

**농
생
명
사
업**

**R
&
D**

**R
e
p
o
r
t**

발 간 등 록 번 호

11-1543000-001719-01

**시설재배에 적합한 복합내병성,
단절간 호박품종의 개발보급**

최종보고서

2017 . 3 . 24 .

주관연구기관 / 흥익바이오

협동연구기관 / 강원도농업기술원
경희대학교

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “시설재배에 적합한 복합내병성, 단절간 호박품종의 개발보급”
(개발기간 : 2011. 12. ~ 2016. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 02. 10.

주관연구기관명 : 흥익바이오 (서상기)
협동연구기관명 : 강원도농업기술원 (권순배)
경희대학교 (박영두)



주관연구책임자 : 서상기
협동연구책임자 : 권순배, 박영두

보고서 요약서

과제고유번호	111165-05	해당 단계 연구 기간	2011. 12 ~ 2016. 12. (5년)	단계 구분	(해당단계)/ (1단계)
연구사업명	중사업명	농생명사업			
	세부사업명				
연구과제명	대과제명				
	세부과제명	시설재배에 적합한 복합내병성, 단절간 호박품종의 개발보급			
연구책임자	서상기	해당단계 참여 연구원 수	총: 59 명 내부: 49 명 외부: 10 명	해당단계 연구개발 비	정부: 700,000 천원 민간: 234,000 천원 계: 934,000 천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 59 명 내부: 49 명 외부: 10 명	총 연구개발 비	정부: 700,000 천원 민간: 234,000 천원 계: 934,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	홍익바이오 연구소			참여기업명	홍익바이오
협동연구	연구기관명: 강원도농업기술원			연구책임자: 권순배	
	연구기관명: 경희대학교			연구책임자: 박영두	
요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)				보고서 면수 118p	

국문 요약문

		코드번호	D-01		
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내에 주로 재배되는 애호박과 주키니 호박은 흰가루병과 바이러스병에 취약하여 재배농가에 많은 어려움이 있었다. 바이러스(WMV, ZYMV)와 흰가루병에 강하고 질성이 높은 애호박과 주키니 호박품종을 개발 보급하는 것이 본 과제의 목표이며 그 내용은 다음과 같다. ○ 바이러스와 흰가루병에 강하면서 품질이 우수한 애호박 및 주키니 호박품종의 개발 ○ 복합내병성 품종육성을 위한 내병성 관련 mapping 집단 육성 ○ 바이러스(WMV, ZYMV)와 흰가루병 내병성 진단 및 바이러스 신속진단키트 개발 ○ 바이러스(WMV, ZYMV)와 흰가루병 내병성관련 분자마커 개발 ○ 개발된 바이러스 진단키트 및 내병성 관련 분자마커를 품종육성과 농가 서비스에 이용 				
연구개발 성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 우수계통 50계통 이상 선발 및 600개 이상의 교배조합작성 및 성능검정 ○ 교배친화성 및 종자생산능력검정실시 후 최종 선발함 ○ WMV, ZYMV 내병성 검정기술개발 및 바이러스 내병성 20여계통 선발 ○ 흰가루병 발병조건 확립 및 내병성 10여 계통의 선발 ○ 호박바이러스(WMV, ZYMV) 진단키트개발 및 농가서비스 실시 ○ 바이러스와 흰가루병에 대한 내병성 관련 mapping 집단 육성 ○ 바이러스 및 흰가루병 내병성 관련 분자마커 개발 ○ 농가 및 소비자 선호 품종특성에 대한 기초 설문조사 실시 ○ 애호박 및 주키니 호박 농가시험재배 10곳 이상 실시 ○ 30개 이상의 우수 30조합의 선발 ○ 우수한 10조합 이상 선발 및 시험용 종자생산 ○ 최종 선발된 조합의 품종보호 등록; 흰가루 내병계 애호박 1품종(파랑새애호박), 바이러스와 흰가루병에 강한 주키니호박(가야금주키니) 1 품종개발 ○ 지역별 농가시험재배 및 평가회; 최소 15회 이상 실시 ○ 농가현장방문, 신문, TV 등을 통한 홍보실시 ○ 제품포장 및 판매 실시 중임 				
연구개발 성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 개발된 신품종을 이용한 매출 확보 본 과제를 통해 개발된 흰가루병 내병계인 파랑새애호박과 바이러스병과 흰가루병에 강한 가야금주키니 호박품종에 대한 확대보급을 지속적으로 추진하여 국내 시장에서의 시장점유율 확보는 물론 매출을 극대화할 계획임 ○ 개발과정에 선발된 우수계통을 이용한 신품종 개발 본 과제를 통해 개발된 많은 우수계통을 활용한 차세대 우수품종개발이 지속적으로 이루어질 것이며, 향후 우리나라는 물론 세계호박시장에서의 입지를 강화할 수 있도록 노력할 것입니다. ○ 바이러스 진단키트를 이용한 농가현장서비스 및 바이러스와 흰가루병 내병성 품종의 개발에 효율적으로 이용 가능 ○ WMV, ZYMV 및 흰가루병 내병성 품종개발에 있어서 RAPD나 SCAR 마커가 유용하게 이용될 것이다. 				
중심어 (5개 이내)	호박	내병성 품종	바이러스병	흰가루병	유전자마커선발

〈SUMMARY〉

		코드번호	D-02			
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ○ Most squash varieties cultivating in Korea are susceptible to powdery mildew, watermelon mosaic virus (WMV), and zucchini yellow mosaic virus (ZYMV), which is a problem awaiting solution. The purpose of this study is to develop and distribute good varieties with resistance genes of the viruses and powdery mildew. The contents are as follows; ○ Development of squash varieties with a good quality as well as the resistance genes of WMV, ZYMV, and powdery mildew . ○ Development of mapping populations for the disease resistance. ○ Development of the highly effective methods for the diagnosis and infection of the major viruses (WMV, ZYMV) and powdery mildew disease in squash. ○ Selection of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and sequence characterized region (SCAR) markers for the diseases ○ Application of the diagnostic kit and molecular markers to the study and farmers' field 					
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ Selection of over 50 lines with a good characteristics, and the performance test of over 600 combinations ○ Selection of good combinations after testing the combining and seed production ability ○ Development of the diagnostic kit of WMV, ZYMV and application it to the farmers' field ○ Selection of over 20 lines with the virus resistance and 10 lines with powdery mildew resistance ○ Development of the mapping population of the viruses and powdery mildew ○ Development of RAPD and SCAR markers for the resistance of virus and powdery mildew in <i>C. moshata</i> and <i>C. pepo</i>. ○ Market research for the farmers and consumers ○ Selection of over 30 good combinations, and the performance test in over 10 farmers' field ○ The seed production of 10 good combinations for the performance test in farmers' field ○ Registration of one variety with both the viruses and powdery mildew resistance, and one variety with powdery mildew resistance for plant variety protection ○ Evaluation event in more than 15 farmers' field ○ Advertisement of the registered varieties in the papers and a TV channel ○ Packing and distribution of the seeds of registered varieties 					
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ○ Securing sales volume through the developed varieties in this study ○ Development of new varieties using good lines developed in this project ○ Contribution to quick and easy selection of squash varieties with resistance of the viruses and powdery mildew diseases as well as on-site service with the diagnostic kit ○ Application of these RAPD and SCAR markers could be used as the tools of Marker-Assisted Selection (MAS), and that will provide many benefits to breeding of resistance varieties for watermelon mosaic virus (WMV), zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) and powdery mildew disease. 					
Keywords	squash	disease resistance variety	virus	powdery mildew	marker-assisted selection (MAS)	

영문목차

1. Project abstract	7
2. Present situation of the technology	9
3. Research results	9
4. Achievement & contribution rate	116
5. Application plan of the results	117
6. Information of abroad technology collected	117
7. Security grade of the results	117
8. Research facilities and equipments registered	117
9. Record of performance of safety supervision	118
10. Representative results of the project	118
11. Others	118
12. Reference	118

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	7
2. 국내외 기술개발 현황	9
3. 연구수행 내용 및 결과	9
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	116
5. 연구결과의 활용계획 등	117
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	117
7. 연구개발성과의 보안등급	117
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	117
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	118
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	118
11. 기타사항	118
12. 참고문헌	118

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

1-1. 연구개발 목적

- 집약적 시설재배에 적합한 단절간의 애호박, 풋호박 및 추키니호박 각 1품종개발
- 바이러스(WMV, ZYMV)와 흰가루병에 강하고 절성이 높아 기존 품종보다 수량이 20%이상 많은 품종개발
- 과형과 과피색이 좋아 품질이 우수하고 숙기가 1주일 이상 빠른 품종개발
- 복합내병성 품종육성을 위한 내병성 관련 mapping 집단 육성
- 바이러스(WMV, ZYMV)와 흰가루병 내병성 진단 및 바이러스 신속진단키트 개발
- 바이러스(WMV, ZYMV)와 흰가루병 내병성관련 분자마커 개발
- 내병성 형질 관련 linkage map 작성
- 개발된 바이러스 진단키트 및 내병성 관련 분자마커를 품종육성과 농가 서비스에 이용

1-2. 연구개발의 필요성

건강식품이라는 인식으로 그 수요가 증가하고 있는 호박의 재배면적은 매년 2% 정도 늘어나 과채류 중에서는 수박 다음으로 많은 면적을 차지하고 있으며, 2010년 현재 8,970ha로 그중 시설재배가 3,246ha(36.2%)이고 노지재배가 5,724ha(63.8%)에 달하고 있다. 출하비중으로 볼 때 애호박이 60%이상을 차지하고 있으며 그 비중은 지자체의 시설지원 또는 시장가격이 좋아 계속 증가되고 있는 실정이다. 호박의 1인당 소비량은 다른 과채류와는 달리 년평균 2~3% 증가하여 2010년 6.9kg 였으며, 2016년 8kg, 2021년 8.9kg으로 증가될 것으로 전망하고 있다(2011년 과채수급전망과 동향, 한국농촌경제연구원). 애호박, 풋호박, 및 추키니호박은 우리의 식단 구성상 연중 수요가 발생하고 있으며, 이에 시설재배가 많이 증가하여, 2009년 시설채소재배면적은 2006년 대비 16% 증가하였으며 단위면적당 수량도 5%가량 증가되고 있는 것으로 보고되고 있다. 특히, 30년전의 200ha 수준의 시설재배면적이 작년까지 16배 이상 늘어났다고 할 수 있다. 애호박과 추키니 호박의 경우 여름철 일부를 제외 하고는 대부분 시설내에서 재배되고 있으며, 이러한 재배가 매년 연작으로 이어지고 있어 바이러스병이나 흰가루병의 온상이되고 있다. 이러한 이유로 인해 장기적인 하우스재배가 힘들어져 축성재배의 경우 날씨가 따뜻해지는 3월이 지나기 시작하면 ZYMV, WMV 등의 바이러스와 건조한 하우스내 환경으로 인해 흰가루병이 만연해져 더 이상 재배가 어려워지고 있다.

현재 보급되고 있는 애호박 품종들은 1977년 중앙종묘에서 ‘불암사철애호박’의 품질을 개선하여 보급 ‘중앙애호박’의 수준을 크게 벗어나지 못하고 있는 실정이며, 풋호박의 경우는 절간이 길어 하우스 재배에 어려움이 있고, 착과성이 떨어져 수확량에 한계가 있다. 이러한 현재의 품종적 상황은 크게 발달한 시설재배에 적합하다고 볼 수 없으며 재배자 입장에서는 품종선택의 여지가 별로 없다고 할 수 있습니다. 추키니호박 또한 1969년 흥농종묘에서 육성한 불암하우스 추키니 이후 뚜렷한 품종개발이 이루어 지지않아 흰가루병과 바이러스 병에 약해, 연작이 이루어지고 있는 시설재배에 많은 어려움을 겪고 있다.

호박에 많이 발생하여 생육과 과실품질을 크게 저해하는 Powdery mildew (흰가루병)은 *Sphaerthecha fusca*에 의해 전국적으로 발병되는데, 주로 잎에 많이 발생한다. 일단 발병이 되면 포자가 쉽게 비산하는 특성상 방제가 쉽지 않으며, 저항성 품종의 개발이 가장 합리적인 대안이 될 수 있다. 원예특작과학원에서 저항성 재료를 개발했으나 과형, 수량, 초세 등 몇 가지 이유로 보급이 되지 않고 있다. 따라서 보급 가능한 수준의 수량과 품질을 갖춘 품종개발이 필요한 상황이라고 할 수 있다.

세계적으로 박과 작물에 발생하는 바이러스 종류는 32종이 알려져 있는데, 현재까지 우리나라 호박에서 주로 발생한 바이러스 종류는 여러 종류가 있으나 수박모자이크바이러스(Watermelon mosaic virus, WMV)와 호박 누른모자이크바이러스(Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV)가 대표적이다. 이들 바이러스는 전국적으로 특히 시설 연작지에서 많이 발생되고 있는데, 이러한 바이러스 감염은 장기재배를 해야 하는 호박시설재배에 있어 품질과 재배기간을 단축시키는 가장 큰 요인이라고 할 수 있다. 일단 감염이 되면 잎에는 심한 모자이크 무늬가 나타나며 과실 표면에는 울퉁불퉁한 얼룩무늬의 기형이 나타나서 상품성이 크게 떨어진다. 현재 국내에는 호박 바이러스 저항성 호박품종이 개발, 보급되지 않고 있으며, 연구 또한 미흡한 실정이다. 좀 더 안정적인 영농을 위해 바이러스 진단기술과 분자마커개발을 통한 내병성 품종의 개발이 시급하다고 할 수 있다.

이상과 같은 국내 상황을 감안할 때, 우리의 재배환경에서 많이 발병되는 바이러스나 흰가루병에 내병성이면서 에너지와 노동력 절감형인 단절간 호박품종의 개발은 급변하는 기후환경에 대처하고 친환경적인 재배 측면에서 아주 중요하다고 할 수 있습니다.

1-3. 연구개발 범위

- 단절간으로 수량성이 높고 품질이 우수한 애호박 및 추키니호박 품종개발
 - 1) 기 확보된 계통을 이용한 30개의 우수계통 선발
 - 2) 30개 이상의 교배조합작성 및 우수조합에 대한 농가성능검정
 - 3) 교배친화성 및 종자생산능력 검정
- 농가, 유통채널, 소비자 설문조사를 통한 고객요구사항 파악 및 적용
- 인도네시아 연구농장을 활용한 세대단축 (년간 국내 1세대 --> 인도네시아 3세대)
- 지역적응성 농가시험재배(국내 및 인도네시아); 최소 8개 조합선발
- 애호박형 1품종과 추키니형 1품종 품종보호등록
- 시교종자 및 시관용 종자생산
- 종자건열처리 및 프라이밍 처리
- 등록된 품종의 농가보급
 - 1) 지역별 농가시험재배 및 평가회; 최소 5곳 5회 이상
- 복합내병성 품종육성을 위한 내병성 관련 mapping 집단 육성
 - 1) 기 확보된 계통을 이용하여 바이러스 및 흰가루병 저항성 개체의 선발과 증식을 통한 실험재료 확보
 - 2) 확보된 바이러스 및 흰가루병 저항성, 이병성 개체를 이용하여 mapping을 위한 집단 육성
- 바이러스와 흰가루병 내병성 진단 및 바이러스 진단키트 개발
 - 1) 신속 정확한 병진단 기술개발 및 품종육성에 적용
 - 2) 바이러스(WMV, ZYMV) 진단키트 개발
- 바이러스와 흰가루병 내병성관련 분자마커 개발
 - 1) 흰가루병 (*Sphaertheca fusca*) 저항성에 관련 분자마커 개발
 - 2) 수박모자이크바이러스(Watermelon mosaic virus, WMV)와 호박누른모자이크 바이러스(Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV)저항성과 관련한 분자마커 개발
- 마커개발 결과를 바탕으로 한 내병성 형질 관련 통합 고밀도 linkage map작성
- 개발된 바이러스 진단키트 및 내병성 관련 분자마커를 품종육성과 농가 서비스에 이용

2. 국내외 기술개발 현황

	코드번호	D-04
<p>○ 현재 국내 애호박, 주키니 및 풋호박 품종육성은 여러 이유로 거의 중단된 상태에 있어 좋은 품종개발이 쉽지 않은 실정에 있고, 현재 재배되고 있는 품종도 40여년전과 크게 달라진 것이 없습니다. 우리의 소비자 기호에 맞으면서 시설재배에 용이한 품종의 개발은 시급한 실정이며 이를 통해 호박의 생산성을 크게 높일 수 있을 것입니다.</p> <p>○ 현재 많은 농가들이 비교적 안정된 수익성과 지자체 등의 도움으로 호박의 재배면적을 크게 늘려가고 있는 상황인데, 품종개발은 이에 미치지 못하고 있는 실정입니다. 우리의 작형과 시설에 적합한 호박품종을 개발 보급하는 일은 저온기 난방재배의 생산 효율성과 원가절감에 기여할 뿐만 아니라 적기재배에서도 재배 용이성과 수량증대로 재배농가의 수익을 극대화할 수 있을 것으로 보입니다.</p> <p>○ 외국에서 많이 소비되고 있는 주키니호박을 바이러스와 흰가루병에 내병성이면서 과품질이 우수한 품종으로 개발한다면 많은 수요가 창출될 것이며 이는 우리 나라의 종자산업이 한 단계 앞으로 나가는 길이 되지 않을 까합니다.</p> <p>○ 외국의 경우, 우리의 애호박과 풋호박 같은 제품의 수요가 거의 없는 상황에 연구개발이 이루어지지 않고 있으며, 주키니 호박의 경우는 많은 품종이 개발되어 있으나 우리가 소비하는 크기와 색은 없는 실정으로 동일한 제품을 찾아보기는 힘든 상황이다.</p>		

3. 연구수행 내용 및 결과

	코드번호	D-05
<p>가. 세부과제 : 복합내병성의 단절간 애호박, 풋호박 및 주키니호박 계통의 개발, 조합작성, 성능검정 및 품종개발(홍익바이오, 서상기)</p> <p>(1) 목적</p> <p>4차 년도에 등록된 신품종을 확대 보급함은 물론, 선발된 계통 중에서 내병성, 과품질 등의 특성을 면밀히 조사하여 시설 재배에 적합한 복합내병성인 품종 조합을 작성한 후, 그 성능검정과 농가시험재배를 실시, 평가함으로써 좀 더 차별화된 신품종을 개발하여 이를 품종보호출원을 하는데 목적이 있다.</p> <p>(2) 재료 및 방법</p> <p>(가) 시험일정 및 방법</p> <p>표 1의 경종개요에 나타난 바와 같이 인도네시아에서 1차 시험이 2016년 1월 6일 ~ 4월 20일까지, 2차 시험이 5월 1일 ~ 8월 20일까지 진행되었으며, 3차 시험은 9월 3일 과종되어 12월 20일 수확하였다. 각 시험별 교배기와 수확기에 인도네시아 농장을 각 2회, 총 6회 방문하여 청과특성 및 수확과 조사를 실시하였다. 국내에서는 4월 20일 과종하여 8월 15일 수확완료 하였으며, 금년 보고서에는 시험수행기간 동안 인도네시아 및 평택농장에서 수행된 시험재배의 재료 및 성능검정 결과를 중심으로 자료를 정리 하였다.</p> <p>2016년도에 공시된 호박의 재료는 표 1에 나타난 바와 같이 총 1,468 계통 및 조합이었으며 공시된 조합의 수는 807개로 그 중 가능성이 있는 조합을 선발하여 평택농장에서 재차 시험을 실시한 후 선발된 조합을 농가시험에 이용했다. 이러한 일련의 시험과정을 거쳐 우수한 조합을 선발하여 품종화 하였다.</p>		

Table 1. The schedule of pumpkin cultivation in year 2016.

Generation Advance (2014)	Total No. of BN		Sowing	Transplanting	Pollination	Seed Harvest	Cultivation Site	Remarks
	Material	Combination						
ID-1st*	479	135	06 Jan	16 Jan	15 Feb ~ 05 Mar	20 Apr	Indonesia	completed
ID-2nd	310	297	01 May	10 May	05 Jun ~ 25 Jun	20 Aug	Indonesia	completed
ID-3rd	408	291	03 Sep	13 Sep	10 Oct ~ 31 Oct	20 Dec	Indonesia	completed
KO-1st	271	84	20 Apr	05 May	06 Jun ~ 30 Jul	01 Aug ~ 15 Aug	Korea	completed
Total	1,468	807						

* ID-1st; Indonesian farm, 1기작, KO-1st; Korean farm, 1기작



그림 1. 인도네시아 농장 망실하우스에서 육묘 중인 호박모종, 2016년 9월

(나) 우수한 재료의 선발

절간의 조사는 5마디의 합 즉, 완전히 자란 식물체의 15마디에서 20마디 사이의 총길이를 측정하여 비교 하였는데 시판종이 평균 35~40cm인 점을 감안하여 5 마디의 총길이가 25cm이하인 것을 단절간으로 판정하였다.

절성의 경우는 개화개시 후 30일간 개화된 암꽃의 총수로 나타냈는데 대비종의 평균이 8개 정도인데 다수확의 소질이 있는 절성이 높은 계통을 총 암꽃수가 8개 이상으로 하여 선발하였다. 그림 2는 과실을 수확한 후의 모습이며 과실조사와 선발을 거쳐 탈중에 들어간다.



그림 2. 수확과 특성조사 및 선발 중인 애호박, 풋호박, 주키니호박

(다) 성능검정

흰가루병 저항성 계통의 선발은 저항성의 경우는 숫자 1로, 이병성의 경우는 숫자 5로 나타냈으며 숫자 3은 중간정도의 개체로 판정했다. 조사 시기는 1차는 착과 직후 초세가 약화되는 시점에 2차는 착과후 25일 정도에 초세가 많이 약화된 시점에 조사하였다. 1차 조사는 식물체의 하위엽을 중심으로 관찰하였고 2차 조사는 과실의 비대가 거의 진행된 상태로 식물체는 노화되고 있는 상태로 중간정도의 잎 뒷면을 통해 조사가 이루어졌다. 이 방법은 식물의 노화에 따른 흰가루병 내성약화를 감안함으로써 그 결과의 신뢰도를 높였다.

ZYMV와 WMV의 경우는 비가림 망실하우스에서 84 조합 및 계통에 대하여 집중을 실시 하여 3주 후 병증이 나타나지 않은 경우를 저항성으로 판정했으면 그 후 포장에 정식하여 특성조사와 탈종이 이루어졌다. 그 자세한 내용은 제1협동과제에서 언급될 것입니다.

조합의 작성은 단절간, 고절성, 내병성관련 특성이 어떻게 유전하는지를 알고 우수한 조합을 선발하기 위한 방법으로 작성되었으며 계통별 유전력의 차이를 간파함은 물론 향후 우수한 조합을 작성하는 자료로 활용할 것이다. 조합의 작성은 총 1,200여 조합을 작성하고 그 중 807조합을 공시하여 인도네시아와 국내에서 성능을 조사하였다. 인도네시아의 토질, 기후환경 조건이 우리나라와는 크게 다르기 때문에 평택농장은 물론 전국 주요농가에서도 시험을 실시하여 그 결과를 인도네시아와 비교 분석함으로써 인도네시아에서의 우수조합 선발에 적용할 수 있도록 했다.

(라) 농가시험 및 품종 등록용 조합선발

성능검정은 인도네시아와 평택농장에서 주로 진행되었으며 작성된 조합 중 농가시험이 필요한 몇 조합들을 표 2와 같이 공시하여 재배농가들의 반응을 살펴보았다. 농가재배는 표 2에서 나타난 바와 같이 광양, 진주, 거창, 대구, 청원, 부여, 춘천에서 실시되었으며, 광양, 진주, 청원, 부여, 춘천은 애호박 조합을 공시 하였으며, 거창, 대구는 쥬키니 조합을 공시하였다. 공시된 조합은 흰가루병 내병계를 중심으로 작성되었으며 재배시기와 방법은 농가의 관행에 따랐고 정식기, 수확최성기, 수확말기에 방문하여 조사 및 농가의 의견을 청취했다.

Table 2. The schedule of adaptability test in main cultivation area of pumpkin, 2016.

Cultivation site	No. of grower	Cultivation Period		No. of combination	No. of plant transplanted/c omb.	Remarks
		Sowing	Harvest			
Kwangyang	1	15 Sep	10 Nov ~ 30 May	2	500	Eahobak, on-going
Jinju	3	10 Sep	05 Nov ~ 30 May	2	2,000	Eahobak, on-going
Geochang	1	05 May	05 Jun ~10 Jul	1	2,000	Zucchini, completed
Cheongwon	2	15 Jan	01 Mar ~ 30 Jun	2	1,500	Eahobak, completed
Buyeo	2	20 Jan	05 Mar ~ 30 Jun	2	5,000	Eahobak, completed
Chuncheon	2	20 Mar	15 Jun ~ 20 Oct	1	1,000	Eahobak, completed
Hongcheon	2	20 May	30 Sep	1	5,000	Zucchini, completed

(마) 품종보호출원, 품종등록용 및 확대 시험용 종자생산

평택연구농장과 농가시험을 거쳐 최종 선발된 조합을 품종보호 출원하였으며 종자생산은 생산 농가를 미리 선정하여 생산에 들어갔다.

(1) 결과 및 고찰

(가) 우수한 재료의 선발

지난 8월 25일에 끝난 2차시험에서 암꽃수가 8개 이상이면서 절간이 25cm 이하인 것을 (시판종 36cm/5마디 잎에 비해 11cm 정도 짧음) 단절간인 18계통을 표 3과 같이 선발하였으며 이 계통들은 현재 교배가 한창 진행되고 있다. 이를 이용한 단절간 교배조합작성과 여교잡을 통한 단절간 우수계통개발을 진행할 하고 있다. 절간이 짧아서 유인작업이 상대적으로 줄어든다는 장점은 있지만 이를 이용한 조합작성 시 문제가 되고 있는 초세의 저하를 극복하기 위한 여교잡을 진행하고 있다. 물론 초세가 강한 계통과의 조합을 통한 극복방안도 고려 중에 있다. 우리 나라의 경우 여름철에는 고절성이 수확량 증가로 이어질 수 있으나 주 재배형인 저온기에서는 절성이 너무 높은 것은 식물체의 에너지 낭비와 인위적인 적과 등으로 오히려 부담으로 작용할 수도 있다. 즉, 고절성이면서 담과능력이 우수한 계통을 개발하는 것이 좋다고 볼 수 있다. 흰가루병과 바이러스병에 저항성 유전자의 유전양식은 조합에 따라 달라질 수 있으나 본 시험에 이용된 것의 경우 우성으로 작동하는 것으로 판단되고 있다.

Table 3. Selected lines of Ehobak with High female ratio and short internode.

BN	Total female flower (TFF)	Node length	Leaf size		Petiole	Harvested fruit				
			Length	Wide		Weight	Navel	Length	Wide	Flesh thick
			cm	cm		Kg	mm	cm	cm	mm
Con(NHE)	8	36	17.6	20.6	11.6	1.2	12	31.5	10.5	11.5
PQ002	10	25	15	16	13	0.4	8	18.5	8	9
PQ006	7	15	11	13	8	0.2	6	14.5	5.5	5
PQ012	9	25	16	16	12	0.7	7	21	8	8
PQ014	9	20	15	18	14	0.7	10	22	8	7
PQ022	9	20	12	15	11.5	0.3	6	16	6	7
PQ023	9	15	8	12	10	0.3	7	17.5	6	6
PQ035	12	20	14	18	16	0.6	10	21.5	8.5	7
PQ039	13	25	15	18	15	0.4	17	21.5	6.5	8
PQ045	9	25	12	17	11	0.7	11	25	7	7
PQ046	9	25	15	18	11	0.5	5	22	7.5	7
PQ047	9	20	13	16	9	0.3	9	16	5.5	5
PQ073	8	25	15	19	10	0.3	15	18.5	8	5
PQ075	7	25	19	22	19	0.7	12	23	8.5	8
PQ079	6	25	-	-	-	0.5	5	22	7.5	7
PQ113	6	25	16	19	17.5	0.3	4	17	7	5
PQ114	9	25	15	16	14	0.2	6	16.5	8	4
PQ116	7	25	12	15	9	0.3	6	17.5	7	7
PQ152	13	25	-	-	-	1.2	15	27	9	13

* Con(NHE); 대비종, 농협에호박

(나) 성능검정

각 시험별 공시된 작물별 조합의 수는 표3 과 같다. 국내 성능검정은 인도네시아의 것과 일부 중복되는 것이 있으나 애호박의 경우 327조합, 풋호박의 경우 122조합, 주키니호박의 경우 213조합을 공시하여 그 성능을 조사하였으며 그 중 가능성이 있는 것을 농가시험에 이용했다. 본 성능검정을 통해 부분적으로 단절간, 내병성, 과모양, 절성 등에서 시판종에 비해 우수한 것으로 나왔으나 주요 특성의 전체적인 조화 또는 밸런스 측면에서는 대비종에 비해 우수한 것은 소수에 불과했다. 평택농장에서의 성능시험과 농가 실증시험을 통해 바이러스병과 흰가루병에 내병성인 주키니호박 1조합(가야금 주키니)과 흰가루병에 강하면서 초세가 강하고 담과능력이 우수한 애호박 1 조합(파랑새 애호박)을 최종 선발하여 품종화 하였다.

