. Effectiveness and profitability of the Mi-resistant tomatoes to control root-knot nematodes. *Eur. J. Plant Pathol.* 111:29-38.
- Taylor, A.L. and Sasser, J.N. 1978. Biology, identification and control of root knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Coop. Pub. Deptt. Plant Pathol., North Carolina State University and United States Agency for International Development, Graphics, Raleigh, 111 pp.
- Tesarova, B., Zouhar, M. and Rysanek, P. 2003. Development of PCR for specific determination of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Plant Protec. Sci.* 39:23-28.
- Thorne, G. 1961. Principles of nematology. McGraw-Hill Book Co. Inc. New York, Toronto, London. 553pp.
- Trudgill, D.L. 1991. Resistance to and tolerance of plant parasitic nematodes in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29:167-193.
- Tzortzakakis, E.A. and Gowan, S.R. 1996. Occurrence of a resistance-breaking pathotype of *Meloidogyne javanica* on tomatoes in Crete, Greece. *Fund. Appl. Nematol.* 19:960-967.
- Tzortzakakis, E.A., Blok, V.C., Phillips, M.S. and Trudgill, D.L. 1999. Variation in root-knot nematode (*Meloidogyne* spp) in Crete in relation to control with resistant tomato and pepper. *Nematology* 1:499-506.
- Umesh, K.C., Ferris, H. and Bayer, D.E. 1994. Competition between the plant-parasitic nematodes *Pratylenchus neglectus* and *Meloidogyne chitwoodi*. *J. Nematol.* 26:286 - 295.
- van der Putten, W.H., Cook, R., Costa, S., Davies, K.G., Fargette, M., Freitas, H., Hol, W.H.G., Kerry, B.R., Maher, N., Mateille, T., Moens, M., de la Pena, E., Piskiewicz, A.M., Raeymaekers, A.D.W., Rodriguez-Echeverria, S. and van der Wurff, A.W.G. 2006.

Nematode interactions in nature: models for sustainable control of nematode pests of crop plants? *Adv. Agron.* 89:227-260.

Wiratno, D., Taniwiryonoc, H., Van den Bergb, J.A.G., Riksend, I.M., Rietjensb, C.M., Djiwantia, S.R., Kammengad, J.E. and Murkb, A.J. 2009. Nematicidal activity of plant extracts against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Open Nat. Prod. J.* 2:77-85.

제 5절 포장 검정법 확립 참고문헌

Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*(5th ed). Academic Press, New York. p.922

Barker, K.R., Schmitt, D.P. and Imbriani, J.L. 1985. Nematode population dynamics with emphasis on determining damage potential to crops. In: *An advanced treatise on Meloidogyne*, Vol. II, ed. by K.R. Barker, C.C. Carter and J.N. Sasser, pp. 135-148. North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, USA.

Cho, J.D., Kim, J.S., Lee, J.H. and Chung, B.N. 2008. Characteristics of a NP strain for *cucumber mosaic virus* (CMV-NP) identified newly from sweet pepper showing fruit necrosis. *Res. Plant Dis.* 14:134-137.

Cho, J.D., Lee, S.H., Kim, J.S., Choi, G.S. Kim, H.R., Chung, B.N. and Ryu, K.H. 2006. Characteristics of *cucumber mosaic virus*-VCH causing vein chlorosis on red pepper on Korea. *Res. Plant. Dis.* 12:226-230.

Davies, G. and Jones, C. 2002. The effect of organic amendments on clubroot (*Plasmodiophora brassicae*). UK Organic Research: Proceedings of the COR Conference, 26-28 March, p. 223-224.

Devos S., Vissenberg K., Verbelen J.P. and Prinsen E. 2005. Infection of Chinese cabbage by *Plasmodiophora brassicae* leads to a stimulation of plant growth: impacts on cell wall metabolism and hormone balance. *New Phytologist* 166:241-250.

Hong, S.Y., Song, J.H., Kim, K.T., Ko, S.B. and Kim, K.H. 2007. Occurrence of diseases on broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica* P.) in Jeju island. *Plant Pathol. J.* 23:339(Abstract)

Kim, B.S. 1986. Testing for Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in crucifer Seeds and seed disinfection. *Plant Pathology J.* 2:96-101

Kim, B.S., Chun, Y.R. and Cho, K.Y. 1991. Identification of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, a Causal Agent of Black Rot of Kale(*Brassica oleracea acephala*). *Plant Pathology J.* 7:1-5

Kim, C.H., Cho, W.D. and Kim, H.M. 2000a. Distribution of *Plasmodiophora brassicae* causing clubroot disease of Chinese cabbage in soil. *Plant Dis. Res.* 6:27-33.

