

11-1543000
-001498-01

발간등록번호
11-1543000-001498-01

오이 노균병저항성 마커 개발을 통한 노균병저항성 품종 개발 최종보고서

2016

농림축산식품부

Bio-Industry R&D Report

오이 노균병 저항성 마커개발을 통한 노균병 저항성 품종 개발

최종보고서

2016 . 10. 23.

주관연구기관 / 세종대학교
협동연구기관 / 팜한농

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “오이 노균병 저항성 마커 개발을 통한 노균병 저항성 품종 개발”(개발기간 : 2011. 9. 23 ~ 2016. 9. 22)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016. 12. 12.

주관연구기관명 : 세종대학교 산학협력단 (대표자) 김 선재 (인)

협동연구기관명 : 주식회사 팜한농 (공동 대표이사) 박 진수 (인)

(공동 대표이사) 김 용환 (인)

참여기관명 : 주식회사 팜한농 (공동 대표이사) 박 진수 (인)

(공동 대표이사) 김 용환 (인)

주관연구책임자 : 이 상 협

협동연구책임자 : 최 연 옥

참여기관책임자 : 박 진수, 김 용환

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	111057-5	해당 단계 연구 기간	2011. 9. 23 ~ 2016. 9.22	단 계 구 분	(1)/ (1)
연구 사업명	중 사업명	농생명산업기술개발			
	세부 사업명	생명자원 생산, 관리 기술개발			
연구 과제명	대 과제명	대과제가 있을 경우 기재합니다(단위과제일 경우에는 아래에 기재합니다)			
	세부 과제명	오이 노균병 저항성 마커 개발을 통한 노균병 저항성 품종 개발			
연구 책임자	이 상 협	해당단계 참 여 연구원 수	총: 85 명 내부: 60 명 외부: 25 명	해당단계 연구 개발비	정부: 650,000천원 민간: 650,000천원 계: 1,300,000천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 85 명 내부: 60 명 외부: 25 명	총 연구개발비	정부: 650,000천원 민간: 650,000천원 계: 1,300,000천원
연구기관명 및 소속부서명	세종대학교 바이오산업자원공학			참여기업명: 주식회사 팜한농	
위탁 연구	연구기관명:			연구책임자:	
요약				보고서 면수: 99	
<ul style="list-style-type: none"> - 노균병 병원체의 특성 규명 및 저항성 개체 선발을 위한 유묘 검정 및 포장검정 조건을 규명하여 적용하였다. - SSR과 SNP 마커를 활용한 전통적인 QTL 분석법과 유전체 서열 정보를 활용한 GBS-기반의 QTL 분석법을 통해 노균병 저항성 QTL locus 를 규명하고 이들 영역에 연관된 마커를 선발하여 저항성 품종 육성에 보조적으로 활용하였다 - 유묘검정과 포장검정을 통해 원예적 형질이 우수한 노균병 저항성 계통을 선발하였으며, 선발된 계통을 이용하여 분자표지 개발 집단과 저항성 계통 육성에 활용하였다. - 유묘검정, 포장검정, 마커선발을 활용하여 국내 및 수출용 19 계통(백다다기-8 계통, 가시오이-6 계통, 취청오이-5 계통) 을 선발하였다. - 육성된 계통을 이용하여 조합을 작성하여 특성 검정을 실시하여 최종 6 개 조합을 선발하여 농가시험을 실시하였다. - 농가시험을 통해서 품종보호출원 1건(시원 백다다기) 과 생산 판매신고 1건(수정 백다다기)을 실시하였다 					

국문 요약문

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	1. 오이 노균병 실내 유묘검정 및 포장선발 기술 연구 2. 오이 유전자원 특성 조사 및 매핑 집단 작성 3. 오이 노균병 저항성 QTL 분석 및 연관마커 개발 4. 노균병 저항성 계통 및 조합 육성을 통한 품종 개발					
연구개발성과	1. 노균병 저항성 개체 선발에 필요한 효율적인 선발법 개발 - 유묘 검정 조건 규명: 노균병 저항성 표준 유전자원(PI197088)을 활용하여 실내온실/식물생장상을 이용한 노균병 접종 및 저항성 개체 선발 조건 규명 (18~22°C, 10 ⁵ cfu/ml, 100% RH) - 포장 조건에서 1~8 scale 의 병지수 검정 확립 2. 오이 유전자원 특성 조사 및 매핑 집단 작성 - 유묘검정, 포장검정을 병행하여 노균병 저항성 개체 선발을 실시함 - 수집 108개 자원 중에서 저항성지수가 1~2인 자원/계통 선발 가시오이 6, 백다다기 2, 동남아 슬라이서 9, BAP 1, PSL 2 선발함 - 노균병 저항성, 이병성 각 4 계통을 이용해 작성한 15 분리집단 중 1개 집단 선발 유전자 지도, QTL mapping을 통해 마커 개발에 활용함 3. 오이 노균병 저항성 QTL 분석 및 연관마커 개발 - 오이 노균병원체 서열분석을 통한 변이체 선발을 실시한 결과 국내 포장에서 발견되는 병원체는 동일한 것으로 판단됨 - 오이에서 노균병 병징이 발생하기 전에 노균병원체를 진단하는 기법 개발(특허 등록) - 유전체 서열과 SSR 마커를 바탕으로 전장 855.6 cM 유전자 지도를 작성함 - 전통적인 QTL mapping을 실시해서 노균병 저항성을 조절하는 dm2-1, dm2-2, dm5-1 locus 를 규명함 - GBS 기반 QTL mapping을 실시해서 노균병 저항성을 조절하는 dm2-1, dm4-1, dm5-1, dm6-1 locus를 규명함 - 상기 노균병 저항성 locus 연관마커를 개발하여 육종 계통에 적용성 검정을 실시함 4. 노균병 저항성 계통 육성: 240 계통(총 8,364 개체)를 대상으로 유묘, 포장 선발을 4년 간 병행 실시하여 원예 형질이 우수하고 노균병 저항성이 강한 19 계통을 최종 선발함. 5. 노균병 저항성 조합 육성: 백다다기 145 조합을 대상으로 3년간 선발 및 조합 재작성을 실시하여 원예 형질이 우수하고 노균병 저항성이 강한 6 조합을 최종 선발하였음. 6. 노균병 저항성 품종 육성: 선발된 6조합에 대해 농가 연락시험을 실시하여 생산판매신고와 품종보호출원을 각각 1건씩 실시함.					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	1. 국내 시설재배 오이에 가장 심각한 피해를 주는 노균병 품종 육성에 본 과제에서 개발된 계통을 활용할 계획임. 2. 기존 과제 (흰가루병, CMV 저항성, 내병성 품종 개발) 결과와 연계해서 복합 내병성, 내병성 품종을 개발하면 시설재배 농가 소득 증대와 친환경 농산물 생산 기반 구축을 통한 안전한 먹거리 생산이 가능해짐. 3. 병검정, 내병성 분자마커, 유전체 정보 등 본 과제를 통해 확보된 기술을 적용하면 효율적인 오이 품종 육성이 가능해짐. 3. 본 과제에서 개발된 육종 계통 및 조합을 활용하여 중국, 인도 및 동남아시아 오이 시장에 출시할 품종 육성이 가능해짐.					
중심어 (5개 이내)	오이	노균병	분자마커	QTL mapping	품종육성	

< SUMMARY >

<p>Purpose& Contents</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Study of in-house seedling and field evaluation of cucumber downy mildew resistance. 2. Trait evaluation of cucumber germplasms and construction of QTL mapping population. 3. Analysis of downy mildew resistance QTL and development of downy mildew resistance-linked molecular marker. 4. Development of downy mildew resistance breeding lines and cultivar 				
<p>Results</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Development of effective selection method required for selection of downy mildew resistance cucumber. <ul style="list-style-type: none"> - Identify screening condition to cucumber seedling: Establish condition of downy mildew inoculation and resistance selection using standard germplasm(PI197088) using indoor greenhouses / plant growth chamber. 2. Trait evaluation of cucumber germplasms and construction of QTL mapping population <ul style="list-style-type: none"> - In parallel the seedling and field screening to select downy mildew resistance cucumber. - Selection of downy mildew resistance cucumber from 108 germplasms - From 15 populations, one mapping population was selected further study. 3. Development of cucumber downy mildew resistance QTL analysis, and linked marker. <ul style="list-style-type: none"> - It is believed that there is no sequence variant base on <i>P. cubensis</i> sequencing. - Development of genetic map(855.6 cM) based on the genome sequence and SSR markers. - Development of diagnosing markers for <i>P cubensis</i> (registered patent). - Identification of 5 downy mildew resistance QTL locus and linked markers. 4. Development of downy mildew resistant breeding lines: selection of 19 breeding lines from 240 breeding lines (a total of 8,364 individuals) during 4 years. 5. Development of downy mildew resistant crossing combinations: selection of 6 crossing combinations from 145 combinations during 3 years. 6. Development of downy mildew resistant cultivar: submission of variety protection. 				
<p>Expected Contribution</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. The downy mildew resistance breeding lines and cross combinations will be used for downy mildew cultivars. 2. Pyramiding of resistance genes to downy mildew, powdery mildew, CMV and low temperature will used for multi-disease resistance cucumber cultivar will gain more profit to farmers and facilitate organic farming, 3. The screening technique and molecular marker of downy mildew resistance, and cucumber genome information generated from this research project will be facilitate cucumber breeding program. 4. The downy mildew resistance breeding lines and cross combinations generated from this project will be facilitate cucumber breeding program for developing cultivars target on china, india and eastern Asia. 				
<p>Keywords</p>	<p>cucumber</p>	<p>downy mildew</p>	<p>molecular marker</p>	<p>QTL mapping</p>	<p>breeding</p>

< **Content** >

1. Summar of project	7
2. Status of related technology development	9
3. Project's result	14
4. Attainment targets & contributiveness of related-areas	85
5. Application plan of project's result	89
6. Information of related-foreign technlogy development	91
7. Security level of project	93
8. Status of research facility & equipment	93
9. Performance of lab. safety supervision	93
10. Representative record of project	95
11. Other detail	95
12. References	95

<Appendix> Self-evaluation report

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의개요	7
2. 국내외 기술개발 현황	9
3. 연구수행 내용 및 결과	14
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	85
5. 연구결과의 활용계획 등	89
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	91
7. 연구개발성과의 보안등급	93
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	93
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	93
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	95
11. 기타사항	95
12. 참고문헌	95

〈별첨〉 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- 국내 및 수출용 노균병 저항성 오이 품종을 개발하기 위해서 노균병 실내 유묘 접종 시스템 개발과 QTL mapping 집단 육성을 통한 노균병 저항성 마커를 개발함
- 국내 및 수출용 노균병 저항성 오이 품종을 개발하기 위해서 노균병 저항성 계통(4 계통) 및 조합(4조합)을 육성함
- 노균병 저항성 국내 품종(1품종)을 육성하고 생산판매신고 (1품종) 를 실시함

1-2. 연구개발의 필요성

- 국내 오이재배면적은 변동이 있지만 2005년 이후 평균 5,000 ha 이상이고 생산액은 4,600 억 원으로 단위면적당 소득이 가장 높은 채소작물로 시설재배 농가의 주요 경제작물임.
- 종자시장 규모는 약 75 억원 으로 국내 채소작물 중 7위지만, 인접한 아시아 시장을 포함하면 중요한 글로벌 채소작물중 하나임.
- 중국의 경우 오이 재배면적은 1,200,000 - 1,600,000 ha이며 종자시장 규모는 약 12~15 억 위엔 으로 가장 중요한 채소 작물 중 하나이고 최근에 내한성 및 복합 병저항성 품종에 대한 수요가 지속적으로 증가하고 있음.
- 중국 및 아시아 지역은 전 세계 오이 생산량의 80% 이상 생산되고 있는 지역이나 아직까지 OP(고정종) 품종 비율이 높아 우수한 일대잡종(F1) 품종을 보급할 경우 국내 품종의 시장 진출이 가능하고, 특히 복합 내병성과 내한성이 집적된 품종이 개발되면 막대한 오이 수출 시장이 개척될 수 있음.
- 따라서 한국 품종 육성 위주의 육종기반 강화와 더불어 수출용 품종 개발로 연구 역량을 확대하여 수출 시장을 개척할 시기임.
- 다양한 오이 병원체 중에서 노균병은 시설 및 노지재배에서 가장 문제시되는 병으로서, *Pseudoperonospora cubensis* 에 의해 발생하며, 시설재배가 증가함에 따라 연중 발생되고 있으나, 방제가 어려운 병이고, 방제로 인한 경제적 손실액은 연간 약 100 억원 이상으로 추정됨.
- 현재 국내에서 재배되고 있는 대부분의 오이 품종은 이병성을 나타내며 일부 저항성을 갖는 품종이 시장에 출시되어 있으나, 수량성 및 품질 수준이 농민이 요구하는 수준에 미치는 저항성 품종은 없는 상태임
- 오이 노균병은 다수의 유전자가 관여하는 양적형질로 저항성 계통을 육성하기 위해서는 대규모의 분리집단을 대상으로 한 반복적인 선발과 고정이 필요하여 품종 육성에 까다로운 점이 있어서 몇몇 연구팀에서 노균병 저항성 마커 개발 및 저항성 품종 육성 연구가 진행되었으나 만족할 만한 결과를 아직까지 도출하지 못한 상태임

- 따라서 최신 유전체 기술을 활용한 분자유종 기술에 대한 노하우를 가진 세종대 연구진과 다년간 오이 육종 경험을 보유한 팜한농 육종 연구진이 각자의 노하우를 공유하여 첨단 유전체 기반 분자마커 개발 기술, 오이 유전체 염기서열 정보, 체계적인 계통 육성 및 병리 시스템을 결합하면 기존 연구진이 해결하지 못한 노균병 저항성 우수 계통 육성을 통한 품종 개발이 가능할 것임.
- 특히 팜한농 연구진과 동국대 연구진은 공동으로 오이의 흰가루병 저항성, CMV 저항성, 내한성 마커 개발과 품종 육성이라는 농림수산식품부의 정부 과제를 현재 진행하고 있으므로 본 과제 결과를 기존 과제와 접목시키면 시너지 효과 [복합내병성(흰가루병, 노균병, CMV) 과 내한성이 집적된 계통 육성 및 품종 개발] 창출이 기대되는 과제임.

“최근 친환경 농산물에 대한 소비자의 욕구가 증가하고, 재배관리 편리한 품종에 대한 농민의 수요가 증대되므로 내병성 품종 육성을 위한 분자마커 마커 개발 및 이를 이용한 계통 육성이 절실히 필요한 시점”이고 복합 내병성과 내한성이 집적된 품종 육성을 통해 거대한 중국 및 아시아 오이 시장을 선점할 시기임.

1-3. 연구개발 범위

- 노균병 실내 유묘검정 조건 연구
 - 오이 노균병 표준 저항성/이병성 자원을 활용하여 스크리닝 조건을 규명함
- 노균병 저항성 개체 포장선발 기술 연구
 - 포장에서의 노균병 저항성 개체 선발을 실시함
 - 유묘검정과 포장검정의 저항성 개체 선발의 정확도를 비교함
- 노균병 저항성/이병성 매핑 집단 구축
 - 노균병 저항성 계통(R) 과 이병성 계통(S) 간의 교배를 통해서 F₁ 개체를 확보함
 - F₁ 개체에서 자가 수분을 실시하여 F₂ 개체를 확보하여 유전자 지도 작성과 노균병 저항성 QTL mapping 에 활용함
 - F₂ 개체를 자가 수분하여 F₃ 개체를 확보하여 유전자형 분석과 노균병 저항성 여부를 검정하여 QTL mapping 에 활용함
- 오이 다형성 마커 선발
 - 오이 노균병 저항성 계통, 노균병 감수성 계통의 유전체 염기 서열 분석을 실시함
 - 노균병 저항성과 감수성 계통 간에 다형성 마커를 선발함
- 오이 유전자 지도 작성
 - 오이 F₂ mapping 집단과 SSR(simple sequence repeat) 마커를 활용하여 오이 유전자 지도를 완성함

○ 오이 노균병 저항성 연관 마커 개발

- 오이 F₂ mapping 집단을 대상으로 SSR 마커와 유전체 서열 분석에서 나온 SNP 마커를 활용하여 QTL mapping을 실시함
- QTL mapping을 통해서 노균병 저항성 영역이 밝혀지면, 이들 영역을 기반으로 노균병 저항성 연관 마커를 개발함

○ 국내 및 수출용 노균병 저항성 계통 및 조합 육성

- 국내외 유전자원 특성평가 및 선발
- 백다다기(국내), 가시와 취청계 중심(국외) 으로 계통 육성
- 원예적 특성이 우수한 노균병 저항성 계통 육성
- 계통 간에 교배 조합을 실시하여 우수한 조합 선발

○ 노균병 저항성 국내 품종 육성

- 제일 우수한 선발 조합에서 생산된 F₁을 대상으로 품종보호출원을 실시함

2. 국내외 기술개발 현황

2-1. 국내의 기술 개발 현황

- 오이 노균병은 *P. cubensis* 라는 곰팡이 병원체에 의해 감염되는 병으로 흰가루병과 더불어서 가장 심각한 질병중 하나이다. 특히 수출용 오이 재배에 가장 많은 피해를 주는 병으로, 노균병 방제에 소홀하게 되면 작기를 조기에 끝내야 하는 경우도 발생한다. 일반 약제를 이용하여 방제를 할 경우에는 농약 잔류로 수출이 중단되는 사례가 발생하는 상황이다. 특히 병징이 나타나기 시작한지 1주일 이내에 적절한 방제가 이루어지지 않으면 50% 이상의 수확량 감소가 발생하므로 노균병 저항성 품종 육성이 필요한 상황이다.
- 사실 2004년 이전까지는 노균병이 그리 심각한 상황은 아니었다. 하지만 2004년도에 이후 미국 동부 지역의 오이 재배 농가에 심각한 피해를 입혔다. North Carolina에서 발병이 시작된 노균병은 남쪽으로는 플로리다 북쪽으로는 캐나다 인접 지역까지 확대되었고 결국 기존의 저항성 품종의 저항성이 무너지는 상황이 미국에 발생하였고, 거의 동일한 현상이 전 세계적으로 발생하였다. 최근의 연구결과에 의하면 2000년도 초반에 발생한 노균병 epidemic 현상은 새로운 노균병 race 출현에 의해서 기존의 노균병 저항성 자원인 PI 197087에서 파생된 저항성 품종들의 저항성이 무너진 것으로 판단된다.
- 글로벌하게 자유로운 병원체 이동과 빈번한 sexual recombination 에 의한 노균병 병원체 집단이 빠르게 변이를 일으켜서, 예전과는 달리 심각한 새로운 genotype 출현 속도가 빨라지고, 기존에 노균병원체가 발견되지 않던 중동과 서부 아프리카 지역으로 까지 노균병이 확산 되는 심각한 상황에 직면하고 있는 상황이므로, 새로운 균주에 대한 저항성 품종 육성이 시급한 상황이다.

- 오이와 멜론을 감염시키는 노균병원체는 A1 mating type 으로 알려져 있지만, 2010년 이후에는 pathotype 6 에 속하는 A2 mating type 이 주류를 이루는 것으로 보고되고 있다. 전 세계적으로 A2 mating type 이 발견되고 있고, 한국과 중국, 러시아 등지에서 A2 mating type 의 *P. cubensis* 가 2012년 이후에 발견되는 상황이다. 그리고 각 국가별로 수집된 다양한 isolate 간에 생기는 변이보다 유전적 변이가 적은 특정 isolate 가 거의 모든 박과 작물 재배 국가에서 발견되는 추세이다. 이는 현재 노균병을 유발하는 병원균이 모든 국가에 공통적으로 노균병을 발병 시키므로, 노균병 저항성 품종을 육성하면 국외 지역으로 수출이 용이할 것으로 판단된다.
- 2014년 이후 노균병에 감염된 오이 열매에서 종자가 맺히는 부위나 종자를 통해서 *P. cubensis* 가 전파된다는 보고가 나오고 있다. 최근에는 박과작물의 자방, 꽃, 배유 조직에서도 노균병원체가 발견되는 상황이다. 분석한 종자의 약 0.9%에서 노균병에 감염된 종자가 발견되어서 감염률이 높지는 않지만, 기존의 공기 전염을 통한 전파에서 열매나 종자를 통한 전염으로 변화되는 추세이므로 검역 시스템에서도 이 부분에 대한 대비가 필요할 것으로 여겨진다.
- PI 197088(인도 유래) 과 PI 330628(아프가니스탄 유래) 저항성 자원이 다양한 노균병 isolate 에 대한 저항성을 보인다고 알려져 있다. 그리고 이병성인 SMR-18 과 교배를 통한 유전력 분석을 실시한 결과 A isolate 에 대해서는 3:1 (저항성: 이병성), B isolate 에 대해서는 9:7 (저항성: 이병성), C isolate 에 대해서는 1:3 (저항성: 이병성) 등의 다양한 양상을 나타내었다. 이러한 결과는 노균병 저항성이 한 두 유전자에 의해 조절되는 것이 아니라 기주 식물과의 특별한 관계와 더불어서 다양한 저항성 유전자에 의해 조절되는 것을 의미한다. 실내 접종과 달리 재배 포장에서 자연 발병한 결과를 분석하면, 1:14:1 (저항성: 중도저항성:이병성) 으로 나타나서 최소한 2개 이상의 I불완전 우성 유전자에 의해 조절되는 것으로 생각된다.
- PI 197088 유래의 저항성은 2 개의 열성 유전자에 의해 조절 된다고 알려져 있다. PI 179676 과 PI 234517 자원을 분석한 결과 최소한 하나의 열성 유전자 *dm-1*에 의해 저항성이 조절된다고 밝혀졌다. 하지만 이러한 단일 열성 저항성 인자 와 달리 “Wisconsin 2843(PI 197088 유래의 저항성) 은 3 개의 열성 유전자 (*dm-1*, *dm-2*, *dm-3*) 에 의해 노균병 저항성이 조절되고, 동형접합체(homozygous recessive) 일 경우 강한 저항성을 보인다고 알려져 있다. 하지만 Wisconsin 2843을 기반으로 탄생한 J-13 자원을 분석한 결과 노균병 저항성이 한, 두 개의 불완전 우성 유전자에 의해 조절된다는 상반된 결과도 보고되고 있다. 이외에도 다양한 유전력 분석 실험이 실시되었지만, 일치된 결과는 나오지 않는 상황이다. 연구 결과를 종합하면, 여러 개의 우성 및 열성 유전자가 복합적으로 작용하여 노균병 저항성을 조절한다고 생각되므로 저항성 품종 육성을 위해서는 분자 마커 개발이 필수적으로 생각된다.
- 현재까지 P. R 40, PI 197087, PI 330628, PI 197088 들이 노균병 저항성 연구에 주로 많이 사용되고 있다. 이 중에서 최근에 저항성 유전력이 어느 정도 밝혀진 PI 330628 와 PI 197088 들이 미국에서 발견되는 *P. cubensis* isolate 에 강한 저항성을 나타내고 있으므로 육종에 도입하려는 시도가 있지만, 원예적 특성 (과형, 과피, 개화 불량) 에 약점이

있어서 육종에 도입하기에는 많은 문제점을 내포하고 있다. 만일 노균병 저항성 마커가 개발된다면 이들 자원을 대상으로 육종 계통이 손쉽게 만들어 질 것으로 예상된다. 또한 P. R 40 경우는 중국 자원 이어서 중국 시장을 목표로 하는 품종 육성에 활용될 것으로 예상된다.

- 2004년 노균병 epidemic 이후 많은 연구가 수행된 결과로 2014년 이후 저항성 계통들이 육종 현장에 나타나기 시작하고 있다. DMR-NY264 가 신규 노균병 race에 저항성과 양호한 원예 특성을 보이는 최초의 육성 계통이다. 하지만 착과가 생육 후기에 시작되는 단점을 가지고 있다.
- 노균병 저항성 품종 육성에 활용할 분자마커 개발 연구가 활발히 진행되고 있다. 2013년 Zhang et al. 이 5 개의 QTL (dm1.1, dm5.1, dm5.2, dm5.3, dm6.1) 이 1번, 5번, 6번 염색체에 존재함을 밝히고, Bai et al., 또한 4 개의 QTL (dm1.1, dm1.2, dm6.1, dm6.2)을 규명하였다. 그리고 Pang et al. 이 3 개의 QTL 영역을 밝혔다. 하지만 이러한 노균병 저항성 QTL 들은 PI 190787 유래의 저항성 자원에서 밝혀졌으므로, 공통적으로 dm-1 유래의 저항성 유전자가 도입된 것으로 생각된다. 하지만 최근 문제가 되는 *P. cubensis* 병원체에 대해서는 PI 190787 이 저항성이 강하지 못하므로 새로운 저항성 자원을 활용한 마커 개발이 필요하다.
- 최근에 PI330628 유래의 inbred line WI7120 을 대상의 QTL 분석을 실시해서, 2 개의 major QTL, 1 개의 moderate QTL, 2 개의 minor QTL 영역을 밝혔다. 저항성의 15-30%을 조절하는 dm4.1, dm5.1 (major QTL) locus 와 저항성의 5-15%을 조절하는 moderate QTL (dm2.1)이 밝혀져서 이들 자원을 활용한 노균병 저항성 육종 계통의 육성이 기대되고 있다.
- 이밖에도 PI 190788 자원에서 유래한 CS-PMR1을 기반으로 11 개의 QTL 영역이 밝혀졌고, 상당한 수의 저항성 유전자를 집적해야만 저항성 품종이 개발될 것으로 생각된다.
- 결론적으로, 최근에 노균병을 발병하는 병원체는 기존의 병원체와 다른 균주이고, 오이의 노균병 저항성 기작이 저항성 자원마다 상이하고, 다 수의 열성 및 우성 유전자에 의해 조절되므로, 저항성 품종을 위해서는 저항성 자원에 특화된 분자 마커 개발이 필수적이고 이를 활용한 품종 육성이 필요할 것으로 생각된다.

2-2. 국내의 시장 현황

- 2010년 이후 국내 오이 재배 면적은 4,100 ~ 4,500 ha 수준이며, 이중 시설재배는 76.8 ~ 81.6%를 차지하고 있다. 주요 시설 재배는 경기, 충남, 강원, 경남 등에 위치하고, 주요 노지 재배는 강원, 경기, 충북, 경북에 위치하고 있다.
- 국내 노이 오이 재배 면적 및 생산량은 2011년을 기준으로 점차 감소하는 추세이다. 특히 2011년 대비 2015년 에는 약 20% 정도 감소한 추세이다 (그림 1).

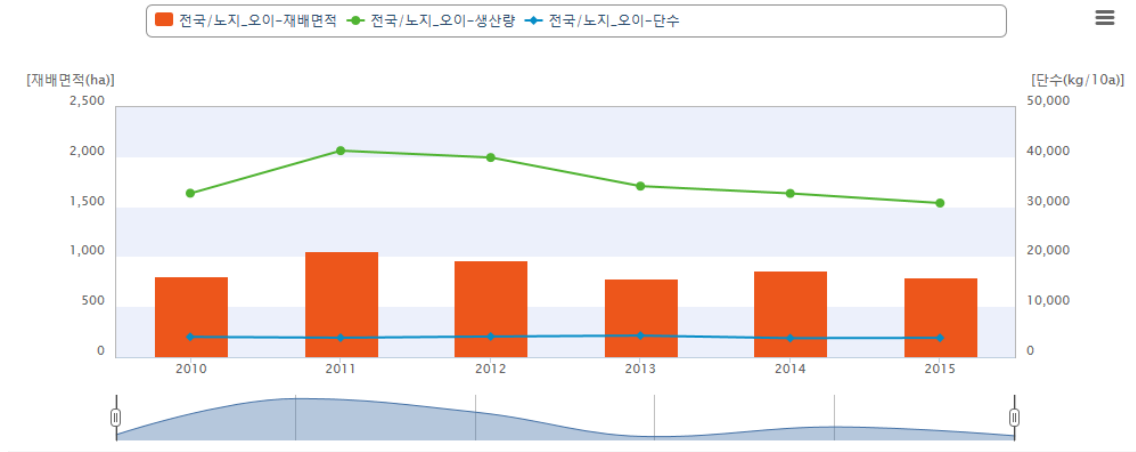


그림 1. 전국 오이 노지 재배면적, 생산량 및 단수 (2016 통계청)

○ 이에 반해 시설 재배 면적과 생산량은 등락은 있지만 2010년 이후 3,300 ~ 3,500 ha 의 재배 면적에서 240,000 ~ 270,000 MT의 생산량을 유지하는 상황이다 (그림 2).

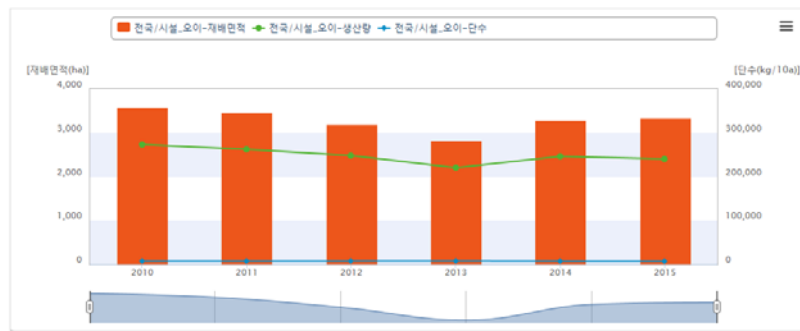


그림 2. 전국 오이 시설 재배면적, 생산량 및 단수 (2016 통계청)

○ 국내 오이 종자 시장은 2010년 53 억원 수준이며, 매년 약 10% 성장하는 추세이며, 2015년도 67 억원 수준이다. 매년 지속적으로 수출 규모가 커져서 전체 매출액의 2010년 17%에서 2015년 41% 정도가 수출이 차지하고 있다 (그림 3).

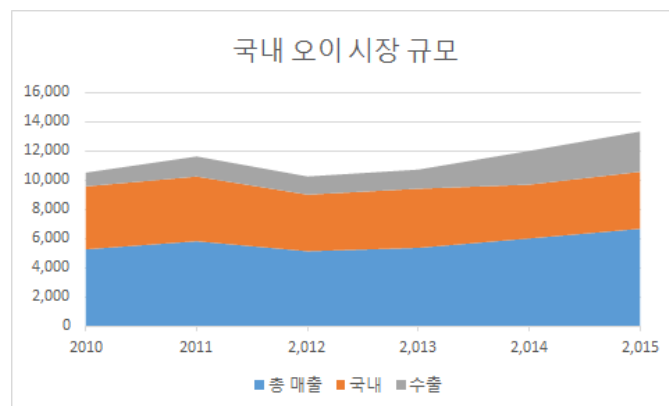


그림 3. 오이 종자 시장 규모 (한국종자협회)

○ 백다다기, 취청, 가시 오이 품종이 국내 종자 시장의 71%, 11%, 17%를 차지하고 있다. 현재 국내에 시판되는 주요 오이 품종은 20 개(백다다기오이), 8개(취청오이), 6 개(가시

오이) 들이 차지하고 있다.

○ 국내 오이 생산량은 세계 18위 정도이고, 전 세계 생산량의 0.3% 수준임.

표 1. 전 세계 오이 생산 규모

순위	국가	생산량(톤)	순위	국가	생산량(톤)
1	China	54,315,900	13	Indonesia	467,691
2	Turkey	1,754,613	14	Iraq	405,610
3	Iran (Islamic Republic of)	1,570,078	15	Netherlands	400,000
4	Russian Federation	1,068,000	16	Kazakhstan	356,850
5	Ukraine	1,044,300	17	Thailand	265,000
6	Spain	754,400	18	South Korea	254,576
7	United States of America	747,610	19	Canada	227,922
8	Mexico	637,395	20	Saudi Arabia	226,180
9	Egypt	631,129	21	Cameroon	224,903
10	Uzbekistan	607,397	22	Germany	223,429
11	Japan	574,900	23	Belarus	219,483
12	Poland	512,714	24	Azerbaijan	218,326

2-3 아시아 오이 종자 시장 정보

- 아시아 (중국, 일본, 대만 제외) 오이 재배 면적은 약 193,000 ha이며 종자 시장규모는 약 \$ 1,100 만 으로 추정된다.
- 주요 재배지역은 인도, 베트남, 태국, 인도네시아 지역으로 전체 재배면적의 약 80%를 점유하고 있다.
- 전체적으로 일대잡종 재배면적은 전체 재배면적의 40%이며 인도의 경우는 아직까지 20% 정도이다. 일대잡종 종자시장 규모는 전체 시장의 84%이며 일대잡종 재배면적이 증가함에 따라 종자시장 규모는 확대될 것으로 예상된다.

표 2 . 아시아 오이종자 시장 규모

국가명	재배면적 (ha)	일대잡종 면적 (ha)	고정종 면적 (ha)	전체 시장규모 (\$000)	일대잡종 시장규모 (\$000)	고정종 시장규모 (\$000)
인도	87,600	17,600	70,000	4,508	3,116	1,392
베트남	32,000	20,000	12,000	1,660	1,540	120
태국	21,000	19,800	1,200	2,278	2,270	9
인도네시아	14,200	14,200	-	1,674	1,674	-
기타	38,113	6,153	31,960	672	446	225
계	192,913	77,753	115,160	10,792	9,046	1,746

<자료: 팜한농, 2012>

- 중국 오이 재배면적은 약 900,000 ~ 1,200,000 ha이며 종자시장 규모는 12.61억 위엔 (RMB) 으로 전체 채소 종자 시장에서 12.9%를 차지하는 가장 비중이 높은 채소작물이다 (농림부, 2008).
- 특히 북방형 온실 재배면적은 지난 10년간 급속히 증가하여 현재 약 25%를 차지하고 있다. 시설재배용 오이 종자가 비교적 높은 가격으로 판매되고 이들 중심의 신규 시장이 형성되는 추세이다 (표 3).

- Tianjin Kernel & Cucumber Research Institute, 중국농업과학원 등 국영 기관에서 개발, 출시한 품종들이 시장을 우점하던 상황이었다. 하지만 최근에는 국영 기관에서 독립한 개인 육종가들이 경쟁력 있는 품종을 출시하고 있는 상황이다. 그리고 주요 다국적 종자회사들과 아시아 종자회사들의 현지 육종 활동이 활발한 상황이다.

표 3 . 중국 오이재배 작형에 따른 시장규모 및 우점품종

작형	재배비율(%)	재배면적(ha)	종자가격(USD/kg)	파종시기	우점품종
노지	50	480,000	35~90	3~4월 초	Jinchun No.4 Zongnong No. 8, Jinyou No.4
플라스틱하우스	15~20	144,000~192,000	60~85	1~2월	Jinyou No.2 Zhongnong No. 16, Jinyou No. 1, Nonai No. 15
북방형 온실	20~25	192,000~240,000	400	9~10월	Jinyou No.3, Jinyou No. 32, Dongguan No.3, Bonai No. 14

<자료: 팜한농, 2012>

3. 연구수행 내용 및 결과

(1) 노균병원체 연구

1-1. 노균병원체 race 분화 연구

- 노균병원균은 진균문(Eumycota), 난균강(Oomycetes), 편모균아문(Mastigomycotina), 노균병균목(Peronosporales), 노균병균과(Oeronosporaceae)에 속하며 농작물에 기생해서 노균병을 일으키는 속은 7 가지로 이들 중 박과를 비롯한 오이에서 병을 일으키는 병원체는 *P. cubensis* Rost. 로 알려져 있다.
- 아직까지 노균병원체에 대한 체계적인 연구가 활발히 이루어지지 않아서, 국내에서 발생하는 노균병원균의 분화에 대한 연구는 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 노균병이 문제가 되는 고온기 주요 재배지역에서 수집한 병반에서 노균병원체를 분리하여 분자생물학적인 검정법과 염기서열 분석을 통한 변이체 유무를 조사하였다.
 - *P. cubensis* 를 수집하기 위해서, 팜한농 안성 육종 포장, 강원도 홍천 오이 재배 농가, 경상북도 상주 오이 재배 농가에서 노균병에 감염된 오이 잎을 수집하였다. 분리된 *P. cubensis* 간에 형태학적인 차이를 광학 현미경 하에서 다양하게 관찰하였고, 형태학적으로는 큰 차이를 확인할 수 없었다. 포자와 유사한 형태의 물질은 육안으로 관찰이 가능하였다 (그림 4).