Table 4. Number of combination for the performance test of each crop in 2015.

Crop	No. of combination transplanted					Remarks
	Korea (PT Farm, completed)	Indonesia #1 (completed)	Indonesia #2 (completed)	Indonesia #3 (on going)	Total	
Ehobak	34	70	114	109	327	
Puthobak	13	33	32	44	122	
Zucchini	48	26	17	122	213	2 times in PT farm
Others	46	67	47	102	262	
Total	141	196	210	377	924	

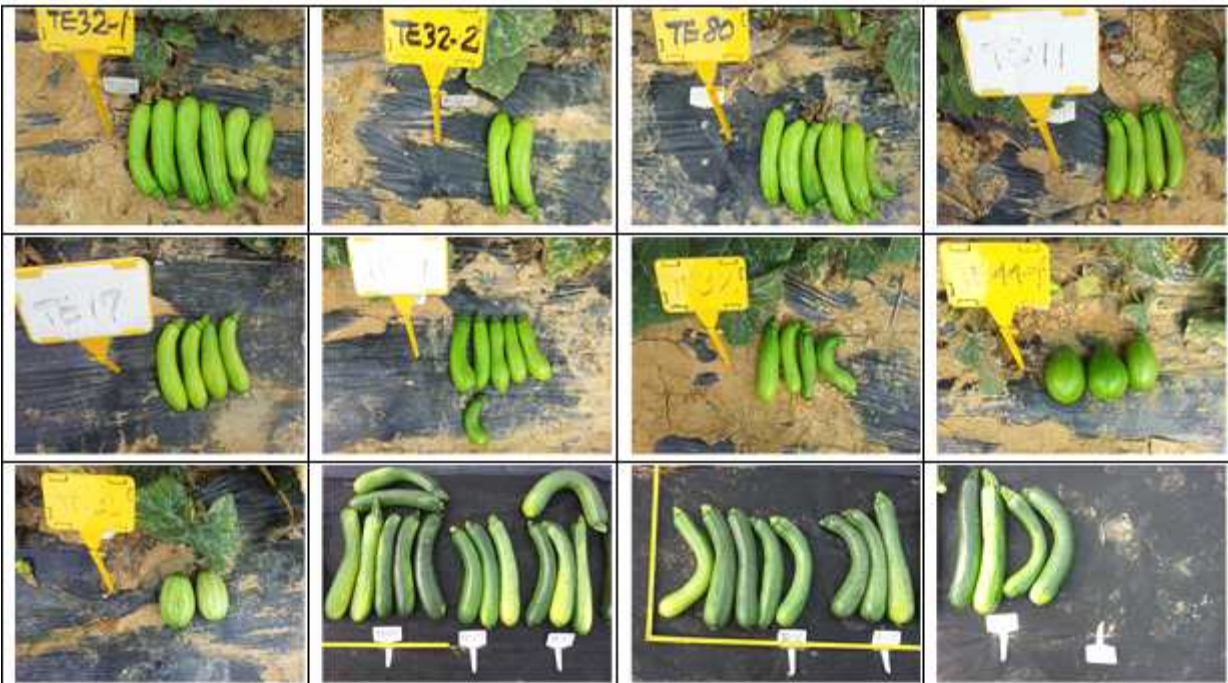


Figure 4. Selected numbers of young fruits from the performance test of Ehobak & Puthobak at Pyeongtaek Farm.

Table 5. The results of Performance test of Eahobak, Puthobak, and Zucchinihobak in Pyeongtaek Farm. The selected combinations are painted with blue color. The green color is a control variety.

No.	NP T	No. of fruit harvested by date(22 Jun ~ 18 Jul,2015)																		Total	Av/p l	
		6/22	6/23	6/24	6/25	6/26	6/27	6/28	6/29	6/30	~	7/10	7/11	7/12	7/13	7/14	7/15	7/16	7/17			7/18
TE32-1 (JAE)	6	2	2	3	2	2			4	6	~	4		2	2	1		1	1	2	48	8
TE32-2 (NHE)	6	5	2	3	3	4	4	1	3	2	~	3	1			4	2	1	1		88	14.7
TE80 (PRS)	6		1	8		1	4	2	1		~	2	3	3	3	4	1	2	2	3	93	15.5
TE01	6		5	2		4	5	1	2	3	~	7	5	1	2	2	2	3	2	1	78	13
TE02	6		3	3	4	5	5		1	4	~	5	6	1	2	8	2	1	5	3	86	14.3
TE03	6		6	1	3	3	4	1	3	3	~	2	4	1	2	2		2	5	3	62	10.3
TE04	6		6	2	4	6	3		1	2	~	6	5	1	2	1		1	2	1	68	11.3
TE05	6		1	1	6	2	3		2	3	~	2	4			1	2	3	4		69	11.5
TE06	6		2	1	5	3	4	1		4	~	2	5	2	5	5	2	1	3		73	12.2
TE07	6		6	2	3	5	7	2		4	~	2	2		3	1	2	1	6	1	63	10.5
TE08	6		8	1	2	5	1		5	4	~	7	5	2		2	5	3	7		79	13.2
TE09	6		4	7	5	5	4	1	2	4	~	1	3	3	2	1	2	2	6	1	88	14.7
TE10	6		5	2	2	4	3		3	1	~	3	5	1	3	1	1	1	4	1	60	10
TE11	6		5	4	4	3	3		3	4	~	5	2		4	5	6	9	3	2	101	16.8
TE12	6		4	3	8	4	4	2	4	4	~	4	5		1	5	2	5	5	1	96	16
TE13	6	4	5	2	3	4	2	3	6	4	~	6	6	2	2	4	2	2	6		98	16.3
TE14	6		6	5	4	3	1	2	4	4	~	5	4		1	1	5	1	2	1	68	11.3
TE15	6		3	6	5	4	1	1	3	4	~	2	6	3	2				3	2	64	10.7
TE17	6	1	3	4	2	6	5	2	1	8	~	7	6	1	2	3	2	2	3	3	88	14.7
TE21	6	5	5	1	1	1	1	1		1	~	2	1	2	1	3	1	1	1	2	55	9.2
TE22	6	7	1	3	1	2	1	1	3	6	~	4	6	2	1		1		2		61	9.0
TE24	6	2	5	1	2	3	1	1	1	2	~	1	3	1		2	1	1	3		54	9
TE28	6		4	1	3	7	6	1	4	3		3	6	1	2	6	4	1	7	1	91	15.2
TE29	6	3	1	5	2	4	2	1	3	3		2	8	3		6	4	1	6		86	14.3
TE30	6	2	3	2	2	4	2		3	3			4	3		1			6	1	56	9.3
TE31	6	4	5	4	1	3	2		3	2		2	2	2	1	4		1	4	4	62	10.3
TE32	6	4	4	4	2	5	3		3	4		5	2			1	3	5	4	1	90	15

Table 5. The results of Performance test of Eahobak, Puthobak, and Zucchinihobak in Pyeongtaek Farm. The selected combinations are painted with blue color. The green color is a control variety.

No.	NP T	No. of fruit harvested by date(22 Jun ~ 18 Jul,2015)																		Tot al	Av/pl	
		6/22	6/23	6/24	6/25	6/26	6/27	6/28	6/29	6/30	~	7/10	7/11	7/12	7/13	7/14	7/15	7/16	7/17			7/18
TE44-1 (NJP)	6	2	3	3	2	2			9		~	6	8		9	2		2	1	4	75	12.5
TE34	8					1		5	1		~	1	4	4	2	1	1	4	4	2	47	7.8
TE35	8			2	1		2	1	3	2	~	4	5	2	3	2				2	52	8.7
TE36	8							1		1	~	3	1	5	1		1	2			27	4.5
TE37	8					1	1	1	2	1	~	4	2	2	2	2	1	4	5		52	8.7
TE38	8				1		3		1	4	~	3	1	1	5	1	5	2	1	1	66	11
TE43	8			2	2	2	1		3	2	~	4		4	2	1		1	2	1	57	9.5
TD25 (NKZ)	6	1	3	1	2	6	2	2	3	2	~	2	1		7	4	2		1	2	106	17.7
TD26	6				2	3		3	1	4	~	4	3		5	5	4	2	3	2	95	15.8
TD27	6	1	2	3		6		2		5	~		1		2	1	5	2	2		79	13.2
TD29	6				3	2	1	3	1	3	~	1	4	1		1	3	1	1	2	96	16
TD30 (GYG)	6	2	3		3	5	2	2	2	5	~	3	2	1	2	3	5	3	2	3	127	21.2
TD31	6			2	3	5	3	3	1	4	~	3	1	1	3	4	4	1	1	2	101	16.8

* JAE; 중앙애호박, NHE; 농협애호박, NJP;농우조생포호박, NKZ;남강쭈키니호박, PRS; 파랑새애호박, GYG; 가야금쭈키니호박 NPT; No. of plant transplanted, AV/PI; avrage no. of fruit/plant

(다) 농가시험 및 품종 등록용 조합선발

표5는 농가시험을 실시한 지역에서의 특성조사와 농가의 반응을 요약 정리하였다. 광양, 진주지역에서 수행한 저온기 작형에서의 농가시험 (KY01~KY04, JJ01~JJ04)은 모두 흰가루병에 강했으며 특히 PM5904의 경우 초세가 강한 편으로 담과능이 우수하고 과실이 잘 자라는 경향이 있어 재배농가들의 관심을 받고 있었다. 청원지역과 춘천의 경우에는 노지나 적기에 적합한 조합을 공시하였으며 그 결과는 전반적으로 무난한 것으로 나타났다. 진주, 광양과 마찬가지로 PM5904조합의 작황이 좋게 나타나고 있어 흰가루병에 강하면서 저온기와 노지 작형에 모두 가능한 것으로 판단되었다. 따라서 PM5904를 파랑새 애호박으로 품종보호출원을 실시하였다.

		
애호박 성능검정	애호박 성능검정 (청과)	애호박 종자수확
		
쥬키니 성능검정	쥬키니 성능검정 (청과)	쥬키니호박 종자수확
		
풋호박 성능검정	풋호박 성능검정 (청과)	풋호박 종자수확

그림 5. 호박 성능검정 및 종자 수확중인 선발된 조합

평택시교 PM0803의 경우 초세가 강하고 흰가루병에 강한 장점이 있으나 과실이 고온기로 갈수록 길어지는 경향으로 인해 농가에서 거부감을 보이고 있었다.

대구의 쥬키니 호박은 바이러스와 흰가루병에 강하고, 초세 또한 강해 끝까지 수확이 가능한 장점이 있어 다시 재배를 희망하고 있었다. 의령에서도 시험한 조합은 대구것과 유사한 조합으로 그 결과는 흰가루병과 바이러스에 강한 편으로 생육이 왕성한 장점을 지니고 있는 것으로 판단되었다. 따라서 대구시교, PM1121이 좀 더 나은 것으로 판단되어 가야금 쥬키니 호박으로 품종보호출원을 실시하였다.

풋호박의 경우 절간이나 과형, 과피색 등에서는 가능성을 보이나, 표5에서와 같이 수량면에서 대비종인 농우조생풋에 미치지 못해 새로운 조합을 작성 중에 있다. 즉, 내병성이면서 품질이 우수하고 수량성도 높은 풋호박 조합이 조만간 나올 것으로 기대하고 있다.

Table 6. The results of field tests and growers' response in main area of pumpkin cultivation.

Tri al site	Trial BN	Characteristics of young fruit								Growers' response
		NL	NF F	FV R	P M R	Vi g	SC	FL	F W	
KY , JJ	KY01, JJ01 PM0803	3	4	3	2	4	3	4	3	전반적으로 양호하나 과실이 고온기로 갈수록 길어지는 경향
	KY02, JJ02 (PM5503)	2	3	3	1	3-	4	3	2	초세가 떨어지고 약간 가는과, 흰가루병에 상당히 강함
	KY03, JJ03 (PM9503)	3	4	3+	2	4	3	4	3	바이러스에 약간 강한 것으로 판단되나 과실이 약간 긴편임.
	KY04, JJ04 (PM5904)	3	4	3	2	4	3	3+	3	초세가 강한편으로 후기에도 담과능이 우수한 편임. 흰가루병에 강함, 좋은반응 보임.
	NHE (con)	3	3+	3	5	3	3	3	3	PM에 약하나 절성과 수량이 높고, 과실 특성이 무난함, 초세는 약간 떨어짐, 흰가루병에 아주 약함
CW CC	CW01, CC01 (PM9503)	3	4	3	2	4	3	3+	3	잎이 작고 과실의 길이가 약간 긴 편으로 전반적으로 양호함. 흰가루병에 강함
	CW02, CC02 (PM5904)	3	4	3	2	4	3	3+	3+	PM에 강하고 과실의 자람과 담과능이 좋은 편임. 좋은 반응을 보임
	CW03, CC03 (PM1303)	2	3	3	2	3	3+	4	3	마디가 짧으면서 흰가루병에 내성이고 과실의 길이가 약간 긴편. 수량 떨어짐
	CW04, CC04 (PM5503)	2	4	3+	1	4	3	3	3	흰가루병에는 강하나 전반적으로 성능은 떨어짐.
	NWE (con)	3	3	3	4	3+	3	3	3	초세가 약간 강한 편으로 꾸준한 수확이 가능함, 잎이 큰 편임. 흰가루에 약함
PT	PM0803	3	3+	3	2	4	3	4+	3	초세가 약간 강한 편으로 과실의 길이가 약간 길고 과실모양도 무난함.
	JHE (con)	3	3	3	4	3	3	3	3	전반적으로 무난하나 흰가루병에 약함
ER	PM0913	1	4	5	5	4	3	4	3	초세가 약간 강한 편으로 흰가루병에 강하고 바이러스에서 대비종과 차이를 보임. 내년도 재배희망
	DD (con)	1	4	1	1	3	3	4	3	바이러스가 많이 와서 성능을 보기가 힘든 상황
DG	PM1121	1	4	5	5	4	3	4	3	초반 과실의 생육이 약간 늦은 것으로 판단되나 암꽃이 3~4일 빨리오고 바이러스와 흰가루병에 아주 강함. 내년도 재배희망
	CGB (con)	1	4	1	1	3	3	4	3	수확 초반~중반까지는 전반적으로 양호했으나 바이러스와 흰가루병으로 인하여 생육이 부진함.

* Trial site: KY: Kwangyang, JJ: Jinju, CW: Cheongwon, CC: Chuncheon, PT: Pyeongtaek, ER: Euiryeong, DG: Daegu

Trial BN: NHE: Nonghyup ehobak, NWE: Nongwoo ehobak, JHE: Nongwoo Jinhan ehobak, DD: Haeorum Dondon, CGB: Nongwoo Choigobong

Characteristics: NL: node length (1:short, 5:long), NFF: no. of female flower (1: few, 5: many), FVR: field virus resistance(1:susceptable, 5: resistance), PMR: powdery mildew resistance(5: susceptible, 1: resistance), Vig: plant vigor (1: weak, 5: strong), SC: skin color (1:light green, 5: dark green), FL: fruit length (1:short, 5: long), FW: fruit width (1: thin, 5: thick)

	
<p>진주, 재배 중인 파랑새애호박</p>	<p>파랑새애호박(과)와 잎새애호박(우)</p>
	
<p>춘천, 재배 중인 파랑새 애호박</p>	<p>춘천, 과과 중인 파랑새 애호박</p>
	
<p>대구, 수확 중인 가야금쭈키니</p>	<p>대구, 수확된 가야금쭈키니</p>
	
<p>의령, 재배 중인 가야금쭈키니</p>	<p>의령, 과과 중인 가야금쭈키니</p>

그림 6. 파랑새애호박과 가야금쭈키니 호박의 진주, 춘천, 대구, 의령 농가시험포장 작황 및 청과수확

(라) 품종보호출원, 품종등록용 및 확대 시험용 종자생산

농가시험을 거쳐 최종선발된 PM5904를 파랑새 애호박으로 품종보호출원 (출원번호 2015-523) 하였으며, 주키니 호박의 경우 PM1121을 가야금주키니 호박으로 품종보호출원 (출원번호 2015-518)을 실시하였다. 등록용 및 시험재배용 종자는 종자 생산농가를 선정하여 확보하였으며, 발아율과 발아세는 양호한 것으로 판단되었다.

품종보호출원된 파랑새애호박과 가야금주키니 호박의 주요특성은 다음과 같다.

(4) 파랑새애호박의 주요특성**(가) 흰가루병에 강하다.**

그림 7. 파랑새 애호박과 일반품종과의 흰가루병 감염정도 비교

(나) 초세가 강하고 수량이 많다

(다) 배꼽이 작고 과실의 모양이 좋다.



그림 8. 파랑새 애호박과 일반품종과의 청과 배꼽비교

(라) 기형과 발생이 적고 상품성이 높다.

(5) 가야금쭈키니 호박의 주요특성

(가) 바이러스병에 강하다.



그림 9. 가야금 쭈키니호박과 일반품종과의 바이러스 감염정도 비교.



그림 10. 가야금 쭈키니와 일반품종과의 청과 바이러스 증상 비교

(나) 흰가루병에 강하다.



가야금쭈키니



일반종

그림 11. 가야금 쭈키니호박과 일반품종과의 흰가루병 내성정도 차이

(다) 초세가 강하고 수확기간이 길다.

계속적인 추비관리로 수확기간을 15일 이상 연장할 수 있다.



그림 12. 가야금 주키니의 생육상황

(라) 과실의 저장성이 좋아 유통인이 선호하는 품종이다.

(6) 품종홍보

품종홍보는 크게 두가지 방안으로 실시하고 있다. 농기평의 도움으로 신문지상 및 TV를 통한 홍보를 실시했으며 쇼핑몰을 통한 홍보를 실시 중에 있다. 그 구체적인 내용은 아래와 같다.

표 7. 신품종 파랑새 애호박과 가야금 주키니의 기사화된 자료내용 요약

구분	홍보 매체	계제, 방송일	제 목
	회사명		
신문	뉴스스	2015. 08. 19.	15일 이상 연장수확 가능한 호박 2개 품종개발
	한국농업신문	2015. 08. 19.	농기평, 농약사용 대폭 줄인 호박품종개발
	식품음료신문	2015. 08. 19.	농약사용 대폭 줄인 내병성 호박품종개발
	원예산업신문	2015. 08. 24.	농약사용 대폭 줄인 내병성호박 품종 눈길
	농업정보신문	2015. 08. 24.	바이러스 내병성 강한 호박탄생, 생산비절감, 친환경재배가능
	농수축산신문	2015. 08. 24.	농기평, 수확기간↑, 농약사용↓ 호박 신품종 개발
	한국농어민신문	2015. 08. 25.	호박 바이러스, 흰가루병 내병성 품종개발
	농민신문	2015. 08. 31.	농약사용 80% 절감 가능한 주키니 호박 개발
	건강과 자연농업	2016. 05. 01. 2016. 07, 01.	아직도 농약으로 농사를 짓고 계십니까?
TV	안동MBC	2015. 09. 02.	뉴스데스크: 농약사용 줄인 신품종 호박개발-홍익바이오

인터넷 포털사이트(Naver, Daum, Google)에서 ‘홍익씨앗’을 입력하면 쉽게 접근이 가능하며 파랑새 애호박과 가야금쭈키니 품종에 대한 구체적인 설명이 이루어지고 있다. 위 내용 중 농민신문에 게재된 신문내용은 아래와 같다.

농민신문 (최종편집일 : 2015-08-31)

농약사용 80% 절감 가능한 쭈키니 호박 개발

홍익바이오, 바이러스병·흰가루병 내병성 품종 육성
농약 적게 쳐도 되는 애호박 신품종도...내년에 시판



홍익바이오가 육성한 신품종 ‘가야금 쭈키니 호박’은 바이러스병·흰가루병에 강하다.

호박 재배농가들의 가장 큰 고민거리인 바이러스병과 흰가루병 피해를 덜어줄 신품종이 개발됐다.

농림수산식품기술기획평가원(원장 이상길)은 농림축산식품부 농생명산업기술개발사업 과제로 벤처기업인 (주)홍익바이오(대표 서상기)를 지원해 2011년부터 호박 신품종 연구를 시작, 최근 내병성 우수품종 육성에 성공했다고 밝혔다.

홍익바이오가 육성한 신품종은 바이러스병과 흰가루병 복합내병성을 가진 <가야금 쭈키니 호박>과 흰가루병 내병성 품종 <파랑새 애호박> 등 2종이다. 홍익바이오에 따르면 농가실증 실험 결과 이번에 개발한 <가야금 쭈키니 호박>은 바이러스병과 흰가루병에 강한 내성을 보였을 뿐만 아니라 생육도 왕성해 재배기간 중 단 2회의 농약살포만으로도 충실한 열매를 수확할 수 있었다.

이에 따라 복합내병성 품종을 이용하면 농가는 농약 사용량이 줄어 1ha당 약 120만원의 생산비 절감 효과를 볼 수 있을 것으로 기대된다. 아울러 내병성 쭈키니 호박은 바이러스병과 흰가루병으로 인해 재배가 힘든 여름철 고온기에 수확기를 보름 이상 연장할 수 있어 농가는 생산량 증대에 따른 추가 이익도 얻을 수 있을 것으로 전망된다.

<파랑새 애호박> 역시 기존 애호박 품종에 비해 흰가루병 내병성이 우수한 특성을 보였으며, 배꼽이 작고 과실의 모양이 균일해 상품성 있는 과실 수확에 유리한 장점을 가진 것으로 나타났다. 특히 애호박은 일반적으로 재배기간 중 여러 번 흰가루병 방제 농약과 살충제를 살포해야 하지만 <파랑새 애호박>은 같은 조건에서 4분의 1정도의 농약살포만으로도 병 피해 없이 재배가 가능한 것으로 확인돼 1ha당 연간 225만원의 생산비 절감효과를 얻을 수 있을 것으로 보인다.

홍익바이오는 <가야금 쭈키니 호박>과 <파랑새 애호박>에 대해 각각 특허출원 및 품종보호출원을 마치고 올해 시험판매를 거쳐 내년부터 본격 시판에 나설 계획이다. 자세한 품종 정보는 ‘홍익씨앗(www.hongikbio.kr)’에서 확인할 수 있다.

이경석 기자 kslee@nongmin.com

(7) 종자생산 및 시판

종자생산은 그동안 생산체계를 갖추고 있는 인도네시아를 비롯한 국가들에서 생산을 하고 있으며, 아직 많은 물량을 생산하지 않고 있어 관리에 큰 문제가 없는 것으로 생각됩니다.

2015년에는 시험재배 위주로 종자공급을 추진하였으며, 호박재배 농가가 품종에 대한 특성을 어느 정도 인지한 2016년 8월부터 본격적인 시판에 나서고 있다.

(8) 시장접근 전략수립**(가) 유통체계관리**

일반 종자회사에서의 종자공급 방법은 통상적으로 종묘상이나 3rd Party등을 통해 공급하고 있으며, 이러한 방법은 중간마진을 크게 가져갈 수 밖에 없는 구조로 종자가격의 상승과 종자회사의 수익 저하로 귀결되고 있다. 이러한 상황에서 홍익바이오는 유통의 패러다임을 바꾸려는 시도를 하고 있다. 즉, 쇼핑몰(hongikbio.kr, 홍익씨앗)을 구축하여 재배농가들이 품종의 특성은 물론 선행 재배농가들의 의견이나 작황을 확인함으로써 좀 더 확신을 가진 구매를 할 수 있다는 것입니다. 또한 쇼핑몰이나 전화를 통한 주문을 유도함으로써 자연스럽게 직거래가 이루어져, 종자의 유통단계를 줄일 수 있음은 물론 재고 및 가격관리도 용이한 상황이다.

(나) 고객관리

호박의 경우, 종자구매 결정권이 대부분 재배농가에 있어 농가를 중심으로 한 Pull Marketing이 유효한 상황이라고 볼 수 있다. 따라서 가장 어려운 방법이지만 농가시험재배를 통한 품종성능의 차별화가 우선되어야 한다고 할 수 있다.

(다) 시판가격 및 재고관리

쇼핑몰이나 전화를 통한 직판체계를 구축하고 있기 때문에 판매가격의 단일화가 가능하며, 농가의 반응을 항상 경청하는 상황이라 재고 관리 또한 쉬울 수 있다.

(라) 제품전략

현재 일반회사들에 의해 시판되고 있는 애호박, 추키니, 풋호박 품종들은 약 40여년전에 개발된 품종을 지금까지 그 특성을 크게 변화시키지 않으면서 판매해온 것이 사실이다. 이에 홍익바이오는 좀 더 차별화된 품종을 개발 보급함으로써 재배농가는 물론 소비자들에게도 도움을 줄수 있는 품종을 개발하였으며, 앞으로 더운 차별화된 품종으로 시장에 접근할 예정이다.

(9) 품종특성 선호도에 대한 설문조사 (애호박, 유키니호박 중심)

(가) 목적

본 연구 결과물의 주 고객인 호박재배농가 및 유통인들이 판단하고 있는 선호하는, 원하는 호박품종에 대한 의견을 설문을 통하여 간파함으로써 연구의 방향성을 구체화시키고, 나아가 개발된 신품종이 고객의 니즈에 부합될 수 있도록 하는데 그 목적이 있다.

(나) 재료 및 방법

설문의 대상을 호박재배농민과 그 산물을 유통하는 유통인 즉, 경매사 및 중도매인으로 했으며 설문방법은 방문 면접을 통해 실시하였다. 그림 9에서와 같이 설문지를 농가는 30문항, 유통인들은 17문항을 작성하였으며 그 판촉물로 T-shirts를 사용하였다. 춘천, 안동, 대구, 진주 및 광주 지역에서 호박을 재배하고 있는 농가를 대상으로 하였으며 전체 농가수는 47명이었다. 유통인의 경우는 서울, 대구, 진주 공판장에서 호박 유통관련 일을 하고 있는 경매사와 중도매인 19명을 대상으로 실시 하였으며 그 구체적인 내용은 표 10과 표 11에 나타난 바와 같다.



그림 9. 본 설문에 이용된 설문지 및 판촉물

표 10. 설문에 참여한 농가의 기본정보 및 품목, 지역별 작형

품목	조사 지역	조사농가수	평균재배면적	작형 평균						종자구매결정시기
				구분	파종	정식	수확개시	수확종료	연령대	
애호박	춘천	7	1,230	노지	4월 10일	5월 15일	6월 20일	10월 29일	60대 초반	3월 20일
	안동	8	1,900	축성	9월 13일	10월 5일	11월 20일	6월 15일	40대 후반	8월 15일
	고령	10	1,890	축성	9월 2일	10월 2일	11월 15일	6월 30일	50대 초반	7월 30일
	광주	6	1,780	축성	9월 10일	9월 30일	11월 15일	6월 20일	50대 초반	8월 10일
	진주	5	1,700	축성	9월 10일	9월 27일	11월 10일	6월 15일	40대 후반	8월 10일
유키니	대구	11	1,220	조숙	1월 30일	3월 2일	4월 5일	6월 20일	50대 초반	12월 20일
계(평균)		47	1,620						50대 초반	

표 11. 조사대상 유통인들의 기본정보

구분	조사지역	인원	평균경력	평균 연령군	인터넷 이용여부	생산능가 접촉유무
경매사	서울, 대구, 진주	7	10년	40대 후반	이용	접촉
중도매인	서울, 진주	12	5년	30대 초반	미이용	미접촉

(다) 결과 및 고찰

① 지역별 호박재배면적 및 주 재배지역의 작형조사

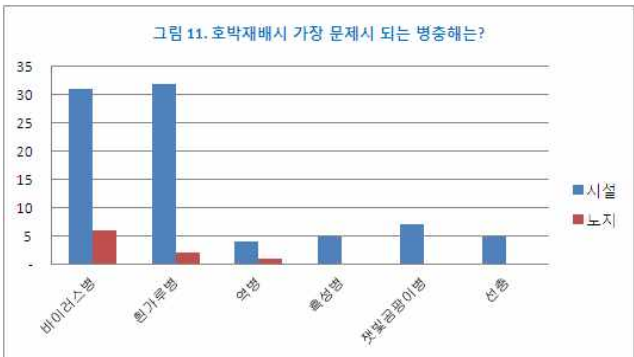
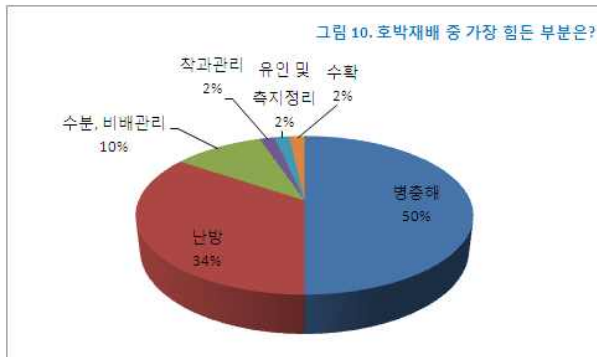
2011년도 우리나라 호박재배면적은 표 12에 나타난 바와 같이 8,820ha로 노지재배가 5,830ha, 시설재배가 2,990ha로 보고 되었으며, 경북, 강원도, 전남, 경남 순으로 많이 재배하고 있다. 시설재배의 경우는 경남이 904ha로 단연 높게 나타났으며, 충북과 경북이 그 뒤를 잇고 있다. 최근들어 전남에서의 시설재배가 많이 줄고 있는 반면에 충북에서는 크게 늘어나고 있는 실정이다.