Kim, C.H., Cho, W.D. and Kim, H.M. 2000b. Yield loss of spring Chinese cabbage as affected by infection time of clubroot disease in fields. *Plant Dis. Res.* 6:23-26.

Kim, C.H., Cho, W.D. and Lee, S.B. 2003. Review of researches on clubroot disease of Chinese cabbage in Korea and future tasks for its management. *Plant Dis. Res.* 9:57-63.

Kim, D.G. 2001. Occurrence of root-knot nematodes on fruit vegetables under greenhouse

- conditions in Korea. Res. Plant Dis. 7:69-79.
- Kim, D.G. and Lee, J.H. 2008. Economic threshold of *Meloidogyne incognita* for greenhouse grown cucumber in Korea. Res. Plant Dis. 14:117-121. (In Korean)
- Kim, D.G., Choi, D.R. and Lee, S.B. 2001a. Effects of control methods on yields of oriental melon in field infested with *Meloidogyne arenaria*. Res. Plant Dis. 7:42-48.
- Kim, H.Y., Cho, M.R., Kang, T.J., Jung, J.A. and Han, Y.K. 2010. Screening of Tomato Cultivars Resistant to Root-knot Nematode, *Meloidogyne incognita*. Res. Plant Dis. 16:294-298. (In Korean)
- Lee, O.H., Hwang, H.S., Kim, J.Y., Han, J.H., Yoo, Y.S. and Kim, B.S. 2001. A Search for Sources of Resistance to Powdery mildew (*Leveillula taurica* (Lév.) Arn) in Pepper (*Capsicum* spp.) Kor. J. Hort. Sci. Technol. 19:7-11 (In Korean)
- Williams, D.H. 1980. Black rot: a continuing threat to world crucifers. Plant Dis. 64: 736-742
- Wright, D.P., Scholes, D., Horton, P., Baldwin, B.C. and Shepphard, M.C. 1990. The relationship between the development of haustoria of *Erysiphe graminis* and the energy status of leaves. In: Current Research in Photosynthesis, Vol. 4, ed by M. Baltscheffsky, pp. 223-226. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Yeoung, R.Y., Kim, J.H., Kim, B.S., Jeon, J.Y. and Yoon, C.S. 2003. Effects of beneficial antagonists (*Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., and *Trichoderma* sp.) on control of clubroot of Chinese cabbage. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 21:194-198.

제 6절 분자마커 검정법 개발 참고문헌

- An, S.J., Kwon, J.K., Yang, H.B., Choi, H.J., Jeong, H.J., Kim, Y.J., Choi, K.J. and Kang, B.C. 2010. SNP Marker Development for Purity Test of Oriental Melon and Melon. Korean J. Breed. Sci. 42:397-406.
- Bae, J.H., Han, Y., Jeong, H.J., Kwon, J.K., Chae, Y., Choi, H.S. and Kang, B.C. 2010. Development of a SNP marker set for tomato cultivar identification. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 28:627-637.
- Bout, S. and Vermerris, W. 2003. A candidate-gene approach to clone the sorghum Brown midrib gene encoding caffeic acid O-methyltransferase. Mol Gen Genomics. 269:205-214.
- Hoang, N.H., Yang, H.B. and Kang, B.C. 2013. Identification and inheritance of a new source of resistance against Tomato spotted wilt virus (TSWV) in *Capsicum*. Scientia Horticulturae. 161:8-14.
- Hwang, J.N., Oh, C.S. and Kang, B.C. 2013. Translation elongation factor 1B (*eEF1B*) is an essential host factor for Tobacco mosaic virus infection in plants. Virology. 439:105-114.
- Jahn M, Paran I, Hoffmann K, Radwanski ER, Livingstone KD, Grube RC, Aftergoot E, Lapidot M and Moyer J. 2000. Genetic mapping of the *Tsw* locus for resistance to the Tospovirus Tomato spotted wilt virus in *Capsicum* spp. and its relationship to the *Sw-5* gene for resistance to the same pathogen in tomato. Mol Plant Microbe In. 13:673-682.