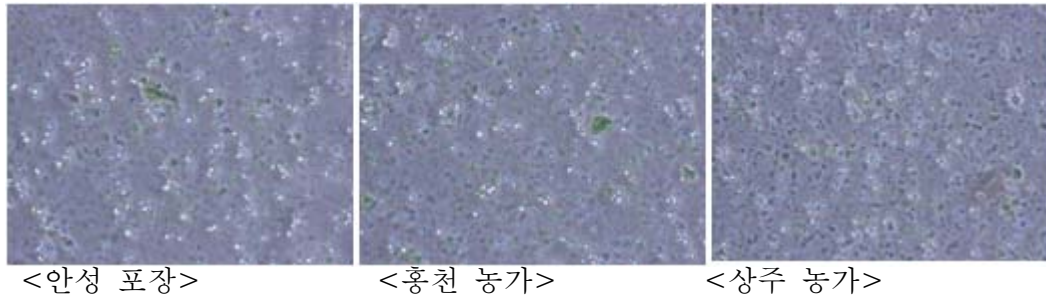
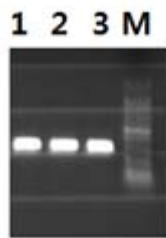


그림 4. *P. cubensis* 와 포자 유사물질의 형태학적 관찰 이미지

- 이들 3 지역에서 수집된 노균병원체 간에 염기서열의 차이가 있는지 nested PCR을 실시하였다. 먼저 1차로 곰팡이의 rDNA-ITS 영역에 공통으로 존재한다고 알려진 염기서열에서 두 개의 프라이머(5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G -3', 5'-GCC GCT TCA CTC GCC GTT AC -3')를 제작하여 PCR 반응(96 도 denature, 60 도 annealing, 74 도 extension, 35 cycle)을 실시하여 PCR 산물을 얻었다. 1차 PCR 반응을 통해서 증폭된 PCR 산물을 template 로 해서 2차 PCR 반응을 노균병 특이적인 프라이머 세트(5'-AAC TTT CCA CGT GAA CTG TAT-3', 5'-TGA GAT GCC GCG CGA CCG AAG-3')를 이용하여 실시하여 아래와 같이 증폭된 PCR 산물을 최종적으로 얻었다 (그림 4).



M: molecular marker
 1: 안성 동부 육종 포장
 2. 경북 상주 재배 농가
 3. 강원도 홍천 재배 농가

그림 4. 노균병원체 2차 nested PCR반응 결과

- 노균병원체 간의 염기서열 차이의 유무를 분석하기 위해서 nested PCR을 통해서 증폭된 PCR 산물을 T-vector 에 클로닝 한 후 클로닝된 plasmid에서 DNA를 분리해서 sequencing을 실시하여 염기서열을 확보하였다
- 동일한 분석을 경기도 이천에 위치한 (주)아시아종묘 육종연구소 포장 과 재배 농가, 강원도 춘천, 경상도 창녕, 충청도 부여, 전라도 나주 지역의 오이 재배 농가 등 6 개 지역에서 수집한 isolate 로 실시하였다. 염기서열을 비교 분석한 결과 9개 지역에서 수집된 노균병원체 염기서열 간에 차이가 없다는 것이 밝혀졌다 (그림 5).

6 처럼 두 병원체를 특이적으로 구분할 수 있는 beta-tubulin 유래의 서열을 확보하였다

- 상기 서열에 바탕 해서 *P. humuli* 와 *P. cubensis*를 특이적으로 진단할 수 있는 프라이머 조합을 개발하였고, RT-PCR을 이용하여 증폭한 결과 아래 그림처럼 두 병원체를 진단 할 수 있었다 (그림 7).

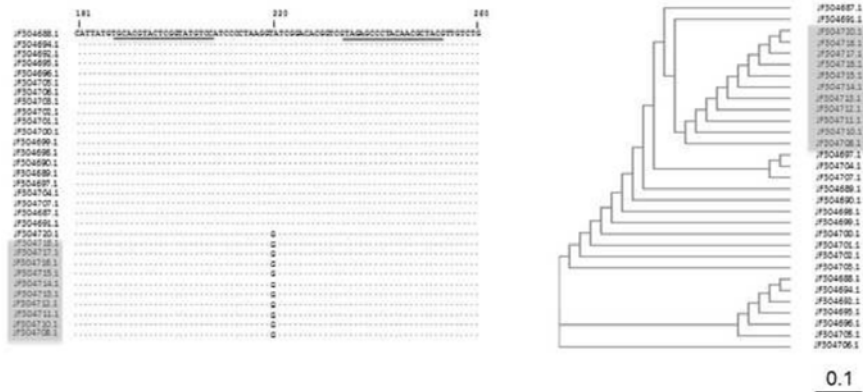


그림 6. beta-tubulin 서열에 대한 *P. humuli* 와 *P. cubensis* 간의 다형성 서열

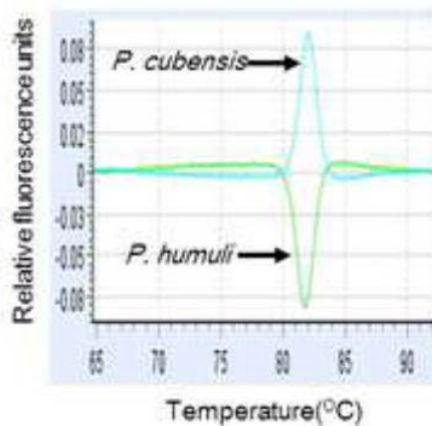


그림 7. beta-tubulin 유래 특이서열을 활용한 *P. humuli* 와 *P. cubensis* 진단 사례

- 상기 결과를 바탕으로 논문 1건을 발표했고, 특허 1건을 등록하였다
 - 논문: Identification of Pseudoperonospora cubensis using real-time PCR and high resolution melting (HRM) analysis, JOURNAL OF GENERAL PLANT PATHOLOGY 82 (2016)
 - 특허: 오이 노균병원체 검출용 단일염기다형성 마커 및 이를 이용한 오이 노균병원체 검출방법. 등록번호 10-1608576-0000 (2016-03-28)

1-3. *P. cubensis* 기내 배양법 개발

- 노균병 저항성 개체는 주로 자연 발병한 포장에서 저항성을 보이는 개체를 선발하는 방식

으로 이루어져왔다. 하지만 선발의 부정확성으로 인해, 최근에는 몇몇 유묘 검정 및 실내 검정법이 개발되어 사용되고 있다. 하지만 포자를 노균병에 감염된 잎에서 분리해서 감염시키기 방식을 따르기 때문에 포장에 노균병이 발병되지 않는 시기에는 실험을 할 수 없는 상황이다. 따라서 본 연구진은 *P. cubensis*를 기내배양해서 연중 안정적으로 포자를 공급하는 방안을 추가로 모색하였다.

- 경기도 안성에 소재한 팜한농 육종연구소 포장에서 노균병이 발병한 오이 잎을 수집한 후 멸균수로 가볍게 3회 세척 후 오이 잎 뒷면에 있는 노균병 포자 등을 50 ml 플라스틱 튜브에 수거하여 냉장(4도) 보관하며 필요시 사용하였다.
- 상기의 수용액을 광학 현미경으로 관찰하면 포자(낭)와 유사한 입자들이 관찰되었다. 광학 현미경의 확대 배율을 고려하면 단독 포자가 아니고 포자낭 형태로 존재하는 것으로 판단된다 (그림 8).

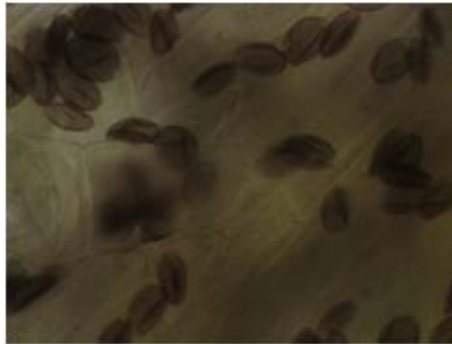


그림 8. 오이 포자(낭) 현미경 관찰, 배율 400 배

- 인공 배양을 위해서 곰팡이용 배지 (Rose bengal chloramphenicol agar, peptone 5g/L, Dextrose 10 g/L, Monopotassium phosphate 1g/L, Magnesium sulphate 0.5 g/L, Rose Benga 0.05 g/L, chloramphenicol 0.1 g/L, agar 15 g/L를 이용하여 pH 7.2) 위에 수집된 *P. cubensis*를 접종하여 상온에서 인공 배양을 시도하였다. 접종 후 상온에서 일주일 배양한 결과 균사체와 유사한 물질들이 배지에서 배양되는 것을 관찰하였다 (그림 9).
- 멸균수 도포 후 회수액을 배양하였기 때문에, 포자 회수액은 세균을 포함한 다른 미생물에 의해 오염이 될 수도 있다. 하지만 본 연구에 사용된 배지는 세균이 자랄 수 없는 곰팡이 전용 배지이므로 오염된 세균에서 이러한 균사체 유사 물질이 배양 될 수 없다고 판단된다. 따라서 광학현미경에서 관찰된 균사체는 곰팡이 유래 물질일 가능성이 크다.



그림 9. 인공 배양한 균사체 유사 물질의 광학 현미경 사진 배율 400 배

- 하지만 이러한 균사체 유사 물질은 오이 잎에서 분리할 때 존재하던 균사체가 배양 배지에 그대로 남아서 관찰 될 수 있기 때문에 현미경 하에서 배양된 균사체 유사 물질이 포자로부터 발아되는지 여부를 확인하였다. 이 목적을 위해서 상온에서 배양된 플레이트를 아이스에 2 시간 heat shock을 주어 포자 발아 (germination)를 유도한 후 배양하여 광학현미경으로 관찰하였다. 그 결과 배양된 균사체 유사 물질이 포자로부터 유래하는 것으로 판단되었다 (그림 10).

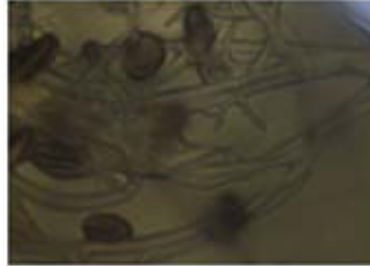


그림 10. 포자를 발아 시킨 후 발아된 균사체 현미경 관찰 사진, 배율 400

- 따라서 현재 확보된 균사체 유사 물질이 곰팡이에서 유래 하였다 하더라도, 오이 잎을 멸균수로 세척한 후 배양했기 때문에 *P. cubensis* 이외의 다른 곰팡이가 오염되었을 가능성이 있다. 따라서 이 부분을 확인하기 위해서 배양 플레이트에서 배양된 미생물을 현미경 하에서 단일 미생물 로 분리 동정하여서, 단일 미생물로 배양하는 작업을 진행 하였다(그림 11).



그림 11. 노균병 감염 오이 잎에서 분리한 곰팡이 배양 모습

<A(좌측)는 1차 배양 모습이고, B(우측)는 일부만 분리 해서 2차 배양을 실시한 모습>

- 인공 배양을 실시한 배지는 곰팡이 전용 배지라서 세균이 자라지 못하고 상기의 그림 11A 처럼 다양한 곰팡이가 배양되는 모습을 보였다. 배양된 곰팡이를 다시 계대 배양 하여 그림 11B 처럼 배지마다 균사를 유도한 후 이들 곰팡이에서 DNA를 추출한 후에 염기서열 분석을 실시한 후 NCBI 데이터베이스에 검색을 실시하였는데 *P. cubensis* 와 일치하는 염기서열은 하나도 발견되지 않고 대부분이 *pseudomona* 계열과 서열이 일치하는 것을 발견하였다.
- *P. cubensis* 인공배양을 위한 다양한 방법을 시도했지만 기존에 알려진 것처럼 본 과제에서 시도한 인공배양 조건에서는 *P. cubensis* 를 배양하기 어려울 것 같았다.

(2) 노균병 검정 시스템 구축

2-1. 유묘 실내 검정 시스템

- 노균병을 발병시키는 *P. cubensis*는 절대활물 기생균으로 인공 배양이 어려워 계획적인 유묘검정이 어려운 형편이다. 본 과제에서도 인공 배양을 시도했지만 성공하지 못했다. 노균병 저항성은 다수의 열성 유전자가 관여하는 형질로 유묘검정을 통한 조기 선발이 매우 필요한 실정이지만, 전 세계적으로 노균병의 유묘검정 기술은 아직 정립되어 있지 못한 실정이다.
- 실내에서 유묘 상태의 오이를 대상으로 한 노균병 검정기술을 개발하기 위해서 *P. cubensis*의 적정 발아 온도로 알려진 16~22°C 조건에서 최적의 접종 농도를 알아보기 위해서, 다양한 접종원 농도 별로 접종 후 발병 양상을 탐색하였다.
 - 다양한 농도를 이용하여 접종한 결과 10⁵ spores/ml 에서 노균병 발병이 최적화 되는 양상을 발견하였다 (그림 12).
 - 접종 수 일 후, 오이 노균병은 하위엽에서 상위엽으로 진전되면서 초기에 각진 황화병반이 시작되고 그 후 뒷면에 회백색의 곰팡이 형성이 일주일 정도 지나면 육안으로 관찰된다. 결국 황화병반이 잎 전반에 커지면서 괴사 및 갈색 병반으로 확대되고 나중에는 잎 전체가 고사되는 양상을 보였다.

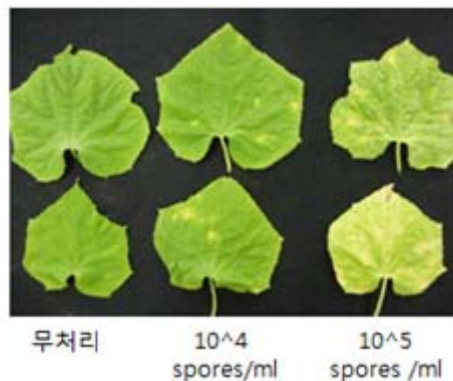


그림 12. 노균병 접종 농도에 의해 발생한 병반 사진

- 노균병 감염의 여부를 정확하게 확인하기 위해서 노균병원체를 특이적으로 진단할 rDNA-ITS 유래의 특이적 primer 를 이용하여 PCR 증폭을 실시해서 증폭된 PCR 산물을 확인하였다 (그림 13).

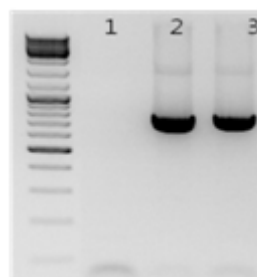


그림 13. 오이 병반에서 노균병원체 기반 rDNA-ITS 프라이머로 PCR 반응 결과
 <1: Control(무접종), 2: 접종 후 병징 발생 전 샘플, 3: 접종 후 병징 발생 후 샘플>

○ 따라서 상기의 접종원 농도 조건으로 유묘 검정을 실시하였다.

- 실내에 제작한 소규모 비닐 온실 안에 600 개 정도의 유묘를 재배한 후 10^5 spores/ml 농도의 노균병원체 spore를 식물체 잎 뒷면에 spray 한 후, 일주일 동안 온실 내를 절대 습도로 유지한 후 병징을 관찰하여 아래와 같은 결과 (그림 14) 를 도출하였고 이를 바탕으로 노균병 저항성 개체 선발에 사용되었다.



그림 14. 유묘 실내 검정 이미지

○ 하지만 상기의 유묘 실내 검정법 으로는 아주 균일한 병징 을 유도하지 못하였다. 그래서 실내 온실 대신에 향온 향습이 우수한 실내 성장상 을 통해 개선된 병징 유도를 확인하였다.

- 유묘실내검정의 반복 실험을 통해서 절대 습도 조건 유지, 20℃ 내외의 컨트롤된 온도 조건 유지, 주, 야간 온도 차이 등이 균일한 발병에 가장 중요한 요인임을 규명하였다.
- 따라서 상기의 조건 정확하게 제어하기 위해서, 소규모 실내 온실 보다는 growth chamber 가 더 적절할 것으로 판단되어서 실내 성장상 에서 유묘 검정을 실시하여 저항성 개체를 선발하여 품종 육성에 사용하였다.

2-2. 포장 성체 선발 방법 구축

- 기존의 육종 계통에 비해 강한 저항성 계통을 육성하고 분자표지 개발을 위한 자원을 선발하기 위해 보유 중인 육종계통과 수집 자원을 대상으로 포장저항성 검정을 수행하였다 (그림 15).
- 본엽 20 ~ 25매 단계의 식물체를 대상으로 노균병 발병 후 2회 병지수 조사를 실시하였다. 저항성 지수 (DI, Disease Index)는 1 ~ 5 scale (저항성을 1, 이병성을 5) 로 평가하였다(표 4, 그림 16).

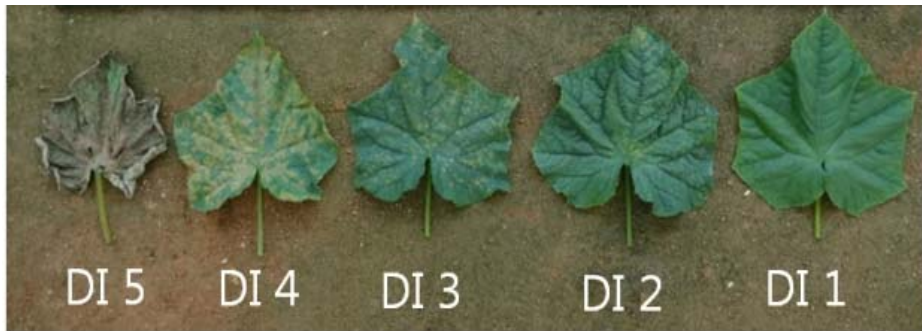


그림 15. 오이 노균병 저항성 검정을 위한 포장 검정 사례

표 4. 오이 노균병저항성 지수(DI, Disease Index) 판별기준

저항성지수(DI)	병징
1	병반이 발생하지 않음
2	병반이 발생하지만 진전이 없음
3	병반이 다수 존재하나 비교적 건전
4	병반이 잎 전체에서 발생하지만 황화 현상 없음
5	병반이 잎 전체에서 발생하여 황화

그림 16. 오이 노균병 저항성지수 지표



<좌: DI 1 (저항성), 중: DI 3(중간저항성), 우:DI 5(이병성)>

그림 16. 오이 노균병 저항성지수 지표

- 기존의 육종 계통에 비해 강한 저항성 계통을 육성하고 분자표지 개발을 위한 자원을 선발하기 위해 보유 중인 육종계통과 수집 자원을 대상으로 유묘 검정법과 포장 검정법을 병행 실시하여 선발하였다.

(3) 노균병 저항성 자원 선발

3-1. 수집 유전자원에 대한 노균병 저항성 검정

○ 총 108개 수집 유전자원을 대상으로 노균병 저항성 검정을 실시하여 다음과 같은 결과를 도출하였다.

- 전체 108개 자원에 대한 노균병 병지수는 DI 1 (10 계통), DI 2 (10 계통), DI 3 (46 계통), DI 4 (28계통), DI 5 (14 계통) 로 나타났다 (표 5). 전체 검정 대상 자원 중 저항성지수 1~2인 계통에는 가시오이 6 계통, 동남아 슬라이서 9 계통, 백다다기 2 계통, BAP 1 계통, PSL 2 계통으로 전체적으로 가시오이와 동남아 계통에서 다수의 저항성 계통을 선발할 수 있었다 (표 5)
- 전 세계적으로 노균병저항성 자원과 분자표지 개발을 위해 이용되고 있는 PI197088은 본 시험에서도 강한 저항성을 보이는 것으로 나타났다. 기존 논문에 나타난 것처럼 과형과 상품성이 야생종에 가까워서 육종자원으로 활용하기에는 어려운 것으로 판단되었다. 재배종과 상품성이 유사한 가시오이 수집자원인 PI 418962도 강한 저항성을 보였으나 식물체에 괴사(necrosis) 현상이 발생하여 저항성 자원으로 이용하는데 제약 요인이 될 것으로 보였다.

표 5. 오이 육종 자원의 노균병 저항성 검정 결과

번호	Group	Plot	성발현	노균병 병지수(DI)	흰가루병 병지수(DI)	비고
1	AS	DM1201	M	3	1	
2	AS	DM1202	G	3	1	
3	BAF	DM1203	G	3	1	
4	BAF	DM1204	G	3	1	
5	BAF	DM1205	G	4	3	
6	BAP	DM1206	G	5	1	
7	BAP	DM1207	G	3	1	
8	EU	DM1208	G	4	1	
9	EU	DM1211	G	5	2	
10	C	DM1213	M	3	1	PI 289698
11	C	DM1214	M	1	1	PI 418962, necrosis
12	C	DM1218	G	1	1	
13	C	DM1219	G	3	1	
14	C	DM1220	M	1	1	
15	C	DM1221	M	4	1	
16	C	DM1222	PF	5	3	
17	C	DM1223	M	4	1	
18	C	DM1224	M	3	1	
19	C	DM1225	M	3	1	
20	C	DM1227	M	4	1	
21	C	DM1228	PF	3	1	
22	C	DM1229	M	2	1	
23	C	DM1230	PF	2	1	
24	C	DM1231	M	2	1	
25	H	DM1232	PF	3	1	
26	H	DM1233	G	4	1	
27	H	DM1234	M	3	1	
28	H	DM1235	M	4	1	
29	H	DM1236	M	4	1	
30	H	DM1237	M	3	1	
31	O	DM1239	M	1	1	PI 197088
32	O	DM1240	M	1	1	
33	O	DM1241	G	1	3	
34	O	DM1242	G	3	1	
35	O	DM1243	M	2	1	
36	O	DM1244	M	1	3	
37	O	DM1245	G	2	2	

38	O	DM1246	M	1	4
39	O	DM1247	M	2	2
40	O	DM1248	M	2	3
41	O	DM1249	M	3	1
42	W	DM1250	M	3	1
43	W	DM1251	G	3	2
44	W	DM1254	M	4	1
45	W	DM1256	M	3	2
46	W	DM1257	PF	3	2
47	W	DM1258	M	3	2
48	W	DM1259	PF	4	2
49	W	DM1260	M	3	2
50	W	DM1261	M	4	2
51	W	DM1262	PF	4	2
52	W	DM1263	M	4	3
53	W	DM1264	G	4	3
54	W	DM1265	M	3	3
55	W	DM1266	M	1	5
56	W	DM1269	M	1	5
57	W	DM1270	G	4	3
58	W	DM1271	M	5	3
59	W	DM1272	G	5	3
60	W	DM1273	PF	5	4
61	W	DM1274	PF	5	4
62	BAF	DM12G03	G	4	3
63	BAF	DM12G04	M	3	3
64	BAF	DM12G05	M	3	3
65	BAF	DM12G06	M	3	3
66	BAF	DM12G07	M	4	3
67	BAF	DM12G08	G	3	3
68	BAF	DM12G09	G	3	3
69	BAF	DM12G11	G	5	4
70	BAF	DM12G12	M	3	3
71	BAF	DM12G13	G	3	3
72	BAF	DM12G14	M	3	3
73	BAF	DM12G15	M	3	3
74	BAF	DM12G16	M	4	3
75	BAF	DM12G17	M	5	4
76	BAF	DM12G18	G	3	3
77	BAF	DM12G19	M	3	3
78	BAF	DM12G21	G	3	3
79	BAP	DM12G22	G	4	3
80	BAP	DM12G23	G	4	4
81	BAP	DM12G24	G	4	4
82	BAP	DM12G25	G	4	4
83	BAP	DM12G27	G	2	3
84	BAP	DM12G28	PF	4	5
85	BAP	DM12G29	G	5	5
86	BAP	DM12G30	G	4	5
87	BAP	DM12G31	G	5	5
88	BAP	DM12G32	G	3	3
89	BAP	DM12G33	G	4	5
90	BAP	DM12G34	G	4	5
91	BAP	DM12G35	G	3	3
92	BAP	DM12G36	HE	5	5
93	PSL	DM12G37	G	3	3
94	PSL	DM12G38	G	3	4
95	PSL	DM12G39	PF	3	4
96	PSL	DM12G40	G	2	4
97	PSL	DM12G41	G	4	5
98	PSL	DM12G42	G	3	4
99	PSL	DM12G43	G	3	4

100	PSL	DM12G44	G	5	5
101	PSL	DM12G45	G	3	4
102	PSL	DM12G46	G	5	5
103	PSL	DM12G47	G	3	4
104	PSL	DM12G48	G	2	5
105	PSL	DM12G49	G	3	5
106	PSL	DM12G51	G	3	5
107	PSL	DM12G52	G	3	5
108	PSL	DM12G53	G	4	5

*경종개요; 과종: 2012년 4 20일, 정식: 5월 19일, 조사: 7월 2일 ~13일

*Group: ASL: American Slicer, PSL: Parthenocarpic Slicer, BAP: Beith Alpha Parthenocarpic, BAF: Beith Alpha Open field, EU: Long Dutch Green, O: Oriental Slicer, W: 백다다기, C: 가시오이, H: 취청오이

*성발현; G: Gynoeciou, PF: Predominantly-Female, MO: Monoecious

*노균병, 흰가루병저항성(DI); 1:저항성, 3:중간저항성, 5:이병성

- 노균병 저항성과 흰가루 병저항성에 대한 문헌 조사 결과 아주 다양한 유전 양상을 보였고, 동일한 저항성 유전자에 의해서 두 가지 병에 대해서 저항성이 유도되는 결과도 발견되었다. 하지만 본 연구 결과는 두 가지 병저항성 간에 뚜렷한 상관 관계를 발견할 수 없었다 (상관 계수 $r = 0.25$). 하지만 노균병에 대한 이병성 정도가 증가될수록, 흰가루병에 대한 이병성(DI 5) 정도가 늘어나는 계통 수가 많은 것으로 나타났다(표 6). 선발된 저항성 계통 중 가시오이(C)와 동남아 계통(O)군은 노균병저항성과 흰가루병 저항성이 동시에 발현되는 특이한 경향을 보였고 백다다기(W)와 기타 그룹에서는 일치하지 않는 것으로 나타났다(표 6).

표 6 오이 흰가루병과 노균병 저항성간의 상관 관계

Group	Plot	성발현	노균병 저항성 (DI)	흰가루병 저항성 (DI)
C	DM1214	M	1	1
C	DM1218	G	1	1
C	DM1220	M	1	1
O	DM1239	M	1	1
O	DM1240	M	1	1
O	DM1241	G	1	3
O	DM1244	M	1	3
O	DM1246	M	1	4
W	DM1266	M	1	5
W	DM1269	M	1	5
BAP	DM1206	G	5	1
EU	DM1211	G	5	2
C	DM1222	PF	5	3
W	DM1271	M	5	3
W	DM1272	G	5	3
W	DM1273	PF	5	4
W	DM1274	PF	5	4
BAF	DM12G11	G	5	4
BAF	DM12G17	M	5	4
BAP	DM12G29	G	5	5
BAP	DM12G31	G	5	5
BAP	DM12G36	HE	5	5
PSL	DM12G44	G	5	5
PSL	DM12G46	G	5	5

3-2. 국내 및 중국 재배품종의 포장저항성 검정

- 주요 재배 품종들의 노균병 저항성 수준을 파악하기 위해 국내의 백다다기, 가시오이, 취청오이 품종과 중국 가시오이 품종들을 대상으로 노균병 포장저항성 수준을 조사하였다.
 - 조사 결과, 국내에서 시판되는 백다다기, 취청오이, 시설재배 가시오이 품종들은 모두 이병성인 것으로 조사되었다.
 - 이에 반해 중국 가시오이 품종들은 9개 품종 중 3개 품종이 중간저항성 이상의 저항성을 보여 저항성 육종의 수준이 국내에 비해 앞서 있는 것으로 파악되었다 (표 7).

표 7. 국내 및 중국 재배품종의 노균병 포장저항성 검정

PLOT	품종명	회사명	DI (1차)		DI (2차)		노균병 저항성 평균
			1반복	2반복	1반복	2반복	
11JUL C501	중복삼척	신젠타코리아	2	2	3	3	2.5
11JUL C503	낙동청장	팜한농	4	4	5	5	4.5
11JUL C504	영남청장	고농	4	4	5	5	4.5
11JUL C506	Dongguan No.3	Derit(중국)	3	4	4	5	4
11JUL C507	Sun Beauty 812	Sun Field(중국)	1	2	2	2	1.8
11JUL C508	Sun Beauty 833	Sun Field(중국)	4	5	4	5	4.5
11JUL C509	SF80820	Sun Field(중국)	2	2	2	2	2
11JUL C510	SF80822	Sun Field(중국)	2	2	2	2	2
11JUL C511	SF80129	Sun Field(중국)	3	3	4	5	3.8
11JUL C513	SF80149	Sun Field(중국)	2	4	5	5	4
11JUL C512	SF80148	Sun Field(중국)	3	3	4	5	3.8
11JUL C514	SF80233	Sun Field(중국)	3	3	3	4	3.3
11JUL H501	장형낙합	농우	3	4	5	5	4.3
11JUL H502	신세대	팜한농	3	4	5	5	4.3
11JUL H503	오성낙합	원농	4	4	5	5	4.5
11JUL W502	조은	팜한농	4	5	5	5	4.8
11JUL W504	아침백다다기	신젠타코리아	-	-	5	5	5
11JUL W505	상생	농협	3	4	4	5	4
11JUL W506	신정품	팜한농	3	4	5	4	4
11JUL W507	오마이	원농	4	4	5	5	4.5
11JUL W509	화이트	팜한농	4	4	5	5	4.5
11JUL W510	싱싱	팜한농	4	4	5	5	4.5
11JUL W511	미인	팜한농	4	4	5	4	4.3
11JUL W513	장백침	몬산토코리아	4	4	5	4	4.3
11JUL W514	한강맛	신젠타코리아	3	4	4	5	4
11JUL W515	백미	팜한농	4	4	5	5	4.5
11JUL W515A	구월반백	팜한농	3	4	4	5	4

*경종개요; 파종: 2011년 7월 22일, 정식: 8월 20일, 조사: 9월 16일 ~10월 4일

*DI: Disease, 1:저항성, 3:중간저항성, 5:저항성

- 노균병저항성은 다수의 열성유전자가 관여하는 양적 형질로 저항성 일대잡종 품종을 육성하기 위해서는 양친 모두에 저항성 유전자를 도입해야 한다. 또한, 오이 재배에서 요구되는 다수성, 상품성과 같은 기본형질을 보유한 계통에 노균병저항성을 도입하기 위해서는 대규모 분리집단을 대상으로 한 선발과 반복적인 유용 형질 집적이 필요한 것으로 판단되었다.

3-3. 육성 계통의 포장저항성 검정

- 주요 백다다기 육종 계통에 대한 노균병 포장저항성 수준을 조사한 결과는 아래 표 8 과 같았다.
 - 주요 재배 품종들은 조합 성능 검정에서와 같이 이병성을 보였다. 조사 대상 185개 계통 중 12개 계통이 중간저항성 이상을 보였으며 이들 중 2개 계통은 비교적 높은 저항성을 나타냈고, 흰가루병에 대해서도 저항성인 것으로 조사되었다.
 - 뿐만 아니라 저온기 재배에서 중요 형질인 내냉성의 지표 중 하나인 정단 생육에서는 재배 품종들에 비해 낮은 수준이었다.
 - 종합적으로 노균병에 대해 중간저항성 이상을 보이고, 정단부 생육이 우수한 계통으로는 WGA, BMB, DHDHG, DSKG 등 4 계통이 조사되었다.

표 8. 주요 백다다기 육종계통에 대한 노균병 포장저항성 조사

Group	Plot	계통(품종)명	노균병저항성(DI)				흰가루병 저항성(DI)	정단부 생육	성발현	엽결각	엽형
			1차	2차	3차	평균					
WW	12JAN W001	신정품(팍한농)	5	5	5	5.0	3	5	G	5	1
WW	12JAN W003	조은백다다기(팍한농)	5	5	5	5.0	3	7	PF	6	1
WW	12JAN W003A	청설백다다기(팍한농)	5	5	5	5.0	3	7	G	6	1
WW	12JAN W004	아침백다다기(신젠타)	5	5	5	5.0	4	6	G	6	1
WB	12JAN W005	한강맛(신젠타)	5	5	5	5.0	5	7	G	5	1
WB	12JAN W006	HDA	2	3	3	2.7	3	5	G	5	3
WB	12JAN W007	WGA	3	3	3	3.0	3	7	G	5	1
WW	12JAN W008	HDSG	4	3	3	3.3	3	3	G	3	1
WW	12JAN W016	WEU(L)	4	5	5	4.7	3	4	M	4	2
WW	12JAN W018	WEU(L)	4	5	5	4.7	4	5	G/M	5	2
WW	12JAN W021	WEU(M)	5	5	5	5.0	3	3	G	5	1
WW	12JAN W022	WCE	5	5	5	5.0	3	6	G	5	1
WW	12JAN W025	BMB	3	3	4	3.3	3	8	M	4	1
WW	12JAN W028	DHDHG	3	3	4	3.3	3	7	M	5	1
WW	12JAN W032	HDHGM	5	5	5	5.0	3	7	PF	3	1
WW	12JAN W035	WFEN	2	3	2	2.3	-	3	G	5	1
WW	12JAN W037	MEJ	4	5	5	4.7	3	7	M	6	1
WB	12JAN W038	DH	3	3	4	3.3	5	6	M	4	1
WW	12JAN W039	DH//DHDHG/DH	3	3	3	3.0	5	5	PF/M	5	1
WW	12JAN W040	DH//DHDHG/DH	3	3	3	3.0	5	5	G/M	4	1
WW	12JAN W049	DSKG(A4)(M)	4	3	3	3.3	3	7	M	4	1
WW	12JAN W050	DSKG(S)	5	3	4	4.0	3	8	M	4	1
WW	12JAN W089	WJE	4	3	3	3.3	3	5	G	6	1

WW	12JAN W090	WJE	5	5	5	5.0	3	7	G	6	1
WW	12JAN W093	WJE	5	5	5	5.0	4	7	G	6	1
WW	12JAN W094	WJE	5	5	5	5.0	4	4	G	5	3
WW	12JAN W096	WJE	5	5	5	5.0	3	7	G	6	1
WW	12JAN W102	WJE	4	4	5	4.5	3	7	G	5	1
WW	12JAN W126	WJE/DWB	3	5	5	4.3	3	7	G	5	3
WW	12JAN W160	WNE	2	2	2	2.0	2	5	M	5	3

*경종개요; 과중 2011년 7월 25일, 정식 8월 20일, 조사: 10월 9일 ~11월 2일
*노균병, 흰가루병저항성(DI): 1:저항성, 3:중간저항성, 5:이병성
*정단생육: 저온기 정단부위의 생육정도; 3:불량~7:우수
*성발현; G: Gynoeciou, PF: Predominantly-Female, MO: Monoecious
*엽결각; 3:환엽 ~ 7:결각엽
*엽형; 1:상향엽, 2:수평엽, 3:하향엽

(4) 노균병 저항성 마커 개발을 위한 분리 집단 육성

4-1. 유전자 지도 및 QTL 분석용 분리 집단 육성

- 분자표지 개발과 저항성 계통 육성을 위해 선발된 저항성 계통과 원예적 특성이 우수한 이병성 자원을 이용해 15 종의 교배조합을 작성하였다(그림 17, 표 9).
 - 가시오이 그룹에서는 저항성 2계통(DM1218, DM1220)과 이병성 2계통(DM1222, DM1223)을 이용해 총 7개의 정역 교배조합을 작성하였다
 - 백다다기 저항성 육종을 위해 동남아 슬라이서 저항성 2 계통(DM1244, DM1246)과 국내 육종계통 2계통(DM1261, DM1271)를 이용해 8개의 정역교배 조합을 작성하였다. 작성된 교배조합을 이용해 종과 수확 후 분리 집단을 육성 하였다.



그림 17. 오이 교배조합 작성 후 과실 착과 모습(교배 후 25일 경)
좌: 가시오이 계통, 중:동남아슬라이서 계통, 우: 백다다기 계통

표 9. 오이 노균병 저항성 계통과 이병성 계통간의 분리모집단 육성

Group	종자친	x	화분친	저항성지수(DI)	
				종자친	화분친
C x C	DM1218	x	DM1222	1	5
C x C	DM1218	x	DM1223	1	4
C x C	DM1220	x	DM1222	1	5
C x C	DM1220	x	DM1223	1	4
C x C	DM1222	x	DM1218	5	1

C x C	DM1222	x	DM1220	5	1
C x C	DM1223	x	DM1220	4	1
O x W	DM1244	x	DM1261	1	4
O x W	DM1244	x	DM1271	1	5
O x W	DM1246	x	DM1261	1	4
O x W	DM1246	x	DM1271	1	5
W x O	DM1261	x	DM1244	4	1
W x O	DM1261	x	DM1246	4	1
W x O	DM1271	x	DM1244	5	1
W x O	DM1271	x	DM1246	5	1

*경종 개요

과종: 2013년 4월 12일, 정식: 5월 9일, 포장 저항성 평가: 6월 10일 ~19일, 자가수분: 6월 15일 ~21일

- 이를 포장에서 평가한 후에 저항성 이병성 분리가 우수하게 나타나고, 품종 육성 목표인 백다다기 유래의 계통을 고려하여 1개의 집단(DM1271 x DM1246)을 마커 개발을 위한 집단으로 선발하였다.
- 포장 저항성 검정(scoring)을 위해 노균병 발병이 활발한 시기인 5월 중순에서 6월 초에 본엽 15 ~ 20매 생육 단계에서 개체 별로 저항성 양상을 조사하였다. 또한, 개체 별로 자가수정을 실시하여 F₂, F₃ 집단을 육성하였다 (그림 18)
- 분자마커 개발에 이용된 저항성친(TH118)과 이병성친(WMEJ)의 저항성 검정 결과 1차년도 와 동일하게 2차년 에도 각각 저항성 수준(1과 5) 을 보였다. 또한, 전 세계적으로 오이 노균병 연구에 일반적으로 이용되고 있는 대비 계통의 경우에도 기존의 보고와 일치하는 저항성 발현양상을 확인할 수 있었다 (표 10).