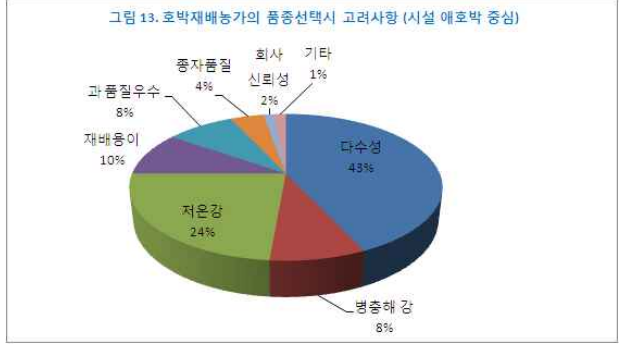
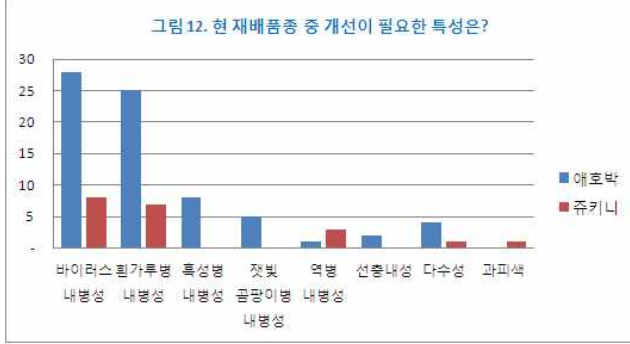
표 12 . 2011년도 시도별 호박 재배면적 (ha)

시도별	전체	노지	시설
계	8,820	5,830	2,990
서울특별시	11	5	6
부산광역시	35	32	3
대구광역시	50	34	16
인천광역시	32	32	0
광주광역시	185	1	184
대전광역시	8	5	3
울산광역시	50	48	2
경기도	1,046	696	350
강원도	1,412	1,351	61
충청북도	773	321	452
충청남도	469	242	227
전라북도	355	208	147
전라남도	1,342	1,088	254
경상북도	1,580	1,203	377
경상남도	1,220	316	904
제주도	252	248	4

② 애호박 주 재배지역에 대한 품종특성 선호도 조사

호박재배 중에 농가가 가장 힘들어하는 부분은 그림 10에 나타난 바와 같이 병충해 방제가 50%로 가장 높게 나타났으며 그 다음이 34%로 겨울철 난방문제를 꼽고 있다. 호박 병충해 중에서는 바이러스병과 흰가루병 방제가 힘든 것(그림 11)으로 나타났으며 잣빛곰팡이와 선충도 문제가 되고 있는 것으로 보인다.





호박재배는 많은 경우 연작을 하고 있어 호박에 많이 이병되는 바이러스와 흰가루병은 재배포장에 만연하고 있다고 할수 있으며 시설재배에서는 더더욱 심각한 실정이다. 따라서 기존 재배품종에서 개선이 필요한 특성 또한 바이러스와 흰가루병으로 나타났으며 시설 저온기재배에서 흑성병과 잣빛곰팡이병도 문제로 대두되고 있다(그림 12).

하지만 품종선택에 있어서는 수량성을 가장 높게 꼽았고 그 다음이 저온에 강한 품종을 선호하는 것으로 나타났다(그림 13). 호박재배에 있어서 가장 큰 문제는 병충해로 인식하면서 품종선택에 있어서는 수량성으로 바뀌는 것은 현재 시중에 병에 강한 품종이 보급되지 않은 상황에서 선택할 수 있는 최선의 방법이 아닌가 생각된다.



내병성 호박품종이 보급될 때 그것을 심을 것인가를 묻는 질문에 대부분인 93%가 심을 의향이 있다고 했지만 재배농민의 보수적인 성향으로 56%는 시험재배를 해본 후 심겠다고 답했다.

③ 주요 경매시장에서의 선호품종 및 특성에 대한 조사

호박을 재배하는 농가입장에서는 재배에 있어서 어려운 점에 집중하고 있는 반면에 유통에 관여하는 경매사나 중도매인의 경우는 과실의 길이나 굵기 및 색택을 중요시하고 있다(그림 15). 특히 겨울에 출하되는 상품의 경우는 과실의 길이와 과실이 인큐 비닐봉지에 꽂찬 정도에 따라 상품의 등급이 결정되는 것으로 보인다.

경매가를 높게 받는 농가의 일반적인 특성을 묻는 질문에 대부분은 품질이 우수하고 선별이 잘되어 시종일관 믿을 수 있는 출하자라고 판단하고 있다. 호박의 물량확보가 힘든 시기는 여름 장마철과 태풍이 오는 시기가 수급을 맞추는데 가장 어려움을 겪고 있는 것으로 응답했으며 한 겨울철이 또한 힘들다고 답했다.

나. 제1 협동과제

수박모자이크바이러스(WMV), 호박황화모자이크바이러스(ZYMV) 및 흰가루병 내병성 검정 및 선발 강원도농업기술원

(1) 연구수행 내용

본 협동과제는 호박의 신품종 육종을 수행함에 있어서 효율적인 바이러스(WMV 및 ZYMV)와 흰가루병 검정기술을 개발하고, 이 검정기술을 활용한 내병성 호박 계통의 선발이 주목적이며, 수박모자이크바이러스(WMV)와 추키니황화모자이크바이러스(ZYMV) 감염 여부를 호박재배의 영농현장 등에서 실용적으로 조기진단 할 수 있는 바이러스 현장검정키트의 개발을 두 번째 목적으로 하여 연구를 수행하였다.

(가) 내병성 검정용 표준 병원균주 준비

애호박 및 추키니호박으로부터 자연 감염된 수박모자이크바이러스와 추키니황화모자이크바이러스의 순수분리 및 흰가루병(*S. fusca*) 균주를 채집하여 계대배양하면서 보존하며 실험의 접종원으로 이용하였다.

(나) 내병성 검정 효율화를 위한 대량접종기술 확립

① 바이러스 접종 : Spray gun method의 개선을 통한 바이러스 종류별, 유묘 생육기에 따른 고효율 접종법 확립을 도모하였다. 계대배양한 각 바이러스 균주의 이병즙액을 CO₂ 가압(2, 3, 4 bar) 미립자분무장치에 의한 접종방법의 효율화를 검토하였다.

② 흰가루병 접종 : 고효율 Spore spray inoculation method 확립을 위하여 계대배양한 각 균주의 흰가루병 포자를 10⁶ spores/L 농도 현탁액의 분무접종(10, 50, 100ml/주)법을 검토하였다.

(다) 단독 및 복합내병성 계통의 선발

상기 병원균에 대한 단독, 복합내병성 계통 선발의 내병성 판별기준은 다음의 매뉴얼에 따랐다.

① 바이러스 저항성(내병성) 판정

바이러스의 인공접종 후 나타나는 식물체에 발현되는 외형적인 병징의 조사는 주 전체의 위축, 잎의 모자이크 증상 등을 육안으로 관찰하여, 조사 계통별로 등급별 발병지수(0-9)로 표시하였다.

0 : 발병 없음, 1 : 어린 잎 병징경미, 3 : 전체 잎 병징경미,
 5 : 전체 잎 모자이크 병징 또는 경미한 위축, 7 : 일부 낙엽 또는 위축,
 9 : 심한 위축 또는 낙엽

또한, 바이러스를 접종한 호박 계통들 중에서 외부병징이 발현되지 않는 계통들에 대하여는 항체진단(ELISA, immunostrips)과 유전자진단(RT-PCR)법을 활용하여, 무병징감염 계통 또는 무감염 계통(조합)을 검정하였다.

② 흰가루병 저항성 판정

발병정도는 병반면적율로 0%인 경우 (0, 무감염), 0.1~5%인 경우는 (1, 경미), 5.1~20% 경우를 (2, 약), 20.1~30%는 (3, 중), 30.1~40%는 (4, 심), 40.1이상 이상인 경우는 (5, 극심) 으로 지수화하여 각 계통(조합)의 흰가루병 내병성을 검정하였다. 본 선발 매뉴얼에 따라 흰가루병 내병성 또는 저항성 호박 계통(조합)을 선발하였다.

(라) 호박 바이러스 진단키트 개발

내병성 검정의 효율성을 높이기 위하여 호박 맞춤형 「간이형 실시간 진단키트(Immunostrips), 현장진단키트」 및 「다량 신속진단키트(ELISA)」 개발을 수행하였다. 간이형 실시간 진단키트는 ZYMV 또는 WMV 감염 유무를 육종포장에서 실시간 검정에 활용하고, 다량 신속진단키트는 육종 과정 중 다수의 내병성계통들의 ZYMV, WMV의 식물체내 감염 정도를 정량적으로 분석하는데 활용하고, 아울러 개발된 바이러스 진단키트는 호박 등 박과류 재배농가의 바이러스 조기 진단 진단서비스에 이용함으로써 농가의 바이러스병 조기진단을 위한 애로기술 해결에도 도움을 주고자 하였다.

(2) 연구수행 결과

(가) 2012년 수행

① 내병성 검정용 표준 병원균주 동정

내병성 검정에 활용할 병원균의 표준균주를 선발 하였다. 추키니황화모자이크바이러스(ZYMV)는 강원도 춘천의 추키니 재배포장에서 심한 모자이크 증상을 보이는 감염주로부터 ZYMV를 분리하였다. 수박모자이크바이러스(WMV)는 강원도 화천의 애호박포장에서 전형적인 WMV 증상을 보이는 감염주로부터 분리하였다. 2종의 바이러스 균주의 동정(Identification)은 본원이 보유하고 있는 각 바이러스의 표준항체에 대한 항원항체면역반응(agar gel double diffusion test)을 통하여 확인하였다. 또한 흰가루병은 강원도농업기술원 애호박 시험포장에서 채집하여, 흰가루병원균 분류 기준에 의거하여 동정하였다. 또한 순수분리한 바이러스 및 흰가루병원균은 시판 애호박(농우애호박) 및 추키니(서울올추키니)에 인공접종하여 각 균주의 이병엽을 냉동보존 또는 식물체에 유지하면서 시험의 접종원으로 사용하였다. 본 실험에서 분리한 2종 바이러스에 대한 항원항체면역검정 결과, ZYMV 및 WMV로 동정되었으며, 건전애호박 유묘에 인공접종한 결과 전형적인 바이러스 병징이 재현되었다(그림1, 2).



ZYMV 병징



ZYMV 형태

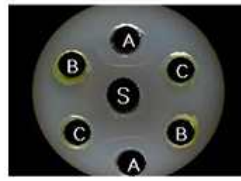


ZYMV 항원항체반응
S:항체, a: 정제ZYMV액, b:이병즙액, c:건전즙액

그림 1. 추키니황화모자이크바이러스(ZYMV) 동정



WMV 병징



WMV 항원항체반응.

S:항체, a: 정제WMV액, b:이병즙액, c:건전즙액

그림 2. 수박모자이크바이러스(WMV) 동정

호박의 추키니황화모자이크바이러스와 수박모자이크바이러스는 바이러스 분류상 Group IV(+ssRNA, Potyviridae과, Potyvirus에 속하는 750nm의 사상형 바이러스이다. 이들 바이러스는 거의 대부분의 박과작물들에 감염성을 가지며, 전염방법은 진딧물 및 즙액전염이 주 경로이다. 호박의 흰가루병은, 주로 잎에 발생하며 잎자루와 줄기에도 발생한다. 잎에는 처음 흰색의 분생포자가 점점이 나타나고, 진전되면 잎 전체에 밀가루를 뿌려 놓은 것 같은 증상으로 변한다. 기온이 서늘해지면 병반상에 자낭각이 형성된다. 자낭각의 형태로 병든 식물체 잔재에서 월동하여 1차전염원이 되며, 분생포자가 공기전염 되어 계속해서 발생한다. 흰가루병 집중원은 강원도농업기술원 애호박 시험포장에서 채집하였으며 *Sphaerotheca fusca*로 동정되었다, 이 균주는 생물검정 격리온실에서 애호박 및 추키니호박에 계대보존하면서 실험에 이용하였다. 흰가루병 포자 현탁액을 호박 건전묘 잎에 분무접종시 감염이 용이하였다(그림 4). 또한 본시험 수행되는 인도네시아 포장의 경우에는 따뜻한 기후의 영향으로 자낭각(포자)를 형성하는 세대가 없이도 1년내내 분생포자가 주 전염원으로 역할을 하여, 인도네시아 호박재배지에는 항상 자연발생하는 흰가루병이 상존함을 관찰할 수 있었다. 이 점에 착안하여 다량의 육성계통을 1차 선발하는 인도네시아포장에서 흰가루병 저항성(내병성) 호박계통의 선발에는 흰가루병 인공접종법을 사용하는 국내의 선발시험과 다르게 인공접종법을 사용하지 않고, 호박 생육 전기간의 관찰을 통하여 흰가루병에 강한 계통을 선발하였고, 2차선발은 국내 실험포장에서 실시하였다.

② 내병성 검정 효율화를 위한 대량접종기술 확립

바이러스 대량접종은 가압 미세분무기를 이용하였다(그림 3). 접종원으로는 각각의 바이러스에 감염된 애호박 또는 추키니잎 10g을 100ml-200ml의 0.1M 인산완충액(pH7.2, 0.2% sodium silfite, 10mM 2-mercaptoethanol)을 넣고 냉각된 막자사발에서 미세하게 분쇄 후, 2겹 꺼즈로 거른 이병즙액에 1%

코드번호	D-05
------	------

의 celite 545와 1%의 카보랜덤(400grit)를 첨가하여 분무액으로 사용하였다(그림 3). ZYMV 또는 WMV2를 high pressure spray gun을 이용하여 호박의 유식물체에 즙액접종(압력 2 bar) 결과 95% 이상의 감염율을 높일 수 있었다. 또한 애호박 1주당 접종에 소요되는 시간은 평균 2초 정도로 면봉 등을 이용하는 관행접종방법에 소요 되는 약 20초에 비하여 접종시간을 10배 단축할 수 있었다. 이는 대량의 선발육종에 유용하게 이용될 수 있는 방법이라고 판단되었다(그림 3).



그림 3. 바이러스 즙액접종 장면(고압스프레이 및 관행접종 방법)

흰가루병의 접종은 Spore spray inoculation method를 사용하였다. 애호박에서 계대배양한 흰가루병 포자를 수거하여 멸균증류수로 10^6 spores/L 농도로 현탁액을 조제하여 일반 소형스프레이로 잎에 분무하여 접종하였다(그림 3). 접종엽의 흰가루병 발생율은 95%이상으로 안정적으로 병징이 발현되었다(그림 4).



그림 4. 흰가루병 포자 분무접종 장면 및 흰가루병 병징

③ 내병성 계통의 선발

2012년 1년차 시험에서는 호박 육성조합 234계통을 공시하여 4회에 걸쳐서 인도네시아 육종포장 및 강원도농업기술원 내병성 검정시설에서 수행하였다(그림 5). 실험바이러스로는 추키니황화모자이크바이러스(Zucchini Yellow Mosaic Virus, ZYMV)와 수박모자이크바이러스(Watermelon mosaic virus2, WMV2), 오이모자이크바이러스(Cucumber mosaic virus) 그리고 흰가루병원균(*Sphaerotheca fusca*)을 접종원으로 사용하였다. 호박 육성조합에 대한 병원균의 접종방법은 상기의 재료 및 방법에 따랐다. 선발된 내병성 계통의 목록은 표 1과 같다.

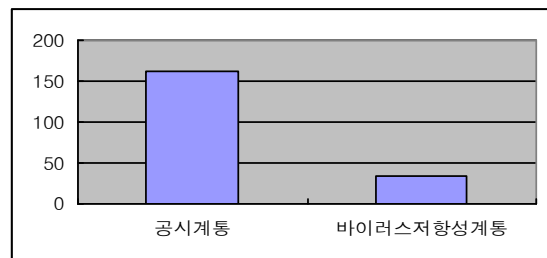


그림 5. 인도네시아 격리온실에서 바이러스 접종 및 1차 내병성선발 (34계통/162계통)

(나) 인도네시아 육종포장에서 바이러스 내병성 선발시험

본 시험은 2012년 1월부터 3월에 걸쳐 수행되었다. 본시험에 공시한 계통은 162계통 (SQ1~162)으로 ZYMV와 CMV에 대한 내병성 검정을 실시하였으며, 그 결과 34계통의 내병성계통을 선발하였다.

표 1. 인도네시아 격리온실에서 162계통에 대한 바이러스 내병성 선발 목록 및 결과

BN	No. of plant inoculated			Virus Symptom 2012/03/16		
	A	B	C	A (control)	B (CMV)	C (ZYMV)
SQ001				0	0	0
SQ002	5	4	4	0	4	1
SQ003	1	1	1	0	0	0
SQ004	5	5	5	0	5	2
SQ005				0	0	0
SQ006	4	3	3	0	3	0
SQ007	5	4	4	0	4	4
SQ008				0	0	0
SQ009	5	5	5	0	5	0
SQ010	5	5	4	0	3	2
SQ011	5	5	5	0	4	0
SQ012	5	5	5	0	5	0
SQ013	5	5	5	0	4	2
SQ014	5	5	5	0	5	2
SQ015	5	5	5	0	5	1
SQ016	5	5	5	0	5	1
SQ017	5	5	5	0	5	2
SQ018	5	5	5	0	2	0
SQ019	5	5	5	0	3	1
SQ020	5	5	5	0	5	3
SQ021	3	3	3	0	2	0
SQ022	5	5	5	0	4	3
SQ023	2	2	2	0	2	1
SQ024	2	2	2	0	2	1
SQ025	5	5	5	0	5	3
SQ026	5	5	5	0	5	1
SQ027	5	5	5	0	5	1
SQ028	5	5	5	0	2	2
SQ029	5	5	5	0	4	0
SQ030	5	5	5	0	4	1
SQ031	2	2	1	0	1	0
SQ032				0	0	0
SQ033	3	2	2	0	2	0
SQ034	2	2	2	0	1	0
SQ035				0	0	0
SQ036	2	5	5	0	0	0
SQ037				0	0	0
SQ038				0	0	0
SQ039				0	0	0
SQ040				0	0	0
SQ041				0	0	0

BN	No. of plant inoculated			Virus Symptom		
	A	B	C	2012/03/16		
				A (control)	B (CMV)	C (ZYMV)
SQ042	3	3	3	0	2	0
SQ043	3	3	2	0	1	2
SQ044	3	3	2	0	1	0
SQ045	2	3	2	0	1	0
SQ046	5	5	5	0	0	1
SQ047	5	5	5	0	0	0
SQ048	5	5	5	0	0	0
SQ049	5	5	5	0	0	0
SQ050	3	3	3	0	1	0
SQ051				0	0	0
SQ052	5	5	5	0	0	0
SQ053	5	5	4	0	1	0
SQ054				0	0	0
SQ055				0	0	0
SQ056	5	5	5	0	1	0
SQ057	5	4	3	0	2	0
SQ058				0	0	0
SQ059	4	4	4	0	0	0
SQ060				0	0	0
SQ061	5	4	4	0	0	0
SQ062	5	5	5	0	2	0
SQ063	3	3	3	0	0	0
SQ064				0	0	0
SQ065	5	5	5	0	2	0
SQ066	5	5	5	0	4	0
SQ067	1	1	1	0	0	0
SQ068				0	0	0
SQ069	5	5	5	0	3	0
SQ070	5	5	5	0	0	0
SQ071	5	5	5	0	3	0
SQ072	5	5	5	0	0	0
SQ073				0	0	0
SQ074	5	5	5	0	0	0
SQ075	5	4	4	0	1	0
SQ076	5	5	5	0	3	0
SQ077	5	5	5	0	0	1
SQ078	5	5	5	0	2	0
SQ079	5	5	5	0	1	0
SQ080	2	2	2	0	0	0
SQ081	1	3	1	0	0	0
SQ082	5	5	5	0	0	0

BN	No. of plant inoculated			Virus Symptom		
	A	B	C	2012/03/16		
				A (control)	B (CMV)	C (ZYMV)
SQ083	3	2	3	0	0	0
SQ084	5	5	5	0	0	0
SQ085	5	5	5	0	1	0
SQ086	5	5	5	0	0	0
SQ087	5	5	5	0	0	0
SQ088	5	5	5	0	2	1
SQ089	5	4	4	0	0	0
SQ090				0	0	0
SQ091	5	5	5	0	3	0
SQ092	5	5	5	0	1	0
SQ093	4	4	3	0	1	0
SQ094	3	3	3	0	1	0
SQ095	5	5	5	0	0	0
SQ096	5	5	5	0	0	0
SQ097	5	5	5	0	4	0
SQ098	5	5	5	0	0	0
SQ099	4	4	3	0	0	0
SQ100	5	5	5	0	3	0
SQ101	3	3	3	0	0	0
SQ102	5	4	4	0	2	0
SQ103	3	2	2	0	1	0
SQ104	5	5	5	0	1	0
SQ105	5	5	5	0	0	0
SQ106	5	5	5	0	4	3
SQ107	5	5	5	0	1	0
SQ108	5	5	5	0	1	1
SQ109	5	5	5	0	2	0
SQ110	5	5	5	0	0	0
SQ111	4	2	3	0	1	0
SQ112	4	4	4	0	2	1
SQ113	5	5	5	0	4	0
SQ114				0	0	0
SQ115	5	5	5	0	2	2
SQ116	5	5	5	0	2	1
SQ117	5	5	5	0	0	0
SQ118	5	5	5	0	2	0
SQ119	5	5	5	0	0	0
SQ120	5	5	5	0	0	1
SQ121	5	5	5	0	5	0
SQ122	5	5	5	0	0	0
SQ123	5	5	5	0	2	1

BN	No. of plant inoculated			Virus Symptom		
	A	B	C	2012/03/16		
				A (control)	B (CMV)	C (ZYMV)
SQ124	5	5	5	0	5	1
SQ125	5	5	5	0	0	0
SQ126	3	2	2	0	0	0
SQ127	4	3	3	0	3	0
SQ128	5	5	4	0	0	0
SQ129	3	3	3	0	0	0
SQ130	5	5	5	0	2	0
SQ131	5	5	5	0	1	0
SQ132	4	4	3	0	2	0
SQ133	5	5	4	0	5	2
SQ134	5	5	5	0	4	0
SQ135	5	5	5	0	1	0
SQ136	5	5	5	0	2	2
SQ137	4	5	4	0	0	0
SQ138	4	4	4	0	0	0
SQ139	5	5	5	0	5	0
SQ140	5	5	5	0	4	0
SQ141	5	5	5	0	4	0
SQ142	3	3	3	0	2	0
SQ143	5	5	5	0	1	0
SQ144				0	0	0
SQ145				0	0	0
SQ146				0	0	0
SQ147	5	5	5	0	2	0
SQ148	5	5	5	0	3	0
SQ149	5	5	5	0	5	0
SQ150	5	5	5	0	3	0
SQ151	5	5	5	0	5	0
SQ152	5	5	5	0	5	0
SQ153	5	5	5	0	5	0
SQ154	5	5	5	0	4	0
SQ155	4	4	4	0	3	0
SQ156				0	0	0
SQ157	4	4	4	0	2	0
SQ158	2	1	1	0	0	0
SQ159	5	5	5	0	1	0
SQ160	5	5	5	0	1	2
SQ161				0	0	0
SQ162				0	0	0

(다) 흰가루병 저항성 계통 선발

본 시험은 2012년 5월부터 8월에 걸쳐 강원도농업기술원 포장에서 수행하였다. 본 시험에는 흰가루병에 대한 내병성 검정을 실시하였다. 그 결과 흰가루병 내병성 2계통 선발 (K05, K06)을 선발하였다. 이 2계통은 흰가루병 발병도는 주당 흰가루병 발생 병반면적율이 0.1~5%수준인 발병도1.2~1.3의 높은 저항성을 보였다(표 2).

표 2. 애호박 흰가루병 저항성 계통 선발

계통	어린과실				절간장 (20마디, cm)	엽병장 (20마디, cm)	엽장 (cm)	엽폭 (cm)	흰가루병 0(면역성) 1(저항성) 5(감수성)
	표피색 1(흰색)~ 5(짙은색)	과형 1(타원형) ~5(실린더형)	4일차 과장 (cm)	4일차 과폭 (cm)					
K01	3.3	3.8	14.7	4.0	15.1	35.4	32.8	28.2	4.9
K02	2.6	4.0	16.6	4.1	16.2	34.4	34.8	31.5	3.9
K03	4.0	4.8	19.5	4.2	17.8	25.5	32.3	28.9	4.0
K04	3.8	3.8	17.8	4.3	14.6	24.5	28.5	25.9	5.0
K05	3.1	3.8	17.5	4.1	15.2	27.0	32.2	27.4	1.2
K06	4.9	4.0	15.5	3.8	14.7	26.7	33.2	28.7	1.3

(라) 국내포장 바이러스 내병성 선발시험

2012년 5월부터 8월에 걸쳐 강원도농업기술원 포장에서 수행되었다. 본시험에는 주키니황화모자이크바이러스(ZYMV)에 저항성을 평가하였다. 그 결과 K03 및 K05을 선발하였다(그림 6).

	K2 (10 ⁻¹)	K3 (10 ⁻¹)	K4 (10 ⁻¹)	K5 (10 ⁻¹)	농우 (10 ⁻¹)	K2 (10 ⁻²)	K3 (10 ⁻²)	K4 (10 ⁻²)	K5 (10 ⁻²)	농우 (10 ⁻²)	진전
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B	1.468	0.287	0.291	0.283	1.054	0.795	0.311	0.313	0.303	0.569	0.281
C	3.284	0.353	1.708	2.332	1.616	1.393	0.357	0.776	0.921	0.995	0.311
D	0.348	0.363	3.232	2.237	1.06	0.321	0.305	1.41	1.085	0.858	0.275
E	0.333	0.464	2.119	0.31	3.097	0.326	0.336	1.016	0.288	1.26	0.265
F	1.685	1.372	3.361	0.35	1.193	0.944	0.593	2.046	0.276	0.821	0.224
이병주 점점주	3 5	1 5	4 5	2 5	5 5	3 5	3 5	4 5	2 5	5 5	0 5

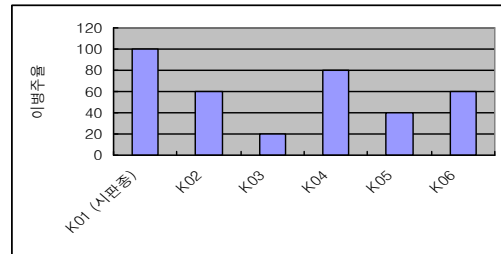


그림 6. ELISA법을 이용한 바이러스 내병성계통 선발

(마) 복합내병성 계통의 선발

2012년 8월부터 10월에 걸쳐 강원도농업기술원 포장에서 수행하였다. 본시험에서 ZYMV, WMV2 및 *Sphaerotheca fusca*에 복합 내병성계통을 실시하였다(그림 7). 현재까지(10.17)의 결과 ZYMV 단독 내병성 25계통, WMV 단독 내병성 25계통, 흰가루병 단독 내병성 16계통을 선발하였다. 또한 바이러스 및 흰가루병에 복합저항성을 가지는 11 계통이 선발되었다(표 3, 그림8).