- Jung, Y.L., Jung, C.H., Park, J.H., Kim, M.I. and Park, H.G. 2013. Direct detection of unamplified genomic DNA based on photo-induced silver ion reduction by DNA molecules. *Chem. Commun.* 49:2350–2352.
- Kim, J.H., Kang, W.H., Hwang, J.N., Yang, H.B., Kim, D.S., Oh, C.S. and Kang, B.C. 2014. Transgenic *Brassica rapa* plants overexpressing *eIF(iso)4E* 1 variants show broad-spectrum TuMV resistance *Molecular Plant Pathology*. DOI: 10.1111/mpp.12120
- Kim, J.H., Kang, W.H., Yang, H.B., Park, S.H., Jang, C.S., Yu, H.J. and Kang, B.C. 2013. Identification of a broad-spectrum recessive gene in *Brassica rapa* and molecular analysis of the *eIF4E* gene family to develop molecular markers. *Mol Breeding*. 32:385–398.
- Kim, S.I., Park, M.K., Yeom, S.I., Kim, Y.M., Lee, J.M., Lee, H.A., Seo, E.Y., Choi, J., Cheong, K., Kim, K.T., Jung, K., Lee, G.W., Oh, S.K., Bae, C., Kim, S.B., Lee, H.Y., Kim, S.Y., Kim, M.S., Kang, B.C., Jo, Y.D., Yang, H.B., Jeong, H.J., Kang, W.H., Kwon, J.K., Shin, C., Lim, J.Y., Park, J.H., Huh, J.H., Kim, J.S., Kim, B.D., Cohen, O., Paran, I., Suh, M.C., Lee, S.B., Kim, Y.K., Shin, Y., Noh, S.J., Park, J., Seo, Y.S., Kwon, S.Y., Kim, H.A., Park, J.M., Kim, H.J., Choi, S.B., Bosland, P.W., Reeves, G., Jo, S.H., Lee, B.W., Cho, H.T., Choi, H.S., Lee, M.S., Yu, Y., Choi, Y., Park, B.S., van Deynze, A., Ashrafi, H., Hill, T., Kim, W.T., Pai, H.S., Ahn, H.K., Yeam, I., Giovannoni, J.J., Rose, J.K., Sørensen, I., Lee, S.J., Kim, R.W., Choi, I.Y., Choi, B.S., Lim, J.S., Lee, Y.H., Choi, D. 2014. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. *Nat Genet.* 46:270–278.
- Lim G, Wang GP, Hemming M, McGrath D and Jones D. 2008. High resolution genetic and physical mapping of the *I-3* region of tomato chromosome 7 reveals almost continuous microsynteny with grape chromosome 12 but interspersed microsynteny with duplications on Arabidopsis chromosomes 1, 2 and 3. *Theor Appl Genet.* 118:57–75.
- Miyoshi, H., Suehiro, N., Tomoo, K., Muto, S., Takahashi, T. and Tsukamoto, T. 2006. 22 Binding analyses for the interaction between plant virus genome-linked protein (VPg) and 23 plant translational initiation factors. *Biochimie.*, 88, 329–340.
- Moury B., Pflieger S., Blattes A., Lefebvre V. and Palloix A. 2000. A CAPS marker to assist selection of tomato spotted wilt virus (TSWV) resistance in pepper. *Genome* 43:137–142.
- Mutlu, N., Boyaci, F.H., Göçmen, M. and Abak, K. 2008. Development of SRAP, SRAP-RGA, RAPD and SCAR markers linked with a *Fusarium* wilt resistance gene in eggplant. *Theor Appl Genet.* 117:1303–1312.
- Park, S.W., An, S.J., Yang, H.B., Kwon, J.K. and Kang, B.C. 2009. Optimization of High Resolution Melting Analysis and Discovery of Single Nucleotide Polymorphism in *Capsicum*. *Horticulture, Environment, and Biotechnology.* 50:31–39.
- Rouillard JM, Zuker M and Gulari E 2003. OligoArray 2.0: design of oligonucleotide probes for DNA microarrays using a thermodynamic approach. *Nucleic Acids Res.* 31:3057–3062.
- Sakamoto, K., Saito, A., Hayashida, N., Taguchi, G. and Matsumoto, E. 2008. Mapping of