그림 18. 오이 노균병 저항성 포장검정 및 교배 후 착과 모습

표 10. 오이 노균병 저항성과 이병성 계통 및 일대잡종(F1)에서의 저항성 발현 양상

BN	계통명	노균병저항성 (DI)	비고
Z31101	SMR58	5	이병성 대비 계통
Z31102	Mummy 331	2	저항성 대비 계통

Z31103	G5F	1	저항성 대비 계통
Z31104	PI197088	1	저항성 대비 계통
Z31310	TH118	1	저항성 친 (R)
Z31312	WMEJ	5	이병성 친 (S)
Z31325	TH118FLM x WMEJ	4	F1: 저항성 (R) X 이병성 (S)
Z31327	WMEJ x TH118FLM	4	F1: 이병성 (S) X 저항성 (R)

*DI: 1(저항성), 3(중도저항성), 5(이병성)

- 일대잡종(F₁)의 경우 이병성친 보다는 다소 강한 저항성을 나타내었으나, 이병성으로 판단되어 저항성 발현이 열성인 것을 확인할 수 있었다. 또한, 정교배 (TH118FLM x WMEJ)와 역교배 (WMEJ x TH118FLM)에서 동일한 이병성 발현 양상을 보여 세포질의 영향은 없는 것으로 판단되었다 (표 9).
- 분리집단 (WMEJ x TH118FLM) 151개 개체의 저항성 검정 결과 저항성 지수(DI) 1은 1 개체(0.7%), 2는 17 개체(11.3%), 3은 49 개체(32.5%), 4는 46 개체(30.5%), 5는 38 개체(25.2%)의 분포를 보였다 (표 11).

표 11. 오이 노균병 분자마커 개발 분리집단에서의 저항성 분포

저항성지수(DI)	병징	개체수(%)
1	병반이 발생하지 않음	1 (0.7%)
2	병반이 발생하지만 진전이 없음	17 (11.3%)
3	병반이 다수 존재하나 비교적 건진	49 (32.5%)
4	병반이 있 전체에서 발생하지만 황화 현상 없음	46 (30.5%)
5	병반이 있 전체에서 발생하여 황화	38 (25.2%)
합계		151 (100%)

- 전체적으로 저항성으로 판단되는 지수 1과 2를 보이는 개체의 비율은 12%, 중도저항성은 32.5%, 이병성은 55.7%의 분포를 나타내었다. 이는 노균병 저항성에 다수의 열성 유전자가 관여한다는 기존의 보고와 부합하는 것으로 판단되었다.
- 분리집단에서 완전 저항성 개체의 출현 비율이 0.7%인 것으로 나타나 저항성 계통 육성을 위해서는 비교적 큰 규모의 집단을 대상으로 한 개체선발이 필요한 것으로 판단되었다.
- 대안으로는 저항성 계통 선발에 분자마커의 적용을 통한 선발압을 높일 필요성이 있다고 판단된다.
- F3 집단에 대한 포장저항성 검증을 수행하였다.
 - 전년도에 비해 발병이 심해 전체적으로 저항성지수 분포는 낮게 나타났으며 집단별로 저항성 분포가 다양하게 분포하였다. 전 세대에서 저항성을 보였던 15, 23번 집단의 경우 전체적으로 높은 저항성 수준을 보였으며 38, 45번 집단의 경우 이병성으로 치우치는 경향을 보였다. 이러한 현상은 저항성 관련 유전자의 호모화에 따른 이병성화 때문으로 판단되었으며 후보 저항성 분자표지의 분리 양상과 연계하여 정확한 연관 마

커를 개발하는데 활용할 수 있을 것으로 생각되었다.

표 12. 노균병 저항성 분자표지 개발집단(F3)의 개체별 저항성 발현 양상

교배번호	F ₂ 노균병저항성	F ₃ 개체별 노균병저항성 ^a															평균
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Z31326-002	5	1	2	3	1	2	1	1	1	2	2	2	2	2			1.7
Z31326-005	4	3	4	6	6	4	5	5									4.7
Z31326-015	2	6	5	5	5	4	4	4	4								4.6
Z31326-016	5	3	3	4	3												3.3
Z31326-017	5	4	4	3	3	4	3	3	3								3.4
Z31326-022	3	3	4	4	4	3	4	5	5	4	3	3					3.8
Z31326-023	2	6	5	5	7	4	5	6	6	4	5	5	5	4			5.2
Z31326-024	5	3	4	5	4	3	1	6	3	4	4	4	5	4			3.8
Z31326-025	5	5	2	3	1	4	2	1	4	3	1						2.6
Z31326-030	5	4	3	3	2												3.0
Z31326-038	2	2	3	2	3	2	1	1	1	2	3	1					1.9
Z31326-045	2	1	2	2	2	4	3	2	4	3	5	4	3	3			2.9
Z31326-047	3	4	4	4	3	3	4										3.7
Z31326-048	3	4	4	2	5	3	4	2	4	3	5	5	4	4	2		3.6
Z31326-049	2	3	4	3	3	2	4	4	3	3							3.2
Z31326-054	3	2	4	3	4	5	4	4	5	4	1	3	4				3.6
Z31326-062	3	2	4	1	4	4	3	4	4								3.3
Z31326-063	2	5	4	2	5	4	3	4	3	1	3	4	3	4			3.5
Z31326-067	4	3	4	4	2	4	4	4									3.6
Z31326-073	4	1	1	1	2	1	3	1									1.4
Z31326-104	5	3	2	4	4												3.3
Z31326-111	5	1	1	2	2	1	2	2	3	2	3	3					2.0
Z31326-120	5	3	3	2	4	3	4	2	2	3	1	3	4	2			2.8
Z31326-145	3	4	4	5	5	5	4	3	5	4	4	4	4	4	5	1	4.1

^a5: Susceptible ~ 1: Resistant

(5) 노균병 저항성 계통 육성

- 유묘선발과 포장성체검정을 병행해서 저항성 개체를 선발할 경우 성체포장검정을 단독으로 실시해서 선발할 경우 (16.8%) 보다 저항성 개체를 선발할 효율이 56%로 증가되었다. 이는 포장성체검정 단독으로 선발 할 경우보다 2.3배 이상 선발압이 증가한다는 것을 의미한다(표 13).

표 13. 유묘선발 적용구와 비적용구 간의 노균병저항성 개체 선발 비율

유묘선발	정식수	저항성 개체수 (DI 1~2)*	저항성 비율(%)
적용구	77	43	55.8
비적용구	137	23	16.8

*2013년 3~5월 안성연구 포장 조사치, DI: Disease Index

○ 유묘실내검정을 통해서 선발효율을 향상시키고, 이후 포장성체검정과 병행 실시하면 효율적으로 노균병 개체를 선발할 수 있을 것으로 판단되어서, 본 과제에서는 두 가지 선발법을 병행해서 노균병 저항성 개체를 선발하였다.

- 유묘 상태에서 유묘실내검정을 통해 1차로 저항성 개체를 선발해서 선발된 개체를 포장에 정식하여 포장저항성을 검정하였다. 원예적 특성과 병저항성을 종합적으로 평가하여 최종 선발 하였고 선발된 개체를 포장에 정식하여 세대진전을 수행하였다.

5-1. 1차 계통 육성

○ 효율적인 저항성 계통 선발을 위해 초기 (F₂ ~F₄) 육성 계통을 대상으로 유묘검정을 실시하여 저항성 개체를 선발하였다 (그림 19).



그림 19. 오이 유묘의 노균병 검정 및 선발
<좌: 육묘상에서의 발병처리, 우: 노균병 발병 유묘>

- 총 240개 육성 계통 (8,364 개체)을 대상으로 유묘검정을 수행하여 674 개체 (8.1%)를 선발하였다 (표 14). 저항성 판별 계통인 G5F, PI197088 들은 저항성 지수 6~7를 이병성 판별 계인 SMR58, Mummy331 들은 3~4의 저항성 지수를 나타내어 비교적 정확한 판별지표로 활용할 수 있었다. 집단의 특성에 따라 강한 저항성 개체를 선발하거나 저항성이 약하더라도 향후 계통육성에 활용하기 위해 선발하였다.

표 14. 주요 오이 육종 계통의 노균병 저항성 유묘선발 결과

BN	계통명	Lineage	F	성표현	저항성 분포	유묘수	선발수
Z31101	SMR58	11658-0-0	INBRED	MO	3	20	0
Z31102	Mummy 331	0143-0-0-0	INBRED	MO	4	20	0
Z31103	G5F	09617-0-0-0-0-0	INBRED	MO	6	20	0
Z31104	PI197088	09621-0-0-0-0-0	INBRED	MO	7	20	0
Z31105	JEF*2/G5F	121623-3-5	BC1F3	MO	5	50	5
Z31112	JEF*3/GA	121380-4-1	BC2F3	GY	4	50	3
Z31119	JBF*3/GA	121402-6-1	BC2F3	GY	3	50	0

Z31122	JBF*2/PI88	122592-3	BC1F2	MO	4~5	50	2
Z31128	BCF*3/GA	121395-6-2	BC2F3	GY	5	50	1
Z31150	JEM*2/GA	121439-0-3	BC1F3	MO	5	50	4
Z31175	BCM*2/PI88	111927-8-2	BC1F3	MO	4~5	50	4
Z31186	(97/K2)*3/G5F	111856-2-7	BC2F3	MO	4~6	50	4
Z31194	(97/K2)*3/G5F	121528-7	BC2F2	GY	3~4	50	2
Z31199	(97/K2)*3/G5F	121545-1-6	BC2F3	MO	4~7	50	4
Z31200	(97/K2)*3/G5F	121545-3-4	BC2F3	GY	4~6	50	5
Z31201	(97/K2)*3/G5F	121664-1*9-4	BC2F4	GY	4~5	50	3
Z31223	(BCM/(J7/K2))/(JEM)*2/GA	122560-6	BC1F2	MO	3~5	50	3
Z31232	(K4/KJ2)*2/G5F	121511-1-7	BC1F3	GY	4~7	50	4
Z31256	(K4/KJ2)*2/GA	111931-1-2-3	BC1F3	MO	4~6	50	5
Z31260	(K4/KJ2)*3/GA	121410-1-4	BC2F3	GY	4~7	50	5
Z31261	(K4/KJ2)*3/GA	121411-6-1	BC2F3	MO	4~6	50	4
Z31262	(K4/KJ2)*3/GA	121415-3-2	BC2F3	MO	4~7	50	3
Z31277	(K4/KJ2)*3/PI88	121514-5-2	BC2F3	GY	5~6	50	4
Z31320	GHSGC/CHJCYA	12011-0	F2	PF~MO	3~5	200	11
Z31338	WEU/TH118FLM	12021-0	F2	GY/MO	3~5	100	9
Z31339	TH048/DHDHG	12015-0	F2	MO	3~5	100	5
Z31340	TH118FLM/DHDHG	12017-0	F2	MO	3~5	100	7
Z31341	TH323/WMEJ	12014-0	F2	MO	3~5	100	7
Z31342	JY35/NDCJ	12002-0	F2	MO	3	100	5
Z31343	NDCJ/JY35	12001-0	F2	PF~MO	3	100	3
Z31344	WHDHG/EJ//NE/MEJ	12003-0	F2	MO	3~5	100	4
합계						1,930	116

*성발현: G: Gynoeciou, PF: Predominantly-Female, MO: Monoecious

*노균병저항성: 3: 이병성 ~ 7:저항성

- 육성 계통들은 저항성 자원과 elite line 간의 여교배 (backcross) 또는 분리집단(F₂) 세대로 원예적 특성 개선을 목표로 개발 중에 있다. 선발된 유묘를 포장에 정식하여 포장 저항성, 과실 특성을 조사하며 선발된 개체를 대상으로 세대진전을 위한 교배를 실시하였다(그림 20).



그림 20. 오이 노균병 유묘검정 선발 개체의 포장 특성조사 및 세대진전

과중: 2013년 3월 21일, 유묘선발: 5월 6일 ~8일,

정식: 5월 9일, 포장 저항성 평가: 6월 10일 ~19일, 자가수분: 6월 15일 ~21일

5-2. 2차 계통 육성

- 국내용 노균병저항성 계통육성을 위해 대비품종 10 품종, 대비계통 10 계통, 육종 계통 450 계통에 대한 노균병 포장저항성 평가를 2013년 가을 작형과 2014년 봄 작형에 수행하였고, 인도 및 동남아 수출용 저항성 계통 육성을 위해 대비품종 6 품종, 대비계통 10 계통, 85개 육종계통에 대한 포장저항성 검정을 2014년 상반기에 수행하였다 (그림 21).

시험 구분	과종	정식	수확 조사
2013년도 하반기	2013-07-26	2013-08-13	2013-09-10 ~ 11-15
2014년도 상반기	2014-02-17	2014-03-27	2014-04-10 ~ 05-30
동남아 계통	2014-04-08	2014-05-08	2014-06-06 ~ 06-30



그림 21. 시설재배를 통한 국내 오이 계통(좌) 및 노지재배를 통한 동남아 계통(우) 선발

- 포장저항성 검정 결과 중도저항성(저항성지수 5 이상)을 보이는 계통으로 국내 백다다기 27개 계통, 가시오이 14개 계통, 취청오이 5개 계통을 동남아시아 계통 22 계통을 선발하였다 (표 15, 16).
 - 백다다기오이의 경우 대비품종과 대비계통의 저항성 지수는 4이었으며 10개 계통은 저항성 지수 2 이상이었으며 이들 계통들은 흰가루병에 대해서도 저항성을 나타내었다.
 - 가시오이 대비품종과 대비계통의 저항성 지수는 3~4 수준이었으며 9개 계통이 저항성 지수 2 이상의 저항성을 보였음. 9개 계통 중 8개 계통은 흰가루병에 대해서도 저항성을 보였다.
 - 취청오이 대비품종과 대비계통의 저항성 지수는 4 수준이었으며 1개 계통이 저항성 지수 2을 보였다.
 - 동남아시아 오이 대비품종과 대비계통의 저항성 지수는 2~3 이었으며 선발된 22개 계통은 저항성 지수 2 이상을 보였음. 이들 저항성 계통 중 13개 계통은 흰가루병에 대해서도 저항성을 보였으며 6개 계통은 과실의 쓴맛이 없는 것으로 나타났다.
 - 저항성 계통 중 43006, 43013, 43109 자성(gynoecious) 계통으로 고질성 품종 육성에 활용할 수 있을 것으로 판단되었다.

표 15. 노균병저항성 국내 오이 계통의 주요 특성

품종군	BN	F	성발현*	DM ^y 13-9-27	DM 13-11-19	DM 14-05-18	PM 14-6-16
백다다기	대비품종1	1	PF	-	-	4	4
백다다기	대비품종2	1	PF	-	-	4	4
백다다기	대비계통1	P	GY	-	-	4	5
백다다기	대비계통2	P	M	-	-	4	5
백다다기	42026	8	GY	3	5	3	3
백다다기	42049	4	GY	3	4	3	3
백다다기	42060	5	GY	3	4	3	3
백다다기	42067	4	GY	3	4	3	3
백다다기	42077	5	GY	3	5	3	4
백다다기	42100	11	GY	3	5	3	2
백다다기	42116	P	M	3	4	3	2
백다다기	42173	6	M	3	4	3	2
백다다기	42174	5	M	3	4	3	3
백다다기	42184	4	M	3	4	2	2
백다다기	42196	4	M	3	4	3	-
백다다기	42274	3	F/F	-	-	3	3
백다다기	42277	6	M	-	-	2	2
백다다기	42286	5	F	-	-	2	2
백다다기	42298	5	F	-	-	2	2
백다다기	42306	8	M/F	-	-	3	2
백다다기	42308	4	M	-	-	3	2
백다다기	42314	5	M	-	-	2	2
백다다기	42321	4	M	-	-	2	2
백다다기	42327	4	F	-	-	3	2
백다다기	42329	6	M	-	-	2	2
백다다기	42330	6	M	-	-	3	2
백다다기	42333	8	M	-	-	2	2
백다다기	42334	6	M	-	-	2	2
백다다기	42339	7	M	-	-	2	2
가시	대비품종1	1	PF	-	-	4	4
가시	대비품종2	1	PF	-	-	4	4
가시	대비계통1	P	GY	-	-	4	4
가시	대비계통2	P	M	-	-	3	4
가시	42352	6	M	3	4	2	2
가시	42360	9	M	3	4	3	4
가시	42368	10	M	2	3	3	3
가시	42371	9	M	2	4	2	-
가시	42380	8	M	3	4	2	2
가시	42382	8	M	3	4	2	2
가시	42387	6	M	3	3	3	2
가시	42398	6	M	3	3	3	2
가시	42403	6	M	3	4	2	2
가시	42406	6	M	2	4	2	2
가시	42410	6	M	3	3	2	2
가시	42413	6	M	3	4	2	2
가시	42420	6	M	2	3	2	2
취청	대비품종1	1	M	-	-	4	-
취청	대비품종2	1	M	-	-	4	-
취청	대비계통1	P	M	-	-	4	-
취청	대비계통2	P	M	-	-	4	-
취청	42526	9	M	3	3	3	-
취청	42530	3	M	3	3	3	-
취청	42547	3	M	2	3	2	-
취청	42554	3	M	3	4	3	-

취청	42575	8	M	3	4	3	-
----	-------	---	---	---	---	---	---

²GY: Gynoecious, PF:Predominantly female, M: Monoecious; ³3: Susceptible ~ 7: Resistant

표 16. 노균병 저항성 동남아 슬라이서 오이 계통의 주요 특성

품종/계통명	F	성발현 ²	노균병 저항성 ³	흰가루병 저항성 ³	쓴맛 ^x
Malini (Monsanto)	1	M	3	4	2
Dynasty (Nong-Woo Bio)	1	M	3	3	1
Amata 765 (Chia-Tai)	1	M	3	3	2
Hercules 56 (Chia Tai)	1	PF	2	2	0
Mercy (East-West)	1	M	3	3	0
Monza (East-West)	1	M	3	4	3
43002	P	M	2	2	0
43006	P	GY	2	3	0
43007	P	M	2	2	1
43010	P	PF	2	2	-
43013	P	GY	2	2	0
43014	P	M	2	4	1
43016	P	M	2	4	0
43017	P	M	2	2	0
43018	P	M	2	2	0
43019	P	M	2	2	0
43024	P	M	2	3	0
43025	P	M	2	2	0
43026	P	M	2	4	0
43027	P	M	2	3	0
43028	P	M	2	2	-
43029	P	M	2	2	3
43049	4	M/GY	2	3	3
43057	4	GYPF	2	3	0
43077	4	M	2	2	2
43109	4	GY	2	2	0
43117	4	M	2	2	2~3
43129	4	M	2	3	0

²GY: Gynoecious, PF:Predominantly female, M: Monoecious

³5: Susceptible ~ 5: Resistant

^x0: Bitter-free ~ 3: Bitter

5-3. 3차 계통 육성

- 국내용 노균병저항성 계통육성을 위해 대비품종 26 품종, 대비계통 26계통, 육종 계통 689 계통에 대한 노균병 포장저항성 평가를 2014년 가을 작형과 2015년 봄 작형에 수행하여 저항성 계통을 선발하였다.

시험 구분	파종	정식	수확 조사
2014년도 하반기	2014-07-26	2014-08-13	2014-09-10 ~ 11-15
2015년도 상반기	2015-03-30	2015-04-24	2015-05-14 ~ 07-10

- 포장저항성 검정 결과 중도저항성(저항성지수 5 이상)을 보이는 계통으로 국내 백다다

기 12개 계통, 가시오이 9개 계통, 취청오이 6개 계통을 선발하였음(표 17).

- 백다다기오이의 경우 대비품종과 대비계통의 저항성 지수는 3 수준이었으며 9개 계통은 저항성 지수 2 이상이었으며 이들 계통들은 흰가루병에 대해서도 저항성을 나타내었다.
- 가시오이 대비품종과 대비계통의 저항성 지수는 4 수준이었으며 6개 계통이 저항성 지수 2 이상의 저항성을 보였음. 이들 계통은 흰가루병에 대해서도 3이상 저항성 수준을 보였다.
- 취청오이 대비품종과 대비계통의 저항성 지수는 4 수준이었으며 6개 계통이 저항성 지수 2을 보였음. 이들 계통은 흰가루병에 대해서도 3이상 저항성 수준을 보였다.

표 17. 노균병저항성 국내 오이 계통의 주요 특성

품종군	파종번호	세대	성발현 ¹	노균병 저항성 (1강~5약)	흰가루병 저항성 (1강~5약)
백다다기	대비품종1	1	G	4	5
백다다기	대비품종2	1	PF	4	5
백다다기	대비계통1	P	G	4	5
백다다기	대비계통2	P	M	4	5
백다다기	W126	6	G	2	3
백다다기	W129	6	G	2	3
백다다기	W279	5	M	3	2
백다다기	W280	6	M	2	2
백다다기	W282	7	M	2	3
백다다기	W283	7	M	3	2
백다다기	W284	5	M	2	2
백다다기	W286	7	M	2	3
백다다기	W326	7	M	3	2
백다다기	W343	7	M	2	2
백다다기	W348	8	M	2	3
백다다기	W397	5	M	2	3
가시	대비품종1	1	G	4	4
가시	대비품종2	1	M	4	4
가시	대비계통1	P	G	4	4
가시	대비계통2	P	M	4	4
가시	C43	7	M	2	3
가시	C75	9	M	2	2
가시	C81	7	M	3	2
가시	C95	7	M	3	2
가시	C98	7	M	3	2
가시	C100	7	M	2	3
가시	C105	7	M	2	3
가시	C112	7	M	2	2
가시	C115	9	M	2	2
취청	대비품종1	1	M	4	4
취청	대비품종2	1	M	4	4
취청	대비계통1	P	M	4	4
취청	대비계통2	P	M	4	4

취청	H78	5	M	2	2
취청	H80	5	M	2	2
취청	H81	5	M	2	2
취청	H84	5	M	2	2
취청	H110	4	M	3	2
취청	H118	4	M	3	2

¹GY: Gynoecious, PF:Predominantly female, M: Monoecious

²5: Susceptible ~ 1: Resistant

5-4. 4차 계통 육성

○ 5차년도에는 2차에 걸쳐 (1차: 2015년 9~11월, 2차: 2016년 4~6월) 포장저항성과 열매 특성을 평가하여 저항성 계통을 최종 선발하였다.

- 국내 백다다기(8개 계통), 가시오이(6개 계통), 취청오이(5개 계통)를 선발하였다.

표 18. 노균병 저항성 계통 선발

품종군	파종번호	세대	성발현 ¹	노균병저항성 (5약~1강)	흰가루병 저항성 (5약~1강)
백다다기	대비계통1	P	G	4	4
백다다기	대비계통2	P	M	4	4
백다다기	135	6	M	2	3
백다다기	139	13	G	2	2
백다다기	143	8	G	2	2
백다다기	154	12	G	2	2
백다다기	157	11	G	3	3
백다다기	160	11	G	2	2
백다다기	170	7	G	3	2
백다다기	180	11	G	2	2
가시오이	대비계통1	P	G	4	4
가시오이	대비계통2	P	M	4	4
가시오이	405	10	G	3	2
가시오이	412	12	M	2	2
가시오이	414	12	M	2	2
가시오이	419	3	G	2	2
가시오이	447	5	M	3	2
가시오이	460	5	G	2	2
취청오이	대비계통1	P	M	4	4
취청오이	대비계통2	P	M	4	4
취청오이	507	4	M	2	3
취청오이	514	4	M	2	3
취청오이	516	4	M	2	3
취청오이	519	4	M	2	3
취청오이	520	4	M	2	3

²GY: Gynoecious, PF:Predominantly female, M: Monoecious

³ 5 Susceptible ~ 1 Resistant

(6) 노균병 저항성 오이 성능 검정

6-1. 1차 노균병 저항성 오이 조합 작성 및 성능검정

- 2012년도에 육성한 백다다기오이 145개 조합을 대상으로 장내 성능검정을 실시하여 노균병 중도저항성 이상을 보이는 5개 조합을 선발하였다(표 19, 그림 22).
- 상반기 성능검정을 위해 2012년 12월 20일에 파종하여 2013년 1월 22일 정식하였으며 수확 조사는 3월 29일부터 5월 30일 까지 수행하였다.
- 노균병 포장저항성은 3 차에 걸쳐 조사를 실시하였는데 대비종 들은 모두 중도저항성 이하를 보였고 선발조합들은 모두 중도저항성 수준의 저항성을 보였다. 선발된 조합들의 주당 수확 수는 대비종의 3.3~3.9개 보다 많은 4.1~5.5개의 분포를 보였다.

표 19. 백다다기오이 선발조합의 특성

BN	품종명	노균병 저항성(1)	노균병 저항성(2)	노균병 저항성(3)	초세	주당 수확수
311	대비종1	3	4	4	5.0	3.3
312	대비종2	3	3	4	5.5	3.6
313	대비종3	4	4	4	5.3	3.9
316	대비종4	3	4	4	5.3	3.5
317	대비종5	3	4	4	5.5	3.3
304	W31639	3	3	3	6.0	4.1
305	W31563	3	3	3	7.0	5.5
307	W31630	3	4	3	6.0	4.9
317	W31667	3	3	3	6.5	4.8
318	W31675	3	3	3	6.0	4.8

*경종개요: 파종: 2012년 12월 20일, 정식: 2013년 1월 22일, 수확: 3월 29일 ~ 5월 30일
 *노균병저항성: 5: 이병성 ~ 1:저항성, 1차: 2월 5일, 2차: 3월 29일, 3차: 5월 15일
 *초세: 3: 약함 ~ 7: 강함



그림 22. 백다다기오이 주요 선발조합의 과형 비교

- 오이의 기본 형질은 다수성과 상품성으로 내병성 품종의 경우에도 일정 수준 이상의 기본 요구 형질을 만족시켜야 한다. 특히, 미숙과를 이용하는 오이의 경우에는 이 두 가지 기본 형질이 충족되어야 품종으로 성립될 수 있다. 농가시험을 통해 고온 착과력, 연속 비대력, 과장, 과피 색 등의 원예적 특성을 평가하여 향후 품종 개발을 위한 자료로 활용하였다.

6-2. 2차 노균병 저항성 오이 조합 작성 및 성능 검정

- 2013년 가을 작형 에서 250개 백다다기오이 조합을 육성하였으며 육성한 조합을 대상으로 아래와 같은 기준으로 장내 조합성능검정을 수행하였다.

시험 지역	과종	정식	수확 조사
팜한농 육종연구소	2014-2-17	2014-3-27	2014-4-10 ~ 5-30

- 조합 선발을 위해서 수확 초기에는 정단부 생육, 저온 비대력과 같은 저온기 특성을 검정하고, 수확 후기에는 노균병저항성, 솟 꽃 발생과 같은 고온기 특성을 조사하였다
- 주요 선발지표는 착과력, 과형, 과피 색으로 정하고 조사하였다.
- 상기의 조사를 통해 23개 백다다기오이를 농가 연락시험을 위한 조합으로 선발하였다 (표 20).
- 선발조합 중 41556외 4개 조합은 노균병저항성 지수 2 이상의 저항성 수준을 보였으며 이들 중 41702, 41722, 41729, 41766, 41774, 41775는 상품과율이 85% 이상으로 대비종 들에 비해 높은 특성을 보였다.

표 20. 장내 조합성능검정을 통해 선발된 백다다기오이 조합의 특성

조합명	노균병 저항성 ^z	조숙성 ^z	초세 ^z	솟꽃 ^y	마디당 자화수 ^x	주당 상품과수 ^w	상품과율 (%)	과장 (cm)	과중 (g)
대비종1	3	5	5	0	1.3	7	80	24.9	233
대비종2	4	7	5	0.5	1.3	6.9	66	25.3	228
대비종3	4	6.5	6	0	1.2	5.3	58	25.7	218
41517	3	5	7	0.3	1	7.9	94	24.5	232
41522	3	6.5	6	0	1.1	9.3	80	24.7	233
41525	3	6.5	6	0	1	6.5	73	-	-
41527	3	5.5	6	0.3	1.5	4.8	76	-	-
41530	4	5	7	0	0.7	4.8	75	24.7	247
41531	4	4	6	0	0.6	4.3	72	25.7	247
41556	3	5.5	5	0.3	1.1	5.9	73	27.2	257
41589	4	6.5	4	0	2	4.1	64	-	-
41614	4	6	4	1	1.2	4	80	27.4	313
41647	2	7	5	0.3	1.2	5.6	74	-	-
41653	3	8	4	0	1.3	6	75	25.9	225
41665	4	7	4	0.3	1.1	5.3	81	27.8	260
41702	3	4.5	6	0	1.3	6	91	24.3	248

41704	2	5	7	0	1.1	3.5	65	-	-
41713	2	4	6	0	1.2	4.6	71	24.6	212
41722	2	4.5	5	0	1.1	5.7	93	22.7	210
41729	2	5.5	5	0	1.2	5.5	89	25.6	232
41766	3	9	7	0	1	6.9	86	27.6	255
41771	3	6	5	0.3	1.3	6	84	-	-
41774	3	6.5	6	0	1.2	5.5	86	-	-
41676	3	7.5	3	0	1.1	4.3	62	23.8	165
41723	3	6	5	0	1	5.5	80	24.5	210
41775	3	6	6	0	1.3	6	86	24.6	243

⁵:이병성 ~ 1:저항성, 3: 약함, 늦음 ~ 7:강함, 빠름

^y10 마디에서의 숫꽃수,

^x10 마디 아래에서의 마디당 암꽃수

^w2014년 3월10일 ~ 4월15일 까지의 주당 상품 과수

- 선발된 계통을 이용하여 2013년도 상반기에 인도 및 동남아 슬라이서오이 조합 85개를 작성하여 팜한농의 미얀마 농장에서 2013년 9월부터 11월까지 조합성능검정을 수행하였다.

시험 지역	파종	정식	수확 조사
Myanmar, Mandalay	2013-9-15	2013-10-15	2013-11-15 ~11-17

- 장내성능검정 결과 현재 시장에서 우점품종인 Malini와 같은 Green형으로 3개 조합(M3055, M3020, M30600), Dark green 형으로 8개 조합(M3019, M3065, M3056, M3057, M3059, M3075, M3086, M3087), White 형으로 1개 조합(M3035)을 선발하였다(표 21, 그림 23).
- 선발조합들은 Malini에 비해서는 노균병저항성이 낮은 수준이었으나 M3086, M3087 이외의 조합들은 Dynasty와 Hercules와는 동일한 수준이거나 높은 저항성을 나타내었다.

표 21. 인도/동남아 수출용 슬라이서 오이 선발조합의 특성

Group	품종명	Downy Mildew Resistance ^z	Plant Vigor ^y	Fruit length (cm)	% Marketable fruit	No.Marketable Fruit/Plant (2weeks)
Green	Malini	2	5.5	21.0	95	3.1
Green	Dynasty	3	5	22.4	74	2.8
Green	Hercules 56	3	7	21.5	66	2.7
Green	M3055	3	6	-	83	3.4
Green	M3020	5	5.5	21.7	81	6.3
Dark green	M3019	3	6	21.2	70	5.0
Dark green	M3065	3	5.5	20.5	67	3.4
Dark green	M3056	3	5.5	22.5	72	3.3
Dark green	M3057	3	6.5	-	68	4.4
Dark green	M3059	4	5	-	70	2.1
Green	M3060	3	5	22.0	71	3.0
Dark green	M3075	3	6.5	19.4	66	5.1
Dark green	M3086	3	5.5	-	56	3.2

Dark green	M3087	3	5	27.3	59	4.5
White	M3035	5	7	19.6	76	4.2

²3: susceptible ~ 7: resistant

³3: weak ~ 7: vigorous



그림 23. 동남아 슬라이서 오이 선발조합 과형 비교

- Malini에서 문제가 되는 과실의 쓴맛은 조합선발에서 주요 지표였으며 본 시험에서는 쓴맛이 있는 조합들은 모두 도태하였다.
- 상품과율은 Malini에서 95%로 높았으나 선발조합들의 주당 수확량은 동등 수준 이상이었다.
- 특히, M3020, M3019, M3057, M3075, M3087, M3035 조합에서는 Malini 대비 30% 이상 수확량이 많았다.
- 재배관리 기술, 시비기술의 발달에 따라 시장에서는 고품질 품종에 대한 수요가 증가하고 있어 향후 고품질 품종에 대한 개발이 필요한 것으로 판단된다.

6-3. 3차 노균병 저항성 오이 조합 작성 및 성능검정

- 2차 선발한 계통을 이용하여 2014년 가을 작형에서 백다다기오이 151조합을 육성하였으며 육성한 조합을 대상으로 아래와 같은 기준으로 장내 조합성능검정을 수행하였다.
 - 조합 선발을 위해서 수확 초기에는 조숙성, 연속착과성, 저온 비대력과 같은 저온기 특성을 조사하고, 수확 후기에는 노균병저항성, 흰가루병 저항성 등 내병성을 조사하여 조합 선발에 활용하였다.
 - 주요 선발지표는 수량성, 과형, 과피 색으로 정하고 조사하였다
 - 선발 결과 17개 백다다기오이를 농가 연락시험을 위한 조합으로 선발하였음(표 22)

표 22. 장내 조합성능검정을 통해 선발된 백다다기오이 조합의 특성

조합명	성발현 ^a	초세 ^c	연속 착과 ^c	과형	과색 ^c	수량성 ^c	상품성 ^c	PM ^b	DM ^b
대비종1	PF	6	7	중과	5	7	6	4	4
대비종2	PF	7	6	장과	6	6	5	4	4
대비종3	PF	7	6	중과	6	7	7	4	4
대비종4	PF	8	7	장과	7	6	6	3	3
W5044	G	7	6	중과	8	7	7	3	3
W5045	G	8	6	중과	8	7	7	2	3
W5046	G	8	6	중과	8	7	7	3	5
W5158	PF	7	6	장과	7	7	7	4	4
W5178	PF	7	7	중과	7	8	7	4	4
W5033	G	7	6	중과	8	7	7	2	3
W5039	PF	7	6	중과	8	7	7	4	3
W5051	G	7	6	장과	7	6	7	4	3
W5061	PF	6	6	장과	8	7	7	4	3
W5026	G	6	7	중과	7	7	7	2	2
W5113	PF	8	7	중과	7	7	7	2	2
W5035	PF	6	6	중과	7	7	7	2	2
W5047	PF	6	6	중과	7	7	6	2	2
W5059	PF	6	6	중과	7	7	7	2	2
W5067	PF	8	6	중과	8	7	7	2	3
W5090	G	6	6	중과	7	6	7	2	2
W5091	G	6	6	중과	7	6	7	2	2

^aG: Gynoecious, PF:Predominantly female, M: Monoecious

^b5:이병성 ~ 1:저항성; c1: 약함, 늦음 ~ 7:강함, 빠름

- 선발조합 14개 조합은 노균병저항성 지수 3의 중도저항성 이상 수준을 보였으며 이들 중 W5026, W5035, W5047, W5090, W5091, W5113의 6조합은 노균병과 흰가루병에 높은 수준의 복합 내병성을 보였음.