그림 7. 복합내병성 계통의 선발

표. 3. 50계통(KK01~KK50)에 대한 복합내병성 계통 선발 목록 및 결과

조사일	10/15			조사일	10/15			조사일	10/15			조사일	10/15			조사일	10/15						
	Z	W	환		Z	W	환		Z	W	환		Z	W	환		Z	W	환				
	Y M V	M V 2	가 루 병		Y M V	M V 2	가 루 병		Y M V	M V 2	가 루 병		Y M V	M V 2	가 루 병		Y M V	M V 2	가 루 병	Y M V	M V 2	가 루 병	
K01-1	-	-	3	K02-1	-	-	2	K03-1	-	-	0	K04-1	-	-	0	K05-1	-	-	1	K06-1	+	+	0
K01-2	-	-	2	K02-2	-	-	2	K03-2	-	-	0	K04-2	-	-	0	K05-2	-	-	2	K06-2	+	+	0
K01-3	-	-	2	K02-3	-	-	2	K03-3	-	-	0	K04-3	-	-	1	K05-3	-	-	2	K06-3	+	+	0
K01-4	-	-	2	K02-4	-	-	2	K03-4	-	-	0	K04-4	-	-	0	K05-4	-	-	2	K06-4	+	+	0
K01-5	-	-	3	K02-5	-	-	2	K03-5	-	-	0	K04-5	-	-	1	K05-5	-	-	2	K06-5	+	+	0
K01-6	-	-	2	K02-6	-	-	2	K03-6	-	-	0	K04-6	-	-	1	K05-6	-	-	2	K06-6	+	+	0
K01-7	-	-	2	K02-7	-	-	2	K03-7	-	-	0	K04-7	-	-	0	K05-7	-	-	2	K06-7	-	-	0
K01-8	-	-	2	K02-8	-	-	2	K03-8	-	-	0	K04-8	-	-	0	K05-8	-	-	2	K06-8	+	+	0
K01-9	-	-	3	K02-9	-	-	1	K03-9	-	-	0	K04-9	-	-	1	K05-9	-	-	2	K06-9	X	X	X
K01-10	-	-	2	K02-10	-	-	2	K03-10	-	-	0	K04-10	-	-	1	K05-10	-	-	2	K06-10	+	+	0
K07-1	-	-	1	K08-1	+	+	1	K09-1	+	+	1	K10-1	-	-	0	K11-1	-	-	2	K12-1	-	-	0
K07-2	-	-	1	K08-2	+	+	1	K09-2	+	+	1	K10-2	-	-	0	K11-2	-	-	2	K12-2	-	-	0
K07-3	-	-	1	K08-3	-	-	1	K09-3	-	-	1	K10-3	-	-	0	K11-3	-	-	2	K12-3	-	-	0
K07-4	-	-	0	K08-4	-	-	1	K09-4	+	+	1	K10-4	-	-	1	K11-4	+	+	2	K12-4	-	-	0
K07-5	+	+	1	K08-5	-	-	1	K09-5	+	+	0	K10-5	-	-	0	K11-5	-	-	1	K12-5	-	-	0
K07-6	-	-	1	K08-6	-	-	1	K09-6	+	+	1	K10-6	-	-	1	K11-6	+	+	2	K12-6	-	-	0
K07-7	-	-	3	K08-7	+	+	1	K09-7	+	+	1	K10-7	-	-	0	K11-7	-	-	2	K12-7	-	-	0
K07-8	-	-	4	K08-8	+	+	1	K09-8	+	+	1	K10-8	-	-	0	K11-8	-	-	1	K12-8	-	-	0
K07-9	-	-	5	K08-9	+	+	1	K09-9	+	+	1	K10-9	-	-	0	K11-9	-	-	1	K12-9	-	-	0
K07-10	-	-	4	K08-10	-	-	1	K09-10	+	+	2	K10-10	-	-	0	K11-10	-	-	1	K12-10	-	-	0
K13-1	-	-	1	K14-1	X	X	X	K15-1	+	+	0	K16-1	+	+	3	K17-1	-	-	1	K18-1	-	-	0
K13-2	-	-	0	K14-2	-	-	1	K15-2	+	+	0	K16-2	-	-	2	K17-2	-	-	1	K18-2	-	-	0
K13-3	-	-	0	K14-3	-	-	1	K15-3	+	+	0	K16-3	-	-	2	K17-3	-	-	1	K18-3	-	-	0
K13-4	-	-	1	K14-4	-	-	0	K15-4	+	+	0	K16-4	+	+	2	K17-4	-	-	1	K18-4	-	-	0
K13-5	-	-	0	K14-5	-	-	0	K15-5	+	+	0	K16-5	+	+	2	K17-5	-	-	2	K18-5	-	-	1
K13-6	-	-	0	K14-6	-	-	0	K15-6	+	+	0	K16-6	+	+	2	K17-6	-	-	4	K18-6	-	-	1
K13-7	-	-	0	K14-7	-	-	0	K15-7	+	+	0	K16-7	+	+	2	K17-7	+	+	1	K18-7	-	-	0
K13-8	-	-	0	K14-8	-	-	0	K15-8	+	+	0	K16-8	+	+	5	K17-8	-	-	1	K18-8	-	-	0
K13-9	-	-	0	K14-9	-	-	0	K15-9	+	+	0	K16-9	+	+	2	K17-9	-	-	4	K18-9	-	-	0
K13-10	-	-	1	K14-10	-	-	0	K15-10	+	+	0	K16-10	+	+	2	K17-10	+	+	2	K18-10	-	-	0
K19-1	-	-	1	K20-1	-	-	2	K21-1	+	+	0	K22-1	-	-	2	K23-1	-	-	4	K24-1	-	-	1
K19-2	-	-	1	K20-2	-	-	2	K21-2	+	+	0	K22-2	-	-	2	K23-2	-	-	5	K24-2	-	-	1
K19-3	-	-	1	K20-3	-	-	3	K21-3	+	+	0	K22-3	-	-	3	K23-3	-	-	2	K24-3	-	-	1
K19-4	-	-	0	K20-4	-	-	2	K21-4	+	+	0	K22-4	-	-	4	K23-4	-	-	3	K24-4	-	-	1
K19-5	-	-	1	K20-5	-	-	1	K21-5	+	+	1	K22-5	-	-	2	K23-5	-	-	4	K24-5	-	-	2
K19-6	-	-	1	K20-6	-	-	2	K21-6	+	+	0	K22-6	-	-	2	K23-6	-	-	4	K24-6	-	-	1
K19-7	-	-	2	K20-7	-	-	2	K21-7	+	+	0	K22-7	-	-	2	K23-7	-	-	4	K24-7	-	-	2
K19-8	-	-	1	K20-8	-	-	2	K21-8	+	+	0	K22-8	-	-	2	K23-8	-	-	3	K24-8	-	-	1
K19-9	-	-	1	K20-9	-	-	2	K21-9	+	+	0	K22-9	-	-	2	K23-9	-	-	3	K24-9	-	-	1
K19-10	-	-	1	K20-10	-	-	2	K21-10	+	+	0	K22-10	-	-	2	K23-10	-	-	5	K24-10	-	-	1
K25-1	-	-	0	K26-1	X	X	X	K27-1	-	-	0	K28-1	+	+	0	K29-1	-	-	0	K30-1	-	-	0
K25-2	-	-	0	K26-2	-	-	0	K27-2	+	+	0	K28-2	-	-	0	K29-2	-	-	0	K30-2	-	-	0
K25-3	-	-	0	K26-3	X	X	X	K27-3	+	+	0	K28-3	-	-	0	K29-3	-	-	0	K30-3	-	-	0
K25-4	-	-	0	K26-4	-	-	0	K27-4	X	X	X	K28-4	+	+	0	K29-4	-	-	0	K30-4	-	-	0
K25-5	-	-	0	K26-5	-	-	0	K27-5	-	-	0	K28-5	+	+	0	K29-5	-	-	0	K30-5	-	-	0

조사일	10/15			조사일	10/15			조사일	10/15			조사일	10/15			조사일	10/15						
	Z Y M V	W M V	환 가 루 병		Z Y M V	W M V	환 가 루 병		Z Y M V	W M V	환 가 루 병		Z Y M V	W M V	환 가 루 병		Z Y M V	W M V	환 가 루 병				
K25-6	-	-	0	K26-6	-	-	0	K27-6	-	-	0	K28-6	+	+	0	K29-6	+	+	0	K30-6	-	-	0
K25-7	-	-	1	K26-7	-	-	0	K27-7	-	-	1	K28-7	+	+	0	K29-7	-	-	0	K30-7	-	-	0
K25-8	-	-	0	K26-8	-	-	0	K27-8	-	-	0	K28-8	+	+	0	K29-8	-	-	0	K30-8	-	-	0
K25-9	-	-	0	K26-9	-	-	0	K27-9	-	-	0	K28-9	+	+	0	K29-9	-	-	0	K30-9	-	-	0
K25-10	-	-	0	K26-10	-	-	0	K27-10	X	X	X	K28-10	△	△	0	K29-10	+	+	0	K30-10	-	-	0
K31-1	-	-	1	K32-1	+	+	1	K33-1	+	+	0	K34-1	+	+	2	K35-1	-	-	2	K36-1	-	-	2
K31-2	-	-	1	K32-2	-	-	1	K33-2	-	-	0	K34-2	-	-	2	K35-2	-	-	2	K36-2	-	-	0
K31-3	-	-	1	K32-3	-	-	2	K33-3	-	-	1	K34-3	+	+	2	K35-3	-	-	2	K36-3	-	-	0
K31-4	-	-	1	K32-4	-	-	2	K33-4	-	-	1	K34-4	+	+	4	K35-4	-	-	2	K36-4	+	+	2
K31-5	-	-	1	K32-5	+	+	1	K33-5	+	+	1	K34-5	+	+	3	K35-5	-	-	2	K36-5	+	+	0
K31-6	-	-	1	K32-6	-	-	2	K33-6	-	-	2	K34-6	-	-	2	K35-6	-	-	2	K36-6	-	-	1
K31-7	+	+	1	K32-7	-	-	2	K33-7	+	+	1	K34-7	+	+	2	K35-7	-	-	2	K36-7	-	-	0
K31-8	+	+	1	K32-8	-	-	1	K33-8	+	+	1	K34-8	+	+	3	K35-8	-	-	2	K36-8	-	-	0
K31-9	-	-	1	K32-9	-	-	1	K33-9	-	-	2	K34-9	+	+	2	K35-9	-	-	2	K36-9	-	-	1
K31-10	+	+	1	K32-10	-	-	2	K33-10	-	-	3	K34-10	+	+	2	K35-10	-	-	2	K36-10	+	+	1
K37-1	-	-	2	K38-1	-	-	0	K39-1	-	-	2	K40-1	+	+	3	K41-1	-	-	2	K42-1	-	-	2
K37-2	-	-	2	K38-2	-	-	0	K39-2	-	-	3	K40-2	+	+	2	K41-2	-	-	3	K42-2	X	X	X
K37-3	-	-	2	K38-3	-	-	0	K39-3	-	-	2	K40-3	X	X	X	K41-3	-	-	2	K42-3	+	+	2
K37-4	-	-	2	K38-4	-	-	0	K39-4	-	-	1	K40-4	X	X	X	K41-4	-	-	2	K42-4	-	-	2
K37-5	-	-	2	K38-5	-	-	0	K39-5	-	-	4	K40-5	+	+	1	K41-5	-	-	2	K42-5	+	+	2
K37-6	-	-	2	K38-6	-	-	0	K39-6	-	-	4	K40-6	+	+	1	K41-6	-	-	3	K42-6	+	+	2
K37-7	-	-	2	K38-7	-	-	0	K39-7	-	-	3	K40-7	+	+	1	K41-7	-	-	3	K42-7	-	-	2
K37-8	-	-	2	K38-8	-	-	0	K39-8	-	-	5	K40-8	X	X	X	K41-8	-	-	2	K42-8	+	+	2
K37-9	-	-	2	K38-9	-	-	0	K39-9	-	-	4	K40-9	+	+	1	K41-9	-	-	3	K42-9	-	-	2
K37-10	-	-	2	K38-10	-	-	0	K39-10	-	-	4	K40-10	-	-	1	K41-10	-	-	4	K42-10	+	+	2
K43-1	-	-	3	K44-1	+	+	3	K47-1	-	-	3	K48-1	+	+	3	K49-1	+	+	2	K50-1	-	-	2
K43-2	+	+	2	K44-2	+	+	5	K47-2	-	-	2	K48-2	-	-	3	K49-2	+	+	2	K50-2	-	-	2
K43-3	-	-	3	K44-3	-	-	5	K47-3	+	+	3	K48-3	+	+	3	K49-3	-	-	2	K50-3	-	-	2
K43-4	-	-	1	K44-4	-	-	5	K47-4	+	+	0	K48-4	+	+	3	K49-4	+	+	2	K50-4	-	-	2
K43-5	-	-	1	K44-5	-	-	4	K47-5	+	+	4	K48-5	-	-	3	K49-5	-	-	2	K50-5	-	-	2
K43-6	-	-	3	K44-6	-	-	5	K47-6	+	+	4	K48-6	+	+	3	K49-6	+	+	2	K50-6	-	-	2
K43-7	-	-	3	K44-7	-	-	4	K47-7	+	+	3	K48-7	+	+	2	K49-7	X	X	X	K50-7	-	-	2
K43-8	-	-	3	K44-8	-	-	5	K47-8	-	-	3	K48-8	+	+	2	K49-8	+	+	2	K50-8	-	-	2
K43-9	-	-	3	K44-9	-	-	4	K47-9	+	+	3	K48-9	+	+	2	K49-9	+	+	2	K50-9	-	-	2
K43-10	-	-	2	K44-10	-	-	2	K47-10	+	+	3	K48-10	-	-	2	K49-10	+	+	2	K50-10	-	-	2
K45-1	-	-	0	K46-1	+	+	2	바이러스 및 환가루병 단독 내병성 계통 선발 결과 ① ZYMV 단독 내병성 계통 : 25계통(표시색 ■) - 조사기준 : 접종14일 후 현재까지 무 감염주 ② WMV 단독 내병성 계통 : 25계통(표시색 ■) - 조사기준 : 접종14일 후 현재까지 무 감염주 ③ 환가루병 단독 내병성 계통 : 16계통 (발병도 0: 5계통, 발병도 1: 11계통) - 조사기준 : 0 : 병반면적율 0(표시색 ■), 1: 병반면적율 0.1-5.0(표시색 ■), 2 : 병반면적율 5.1~20.0, 3 : 병반면적율 20.1~30.0, 4 : 병반면적율 30.1~40.0, 5 : 병반면적율 40.1% 이상 ④ ZYMV, WMV2 및 환가루병 복합내병성 계통 : 11계통 (KK03, KK04, KK10, KK12, KK13, KK14, KK18, KK25, KK26, KK30, KK38)															
K45-2	-	-	1	K46-2	-	-	2																
K45-3	-	-	0	K46-3	-	-	2																
K45-4	-	-	0	K46-4	-	-	2																
K45-5	-	-	0	K46-5	-	-	2																
K45-6	-	-	1	K46-6	-	-	2																
K45-7	-	-	2	K46-7	+	+	2																
K45-8	-	-	1	K46-8	+	+	2																
K45-9	-	-	0	K46-9	+	+	2																
K45-10	-	-	3	K46-10	+	+	1																



KK03



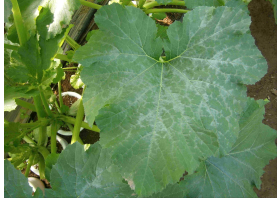
KK04



KK10



KK12



KK13



KK14



KK18



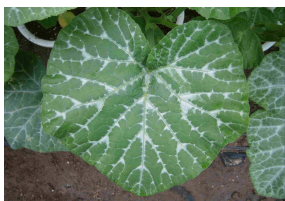
KK25



KK26



KK30



KK38



그림 8. 바이러스와 흰가루병에 복합내병성 형질을 갖는 11계통 선발(2012년 수행)

(2) 2013년 수행

(가) 내병성계통의 선발

호박 육성조합 169계통을 공시하여 2차에 걸쳐서 인도네시아 육종포장과 강원도농업기술원 내병성 검정시설에서 수행하였다. 공시바이러스로는 주키니황화모자이크바이러스(Zucchini Yellow Mosaic Virus, ZYMV), 수박모자이크바이러스(Watermelon mosaic virus, WMV) 그리고 흰가루병원균(*Sphaerotheca fusca*)을 접종원으로 사용하였다. 호박 육성조합에 대한 병원균의 접종방법 및 각 병원균의 저항성 판별은 연구수행방법에 기술된 방법을 따랐다.

(나) 인도네시아 육종포장에서 바이러스 내병성계통 선발

본 시험은 2013년 1월부터 3월에 걸쳐 수행되었다. 본시험에 공시한 계통은 127계통 (PA1-PA126) 으로 ZYMV와 WMV에 대한 내병성 검정을 실시하였으며(표 4), 그 결과 아래 목록의 46종 바이러스 내병성계통을 선발하였다.

- 중 저항성 후보계통 선발 : 24계통

PA004,PA005,PA006,PA011,PA014,PA015, PA017, PA019,PA020,PA028, PA030,PA036, PA037,PA040,PA041,PA043,PA050,PA079,PA084,PA087,PA088,PA100-2,PA102,PA118

- 강 저항성 후보계통 선발 : 22계통

PA016,PA023,PA033,PA034,PA044,PA048,PA058,PA059,PA064,PA070,PA071,PA080,PA085, PA086,PA092,PA095,PA098,PA112,PA115,PA123,PA125,PA100-1

표 4. 2013년 인도네시아 격리온실에서 127계통에 대한 바이러스 내병성 선발 목록 및 결과

BN	No. of plant for inoculation				Checking date, no. of infected plant															
	2013-02-20				2013-02-27				2013-03-03				2013-03-04				2013-03-07			
	ZY MV	W MV	Mix	Co n	ZYM V	WM V	Mix	Con	ZYM V	WM V	Mix	Con	ZYM V	WM V	Mix	Con	ZYM V	WM V	Mix	Con
PA001	4	4	4	4	4	3	0	-	4	3	0	-	4	3	0	-	4	3	1	
PA002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PA003	4	3	3	3	0	0	0	-	4	0	0	-	4	0	0	-	4	0	0	
PA004	4	4	4	4	0	0	0	-	1	0	1	-	1	0	1	-	1	0	1	
PA005	4	4	4	4	0	1	0	-	0	1	0	-	0	1	0	-	0	1	0	
PA006	4	4	4	4	1	1	0	-	1	1	0	-	1	1	0	-	1	1	0	
PA007	4	4	4	4	3	2	1	-	4	2	1	-	4	2	1	-	4	2	1	
PA008	4	4	4	4	0	0	0	-	2	1	1	-	2	1	1	-	2	1	1	
PA009	4	4	4	4	1	0	0	-	2	0	1	-	2	0	1	-	2	0	1	
PA010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PA011	3	3	3	2	0	0	0	-	0	1	0	-	0	1	0	-	0	1	0	
PA012	4	4	4	4	2	0	1	-	2	0	1	-	2	0	1	-	2	0	1	
PA013	4	4	4	4	2	2	1	-	3	3	1	-	3	3	1	-	3	3	1	
PA014	2	1	1	1	1	0	0	-	1	0	0	-	1	0	0	-	1	0	0	
PA015	4	4	4	4	1	0	0	-	1	0	0	-	1	0	0	-	1	0	0	
PA016	4	4	4	4	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	
PA017	2	2	2	2	0	0	0	-	1	0	0	-	1	0	0	-	1	0	0	
PA018	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PA019	-	-	1	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	
PA020	-	-	1	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	
PA021	4	4	4	4	3	0	1	-	3	0	1	-	3	0	1	-	3	0	1	
PA022	-	-	3	2	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	
PA023	3	3	3	3	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	

													코드번호			D-05			
PA024	4	4	4	4	4	1	0	-	4	1	0	-	4	1	0	-	4	1	0
PA025	4	4	4	4	1	3	0	-	1	3	0	-	1	3	0	-	1	3	0
PA026	3	2	2	2	1	2	0	-	1	2	0	-	1	2	0	-	1	2	0
PA027	4	4	4	4	1	0	1	-	2	0	1	-	2	0	1	-	2	0	1
PA028	4	4	4	4	0	1	1	-	0	1	1	-	0	1	1	-	0	1	1
PA029	4	4	4	4	2	3	0	-	2	3	0	-	2	3	0	-	2	3	0
PA030	4	4	4	4	1	0	1	-	1	0	1	-	1	0	1	-	1	0	1
PA031	4	3	3	3	1	1	1	-	1	1	1	-	1	1	1	-	1	2	1
PA032	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PA033	4	4	4	4	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
PA034	-	-	4	2	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0
PA035	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PA036	4	4	4	4	0	0	0	-	0	0	1	-	0	0	1	-	0	0	1
PA037	4	4	4	3	0	0	1	-	0	0	1	-	0	0	1	-	0	0	1
PA038	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PA039	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PA040	-	2	3	2	-	0	0	-	-	1	0	-	-	1	0	-	-	1	0
PA041	-	-	3	1	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0
PA042	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PA043	2	2	3	2	0	0	0	-	0	1	0	-	0	1	0	-	0	1	0
PA044	-	-	4	2	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0
PA045	4	4	4	4	2	0	0	-	0	1	0	-	2	1	0	-	2	1	0
PA046	4	3	3	3	2	0	0	-	0	1	1	-	2	1	1	-	2	1	1
PA047	-	-	1	1	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0
PA048	3	3	3	2	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
PA049	4	4	4	4	3	4	0	-	3	4	0	-	3	4	0	-	3	4	0
PA050	4	4	4	3	1	1	0	-	1	1	0	-	1	1	0	-	1	1	0
PA051	4	4	4	4	1	1	0	-	4	1	0	-	4	2	0	-	4	2	0
PA052	4	4	4	4	4	3	0	-	4	3	2	-	4	3	2	-	4	3	2
PA053	2	2	2	1	2	0	0	-	2	0	0	-	2	0	0	-	2	0	0
PA054	4	4	4	4	4	2	0	-	4	2	1	-	4	2	1	-	4	2	1
PA055	4	4	4	4	1	2	0	-	2	2	0	-	2	2	0	-	2	2	0
PA056	2	2	2	2	1	1	0	-	1	1	1	-	1	1	1	-	1	1	1
PA057	4	4	4	4	1	1	0	-	1	2	0	-	2	2	0	-	1	2	1
PA058	-	-	1	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0
PA059	3	3	3	2	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
PA060	4	4	4	4	2	3	1	-	3	3	1	-	3	3	1	-	3	3	1
PA061	4	4	4	4	4	1	0	-	4	1	0	-	4	1	0	-	4	1	0
PA062	4	4	4	4	2	3	0	-	2	3	0	-	2	3	0	-	2	3	0
PA063	4	4	4	4	1	2	0	-	1	2	0	-	1	2	0	-	1	3	0
PA064	3	3	3	2	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
PA065	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PA066	4	4	4	4	0	0	0	-	1	0	1	-	1	0	1	-	1	0	2
PA067	4	4	4	4	3	2	0	-	4	2	1	-	4	2	1	-	4	3	1
PA068	-	-	2	1	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0
PA069	4	4	4	4	3	2	0	-	3	2	0	-	3	2	0	-	3	2	0
PA070	-	-	2	2	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0
PA071	3	3	4	2	0	0	0	-	1	0	1	-	1	0	1	-	1	0	1
PA072	4	4	4	4	0	2	0	-	0	2	0	-	0	2	0	-	0	2	0
PA073	1	1	1	1	1	0	0	-	1	0	0	-	1	0	0	-	1	0	0
PA074	1	2	1	1	1	0	0	-	1	0	0	-	1	0	0	-	1	0	0
PA075	4	4	3	3	1	1	0	-	1	1	1	-	1	1	1	-	1	1	1
PA076	4	4	3	3	2	0	0	-	2	0	1	-	2	0	1	-	2	0	1
PA077	3	3	2	2	0	0	0	-	1	2	0	-	1	2	0	-	1	2	0

																코드번호			D-05		
PA078	4	4	4	4	0	0	0	-	0	2	0	-	0	2	0	-	0	2	0		
PA079	3	2	2	2	0	0	0	-	1	0	0	-	1	0	0	-	1	0	0		
PA080	4	4	4	3	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0		
PA081	3	3	2	2	1	1	0	-	2	1	0	-	2	1	0	-	2	1	0		
PA082	1	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-		
PA083	2	2	2	2	0	0	0	-	0	1	0	-	0	1	0	-	0	1	0		
PA084	4	4	4	4	1	1	0	-	1	1	1	-	1	1	1	-	1	1	1		
PA085	4	4	4	4	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0		
PA086	4	4	4	3	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0		
PA087	4	4	4	4	1	0	0	-	1	0	0	-	1	0	0	-	1	0	0		
PA088	4	4	4	4	1	0	0	-	1	0	0	-	1	0	0	-	1	0	0		
PA089	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
PA090	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
PA091	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
PA092	2	2	2	2	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0		
PA093	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
PA094	2	1	2	1	1	0	0	-	1	1	0	-	1	1	0	-	1	1	0		
PA095	4	4	4	4	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0		
PA096	-	-	1	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0		
PA097	-	-	3	2	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0		
PA098	4	4	4	4	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0		
PA099	4	4	4	4	0	2	0	-	0	2	0	-	0	2	0	-	0	2	0		
PA100-2	4	4	4	3	0	1	0	-	0	1	0	-	0	1	0	-	0	1	0		
PA101	3	3	3	3	1	0	0	-	1	2	1	-	1	2	1	-	2	2	1		
PA102	3	3	3	3	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0		
PA103	-	-	1	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0		
PA104	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
PA105	1	-	1	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0		
PA106	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
PA107	2	2	2	2	1	1	0	-	1	1	0	-	1	1	0	-	1	1	0		
PA108	4	4	3	3	2	3	0	-	2	3	0	-	2	3	0	-	2	3	0		
PA109	4	4	4	4	1	1	0	-	1	2	1	-	1	2	1	-	1	2	1		
PA110	3	2	2	2	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0		
PA111	4	4	4	4	0	1	1	-	0	3	1	-	0	3	1	-	0	3	1		
PA112	4	2	2	4	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0		
PA113	2	1	2	1	0	0	0	-	0	0	1	-	0	0	1	-	0	0	1		
PA114	4	3	3	3	3	1	0	-	3	1	0	-	3	1	0	-	3	1	0		
PA115	4	4	4	4	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0		
PA116	4	4	4	4	2	0	0	-	2	0	0	-	2	0	0	-	2	0	0		
PA117	4	4	4	4	2	4	1	-	2	4	1	-	2	4	1	-	2	4	1		
PA118	3	3	2	2	1	0	0	-	1	0	0	-	1	0	0	-	1	0	0		
PA119	4	4	4	4	1	2	1	-	2	2	2	-	2	2	2	-	2	2	2		
PA120	2	2	2	1	1	0	0	-	2	0	0	-	2	0	0	-	2	0	0		
PA121	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
PA122	-	-	1	1	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0		
PA123	4	4	4	4	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0		
PA124	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
PA125	-	-	3	2	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0		
PA126	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
PA100-1	-	-	2	2	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0		

(다) 국내포장에서 바이러스 내병성 선발시험

본 시험은 2013년 9월~10월에 걸쳐 강원도농업기술원 포장에서 수행하였다. 공시한 계통 42 계통(KB01~KB42)은 2013년 인도네시아 포장의 1차 내병성 검정에서 저항성을 나타냈던 선발 계통 이다. 바이러스는 박과류 병원성 바이러스 균주 (WMV 및 ZYMV)를 사용하였고, 흰가루병은 *Sphaerotheca cucurbitae* 및 *S. fusca*를 사용하였다. 바이러스 저항성 판정은 외부병징 (주 위축, 잎의 모자이크 등 증상, 발병지수: 0-9) 및 내부병징 (조직내의 바이러스 ELISA) 조사를 하였다. 흰가루병 저항성 판정은 발병정도는 병반면적율로 0%인 경우 (0, 무감염), 0.1~5%인 경우는 (1, 경미), 5.1~20%경우를 (2, 약), 20.1~30는 (3, 중), 30.1~40는 (4, 심), 40.1이상 이상인 경우는 (5, 극심) 조사였다. 그 결과, 바이러스 저항성 계통은 8(KB05, KB07, KB08, KB09, KB11, KB12, KB13, KB35)으로 전혀 감염이 되지 않는 고도 저항성계통이 선발되었다. 바이러스 저항성 8계통 중에서 흰가루병에 강한 발병지수 (1) 이하인 계통은 5계통(KB05, KB07, KB08, KB09, KB13)이고 나머지 3계통(KB11, KB12, KB35)고 흰가루병 발병지수가 2~3으로 흰가루병에 강하였다(그림 6).