- isolate-specific QTLs for clubroot resistance in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Theor Appl Genet.* 117:759–767.
- Shin, S.C., Kim, G.H., Yang, H.B., Park, K.W., Kang, B.C. and Park, H.G. 2014. Application of the ASLP technology to a novel platform for rapid and noise-free multiplexed SNP genotyping. *Biosensors and Bioelectronics* 54:687–694.
- The Tomato Genome Consortium. 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485:635 - 641.
- Tomita, R., Murai, J., Miura, Y., Ishihara, H., Liu, S., Kubotera, Y., Honda, A., Hatta, R., Kuroda, T., Hamada, H., Sakamoto, M., Munemura, I., Nunomura, O., Ishikawa, K., Genda, Y., Kawasaki, S., Suzuki, K., Meksem, K. and Kobayashi, K. 2008. Fine mapping and DNA fiber FISH analysis locates the tobamovirus resistance gene *L³* of *Capsicum chinense* in a 400-kb region of R-like genes cluster embedded in highly repetitive sequences *Theor Appl Genet.* 117:1107–1118
- Woo, M.A., Kim, M.I., Cho, D. and Park, H.G. 2013. Cell-based galactosemia diagnosis system based on a galactose assay using a bioluminescent *Escherichia coli* array. *Anal. Chem.* 85:11083–11089.
- Wu FN, Eannetta NT, Xu YM, Durrett R, Mazourek M, Jahn MM and Tanksley SD 2009. A COSII genetic map of the pepper genome provides a detailed picture of synteny with tomato and new insights into recent chromosome evolution in the genus *Capsicum*. *Theor Appl Genet* 118:1279–1293.
- Yang, H.B., Liu, W.Y., Kang, W.H., Kim, J.H., Cho, H.J., Yoo, J.H. and Kang, B.C. 2012. Development and validation of the *L* allele specific markers in *Capsicum* *Mol Breeding* 30:819–829.
- Zhao, M.A., An, S.J., Lee, S.C., Kim, D.S., Kang, B.C. 2013. Overexpression of Single-chain Variable Fragment (scFv) Antibody Confers Unstable Resistance to TuMV in Chinese cabbage. *Plant Biotechnol Rep.* 31:1203–1211.

제 7절 육종소재 선발 참고문헌

- Abad, P., Gouzy, J., Aury, J.M., Castagnone-Sereno, P., Danchin, E.G.J. and Deleury, E. 2008. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nat. Biotechnol.* 26:909–915.
- Agrios, G.N. 1997. *Plant pathology*, 4th edition. Academic Press, San Diego.
- Arden, S. 1979. Fusarium yellows of cabbage and related crops. *Vegetable Crops* 730.
- Arie, T., Kobayashi, Y., Okada, G., Kono, Y. and Yamaguchi, I. 1998. Control of soilborne clubroot disease of cruciferous plants by epoxydon from *Phoma glomerata*. *Plant Pathol.* 47:743–748.
- Armstrong, G.M. and Armstrong, J.K. 1952. Physiological races of the fusaria causing wilts of the Cruciferae. *Phytopathology* 42:255–257.
- Armstrong, G.M. and Armstrong, J.K. 1966. Races of *Fusarium oxysporum* f. *conglutinans*;

- race 4, new race; and a new host for race 1, *Lychnis chalconica*. *Phytopathology* 56:525-530.
- Armstrong, G.M. and Armstrong, J.K. 1981. *Formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. In : *Fusarium Diseases, Biology and Taxonomy*, ed. by P. E. Nelson, T. A. Toussoun and R. J. Cook, pp. 391-399. The Pennsylvania State University Press, University Park, USA.
- Baggett, J. R. and Kean, D. 1985. Clubroot-resistant broccoli breeding lines OSU CR-2 to OSU CR-8. *Hort. Science* 20:784-785.
- Baik, S.Y., Kim, J.C., Jang, K.S., Choi, Y.H. and Choi, G.J. 2011. Development of efficient screening method for resistance of cabbage to *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*. *Res. Plant Dis.* 17:13-18. (In Korean)
- Barker, K.R., Schmitt, D.P. and Imbriani, J.L. 1985. Nematode population dynamics with emphasis on determining damage potential to crops. p. 135-148. In: K.R. Barker, C.C. Carter, and J.N. Sasser (eds), *An advanced treatise on Meloidogyne*, Vol. II. North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, USA.
- Blank, L.M. 1937. *Fusarium* resistance in Wisconsin all seasons cabbage. *J. Agric. Res.* 55:497-510.
- Boina, D.R., Lewis, E.E. and Bloomquist, J.R. 2008. Nematicidal activity of anion transport blockers against *Meloidogyne incognita*, *Caenorhabditis elegans* and *Heterorhabditis bacteriophora*. *Pest Manag. Sci.* 64:646-653.
- Bosland, P.W. 1996. *Capsicums*: Innovative uses of an ancient crop. p. 479-487. In: J. Janick, ed., *Spices, herbs, and edible fungi*. Elsevier Publ., New York.
- Bosland, P.W. and Williams, P.H. 1986. An evaluation of *Fusarium oxysporum* from crucifers based on pathogenicity, isozyme polymorphism, vegetative compatibility, and geographic origin. *Can. J. Bot.* 65:2067-2073.
- Bosland, P.W. and Williams, P.H. 1987. An evaluation of *Fusarium oxysporum* from crucifers based on pathogenicity, isozyme polymorphism, vegetative compatibility, and geographic origin. *Can. J. Bot.* 65:2067-2073.
- Bosland, P.W. and Williams, P.H. 1988. Pathogenicity of geographic isolates of *Fusarium oxysporum* from crucifers on a differential set of crucifer seedlings. *J. Phytopathol.* 123:63-68.
- Cartea, M.E., Velasco, P., Obregon, S., Padilla, G. and Haro, A.D. 2008. Seasonal variation in glucosinolate content in *Brassica oleracea* crops grown in northwestern Spain. *Phytochemistry* 69:403-410.
- Cho, H.J., Han, S.C. and Choi, D.G. 1986. Screening peanut, pepper, cucumber, and tomato varieties for resistance to root-knot nematode, *Meloidogyne hapla*. *Res. Rept. RDA.* 28:94-97.
- Choi, D.R., Lee, J.K., Park, B.Y. and Chung, M.N. 2006. Occurrence of root-knot nematodes in sweet potato fields and resistance screening of sweet potato cultivars. *Korean J. Appl. Entomol.* 45:211-216.