6-4. 4차 노균병 저항성 오이 조합 작성 및 성능검정

- 3차 선발한 계통을 이용하여 2015년 가을 작형 에서 백다다기오이 122조합을 육성하였으며 육성한 조합을 대상으로 아래와 같은 기준으로 장내 조합성능검정을 수행하였다.
 - 수확 초기에는 조숙성, 연속착과성, 저온 비대력과 같은 저온기 특성을, 수확 후기에는 노균병저항성, 흰가루병 저항성등 내병성을 조사하여 조합 선발에 활용하였다.
 - 내병성 뿐만 아니라 수량성, 과형, 과피 색 등 원예적 형질을 선발기준으로 선발을 실시하였다
 - 대비종에 비해 노균병 수준이 높고(저항성 지수 3 이하) 연속착과력, 과색, 수량성 등 원예적 형질이 우수한 6개 조합을 선발 하였다.(표 23)

표 23. 장내 조합성능검정을 통해 선발된 백다다기오이 조합의 특성

조합명	성발현 ^a	초세 ^c	연속 착과 ^c	과형	과색 ^c	수량 ^c	상품성 ^c	PM ^b	DM ^b	DM ₂
대비종1	G	5	7	중	중과	5	7	3	3	4
대비종2	G	7	7	상	장과	7	7	3	5	3
대비종3	G	7	8	상	장과	8	7	3	4	4
대비종4	G	7	7	중	장과	7	7	3	3	4
W6007	G	7	6	상	장과	6	7	3	5	3
W6062	G	7	7	상	장과	6	7	3	5	3
W6064	G	6	8	중	중과	8	7	2	5	3
W6075	G	7	7	중	장과	6	7	3	5	3
W6108	G	7	7	상	장과	7	7	2	5	3
W6163	G	6	8	중	중과	8	8	2	3	3

^aG: Gynoecious, PF:Predominantly female, M: Monoecious

^b5:이병성 ~ 1:저항성

^c1: 약함, 늦음 ~ 7:강함, 빠름

7. 노균병 저항성 오이 농가 연락 시험 및 선발

7-1. 1차 농가연락 시험(3차년도)

- 고온기 백다다기오이 주산지인 강원도 홍천군 서석면과 내면 2개 지역에서 농가시험을 실시하여 2개의 시교조합(W31621, W31625)을 선발하였다 (그림 24).

시험 지역	파종	정식	수확 조사
강원도 홍천군 서석면	2013-05-13	2013-06-04	2013-07-04 ~ 08-20
강원도 홍천군 내면	2013-05-20	2013-06-12	2013-07-10 ~ 08-25



그림 24. 백다다기오이 농가 연락 시험 포장
(강원도 홍천군 서석면, 파종: 2014-5-13, 촬영: 7-31)

- 고온 착과력은 고온기 재배에서 다수확을 결정하는 주요 지표로 고온 착과력이 낮은 품종은 유과(미이라과) 발생이 증가하는 경향을 나타낸다. 선발조합의 고온 착과력은 착과력 지수를 기준으로 대비종 들에 비해 한 단계 정도 높은 수준을 보였다.
- 노균병 저항성은 중도저항성(저항성 지수3)보다 다소 낮았으나 대비종 들에 비해서는 비교적 높은 특성을 보였다. 고온기에 가장 큰 문제가 되는 갈록과 발생은 W31621은 대비종에 비해 동일하거나 다소 높았지만 W31625은 비교적 낮았다. 전체적인 수확량은 대비종과 유사하거나 높은 특성을 보였다 (표 24).

표 24. 선발된 백다다기오이 선발조합의 주요 특성

품종명	고온착과력 ^z	노균병저항성 ^y	갈록내성 ^x	주당수확수 ^w
대비종1	4.8	4	5	7.0
대비종2	4.3	4	4	7.8
W31621	5.3	3	4	7.5
W31625	5.5	3	6	7.3

^z암꽃의 발육 및 비대 정도, 3: 낮음 ~ 7: 높음

^y5: 이병성, 3: 중도저항성, 1: 저항성; 2013년 7월 9일부터 7월 31일까지 서석면과 내면 시험포장에서의 3회 조사값의 평균

^x오이 과실의 갈록과 발생정도; 3: 심함 ~ 7: 거의 없음

^w홍천군 서석면 시험포장, 7월 22일부터 8월 8일까지 3회 수확수의 평균

- W31621과 W31625는 대비종에 비해 청수부 착색이 진하고 과피 착색이 균일해 외관품질이 높은 특성을 보였음. W31621은 과장이 다소 짧고 균일도가 높았으며 W31625은 H형 과형으로 과실 비대성이 높은 특성을 보였다 (그림 25).



그림 25. 백다다기오이 시교조합 오이(W361, W3625) 과형 비교

7-2. 2차 농가연락 시험(4차년도)

- 2015년 장내성능검정을 통해 선발된 17조합에 대하여 강원도 홍천군 서석면 지역에서 농가시험을 2회에 걸쳐 진행 하였다 (그림 26).

시험 지역	파종	정식	수확 조사
강원도 홍천군 서석면	2015-05-05	2015-06-08	2015-07-13 ~ 08-15
강원도 홍천군 서석면	2015-06-10	2015-06-29	2015-07-25 ~ 08-30

A. 노균병 검정. (좌)대비종, (우)시험조합



B. 시험 포장



그림 26. 백다다기오이 농가연락 시험 전경
(강원도 홍천군 서석면, 정식: 2015-6-8, 촬영: 7-14)

- 시험조합은 농가연락시험 포장에서의 노균병 저항성 평가와 더불어 원예적 특성인 고온 기작과력, 상품성, 수량성, 과색, 과형 등을 평가후 최종 2조합(W5033, W5044)을 선발하였다.
- 선발된 2조합은 대비종에 비해 노균병 저항성 지수가 3으로 노지 포장에서 상대적으로 강한 특성을 보였다 (표 25. 그림 27)

표 25. 장내 조합성능검정을 통해 선발된 백다다기오이 조합의 특성

조합명	성발현 ^a	초세 ^c	연속착과 ^c	과형	과색 ^c	수량성 ^c	상품성 ^c	PM ^b	DM ^b
대비종1	PF	6	7	중과	5	7	6	4	4
대비종2	PF	7	6	장과	6	6	5	4	4
대비종3	PF	7	6	중과	6	7	7	4	4
W5033	G	7	6	중과	8	7	7	2	3

W5044	G	7	6	중과	8	7	7	3	3
-------	---	---	---	----	---	---	---	---	---

^aG: Gynoeocious, PF:Predominantly female, M: Monoecious
^b5:이병성 ~ 1:저항성, °1: 약함, 늦음 ~ 7:강함, 빠름



그림 27 . 농가연락시험(홍천) 선발 조합

7-3. 농가연락 시험(5차년도)

○ 강원도 홍천군 지역에서 농가시험 2회에 걸쳐 정식되어 진행하였다 (그림 28).

시험 지역	파종	정식	수확 조사
강원도 홍천군 서석면	2016-05-09	2016-06-11	2016-07-13 ~ 08-15
강원도 홍천군 내면	2016-05-09	2016-06-08	2016-07-20 ~ 09-09



그림 28 . 백다다기오이 농가연락시험 포장
(강원도 홍천군 내면, 정식: 2016-6-8, 촬영: 7-26)

○ 시험조합은 노지 및 하우스 포장에서의 노균병 저항성 평가와 더불어 원예적 특성인 고온

기 착과력, 상품성, 수량성, 과색, 과형 등을 평가 후 최종 2조합(W6062, W6064)을 선발하였다.(표 26, 그림 29)

표 26. 농가연락시험을 통해 선발된 백다다기오이 조합의 특성

조합명	성발현 ¹	조숙성 ²	연속 착과 ²	입성 ³	과장	과색 ²	수량성 ²	상품성 ²	PM ²	DM ²
대비종1	G	6	7	중	장과	7	7	7	4	4
대비종2	G	6	8	상	장과	8	7	7	4	4
대비종3	G	5	7	상	장과	7	7	7	3	3
W6062	G	7	7	상	장과	6	7	7	3	3
W6064	G	7	8	중	중과	8	7	8	3	3

1GY: Gynoecious, M: Monoecious

25:이병성; ~ 1:저항성, 3: 약함; 늦음; 나쁨; 적음 ~ 7: 강함; 빠름; 좋음; 많음

3완전히 전개된 잎의 자세, 과의 길이; 상,중,하

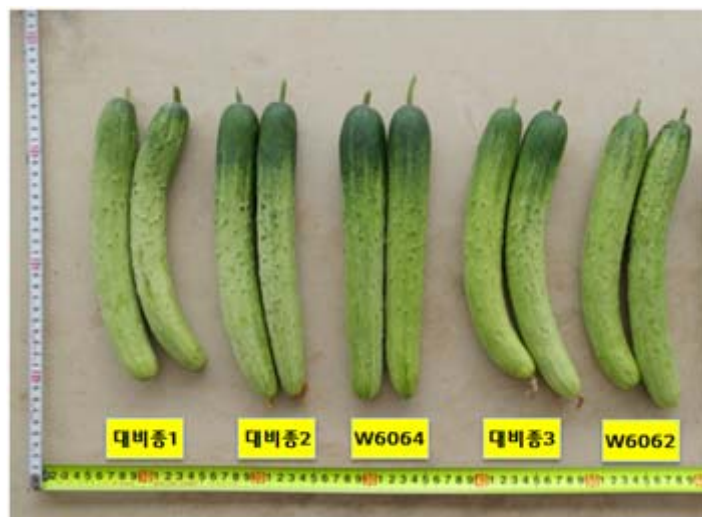


그림 29. 농가연락시험(홍천) 선발 조합

- 선발된 W6062는 수정백다다기로 명명하여 생산판매신고(품종명칭 등록출원번호 : 40-2015-000747) 완료함. 수정백다다기는 대비종에 비해 노균병에 상대적으로 강하며 과가 길고 바탕색이 진하여 최근 시장에서 선호하는 색을 선발할 수 있었다 (그림 29).
- 선발된 W6064는 시원백다다기로 명명하여 품종보호출원(출원번호 : 2016-608) 완료함. 시원백다다기는 대비종에 비해 노균병, 흰가루병에 중도 저항성이며 착과력이 좋고 과색이 진하고 과형이 안정적이어서 상품성이 뛰어난을 확인하였다 (그림 29).

(8) 노균병 저항성 유전자 선발 및 마커 개발

8-1. candidate gene approach

A. NBS-LRR 유전자 기반 마커

○ CAPS 마커

- 최근에 tomato, Arabidopsis, tobacco, rice, pepper, flax 등 다양한 식물체로부터 세균, 바이러스, 균류, 곤충 등 세포내외에서 다른 생활방식을 가진 다양한 식물병원균에 특이적 저항성을 유도하는 30 여 개의 식물 병저항성 (R) 유전자들이 분리되었다.
- 흥미롭게도 이들 유전자들은 분자 구조적으로 서로 유사성을 가지고 있으며 크게 5 종류로 대별된다. 이 5 종류의 저항성 유전자 구조에서 가장 많은 비중을 차지하는 것이 nucleotide-binding site(NBS)와 LRR domain을 함께 가지는 NBS-LRR 형태의 유전자들이다. 따라서 오이 유전체 서열을 분석해서 67 개 정도의 NBS-LRR 유전자를 발견하였다 (표 27)

표 27. 오이 NBS-LRR 유전자 리스트

ID	GenBank best hit
Csa1M334920.1	B9IP48 Tir-nbs-lrr resistance protein (Fragment)
Csa1M572370.1	B9GV40 Cc-nbs-lrr resistance protein
Csa2M008000.1	B9V0H2 NBS-LRR disease resistance protein family-1
Csa2M012670.1	B9HE76 Cc-nbs-lrr resistance protein
Csa2M014830.1	B9NCG3 Cc-nbs-lrr resistance protein
Csa2M015330.1	B9NCG6 Cc-nbs-lrr resistance protein
Csa2M020890.1	B9N9Q3 Tir-nbs-lrr resistance protein
Csa2M020940.1	B9I4D9 Tir-nbs-lrr resistance protein (Fragment)
Csa2M021510.1	B3VTL6 TIR-NBS-LRR RCT1 resistance protein
Csa2M021530.1	Q8GTC4 NLS-TIR-NBS disease resistance protein (Fragment)
Csa2M021540.1	B9IP48 Tir-nbs-lrr resistance protein (Fragment)
Csa2M022270.1	Q19PL7 TIR-NBS-LRR-TIR type disease resistance protein
Csa2M022780.1	B9NAV8 Tir-nbs-lrr resistance protein
Csa2M022790.1	B9GGU2 Tir-nbs-lrr resistance protein (Fragment)
Csa2M059700.1	B3VTL6 TIR-NBS-LRR RCT1 resistance protein
Csa2M074130.1	Q6ZJF7 Putative NBS-LRR resistance protein RGH1
Csa2M074250.1	B9I4D9 Tir-nbs-lrr resistance protein (Fragment)
Csa2M075330.1	B9IQ79 Tir-nbs-lrr resistance protein
Csa2M075440.1	B9NCG3 Cc-nbs-lrr resistance protein
Csa2M096930.1	B9I7H9 Cc-nbs-lrr resistance protein
Csa2M401400.1	Q0PDU9 NBS-containing resistance-like protein (Fragment)
Csa2M403680.1	B9NCG6 Cc-nbs-lrr resistance protein
Csa2M432260.1	B9NCL4 Cc-nbs-lrr resistance protein
Csa2M433370.1	B9N679 Cc-nbs-lrr resistance protein
Csa3M044470.1	B9GHK5 Tir-nbs resistance protein
Csa3M172400.1	B9IP06 Nbs-lrr resistance protein
Csa3M206330.1	Q2L361 Putative CC-NBS-LRR resistance protein
Csa3M308200.1	A1YEB0 NBS1
Csa3M687220.1	Q6URA2 TIR-NBS-LRR type R protein 7
Csa3M695840.1	B9NAW5 Tir-nbs-lrr resistance protein
Csa3M710180.1	B9NCH8 Cc-nbs-lrr resistance protein

Csa3M814390.1	B9I533 Nbs- <i>lrr</i> resistance protein
Csa3M814400.1	B9IL69 Cc- <i>nbs-lrr</i> resistance protein
Csa3M815400.1	B9I533 Nbs- <i>lrr</i> resistance protein
Csa3M822460.1	C6FF78 NBS-LRR disease resistance protein
Csa3M824920.1	B3VTL6 TIR-NBS-LRR RCT1 resistance protein
Csa3M824940.1	B3VTL6 TIR-NBS-LRR RCT1 resistance protein
Csa4M015710.1	B9GZ62 Cc- <i>nbs-lrr</i> resistance protein
Csa4M015840.1	B9IP06 Nbs- <i>lrr</i> resistance protein
Csa4M015850.1	B9IP06 Nbs- <i>lrr</i> resistance protein
Csa4M016430.1	B9NBC0 Cc- <i>nbs-lrr</i> resistance protein
Csa4M638480.1	B9MVJ7 Nbs- <i>lrr</i> resistance protein
Csa5M152980.1	B9GWT3 Tir- <i>nbs</i> resistance protein
Csa5M165310.1	B9HYP1 NBS resistance protein
Csa5M165320.1	Q8LJ95 NBS-LRR resistance protein RGH1-like
Csa5M165820.1	B9GZV0 Nbs- <i>lrr</i> resistance protein
Csa5M266890.1	Q84XF9 NBS-LRR resistance protein RGH2
Csa5M484620.1	B9NFN7 Cc- <i>nbs-lrr</i> resistance protein
Csa5M495930.1	B9N9Q6 Tir- <i>nbs-lrr</i> resistance protein (Fragment)
Csa5M579560.1	C6FF80 NBS-LRR disease resistance protein
Csa5M647510.1	B9NDR6 Tir- <i>nbs-lrr</i> resistance protein
Csa5M647620.1	Q19PN4 Tir- <i>nbs-lrr</i> type disease resistance protein (Fragment)
Csa5M648130.1	B9NDR6 Tir- <i>nbs-lrr</i> resistance protein
Csa5M648640.1	B9GT00 Tir- <i>nbs-lrr</i> resistance protein
Csa5M648650.1	B9NDR6 Tir- <i>nbs-lrr</i> resistance protein
Csa6M375730.1	Q84XG0 NBS-LRR resistance protein RGH1
Csa6M490170.1	B9HE76 Cc- <i>nbs-lrr</i> resistance protein
Csa7M073380.1	C4TPD9 Putative uncharacterized protein NbSS52
Csa7M239020.1	B9H475 Cc- <i>nbs-lrr</i> resistance protein
Csa7M239020.2	B9H475 Cc- <i>nbs-lrr</i> resistance protein
Csa7M420890.1	B9HBI8 Nbs- <i>lrr</i> resistance protein
Csa7M425900.1	Q84XG0 NBS-LRR resistance protein RGH1
Csa7M425930.1	Q84XF9 NBS-LRR resistance protein RGH2
Csa7M425940.1	Q94J89 Putative NBS-LRR type resistance protein
Csa7M426510.1	Q84XG0 NBS-LRR resistance protein RGH1
Csa7M426520.1	Q2L359 Putative CC-NBS-LRR resistance protein
Csa7M426530.1	B9MYE0 Cc- <i>nbs-lrr</i> resistance protein

- 67 개의 NBS-LRR 유전자들의 염색체 상의 위치를 확인한 결과 그림 30처럼 나타났고, 특이한 점은 2 번 염색체의 1-2 Mb 부근에 NBS-LRR cluster 가 분포하는 것으로 나타났다.

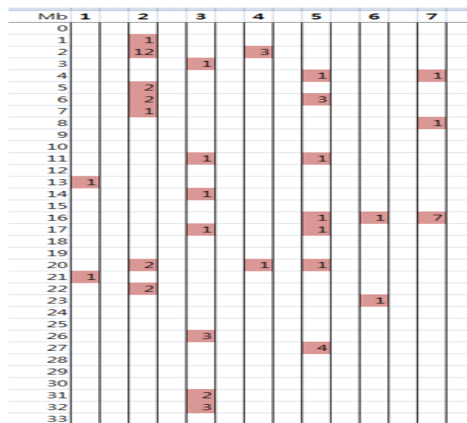


그림 30. 오이 NBS-LRR 유전자의 유전체 상의 위치

- 몬산토의 특허 데이터를 분석해보면 오이 2번, 4번, 5번 염색체 상에 노균병 저항성 QTL 이 존재하는 것으로 알려져 있고, 다른 mapping 연구 결과도 비슷한 결과를 보였다. 따라서 2번, 4번, 5번 염색체에 존재하는 NBS-LRR 타입의 유전자들이 노균병 저항성에 관여할 것이 클 것으로 판단되어서 염색체 2번, 4번, 5번 에 위치하는 38 개의 NBS-LRR 유전자에 대해서 오이 노균병 저항성과 이병성 개체 서열을 비교하였다. 결과 10개의 NBS-LRR 유전자가 노균병 이병성과 저항성간에 서열 차이를 보였다 (표 28).

표 28. 오이 2번, 4번, 5번 염색체 상의 다형성을 보이는 NBS 유전자 리스트

염색체	유전자	염색체 위치
2	Csa2M008000.1	1354160..1355840
2	Csa2M075330.1	1957620..1958660
2	Csa2M433370.1	22683340..22688680
2	Csa2M020940.1	2499980..2505240
2	Csa2M012670.1	2203360..2207200
5	Csa5M647510.1	27414850..27420430
5	Csa5M647580.1	27440540..27449720
5	Csa5M647620.1	27466480..27473250
5	Csa5M648130.1	27478160..27480930
5	Csa5M648650.1	27491800..27494660

- 이들 10 개의 NBS-LRR 유전자를 증폭할 프라이머 조합을 작성하여 오이 노균병 이병성 개체와 저항성 개체에서 분리된 DNA를 template를 이용해서 PCR 반응을 실시한 후 아래와 같은 결과를 확보하였다 (그림 31)

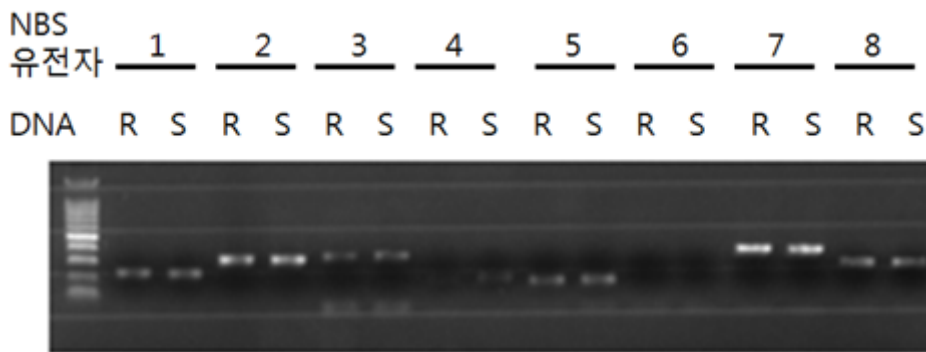


그림 31. 다형성을 보이는 NBS-LRR 유전자 PCR증폭 사진

- 이렇게 증폭된 PCR 산물을 대상을 적절한 제한 효소를 처리하여 다형성을 검출하는 CAPS 마커로 전환을 추진하였다. 따라서 이들 유전자에 해당하는 노균병 저항성과 이병성 서열 간에 적용되는 제한 효소의 차이를 분석하였다. 이러한 restriction enzyme mapping을 실시한 결과 아래의 결과를 얻었다 (표 29, 그림 32).

표 24. NBS-LRR 유전자의 CAPS 마커 전환을 위한 제한 효소

번호	유전자 이름	프라이머 조합	제한효소
1	Csa5M647510.1	Chr5_27414850_1_L / Chr5_27414850_1_R	AvAII
2	Csa5M647580.1	Chr5_27440540_2_L / Chr5_27440540_2_R	ApoI
3	Csa5M647620.1	Chr5_27466480_4_L / Chr5_27466480_4_R	MboI
4	Csa5M648130.1	Chr5_27478160_2_L / Chr5_27478160_2_R	MboI
5	Csa5M648650.1	Chr2_1354160_1_R / Chr2_1354160_1_R	MboI
6	Csa2M008000.1	Chr2_1354160_3_L / Chr2_1354160_3_R	Tsp45I
7	Csa2M075330.1	Chr2_1957620_1_L / Chr2_1957620_1_R	AvAII
8	Csa2M020940.1	Chr2_22683340_2_R / Chr2_2499980_1_R	XcmI
9	Csa2M012670.1	Chr2_2203360_1_R / Chr2_2203360_1_L	AvAII

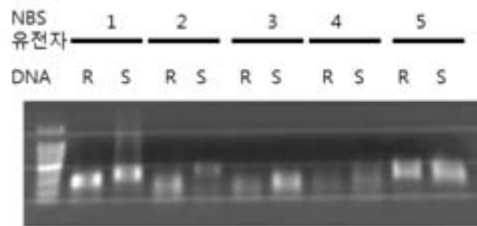


그림 32. 제한효소를 처리한 후 노균병 저항성과 이병성 간에 다형성 검출 결과

- 이렇게 변환된 CAPS 마커 중에서 오이 노균병 저항성과의 연관 정도를 확인하기 위해서, 오이 노균병 저항성 개체 (10 개체)와 이병성 개체 (8 개체) 에서 DNA를 분리하였다. 이렇게 분리된 DNA를 Template 로 하고 적절한 프라이머 조합을 이용해서 PCR reaction 반응을 실시한 후에 적절한 제한 효소를 적용한 후 아가로스 겔에 전기영동을 하여 밴드 패턴에 의한 genotyping 분석을 한 후 이들의 실제 표현형 (저항성, 이병성 여부)과 비교 분석하였다 (그림 33).

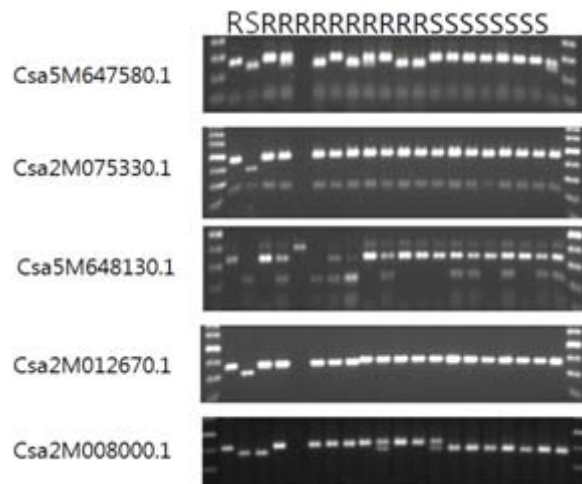


그림 33. NBS-LRR 유전자 유래 CAPS 마커의 genotype-phenotype 비교

- 여러 가지 다양한 CAPS 마커 중에서 위의 그림에서 보는 것처럼, Csa2M008000.1에서 유래한 CAPS 마커에서만 유전형 (genotype) 과 표현형 (phenotype) 이 상당히 일치한다는 결과를 보여주었다. 특히 CAPS마커 Csa2M008000.1 는 저항성 개체에서는 표현형과 이병성이 불일치하는 몇 가지 case를 보여 주지만, 이병성 표현형을 보이는 개체

에서는 genotype 과 일치하는 결과를 보였다.

○ CAPS 마커의 육종 현장 적용

- 팜한농에서 제공한 200 개체에 대해 DNA를 추출하여 CAPS 마커 분석을 실시하였다 (그림 34, 표 25). 제공된 육성 계통에 대해서는 사전 정보를 제공하지 않는 맹검법 (blind test) 을 적용하였다.



그림 34. CAPS 마커를 이용한 육종 개체 노균병 저항성/이병성 검정

표 25. CAPS 마커를 이용한 육종 개체 노균병 검정표.

연번	개체번호	유전형	연번	개체번호	유전형	연번	개체번호	유전형
1	Z31320-1		41	Z31320-41	r/r	81	Z31320-81	
2	Z31320-2		42	Z31320-42		82	Z31320-82	
3	Z31320-3		43	Z31320-43		83	Z31320-83	r/r
4	Z31320-4		44	Z31320-44		84	Z31320-84	
5	Z31320-5		45	Z31320-45		85	Z31320-85	
6	Z31320-6		46	Z31320-46		86	Z31320-86	
7	Z31320-7		47	Z31320-47		87	Z31320-87	
8	Z31320-8		48	Z31320-48		88	Z31320-88	
9	Z31320-9		49	Z31320-49		89	Z31320-89	
10	Z31320-10		50	Z31320-50		90	Z31320-90	
11	Z31320-11		51	Z31320-51		91	Z31320-91	
12	Z31320-12		52	Z31320-52		92	Z31320-92	
13	Z31320-13		53	Z31320-53		93	Z31320-93	
14	Z31320-14		54	Z31320-54		94	Z31320-94	
15	Z31320-15	r/r	55	Z31320-55		95	Z31320-95	r/r
16	Z31320-16		56	Z31320-56		96	Z31320-96	
17	Z31320-17		57	Z31320-57		97	Z31320-97	
18	Z31320-18		58	Z31320-58		98	Z31320-98	
19	Z31320-19		59	Z31320-59		99	Z31320-99	
20	Z31320-20		60	Z31320-60	r/r	100	Z31320-100	
21	Z31320-21		61	Z31320-61		101	Z31320-101	
22	Z31320-22		62	Z31320-62		102	Z31320-102	
23	Z31320-23		63	Z31320-63		103	Z31320-103	
24	Z31320-24		64	Z31320-64		104	Z31320-104	
25	Z31320-25		65	Z31320-65		105	Z31320-105	
26	Z31320-26		66	Z31320-66		106	Z31320-106	
27	Z31320-27		67	Z31320-67		107	Z31320-107	
28	Z31320-28		68	Z31320-68		108	Z31320-108	

29	Z31320-29		69	Z31320-69		109	Z31320-109	
30	Z31320-30		70	Z31320-70		110	Z31320-110	
31	Z31320-31		71	Z31320-71		111	Z31320-111	
32	Z31320-32	r/r	72	Z31320-72	r/r	112	Z31320-112	
33	Z31320-33		73	Z31320-73		113	Z31320-113	
34	Z31320-34		74	Z31320-74		114	Z31320-114	
35	Z31320-35		75	Z31320-75		115	Z31320-115	
36	Z31320-36		76	Z31320-76		116	Z31320-116	r/r
37	Z31320-37		77	Z31320-77		117	Z31320-117	
38	Z31320-38		78	Z31320-78		118	Z31320-118	
39	Z31320-39		79	Z31320-79		119	Z31320-119	
40	Z31320-40		80	Z31320-80		120	Z31320-120	
121	Z31320-121		148	Z31320-148		175	Z31320-175	
122	Z31320-122		149	Z31320-149		176	Z31320-176	
123	Z31320-123		150	Z31320-150		177	Z31320-177	
124	Z31320-124	r/r	151	Z31320-151	r/r	178	Z31320-178	
125	Z31320-125		152	Z31320-152		179	Z31320-179	
126	Z31320-126		153	Z31320-153		180	Z31320-180	
127	Z31320-127		154	Z31320-154		181	Z31320-181	
128	Z31320-128		155	Z31320-155		182	Z31320-182	
129	Z31320-129		156	Z31320-156		183	Z31320-183	
130	Z31320-130		157	Z31320-157		184	Z31320-184	
131	Z31320-131		158	Z31320-158		185	Z31320-185	r/r
132	Z31320-132		159	Z31320-159		186	Z31320-186	
133	Z31320-133	r/r	160	Z31320-160		187	Z31320-187	
134	Z31320-134		161	Z31320-161		188	Z31320-188	
135	Z31320-135		162	Z31320-162		189	Z31320-189	
136	Z31320-136		163	Z31320-163	r/r	190	Z31320-190	
137	Z31320-137		164	Z31320-164		191	Z31320-191	
138	Z31320-138		165	Z31320-165		192	Z31320-192	
139	Z31320-139		166	Z31320-166		193	Z31320-193	
140	Z31320-140		167	Z31320-167		194	Z31320-194	
141	Z31320-141		168	Z31320-168		195	Z31320-195	
142	Z31320-142		169	Z31320-169		196	Z31320-196	
143	Z31320-143	R/R	170	Z31320-170		197	Z31320-197	
144	Z31320-144		171	Z31320-171		198	Z31320-198	R/R
145	Z31320-145		172	Z31320-172		199	Z31320-199	
146	Z31320-146		173	Z31320-173		200	Z31320-200	
147	Z31320-147		174	Z31320-174				

- CPAS 마커 분석에 의해 노균병 저항성 (r/r) 자원이 선발되었고, 이를 유묘 검정 결과와 비교하면 약 50% 정도 일치하는 결과를 보였다.
- 이러한 결과는 실제 병 접종 없이도 위의 CAPS 마커를 이용해서 이병성 개체를 선발해서 포장에서 제거할 가능성을 보여 주고 있다. 물론 약간의 저항성 개체가 없어질 가능성은 현재 상존하지만, 현재 마커를 가지고 포장에서 이병성 개체 제거용 마커로 활용할 여지는 충분한 것으로 판단된다.
- 이러한 연구 결과를 바탕으로 특허 출원 및 등록을 실시하였다.

특허명: 오이 노균병 저항성 개체 선별용 분자 마커 및 이를 이용한 선별방법

등록번호: 1014900130000

등록일: 2015.01.29

- 제한효소 처리를 해야 하는 CAPS 마커의 단점을 보완해서 사용자 편의성을 늘릴 목적으로 SNP 마커 개발을 추진하였다.
- 이병성 선발용 CAPS 마커는 Csa2M008000.1 유전자에서 유래 하였고, 저항성에서 코딩하는 단백질보다 truncated 된 형태의 길이가 줄어든 단백질을 코딩하는 현상이 이병성 개체에서 발견되고, 이와 더불어서 몇 개의 SNP 이 발견된다.
- 아래 서열은 노균병 저항성과 이병성 개체의 Csa2M008000.1 유전자 영역에서 염기서열이 온전히 보존된 영역이다(붉은색으로 * 표시가 된 서열은 이병성과 저항성 개체 간에 서열의 차이를 보이는 부분이다). 따라서 이러한 SNP 부분을 포함하면서 150 bp 이하의 PCR 산물을 생산할 주위의 flanking sequence에서 SNP 마커용 프라이머(밑줄친 부분)를 아래처럼 디자인 하였다.

```
ATGGGTGACCTACTGACTTTTGGTGTGCAAGAACTTTGAAGCAGGCTGTAACCTCTGTAGCCAAAAAATTATTGCGT
CAAGTGAATTTAAGGTGGTGCTAGAAGAGCTG*AAAGATGATCTACTTCATGCTGAATGGATCCTCCATGCCATAAAAA
CAAAGCATGATCATTCACTCAATGACAAAATAACTCATTGGGTGAATGATCTTCAACTTA*TTGTTTATGAAGCTGAGG
ATATGTTAGACTTGTTTGCTTATGACGATGTTGAACGAAAAATAAGATCAAACAAGGTTGAAGAGACAACTTCACTGC
TTGAAAATTATGTGGTGGGAAGGGAGATGGAAGTTGAAAGCATAGTTCAAGATGTGAC*TGAGGCTAGTCAACAACA
ACTCAATTCTATTTTACCCGTTTATGGAACGGGTGGATCAGGAAAAACCCTTTGGCCAGTTGGTGTTTAATGACGA
GAGGATTGGAAAACAATTCATCATACTGTTTGGGTATGTGTGTCTCAACCTTTTGTTCATCAACGAGATCTTGCAGTCA
ATCTTGAAAAAGGTAAGCAAAAAGCAA T*GATAATCGTAGCAAGGATGATAAGGACACCTTAATTGCGAATCTTAAAGA
AGTGATGGGTGGAAAAGATATTTTCTTGTGCTTGACAATGTTTGGAAATGAAAACAAAAT A* TTC* TGGGAGAAGTTG
AAGGAATGCTTAATGAGTATTGTTGAAGAATTAGGAAGCAGTGTCTTGTACGACCAGGAGTCGTAAAATTGCAGAAA
TGATGAAAGAAACACTTGACACCTATCATTTAAACAAATTAAGTATGATCAATGTTGGTCAGTATTTAGCTACTTTG
CCAAGGCGAATGCAGTACCAATAACTTCCAATTTGGAGCTTGTGCGAGAAGAGGTCGTTAAAAAAATTGGTGG
```

- 상기의 프라이머를 이용하여 Roche 의 Light-cycler를 활용하여 이병성과 저항성 개체의 유전형(genotype)을 HRM 분석을 실시한 결과 개발된 SNP 마커가 유전형 분석에 적합함을 확인하였다 (그림 35).

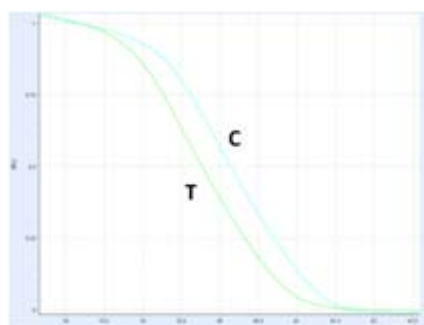


그림 35. SNP 마커를 이용한 HRM 분석 결과

- 따라서 (주)아시아종묘에서 제공한 육성 계통 28점에 대해 DNA를 추출하여 SNP 프라이머를 이용해서 HRM 분석을 실시하였다 (표 x). 제공된 육성 계통에 대해서는 사전 정보를 제공하지 않는 맹검법(blind test) 을 적용하였다.

표 26. SNP 마커를 이용한 육종 계통 노균병 검정표

계통번호	유전형	계통번호	유전형	계통번호	유전형	계통번호	유전형
1	R/R	8	R/r	15	R/R	22	R/r
2	R/R	9	R/R	16	R/R	23	R/R
3	R/R	10	R/R	17	R/R	24	R/R
4	r/r	11	R/R	18	R/r	25	r/r
5	R/R	12	R/r	19	R/R	26	R/R
6	R/r	13	R/R	20	R/R	27	R/r
7	R/R	14	R/R	21	R/R	28	R/R

- SNP 마커에 의해 증폭된 산물의 HRM 분석을 통해 이병성 유전형을 가진다고 판별된 계통에 대해 표현형 데이터와 비교하면 대부분 이병성 개체로 나타남을 알 수 있었다.
- 하지만 HRM 분석에 의해 저항성 자원으로 분류된 계통의 표현형은 이병성으로 나타난 경우도 많았다. 이는 현재 개발된 SNP가 선발하는 저항성 유전형이 실제 오이의 노균병 저항성 유도에 상당히 큰 기여하지 못함을 의미하거나, 또는 SNP 마커 개발의 시발점이 된 Csa2M008000.1 유전자가 실제 노균병 저항성 유전자와 물리적으로 상당히 원거리에 떨어진 연관 마커일 개연성도 있다.
- 따라서 추가적으로 노균병 저항성 유도에 중요한 역할을 하는 신규 QTL 영역을 추가로 발굴하는 작업과 기존의 2번 QTL 영역에서 recombinant가 발생한 recombinant 라인을 대거 선발하여 high density mapping을 실시해서 가깝게 연관된 마커를 개발할 필요가 있음을 알게 되었다

○ LOX(lipoxygenase) 유전자 서열의 다형성 검정

- NBS-LRR 유전자 이외에도 lipoxygenase (LOX) 가 병저항성에 관련되어 있다는 보고가 있다. 따라서 오이에서의 LOX 유전자와 오이 노균병과의 연관 관계를 분석하기 위해서 오이 유전체를 분석하여 42개의 LOX 유전자가 존재함을 밝히고 염색체 상의 그들의 위치를 확인하였다 (그림 36).