그림 9. 2013년 국내 격리온실에서 선발한 바이러스 및 흰가루병 저항성 8계통

(라) 호박 바이러스 현장진단키트(Simple Speed gold immunostips kit, SIS-Gold kit) 개발**① ZYMV 항원 정제**

바이러스병에 감염된 호박의 잎으로부터 순수분리한 ZYMV를 접종원으로 이용하였다. 본 바이러스의 외피단백질을 코딩하는 염기서열이 국내에서 기보된 ZYMV-k1계통의 염기서열과 98%의 상동성을 보여 국내에 과거부터 다발생하고 있는 ZYMV로 확인되었다. 이 바이러스는 온실에서 잡균에 오염되지 않게 건전하게 생육시킨 애호박 유묘에 ZYMV를 인공접종하여 바이러스를 대량증식하였다. 인공접종법은 금강사(600mesh)를 본엽이 4~6엽 정도 자란 애호박의 잎에 소량씩 산포하고 ZYMV 감염 즙액을 소형멸균거즈구(Ø2cm)에 충분히 흡수시켜서 잎 표면을 약하게 문지르면, 금강사에 의해 생성된 엽조직세포의 상처부분을 통하여 ZYMV는 건전 호박에 감염시켜서 증식시켰다. 약 20일이 경과한 후에, ZYMV 병징을 보이는 호박 잎을 채취하여 조직내의 바이러스를 정제하여 항원으로 이용하였다. ZYMV의 정제방법은 다음 방법으로 수행되었다. 먼저 ZYMV에 감염된 신선한 호박잎 200g에 600밀리리터의 0.1몰의 인산완충액(pH7.0)을 넣고, 주서기로 착즙액을 내어 8,000xg에서 30분간 1차 원심분리한 후, 상등액을 2차로 76,000xg에서 2시간 동안 초원심분리(Beckman, USA)하였다. 원심분리된 펠렛(pellet)을 20% 설탕액에 재부유시키고, 설탕밀도 구배 초원심분리(sucrose density gradient ultracentrifugation, 60,000xg, 90분)를 수행한 다음, 가시광하에서 튜브내 유백색 층의 바이러스 분획(fraction)을 분리하였다. 이 분획액을 0.01몰의 인산완충액(pH7.0)에 재희석하여 120,000xg에서 2시간 동안 초원심분리(Beckman, USA)하였다. 원심분리된 펠렛(pellet)을 2ml 0.01몰의 인산완충액(pH7.0)에 용해 시킨 후, 다시 8,000xg에서 30분간 원심분리하여, ZYMV를 분리하였다.

② ZYMV 항체 제조

상기단계에서 정제된 ZYMV 항원을 면역원으로 사용하여 뉴질랜드 화이트 레비트에 면역시켰다. 1회 면역은 0.5ml Freund's complete adjuvants에 희석한 0.5mg/ml의 항원을 주사하고, 그 2주 간격으로 2회 더 Freund's incomplete adjuvants에 희석한 항원을 주사한다. 부분채혈 및 미침강반응법으로 역가를 확인하고, 역가상승을 위하여 추가로 0.5mg/ml의 항원을 1회 혈관 주사하고 10일 후에 16시간 절식시킨 면역동물의 경동맥으로부터 채혈을 실시하였다. 채취한 혈액은 2,000xg에서 5분간 원심분리하여 항혈청액을 얻고, 여기에 0.01% 소듐아자이드(sodium azide)를 첨가, 1ml 바이알에 분주하여 동결건조시켜 보존하였다. 보존 항혈청으로부터 면역글로블린 항체 정제키트를 이용하여 항체를 정제하였다. 얻어진 항체는, ZYMV항원을 면역원으로 하여 제조된 ZYMV에만 특이적인 반응을 하는 항체이다.

③ 현장진단키트의 스트립의 제조

멤브레인 코팅 공정은 니트로셀룰로오스 멤브레인의 검사선 “V” 위치에 ZYMV에 특이적인 항원에 대한 항체를 코팅하고, 대조선 “C” 위치에는 산양 항토끼 항체를 각각 코팅하였다. 여기서, 상기 ZYMV 항원에 대한 항체는, PBS(phosphate buffered saline, pH 7.0)를 이용하여 0.5~1.0mg/ml 농도로 희석하여 사용하였다. 항체-금 접합체 제조 공정은 ZYMV 항체를 금콜로이드와 결합시켰다. 구체적으로, 염화금을 시트르산 나트륨 용액으로 환원시켜, 532nm에서의 흡광도가 10 ± 1 이 되도록, 약 40nm 크기의 금 입자를 제조하였다. 상기 금 입자를 PEG(poly ethylene glycol) 용액으로 안정화시킨 후, ZYMV 항체에 일정 비율(10µg/ml)로 혼합하고, 폴리에스테르 또는 유리 섬유에 함침 및 건조시켜, 금-패드를 제조하였다. 흡수 패드 제조 및 스트립 조립은 상기 니트로셀룰로오스 멤브레인 상단에 건조된 흡수 패드를 부착하여, 니트로셀룰로오스 멤브레인을 통과한 반응 용액이 잘 흡수될 수 있도록 하였다.

④ ZYMV 바이러스 검출 한계 시험

조제 현장진단키트의 ZYMV 바이러스의 검출 한계를 시험하기 위하여, ZYMV 바이러스의 농도를 희석하면서 미세침강반응(Microprecipitation) 시험을 실시하였으며, 그 결과 미세침강반응 역가(Titer)는 U형의 96 웰 플레이트(well plate)의 13개의 웰(well)에 PBS(pH7.2)를 50ul씩 첨가하고, 1번 웰(well)에 ZYMV 항혈청을 50ul 첨가한 후, 2배 단계 희석하였다. 그 후, 각 웰에 0.1mg/ml 농도의 ZYMV를 50ul 씩 첨가하고 잘 흔든 다음, 37°C 에서 120분간 정치하였다. 미세침강반응 역가는 각 웰의 항원-항체 반응에 의해 만들어진 응집물을 만드는 항체의 최고 희석배수로 결정하였다. ZYMV 항체의 미세침강반응 역가는 1/32이고, 신속 면역크로마토그래피 진단키트에 의한 ZYMV 검출한계는 검체내의 바이러스 농도가 0.1mg/ml 경우는 1/4,096 희석배수(0.024ug/ml)까지 검출할 수 있었다(표 5).

표 5. ZYMV 현장진단키트의 검출 한계농도

번호	희석배수	미세침강반응 결과	현장진단키트의 ZYMV 진단결과
1	1/2	+	+
2	1/4	+	+
3	1/8	+	+
4	1/16	+	+
5	1/32	+	+
6	1/64	-	+
7	1/128	-	+
8	1/256	-	+
9	1/512	-	+
10	1/1,024	-	+
11	1/2,048	-	+
12	1/4,096	-	+

⑤ 현장진단키트에 의한 ZYMV의 진단

검체 희석액이 담긴 테스트 튜브에 검체(식물체 조직)를 넣고, 제조한 진단스트립을 넣어 반응시킨다. 이때, 검체 중에 ZYMV가 일정량 이상 존재하면, 금-접합체 패드의 금 입자에 결합되어 있는 ZYMV 항체와 1차 반응하며, 이후 면역크로마토그래피법 원리에 의해, 검체가 멤브레인을 따라 이동하면서, 멤브레인의 대조선 “C” 위치에 있는 산양 항토끼 항체와 2차적으로 결합하여, 검사선 “V” 및 대조선 “C”의 2개의 보라색 밴드가 나타난다. 한편, ZYMV 바이러스 음성의 경우에는 대조선 만의 1개의 보라색밴드를 나타낸다. 그림10은 ZYMV 진단 키트에 검체를 적용시킨 결과를 보여주는 사진으로서, 위쪽 그림이 ZYMV 양성인 경우의 진단 결과를 보여준다.

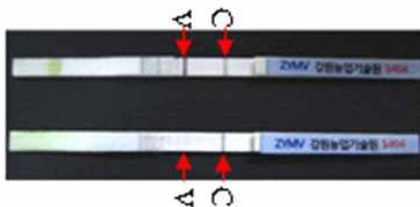


그림10. 주키니황화모자이크바이러스(Zucchini Yellow Mosaic Virus, ZYMV)의 현장진단키트

(3) 2014년 수행

(가) 인도네시아 육종포장에서 바이러스 내병성 선발

본 시험은 2014년 1월부터 3월에 걸쳐 수행되었다. 본 시험에 공시한 계통은 205계통 (PI1~PI205) 으로 ZYMV와 WMV에 대한 내병성 검정을 실시하였으며, 그 결과 34계통의 바이러스 내병성계통을 선발하였다(표 6).

표 6. 2014년 인도네시아 격리온실에서 선발된 바이러스 저항성계통 목록

번호	파종 립수	발아일						발아주수	접종주			병징 발현주수						
		2/7	2/8	2/9	2/10	2/11	2/12		2/17			2/27			4/3			
									A	B	C	A	B	C	A	B	C	
PI175	20		1	8	3			12	3	4	2	0	0	0	0	0	0	0
PI176	20		5	3	3			11	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0
PI177	20	16						16	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0
PI178	20		20					20	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0
PI179	20		18					18	5	5	5	0	1	0	0	0	1	0
PI180	20		20					20	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0
PI182	20		9	10				19	5	5	5	0	1	0	0	0	1	0
PI183	20		13	5				18	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0
PI184	20	18						18	5	5	5	0	1	0	0	0	1	0
PI185	20							0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PI186	20		4	4				8	5	5	4	0	0	0	0	0	0	0
PI187	20		17					17	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0
PI188	20		6					6	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0
PI189	20	15						15	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0
PI190	20		20					20	5	5	5	0	1	0	0	0	1	0
PI191	20		7	3	1	3		14	5	5	4	0	1	0	0	0	1	0
PI192	20		1		6		1	8	4	3	3	0	0	0	0	0	0	0
PI193	20		4			1		5	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0
PI194	20				2			2	1	1	1	0	0	0		0	0	0
PI195	20		3		6	3	1	13	4	4	4	0	0	0	0	0	0	0
PI196	20		15					15	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0
PI197	20		8	4	4			16	5	5	5	0	1	0	0	0	2	0
PI198	20		4					4	0	0	0	0	0			0	0	0
PI199	20		1		6	2	1	10	3	3	2	0	0	0	0	0	0	0
PI200	20				3	1		4	2	0	0	0	0			0	0	0
PI201	20	17						17	5	5	5	0	1	0	0	0	1	0
PI202	20	15						15	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0
PI203	20		11	9				20	5	5	5	1	1	1	0	0	2	0
PI204	20	20						20	5	5	10	0	0	0	0	0	0	0
PI205	20	20						20	5	5	10	0	0	0	0	0	1	0
Total	4100																	

(나) 국내 포장에서 바이러스 및 흰가루병 내병성 선발

본 시험은 2014년 9월~10월에 걸쳐 강원농업기술원에서 수행하였다. 공시 34계통 (KC1~KC34)은 2014년 인도네시아의 1차 내병성 검정에서 선발된 계통이다. 접종원으로서 공시 바이러스는 박과류 병원성 바이러스 균주 (WMV 및 ZYMV)를 사용하였고, 흰가루병은 *S. fusca*를 사용하였다. 바이러스 저항성 판정은 외부병징 (주 위축, 잎의 모자이크 등 증상, 발병지수: 0-9, 0 : 병징 없음, 1 : 어린 잎 병징경미, 3 : 전체 잎 병징경미, 5 : 전체 잎 모자이크 병징 또는 경미한 위축, 7 : 일부 낙엽 또는 위축, 9 : 심한 위축 또는 낙엽) 및 내부병징 (조직내의 바이러스

코드번호	D-05
------	------

RT-PCR) 조사를 하였다. 흰가루병 저항성 판정은 발병정도는 병반면적율로 0%인 경우 (0, 무감염), 0.1~5%인 경우는 (1, 경미), 5.1~20%경우를 (2, 약), 20.1~30는 (3, 중), 30.1~40는 (4, 심), 40.1이상 이상인 경우는 (5, 극심) 조사였다. 그 결과, 육안검정에서 선발된 바이러스(WMV 및 ZYMV) 및 흰가루병에 내병성인 계통은 11(KC03, KC06, KC21, KC24, KC6, KC27, KC28, KC29, KC30, KC33, KC34)계통이 선발되었다(그림 11). 이들 11계통에 대한 바이러스 이병여부를 RT-PCR로 분석한 결과, KC6 및 KC34계통은 무감염하는 고도 저항성 계통이고, 나머지 28 계통에서는 1종 또는 2종 바이러스 모두 검출되었다. 이 결과로부터 KC6 및 KC34계통을 제외한 9계통(KC03, KC21, KC24, KC6, KC27, KC28, KC29, KC30, KC33)은 WMV 및 ZYMV에 감염은 일어나지만, 병징의 발현은 많이 억제되는 내병성형질을 가짐을 알 수 있었다(그림 12).



ZYMV+WMV
내병성(1) 흰가루병
저항성(1)
KC 01



ZYMV+WMV
내병성(3) 흰가루병
저항성(1)
KC 02



ZYMV+WMV
내병성(0) 흰가루병
저항성(0)
KC 03



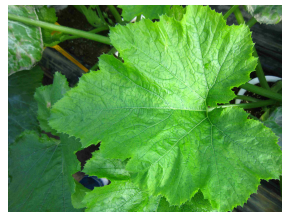
ZYMV+WMV
내병성(5) 흰가루병
저항성(1)
KC 04



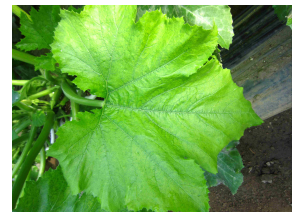
ZYMV+WMV
내병성(3) 흰가루병
저항성(1)
KC 05



ZYMV+WMV
내병성(0) 흰가루병
저항성(1)
KC 06



ZYMV+WMV
내병성(1) 흰가루병
저항성(1)
KC 07



ZYMV+WMV
내병성(1) 흰가루병
저항성(1)
KC 08

ZYMV+WMV
내병성(3) 흰가루병
저항성(2)
KC 09

ZYMV+WMV
내병성(5) 흰가루병
저항성(0)
KC 10

ZYMV+WMV
내병성(3) 흰가루병
저항성(0)
KC 11

ZYMV+WMV
내병성(3) 흰가루병
저항성(0)
KC 12

ZYMV+WMV
내병성(5) 흰가루병
저항성(1)
KC 13

ZYMV+WMV
내병성(3) 흰가루병
저항성(1)
KC 14

ZYMV+WMV
내병성(3) 흰가루병
저항성(1)
KC 15

ZYMV+WMV
내병성(5) 흰가루병
저항성(1)
KC 16



ZYMV+WMV 흰가루병
내병성(5) 저항성(1)
KC 17



ZYMV+WMV 흰가루병
내병성(3) 저항성(2)
KC 18



ZYMV+WMV 흰가루병
내병성(3) 저항성(1)
KC 19



ZYMV+WMV 흰가루병
내병성(3) 저항성(0)
KC 20



ZYMV+WMV 흰가루병
내병성(0) 저항성(1)
KC 21



ZYMV+WMV 흰가루병
내병성(3) 저항성(1)
KC 22



ZYMV+WMV 흰가루병
내병성(0) 저항성(0)
KC 24



ZYMV+WMV 흰가루병
내병성(0) 저항성(1)
KC 26

ZYMV+WMV 흰가루병
내병성(0) 저항성(1)
KC 27

ZYMV+WMV 흰가루병
내병성(0) 저항성(0)
KC 28

ZYMV+WMV 흰가루병
내병성(0) 저항성(1)
KC 29

ZYMV+WMV 흰가루병
내병성(0) 저항성(0)
KC 30



ZYMV+WMV 흰가루병
내병성(0) 저항성(0)
KC 33

ZYMV+WMV 흰가루병
내병성(0) 저항성(0)
KC 34

그림 11. 2014년 국내 격리온실에서 선발된 바이러스 및 흰가루병 복합저항성계통

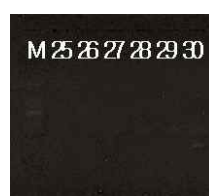


그림 12. 선발 30계통(KC1~KC30)의 접종 상위엽에서 ZYMV(상) 및 WMV(하) 증식 특성

(다) 호박 바이러스 현장진단키트(Simple Speed gold immunostrips kit, SIS-Gold kit) 개발
 오이모자이크바이러스(CMV)를 항원으로 토끼에서 항혈청을 제조하고, 감마글로브린을 정제하여, 전년도에 제작한 주키니황화모자이크바이러스(ZYMV)의 Simple Speed gold immunostrips 제조방법에 따라 CMV 현장진단키트를 제작하였다. 그림13은 현장진단키트의 진단원리를 모식화 한 것이다. 그림 14는 특허출원한 ZYMV 키트의 요약 명세서이며 그림 15는 실제 영농현장에서 사용방법을 설명하였다.

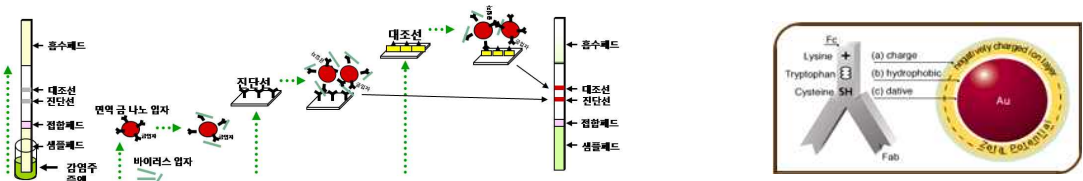


그림 13. 바이러스(CMV 및 ZYMV)의 현장진단키트의 모식도

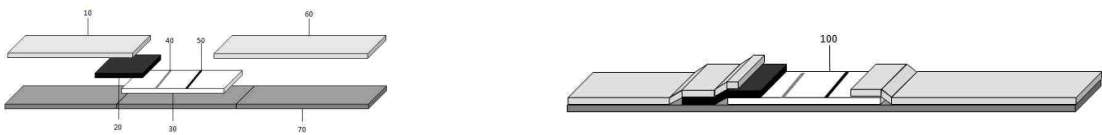


그림 14. ZYMV 현장진단키트 개발(특허출원번호 10-2014-0141843)

면역크로마토그래피를 이용한 ZYMV 신속 진단키트 및 ZYMV 진단방법에 관한 것으로 보다 상세하게는 종이 또는 플라스틱 소재의 지지판 위에 검사선과 대조선을 포함하는 니트로셀룰로오스 멤브레인(nitrocellulose membrane)이 구성되고 상기 니트로셀룰로오스 멤브레인의 한쪽에는 콘쥬게이트 패드(conjugate pad)를 중첩되게 붙이고, 상기 콘쥬게이트패드 위에 바이러스 감염즙액을 흡수하는 샘플 패드(sample pad)가 중첩되어 구성되며; 상기 니트로셀룰로오스 멤브레인의 타측에는 지지판(supported plate) 위에 반응이 종료된 바이러스 감염즙액을 흡수하는 흡수 패드(absorption pad)로 구성되는 면역크로마토그래피를 이용한 ZYMV 신속 진단키트 및 면역크로마토그래피를 이용한 ZYMV 진단방법



그림 15. 현장진단키트 사용방법

(4) 2015년 수행

(가) 인도네시아 육종포장에서 내병성 계통의 선발

본 시험은 2015년 1월부터 3월에 걸쳐 수행되었다. 본 시험에 공시한 계통은 270계통(PP1 ~ PP270) 으로 ZYMV와 WMV에 대한 내병성 검정을 실시하여 내병성 계통을 선발하였다(그림 16).



그림 16. 바이러스 즙액접종 및 바이러스 현장진단키트(SIS-gold kit) 활용한 내병성 검정

(나) 국내 육종포장에서 계통의 내병성 선발

2015년 9월~10월에 걸쳐 강원도농업기술원 격리온실에서 수행하였다. 시험계통 28종은 2015년 인도네시아의 1차 내병성 검정에서 선발된 계통들이다. 접종원으로서 바이러스는 박과류 병원성 바이러스 균주 (WMV, ZYMV 및 CMV) 및 흰가루병은 *S. fusca*이다. 바이러스 저항성 판정은 외부병징 (주 위축, 잎의 모자이크 등 증상, 발병지수: 0-9, 0 : 병징 없음, 1 : 어린 잎 병징 경미, 3 : 전체 잎 병징경미, 5 : 전체 잎 모자이크 병징 또는 경미한 위축, 7 : 일부 낙엽 또는 위축, 9 : 심한 위축 또는 낙엽) 및 내부병징 (조직내의 바이러스 RT-PCR 진단)을 조사 하였다. 흰가루병 저항성 판별은 병반면적율이 0%인 경우 (0, 무감염), 0.1~5%인 경우는(1, 경미), 5.1~20%경우를 (2, 약), 20.1~30%는 (3, 중), 30.1~40%는 (4, 심), 40.1이상 이상인 경우는 (5, 극심) 조사였다. 그 결과, 육안검정 및 유전자검정에서 바이러스 내병성인 계통은 9(KA102, KA104, KA106, KA107, KA108, KA109, KA110, KA113, KA124)계통이 선발되었다(그림 17). 이들 9계통에 대한 바이러스 이병여부를 RT-PCR로 분석한 결과, 5계통 (KA106, KA107, KA108, KA109, KA110)은 3종 바이러스에 전혀 감염하지 않는 고도 저항성 계통이었다. KA102, KA104, KA113, KA124는 ZYMV에만 미약한 양성반응을 나타냈다. 위 계통이라 표기한 것 중 KA106은 출원한 가야금쭈키니이며, KA124파랑새애호박으로 가야금쭈키니는 고도의 바이러스 및 흰가루병 내성을 나타내고 있으며, 파랑새애호박의 경우 흰가루병에는 내서이나 바이러스에는 중도저항성을 나타내고 있다. 이 결과로부터 국내에 주로 발생하는 ZYMV, CMV, WMV에 대하여 내병성 형질의 가진 쭈키니호박 6계통과 가야금쭈키니, 단호박 1계통 및 파랑새애호박 1품종이 선발되었다. 상기 9 계통 및 품종은 흰가루병에도 내병성을 가지는 계통으로 선발되었다(그림 17).



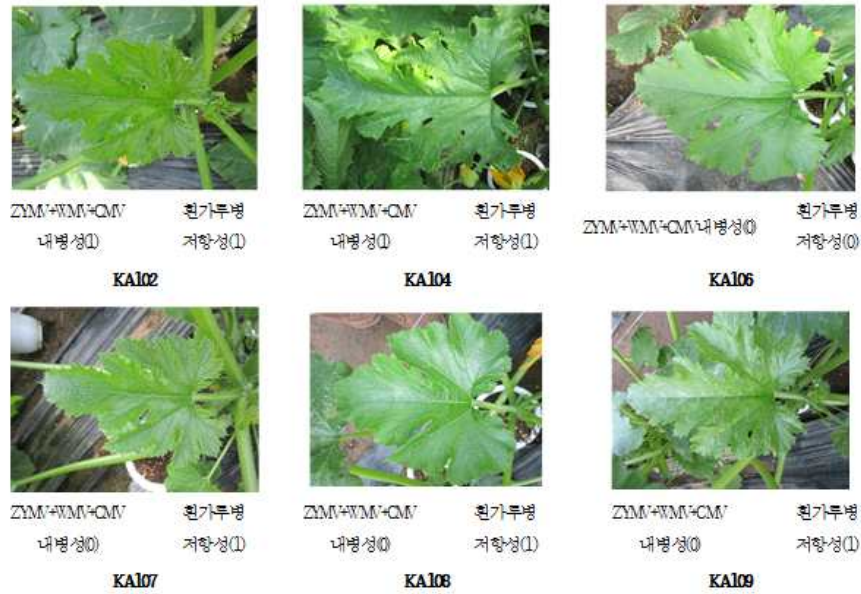


그림 17. 2015년 국내 격리온실에서 선발된 바이러스 및 흰가루병 복합저항성 9계통

(다) 호박 바이러스 현장진단키트(Simple Speed gold immunostips kit, SIS-Gold kit) 개발

수박모자이크바이러스(WMV)를 항원으로 토끼에서 항혈청을 제조하고, 감마글로브린을 정제하여, Simple Speed gold immunostips 제조방법에 따라 CMV 현장진단키트를 제작하였다. WMV의 항원정제는 바이러스병에 감염된 애호박의 잎으로부터 순수분리한 WMV를 접종원으로 이용하였다. 본 바이러스의 외피단백질을 코드하는 염기서열이 국내에서 기보고된 WMV의 염기서열과 97.5%의 상동성을 보여 국내에 과거부터 다발생하고 있는 WMV로 확인되었다. 이 바이러스는 온실에서 잡균에 오염되지 않게 건전하게 생육시킨 애호박 유묘에 WMV를 인공접종하여 바이러스를 대량증식하였다. 인공접종법은 연마제(600mesh)를 본엽이 4~6엽 정도 자란 애호박의 잎에 소량씩 산포하고 WMV 감염 즙액을 소형멸균거즈구(Ø2cm)에 충분히 흡수시켜서 잎 표면을 약하게 문지르면, 연마제에 의해 생성된 엽조직세포의 상처부분을 통하여 WMV는 건전 호박에 감염시켜서 증식시켰다. 약 20일이 경과한 후에, WMV 병징을 보이는 호박 잎을 채취하여 조직내의 바이러스를 정제하여 항원으로 이용하였다. WMV의 정제방법은 다음 방법으로 수행되었다. 먼저 WMV에 감염된 신선한 호박잎 100g에 250ml의 Extraction Buffer(pH7.6)을 넣고 마쇄 후 마쇄용액의 1/10 volume의 양으로 클로르포름을 넣고 15분간 교반을 시켜준다. 그 후 Vacuum Filtering을 이용해 2겹으로 착즙액을 회수 후 8,000rpm에서 20분간 원심분리를 시켜준 다음 상등액을 여과지 위에서 Vacuum Filtering 한 다음 300ml의 여과액을 회수 한후 여과액의 1/10 volume으로 Triton X-100을 혼합 교반을 10분간 시켜준다. 그 후 여과액을 3개의 튜브에 20% 설탕액 20ml에 여과액 75ml씩 중층한 다음 초고속원심분리를 통해 90,000G에서 60분 후 Ppt를 회수한다. 회수한 Ppt에 약 60ml의 Resuspension buffer로 현탁 후 원심분리

코드번호	D-05
------	------

8,000rpm에서 10분간 돌려준 다음에 상층액을 60ml 회수 한다. 그 후 20%설탕액 12ml에 회수 된 용액 30ml씩 중층을 2개의 튜브에 한 후 초고속원심분리기를 이용해 100,000G에서 60분간 돌려준 후 Ppt를 회수 한 다음 40ml의 storage buffer를 이용해 현탁 후 다시 8,000rpm에서 10분간 원심분리를 시켜준 후 상층액 40ml을 회수한다. 다음 다시 초고속원심분리기를 이용해 60분간 110,000G에서 원심분리 후 Ppt를 회수한다. 막이막으로 Ppt를 5ml의 Storage buffer로 현탁 후 UV 및 전자현미경으로 확인하였다(그림 18).

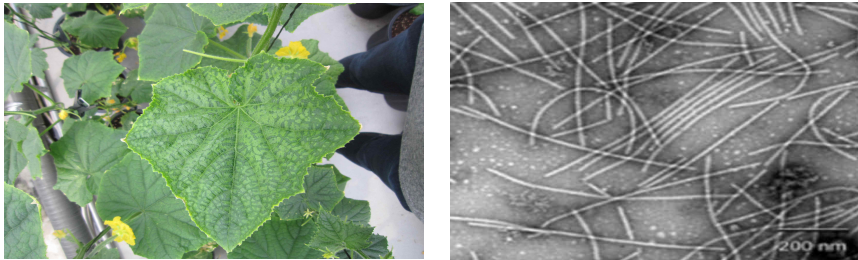
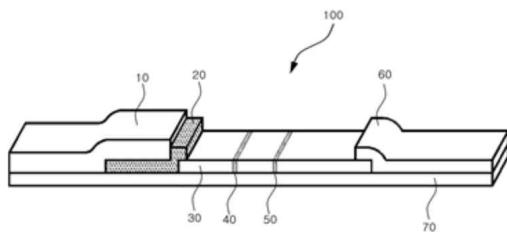


그림 18. WMV 접종원 병징 및 정제 바이러스 입자

정제된 WMV 항원을 면역원으로 뉴질랜드 화이트 레비트에서 항혈청을 제조하였으며, 완성된 항체는 WMV에 특이적인 반응을 나타냈다. 항체를 이용하여 그림 19와 같이 현장진단키트를 제조하였다. 제작된 WMV 현장진단키트(WMV-SIS kit)의 진단 한계농도를 그림 20에 나타냈다.