- Chon, H.S., Park, H.J., Yeo, S.G., Park, S.D. and Choi, Y.E. 1996. Technical development for control on soil nematodes (*Meloidogyne spp.*) of oriental melon in plastic film house. RDA J. Agri. Sci. 38 (C.P.):401-407.
- Crute, I.R., Gray, A.R., Crisp, P. and Buczacki, S.T. 1980. Variation in *Plasmodiophora brassicae* and resistance to clubroot disease in Brassicas and allied crops- a critical review. Plant Breeding Abst. 50:91-104.
- Dobson, R.L., Gabrielson, R.L., Baker, A.S. and Bennett, L. 1983. Effects of lime particle-size and distribution and fertilizer formulation on clubroot disease caused by *Plasmodiophora brassicae*. Plant Dis. 67:50-52
- Farnham, M.W., Keinath, A.P. and Smith, J.P. 2001. Characterization of Fusarium yellows resistance in collard. Plant Dis. 85:890-894.
- Fassuliotis, G. 1985. The role of nematologist in the development of resistance cultivars. An advanced treaties on *Meloidogyne*. Vol. I: Biology and control edited by Sasser, J. N. and Cater. C.C., pp. 234-240.
- Figdore, S.S., Ferreira, M.E., Slocum, M.K. and Williams, P.H. 1993. Association of RFLP markers with trait loci affecting clubroot resistance and morphological characters in *Brassica oleracea* L. Euphytica 69:33-44.
- Grandclement, C. and Thomas, G. 1996. Detection and analysis of QTLs based on RADP markers for polygenic resistance to *Plasmodiophora brassicae* Woron in *Brassica oleracea* L. Theor. Appl. Genet. 93:86-90.
- Han, S.C. and Kim, Y.G. 1997. Screening resistant red pepper varieties to *Meloidogyne hapla* and their resistance mechanisms. Korean J. Appl. Entomol. 36:185-191.
- Hansen, M. 1989. Genetic variation and inheritance of tolerance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Wor.) and other quantitative characters in cabbage (*Brassica oleracea* L.). Hereditas 110:13-22.
- Heald, C.M. and Robinson, A.F. 1987. Effects of soil solarization of *Rotylenchus reniformis* in the Lower Rio Grande Valley of Texas. J. Nematol. 19:93-103.
- Hirai, M. 2006. Genetic analysis of clubroot resistance in Brassica crops. Breed. Sci. 56:223-229.
- Hwang, B.K. 1995. Genetical variation of *Phytophthora capsici* isolates, genetics and biochemistry of resistance to phytophthora blight in *Capsicum annuum*, p. 145. In: H.S. Chung (ed.). Current Topics in Fungal Plant Pathology. Hanrimwon Publishing Company, Seoul, Korea.
- Im, J.H. and S.G. Lee. 2004. Red pepper anthracnose: *Colletotrichum gloeosporioides*, It's cultural variations and pathogenicity. Res. Plant Dis. 10:203-208.
- James, R.V. and Williams, P.H. 1980. Clubroot resistance and linkage in *Brassica campestris*. Phytopathology 70:776-779.
- Jo, S.J., Shim, S.A., Jang, K.S., Choi, Y.H., Kim, J.C. and Choi, G.J. 2012. Development of efficient screening method for resistant cabbage and broccoli to *Plasmodiophora brassicae*. Res. Plant Dis. 18:86-92. (In Korean)