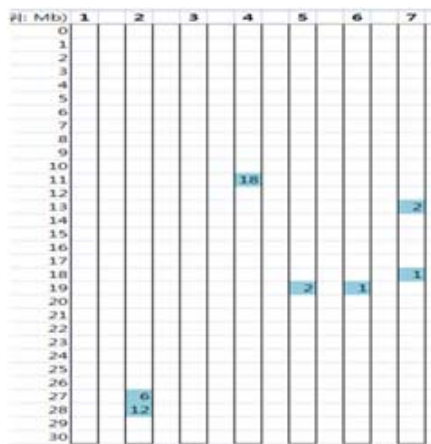


그림 36. 오이 유전체 상의 42개 LOX 유전자

- 흥미로운 점은 2 번 염색체와 4 번 염색체에 대부분의 LOX 유전자가 존재하고 이들 유전자의 염기서열을 노균병 저항성 개체와 이병성 개체에서 분석해보면 9개의 LOX 유전자가 차이를 보이는 것을 확인하였다.
- DNA 서열의 차이를 보이는 이들 9개 LOX 유전자들에 대해 아미노산 서열을 비교한 결과 아미노산 서열 차이를 보이는 유전자 4 개를 확인하였다. 즉 노균병 저항성 과 이병성 개체에서 LOX 단백질로 코딩되는 아미노산 서열에 차이가 나는 유전자가 4개 있고 이들을 활용한 마커 개발의 여지가 있으므로 이들 4개의 유전자에 대해서 프라이머 를 제작해서 실험을 진행했다.
- 염기서열 상의 차이가 많아서 dominant marker(밴드의 유무) 로 테스트 하였다. 다음 프라이머 조건 (P1; CsLOX1_S6_Left+Right, P2; CsLOX1_S7_Left+Right, P3; CsLOX2_Right+CsLOX2_S6_Left,P4; CsLOX2_Right+CsLOX2_S7_Left) 으로 PCR 반응을 하면 아래 그림 37 처럼 유전형에 특이적인 저항성과 이병성 밴드가 증폭된다.



그림 37. 저항성 과 이병성 유래 LOX 검출용 PCR 반응 이미지

<lane 1; marker, lane 2; 이병성 DNA+ 이병성 LOX 특이 프라이머 조합, lane 3; 이병성 DNA + 저항성 LOX 특이 프라이머 조합, lane 4; 저항성 DNA+ 저항성 LOX 특이 프라이머 조합, lane 5; 저항성 DNA + 이병성 LOX 특이 프라이머 조합>

- 이 결과를 바탕으로 다양한 이병성과 저항성 자원에 적용해봤는데, 아래 그림 38 처럼 저항성 밴드가 증폭된 자원과 그림 상단부에 표시된 표현형과 일치하는 빈도가 낮아서 노균병 저항성과 연관 지어서 마커 개발을 계속 추진할 근거가 희박했다.

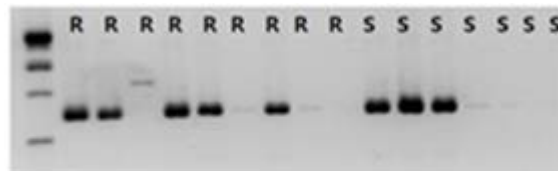


그림 38. 다양한 자원에서의 LOX 마커 검정

- NBS-LRR 유전자와는 달리 LOX 유래의 CAPS 마커는 노균병 저항성과 관련 여부가 없는 것으로 밝혀졌다.
- 문헌 조사와 위에서 언급한 candidate gene approach를 통해 얻어진 결론은 노균병 저항성 연관 QTL 영역은 2번, 4번, 5번 염색체에 위치하는 것 같고, 이러한 QTL 영역에 해당하는 영역의 노균병 저항성과 이병성 개체의 염기서열을 분석한 결과 10 여개의

NBS-LRR 과 8 개의 LOX 유전자에서 다형성 서열을 확인하였다. 그리고 이를 NBS-LRR 유전자 유래의 CAPS 마커 중에서 하나가 노균병 감수성 개체를 선발할 가능성을 보여 주고 있다 (그림 39).

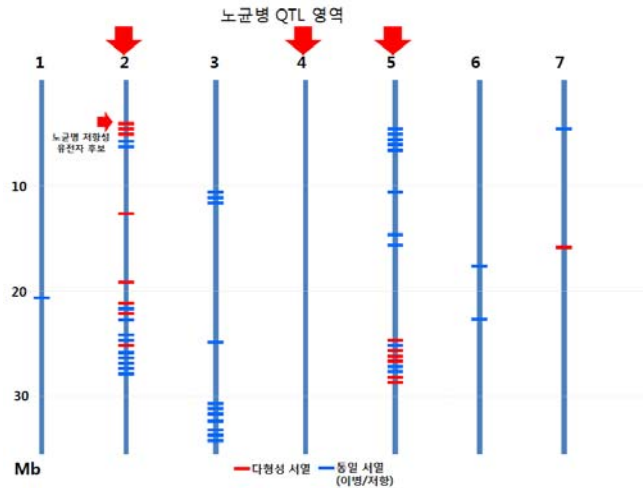


그림 39. candidate gene approach 연구 결과 요약

○ Csa2M008000.1 전장유전자 클로닝

- Csa2M008000.1 전장유전자를 노균병 저항성 개체와 이병성 개체에서 확보하기 위하여 아래와 같은 프라이머 조합을 제작하였다 (표 27).

표 27. Csa2M008000.1 전장유전자 확보를 위한 프라이머 조합.

프라이머 이름	서열	비고
FL_S7_2M008000_For	CACCATGGGTGACCTACTGACTTTTG	
FL_S7_2M008000_For2	CACCTCAAATAATGGGTGACCTACT	
FL_S7_2M008000_Rev	AGAGACTCTCAAACCTATCCCCTTGTGC	
FL_S6_2M008000_For	CACCATGGGTGACCTACTGACTTTT	
FL_S6_2M008000_For2	CACCATCCTTTGTATCCATTATCCC	
FL_S6_2M008000_Rev	ATAAGATCATGCATACGAAACTTCC	

- 상기의 프라이머 조합으로 gradient PCR을 시행하여 이병성과 저항성 개체에 존재하는 Csa2M008000.1 전장 유전자를 확보하였다 (그림 40).

S6-FL-2 PCR 결과 (annealing T는 45°C-65°C)

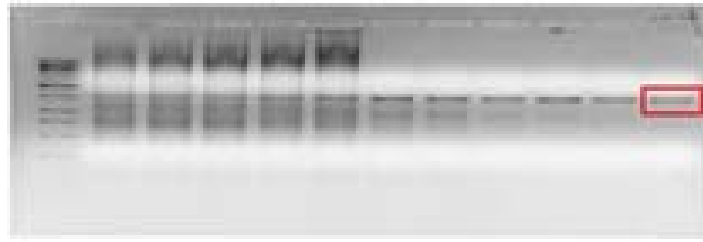


그림 40. 이병성 개체에서의 Csa2M008000.1 전장 유전자 증폭

- 이러한 과발현(over-expression) 연구 이외에도, RNAi를 이용한 knock-out 방법도 병행해 진행하였다. 이런 목적으로 아래처럼 RNAi 프라이머를 제작하였다 (표 28).

표 28. 노균병 저항성과 이병성 개체에서 Csa2M008000.1 유전자 발현을 억제할 RNAi construct 제작용 프라이머 조합.

프라이머 이름	프라이머 서열	비고
RNAi_S7_2M008000_For	CACCCAAAAGAATTAGACAACCTGCA	S6-1-1
(RNAi_S7_2M008000_Rev	CTTGTGCTTGAGAAAGACCCCTATAA	S6-1-1
RNAi_S7_2M00800_For2	CACCGTTTTGCTTACTGTTCAAATT	S6-1-2
RNAi_S7_2M00800_Rev2	CTCACAAACATTTTCTTTCCACTTT	S6-1-2
RNAi_S6_2M008000_For	CACCTATTGCTTATTTCAAGATGCT	S7-1-1
RNAi_S6_2M008000_Rev	TGTTTCAACTTAGAAATTGAGTTTGG	S7-1-1
RNAi_S6_2M00800_For2	CACCATTGTTGAAGAATTAGGAAGC	S7-1-2
RNAi_S6_2M00800_Rev2	CACCATTGTTGAAGAATTAGGAAGC	S7-1-2

- 상기의 프라이머 조합을 이용하여 PCR 반응 후 RNAi 실험용 PCR 산물을 확보해서 expression 벡터에 도입하였다 (그림 41).

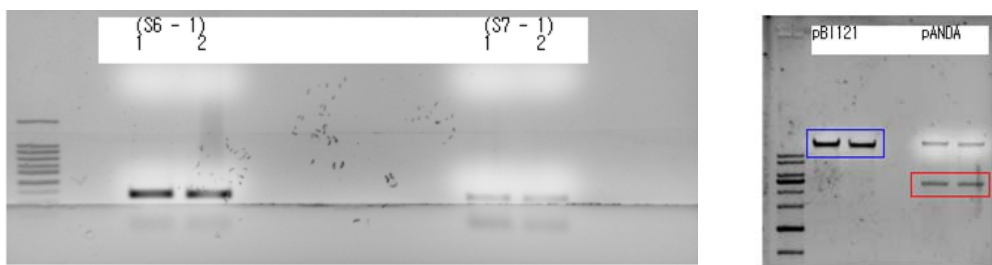


그림 41. RNAi amplicon (좌) 과 vector (우)

- 상기 construct 들을 도입한 형질전환체를 개발하여 노균병에 대한 저항성 여부를 검정하였다. 하지만 기대한 바와는 달리 Csa2M008000.1 전장 유전자가 과발현 되거나 발

현이 줄어들더라도 노균병 저항성에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

8-2. 다형성 마커 개발 및 유전자 지도 작성

○ 오이 노균병 저항성 개체와 이병성 개체의 유전체 서열 분석

- 노균병 저항성 마커 개발을 위한 QTL mapping을 하기 위해서 제일 선행되어야 할 것이 노균병 저항성과 이병성 개체 간의 다형성(염기서열의 차이)을 보이는 분자마커 후보이고 이러한 다형성 마커를 이용하여 매핑 집단에 매핑해서 유전자 지도를 확보하는 작업이다.
- 노균병 이병성과 저항성 개체 간에 다형성을 보이는 분자마커를 선별하기 위해서 노균병에 대해서 저항성 보이는 개체와 이병성을 보이는 개체를 대상으로 전체 유전체 염기서열 분석 작업을 실시하였다. 오이 전체 유전체 크기의 30-40 배에 해당하는 전체 12.8 Gb 의 오이 유전체 서열을 최종 확보하였다.
- 이병성 오이 개체에서 6.3 Gb 서열을 확보하였고, 저항성 오이 개체에서 6.5 Gb 염기서열을 확보하였다. 오이 표준 유전체 정보인 chinese ling 9930 서열을 표준(reference) 으로 하여 표준 서열에 sequencing 한 서열을 매핑해서 assembly 하는 reference mapping 이란 방법을 CLC genome workbench 란 소프트웨어를 이용하여 실시하였다. Assembly 결과는 아래 그림 42 처럼, 오이 표준 유전체에 바탕을 둔 7개 염색체에 해당하는 오이 노균병 저항성 식물과 이병성 식물 유래의 pseudomolecule 서열을 확보하였다.

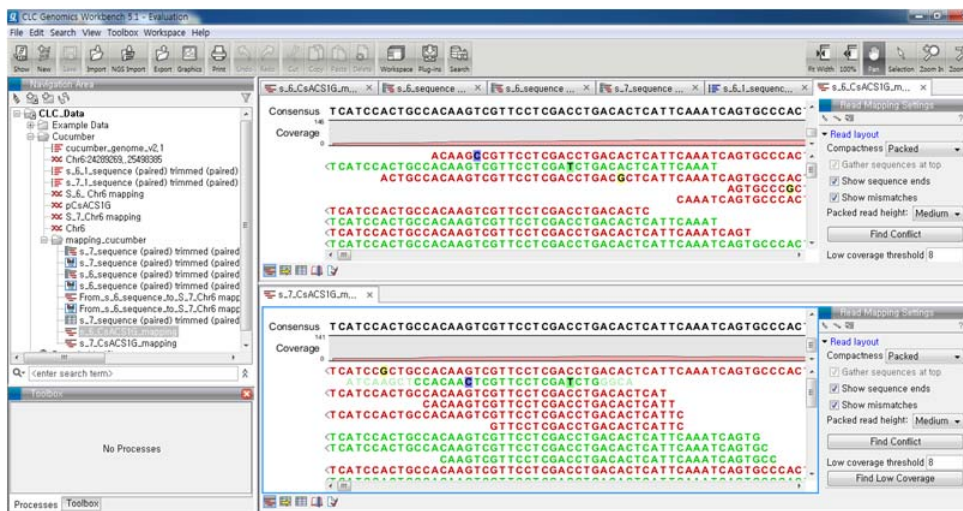


그림 42. 오이 reference mapping을 통한 염색체별 pseudomolecule 서열

- 상기의 유전체 염기서열 정보는 노균병 저항성 연관 분자마커 개발에 필요한 다형성 마커 정보 뿐 만 아니라, 추후 노균병 저항성 QTL cloning을 위해서 필요한 고밀도 유전자지도 작성용으로 본 염기 서열 정보가 필수적이고 유용하게 활용될 정보이다. 특히 노

균병 저항성 연관마커 개발에 필요한 실제적인 실험을 하기 이전에 유전체 정보에서 false positive 정보를 제거할 수 있으므로, 마커 개발에 걸리는 시간과 비용을 최소화할 중요한 수단으로 본 연구 결과가 활용될 것으로 생각된다.

○ 유전체 기반 SSR 마커 확보

- 중국에서 오이 표준 유전체 서열 정보를 분석하여 약 20,000 여개 이상의 SSR (simple sequence repeat) 마커를 발표하였다. 그리고 이들 중에서 중국의 육종 계통들 간에 다형성이 많이 관찰되는 900 여개의 SSR 마커 정보를 발표하였다.
- 오이 노균병 저항성과 이병성 개체의 서열과 이들 900 여개의 SSR 마커 서열을 분석하여 이병성과 저항성 개체 간에 다형성을 보이는 220 여개의 SSR 마커를 확보하였다.
- 하지만 이러한 다형성 정보가 노균병 저항성과 이병성 간의 유전체 서열상의 차이에 의해 발생한 것인지 염기서열 분석에서 흔히 발생하는 sequencing error 인지를 확인할 필요가 있었다. 실제 SSR 이 포함된 영역을 증폭할 프라이머를 제작하여 실제 젤 상에서 전기영동을 실시하여 다형성을 관찰하는 후속 작업을 진행하였다.
- 이들 220 여개의 SSR 영역을 포함하는 좌, 우 프라이머를 제작, 구매하여, PCR reaction (95도 denature, 60도 annealing, 74도 extension, 35 cycle) 을 오이 이병성과 저항성 개체에서 분리한 DNA를 template로 해서 실시했다. PCR 반응을 통해 증폭된 PCR 산물을 먼저 아가로스 젤 상에서 전기영동해서 repeat length 차이에 의해 밴드 패턴이 아가로스 젤에서 분리되는지 여부를 확인하였다.
- 확인 결과 유전체 정보 분석에 의해 노균병 저항성과 이병성에서 다형성을 보이는 SSR 마커의 대부분이 아래 이미지에서 보이는 것처럼 아가로스 젤 상에는 차이를 발견하기 힘들다는 것을 알 수 있었다 (그림 43)

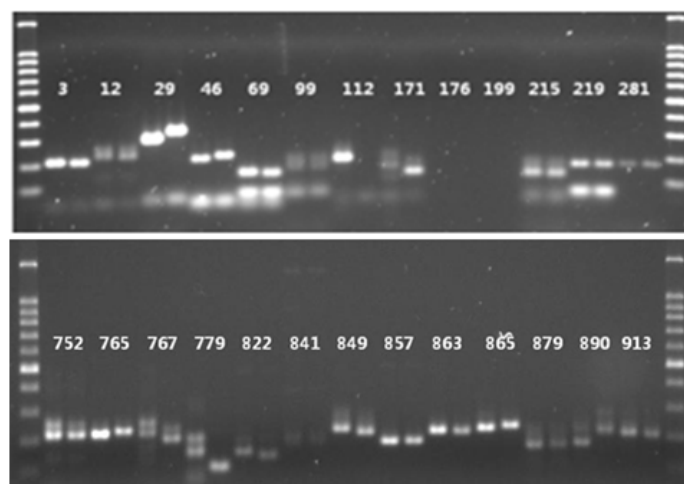


그림 43. 노균병 이병성/저항성 개체간에 다형성을 보이는 SSR 마커를 대상으로 아가로스 젤 상에서 전기영동 후 다형성 밴드패턴 결과 이미지

- 아가로스 젤에서 검정이 어려운 SSR 마커 유래의 PCR 산물을 분석할 수 있는 아크릴아

마이드 젤(대개 4bp 이상의 차이 detect)를 상에서 다형성을 확인하였다.

- 아가로스 젤과 아크릴아마이드 젤을 통해서 약 200 여개의 SSR 마커가 노균병 저항성과 이병성 개체 간에 다형성을 보인다는 사실을 최종 확인하였고, 이를 중국에서 발표한 오이 physical map (염색체 지도) 상에 mapping 하였다. mapping 결과 오이 전체 유전체를 충분히 커버할 수준의 다형성 SSR 마커가 확보되었다. physical map 상의 위치를 오이 유전자 지도와 비교 분석 해보면 아래의 mapping 결과처럼 몇 몇 영역을 제외하고는 대부분의 SSR 마커가 5 cM 이내에 위치하며, 전체 유전체를 비교적 균일하게 커버하고 있다는 것을 알 수 있었다 (그림 44).

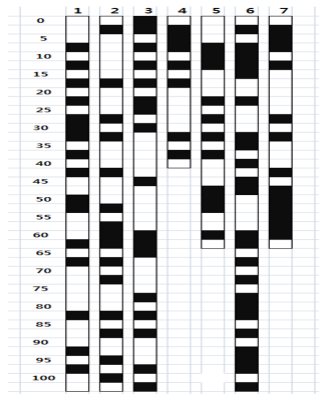


그림 44. 오이 SSR 마커에 대한 유전자 지도 상의 위치 확인

- 아래 그림에서 보는 것처럼 다형성 마커들이 오이 염색체 7개에 골고루 분포하는 것으로 확인되었고, 중국 연구진에 의해서 발표된 노균병 저항성 QTL 영역 (보라색과 녹색으로 나타난 염색체 1번, 5번, 6번), 미국 몬산토에 의해 발표된 노균병 저항성 QTL 영역 (붉은색으로 나타난 염색체 1번, 2번, 6번) 과 SSR 다형성 마커들이 중첩되는 걸 (그림 45) 로 봐서 SSR다형성 마커를 F₂ mapping 집단에 적용한다면 노균병 저항성에 관여하는 QTL 영역 개략적으로나마 확인 할 수 있을 것으로 기대하고 일을 진행하였다

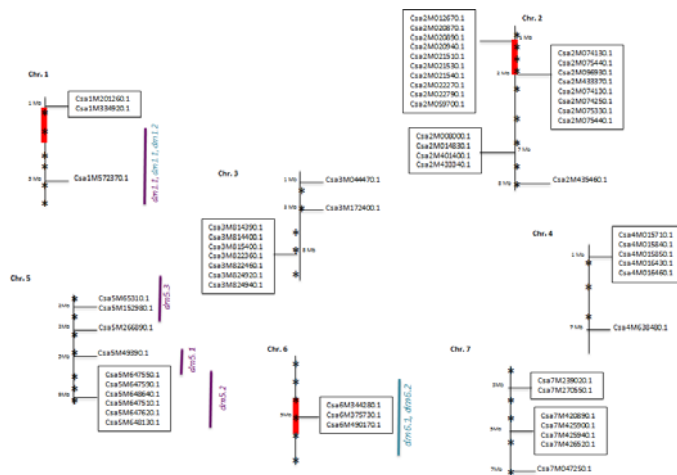


그림 45. SSR마커와 NBS-SSR 유전자를 이용한 오이 유전자 지도

<염색체 1, 2, 6번의 붉은 색 바는 몬산토가 주장하는 노균병 저항성 QTL 영역이고, 중국 연구진이 발표한 염색체 1, 5, 6번의 노균병 저항성 QTL 영역은 보라색과 하늘색 막대로 표시 . 염색체 옆의 박스 표시는 병저항성 유전자로 알려진 NBS-LRR 유전자의 위치 표시이고, 각 염색체 상의 * 표시는 노균병 저항성과 이병성 간에 다형성을 보이는 SSR 마커의 위치를 나타냄>

○ 유전자 유래의 다형성 SSR (EST-SSR) 마커 확보

- 1차년도에 SSR 마커를 대상으로 노균병 저항성/이병성 개체 간의 다형성 마커 pool을 확보한 상태이지만, QTL 분석을 위해서는 보다 많은 다형성 marker pool 이 필요할 뿐만 아니라, 유전자 자체에서 유래한 유전자 마커 (기능성 마커)를 개발하면 마커 선발의 정확도를 높일 수 있으므로 유전자의 coding 영역에서 다형성을 보이는 마커를 개발하였다.
- 1차 년도에 확보한 노균병 저항성 유전자와 이병성 개체의 유전체 염기서열을 기반으로 해서 FGENESH program을 사용하여 오이 유전체와 염기서열이 제일 유사한 Medicago의 Gene Model을 활용해서 ORF 로 coding 되는 영역을 확보한다. 결과로 약 25,000 개의 유전자가 존재 하는 것으로 밝혀졌다.
- 그리고 박과작물 유전체 정보 데이터베이스인 ICUGI (<http://www.icugi.org/cgi-bin/ICuGI/index.cgi>) 에서 발표한 유전자 정보와 자체적으로 분석한 유전자 정보를 통합하여 최종적으로 약 26,000 유전자 서열을 확보하였다.
- SSR 영역을 찾아주는 SSRIT (<http://www.gramene.org/db/markers/ssrtool>) 에 상기 서열을 입력하여 repeat을 가진 유전자를 선발한 결과, 최종 4,158 개의 유전자에서 유래한 EST-SSR 서열을 확보하였다 (표29).

표 29. 오이 EST-SSR 의 염색체상의 위치와 EST-SRR 의 다형성 분석

염색체	No. of EST -SSR	No. of 다형성을 보이는 EST-sSR
1	495	105
2	428	95
3	725	116
4	418	74
5	463	84
6	629	107
7	347	76

- 4,158 개의 EST-SSR 서열에 해당하는 노균병 저항성 과 이병성 개체 서열을 오이 유전체 서열에서 분리하여 이병체 개체에서 나온 서열과 저항성개체에서 나온 서열 을 비교하여 repeat length에서 차이를 보이는 서열 657 개를 확보하였다 (그림 46).

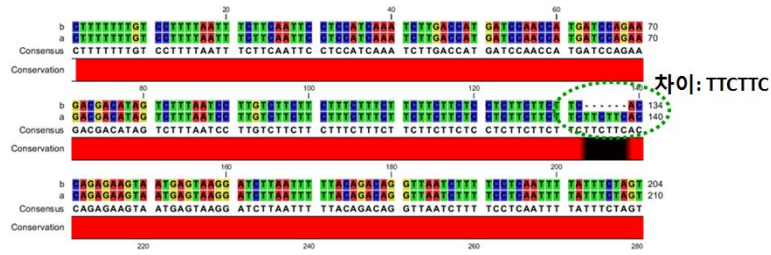


그림 46. 노균병 이병성에서 TTC 2 반복 서열이 deletion 된

- 657개의 EST-SSR 서열에 대해 repeat 영역을 flanking 하면서 PCR 증폭 산물의 크기가 100-300 bp 이고, PCR 반응시 annealing 온도가 60도 내외 (총 변동 1도 이내) 인 프라이머를 primer 3 라는 소프트웨어를 이용하여 디자인하였다 (그림 47).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	unigene ID	SSR no.	SSR motif	size	start	end	forward	Tm	size	reverse	Tm	size	product size	start
3	CU100016	1	(GA)23	46	758	803	GGGATGAGAAACCGAGTCTTC	59.957	20	TTGCCACGTAACCTTATCC	59.823	20	244	631
4	CU100024	1	(AG)6	12	366	377	CCAAACCTTCAAATTC	59.91	20	ACGGATTGTCAAAGGAC	59.978	20	149	276
5	CU100036	1	(CT)8	24	91	114	AGCTCTCAACACGAGGGA	59.989	20	GGATGCTTTGAAGGCAACAT	60.081	20	153	47
6	CU100082	1	(CT)5	15	691	705								
7	CU100101	1	(GAT)5	15	246	260	ACCTGGCCCTGATTTCTTT	59.94	20	CGTGTCTCATTGTGAGCGT	59.905	20	131	169
8	CU100102	1	(CT)5	15	133	147	CATCGATTTCTGGGCTGT	60.074	20	CAGCTTCAACAGGTGTTCA	59.873	20	237	92
9	CU100123	1	(ATC)5	15	231	245	CGTGTCTCATTGTGAGCGT	59.905	20	CAACCTGGTCCCGTATTT	59.711	20	135	192
10	CU100131	1	(TA)7	14	113	126	AAAAAGCACTACAACCGTATTTT	58.764	25	GGTTTTAAAGACCATATTTCCAA	57.702	24	118	48
11	CU100132	1	(AAG)8	24	330	353	TAGCGGAAGAGGCTACAAA	59.975	20	GGACCAGGAAACAAAACAGA	60.934	20	145	239
12	CU100138	1	(AC)6	12	204	215	GGGGCTGTTGAAGAATGA	60.051	20	AATCCCGAGGAGAGAGAG	59.846	20	176	110
13	CU100141	1	(AAG)7	21	1389	1409								
14	CU100145	1	(GAT)5	15	150	164	ACCTGGCCCTGATTTCTTT	59.94	20	TCGTGTCTCATTGTGAGC	59.837	20	134	74
15	CU100165	1	(GA)9aatata	48	626	671	GGAGCCTCAATGGCAAG	59.836	20	CGGGAAATGAATGAATCAA	59.264	19	199	502
16	CU100173	1	(TCC)5	15	117	131	TAATTTCCCATCCGGCATA	60.11	20	CCACGAAAGGAGAGCCAA	59.982	20	192	19
17	CU100180	1	(CT)8	24	134	157	TGGAATTTGATGAGGAG	59.884	20	AACATCTCCAGTGAGACGCA	59.42	20	232	13
18	CU100185	1	(CT)12	24	206	229	CTCATTTTCCATTCGCGCA	60.031	20	ACGGTGAATTCCTCGTATC	60.12	20	216	152
19	CU100188	1	(TCC)6	18	193	210	ACTTTGGTGAAGAGTCCCGT	59.789	20	CTCCAGTTTGTGCGTGAACA	60.025	20	195	62
20	CU100193	1	(GAT)5	15	216	230	ACCTGGCCCTGATTTCTTT	59.94	20	TAAGTCAAGCACCACCACA	60.152	20	262	140
21	CU100199	1	(AC)6	12	181	192	ATTGGGAAATGACTATAAATAA	57.293	25	ATTGGCACATCTTTTCCAG	59.933	20	246	81
22	CU100202	1	(TA)7	14	948	961	GCAACATGGTGCAATAATG	59.816	20	CTCCCTTTGGAGGGGCTAC	60.204	20	277	752
23	CU100204	1	(CT)8	16	157	172	TGCGAAACCTCAAGCTGA	59.729	20	TATTGTGCAGTCCAATCC	60.723	20	202	3
24	CU100208	1	(ATA)6	18	298	315	AGCACACCAACAAACCTCA	59.187	20	GATATTGTGTGCCAGGGGG	60.074	20	269	177
25	CU100209	1	(GAA)8	24	99	122	TTCTGTTGATCCAGTCTCA	60.39	20	GGAGTCCGATCAATGAGAT	60.042	20	257	43
26	CU100221	1	(TGA)5	15	622	636	GGAGGAGGATCAAGACGATG	59.612	20	CGGGGAAACAAGTACATA	59.953	20	261	598
27	CU100236	1	(GTG)6	18	27	44								
28	CU100237	1	(CT)7	14	133	146	GCCCTTTTCTCTCATCCTC	60.154	20	GCCCAACGATATCTCTA	60.059	20	265	79
29	CU100241	1	(AAG)5	15	804	818	CGTAATTTTCTACGGCGGA	60.089	20	SCGACATTATGGCTACAAA	59.894	20	166	777
30	CU100250	1	(AC)6	12	129	139	CAAAATCAATCACCATCCC	59.991	20	ACTCGCAGCTCATTGACT	60.02	20	278	79
31	CU100256	1	(GAA)8agaag	82	14	95								

그림 47. 657 EST-SSR 에 대한 프라이머 및 PCR 조건

○ SNP기반 다형성 마커 선발

- 고밀도 mapping을 위해서는 노균병 저항성 연관 QTL 영역 부분에서 recombination이 발생한 F₂ 매핑 개체를 이용해서 고밀도(high density) mapping 작업을 진행해야 한다.
- 따라서 전체 유전체 영역에서 균등하게 분포하면서 최대한 많은 숫자의 다형성을 보이는 마커를 개발해야 하는데, 이러한 목적에 부합하는 마커는 SNP 마커 뿐이므로 본 과제에서 SNP 마커를 선발하였다.
- 오이 노균병 저항성과 이병성 개체에서 확보한 유전체 서열 정보를 Geneie 라는 서열 분석 소프트웨어에 import 해서 (분석시 사용한 파라미터 --> coverage: at least 20 reads, quality equal more than 30, frequency: at least 95% of the reads were different from both sequences) SNP 마커를 선발하여 총 69,659 SNP 마커를 확보하

였다 (표 30, 그림 48).

표 30. 오이 SNP 마커 숫자와 해당 염색체 번호

염색체	No. of SNP	염색체	No. of SNP
1	8,595	5	9,580
2	14,488	6	8,351
3	10,988	7	9,163
4	8,504		

#	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Name	Minimum	Maximum	Length	Change	Coverage	Polymorphism Type	Variant Frequency		
2	T	23,174,373	23,174,373	23,174,521	1 G -> T	8,970	SNP (transversion)	96.20%		
3	G	23,174,362	23,174,362	23,174,373	1 A -> G	16,834	SNP (transition)	96.80%		
4	T	23,174,334	23,174,334	23,174,362	1 G -> T	10,924	SNP (transversion)	98.10%		
5	C	23,174,307	23,174,307	23,174,334	1 A -> C	19,290	SNP (transversion)	98.70%		
6	C	23,173,947	23,173,947	23,174,307	1 A -> C	54,247	SNP (transversion)	97.50%		
7	T	23,173,853	23,173,853	23,173,947	1 C -> T	99,896	SNP (transition)	97.20%		
8	C	23,173,355	23,173,355	23,173,593	1 G -> C	94,924	SNP (transversion)	97.80%		
9	C	23,173,184	23,173,184	23,173,355	1 A -> C	127,534	SNP (transversion)	97.40%		
10	C	23,173,184	23,173,184	23,173,184	1 A -> C	100,369	SNP (transversion)	97.30%		
11	T	23,173,030	23,173,030	23,173,184	1 G -> T	38,362	SNP (transversion)	95.60%		
12	T	23,166,828	23,166,828	23,173,030	1 C -> T	726	SNP (transition)	96.80%		
13	T	23,165,302	23,165,302	23,166,828	1 G -> T	133	SNP (transversion)	85.70%		
14	G	23,165,299	23,165,299	23,165,302	1 C -> G	240	SNP (transversion)	87.10%		
15	G	23,165,290	23,165,290	23,165,299	1 C -> G	297	SNP (transversion)	90.60%		
16	A	23,165,288	23,165,288	23,165,290	1 G -> A	732	SNP (transition)	96.40%		
17	T	23,165,280	23,165,280	23,165,288	1 C -> T	902	SNP (transition)	95.70%		
18	T	23,165,278	23,165,278	23,165,280	1 A -> T	1,274	SNP (transversion)	96.90%		
19	G	23,165,272	23,165,272	23,165,278	1 C -> G	1,501	SNP (transversion)	98.10%		
20	A	23,165,269	23,165,269	23,165,272	1 C -> A	1,331	SNP (transversion)	97.80%		
21	C	23,165,255	23,165,255	23,165,269	1 G -> C	1,833	SNP (transversion)	98.60%		
22	C	23,165,253	23,165,253	23,165,255	1 T -> C	2,260	SNP (transition)	98.30%		

그림 48. 오이 SNP 마커 엑셀 데이터베이스 이미지

- 확보된 SNP중 일부를 선발해서 primer를 제작한 후 HRM 분석을 실시하였으며, 분석 결과 SNP 마커를 활용한 유전형(genotyping) 분석이 가능함을 확인하였다. (그림 49).



그림 49. HRM 분석에 의한 노균병 저항성과 이병성 개체 간의 SNP 차이 검색

<HRM 분석에 의한 SNP (A-->G transition) 검출 이미지이고 조건은 150bp PCR 산물 생산을 위한 프라이머 조합 제작, 95oC (denature), 60oC(annealing), 74oC(extension) 35 cycle 로 PCR 반응 실시. 이후 default parameter에서 normalization 후 HRM분석 실시. 그림 3의 2번째 row 데이터임>

- 상기의 프라이머를 이용해서 노균병에 대해 다양한 유전형 (RR, rr, Rr)을 가진 자원을 대상으로 HRM 분석을 적용한 결과 유전형에 따라 자원이 그룹핑 되는 결과를 보았고, 이는 HRM을 이용해서 SNP 마커로 genotyping 이 가능하고, SNP 마커를 이용해서 고밀도 QTL mapping을 실시할 것이다.

8-3. 오이 노균병 저항성 QTL 분석

○ 노균병 F₂ 매핑집단 표현형 검정

- 노균병에 대한 병지수 (DI: disease index) 를 1(저항성) - 8(감수성) 로 설정함 (그림 50)



그림 50. 노균병 병지수(DI) 1 ~ 9 scale 의 병징 정도를 나타낸 사진

- 본 연구에 사용된 149 개 F₂ mapping 집단의 병지수 분포를 조사하여 정규성 검정 (Normality Test)을 실시한 결과 정규분포 양상을 보이는 것으로 밝혀짐. 오른쪽 꼬리 분포를 보이는 양상은 저항성이 유전적으로 열성 유전자에 의해 조절된다는 기존의 결과와 동일하므로 mapping 집단으로 사용하기에 적합함을 확인하였다 (그림 51)

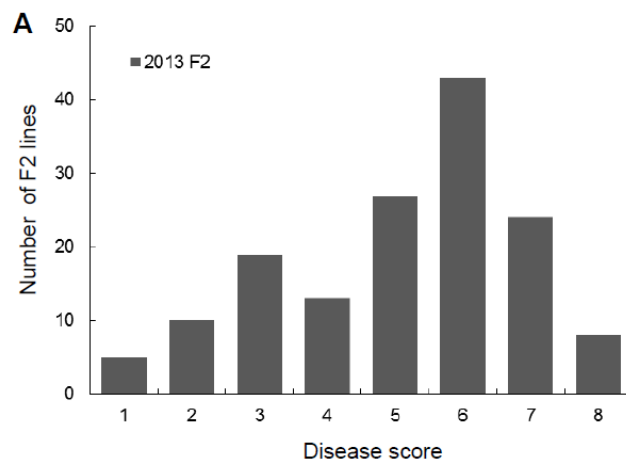


그림 51. F₂ 매핑 집단의 표현형 분포.

<가로축은 병지수이고 세로축은 관찰된 개체수로 이병성에 치우친 오른쪽 꼬리 분포를 가지지만 전체적으로 정규분포 양상을 보임>

- F₂ 매핑 집단을 대상으로 한 QTL mapping 결과 2번과 5번 염색체가 노균병 저항성과 연관이 있을 것으로 추정되었다. 따라서 2번과 5번 염색체 상에 존재하는 노균병 저항성 QTL 영역에 recombination이 생긴 41 개체를 선발한 후 selfing을 실시해서 F₃ 집단을 만들었다. F₃ line 별로 9 개체를 과종해서 2년('14,'15) 동안 병지수를 스코어링 했다 (그림 52).

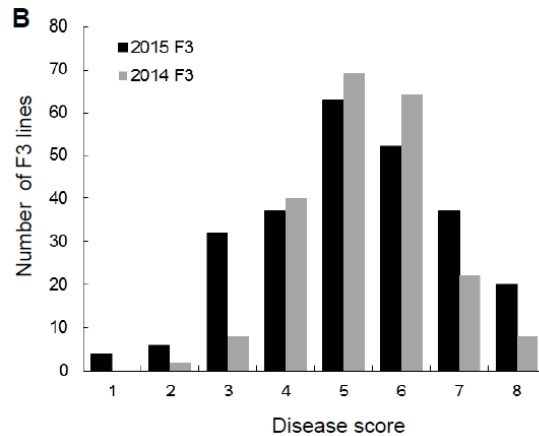


그림 52. F₃ 매핑 집단의 표현형 분포.