- 10 - sample pad
- 20 - conjugate pad
- 30 - nitrocellulose membrane
- 40 - test line
- 50 - control line
- 60 - adsorption pad
- 70 - supported plate

그림 19. WMV 현장진단키트 제작 모식도

Fig A



Fig B



Fig A. WMV 정제액 농도별 진단결과 :
 (1)100 μ g/ml, (2)10 μ g/ml, (3)1 μ g/ml,
 (4)100 ng/ml,(5) 10ng/ml, (6)1 ng/ml,
 (7)100 pg/ml, (8)10 pg/ml, (9)1pg/ml,
 (10)healthy sap

Fig B. WMV 감염엽(w/v, g/ml) 즙액의
 희석배수별 진단결과 :
 (1)10⁻¹, (2)10⁻², (3) 10⁻³, (4) 10⁻⁴,
 (5)10⁻⁵,(6) 10⁻⁶, (7) 10⁻⁷,(8)10⁻⁸,
 (9)10⁻⁹, (10) healthy sap

그림 20. WMV 현장진단키트(WMV-SIS kit)의 진단 한계농도

2015년 개발한 WMV 현장진단키트(WMV-SIS 키트) 를 유전자진단법(RT-PCR)과 비교한 결과를

표에 나타났다. 그 결과 WMV-SIS 키트의 진단 민감도(sensitivity)는 93.7%이고, 진단 특이도 (specificity)는 92.2%를 보여, ELISA 진단 수준으로 진단효율성이 우수하였다(표 7).

표 7. 호박 잎조직에서 WMV 진단효율성 비교

진단법 구분	검정 시료(개체)	검정 결과	
		양성	음성
유전자진단(RT-PCR)	45 (호박 잎조직)	32	13
현장진단키트 (WMV-SIS)	32 (유전자진단에서 양성 개체주)	30	2
	13 (유전자진단에서 음성 개체주주)	1	12

(5) 2016년 수행

(가) 내병성 검정용 표준 바이러스 균주의 유전자 분석

2012년부터 2016년에 본 시험에서 이용된 2종의 바이러스 균주에 대한 유전자 분석을 실시하였다. ZYMV 분리주는 2005년 안동지역의 호박에서 채집되어 보고된 Zucchini yellow mosaic virus strain KR-PA와 97.2%의 높은 유전자 상동성을 가짐을 확인하였다. 또한, Watermelon mosaic virus는 한국에서 분리된 WMV 계통인 accession number AB369278 분리주와 97%의 높은 상동성을 확인하였으며, 동시에 잠종실험을 통한 기주식물에서 병원성이 재현됨을 재 확인하였다(그림 21).



애호박 ZYMV 병징

애호박 WMV 병징

애호박 흰가루병 병징

그림. 실험에 이용된 균주(ZYMV, WMV, 흰가루병)의 시판애호박 품종에서 재현된 병징

내병성 검정 효율화를 위한 바이러스의 대량접종기술로서 가압 미세분무장치를 활용하여 바이러스 감염즙액에 0.5% celite 545와 0.5% 카보란덤(400grit)을 첨가하여 인공접종시 95%의 높은 접종효율을 얻었으며 접종에 소요되는 시간도 관행접종법보다 10배의 효율이 높았다(그림 22). 흰가루병의 접종은 spore spray inoculation method를 사용하였다. 애호박에서 계대배양한 흰가루병 포자를 수거하여 멸균증류수로 10^6 spores/L 농도로 현탁액을 조제하여 일반 소형스프레이로 잎에 분무하여 접종하였다. 접종엽의 흰가루병 병징의 재현율은 100%로 안정적이었다(그림 22).



바이러스 접종 (관행 → 개선)



흰가루병 접종 (포자분무 → 병징 100% 발현)



(나) 내병성 계통의 검정 및 선발

2012년부터 2016년에 걸쳐 실시한 바이러스 및 흰가루병 내병성 호박계통 선발을 위한 검정에서 공시된 자원 수는 총 1,290계통(조합)이었으며 이 중에서 선발된 복합내병성 유전자원은 47계통이었다. 이 선발계통은 최종 품종 육성을 위한 수량 및 품질 특성검정을 위한 우수계통으로 활용되었다.

(다) 호박바이러스 진단키트 개발

2013년부터 2015년에 걸쳐 호박의 주요바이러스인 ZYMV와 WMV의 진단키트 2종을 개발하여 육종시 바이러스 검정과 농가포장에서 바이러스병 확산을 예방하기 위한 조기진단에 활용하였다. 그림 23은 자체 개발한 2종 바이러스(ZYMV와 WMV)의 항혈청이며, 그림 24, 25는 ZYMV와 WMV를 실시간으로 간편하게 진단할 수 있는 현장진단키트 및 다량의 시료를 동시에 진단할 수 있는 ELISA진단키트이다. 표 8은 ZYMV와 WMV의 유전자진단을 위해 개발된 프라이머 염기서열을 나타내었다.



ZYMV 항혈청



WMV 항혈청

그림 23 . 자체개발한 2종 호박 바이러스의 항혈청

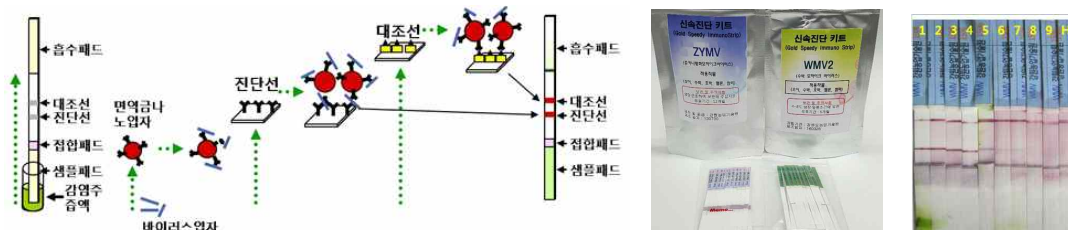


그림 24. 바이러스(ZYMV 및 WMV) 현장진단키트



그림 25. 바이러스(ZYMV 및 WMV) ELISA키트

표 8. 바이러스(ZYMV 및 WMV) 의 유전자진단용 프라이머 염기서열

구분	프라이머명	프라이머 염기서열	RT-PCR 진단 유전자 염기수 (bp)
WMV	WMV-580	F-CTG GCA GTT AGG GAT GAG GAT GTA R-CAG TTT GCA GGT TTT GTG GCT TAT	840
ZYMV	ZYMV-840	F-TGG GGC TAC AAA GAA AGA TAA A R-CGG CAG CGA AAC GAT AAC	580

다. 제2협동과제

호박 바이러스 (WMV, ZYMV) 및 흰가루병 저항성 분자마커 개발

..... 경희대학교

(1) 호박 흰가루병 저항성 계통 개체들을 이용한 RAPD 및 SCAR 마커 개발 및 분석

(가) 흰가루병 저항성 관련 RAPD 마커 개발

① 목적

본 실험은 호박의 주요 곰팡이성 질병인 흰가루병에 대한 저항성 관련 RAPD 분자마커를 개발하고, 이를 통해 선발된 특이적 RAPD band의 염기서열 정보를 분석하여, 이를 이용한 SCAR 마커를 개발하기 위한 기반인 RAPD 마커를 개발하기 위하여 수행하였다.

② 재료 및 방법

㉞ 흰가루병 저항성 관련 RAPD 마커 개발

본 실험에는 흰가루병 감수성 PE85 line과 흰가루병 저항성 PE12 line 및 PE12 × PE85 F₁ 개체들(Table 1-6)을 이용하여 RAPD 실험을 진행하였다. 흰가루병 감수성 5개체, 저항성 5개체, F₁ 5개체를 이용하여 OPERON random primer 100개(Table 7)를 이용해 실험을 진행하였다. iNtRon사의 *i-Taq* premix Kit를 사용하였고, Veriti™ thermal cycler 기기를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR 반응조건은 95℃에서 5분 pre-denature 한 후 95℃에서 1분 denaturation, 37℃에서 1분 annealing, 72℃에서 1분 extension을 1 cycle로 정하여 총 40 cycle을 반복하고 72℃에서 10분간 final-extension 처리 후 반응을 종료하였다. 반응결과를 확인하기 위하여 ethidium bromide에 염색한 1.5% agarose gel에서 150V, 2.5시간 이상 전기영동 하였다.

Table 1. Squash materials for development of molecular markers related to powdery mildew resistance.

Sample	P ₁ (PMR)	P ₂ (PMS)	F ₁	F ₂	BC ₁
			PE12		PD11
KH11-15 line	PE12	PE85	×	PD11	×
			PE85		PE85

Table 2. DNA concentration and degree of purity of PE12 P₁ line.

Sample	Conc. (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
P1-1	4711.40	1.13	1.26
P1-2	4508.88	1.24	1.37
P1-3	4575.92	1.65	1.92
P1-4	4604.28	1.12	1.27
P1-5	4694.18	1.09	1.24

Table 3. DNA concentration and degree of purity of PE85 P₂ line.

Sample	Conc. (ng/ μ l)	A260/A280	A260/A230
P2-1	4406.53	1.42	1.54
P2-2	4553.87	1.47	1.67
P2-3	3552.86	1.79	2.07
P2-4	4512.91	1.30	1.42
P2-5	2135.48	1.67	1.87

Table 4. DNA concentration and degree of purity of PE12 \times PE85 F₁ line.

Sample	Conc. (ng/ μ l)	A260/A280	A260/A230
F1-1	2466.8	1.82	1.93
F1-2	1921.21	1.81	1.87
F1-3	4189.16	1.60	1.80
F1-4	4507.03	1.51	1.75
F1-5	4504.72	1.59	1.80

Table 5. DNA concentration and degree of purity of PD11 F₂ line.

Sample	Conc. (ng/ μ l)	A260/A280	A260/A230
F2-1	4234.66	1.68	1.90
F2-2	4204.25	1.66	1.90
F2-3	4594.88	1.32	1.46
F2-4	4637.47	1.35	1.52
F2-5	4411.48	1.63	1.81

Table 6. DNA concentration and degree of purity of PD11 \times PE85 BC₁ line.

Sample	ng/ μ l	A260/A280	A260/A230
BC1-1	4203.78	1.63	1.79
BC1-2	4278.72	1.57	1.78
BC1-3	4035.48	1.70	1.86
BC1-4	4490.17	1.53	1.73
BC1-5	4637.10	1.38	1.53

Table 7. Random primers tested for PE12, PE85, PE12 × PE85 F₁ lines.

Primer	Nucleotide sequence (5' to 3')
OPA-01	CAG GCC CTT C
OPA-02	TGC CGA GCT G
OPA-03	AGT CAG CCA C
OPA-04	AAT CGG GCT G
OPA-05	AGG GGT CTT G
OPA-06	GGT CCC TGA C
OPA-07	GAA ACG GGT G
OPA-08	GTG ACG TAG G
OPA-09	GGG TAA CGC C
OPA-10	GTG ATC GCA G
OPA-11	CAA TCG CCG T
OPA-12	TCG GCG ATA G
OPA-13	CAG CAC CCA C
OPA-14	TCT GTG CTG G
OPA-15	TTC CGA ACC C
OPA-16	AGC CAG CGA A
OPA-17	GAC CGC TTG T
OPA-18	AGG TGA CCG T
OPA-19	CAA ACG TCG G
OPA-20	GTT GCG ATC C
OPF-01	ACG GAT CCT G
OPF-02	GAG GAT CCC T
OPF-03	CCT GAT CAC C
OPF-04	GGT GAT CAG G
OPF-05	CCG AAT TCC C
OPF-06	GGG AAT TCG G
OPF-07	CCG ATA TCC C
OPF-08	GGG ATA TCG G
OPF-09	CCA AGC TTC C
OPF-10	GGA AGC TTG G
OPF-11	TTG GTA CCC C
OPF-12	ACG GTA CCA G
OPF-13	GGC TGC AGA A
OPF-14	TGC TGC AGG T
OPF-15	CCA GTA CTC C
OPF-16	GGA GTA CTG G
OPF-17	AAC CCG GGA A
OPF-18	TTC CCG GGT T
OPF-19	CCT CTA GAC C
OPF-20	GGT CTA GAG G

Table 7. Continued.

Primer	Nucleotide sequence (5' to 3')
OPL-01	GGC ATG ACC T
OPL-02	TGG GCG TCA A
OPL-03	CCA GCA GCT T
OPL-04	GAC TGC ACA C
OPL-05	ACG CAG GCA C
OPL-06	GAG GGA AGA G
OPL-07	AGG CGG GAA C
OPL-08	AGC AGG TGG A
OPL-09	TGC GAG AGT C
OPL-10	TGG GAG ATG G
OPL-11	ACG ATG AGC C
OPL-12	GGG CGG TAC T
OPL-13	ACC GCC TGC T
OPL-14	GTG ACA GGC T
OPL-15	AAG AGA GGG G
OPL-16	AGG TTG CAG G
OPL-17	AGC CTG AGC C
OPL-18	ACC ACC CAC C
OPL-19	GAG TGG TGA C
OPL-20	TGG TGG ACC A
OPX-01	CTG GGC ACG A
OPX-02	TTC CGC CAC C
OPX-03	TGG CGC AGT G
OPX-04	CCG CTA CCG A
OPX-05	CCT TTC CCT C
OPX-06	ACG CCA GAG G
OPX-07	GAG CGA GGC T
OPX-08	CAG GGG TGG A
OPX-09	GGT CTG GTT G
OPX-10	CCC TAG ACT G
OPX-11	GGA GCC TCA G
OPX-12	TCG CCA GCC A
OPX-13	ACG GGA GCA A
OPX-14	ACA GGT GCT G
OPX-15	CAG ACA AGC C
OPX-16	CTC TGT TCG G
OPX-17	GAC ACG GAC C
OPX-18	GAC TAG GTG G
OPX-19	TGG CAA GGC A
OPX-20	CCC AGC TAG A

Table 7. Continued.

Primer	Nucleotide sequence (5' to 3')
OPAN-01	ACT CCA CGT C
OPAN-02	CAC CGC AGT T
OPAN-03	AGC CAG GCT G
OPAN-04	GGC GTA AGT C
OPAN-05	GGG TGC AGT T
OPAN-06	GGG AAC CCG T
OPAN-07	TCG CTG CGG A
OPAN-08	AAG GCT GCT G
OPAN-09	GGG GGA GAT G
OPAN-10	CTG TGT GCT C
OPAN-11	GTC CAT GCA G
OPAN-12	AAC GGC GGT C
OPAN-13	CTT CCA GGA C
OPAN-14	AGC CGG GTA A
OPAN-15	TGA TGC CGC T
OPAN-16	GTG TCG AGT C
OPAN-17	TCA GCA CAG G
OPAN-18	TGT CCT GCG T
OPAN-19	ACC ACG CCT T
OPAN-20	GAG TCC TCA C

㉔ **흰가루병 저항성 관련 특이적 band 추출**

RAPD 분석에 쓰인 식물 재료는 홍익바이오에서 제공받은 흰가루병 저항성 PE12 line과 흰가루병 감수성 PE85 line 및 PE12 × PE85 F₁ 개체들이다. 저항성인 P₁과 F₁ 각 5개체와 대조군으로 P₂ 5개체에서 RAPD 분석을 다시 진행하였고, 증폭된 band의 size를 확인하여 저항성 특이적인 band를 추출하였다. 추출한 특이적 band는 iNtRON사의 MEGAquick-spin™ Total Fragment DNA Purification Kit를 이용하여 elution을 진행하였다. 수율을 높이기 위하여 P₁과 F₁에서 증폭된 band는 하나의 1.5ml tube에 gel 2개(약 100~200mg)씩 넣어 총 10개의 gel을 BNL buffer에 녹였고, 이 용액을 2개의 kit column에 20여초씩, 여러 번 centrifuge 하여 한꺼번에 추출하는 방법으로 진행하였다. Elution 결과 얻는 DNA의 농도가 적어도 10ng/ul를 넘게 하기 위함이었다. Elution은 kit의 BNL buffer를 1.5% gel 100mg 당 450ul 넣은 뒤 55℃ heat block에 10분간 heating 처리하였고 처리 중 2~3분마다 vortex 또는 invert 여러 번하여 gel을 완전히 녹여주었다. 녹은 용액은 kit의 column tube에 옮겨 1분간 10000rpm으로 centrifuge처리 후 2ml tube에 걸러진 용액을 제거했다. 그 후 kit의 washing buffer를 700ul 넣고 12000rpm으로 2분 centrifuge 하여 washing하는 과정을 2회 반복하고 2분간 12000rpm으로 centrifuge하여 건조시켰다. 건조된 column은 새 1.5ml tube에 끼우고 filter의 가운데에 elution buffer를 25~35ul 넣어 3분간 상온에 반응시킨 후 12000rpm에 1분 centrifuge하여 DNA를 추출하였다.

㉔ 추출한 band의 DNA 분리 및 cloning

Cloning은 ligation, *E. coli* transformation, plasmid DNA mini-prep 순서로 진행되었다. 먼저, ligation에는 PROMEGA 사의 pGem-T easy vector와 T4 ligase 및 2× ligase buffer를 이용하였다. 위의 실험에서 elution으로 추출한 DNA는 새 1.5ml tube에 절대 농도가 100~200ng가 되게끔 3ul~8ul씩 분주한 후 각 DNA 당 pGem-T easy vector 1ul, 2X buffer 5~10ul, T4 ligase 1ul의 조성을 갖는 mixture를 만들어 분주하여 총 10~20ul의 volume을 만들고 4°C에 overnight하여 ligation을 진행하였다. Transformation은 life technologies사의 *E. coli* (*Escherichia coli*) DH10β에 CaCl₂ 처리를 하여 competent cell을 직접 제조한 후, competent cell에 transformation하였다. Transformation 과정은 다음과 같다. -80°C에 보관된 competent cell을 ice bucket에서 3분 정도 천천히 녹인 후 살짝 녹은 competent cell에 ligation된 DNA를 10ul 모두 첨가하여 tapping, ice bucket에 30분 배양한 후 42°C heat block으로 90초 heat shock 처리했다. 처리 후 ice bucket에 옮겨 5분간 배양하고 LB liquid broth 200ul를 첨가하여 37°C shaking incubator에서 60분 배양했다. 배양이 끝나기 전 ampicillin이 50mg/L 농도로 첨가된 고체 LB배지에 40mg/L 농도의 X-gal 용액을 40ul씩 분주해 spreading했고 배양이 끝난 *E. coli* cell을 그 위에 100ul씩 분주해 spreading하여 37°C incubator에 12~16시간 배양하여 콜로니를 확인했다. 선발한 white colony는 X-gal을 이용하여 재검정을 하였다. Plasmid DNA를 추출하는 방법은 다음과 같다. X-gal로 재검정하고 선발한 white colony를 ampicillin이 50mg/L 농도로 첨가된 5ml LB 액체배지에 넣어 37°C incubator에서 12~16시간 배양하여 iNtRON사의 DNA-spin™ Plasmid DNA Purification Kit를 이용, plasmid DNA를 추출하였다. Kit의 세부 과정은, 먼저 2ml tube에 배양액을 옮겨 12,000 rpm에서 2분 centrifuge하여 pellet을 만들었다. 그 후 상등액을 버리고 plasmid kit의 Resuspension buffer를 250ul 넣어 vortex로 섞고 1분 배양, Lysis buffer를 250ul 넣고 5회 invert 후 3분 배양, Neutralization buffer를 350ul 넣고 invert하여 용액의 보라색이 사라지고 투명해지는 것을 확인한 후 ice에서 5분 배양한 용액을 12,000 rpm에서 5분 centrifuge 처리하였다. 원심분리된 용액의 상등액을 column tube에 옮긴 후 12,000 rpm에서 1분 centrifuge하여 걸러내고 Wash solution 700ul을 넣어 12,000 rpm에서 1분간 washing하였다. Washing이 끝난 용액은 제거하고 12,000 rpm에서 2분 centrifuge하여 column을 완전히 건조시킨 후 1.5ml tube로 column을 옮겨 elution buffer를 30ul 첨가하고 2분 반응시켰다. 반응이 끝난 용액은 12,000 rpm에서 1분 centrifuge 처리하여 plasmid DNA를 추출하였다. 추출한 plasmid DNA는 마크로젠 사에 sequencing 분석 의뢰를 보내 sequence를 얻었다. 얻은 sequence는 NCBI BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)에서 상동성을 검색했다.

③ 결과 및 고찰

㉔ RAPD 실험 결과를 바탕으로 개체 간 유연관계 분석

본 실험은 호박 흰가루병 저항성 관련 분자마커 개발을 위해 수행한 RAPD 실험 결과를 바탕으로 개체 간 유연관계를 밝혀 개체군의 유전적 고정 정도를 확인하고 마커 선발에 대한 신뢰도를 높이기 위해 수행하였다. 호박 흰가루병 저항성 분자마커 개발을 위한 실험재료로 육성된 흰가루병 저항성 PE51 line과 흰가루병 감수성 PE103 line 및 PE51 × PE103 F₁ line, PH77 F₂ line까지 KH01-04 set의 P₁, P₂, F₁ 각 5개체를 이용하여 수행한 RAPD 결과를 분석

하였다. 분석에는 OPERON random primer 26개를 사용하여 수행한 결과값을 사용하였고, NTSYSpc 2.1 프로그램을 통해 개체별 유연관계를 확인하기 위한 UPGMA 방법에 따른 dendrogram을 작성하였으며, 유연관계 결과를 바탕으로 개체군간의 유전적 고정 정도를 확인하였다. 그 결과로부터 총 24개의 primer에서 다형성을 확인할 수 있었으며, 개체 간 유전적 유사도가 평균 66%의 값을 가지는 것을 확인하였다(Table 8).

Table 8. Genetic similarity and polymorphism from RAPD markers related to powdery mildew resistance.

No. of accession analyzed	No. of polymorphic / total band	Percent of polymorphism (%)	GS AVG (min-max)
24 / 26	97 / 169	57.4 %	0.66 (0.45 - 0.99)

이러한 결과를 바탕으로 NTSYSpc 2.1 program을 이용하여 UPGMA 방법에 따른 dendrogram을 작성하였다. 흰가루병 저항성 PE51 line과 흰가루병 감수성 PE103 line 및 PE51 × PE103 F₁ line, PH77 F₂ line 전체 개체에 대한 dendrogram을 작성한 결과 흰가루병 저항성 계통인 PE51 line은 높은 유전적 유사도를 보이며 집단을 이루고 있으나 나머지 계통들은 집단이 분산되어 있는 모습을 나타내었다(Fig. 1).

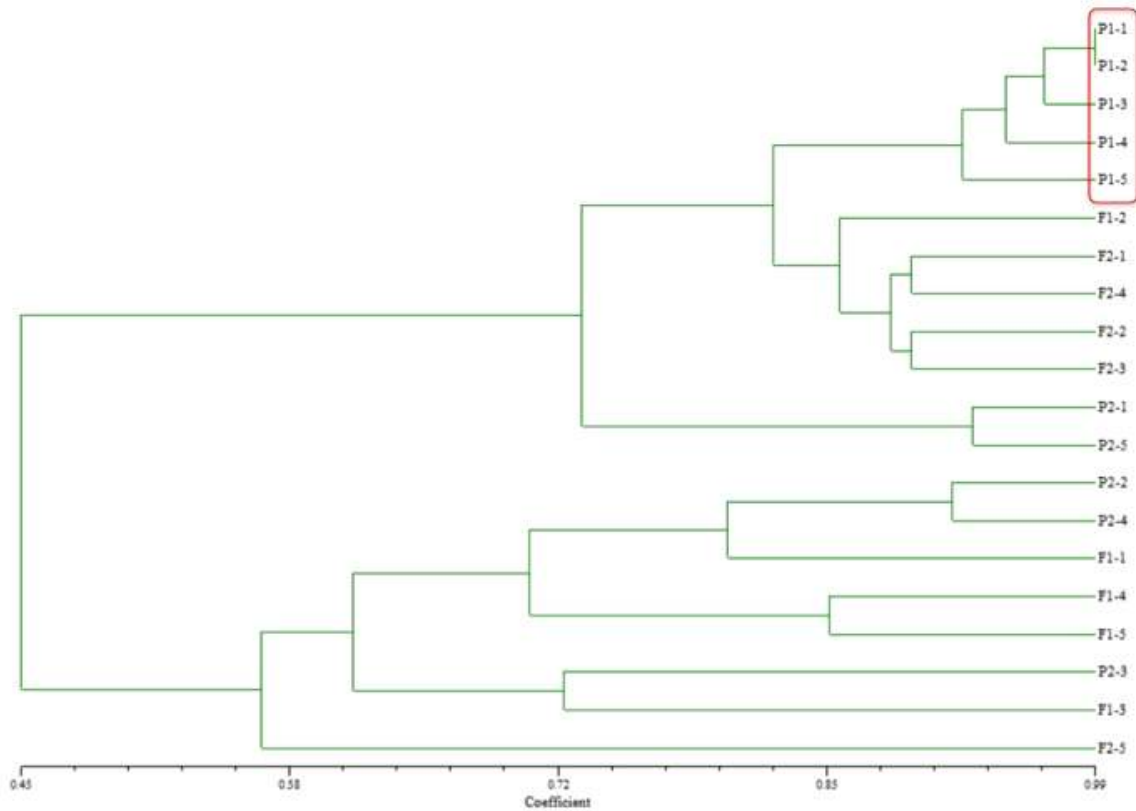


Fig. 1. Cluster dendrogram based on RAPD analysis for PE51, PE103, PE51 × PE103 F₁ lines, and PH77 F₂ lines.

이러한 이유로 우선 개체별 분리가 많이 일어날 수 있는 F₂ line을 제외한 흰가루병 저항성 PE51 line과 흰가루병 감수성 PE103 line 및 PE51 × PE103 F₁ line에 대한 dendrogram을 다시 작성하였다(Fig. 2). 그 결과 위와 동일하게 흰가루병 저항성 PE51 line에서는 약 95%의 높은 유전적 유사도가 나타났으나 P₂와 F₁ line이 각 그룹에 혼재해 있는 모습을 보였다. 이는 분석에 이용한 개체수 및 primer의 수가 많지 않았고, DNA의 순도가 좋지 않았던 개체들이 있었기 때문에 분석에 오차가 발생할 수 있다고 판단하여 확실하게 유전적 유사도가 높게 나타난 P₁ line을 선발의 기준으로 두고 선발한 RAPD 마커들이 P₁ line에서 동일한 band를 보였는지 재확인하여 이용하였다.