- Jung, C. and Wyss, U. 1999. New approaches to control plant parasitic nematodes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:439-446.
- Kang, B.K., J.H. Kim, K.H. Lee, S.C. Lim, J.J. Ji, J.W. Lee, and H.T. Kim. 2009. Effects of temperature and moisture on the survival of *Colletotrichum acutatum*, the causal agent of pepper anthracnose in soil and pepper fruit debris. *Plant Pathology J.* 25:128-135.
- Keinath, A.P., Farnham, M.W. and Smith, P. 1998. Reactions of 26 cultivars of *Brassica oleracea* to yellows in naturally infested soil. *Biol. Cult. Tests* 13:155.
- Kim, B.S. 1986. Resistance to phytophthora root rot in introduced peppers (*Capsicum* spp.). *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 20:77-80.
- Kim, B.S. and H.S. Hwang. 2002. Introduction of resistance to *Phytophthora capsici* into 'Chilseongcho' a local pepper cultivar in Youngyang, using backcross method. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 20:77-80.
- Kim, C.H. and K.S. Park. 1998. A predictive model of disease progression of red-pepper anthracnose. *Kor. J. Plant Pathol.* 4:325-331.
- Kim, C.H., Cho, W.D. and Lee, S.B. 2003. Review of researches on clubroot disease of Chinese cabbage in Korea and future tasks for its management. *Res. Plant Dis.* 9: 57-63. (In Korean)
- Kim, D.G. 2001 Occurrence of root-knot nematodes on fruit vegetables under greenhouse conditions in Korea. *Res. Plant Dis.* 7:69-79. (In Korean)
- Kim, J.I. and Han, S.C. 1998. Effect of solarization for control of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). *Korean J. Appl. Entomol.* 27:1-5.
- Kim, K.-H., J.-B. Yoon, H.-G. Park, E.W. Park, and Y.H. Kim. 2004. Structural modifications and programmed cell death of chili pepper fruit related to resistance responses to *Colletotrichum gloeosporioides* infection. *Phytopathology* 94:1295-1304.
- Kim, S., K.-T. Kim, D.-H., Kim, E.-Y. Yang, M.-C. Cho, A. Jamal, Y. Chae, D.-H. Pae, D.-G. Oh, and J.-K. Hwang. 2010. Identification of quantitative trait loci associated with anthracnose resistance in chili pepper (*Capsicum* spp.). *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 28:1014-1024.
- Kim, Y.-S., J.Y. Min, B.K. Kang, N.V. Bach, W.B. Choi, E.W. Park, and H.T. Kim. 2007. Analyses of the less benzimidazole-sensitivity of the isolates of *Colletotrichum* spp. causing the anthracnose in pepper and strawberry. *Plant Pathology J.* 23:187-198.
- Koh, S.B., Kim, S.B. and Kwak, J.H. 2013a. 18. cabbage, In: *Korea Horticulture Historical Development*, ed. by K.W., Kang et al. pp. 111-114. National Institute of Horticultural & Herbal Science and The Korean Society for Horticultural Science, Korea.
- Koh, S.B., Kim, S.B. and Kwak, J.H. 2013b. 19. broccoli. In: *Korea Horticulture Historical Development*, ed. by K.W., Kang et al. pp. 115-117. National Institute of Horticultural & Herbal Science and The Korean Society for Horticultural Science, Korea.
- Kuginuki, Y., Yoshikawa, H. and Hirai, M. 1999. Variation in virulence of *Plasmodiophora brassicae* in Japan tested with clubroot resistance cultivars of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Eur. J. Plant Pathol.* 105:327-332.