○ SSR 마커 기반 QTL mapping

- 먼저 노균병 저항성과 이병성 개체 간에 다형성을 보이는 SSR 마커를 아래 그림 53 처럼 선발하였다.

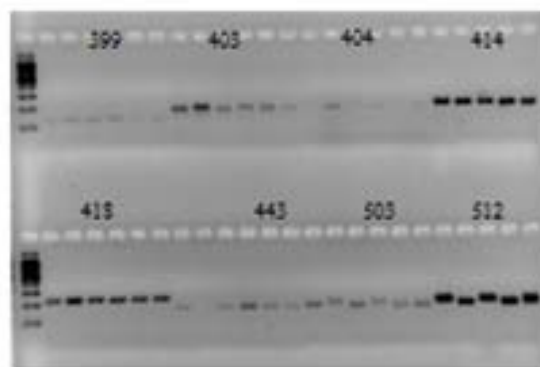


그림 53. SSR 마커에 의한 오이 자원 유전형 분석

<1번 레인: 저항성, 2번 레인: 감수성, 3번 레인: F₂ 라인-1, 4번 레인: F₂ 라인-2, 5번 레인: F₂라인-3. 95°C (denature), 60°C(annealing), 74°C(extension) 30 cycle 로 PCR 반응 실시후 3% metapore gel에서 전기영동 후 이미지 촬영>

- 팜한농에서 제공한 F₂ mapping 149 라인에 상기의 SSR 마커를 적용하여 노균병 저항성 QTL mapping을 실시하였다.
- 팜한농이 제공한 두 개의 parental line 노균병 저항성(S7) 과 이병성(S6) 개체를 26

°C, 상대습도 96 %인 식물 성장상에 두고 *P. cubensis* 포자를 10^5 cfu로 만들어서 인공 접종 2 주 후 그림 54. 처럼 S7 개체와 S6 개체가 각각 노균병에 대해 저항성과 이병성 양상을 보여 주는 결과를 확인하였다.

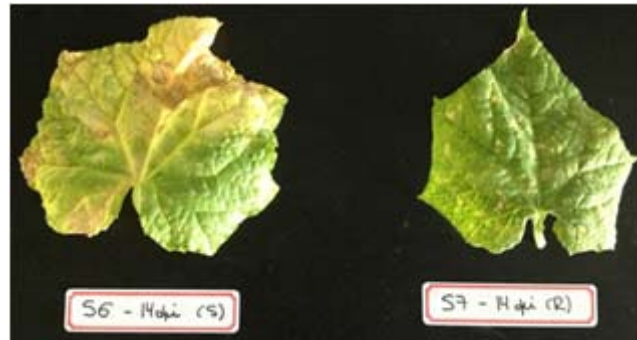


그림 54. 노균병 저항성(S7) 과 이병성 (S6) 개체의 노균병 접종 2주 후 병발생 양상

- 이 후, 팜한농 포장에서 자라던 F₂ mapping 집단 149 개체를 대상으로 노균병 감염에 대한 노균병 표현형 스코어링을 실시하였다.
- 노균병 스코어링이 끝난 후 F₂ 매핑 라인 149 개체에 대해 샘플링을 한 후 DNA extraction Kit를 이용하여 gDNA를 추출하여 SSR 마커에서 제작된 프라이머를 이용해서 PCR 반응을 실시한 후에 gel 분리도가 agarose 보다 높은 metapore gel을 이용해서 전기영동을 실시하여 149개 매핑 라인에 대한 유전형 분석을 진행했다 (그림 55).

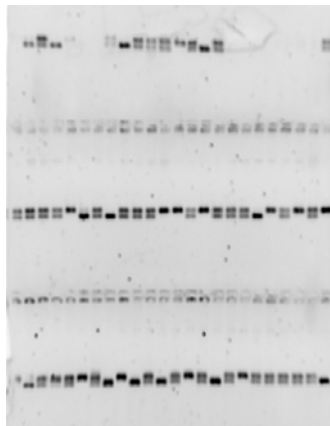


그림 55. F2 매핑 라인에 대한 SSR 마커 활용 유전형 분석

<위쪽 밴드는 저항성, 유래, 아래 밴드는 감수성 유래이므로 위쪽 밴드만 있으면 저항성, 아래 밴드만 있는 경우와 아래 위 밴드 둘 다 있는 경우는 이병성을 의미함>

- 그리고 많은 경우 아가로즈나 메타포어 젤에서 밴드 이동의 차이가 없어서 유전형을 분석할 수 없는 경우가 많다 (그림 56). 이런 경우에 separation 해상도가 높은 자동 전기영동 장치 (MultiNA,동일 시마주) 를 이용할 경우 유전형 분석이 가능함을 알고 유전형

분석을 진행하였다 (그림 57)

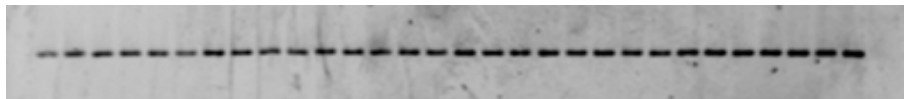


그림 56. 유전형의 차이를 전통적인 아가로스나 메타포어 젤에서 확인이 않됨

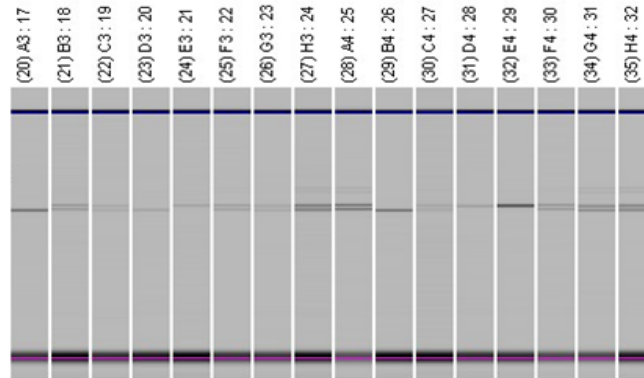


그림 57. 자동 전기영동장치를 이용한 유전형 분석.

A. 1차 QTL분석

- 38 개의 SSR 마커를 이용하여 149 개의 매핑 라인에 대한 유전형 분석 데이터를 mapping software (WinQTL)을 이용하여 QTL mapping을 실시하였다. 분석 결과 노균병 저항성을 책임지는 주요 조절자 들이 2, 4, 7번 염색체에 존재할 것으로 추정되는 결과를 도출하였다 (그림 58).

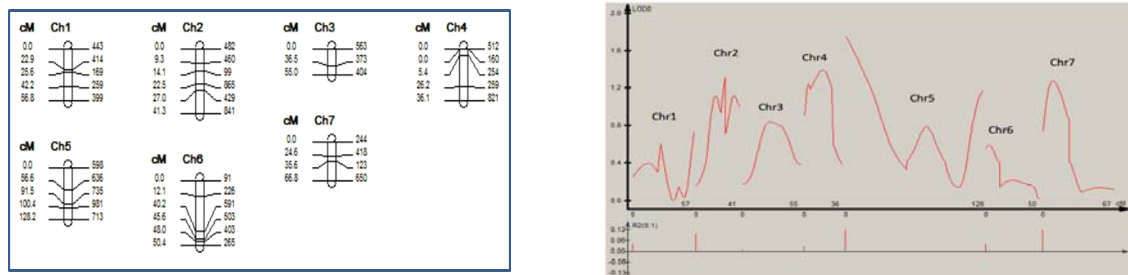


그림 58. 노균병 QTL Mapping 결과 이미지. 좌측은 linkage map 이미지, 우측은 QTL map

B. 2차 QTL분석

- 이후 SSR 마커를 80개 까지 늘려서 QTL mapping 을 실시하였다 (그림 59)
- Mapmaker/Exp 3.0 software에 아래 parameter를 적용하여 그림 60 에서 보는 것처럼 7개의 Linkage map을 작성하였다 (적용 parameter: minimum LOD score 3.0, maxima recombination fraction 0.5, Kosambi mapping function)

Marker	Chr	Position (cM)	Position (Mb)	Gene	Gene Function
DM1_0029	1	0.0	0.0	DM1_0029	DM1_0029
DM1_52	1	13.2	13.2	DM1_52	DM1_52
DM1_363	1	24.3	24.3	DM1_363	DM1_363
DM1_895	1	38.8	38.8	DM1_895	DM1_895
DM1_519	1	42.1	42.1	DM1_519	DM1_519
DM1_259	1	49.4	49.4	DM1_259	DM1_259
DM1_788	1	65.1	65.1	DM1_788	DM1_788
DM1_494	1	68.7	68.7	DM1_494	DM1_494
DM1_20254	1	68.7	68.7	DM1_20254	DM1_20254
DM1_14445	1	75.2	75.2	DM1_14445	DM1_14445
DM1_399	1	98.2	98.2	DM1_399	DM1_399
DM1_16695	1	113.2	113.2	DM1_16695	DM1_16695
DM2_05748	2	0.0	0.0	DM2_05748	DM2_05748
DM2_12573	2	2.6	2.6	DM2_12573	DM2_12573
DM2_00684	2	11.4	11.4	DM2_00684	DM2_00684
DM2_00204	2	18.0	18.0	DM2_00204	DM2_00204
DM2_469	2	21.7	21.7	DM2_469	DM2_469
DM2_22703	2	34.8	34.8	DM2_22703	DM2_22703
DM2_429	2	44.0	44.0	DM2_429	DM2_429
DM2_865	2	52.3	52.3	DM2_865	DM2_865
DM2_641	2	60.1	60.1	DM2_641	DM2_641
DM2_423	2	74.1	74.1	DM2_423	DM2_423
DM2_841	2	81.4	81.4	DM2_841	DM2_841
DM2_747	2	90.6	90.6	DM2_747	DM2_747
DM2_01253	2	97.9	97.9	DM2_01253	DM2_01253
DM2_447	2	112.1	112.1	DM2_447	DM2_447
DM2_592	2	115.5	115.5	DM2_592	DM2_592
DM2_592	2	125.1	125.1	DM2_592	DM2_592
DM3_0130	3	0.0	0.0	DM3_0130	DM3_0130
DM3_563	3	11.7	11.7	DM3_563	DM3_563
DM3_223	3	27.4	27.4	DM3_223	DM3_223
DM3_1502	3	39.3	39.3	DM3_1502	DM3_1502
DM3_1901	3	45.3	45.3	DM3_1901	DM3_1901
DM3_373	3	62.8	62.8	DM3_373	DM3_373
DM3_404	3	59.5	59.5	DM3_404	DM3_404
DM3_21304	3	75.6	75.6	DM3_21304	DM3_21304
DM3_254	3	90.8	90.8	DM3_254	DM3_254
DM4_0039	4	0.0	0.0	DM4_0039	DM4_0039
DM4_0147	4	0.7	0.7	DM4_0147	DM4_0147
DM4_521	4	11.8	11.8	DM4_521	DM4_521
DM4_529	4	25.0	25.0	DM4_529	DM4_529
DM4_169	4	39.8	39.8	DM4_169	DM4_169
DM4_1974	4	41.1	41.1	DM4_1974	DM4_1974
DM4_20165	4	56.8	56.8	DM4_20165	DM4_20165
DM4_512	4	73.7	73.7	DM4_512	DM4_512
DM4_923	4	79.3	79.3	DM4_923	DM4_923
DM4_611	4	84.8	84.8	DM4_611	DM4_611
DM4_14015	4	110.3	110.3	DM4_14015	DM4_14015
DM5_0156	5	0.0	0.0	DM5_0156	DM5_0156
DM5_14247	5	22.4	22.4	DM5_14247	DM5_14247
DM5_22409	5	25.8	25.8	DM5_22409	DM5_22409
DM5_425	5	30.9	30.9	DM5_425	DM5_425
DM5_541	5	48.8	48.8	DM5_541	DM5_541
DM5_396	5	51.3	51.3	DM5_396	DM5_396
DM5_773	5	64.7	64.7	DM5_773	DM5_773
DM5_713	5	72.6	72.6	DM5_713	DM5_713
DM5_599	5	82.8	82.8	DM5_599	DM5_599
DM5_585	5	96.2	96.2	DM5_585	DM5_585
DM5_598	5	107.7	107.7	DM5_598	DM5_598
DM5_14180	5	122.4	122.4	DM5_14180	DM5_14180
DM5_981	5	129.2	129.2	DM5_981	DM5_981
DM5_139	5	142.1	142.1	DM5_139	DM5_139
DM5_03514	5	153.8	153.8	DM5_03514	DM5_03514
DM5_02895	5	155.1	155.1	DM5_02895	DM5_02895
DM6_265	6	0.0	0.0	DM6_265	DM6_265
DM6_403	6	22.6	22.6	DM6_403	DM6_403
DM6_591	6	34.2	34.2	DM6_591	DM6_591
DM6_503	6	44.8	44.8	DM6_503	DM6_503
DM6_46	6	58.4	58.4	DM6_46	DM6_46
DM6_13	6	73.1	73.1	DM6_13	DM6_13
DM6_226	6	105.0	105.0	DM6_226	DM6_226
DM6_671	6	113.4	113.4	DM6_671	DM6_671
DM6_636	6	131.4	131.4	DM6_636	DM6_636
DM7_0252	7	0.0	0.0	DM7_0252	DM7_0252
DM7_947	7	23.3	23.3	DM7_947	DM7_947
DM7_561	7	53.6	53.6	DM7_561	DM7_561
DM7_533	7	62.7	62.7	DM7_533	DM7_533
DM7_545	7	68.2	68.2	DM7_545	DM7_545
DM7_990	7	72.8	72.8	DM7_990	DM7_990
DM7_376	7	76.6	76.6	DM7_376	DM7_376
DM7_650	7	85.8	85.8	DM7_650	DM7_650

그림 59. 유전형 분석에 사용된 80 개의 SSR 마커 정보

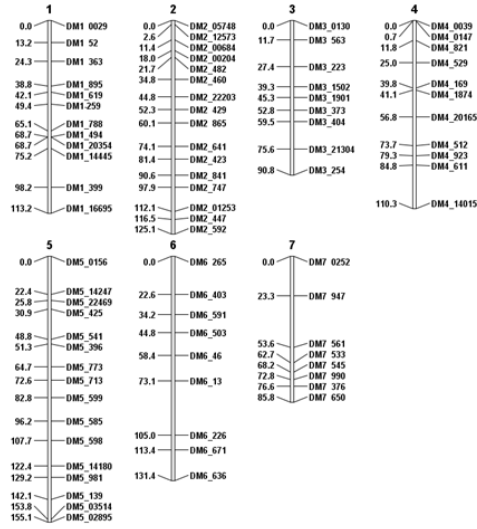


그림 60. 오이 노균병 저항성 Linkage map 작성.

<80 개 SSR 마커에 의해 전체 811.7 cM 길이의 7개 LG를 결정함>

- Gene ver. 4.3.10 software 에서 single trait CIM (composite interval mapping) 과 LOD score는 1,000번의 permutation test 옵션을 적용해서 QTL map을 작성하여, 노균병에 대한 저항성 영역이 염색체 2번과 5번 영역에 존재함을 발견함 (그림 61)

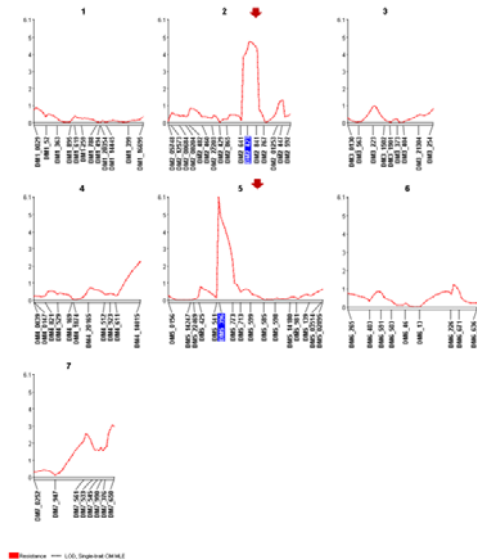


그림 61. 노균병 저항성 QTL region 선발

<minimal LOD score 3.0을 적용해서 분석한 결과 염색체 2번 과 5번에 노균병 저항성 영역이 존재함을 발견함>

- 2번, 5번 염색체 상에 존재하는 노균병 저항성 QTL 영역들은 중국과 일본에서 밝혀진 기존의 노균병 저항성 영역과는 다르다는 것을 알 수 있음 (그림 62). 아마 저항성 자원의 유래가 달라서 다른 결과가 유도된 것으로 생각되고, 국내 노균병 저항성 마커 개발을 위해서는 국내 유전자원을 활용한 마커 개발이 필요하다고 할 수 있다.

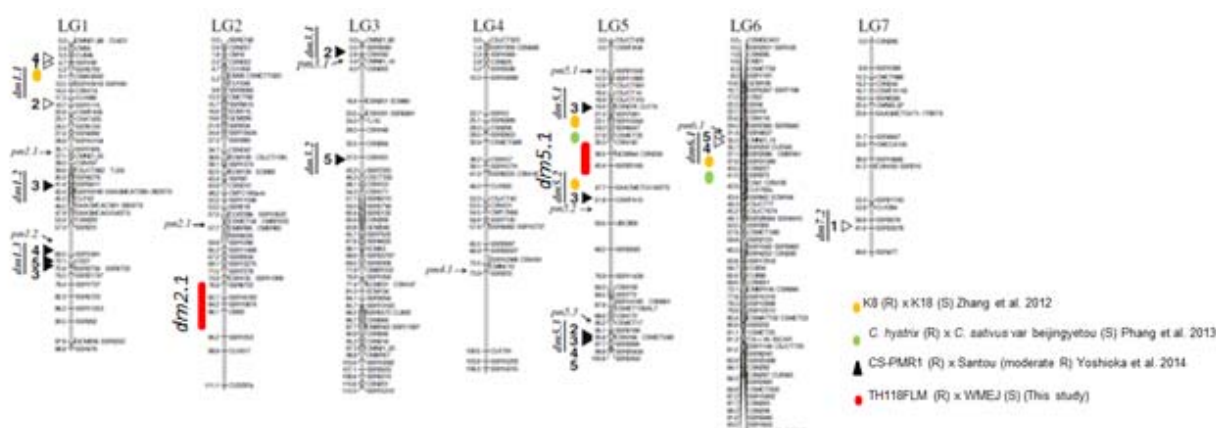


그림 62. 기존에 밝혀진 노균병 저항성 영역과 본 연구 결과 밝혀진 신규 저항성 영역의 비교

C. 3차 QTL 분석

- 이후 SSR 마커 82 개, CAPS 마커 15개, InDel 마커 8 개 해서 총 105 마커를 이용해서 더 정확한 QTL mapping 분석을 실시했다 (표 31).

표 31. QTL mapping 에 사용된 분자마커 정보

#	Loci	Chr	Marker Type	Position ^a (Mb)	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')	Restriction enzyme
1	DM1-0029	1	SSR	0.29	CTGTGCATTGACTTGGAGCA	ACCCTTCACCCCTCTACCTT	
2	SSR00190	1	SSR	2.67	TTCTGAAACGACACCTCCAG	TCCCTTCTAATTTACCTTCCA	
3	SSR10018	1	SSR	4.1	CTTTTGTCTTGTGGAATGTGA	ATTTGGGGATGGAGAGGTTT	
4	SSR22913	1	SSR	5.2	TTGCCACAAACTATAATTATCCAAA	AAACTAAAATCCATCCTATCAAATTTGT	
5	SSR16472	1	SSR	6.8	CACCCACGTGCTGTAATAAAG	ACCAGTTAACACGTCAATATTTTCT	
6	SSR04992	1	SSR	7.84	TTGACCCATAGACCCACACA	AACAACCAACAGGCCAAGAG	
7	SSR20473	1	SSR	18.7	ATGTTTCAGGGCCTGGTATTG	TCCAACAGCTCCAATTAGCC	
8	SSR13960	1	SSR	20.3	ACCAAAGCTCATGGTTTTCC	CATCGATACGCCAATACCAA	
9	SSR20354	1	SSR	20.51	AGATGCCCATTCAGTTTTG	TTGAAGGAGAGAGGGAATGG	
10	SSR14445	1	SSR	21.84	TCCATGGAATTGAAAACCC	CGATCCTTATCGAACAGCCT	
11	SSR11253	1	SSR	23.87	TGGCAATAAGACAGTGATCAAA	GCCATGTGCAACCATCTCTA	
12	SSR16695	1	SSR	24.64	CACAATCCACGAAGAACAA	TGCAATTATGGCAATCAAAA	
13	SSR05748	2	SSR	0.09	TGTGGCCCTGTGCTAAAATGA	TTTGAAAAGCTAAAAGCCCA	
14	SSR12573	2	SSR	64	CGAAGATCAAATCGCAAACA	TGCTGGTCTCGTCTTCTTT	

15	SSR00684	2	SSR	3.25	AAGGCCAAAAGACTATGCGA	CATCCCTTGCATCTCCACTT	
16	SSR00204	2	SSR	4.18	AACCTATTTCACGCATTC	GAGAAACAGCTGGAATGGG	
17	SSR13532	2	SSR	5.64	AAACCCAAGAATTGTAAACCCA	TGATCCATTTCTATTCCTAACATTGA	
18	DM2-6	2	InDel	6.44	TTTGAGGGCTCGTAAAGAAATAA	CGTATCACAATTAAGGTTGATTG	
19	DM2-7	2	InDel	7.18	CCGAGATCAAACCTCAATTGATT	CCAAAGGAACCTAAAGTACACT	
20	DM2-CAPS3	2	CAPS	9.04	CCTAAAGATGGCAGCATGTAAT	CTGCCATTTCATTACAAGCACAT	AluI
21	SSR13105	2	SSR	10.2	AAAAGGGAGGTTAGGGGGTT	TCCATTGGTAATAGCTGGGTTT	
22	DM2-8	2	InDel	11.28	TTTGCATAAGTAGTCGTCATTGC	CATTTAAACTTGCTACGAGATCG	
23	DM2-CAPS4	2	CAPS	12.05	GACAAAGGAAGACCATATAGGC	CTTAGTTATATTTGGAAGGGGAC	AluI
24	DM2-CAPS5	2	CAPS	12.96	TAGTGTGTTGGATGGCAGACA	ACTTAGGTCACTTCCATTCAAAG	DraI
25	SSR22203	2	SSR	13.93	GGTGAGCAAGGGTTTTCTTG	AAGGCGTTCCGATGATTTTT	
26	SSR12083	2	SSR	15.3	GAATTGGCCCATCCTTCATT	GCCATTCCAAAACTTTTCAAC	
27	SSR22227	2	SSR	15.8	ACGTGAGAGACACCCTCC	TATCCCATGGGTATGGTGTG	
28	SSR20045	2	SSR	17.92	TGCACATGTGTAAGGCTTG	AGGGTGAGGAATACATTGAA	
29	SSR21734	2	SSR	19.04	TCCCTCAACGATTCGAGTTT	AAAAGCAAGAACAACCCAA	
30	SSR22093	2	SSR	19.47	GTGGGAATGGAGTTTTTGA	TCAAGTGGTTCAAAGAAAGAAGA	
31	DM2-1	2	InDel	19.65	CAACGTCGTTTATTGAATTTGCC	CTCATTGGACTTGACCACTAAG	
32	DM2-2	2	InDel	19.78	CACACTGGACAATTATGTTGAGG	CCGATTGAAATGTAAACAGAAACG	
33	DM2-4	2	InDel	20.44	GTAGAACATGAGCATGATTGTC	GTTCTGTGAAATAGTCGAGGT	
34	SSR01253	2	SSR	20.65	CGCTGGATTTGTTGTGAAAT	AATGTCGGGGAGTGTACAT	
35	DM2-5	2	InDel	21.04	ACATTAATGACCGTGAGCTATG	CCCCTTGTACCTTTGTTTTCA	
36	SSR12730	2	SSR	21.35	CGGTTTTTGAATTGTCTTCCC	ATCCCGACAGTCTCTGAAGG	
37	SSR16028	2	SSR	22.56	TTACCTTCCCCACCCTAACC	TGACTTTTTGGGGAAACCCCT	
38	SSR15419	3	SSR	3.3	TGTTGCAAATATTGCACCTTC	ATGGCAAAGCCAAAAAGATG	
39	SSR19430	3	SSR	5.57	TATGGCGAAGAAGCTTTGCT	AGGGGGATCTTGCCCTCTAAA	
40	SSR01573	3	SSR	8.4	CGTTAGGCCAAACAAAATTGA	TGCAAACGTTTCTCTAGGCA	
41	DM3-CAPS1	3	CAPS	10.22	ACATGAAATAAACCCAGCCCAAC	CGCACGGGTGTTTCATATATTATAT	AseI
42	DM3-CAPS5	3	CAPS	12.05	CACCGATAAGTGAAACAAAATCC	CGTGTATTTTTATTATGTCGAGCC	EcoRI
43	DM3-CAPS6	3	CAPS	14.8	CACCTTGACCAATTCAGTTCGA	TCTCTCAGTCGAATGCGTCAAT	AvaI
44	SSR02132	3	SSR	20.79	CAATTGATGAGTGAAAGATAAGC	CTCTGGTCCACCCAACTCCT	
45	SSR14649	3	SSR	22.87	AAAACACCCAAATTTAAGCGA	CACCATTAATTAACGATCAACCA	
46	SSR13286	3	SSR	26.28	CAACTATCTCGATTGATACAAAATCT	CGTGGGATTCAATAGTTTGTCT	
47	SSR21008	3	SSR	27.79	TTGTCCACCTTGGATGTGAA	CCCCTTTTCCCTTTAAACCC	
48	SSR21304	3	SSR	31.69	CCTCACCATGGTATTATCAATCG	GAATTCTTCTCGAATGTTTCCAA	
49	DM3-CAPS7	3	CAPS	33.5	GCCTATCAGGTGTTATCTATAC	CTGTAATGGGGATAAAGTAGCATC	HindIII
50	SSR04905	3	SSR	37.35	TTCTACAACCTGGCCAAACCC	GCCTAGGTTCTGTCTTCTT	
51	DM3-CAPS9	3	CAPS	39.09	GCTTCAATGTGACGTTTGACCAT	GGTCGTCTCGTTTCTGAATTATG	ClaI
52	DM4-0039	4	SSR	0.39	TGAGCATGTTCCAGTGGCAA	GCATTCTTCAGTCCAAACGACA	
53	DM4-0147	4	SSR	1.47	TGCTGATGCTGATGCTGATGA	AGTCGTGTTGCAAAAATGGG	
54	SSR21240	4	SSR	5.6	CCACCCCTCTCTCATCATGT	TCAATGGACCAACGTAATCA	
55	SSR14617	4	SSR	11.65	TGTCTCAATGCCCTTTTCAG	CAACTCCGGTTCAAAGTTCA	
56	SSR02697	4	SSR	14.98	CTGCCATTCAAGCTATGGG	TGCTAACCCAACCAACAAA	
57	DM4-1874	4	SSR	18.74	TCAAAATTGATTGGTAAGAAGAAGC	TTGATTGAATGAATGGTTTGGGA	
58	SSR21065	4	SSR	19.33	GGCTOCATATGCCAAATGAC	ATGGGTCCAGAGCTTTTTGA	
59	SSR14257	4	SSR	21.2	CGCGAAGAGTGTTTAGTCTCA	TACAATGGGGCTAGAAGCAATC	
60	SSR23522	4	SSR	22.38	GCATATGGAGATTGTTTGGGA	GTTTGGGGCGTTACAACATT	
61	SSR16292	4	SSR	22.77	TTATTCGAAGCGTGCTTCTCT	AGGGTTTGACGTAGTGACCG	
62	SSR14015	4	SSR	23.34	AACGCACCTCAACCGTATTC	CCCTAAGCGAAGAAATGCAG	
63	SSR14247	5	SSR	3.42	TCACATCCATTTCCGGACAAA	TCACCAGTGACCTGTGAAGAA	
64	SSR22469	5	SSR	4.01	TCACACCTGCATTTTCATCA	GAGCGTCTCAACATACCC	
65	SSR11969	5	SSR	5.97	GGGTCATACCCAAAAGGGAG	TGCTTTAGCCGACAACCTCAA	
66	SSR14899	5	SSR	9.04	ACACCGACAACACACAAAAGC	CGATCTCAACCCCTCCTCTTG	
67	DM5-1	5	InDel	9.87	GAATGGAAATGAAAATGCAGAAGC	AATTAATATGCCTTCAACCACCAG	
68	DM5-CAPS1	5	CAPS	10.3	CCTCATTCTTTTAGACAGAATG	CCATCCTACCTCAAAAATGGAT	NcoI
69	SSR11167	5	SSR	11.53	GAGGAATGTGCAATGAGGGA	CAACTTAACCCAAACCCGAA	
70	SSR20165	5	SSR	12.59	CAATGGAGGAGGAGTTGGAG	GGGGCAGGGTAGAAGAAATC	
71	SSR18729	5	SSR	13	TCCAATCCCACTCTGGTTTC	TCTTTCCAACACTAACCTTGGATT	
72	DM5-CAPS3	5	CAPS	13.8	GCAAGGACGGACATCTTTTAAAG	CTATATTGACCGAACCTGTAGA	HaeII
73	DM5-CAPS4	5	CAPS	14.52	AAGACCAAAATGTAGCACGAGT	GAGCTTGTCTGTGTGGAAAGTA	EcoRI
74	SSR16110	5	SSR	15.37	GGAATATGGAAGGAAAGCCA	ATCCCCAATTCCTCCAAAAC	
75	DM5-CAPS7	5	CAPS	17.8	CAATCTATTTTAACTCAGCCAGAG	GCTGATGGAGTCCAAACTCATTT	DraI
76	SSR15818	5	SSR	18.96	GGACATGTCAACCTCCCGTGT	GCCTCTAGCTGAAGACCA	
77	SSR16068	5	SSR	20.99	TATAACCCCGTCTTCTCCCC	GGGAAACCCCTTTGACTCTC	
78	SSR14180	5	SSR	23.53	TGGCAACATGTGAATTGTG	GAAGGGAGTACTGAGTTGCCA	
79	SSR02166	5	SSR	26.16	TCGATTTCAAACACTCCACTTG	TCAAACAAACTACATGCCACAA	

80	SSR03514	5	SSR	26.71	TAGGGTCCCCTTCCTCATA	GGGTACCCAAAAGCAAGTGA	
81	SSR02895	5	SSR	27.28	GAGTTGGCAAGTCACGTTGT	TTTCCCTCATTATGCCATCC	
82	SSR11343	6	SSR	4.13	CAATGGTTGCTTTGCTTCAA	GTGGGGTTGCTTTTGGATAA	
83	SSR02384	6	SSR	2.78	AAAAATCGGACAAATCGTGC	GGTCAAATGTTGCTCTTTGC	
84	SSR16020	6	SSR	5.42	GGGATGAGGAGCAAATGGTA	ACACCATTTTTCATCGAGATT	
85	SSR14084	6	SSR	6.7	TTTGTGTGTACCCCAAGTAAT	GGGTATTTGTCCAATTCCTAATG	
86	SSR00134	6	SSR	11.51	GTAATGTTCTGGCCAAGCG	CCAGAAGGCTAAAGGTGGAG	
87	Cs41	6	SSR	15.12	GTGGAGGAAGCAGGAGATGA	TGGTGGTGGGACTCCACTAT	
88	SSR00259	6	SSR	10.73	TCCACGTAGACATTGTGAGGTC	CGAGTGTAGCTCAATTAATATGGTG	
89	SSR15955	6	SSR	18.99	TTTGAGCCTTGAGGCAAAGT	GCAATTC AACGTAATGGGCT	
90	SSR04252	6	SSR	20.07	AAGGAGTGTTTGAATAGGCCG	AAAGAACACACATGGTGGTGG	
91	SSR17604	6	SSR	22.27	TTTATTTGATATTGAAGTAAACAG	TTGAAGTGGGAGAGGAAGGA	
92	Cs-WCT25	6	SSR	25.7	AAAGAAATTAAGTCAATCAAACCG	CCCACCAATAGTAAATTAACAT	
93	SSR16882	6	SSR	27.43	CACCTCAACTCCTCCATTCAA	TGGAGGTCATTGAGACTTGCT	
94	DM7-0252	7	SSR	0.25	CCCTGTCAGCTCTTCTTTGT	TGTGTCAGAGAACTCACATGGT	
95	SSR04689	7	SSR	4.41	TCTCCGCGAGAAAAGAAAAGA	TGCGTCTCCTCTTCTCCTCAT	
96	SSR24720	7	SSR	8.53	TGCCATTTAATGTTGATTTG	TTCTAGATTACAACCTTGCACCT	
97	DM7-CAPS1	7	CAPS	10.46	TCTCGTAGTGTTTGTGTTAAACT	TCTCTTTTAGGGTGTTCCTTCAA	HinfI
98	DM7-CAPS4	7	CAPS	12	TGAACTCGAGCAACATTGATCCA	CAAAATGCGCAAAGTGTTTAGGG	HinfI
99	DM7-CAPS3	7	CAPS	14.03	GTAGTTGATTGGGTTGTACTTTC	TAGTCTTGTGAATTCCTGGCTT	HinfI
100	SSR15322	7	SSR	15.92	TGAGGTGTAGGTTGCTATCCA	CCATTCACGTCACATACACAGC	
101	SSR14654	7	SSR	16	TAGGAAAATTTAGGCGGACG	CCTCTCAAATCCCTCACACAA	
102	SSR15006	7	SSR	16.8	CACACAAGGTTTAGCCACCT	TGCCATCTTATCTCACAAAGG	
103	SSR33278	7	SSR	17.52	GTTGGAATGAGGGAGTGACC	GCAAACGCAATTAACAACAGC	
104	SSR10461	7	SSR	17.6	TTCCCGCTTGTAGAAATTAAGA	TTTAGACTTGTACGAGCCATTTT	
105	SSR17062	7	SSR	18.59	CACTCTCAAAATTAGCCACACA	AGCTAGCCACGTAACACCGT	

- Linkage map 작성

- MAPMAKER/EXP 3.0 software 를 사용하여 LOD<3.0, maximum recombination fraction<0.4 를 기준으로 linkage map 을 작성하였다. 유전적 거리는 Kosambi mapping function 에 의해 결정되었다.
- 149 개의 F2 mapping 집단에 105 개의 마커를 적용하여 7개의 linkage group 으로 이루어진 총 855.6 cM 의 연관 지도가 작성되었다. 마커당 평균 거리는 8.7 cM 정도이고, LG3 이 가장 길고 (138.9 cM), LG7 이 가장 짧은(93.7 cM) 걸로 밝혀졌다 (그림 63).

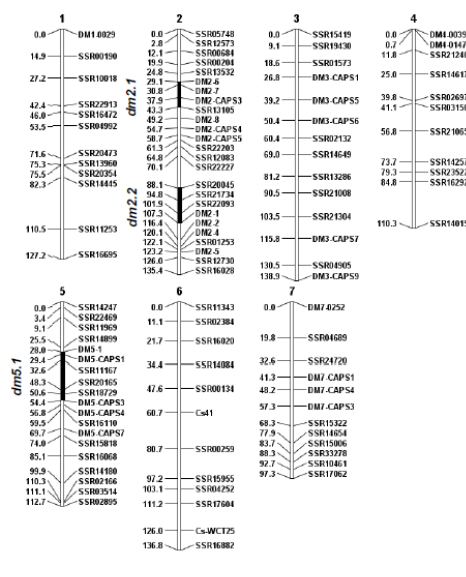


그림 63. 노균병 저항성 QTL region 선발

<minimal LOD score 3.0을 적용해서 분석한 결과 염색체 2번 에 2개 과 5번에 1개의 노균병 저항성 영역이 존재함을 발견함>

- QTL analysis

- Gene version 4.3.10 software 에서 single trait CIM (composite interval mapping) 과 LOD score는 1,000번의 permutation test 옵션을 적용해서 QTL map을 작성함.
- 노균병에 대한 저항성 영역이 염색체 2번과 5번 영역에 존재함을 발견함 (그림 63)

○ GBS-기반 노균병 저항성 QTL mapping

- SSR 마커 기반의 QTL 분석은 105 개 마커를 사용한 한계가 있다. 따라서 보다 많은 마커를 사용해서 QTL 분석을 하기 위해서, SNP마커 보다는 최근 많이 사용되는 NGS 기반의 QTL 분석을 실시하였다. 본 연구에서는 GBS(Genotype based sequencing) 분석 방법을 적용하여 QTL 분석을 실시하였다.
- F2 매핑집단 개체 중 에서 표현형으로 저항성을 보이는 9 개체, 이병성을 보이는 9 개체 그리고 저항성, 이병성 parental line 2 개체, 총 20 개체의 식물체에서 gDNA를 추출 한 후에, ApeKI 과 MspI 두 가지 제한 효소를 이용하여 double digest를 실시하였다. 이후 random sequencing 후에 sequence 유래를 확인하기 위하여 바코드 (barcode) 를 붙인 GBS library를 제작하였다.
- Illumina highseq 기기에서 single channel sequencing을 실시해서 최종적으로 저항성 10개 라인에서 125,738,888 reads 와 이병성 10개 라인에서 130,943,333 reads 를 확보하였고, 이는 오이 전유전체 크기의 43.5X 와 40.8X 정도에 해당하는 sequences 를 확보한 상태임. 따라서 개체별로 4 ~ 5X 정도의 depth 를 가지는 염기서열을 확보하였다.
- adaptor 서열을 바탕으로 개체별 sequence를 sorting 하여 20 개체에 대한 염기서열 정보를 확보하고, 이들 서열을 가지고 데이터 필터링을 통해 최종적으로 sequence 정보를 확보하고 이들 서열을 오이 표준 유전체인 chineselong 9930 서열에 matching 하여 염색체 별로 전체 서열을 확보하였다.
- 이후 TASSEL 프로그램을 이용해서 SNP calling 을 실시한 결과 저항성과 이병성 간에 10,649 개의 SNP 서열이 발견됨. 그리고 이러한 SNP 정보를 바탕으로 genotyping 분석을 실시하여 전 개체에 대한 그림 64 와 같은 genotyping 결과를 얻음.
- genotyping 분석 데이터를 바탕으로 JMP genomics 프로그램을 활용하여 QTL mapping을 실시하였는데 다음과 같은 결과를 도출하였다 (표 32, 그림 65). 노균병 저항성 QTL 이 염색체 2번, 4번, 5번, 6번 영역에서 발견되었다. 특이하게 4, 5번 QTL 영역은 저항성 개체로부터 유래했고, 6번 QTL 영역은 이병성 개체로부터 유래한다는 사실을 보여준다. 즉 이는 노균병 저항성에 우성 인자와 열성 인자가 동시에 관여함을 보여주는 흥미로운 결과이고 저항성 품종 육성이 한결 어려울 것이라는 것

을 시사한다.