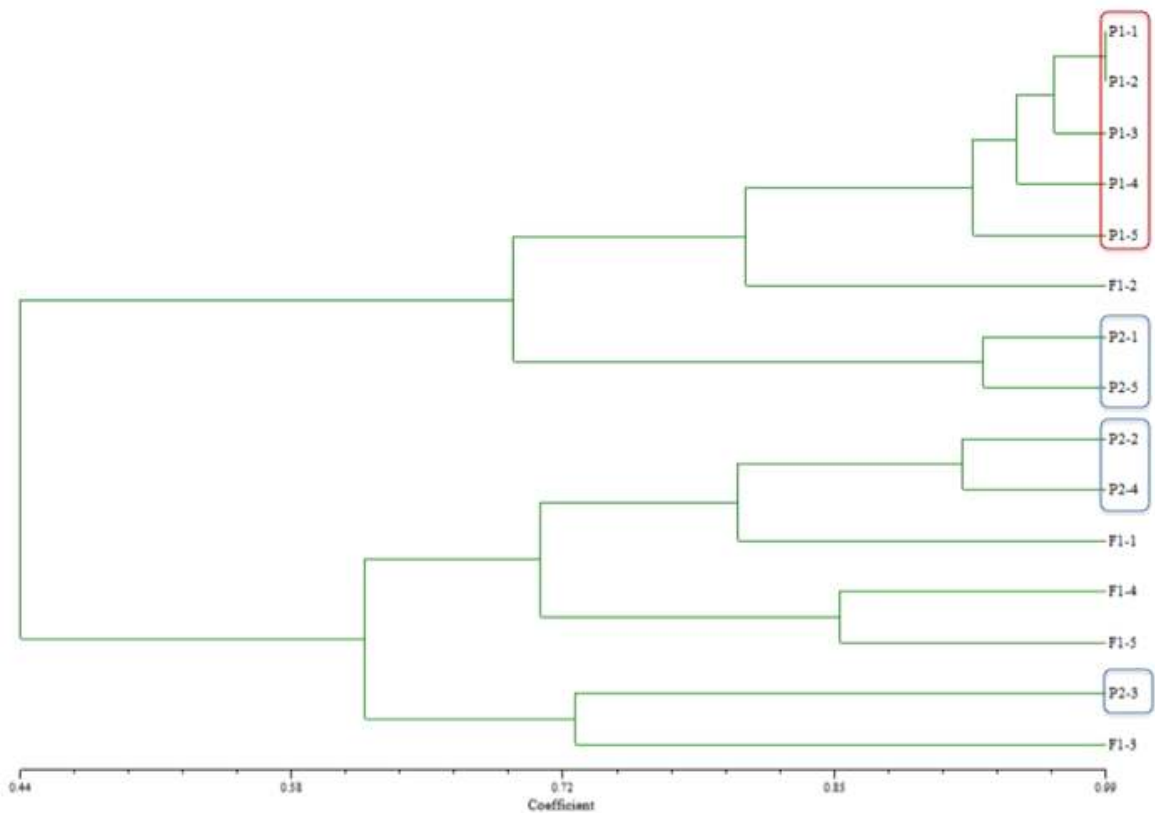


Fig. 2. Cluster dendrogram based on RAPD analysis for PE51, PE103, and PE51 × PE103 F₁ lines

㉔ 흰가루병 저항성 관련 RAPD 마커 개발

OPERON random primer 100개와 홍익바이오에서 제공받은 흰가루병 저항성 PE12 line과 흰가루병 감수성 PE85 line 및 PE12 × PE85 F₁ 개체들을 이용하여 흰가루병 저항성 관련 RAPD 마커를 개발하기 위한 실험을 진행하였고(Fig. 3), 모든 RAPD 결과는 재현성을 위해 2번 이상 수행하였다. 실험 결과 총 10개 primer(OPAN14, OPF16, OPX6, OPL8, OPL11, OPA4, OPA6, OPA11, OPA12, OPA18)에서 총 11개의 저항성 특이적인 band를 선발하였다(Fig. 4). 선발된 band의 대략적인 크기는 각각 OPAN14 primer에서 약 620bp, OPF16 primer에서 약 900bp, OPX6 primer에서 484bp, OPL8 primer에서 401bp, OPL11 primer에서 841bp, OPA4 primer에서 407bp, OPA6 primer에서 약 590bp, OPA11 primer에서 850bp, OPA12 primer에서 약 600bp와 492bp, 그리고 OPA18 primer에서 329bp 크기이다. 흰가루병 저항성

코드번호	D-05
------	------

계통 PE12의 5개체와 F₁의 5개체에서 이러한 크기의 밴드가 증폭된 반면, 흰가루병 감수성 계통 PE85의 5개체에서는 증폭되지 않아 내병성 특이적 다형성을 보였다. 그 외 RAPD 실험들에서는 내병성 특이적 다형성이 보이지 않았고, primer가 개체의 gDNA에서 다형성을 볼 수 있는 sequence를 증폭하지 못했음을 뜻한다.

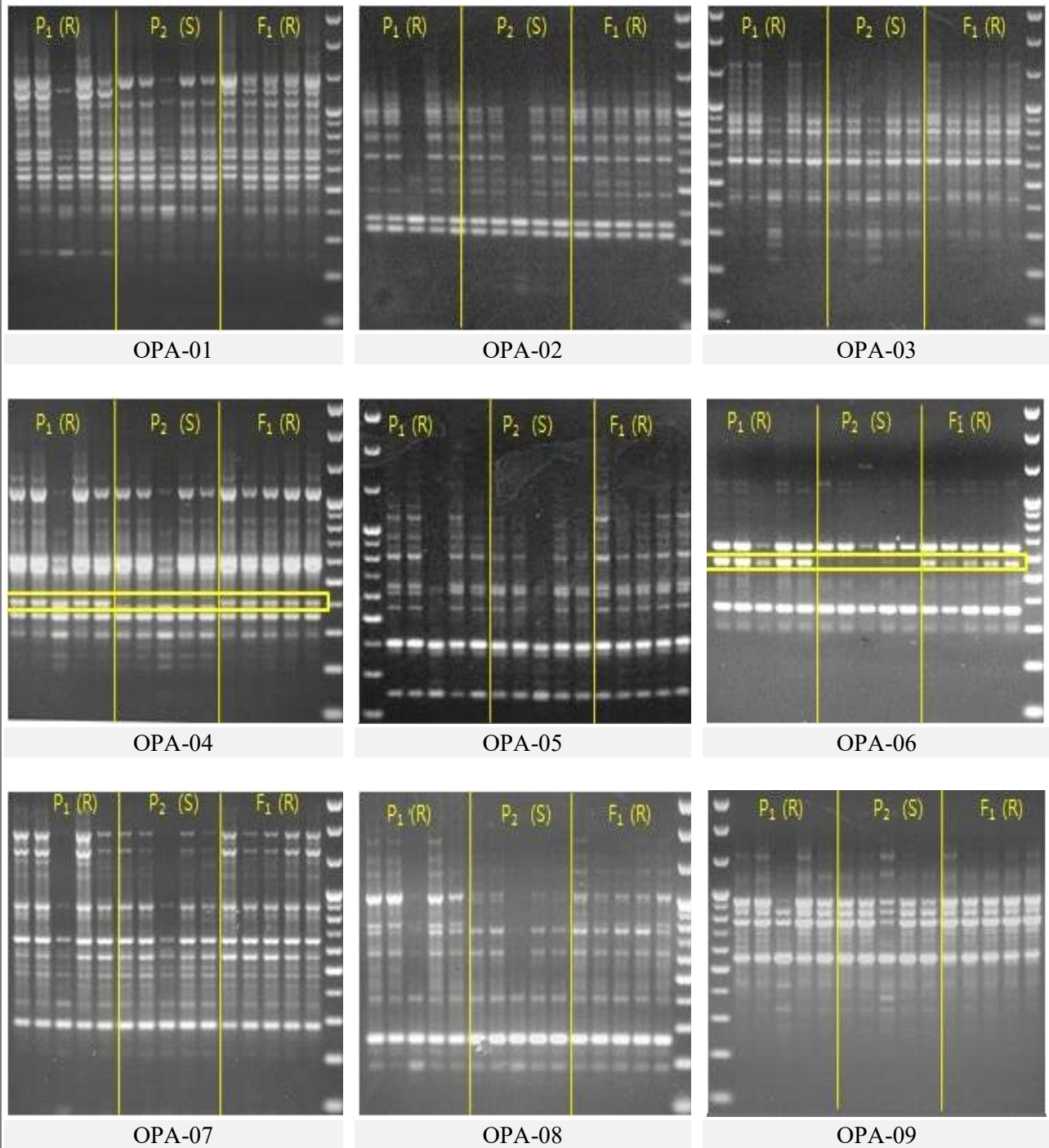


Fig. 3. RAPD analysis of showing polymorphisms from PE12, PE85, and PE12 × PE85 F₁ lines using different primers.

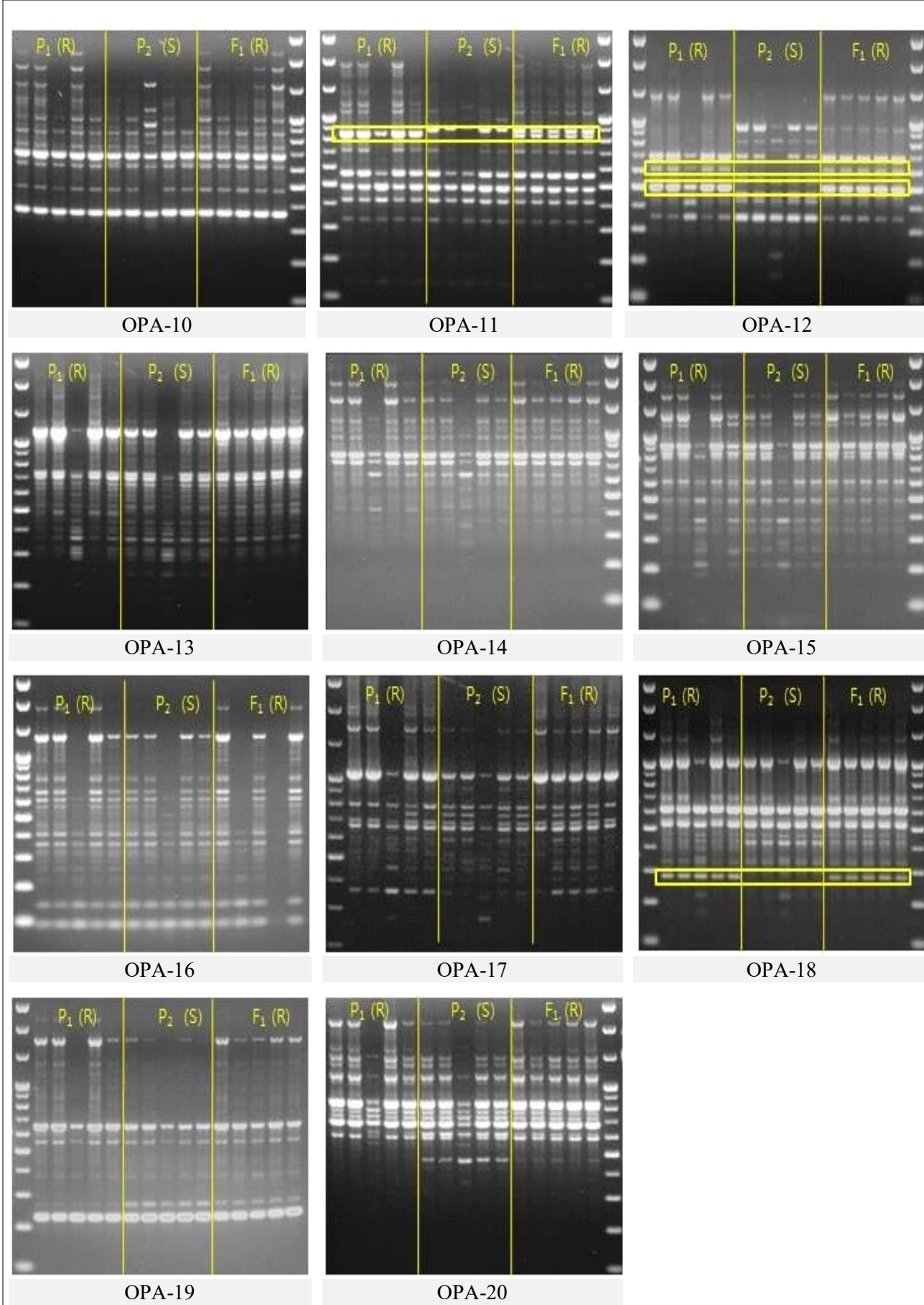


Fig. 3. Continued.

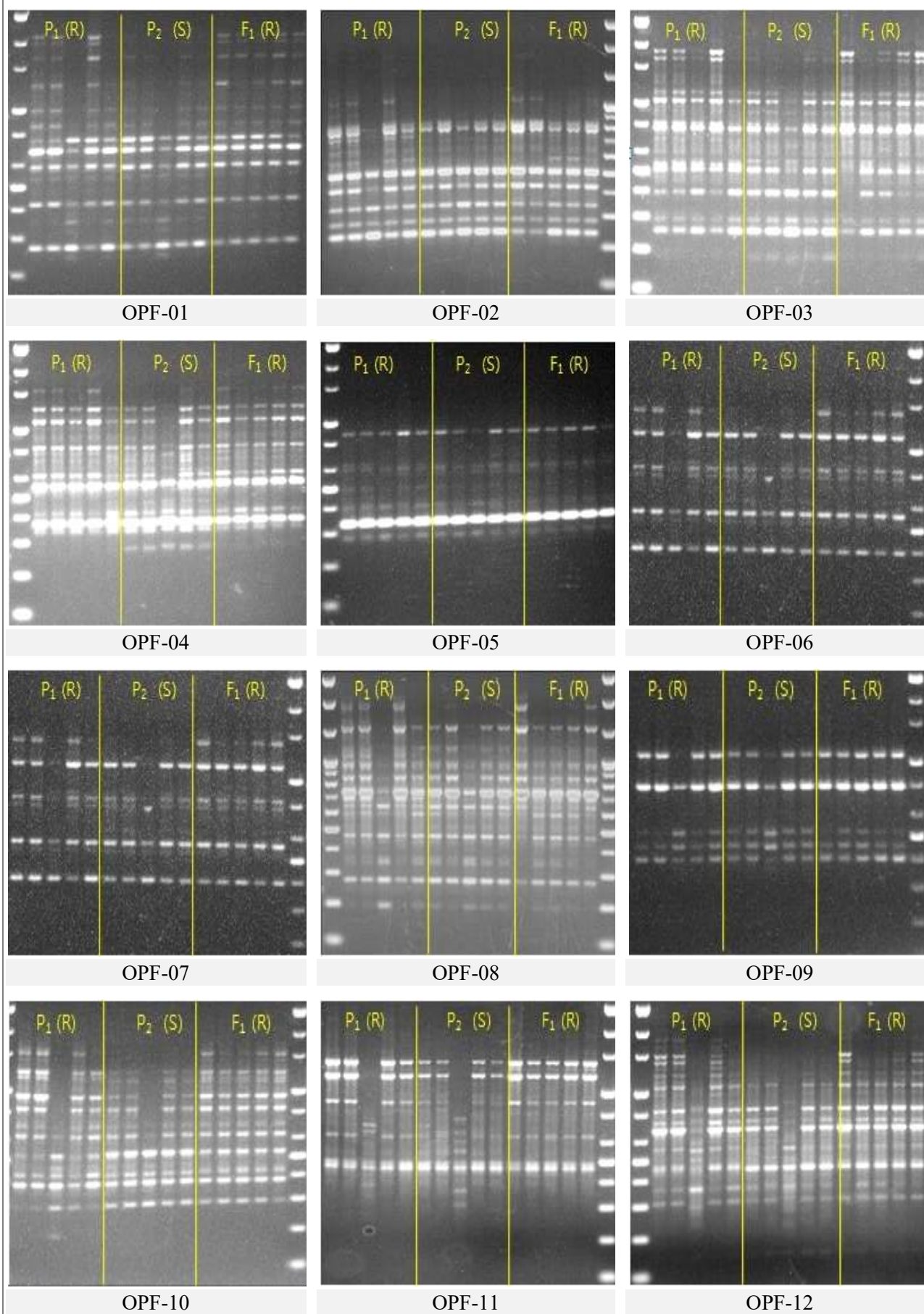


Fig. 3. Continued.

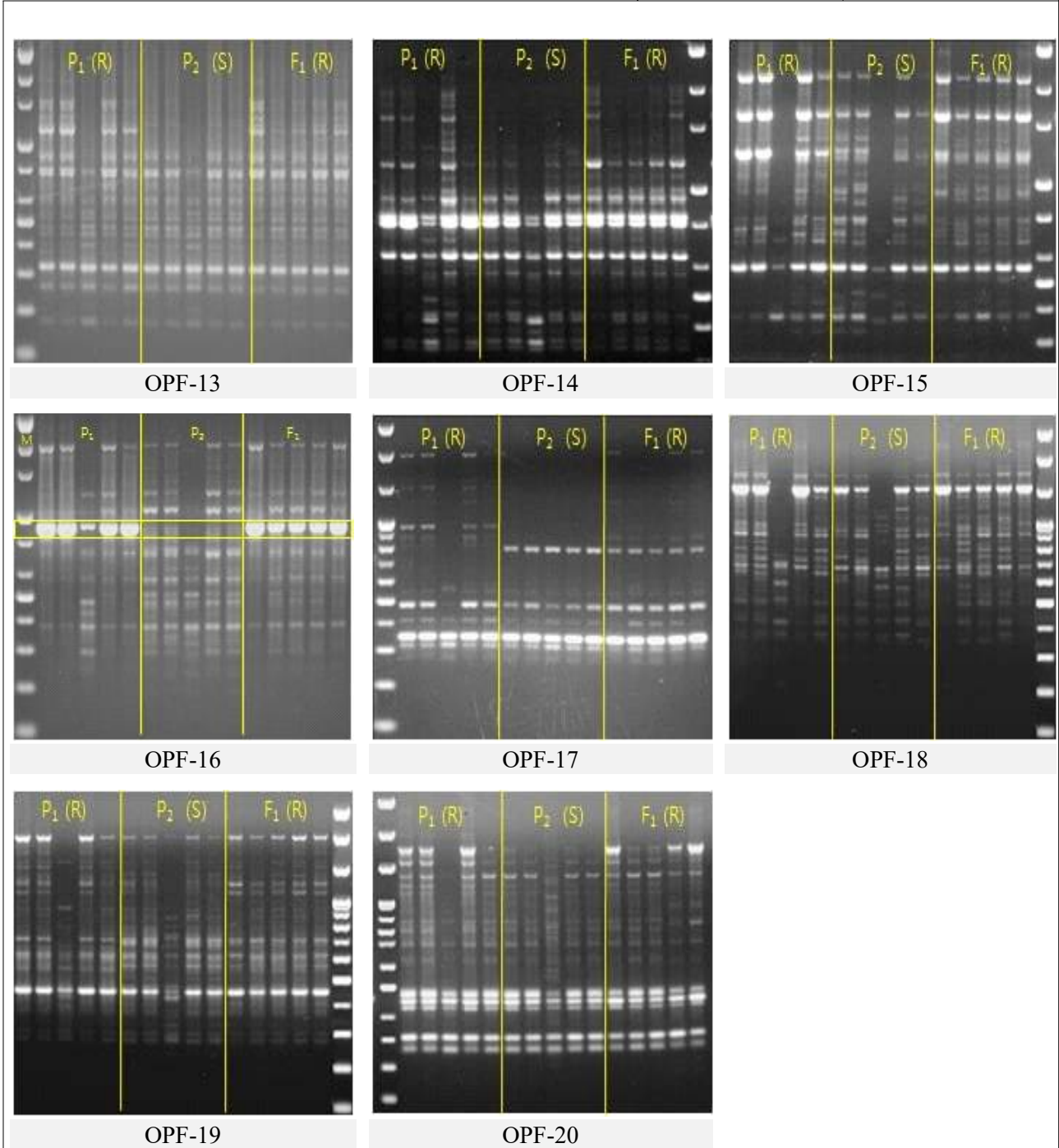


Fig. 3. Continued.

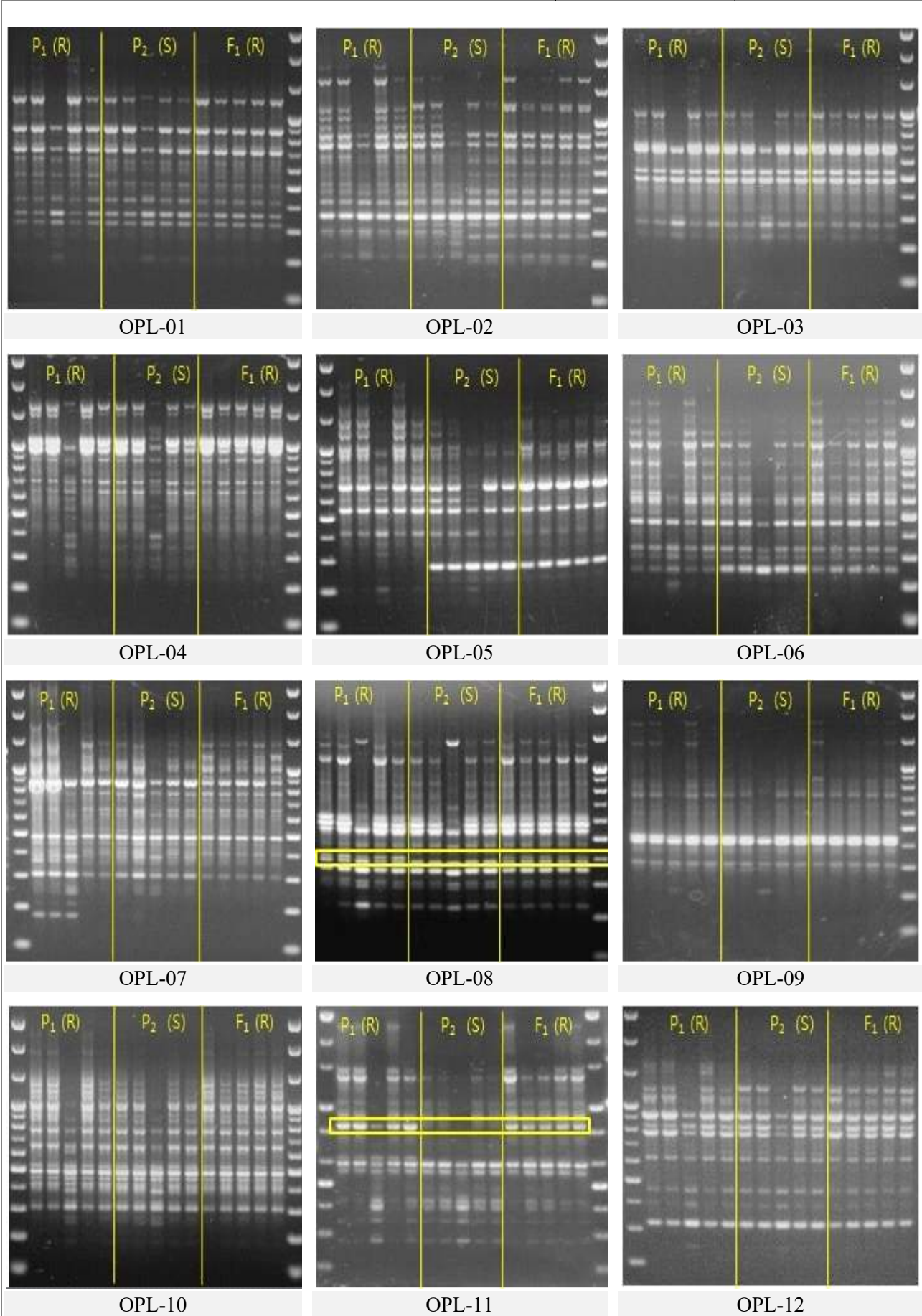


Fig. 3. Continued.

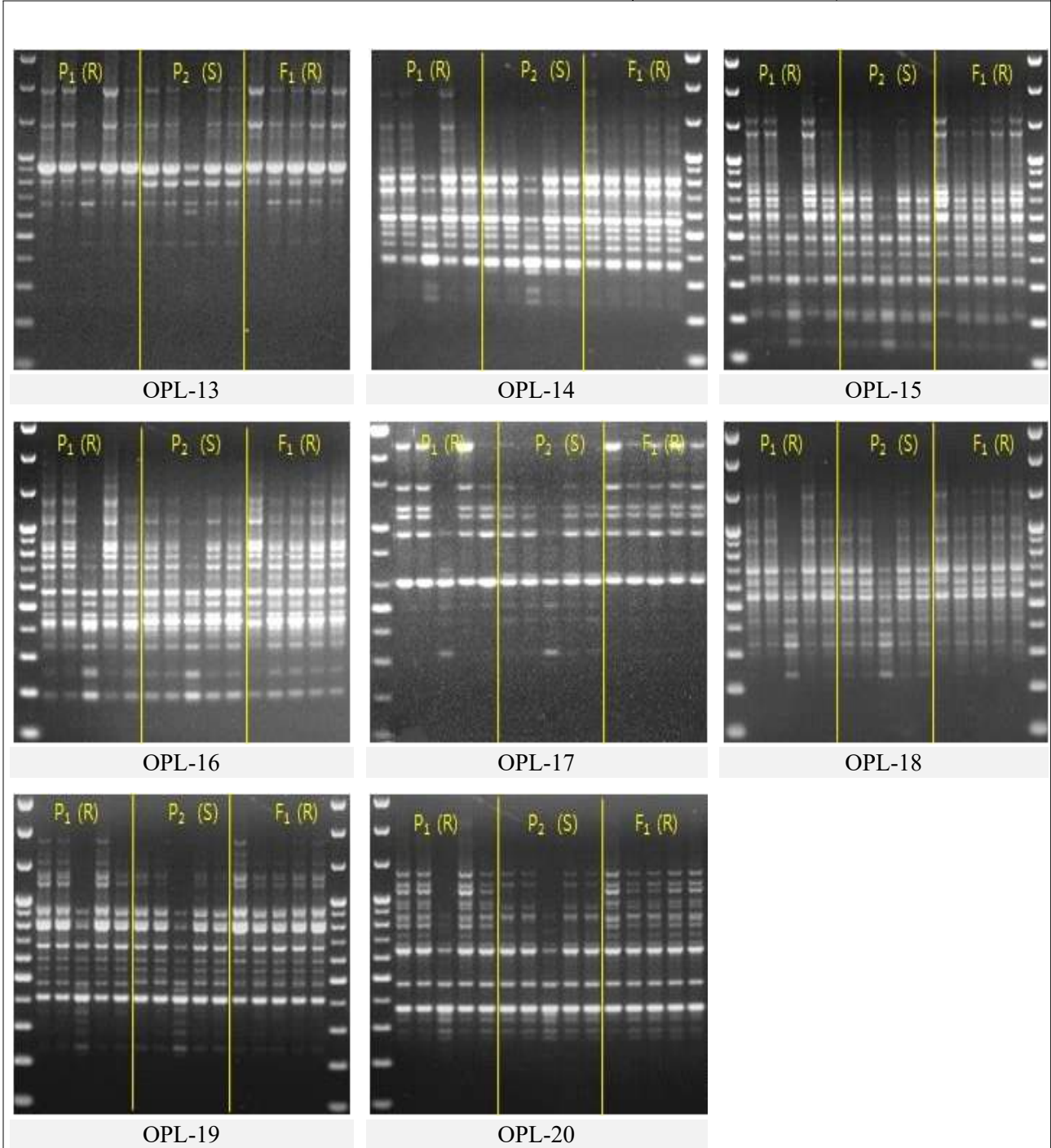


Fig. 3. Continued.

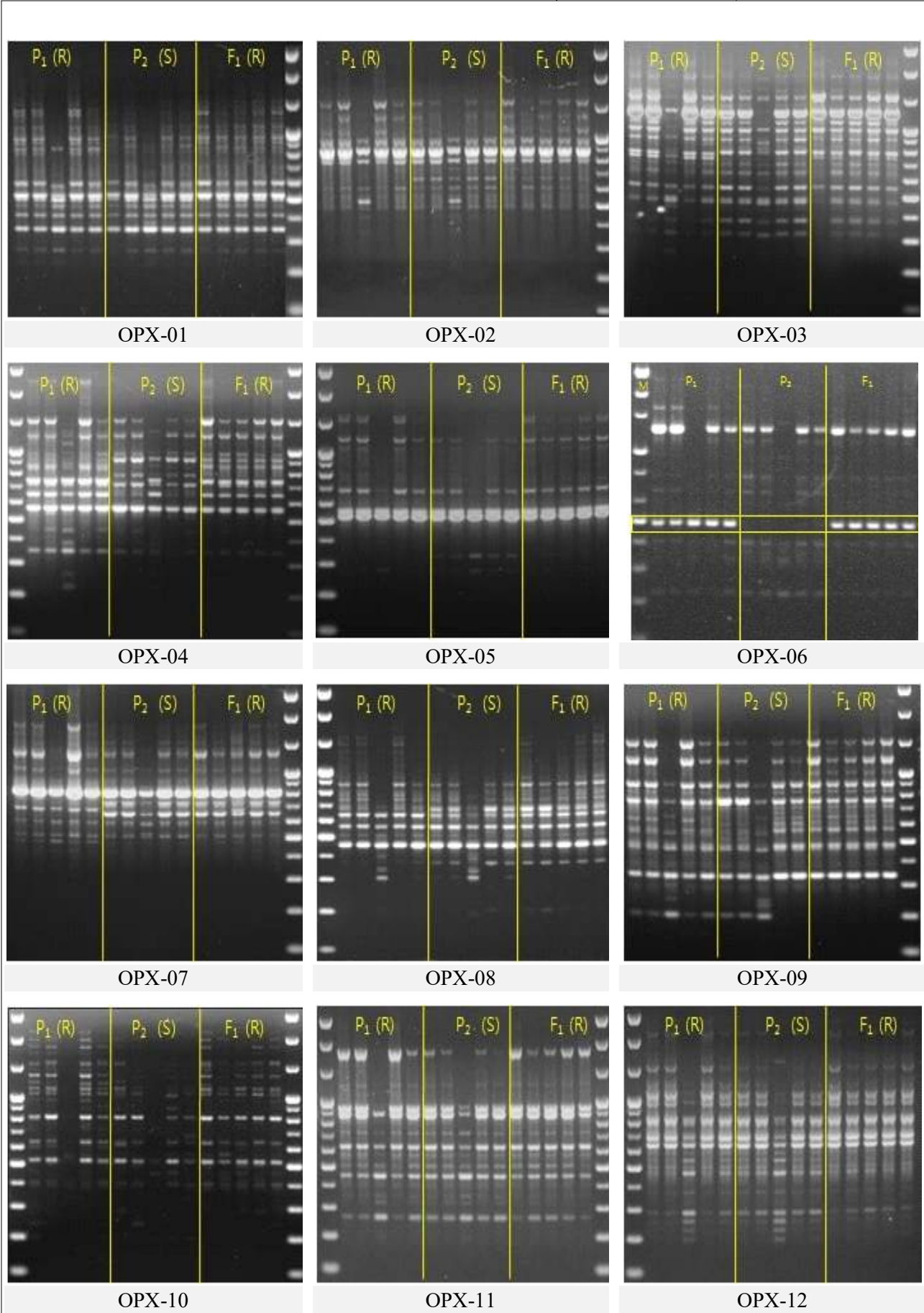


Fig. 3. Continued.