- Landry, B.S., Hubert, N., Crete, R., Chiang, M.S., Lincoln, S.E. and Etoh, T. 1992. A genetic map for *Brassica oleracea* based on RFLP markers detected with expressed DNA sequences and mapping of resistance gene to race 2 of *Plasmodiophora brassicae* (Woronin). *Genome* 35:409–420.
- Laurence, F. and Thomas, G. 1993. Inheritance of resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Wor.) in kale (*Brassica oleracea* ssp. *acephala*). *Hereditas* 119: 253–262.
- Lee, O.H., H.S. Hwang, J.Y. Kim, J.H. Han, Y.S. Yoo, and B.S. Kim. 2001. A Search for Sources of resistance to powdery mildew (*Leveillual taurica* (Lev.) Arn) in pepper (*Capsicum* spp.). *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 19:7–11.
- Lv, H., Yang, L., Kang, J., Wang, Q., Wang, X., Fang, Z., Liu, Y., Zhuang, M., Zhang, Y., Lin, Y., Yang, Y., Xie, B., Liu, B. and Liu, J.-S. 2013. Development of InDel markers linked to Fusarium wilt resistance in cabbage. *Mol. Breed.* 32:961–967.
- Moon, Y.G., Kim, W.G., Cho, W.D. and Sung, J.M. 2001. Occurrence of Fusarium wilt on cruciferous vegetable crops and pathogenic differentiation of the causal fungus. *Res. Plant Dis.* 7:93–101. (In Korean)
- Moriguchi, K., Kimizuka-Takagi, C., Ishii, K. and Nomura, K. 1999. A genetic map based on RAPD, RFLP, isozyme, morphological markers and QTL analysis for clubroot resistance in *Brassica oleracea*. *Breed. Sci.* 49:257–265.
- Niwa, R., Nomura, Y., Osaki, M., and Ezawa, T. 2008. Suppression of clubroot disease under neutral pH caused by inhibition of spore germination of *Plasmodiophora brassicae* in the rhizosphere. *Plant Pathol.* 57:445 - 452
- Nomura, K., Minegishi, Y., Kimizuka-Takagi, C., Fujioka, T., Moriguchi, K., Shishido, R. and Ikehashi, H. 2005. Evaluation of F2 and F3 plants introgressed with QTLs for clubroot resistance in cabbage developed by using SCAR markers. *Plant Breed.* 124:371–375.
- Park, K.S., S.S. Yang, and Y.K. Yang. 1986. Epidemiologic Study of red pepper anthracnose. National Institute of Agricultural Science and Technology. 19: 286–294.
- Park, S.D., Kwon, T.Y., Choi, B.S., Lee, W.S. and Choi, Y.E. 1995a. Studies on integrated control against root-knot nematode of fruit vegetable (oriental melon and cucumber) in vinyl house. *Korean J. Appl. Entomol.* 34:75–81.
- Park, S.D., Kwon, T.Y., Jun, H.S. and Choi, B.S. 1995b. The occurrence and severity of damage by root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in controlled fruit vegetable field. *RDA. J. Agri. Sci.* 37:318–323.
- Park, S.-K., S.H. Kim, H.G. Park, and J.B. Yoon. 2009. *Capsicum* germplasm resistant to pepper anthracnose differentially interact with *Colletotrichum* isolates. *Hort. Environ. Biotechnol.* 50:17–23.
- Peterson, J.L. and Pound, C.S. 1960. Studies on resistance in radish to *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* race 2. *Phytopathology* 50:807–816.
- Ramirez-Villupadua, J., Endo, R.M., Bosland, P. and Williams, P.H. 1985. A new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* that attacks cabbage type A resistance. *Plant*

Dis. 69:612–613.