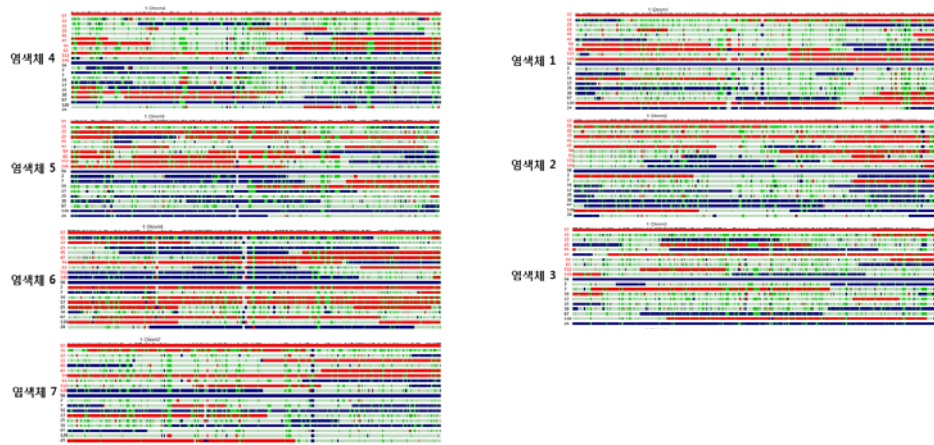


그림 64. GBS 분석 대상 식물 개체의 염색체별 Genotyping 결과.

<각 염색체별 상위 10 행들은 저항성 식물체, 하위 10 행들은 이병체 식물체. 각 bar는 염색체를 나타내고 붉은색은 저항성, 푸른색과 녹색은 이병성 호모와 이병성 헤테로 유전형을 나타냄>

표 32. 노균병 저항성 major QTL 의 유래

QTL	Position interval (Mb)		Summit G' value	Summit TAFD	Source of Resistant allele
	Full	Most probable			
<i>dm2.2</i>	16.64–22.59	16.64–19.94	1256.44	0.70	TH118FLM
<i>dm4.1</i>	15.29–21.62	15.29–19.94	735.36	0.51	TH118FLM
<i>dm5.1</i>	12.11–14.50	12.11–14.50	912.03	0.60	TH118FLM
<i>dm6.1</i>	5.54–17.28	6.47–11.89	766.38	-0.45	WMEJ

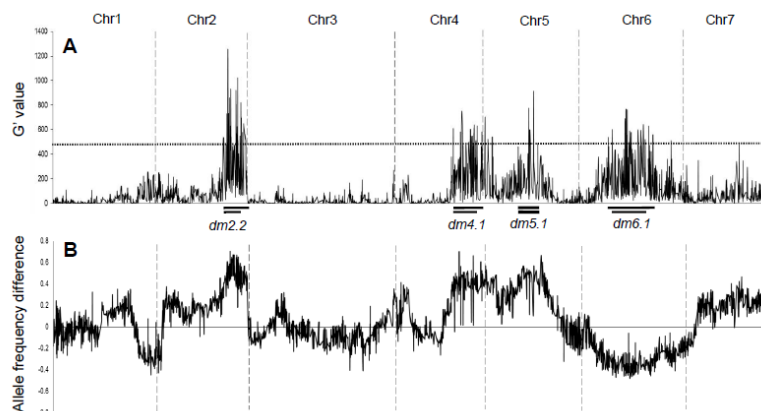


그림 65. GBS 를 이용한 노균병 저항성 QTL mapping.

<a. SNP calling 정보를 바탕으로 G' value를 염색체 별로 plotting 해서 FDR<0.1 (가로 점선)을 적용하면 2, 4, 5, 6 번 염색체 상에 노균병 저항성 QTL 영역이 나타남. b. 저항성 유전형의 allele 발현 빈도를 분석하면 2, 4, 5번 QTL 영역은 저항성 개체로부터 유래했고, 6번 QTL 영역은 이병성 개체로부터 유래한다는 결과를 보여준다>

- 전통적인 SSR 마커 기반의 QTL mapping 과 GBS-seq 기반의 QTL mapping 결과를 비교하면 아래와 같다 (그림 66, 표 33).
- GBS 에 의해 밝혀진 dm2-2 영역 (16.6 - 19.9 Mb) 은 SSR20045와 SSR22093 사이에 위치한 2번 염색체의 17.9 - 19.5 Mb 영역에 상응한다. SSR03150 과 SSR23522 사이에 위치한 4번 염색체의 18.94-22.3 Mb 영역은 GBS 에 의해 밝혀진 dm4-1 영역 (15.29-21.2 Mb) 에 상응한다. DM 5-1 과 SSR18729 사이에 위치한 5번 염색체의 9.9 - 10.3 Mb 영역은 GBS 에 의해 밝혀진 dm5-1 영역 (12.1 - 14.5 Mb) 에 상응한다.
- 하지만 GBS 에 의해 밝혀진 dm6-1 영역은 SSR-기반의 QTL mapping 으로는 밝혀지지 않았다. 이와 반대로 SSR-기반 QTL mapping에서 밝혀진 dm2-1 영역은 GBS-seq 기반의 mapping 으로는 밝혀지지 않았다.

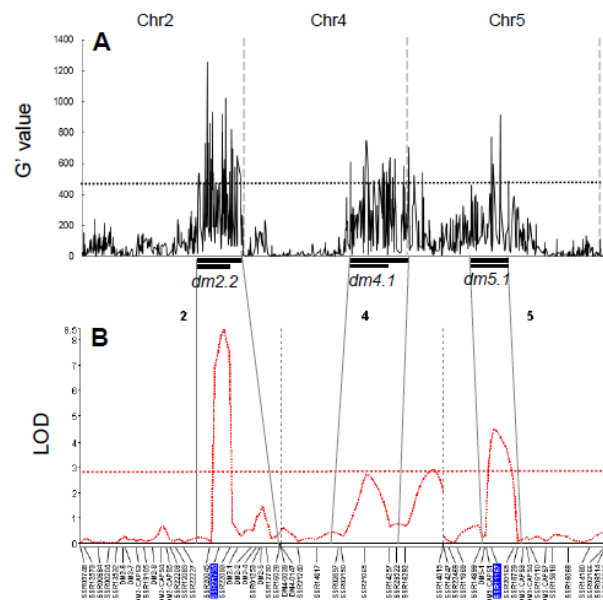


그림 66. 전통적인 SSR 마커 기반의 QTL mapping 과 GBS-seq 기반의 QTL mapping 결과를 비교

QTL	Chr	Associated marker	Peak (cM)	LOD Score	QTL interval ^a		Phenotypic variation (%)	Additive effects	Dominance effects
					Left marker	Right marker			
F₂ population									
dm2.2	2	SSR21734 (19.04)	13.8	8.5	SSR20045 (17.92)	SSR22093 (19.47)	24.0	-1.16	0.32
dm5.1	5	SSR11167 (11.53)	22.6	4.6	DM5-1 (9.87)	SSR18729 (13.00)	14.1	-0.84	0.37
F₃ population									
dm2.1	2	DM2-CAPS3 (9.04)	13.4	11.2	DM2-6 (6.44)	SSR13105 (10.20)	28.2	-0.66	0.45
dm2.2	2	SSR22093 (19.47)	13.8	3.9	SSR21734 (19.04)	DM2-1 (19.65)	10.8	-0.38	0.14
dm5.1	5	SSR18729 (13.00)	6.5	11.0	SSR20165 (12.59)	DM5-CAPS3 (13.80)	27.1	-0.60	0.43

^a Numbers in parentheses are the physical map positions of the corresponding markers on the cucumber reference genome

표 33. F₂ 집단 기반과 F₃ 집단 기반의 노균병 major QTL 분석 결과 비교

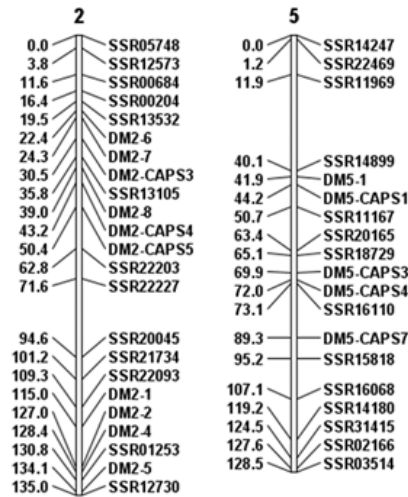


그림 67. F₃ 개체를 이용한 염색체 2번 과 5번의 연관 지도

- QTL analysis

- qGene version 4.3.10 software 에서 single trait CIM (composite interval mapping) 과 LOD score는 1,000번의 permutation test 옵션을 적용해서 QTL map 을 작성함.
- 노균병에 대한 저항성 영역이 염색체 2번에는 2 개 과 5번 영역에 하나 존재함을 발견함 (그림 68)

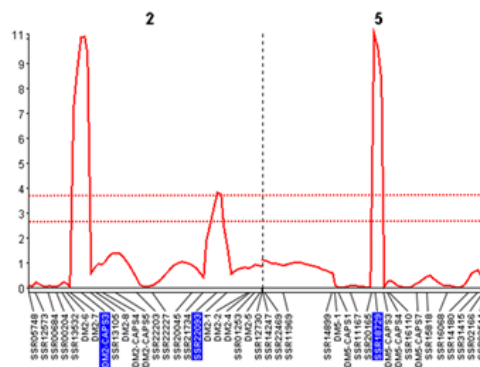


그림 68. F₃ progeny test 에 의한 2번, 5번 염색체의 노균병 저항성 QTL 영역 확인

<가로축의 점선은 유의확률(P-value) 각 0.1, 0.5 이하를 나타내고, x-축의 푸르게 표시된 마커는 각 QTL 과 제일 상관성이 높은 마커를 의미한다.>

- 상기의 연구 결과는 TAG (Theoretical and Applied Genetics) 저널에 게재 승인을 받았고 현재 출간중이다.

Thanda et al. (2016) “QTL mapping for downy mildew resistance in cucumber via bulked segregant analysis using next-generation sequencing and conventional

methods”. TAG (In press)

○ Fine mapping of target QTLs

- 본 과제를 통해서 노균병 저항성을 조절하는 염색체상의 주요한 영역을 규명한 결과 염색체 2번, 4번, 5번 6번 영역에 존재하며, 우성과 열성 인자가 모두 존재하는 복잡한 양상을 보이고 있다는 것을 알게 되었다.
- 따라서 현재까지 규명된 정보를 육종에 직접 적용하기에는 어려움이 존재할 것으로 생각된다.
- 따라서 보다 효율적으로 육종에 활용하기 위해서 RIL (recombinant inbred line) 과 BC(backcross) 개체를 개발하고, 이를 이용해서 더 정밀한 QTL mapping 을 통해서 노균병 저항성 후보 유전자를 선발하고 이를 이용해서 마커를 개발해야 할 것으로 판단된다.
- RIL 개발을 위해서 현재 F₂S₂ 세대가 진행 중 이므로 향후 1~2 년 이내에 RIL 확보가 가능할 것으로 여겨진다.
- dm2.1, dm2.2, dm5.1 locus 영역이 저항성 자원 유래인 개체와 dm2.2 와 dm5.1 모두가 저항성 자원 유래인 개체를 선발해서 이들을 이병성친과 backcross를 진행 중이고, 현재 BC₂F₁ 개체들이 포장에서 자라고 있는 상태이다 (그림 68).

Recombinant	DM2-005728	DM2-12573	DM2-00884	DM2-00204	DM2-482	DM2-460	DM2-22203	DM2-89	DM2-429	DM2-865	DM2-05865	DM2-641	DM2-423	DM2-841	DM2-01253	DM2-12882	DM2-30865	DM2-2309	DM5-0516	DM5-14247	DM5-22469	DM5-425	DM5-541	DM5-396	DM5-713	DM5-599	DM2-565	DM5-598	DM5-14180	DM5-981	DM5-139	DM5-03514	DM5-02865	Resistance	Remarks
R	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	1		
S	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	8	
F1	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	6	
48	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	B	H	H	H	A	H	H	H	B	B	B	B	H	H	H	H	H	H	2	dm2.1
103	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	5	dm2.2
22	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	2	dm5.1
36	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	4	dm5.1
49	B	H	H	H	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	2	dm2.2 & dm5.1

그림 68. BC 개체 육성에 사용된 라인들 정보

- 교배에서 나온 개체들에 대해서 분자마커를 적용해서 선발하고 이후 포장 병저항성 여부를 검정하면서 개체를 선발하기 때문에 선발압이 높은 상태이므로, 조만간 1~2 년 이내에 노균병 저항성 QTL locus 영역을 최소화 해서 후보 유전자 발굴이 가능할 것으로 여겨진다.
- 특히 본 과제와 연계성을 가진 과제 (2016 - 2019: 박과작물 분자유종 시스템 구축) 에 참여하기 때문에 상기에서 언급한 일들을 지속적으로 추진해서 현장에서 효율적으로 사용 가능할 수준의 마커를 개발할 계획이다.

○ 노균병 저항성 연관마커 개발

- 분자마커와 F₂ 개체의 표현형 데이터를 기반으로 일원분산 분석을 실시하여 표현형 데이터와 제일 밀접한 상관관계를 보이는 연관 마커를 선발하였다 (그림 69).
- 2번 염색체상의 노균병 저항성 영역인 dm2.1 QTL은 DM2-641 마커 와 DM2-767 사이 (23.8 cM)에 위치하며 LOD는 4.8 이고, 표현형 변이의 14 %를 설명하고 있다.
- 5번 염색체상의 노균병 저항성 영역인 dm5.1 QTL은 DM5-641 마커 와 DM5-773 사이 (15.9 cM)에 위치하며 LOD는 6.1 이고, 표현형 변이의 18 %를 설명하고 있다..
- 개별 분자마커를 이용한 분산분석 결과 dm2.1 영역에 위치한 DM2-423 (P=0.00001: R²=12.45%) 와 dm5.1 영역에 위치한 DM5-396 (P=0.0000034: R²=14.81%) 들이 노균병 저항성 표현형과 제일 밀접한 연관관계를 보이는 것으로 밝혀졌다.

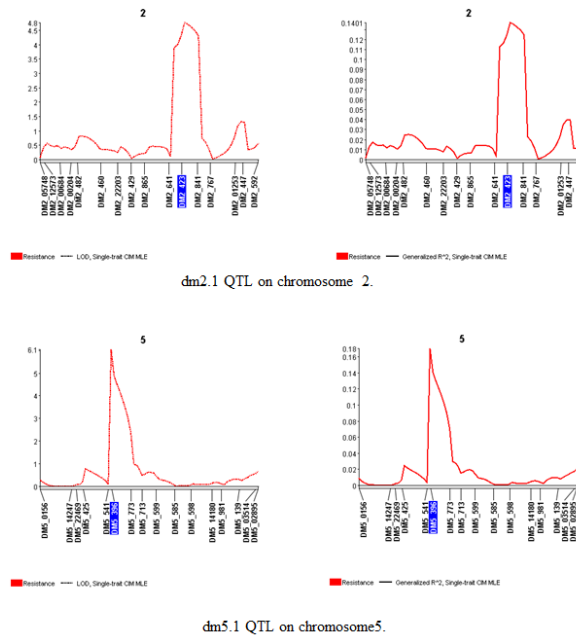


그림 69. 분자마커의 유전형과 F₂ 개체의 상관분석에 의한 연관마커 개발

8-4. 분자마커 활용 육종 계통 선발

○ 국내 시판 품종 대상 저항성 여부 검정

- 2013년도에 개발된 이병성 선발 마커 결과와 2014년도에 선발된 dm2.1, 과 dm5.2-3 기반 genotyping 결과 비교를 통해서 마커의 정확성 여부 판별과 시판 품종의 저항성 여부를 검정하였다.
- dm2.1 영역과 dm5.2 영역에서 통계적으로 노균병 저항성 유전자와 제일 연관된 것으

로 나타난 DM2-865, DM5-713 과 이들 영역을 flanking 하는 dm5-436, dm2-482 마커를 활용하여 저항성 여부를 검정하였다 (그림 70).

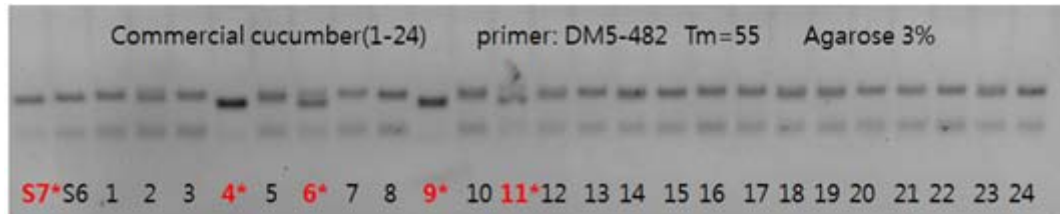


그림 70 . 시판 품종 대상의 마커 적용.

<DM5-482 유래 프라이머를 이용해서 PCR 밴드를 증폭한 후, 3% agarose gel에 전기영동 실시. 밴드 패턴을 보고 genotype scoring 실시해서 * 표시가 있는 품종은 노균병 저항성에 증용한 역할을 하는 5번 염색체 일부분을 가지는 있음을 나타냄>

- 분석 결과 아래 표 33 과 같은 결과를 얻었다. 이병성 자원은 2013년에 개발된 이병성 개체 선발 마커와 2014년도 신규 개발된 마커 적용 시 나타난 결과가 동일하였다. 하지만 2013년도에 저항성으로 나타난 개체 중에서 2014년도 개발된 마커를 적용한 결과 1번, 5번, 8번 품종처럼 저항성을 조절하는 염색체 영역이 도입되지 않는 품종이 발견되었음. 2번, 4번, 6번, 9번 품종의 경우는 노균병 저항성을 조절하는 2번과 5번 염색체 부분이 도입되어서 저항성을 보이는 것으로 판단된다.

표 33. 국내 시판 품종의 dm2.1 과 dm5.2 영역 유래 마커에 의한 저항성 여부 검정표

번호	품종명	회사	'13년 (2차년도 결과) 저항성 여부	'14년 (3차년도 결과)			
				5번 염색체		2번 염색체	
				dm5-713	dm5-436	dm2-482	dm2-865
1	XXX	중국	high tolerance	6	6	6	6
2	XXX	중국	high tolerance	6	7	6	6
3	XXX	중국	high tolerance	6	6	6	6
4	드레곤삼척오이	코레곤종묘	tolerance	6	6	7	6
5	장백칩다다기	팍한농	tolerance	6	6	6	6
6	백칩다다기오이	홍농씨앗	tolerance	6	6	7	7
7	백미백다다기오이	코레곤종묘	tolerance	6	6	6	7
8	한성백다다기	팍한농	tolerance	6	6	6	6
9	이화백칩다다기	팍한농	tolerance	6	6	7	7
10	품종_A	XXX회사	이병성	6	7	6	6
11	품종_B	XXX회사	이병성	6	6	7	6
12	품종_C	XXX회사	이병성	6	6	6	6
13	품종_D	XXX회사	이병성	6	6	6	6
14	품종_E	XXX회사	이병성	6	6	6	6
15	품종_F	XXX회사	이병성	6	6	6	6
16	품종_G	XXX회사	이병성	6	6	6	6
17	품종_H	XXX회사	이병성	6	6	6	6
18	품종_I	XXX회사	이병성	6	6	6	6
19	품종_J	XXX회사	이병성	6	6	6	6
20	품종_K	XXX회사	이병성	6	6	6	6
21	품종_L	XXX회사	이병성	6	6	6	6
22	품종_M	XXX회사	이병성	6	6	6	6
23	품종_N	XXX회사	이병성	6	6	6	6
24	품종_O	XXX회사	이병성	6	6	6	6

- 따라서 노균병 저항성 유전자원 선발이나 고정되지 않은 육종 계통을 대상으로 한 노균병 저항성 개체 선발 시에는 2013년(2차년도)에 개발된 이병성 개체 선별 마커를 통해 이병성 자원을 선발해서 육종 프로그램에서 도태시키고 저항성으로 여겨지는 개체들만 2014년(3차년도)에 개발된 마커를 적용해서 저항성 자원으로 선발하는 방식을 적용하였다.

○ 육성 계통을 대상으로 한 저항성 여부 검정

- 팜한농 육성 15 계통에 대해 마커 분석을 3차년도에 실시하였다 (그림 71).

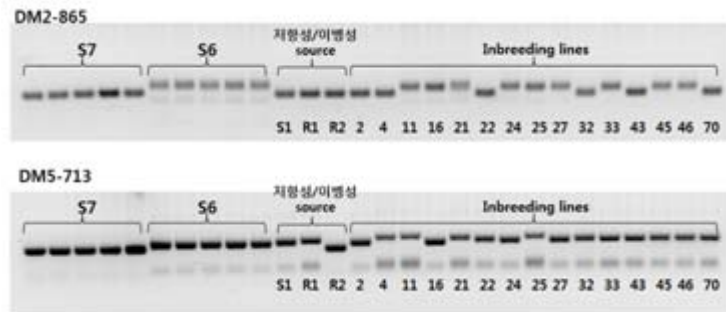


그림 71. 육종 계통을 대상으로 노균병 저항성 QTL 유래 마커를 이용한 genotyping 결과

- 그림 71의 S7은 본 과제의 mapping 집단 제작 시 사용된 저항성친이고, S6는 이병성친으로 사용되었다. 그리고 S1, R1, R2 노균병에 대한 저항성과 이병성 표준 품종들이고 육종에 도입하기 위해 계통 육성에 활용된 계통이다. 그리고 현재 육성 중인 15 계통이 활용되었다.
- 상기의 마커로는 충분한 정보를 확보하지 못해서, 그림 72 에 나타나는 것처럼. dm2.1 과 dm5.2-3 QTL 영역에 위치한 7 개 SSR 마커 (DM2-865, Dm2-482, DM2-460, DM5-436, DM5-713, DM5-598, DM5-CSWT17) 마커를 이용해서 분석을 실시했다. 분석 결과 나온 genotype 데이터와 phenotype data를 비교해보면 아래와 같은 결론을 도출하였다 (그림 72)

표현형 검정		2번 염색체			5번 염색체			
2011-08-17	2014-06-19	dm2-865	dm2-482	dm2-460	dm5-436	dm5-713	dm5-598	dm5-cswt17
6	7	7	7	7	6	7	7	6
5	6	7	7	7	6	6	7	6
5	5	6	7	7	7	6	7	6
5	5	6	6	6	7	6	6	7
3	6	7	7	6	6	6	6	7
7	8	6	7	7	7	6	7	6
5	8	6	6	6	6	7	7	6
6	7	6	7	7	7	6	7	6
	4	7	7	7	7	6	7	6
	5	6	7	7	6	6	7	6
	6	7	7	7	7	6	6	6
	5	6	7	7	7	6	6	6
	7	7	7	7	7	6	6	6
	5	7	7	6	7	6	6	7
5	7	6	6	6	6	7	6	6

그림 72. dm2.1, dm5. 2-3 영역의 SSR 마커 기반 유전형과 표현형 데이터 비교 분석 결과

- 그림 72 에서 보듯이 dm2.1, dm5.2-3 영역에서 제작된 마커 조합을 이용해서 노균병에 대한 반응 (이병성 인지 저항성 인지)를 정확히 예측하기는 힘든 상황이다. 이러한 결과가 발생한 이유는 여러 가지가 있겠지만 (1) 부정확한 표현형 스크리닝: 2011년과 2014년의 표현형 데이터가 불일치하는 경우가 있다 (2) QTL mapping에서 major QTL 영역의 합이 60% 미만이므로,

QTL 마커로 표현형 예측에 어려움이 상존하는데, 특히 사용된 마커는 연관 마커가 아니고 랜덤 마커 이므로 표현형 예측의 정확성에 필연적으로 한계를 보일 수밖에 없을 것 같다. 따라서 saturated QTL map을 작성해서 연관 마커를 확보할 필요성이 제기된다.

- 그림 72 에 나타난 데이터를 이용해서 표현형과 각 마커간의 상관 분석을 실시하여 표 34 같은 결과를 얻었다. 상관분석 결과 dm2-865와 dm5-713 마커는 상관계수가 각 0.22, 0.41로 표현형과 두 마커에 의한 유전형간의 일치도가 어느 정도 보이는 것을 알아냈다. 이는 이들 두 마커를 이용한 유전형 기반의 표현형 예측이 통계적으로 유의미하다는 것을 의미하지만, 추가적인 검정이 필요할 것으로 생각된다.
- 통계 분석 과는 별도로 그림 72 데이터를 분석해보면 3 가지 마커 (dm2-482, dm2-460, dm5-436) 조합을 이용하면 표현형과 60% 정도 일치함을 알 수 있다 (그림 72. 붉은 셀은 표현형과 유전형 일치, 녹색 셀은 불일치). 하지만 선발의 정확성이 떨어지므로 마커에 의해서만 선발하기에는 위험이 있으므로 추가적인 연관 마커 개발이 진행되어야 할 것 같다

표 34. 표현형과 유전형 분석에 사용된 마커 간의 상관분석 결과

	표현형	dm2-865	dm2-482	dm2-460	dm5-436	dm5-713	dm5-598	dm5-cs wt17
표현형	1.00							
dm2-865	0.22	1.00						
dm2-482	-0.07	0.47	1.00					
dm2-460	0.00	0.09	0.71	1.00				
dm5-436	-0.39	-0.05	0.27	0.29	1.00			
dm5-713	0.41	-0.13	-0.58	-0.35	-0.61	1.00		
dm5-598	0.05	-0.20	0.20	0.47	-0.22	0.13	1.00	
dm5-cs wt17	-0.27	0.20	-0.17	-0.71	0.07	-0.25	-0.53	1.00

- 두 종류의 마커 [2차년도 개발한 이병성 선발 마커와 3차년도 개발한 저항성 개체 선발 마커 (dm2.1, dm5.2-3 기반 마커)] 를 적용해서 육성 계통 선발에 보조 데이터로 활용하였다.
- 광한농에서 육성중인 국내 계통 450 계통과 인도/동남아 수출용 85 계통에 대한 마커 선발을 실시해서 포장 검정의 보조 데이터로 제공하였다. 하지만, 위에서 언급한 것처럼 블라인더 테스트 결과 정확도에 한계가 있어서 보조 자료로 활용하였다.
- 선발의 정확성을 가진 마커가 육성 계통 선발에 활용될 수 있으며, 이를 위해서는 saturated 된 map 에 기반 하여 연관 마커를 개발해야 하므로, recombinant 개체를 이용한 매핑집단에 의해 확보된 SNP map 을 활용해서 2번과 5번 염색체 상의 저항성 QTL 영역을 집중적으로 탐색해서 연관 마커를 개발해야 할 것으로 판단된다.
- 2015년도 광한농 에서 육성중인 계통을 대상으로 맹검법(blind test)을 적용하여 DM2-423, DM5-396 연관 마커 분석을 실시하였다(그림 73, 74).
- 아래 그림에 나타나는 것처럼 육종에 사용되는 유전자원을 올해 개발된 노균병 저항성 연관 마커 (DM2-423, DM5-396) 에 기반한 유전형 분석을 실시한 결과 표현형과 100%

일치하는 결과를 얻지는 못했다.

- DM2-423 의 불일치성 : 13.6% (3/22)
- DM5-396 의 불일치성 : 18.1% (4/22)
- DM2-423, DM5-396 동시 적용시 불일치성 : 27.2 %(6/22)

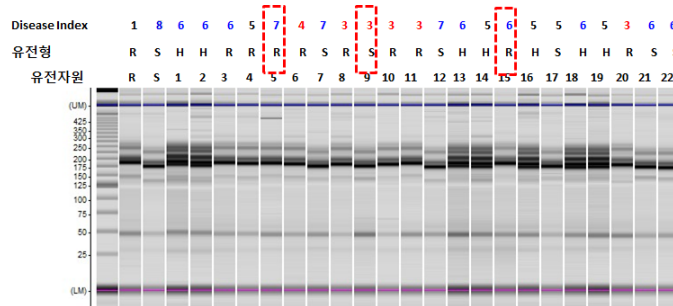


그림 73. DM2-423 마커 적용을 통한 유전형 분석 결과와 표현형 분석 결과 비교

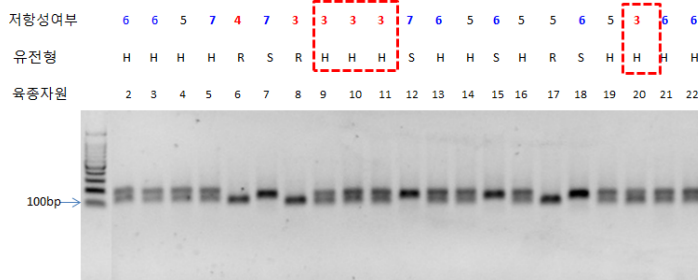


그림 74. DM5-396 마커 적용을 통한 유전형 분석 결과와 표현형 분석 결과 비교

- 연관마커에 의한 유전형과 표현형의 불일치성은 아마 본 연구 결과로 밝혀진 dm2-1, dm5-1 영역 이외에 minor 한 저항성 QTL 영역이 존재할 가능성이 있고, 이러한 minor QTL 영역의 유전형에 의해 표현형이 조절될 가능성이 있음을 생각할 수 있다.
- 아니면 현재 개발된 연관 마커가 노균병 저항성 영역에서 멀리 떨어진 위치에서 제작되어서 현재 마커의 유전형과 표현형 간에 연관 정도 낮기 때문일 가능성도 있음.
- 결론적으로, 현재 연관 마커를 이용한 선발의 정확성은 70% 이하이므로, 보다 선발의 정확성이 높은 연관 마커를 개발할 필요가 있다.
- 특히 dm2-1과 dm5-1 영역에 recombination 이 생긴 다양한 recombinant line을 개발하여 이들 RIL 라인을 mapping 자원으로 해서 선발의 정확도를 높인 마커를 개발하는 전략이 현재 진행중이고, 과제 종료 후에도 지속적으로 진행하여 노균병 저항성 유전자 마커 개발을 확보할 계획임

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

4-1. 목표달성도

연구개발목표	연구개발내용	달성도
실내 유묘 검정법 확립	- 표준 유전자원(PI197088)을 활용한 노균병 적정 접종 조건 규명 및 이를 활용한 저항성 개체 선발법 확립을 통한 노균병 저항성 개체 선발 실시	100%
포장 성체 선발법 확립	- 포장에서 노균병 발병 상태를 1~8 scale 로 표준 지수화 시키고, 이를 이용한 저항성 개체 선발법 확립을 통한 노균병 저항성 개체 선발 실시	100%
유전자원 수집 및 특성 조사	- 유묘검정, 포장검정을 병행하여 노균병 저항성 개체 선발을 실시함 - 수집 108개 자원 중에서 저항성지수가 1~2인 자원/계통 선발(가시오이 6, 백다다기 2, 동남아 슬라이서 9, BAP 1, PSL 2 선발함) - 노균병 저항성, 이병성 각 4 계통을 이용해 작성한 15 분리집단 중 1개 집단을 선발해서 유전자 지도, QTL mapping 작성을 통해 분자마커 개발에 활용함	100%
유전자지도 및 QTL 작성용 분리집단 육성	- 저항성 4개 계통과 이병성 4개 계통을 이용해 작성한 15종의 분리집단 중 백다다기 계통의 1개분리 집단(DM1271 x DM1246) 을 선발, 육성해서 분자마커 개발에 활용함	100%
오이 노균병원체 분석	- 오이 노균병원체 서열분석을 통한 변이체 선발을 실시한 결과 국내 포장에서 발견되는 병원체는 동일한 것으로 판단됨 - 오이에서 노균병 병징이 발생하기 전에 노균병원체를 진단하는 기법 개발(특허 등록)	100%
유전자 지도 작성	- 105 마커를 사용하여 전장 길이가 855.6 cM 이고 마커당 평균 거리가 8.7 cM 인 유전자 지도를 작성함	100%
노균병 저항성 QTL 분석	- 전통적인 QTL mapping을 실시해서 노균병 저항성을 조절하는 dm2-1, dm2-2, dm5-1 locus 를 규명함 - GBS 기반 QTL mapping을 실시해서 노균병 저항성을 조절하는 dm2-1, dm4-1, dm5-1, dm6-1 locus를 규명함 - 상기 QTL 중에서 dm2.2, dm4.1, dm5.1은 저항성이 저항성자원(TH118FLM) 에서 유래했고, dm6.1은 이병성자원(WMEJ) 에서 유래함을 밝힘 - F3 집단의 QTL 분석을 통해 노균병 저항성 major QTL은 dm2.1, dm2.2, dm5.1 이고 각각 노균병 저항성에 28.2, 10.8, 27.1 % 관여하는 것으로 분석됨 - 노균병 저항성 유전자 선발 작업이 진행중 - major QTL (dm2.1, dm2.2, dm5.1) 영역에 대한 recombinant 선발을 통한 RIL(recombination inbreed line) 과 Backcross line 육성을 통해 노균병 저항성 후보 유전자 선발과 이를 기반으로 분자마커를 개발함	100%

<p>노균병 저항성 연관마커 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> - NBS-LRR 유래 CAPS 마커 선발 <ul style="list-style-type: none"> - Csa2M008000-CAPS 마커 개발 - 저항성 개체에는 부정확하지만 이병성 개체는 어느 정도 일치하는 경향을 보임 - 특허 등록과 이병성 개체 선발에 활용 - QTL 분석 유래 연관마커 선발 <ul style="list-style-type: none"> - dm2.1 연관 마커: DM2-865, DM2-482 - dm5.1 연관 마커: DM5-436, DM5-713 - 상기 마커로 시판 품종을 스크리닝 했지만 일치하는 정도가 낮았음 - QTL 분석 유래 연관마커 선발 <ul style="list-style-type: none"> - 7개 SSR 마커(DM2-865, Dm2-482, DM2-460, DM5-436, DM5-713, DM5-598, DM5-CSWT17)를 저항성 개체 선발에 적용한 결과 정확하게 선발하기에는 무리이고, 이중 3 마커 (DM2-482, DM2-460, DM5-436) 조합에 의해서는 표현형과 60% 정도 일치하는 결과를 얻음 - 노균병 저항성 QTL 분석 결과 최소한 5개의 저항성 유전자(우성 혹은 열성 인자) 가 존재하므로 저항성 품종 개발을 위해서는 이들 5개 영역을 도입해야 하므로 이들 5개 영역에 대한 genotyping 이 가능함 마커 개발이 필요하고, 이를 위해서는 RIL, NIL 등에 기반한 마커 개발이 필요하므로 RIL 라인을 개발중임 	<p>100%</p>
<p>노균병 저항성 오이 계통 육성</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 수집자원 108점 중에서 저항성지수 1~2인 계통에는 가시오이 6 계통, 동남아 슬라이서 9 계통, 백다다기 2 계통, BAP 1 계통, PSL 2 계통으로 전체적으로 가시오이와 동남아 계통에서 다수의 저항성 자원을 선발해서 육종계통으로 육성함 - 240 육종계통(총 8,364 개체)를 대상으로 1차 674 개체를 선발하여 계통을 육성함 - 국내 품종 육성을 위해서 450 계통을 대상으로 46 계통(백다다기-27, 가시오이-14, 취청-5 계통), 국외 품종 육성을 위해서 85 계통을 대상으로 22 계통을 2차 선발함. - 3차 선발에서는 국내품종 개발용으로 27 계통(백다다기-12, 가시오이-9, 취청-6 계통)을 선발함 - 4차 선발에서는 품종 육성을 위하여 노균병 저항성 육종 계통 19점을 선발함. (원래 목표는 4 계통 선발) - 가시오이 6 계통, 취청오이 5 계통, 백다다기 8 계통 	<p>100%</p>
<p>노균병 저항성 오이 조합 작성</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 백다다기오이 145 조합에서 5개 조합을 1차 선발함. - 1차 선발 후 백다다기 250 조합을 육성해서 국내 품종 육성용 23 조합을 2차 선발하고, 국외 품종 육성용 85 조합에서 12 조합을 선발함 - 2차 선발 후 백다다기 151 조합을 육성해서 국내 품종 육성용 17 조합을 3차 선발함 - 3차 선발 후 백다다기 122 조합을 육성해서 국내 품종 육성용 6 조합을 선발함 (원래 목표 4 조합) 	<p>100%</p>

농가연락시험 및 노균병 저항성 품종 출원	<ul style="list-style-type: none"> - 장내 성능 검정에서 선발된 조합에 대해 농가(강원도 홍천) 연락시험을 3년간 실시하여 6개 시교조합(W31621, W31625, W5033, W5044, W6062, W6064)을 선발함 - 이 중에서 W6062를 수정백다다기로 생산판매신고를 하고, W6064는 시원백다다기로 품종보호출원을 실시함 - 현재도 농가연락시험이 진행 중이므로 추가적인 품종보호출원이 기대됨 	100%
------------------------------	---	------

4-2. 관련분야 기여도

○ 노균병원체 예찰

- 현재 오이 노균병원체(*P. cubensis*)는 대한민국을 포함하여 전 세계적으로 pathotype 6에 속하는 A2 mating type 이 주류를 이루고 있는 것으로 파악된다. 그리고 오이 열매나 종자를 통해서 노균병이 전염된다는 보고도 나타나고 있다. 따라서 오이 재배 포장에서 노균병 발병 가능성이 어느 때보다 큰 상황이고 농약을 통한 방제보다는 공기전염 등에 의한 노균병원체의 확산을 선제적으로 모니터링해서 노균병의 발생을 선제적으로 예방할 필요성이 제기된다.
- 따라서 노균병원체(*P. cubensis*)를 특이적으로 검출 할 수 있는 진단 시스템을 활용하여 오이 재배지역을 적절히 예찰하게 된다면 오이 노균병원체에 의한 피해를 최소화 할 수 있을 것으로 판단된다.

○ 노균병 실내검정 기술

- 노균병 저항성 개체 선발을 위한 실내검정 연구는 활발히 진행되었지만 육종 현장에서 활발히 활용되지 못하는 상황이다. 병원체 계통 유지의 어려움과 접종에 의한 균일한 병 발생의 어려움이 가장 큰 이유일 것이다. 그리고 실내에서 저항성으로 선발된 개체들이 실제 포장에서 저항성을 보이지 않는다는 점들도 육종 현장에 대한 적용을 어렵게 한다는 점이다. 하지만 본 연구에서는 유묘 검정과 포장 검정을 병행 실시하여 유묘 저항성과 성체 저항성을 동시에 가진 개체를 선발하는 방법을 적용하여 포장 저항성이 우수한 품종을 유도할 수 있을 것으로 판단된다.

○ 노균병 저항성 품종 개발

- 6개 시교조합(W31621, W31625, W5033, W5044, W6062, W6064) 중에서 W6062와 W6064를 대상으로 품종보호출원1 건과, 생산판매신고 1건이 실시되었다. 따라서 나머지 시교조합에 대한 추가적인 품종출원 이 기대된다.
- 본 과제를 통해서 인도/동남아 slice 오이 12 조합이 선발된 상태이므로 인도/동남아 현지 시교사업을 통해서 수출용 slice 오이 품종 육성이 기대된다.
- 그리고 본 과제에 참여하는 팜한농은 이미 오이 흰가루병 및 CMV 저항성과 내냉성 마

커 개발 및 품종 육성을 이미 수행하여, 관련 계통과 조합을 다수 보유하고 있다. 따라서 본 과제에서 개발된 계통이나 조합을 적용하면 국내와 동남아 수출용 복합 내병성 오이 개발에 걸리는 기간이 단축될 것으로 생각된다.

- 특히 전 세계적으로 동일한 타입의 병원체에 의해 노균병이 발병할 가능성이 있고, 현재 노균병 저항성 품종이 Nunem (특히 출원만 된 상태라 상품성이 어느 정도 인지 확인되지 않은 상황임)에서 특허 출원된 것 이외에는 현재까지 시장에는 출시되지 않은 상황이므로, 본 과제를 통해 개발된 다양한 계통 및 조합들을 적절히 활용하면 국외 오시 시장 진출에 큰 기여를 할 것으로 생각된다.
- 현재까지 P. R 40, PI 197087, PI 330628, PI 197088 들이 노균병 저항성 연구에 주로 많이 사용되고 있다. 이중 PI 197087 유래의 저항성은 이미 무너졌고, PI 330628, PI 197088 들이 미국에서 발견되는 *P. cubensis* isolate 에 강한 저항성을 나타내고 있다. 따라서 이들 자원을 육종에 도입하려는 시도가 미국을 중심으로 진행되고 있지만, 원예적 특성 (과형, 과피, 개화 불량) 에 약점이 있어서 육종에 도입되기에는 많은 문제점을 내포하고 있다. 최근에 미국에서 개발한 DMR-NY264 가 신규 노균병 race에 저항성과 양호한 원예 특성을 보이는 최초의 육성 계통으로 알려져 있다. 하지만 착과가 생육 후기에 시작되는 단점을 가지고 있어서 상용화 품종 개발에 어느 정도 적용될지는 아직도 미지수이다. 하지만 본 과제에서 사용한 저항성 자원은 인도 재래종을 자가수정 해서 고정시킨 계통을 사용했으므로, 원예적 특성이 우수한 장점이 있다. 따라서 품종 출시에 걸리는 시간을 미국이나 중국보다 훨씬 단축할 수 있는 점이 본 과제의 가장 큰 장점이라고 생각된다

○ 노균병 저항성 분자마커 개발

- 분자마커 개발의 최근 동향은 유전체 서열에 기반한 마커개발, GBS(genotype-based sequencing), GWAS(genome wide association mapping), SNP-seq(SNP sequencong) 이 활발히 이루어지고 있다. 따라서 본 과제를 생성된 다양한 유전체 정보들은 오이 분자 육종에 사용될 것으로 기대된다.
- 2013년 Zhang et al. 이 5 개의 노균병 저항성 QTL (dm1.1, dm5.1, dm5.2, dm5.3, dm6.1) 을 밝히고, Bai et al., 또한 4 개의 노균병 저항성 QTL (dm1.1, dm1.2, dm6.1, dm6.2)을 규명하였다. 그리고 Pang et al. 이 3 개의 QTL 영역을 밝혔다. 하지만 현재까지 연구된 대부분의 노균병 저항성 QTL 들이 PI 190787 유래의 저항성 자원에서 밝혀져 있고, PI 190787 은 최근 문제가 되는 *P. cubensis* 병원체에 대해 저항성이 강하지 못한 것이 문제점이다.
- 따라서 최근에는 PI330628 과 PI 190788에서 유래한 계통을 활용해서 QTL 분석 작업을 활발히 진행 중이고, 최근 들어서 연구 결과가 발표되는 상황이다. 하지만 두 결과 결과와 본 연구 결과를 종합하면 최소 5 개에서 11 개 QTL locus 가 저항성에 관여한다고 판단된다. 따라서 저항성 품종 육성에는 분자마커가 절대적으로 필요할 것으로 판단된다.

- 하지만 현재까지 QTL 분석을 기반으로 노균병 저항성 연관 마커가 개발되어 육종에 직접 사용되는 수준 까지 연구가 진행된 상황은 아닌 것으로 알려져 있다. 물론 본 연구에서도 QTL 분석 결과를 바탕으로 연관 마커 개발을 시도했지만 육종에 사용할 만한 수준의 마커 개발에 도달하지는 못했다. 따라서 본 연구를 통해 확보된 5개의 노균병 저항성 QTL locus 에 대한 RIL 혹은 Backcross line을 개발하는 후속 연구를 진행해서 QTL 영역을 최소화해서 노균병 저항성 유전자를 선발한다면 국제적으로 오이 노균병 저항성 품종 연구의 선두 그룹으로 자리매김 할 것으로 판단한다.

5. 연구결과의 활용계획

○ 실용화, 사업화 추진 방안

- W31621, W31625, W5033, W5044 시교조합들에 대한 농가연락시험 추진을 통해서 우수한 성능을 나타내는 조합에 대한 품종출시를 추진한다.
- 인도/동남아 슬라이서 오이 12 조합에 대한 인도/동남아 현지 시교사업을 추진해서 현지 시장 진출을 추진한다.
- *P. cubensis* 를 특이적으로 진단하는 마커 시스템을 기반으로 한 노균병 예찰 기법에 대한 기술 이전을 추진한다.
- 본 과제에서 개발된 이병성 개체 선발 마커를 활용한 오이 분자 육종을 추진하여 복합 내병성 오이품종 출시를 추진한다.

○ 논문 및 특허(지식재산권) 확보 방안

- 5 개의 QTL Locus 축소화를 통해 노균병 저항성 후보 유전자 발견에 대한 논문 및 특허 출원을 추진할 계획이다.

○ 타 연구에의 응용

- 본 연구를 통해 생산된 다양한 정보들(유전체 서열, 노균병 저항성 계통 및 조합, 분자 마커, QTL 분석 결과 등) 은 팜한농 에서 기존에 확보된 다양한 정보 및 자원들과 연계해서 국내외 시장 출시를 위한 복합 내병성 품종 개발에 활용될 것이다.
- 현재 본 연구진은 향후 4년 동안 박과작물 저항성 분자육종 시스템 구축(흰가루병 대상) 에 참여하기 때문에 본 연구 과제 결과를 연계해서 복합 내병성 품종 개발을 추진하는 방향으로 본 연구 과제 결과를 활용하고, 본 과제 수행을 통해서 확보한 정보나 경험을 향후 과제 수행에 적용할 계획이다.

○ 추가 연구의 필요성

- 노균병은 현재 전 세계 오이 재배 농가에서 심각한 문제점을 야기하고 있다. 특히 최근 들어 세계적으로 동일한 병원체가 노균병을 발병시키는 것으로 추정되는 상황이 발견되고 있고, 종자 및 열매를 통한 전염을 통해서 ioslate 들이 전 세계적으로 광범위하게 확산되는 추세이다.
- 따라서 국내 자생 *P cubensis* isolate 에 대한 연구를 통해서 노균병원체에 대한 체계적인 정보를 확보할 필요가 있으므로 이 분야에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.
- 노균병원체 종자 감염에 대한 소독 방안이나, 검역 시스템 개발, 및 예찰 시스템 개발 등에 대한 연구가 필요할 것으로 판단된다.
- 노균병원체 활물 기생이므로 인공 기배 배양 및 정확한 인공 접종 방안 등에 대한 체계적인 연구도 필요할 것으로 판단된다.
- 노균병원체에 대한 체계적인 race 정보가 확보되면, 각 race 별 저항성 자원을 스크리닝 하는 연구도 필요할 것으로 판단된다.
- 노균병 저항성은 최소 5 ~ 11 개의 우성 및 열성 인자 들에 의해 조절되는 복잡한 기작이다. 따라서 저항성 품종 효율적인 개발의 위해서는 분자마커가 반드시 필요하고, 본 과제에서는 5 개의 노균병 저항성 QTL locus를 선발하였기 때문에 현재 확보된 저항성 QTL locus 영역을 최소화 시키는 연구 (RIL 혹은 Backcross line을 활용한 QTL 분석 이후 candidate gene 확보 및 positional cloning) 추진이 필요할 것으로 판단된다.

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 박과 작물에 노균병을 일으키는 *P. cubensis* 가 전 세계적으로 확산되면서 막대한 피해를 입히는 추세임. 특히 과거보다 노균병에 의해 피해가 더 심해지고 전 세계적으로 문제를 일으키는 상황임.

Population Biology

Resurgence of *Pseudoperonospora cubensis*: The Causal Agent of Cucurbit Downy Mildew

Yigal Cohen, Kyle M. Van den Langenberg, Todd C. Wehner, Peter S. Ojiambo, Mary Hausbeck, Lina M. Quesada-Ocampo, Aleš Lebeda, Helge Sierotzki, and Ulrich Gisi

First author: Faculty of Life Sciences, Bar-Ilan University, Ramat-Gan, 52100, Israel; second and third authors: Department of Horticultural Science, North Carolina State University, Raleigh 27695; fourth and sixth authors: Department of Plant Pathology, North Carolina State University, Raleigh 27695; fifth author: Department of Plant, Soil, and Microbial Sciences, Michigan State University, East Lansing 48824-1312; seventh author: Palacký University, Faculty of Science, Department of Botany, 78371 Olomouc, Czech Republic; eighth and ninth authors: Syngenta Crop Protection AG, CH-4432 Stein, Switzerland; and ninth author: Department of Environmental Sciences, Institute of Botany, University of Basel, CH-4056 Basel, Switzerland.
Accepted for publication 25 March 2015.

ABSTRACT

Cohen, Y., Van den Langenberg, K. M., Wehner, T. C., Ojiambo, P. S., Hausbeck, M., Quesada-Ocampo, L. M., Lebeda, A., Sierotzki, H., and Gisi, U. 2015. Resurgence of *Pseudoperonospora cubensis*: The causal agent of cucurbit downy mildew. *Phytopathology* 105:998-1012.

The downy mildew pathogen, *Pseudoperonospora cubensis*, which infects plant species in the family Cucurbitaceae, has undergone major changes during the last decade. Disease severity and epidemics are far more destructive than previously reported, and new genotypes, races, pathotypes, and mating types of the pathogen have been discovered in populations from around the globe as a result of the resurgence of the disease. Consequently,

disease control through host plant resistance and fungicide applications has become more complex. This resurgence of *P. cubensis* offers challenges to scientists in many research areas including pathogen biology, epidemiology and dispersal, population structure and population genetics, host preference, host-pathogen interactions and gene expression, genetic host plant resistance, inheritance of host and fungicide resistance, and chemical disease control. This review serves to summarize the current status of this major pathogen and to guide future management and research efforts within this pathosystem.

Additional keywords: disease outbreak, population changes.

INTRODUCTION AND PATHOGEN BIOLOGY

One of the plant groups with the most species used as human food is the family Cucurbitaceae. Such plants are grown around the tropics and in temperate areas, where those with edible fruits were among the earliest cultivated plants both in the Old and New World. Vegetable gardens, including melon and watermelon, constituted an integral element in food production in the old world since the fourth millennium BC (Zohary et al. 2012). Domestication of *Cucurbita* has occurred in southern Mexico more than 7,000 years ago (www.hort.purdue.edu). Cucumber is an important food source for more than 5,000 years (Robinson and Decker-Walters 1997). Today, cucumbers are cultivated throughout most temperate and tropical climates and are the fourth most widely grown vegetable crop behind tomato, cabbage, and onion (Tatlioglu 1993). In 2013, the U.S. farm value of cucumber production was approximately \$363 million, with approximately 3.6×10^5 tons produced for the fresh and pickling market (USDA, 2013). Up to 100% reduction in cucumber yield is possible when downy mildew strikes early and fungicides are not used. If fungicides are applied 1 week after symptom appearance, yield is reduced approximately 50% (Holmes et al. 2015).

Disease cycle and purpose of study. Downy mildew is a major disease of cucurbits with a global distribution (Palti and Cohen

chlorotic lesions on upper leaf surfaces that can be irregular or angular depending on the affected host and in many cases, sporulation on the lower leaf surface is present (Fig. 1). Basic information on the biology, epidemiology, and control of the disease has been published in several review articles (Lebeda and Cohen 2011; Palti and Cohen 1980; Savory et al. 2011). The pathogen preferentially overwinters in areas without killing frost. In early spring, aurally dispersed sporangia land on the adaxial leaf surfaces. If free moisture is available for ≥ 2 h, the sporangia release biflagellate zoospores that swim toward stomata where they encyst (Iwata 1949; Palti and Cohen 1980). Cystospores form a germ tube and then an appressorium for penetration. Hyphae grow into the intercellular space, colonize the mesophyll tissue, and establish intracellular haustoria for nutrient uptake (Fraymouth 1956; Voglmayr et al. 2004). It is likely these structures also deliver effector proteins to combat the host plant's defense response system (Tian et al. 2011; Whisson et al. 2007). Finally, sporangiophores emerge from stomata bearing sporangia at their tips (Fig. 2A) and are dispersed as either primary or secondary inoculum, continuing the disease cycle.

In the past decade, major changes in the population structure of *P. cubensis* have been described and new genotypes, races, pathotypes, and mating types were reported from around the globe. While the use of disease control products may enhance the build-up

- 오이 노균병을 유발하는 *Pseudoperonospora cubensis* 를 분자생물학적 방법으로 진단하기 위해서 미국 전역에서 수집된 다양한 isolate 와 가장 서열이 유사한 *Pseudoperonospora humuli* 에 대한 유전체 서열 정보를 확보해서 공개함
 - S. Withers, E. Gongora-Castillo, D. Gent, A. Thomas, P. S. Ojiambo, and L. M. Quesada-Ocampo (2016) Using Next-Generation Sequencing to Develop Molecular Diagnostics for *Pseudoperonospora cubensis*, the Cucurbit Downy Mildew Pathogen. *Phytopathology* 106:1105-1116



Fig. 4. Using next generation sequencing to identify species-specific regions in *Pseudoperonospora cubensis* utilizing comparative genomics with the closely related species *P. humuli*. Seven species-specific regions (c52.12e13, c572.6e19, c2183.6e2, c2555.2e1, c2555.3e7, c3155.4e9, and c10851.1e0) are shown in the figure as columns with the gene functional annotation above each column and the candidate diagnostic code below each column. The *P. cubensis* genome panel shows predicted genes in the *P. cubensis* genome that are absent or have missing exons in the *P. humuli* genome. RNA-seq was performed in a diverse panel of *P. cubensis* (CA08A1, SC1982, NC2013C3, SC2013F2, NCA11, NCWAY2-1, and SCD3) and *P. humuli* (OR501BA, NY482CA, VT503A3, JP490-5, JP498SA, WI510-1, and OR502AA).

- 누뎀에서 오이 노균병 저항성 품종에 대한 특허 출원 (2015) : 하지만 확실하지 않음



US 20160007550A1

(19) **United States**
 (12) **Patent Application Publication** (10) **Pub. No.: US 2016/0007550 A1**
Johannes (43) **Pub. Date: Jan. 14, 2016**

(54) **CUCUMBER VARIETY NUN 43003 CUL** **Publication Classification**
 (71) Applicant: **Nunhems B.V., Haelen (NL)** (51) **Int. Cl.**
A01H 5/08 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 1/02 (2006.01)
 (72) Inventor: **Robert Hubertus Johannes, Nunhem (NL)** (52) **U.S. Cl.**
CPC ... A01H 5/08 (2013.01); A01H 1/02 (2013.01);
C12N 15/8289 (2013.01); C12N 15/8274
(2013.01); C12N 15/8286 (2013.01); C12N
15/8279 (2013.01); C12N 15/8271 (2013.01);
C12N 15/8245 (2013.01); C12N 15/8251
(2013.01)

(21) Appl. No.: **14/857,984**
 (22) Filed: **Sep. 18, 2015**

Related U.S. Application Data (57) **ABSTRACT**
 (60) Provisional application No. 62/218,666, filed on Sep. 15, 2015. The invention relates to the field of *Cucumis sativus*, in particular to a new variety of *Cucumis sativus* designated NUN 43003 CUL plants, seeds and cucumber fruits thereof.

○ 미국 위스콘신 그룹에서 노균병 저항성 QTL 영역을 규명함

- Wang, Y., VandenLangenberg, K., Wehner, T.C. et al. QTL mapping for downy mildew resistance in cucumber inbred line WI7120 (PI 330628) Theor Appl Genet (2016) 129: 1493.

[Theor Appl Genet](#). 2016 Aug;129(8):1493-505. doi: 10.1007/s00122-016-2719-x. Epub 2016 May 4.

QTL mapping for downy mildew resistance in cucumber inbred line WI7120 (PI 330628).

[Wang Y¹](#), [VandenLangenberg K²](#), [Wehner TC²](#), [Kraan PA³](#), [Suelmann J³](#), [Zheng X⁴](#), [Owens K⁴](#), [Weng Y^{5,6}](#).

⊕ Author information

Abstract

KEY MESSAGE: Host resistance in WI7120 cucumber to prevailing downy mildew pathogen field populations is conferred by two major-effect, one moderate-effect and two minor-effect QTL. Downy mildew (DM) caused by the obligate oomycete *Pseudoperonospora cubensis* is the most devastating fungal disease of cucumber worldwide. The molecular mechanism of DM resistance in cucumber is poorly understood, and use of marker-assisted breeding for DM resistance is not widely available. Here, we reported QTL mapping results for DM resistance with 243 F2:3 families from the cross between DM-resistant inbred line WI7120 (PI 330628) and susceptible '9930'. A linkage map was developed with 348 SSR and SNP markers. Phenotyping of DM inoculation responses were conducted in four field trails in 2 years at three locations. Four QTL, dm2.1, dm4.1, dm5.1, and dm6.1 were consistently and reliably detected across at least three of the four environments which together could explain 62-76 % phenotypic variations (R (2)). Among them, dm4.1 and dm5.1 were major-effect QTL (R (2) = 15-30 %) with only additive effects; dm2.1 (R (2) = 5-15 %) and dm6.1 (R (2) = 4-8 %) had moderate and minor effects, respectively. Epistatic effects were detected for dm2.1 and dm6.1 with both dm4.1 and dm5.1. One additional minor-effect QTL, dm6.2 (R (2) = 3-5 %) was only detectable with the chlorosis rating criterion. All alleles contributing to DM resistance were from WI7120. This study revealed two novel QTL for DM resistance and the unique genetic architecture of DM resistance in WI7120 conferring high level resistance to prevailing DM populations in multiple countries. The effects of disease rating scales, rating time and criteria, population size in phenotyping DM resistance on the power of QTL detection, and the use of DM resistance in WI7120 in cucumber breeding were discussed.

PMID: [27147071](#) DOI: [10.1007/s00122-016-2719-x](#)

[PubMed - in process]



7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○ 연구 결과 공개 가능		

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

- 해당사항 없음

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

○ 연구실 안전 점검 체계 구축 및 실시

A. 실험실 안전 점검 체계를 구축함

※ 위험등급별로 환경안전점검을 단계별로 체계화하여 관리를 실시함

※ 관리위험등급의 지정 상황: 본 연구실은 B 등급에 해당함

- A등급 : 가연성가스, 인화성 시약, 유해화학물질, 다량의 폐액배출, 독극물, 생물 및

동물, 방사성 동위원소, 위험성이 높은 기계장비가 설치된 실험실

- B 등급 : 일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성가스, 소량의 폐수발생실험실
- C 등급 : 이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터 관련 실험실

B. 실험실 정밀안전진단을 실시함

- 대상 : 연구개발활동에 유해화학물질 관리법 제2조 7호에 따른 유해화학물질을 취급하는 연구실, 산업안전보건법 제39조에 따른 유해인자를 취급하는 연구실, 과학기술부령이 정하는 독성가스를 취급하는 연구실
- 실시 : 2년마다 1회 실시하여 교육과학기술부에 보고

○ 교육 훈련을 실시함

A. 개요: 실험실의 안전을 확보하고 종사자의 건강을 보호하여 실험 및 연구활동에 기여하고, 또한 연구실 안전환경조성에 관한 법률에 의거하여 실험실의 환경안전교육이 의무화됨에 따라 이공계열 대학원생 및 관련자 전원은 환경안전교육을 의무적으로 수강

B. 교육대상: 교수, 대학원생, 실험조교, 소속연구원, 실험참여 학부생

C. 교육 이수과정

- 1단계 : 공통이수과목(등록실험실전체)

D. 교육구분: 아래 정기 교육과 비정기 교육을 실시함

- 정기교육 : 방학기간 중 2회 출석 수업 실시
- 비정기 임시교육 :
 - o 대상: 새로운 실험과정의 신설시, 연구소의 신설시, 교육 미 이수자(신입 대학원생, 전담직원, 연구원, 업체직원, 유해물질 취급자 등)
 - o 방법: 사이버 교육 환경안전교육 등(홈페이지 개설 동영상교육), 자료/유인물, 외부 온라인상, 외부강사, 전문교육기관의뢰 등

○. 보험 가입 현황

보 험 명	보 상 내 용	대 상	주관부서
재산종합보험 (종합패키지 보험)	재산종합위험담보 : 2조 5천 6백억원 (신체배상책임보험 특별약관포함)	피보험자	설비안전팀
	대인대물일괄 : 20억원-사고당 제3자 치료비 보상: 1천만원/인당, 8천만원/사고당 학생교내외치료비: 1천5백만원/인당, 8천만원/사고당	전체 제3자 보상 학생	" "
학생단체 상해보험	상해사망, 후유장해 : 2억원 의사상자 상해위험 : 1억원 상해, 후유정도에 따른 보상 : 약관보상 연구활동종사자보험 포함(특별약관)	학부생, 대학원생	학생복지처
교직원 단체안심보험	사망, 후유장해, 질병사망 : 1억원/인 의료비지원 - 암치료비 : 1천만원/인당 - 입원의료비지원 : 3천만원/인당 - 상해의료실비 : 2백만원/인당	교직원	인사팀

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	품종	시원백다다기	팜한농	육성자	대한민국		공고번호 2016-725/ 출원번호 2016-608	단독	
2	논문	QTL mapping for downy mildew resistance in cucumber via bulked segregant analysis using next-generation sequencing and conventional methods	세종대학교	교신저자	Theoretical and Applied Genetics	3.900	2016.10	단독	SCI/0
3	논문	Identification of Pseudoperonospora cubensis using real-time PCR and high resolution melting (HRM) analysis	세종대학교	교신저자	Journal of General Plant Pathology	1.120	2016.03.31	단독	SCI/0
4	논문	Development and characterization of a co-dominant molecular marker via sequence analysis of a genomic region containing the Female (F) locus in cucumber (Cucumis sativus L.)	세종대학교	교신저자	Molecular Breeding	2.246	2015.12.31	단독	SCI/0
5	특허	오이 노균병 저항성 개체 선별용 분자 마커 및 이를 이용한 선별방법	세종대학교	주발명자	대한민국		2015.01.29	단독	

11. 기타사항

코드번호	D-13
○	

12. 참고문헌

Arends D, Prins P, Jansen RC, Broman KW (2010) R/qrtl: high-throughput multiple QTL mapping. *Bioinformatics* 26:2990-2992

Becker A, Chao DY, Zhang X, Salt DE, Baxter I (2011) Bulk segregant analysis using

single nucleotide polymorphism microarrays. PLoS One 6:e15993

- Broman KW, Wu H, Sen S, Churchill GA (2003) R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19: 889–890
- Call AD, Criswell AD, Wehner TC et al (2012a) Resistance of cucumber cultivars to a new strain of cucurbit downy mildew. *HortSci* 47:171–178
- Call AD, Criswell AD, Wehner TC et al (2012b) Screening cucumber for resistance to downy mildew caused by *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. and Curt.) Rostov. *Crop Sci* 52:577–592
- Chen T, Cohen Y (2013) Isolate–dependent inheritance of resistance to downy mildew in cucumber (Abstracts of Presentations at the 34th Congress of the Israeli Phytopathological Society). *Phytoparasitica* 41:462
- Cohen Y, Meron I, Mor N, Zuriel S (2008) A new pathotype of *Pseudoperonospora cubensis* causing downy mildew in cucurbits in Israel. *Phytoparasitica* 31: 458–466
- Cohen Y, Van den Langenberg KM, Wehner TC, Ojiambo PS, Hausbeck M, Quesada–Ocampo LM, Lebeda A, Sierotzki H, Gisi U (2015) Resurgence of *Pseudoperonospora cubensis*: The Causal Agent of Cucurbit Downy Mildew. *Phytopathology*. 105:998–1012
- Dhillon NPS, Pushpinder PS, Ishiki K (1999) Evaluation of landraces of cucumber (*Cucumis sativus* L.) for resistance to downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*). *Plant Genet Resour Newsl* 119:59–61
- Dijkhuizen A (1994) Application of restriction fragment length polymorphism for the assessment of genetic variation and study of quantitatively inherited traits in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Ph.D. Dissertation, University of Wisconsin–Madison pp 123
- Ding G, Qin Z, Zhou X, Fan J (2007) RAPD and SCAR markers linked to downy mildew resistance genes in cucumber. *Acta Botanica Boreali–Occidentalia Sinica* 27:1747–1751 (in Chinese)
- Doruchowski RW, Łazkowska–Ryk E (1992) Inheritance of resistance to downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis* Berk. & Curt.) in *Cucumis sativus*. In: Doruchowski RW (ed) Proceedings of the V Eucarpia Cucurbitaceae Symposium. Poland, Skierniewice–Warszawa, pp 132–138
- Epinat C, Pitrat M (1994) Inheritance of resistance to downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) in muskmelon (*Cucumis melo*). I. Analysis of a 8×8 diallel table. *Agronomie* 14:239–248
- Fanourakis NE (1984) Inheritance and linkage studies of the fruit epidermis structure and

investigation of linkage relations of several traits and of meiosis in cucumber. Ph.D. Dissertation, University of Wisconsin–Madison

- Han Y, Lv P, Hou S, Li S, Ji G, Ma X, et al (2015) Combining Next Generation Sequencing with Bulk Segregant Analysis to Fine Map a Stem Moisture Locus in Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). PLoS One 10(5): e0127065. doi:10.1371/journal.pone.0127065
- He X, Li YH, Pandey S, Yandell BS, Pathak M, Weng Y (2013) QTL mapping of powdery mildew resistance in WI 2757 cucumber (*Cucumis sativus* L.). Theor Appl Genet 126:2149–2161
- Huang S, Li R, Zhang Z, et al (2009) The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. Nat Genet 41:1275–1281
- Kaminski KP, Korup K, Andersen MN, Sonderkaer M, Andersen MS, Kirk HG, Nielsen KL (2016) Next generation sequencing bulk segregant analysis of potato support that differential flux into the cholesterol and stigmasterol metabolite pools is important for steroidal glycoalkaloid content. Potato Research 59:81–97
- Kozik EU, Klosin´ska U, Call AD, Wehner TC (2013) Heritability and genetic variance estimates for resistance to downy mildew in cucumber accession Ames 2354. Crop Sci 53:177–182
- Lebeda A, Cohen Y (2011) Cucurbit downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*)—biology, ecology, epidemiology, host–pathogen interaction and control. European Journal of Plant Pathology 129: 157–192
- Lebeda A, Prasil J (1994) Susceptibility of *Cucumis sativus* cultivars to *Pseudoperonospora cubensis*. Acta Phytopathol Entomol Hung 29:89–94
- Lee J–S, Han K–S, Lee S–C, Soh J–W (2013) Screening for resistance to downy mildew among major commercial cucumber varieties. Res Dis 19(3):188–195 (**in Korean**)
- Magwene PM, Willis JH, Kelly JK (2011) The statistics of bulk segregant analysis using next generation sequencing. PLoS Comput Biol 7:e1002255
- Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV (1991) Identification of markers linked to disease–resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc Natl Acad Sci USA 88:9828–9832
- Mitchell MN, Ocamb CM, Grünwald NJ, Mancino LE, Gent DH (2011) Genetic and pathogenic relatedness of *Pseudoperonospora cubensis* and *P. humuli*. Phytopathology 101:805–818.

- Olczak–Woltman H, Marcinkowska J, Niemirowicz–Szczytt K (2011) The genetic basis of resistance to downy mildew in Cucumis spp.—latest developments and prospects. J Appl Genetics 52:249–255
- Olczak–Woltman H, Marcinkowska J, Niemirowicz–Szczytt K (2011) The genetic basis of resistance to downy mildew in Cucumis spp.—latest developments and prospects. J Appl Genet. 52:249–255. .
- Palti J, Cohen Y (1980) Downy mildew of cucurbits (*Pseudoperonospora cubensis*). The fungus and its hosts, distribution, epidemiology and control. Phytoparasitica 8:109–147
- Pang X, Zhou X, Wan H, Chen J (2013) QTL mapping of downy mildew resistance in an introgression line derived from interspecific hybridization between cucumber and *Cucumis hystrix*. J Phytopathol 161:536–543
- Ren Y, Zhang Z, Liu J et al (2009) An integrated genetic and cytogenetic map of the cucumber genome. PLoS One 4:e5795
- Shettya NV, Wehnera TC, Thomasb CE, Doruchowskic RW, Shettyd KPV (2002) Evidence for downy mildew races in cucumber tested in Asia, Europe, and North America. Scientia Horticulturae 94:231–239
- Shimizu S, Kanazawa K, Kato A, Yokota Y, Koyama T (1963) Studies on the breeding of cucumber for resistance to downy mildew. Part 3. Genetic observations for the resistance to downy mildew and other fruit characters. Bull Hort Res Sta A 2:65–81 (in Japanese with English abstract)
- Summers CF, Gulliford CM, Carlson CH, Lillis JA, Carlson MO, Cadle–Davidson L, Gent DH, Smart CD (2015) Identification of Genetic Variation between Obligate Plant Pathogens *Pseudoperonospora cubensis* and *P. humuli* Using RNA Sequencing and Genotyping–By–Sequencing. PLoS One 10:e0143665.
- Szczechur W, Staniaszek M, Klosinska U, Kozik E (2015) MOLECULAR ANALYSIS OF NEW SOURCES OF RESISTANCE TO *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. et Curt.) Rostovzev in CUCUMBER..51:1134–1140.
- Szczechura W, Staniaszek M, Klosinska U, Kozik EU (2015) Molecular analysis of new sources of resistance to *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. et Curt.) Rostov. in cucumber. Russian J Genet 51:974–979
- Takagi H, Abe A, Yoshida K, Kosugi S, Natsume S, et al (2013) QTL–seq: Rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. Plant J (on line first) doi: 10.1111/ tpj.12105
- Thomas C, Staub JE, Horejsi T (2000) Linkage of random amplified polymorphic DNA markers to downy mildew resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Euphytica 115: 105–113

- Trick M, Adamski NM, Mugford SG, Jiang C-C, Febrer M, Uauy C (2012) Combining SNP discovery from next-generation sequencing data with bulked segregant analysis (BSA) to fine-map genes in polyploidy wheat. *BMC Plant Biol* 12:14
- Vandenlangenberg KM (2015) Studies on downy mildew resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Ph.D. Dissertation, University of North Carolina State University
- Wang Y, VandenLangenberg K, Wehner TC, Kraan PA, Suelmann J, Zheng X, Owens K, Weng Y (2016) MOLECULAR ANALYSIS OF NEW SOURCES OF RESISTANCE TO *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. et Curt.) Rostovzev in CUCUMBER. *Theor Appl Genet*. 129:1493-1505
- Wang Y, VandenLangenberg K, Wehner TC, Kraan PAG, Suelmann J, Zheng X, Owens K, Weng Y (2016) QTL mapping for downy mildew resistance in cucumber inbred line W17120 (PI 330628). *Theor Appl Genet* doi:10.1007/s00122-016-2719-x
- Yoshioka Y, Sakata Y, Sugiyama M, Fukino N (2014) Identification of quantitative trait loci for downy mildew resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Euphytica* 198:265-276
- Zhang S, Liu MM, Miao H et al (2013) Chromosomal mapping and QTL analysis of resistance to downy mildew in *Cucumis sativus*. *Plant Dis* 97:245-251
- Zhang WW, Pan JS, He HL, Zhang C, Li Z, Zhao JL, Yuan XJ, Zhu LH, Huang SW, Cai R (2012) Construction of a high density integrated genetic map for cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Theor Appl Genet* 124:249-259
- 박기환, 신성철, 김창수, 이병훈, 최기림 (2016) 과채 수급 동향과 전망 in 농업전망 2016, 467-519
- 이중섭, 한경숙, 이성찬, 소재우 (2013) 주요 오이 품종의 노균병에 대한 저항성 검정. *식물병 연구* 19:188-195

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 **농생명산업기술개발사업**의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 **농생명산업기술개발사업**의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.