- Rhoades, H.L. 1976. Effects of *Indigofera hirsute* on *Belonolaimus longicaudatus*, *Meloidogyne incognita*, and *M. javanica* and subsequent crop yield. Plant Dis. Rep. 60:384–386.
- Rocherieux, J., Glory, P., Giboulot, A., Boury, S., Barbeyron, G., Thomas, G. and Manzaneres-Dauleux, M.J. 2004. Isolatespecific and broad-spectrum QTLs are involved in the control of clubroot in Brassica oleracea. Theor. Appl. Genet. 108:1555–1563.
- Saranth Babu, B., S.R. Pandravada, R.D.V.J. Prasada Rao, K. Anitha, S.K. Chakrabarty, and K.S. Varaprasad. 2011. Global sources of pepper genetic resources against arthropods, nematodes and pathogens. Crop Prot. 30:389–400.
- Suwabe, K., Tsukada, H., Iketani, H., Hatakeyama, K., Fujimura, M., Nunome, T., Fukuoka, H., Matsumoto, S. and M. Hirai. 2003. Identification of two loci for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in *Brassica rapa* L. Theor. Appl. Genet. 107:997–1002.
- Taylor, A.L. and Sasser, J.N. 1978. Biology, identification and control of root knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Coop. Pub. Deptt. Plant Pathol., North Carolina State University and United States Agency for International Development, Graphics, Raleigh, 111 pp.
- The Korean Society of Plant Pathology. 2009. List of Plant Disease in Korea, 5th ed. p. 853.
- Tran Thi Phuong Chi, O.H. Choi, Y.S. Kwak, D.Y. Son, J.J. Lee, and J.W. Kim. 2012. Evaluation of streptomyces padanus IA70–5 strain to control hot pepper anthracnose (*Colletotrichum acutatum*). Journal of Agriculture & Life Science. 46:37–45.
- Umesh, K.C., Ferris H. and Bayer, D.E. 1994 Competition between the plant-parasitic nematodes *Pratylenchus neglectus* and *Meloidogyne chitwoodi*. J. Nematol. 26:286–295.
- van der Putten, W.H., Cook, R., Costa, S., Davies, K.G., Fargette, M., Freitas, H., Hol, W.H.G., Kerry, B.R., Maher, N., Mateille, T., Moens, M., de la Pena, E., Piskiewicz, A.M., Raeymaekers, A.D.W., Rodriguez-Echeverria, S. and van der Wurff, A. W. G. 2006. Nematode interactions in nature: models for sustainable control of nematode pests of crop plants? Adv. Agron. 89:227–260.
- Voorrips, R.E. 1995. *Plasmodiophora brassicae*: aspects of pathogenesis and resistance in Brassica oleracea. Euphytica 83:139–146.
- Voorrips, R.E. and Visser, D.L. 1993. Examination of resistance to clubroot in accessions of *Brassica oleracea* L. using a glasshouse seedling test. Neth. J. Plant Pathol. 99:269–276.
- Voorrips, R.E., Jongerius, M.C. and Kanne, H.J. 1997. Mapping of two genes for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) in a population of doubled haploid lines of *Brassica oleracea* by means of RFLP and AFLP markers. Theor. Appl. Genet. 94:75–82.
- Walker, J.C. 1930. Inheritance of Fusarium resistance to cabbage yellows. J. Agric. Res. 40:721–745.
- Walker, J.C. 1958. Progress and problems in controlling plant disease by host resistance. In

- : Plant Pathology Problems and Progress 1908-1958, ed. by C.S. Holton, G.W. Fischer, R.W. Fulton, H. Hart and S.E.A. McCallan, pp. 32-41. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 588 pp.
- Yoon, C.S., Jung, E.K., Lee, S.J., Zhang, Y., Lee, J.E. and Kim, B.S. 2010. Screening of resistant Chinese cabbage cultivar against clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) for cultivation in highland. Res. Plant Dis. 16:9-65. (In Korean)
- Yoon, J.B., D.C. Yang, W.P. Lee, S.Y. Ahn, and H.G. Park. 2004. Genetic resources resistant to anthracnose in the genus *Capsicum*. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 45:318-323.
- Yoon, J.B., J.W. Do, D.C. Yang, and H.G. Park. 2004. Interspecific cross compatibility among five domesticated species of *Capsicum* genus. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 45:324-329.
- Yoshikawa, H. 1993. Studies on breeding of clubroot resistance in cole (Cruciferae) crop. Bull. Natl. Res. Inst. Veg. Ornam. Plants Tea Japan, Ser. A 7:1-165.
- Zhang, X.Z., Lee, S.U., Kim, J.S., Yoon, Y.S., Choi, G.S., Kim, H.K. and Kim, B.S. 2005. Control efficacy of Flusulfamide GR on Chinese cabbage clubroot caused by *Plasmodiophora brassicae*. Res. Plant Dis. 11:43-47.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.

[부 표]

인 쇄 내 용

I. 인쇄규격

1. 크기 : A4 신판(가로 210mm * 세로297mm)
2. 제본 : 좌철
3. 용 지
 - 가. 표지 200g/m² 양면 아트지
 - 나. 내용 80g/m² 모조지
4. 인쇄방법
 - 가. 표지 : 바탕 백색, 활자 흑색
 - 나. 내용 : 흑색 지정활자
 - 다. 양면인쇄

II. 편집순서

1. 표 지
2. 제출문
3. 요약문
4. 영문 요약서(Summary)
5. 영문 목차(Contents)
6. 목 차
7. 본 문
8. 뒷면지

III. 참고사항

전자조판 인쇄 시에는 이에 준한다.