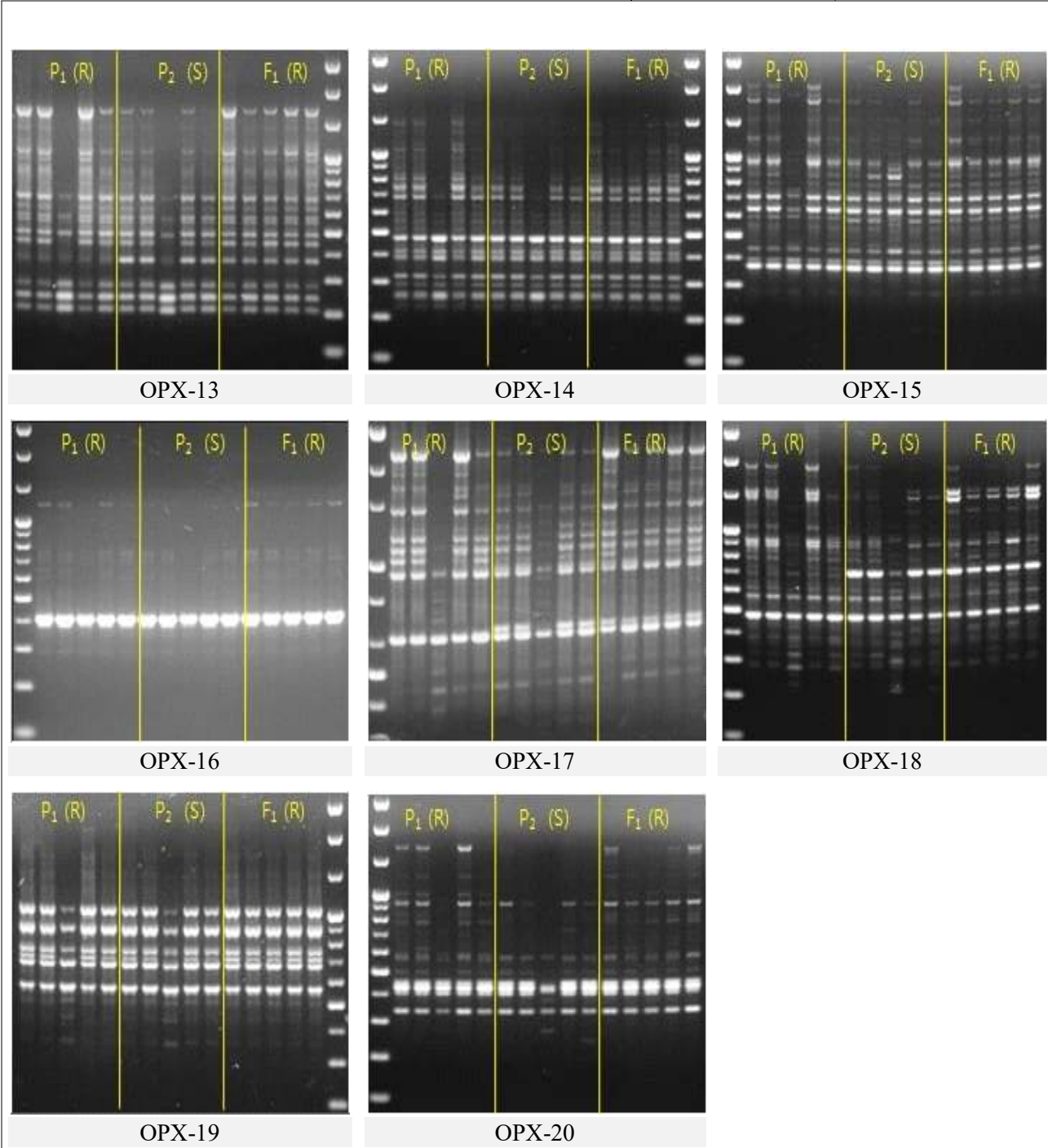


Fig. 3. Continued.

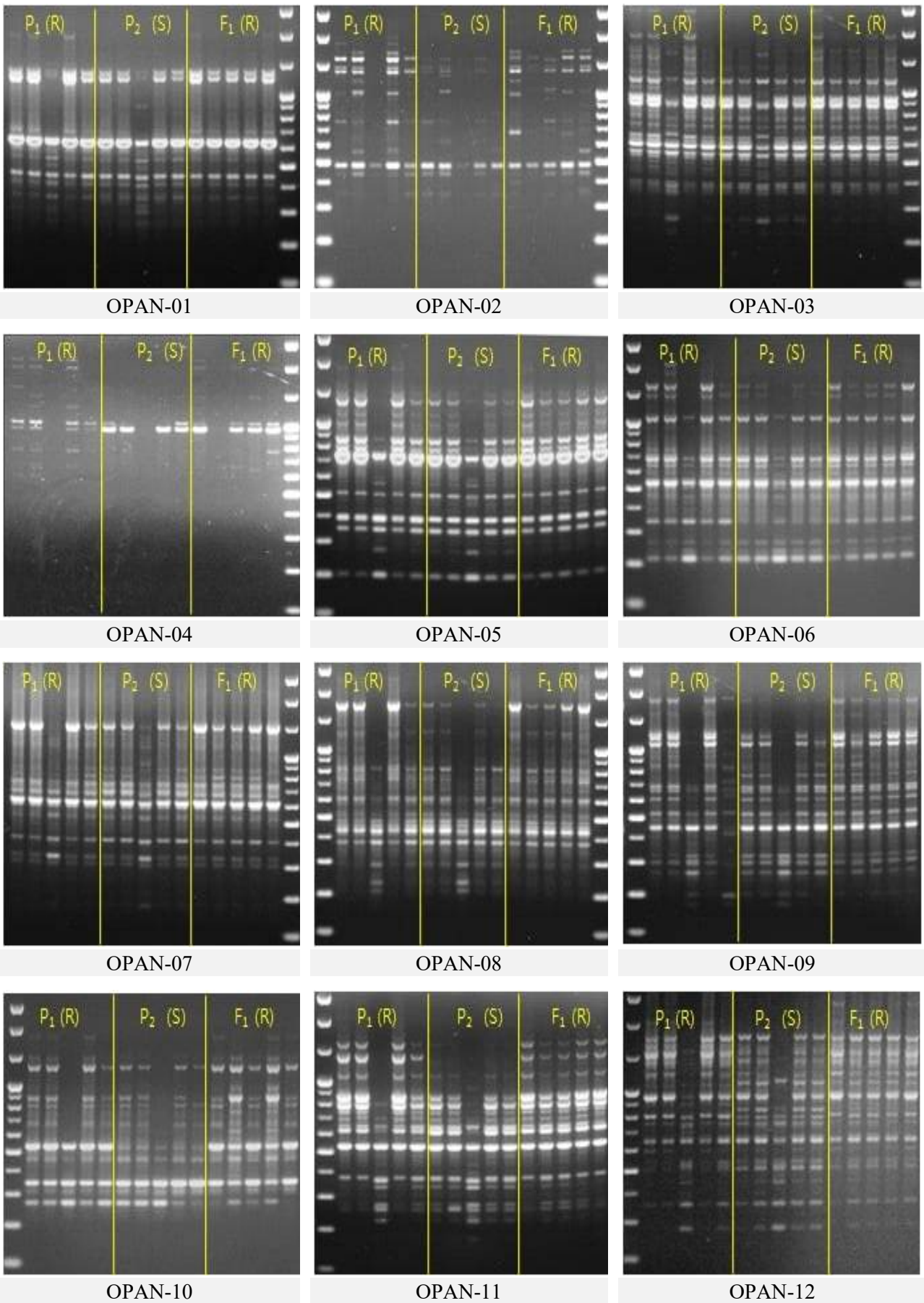


Fig. 3. Continued.

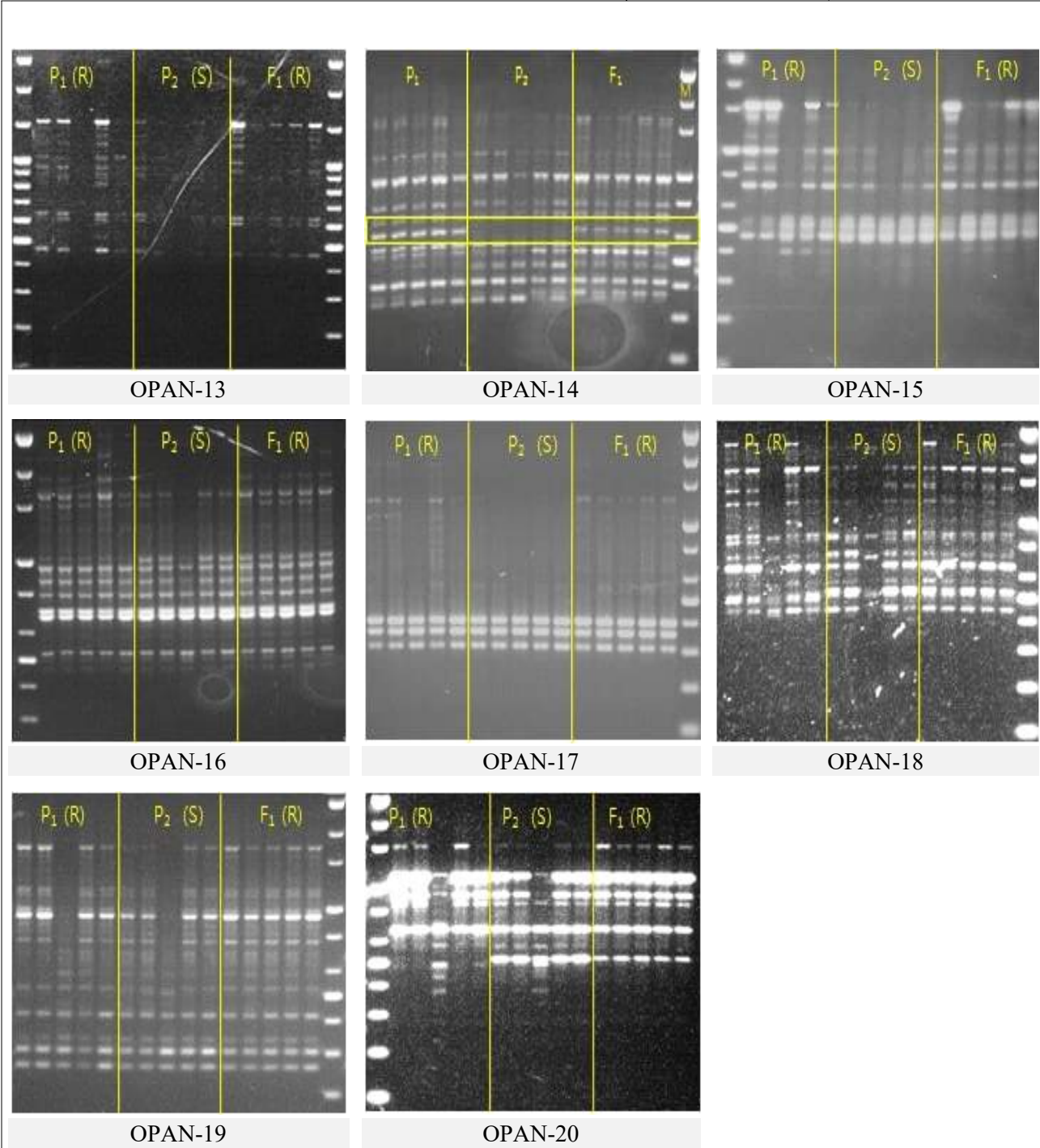


Fig. 3. Continued.

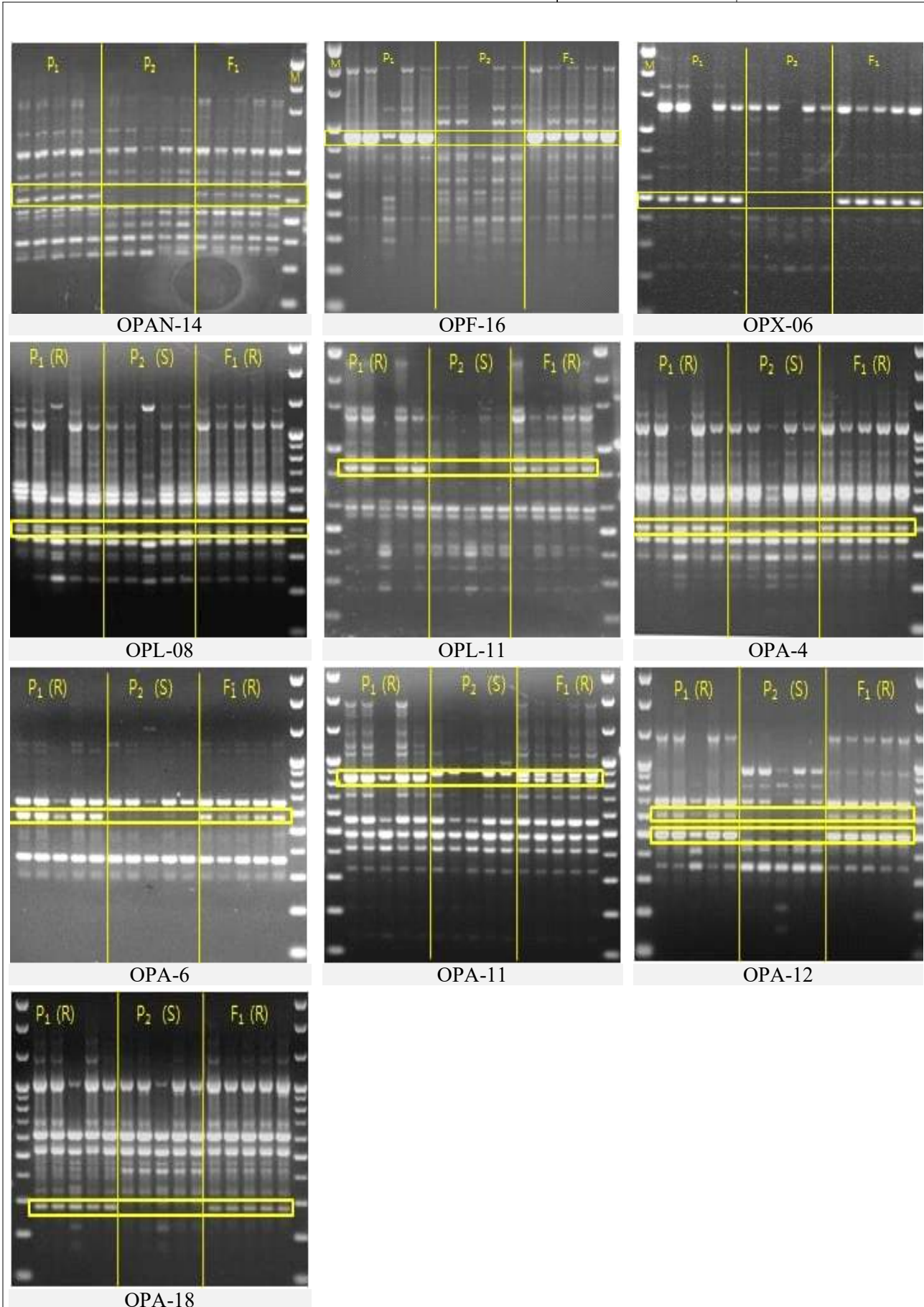


Fig. 4. RAPD analysis showing specific polymorphism between powdery mildew susceptible and resistance materials.

㉔ 흰가루병 저항성 관련 RAPD 마커 검정

흰가루병 저항성 관련 RAPD 마커 개발 실험 결과 선발된 총 10개 primer(OPAN14, OPF16, OPX6, OPL8, OPL11, OPA4, OPA6 OPA11, OPA12, OPA18) 중에서(Table 9) 결과의 신뢰도를 위해 흰가루병 감수성 계통 PE85 5개체의 DNA 농도가 $50\text{ng}\cdot\text{ul}^{-1}$ 일 때와 $200\text{ng}\cdot\text{ul}^{-1}$ 농도일 때 RAPD 실험을 수행하였다(Fig. 5). $50\text{ng}\cdot\text{ul}^{-1}$ 농도의 흰가루병 감수성 계통 PE85 5개체에서 band가 증폭되지 않은 것으로 보였던 결과가, $200\text{ng}\cdot\text{ul}^{-1}$ 농도의 흰가루병 감수성 계통 PE85 5개체에서는 band가 증폭된 것을 보인 건 총 10개 primer 중에서 OPAN14, OPF16, OPX6 3개의 primer이었다. 따라서 이 3개 primer는 제외하고 나머지 7개 primer의 RAPD 마커를 SCAR 마커로 전환하기로 하였다. 모든 RAPD 결과는 재현성을 위해 2번 이상 수행하였다.

Table 9. The selected random primers by RAPD analysis in PE12, PE85, and PE12 × PE85 F₁ lines.

Primer	Nucleotide sequence (5' to 3')
OPAN-14	AGC CGG GTA A
OPF-16	GGA GTA CTG G
OPX-06	ACG CCA GAG G
OPL-08	AGC AGG TGG A
OPL-11	ACG ATG AGC C
OPA-04	AAT CGG GCT G
OPA-06	GGT CCC TGA C
OPA-11	CAA TCG CCG T
OPA-12	TCG GCG ATA G
OPA-18	AGG TGA CCG T

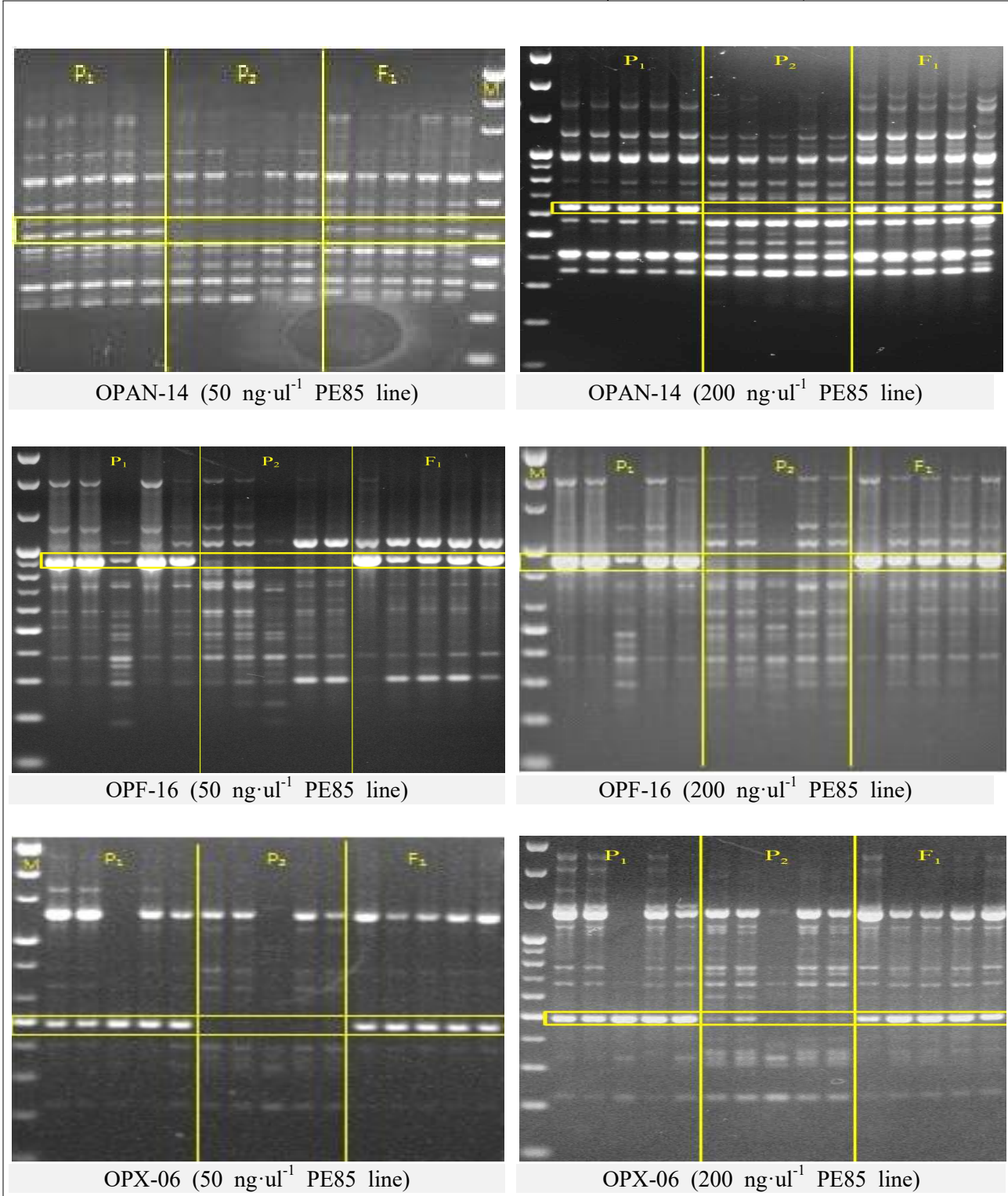


Fig. 5. The variable results of RAPD analysis using the random OPERON primer at different DNA concentrations of PE85 line.

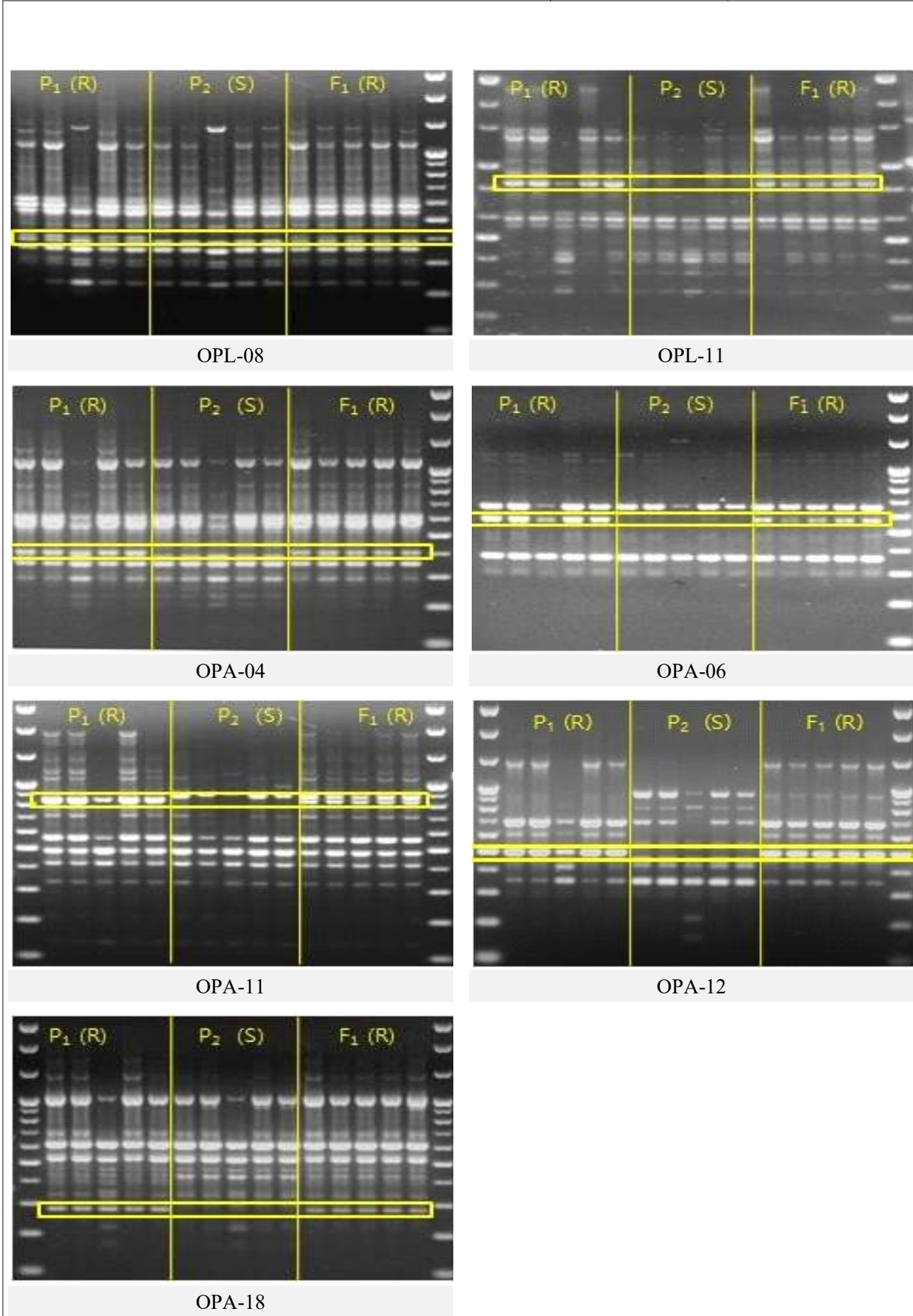


Fig. 5. RAPD analysis of PE12, PE85, and PE127⁸ PE85 F₁ line to elute amplified fragment DNA.

㉔ 흰가루병 저항성 관련 RAPD 마커의 cloning, sequencing 및 BLAST 분석

위에서 선발한 7개 RAPD primer(Table 10)를 토대로 RAPD 마커를 다음과 같이 cloning 하였다. Elution Kit로 추출한 DNA는 pGem-T easy vector에 ligation하여 *E. coli* DH10 β competent cell에 transformation한 후 X-gal을 이용하여 white colony를 선발하였다. 총 7개의 RAPD 마커 중, 약 590bp 크기의 OPA6 RAPD 마커와 약 600bp 크기의 OPA12 RAPD 마커는 cloning에 실패하여 white colony를 얻지 못했고, cloning에 성공한 RAPD 마커는 OPL8, OPL11, OPA4, OPA11, OPA12 그리고 OPA18으로, 6개였다. 선발한 white colony는 X-gal을 이용하여 재검정을 하였다. Ampicillin이 첨가된 5ml LB 배지에 넣어 37°C incubator에서 12~16시간 배양한 후 iNtRON사의 DNA-spin™ Plasmid DNA Purification Kit를 이용하여 plasmid DNA를 추출하였다. 추출한 plasmid DNA는 마크로젠 사에 sequencing 분석 의뢰를 보내 sequence 정보를 확보하였다(Fig. 6). 확보한 RAPD 마커의 sequence 크기는 각각 OPL8 primer에서 401bp, OPL11 primer에서 841bp, OPA4 primer에서 407bp, OPA11 primer에서 850bp, OPA12 primer에서 492bp, 그리고 OPA18 primer에서 329bp이었다(Table 5). RAPD 마커의 sequence 모두 NCBI BLAST에서 상동성을 검색하였다(Fig. 7). 그 결과, RAPD 마커 중 OPL-08, OPL-11, OPA-11, OPA-18 4개가 Cucurbitaceae에 다수의 상동성을 보였고, OPA-04는 Cucurbitaceae에 적은 상동성을 보이면서 *Medicago truncatula*에 큰 상동성을 보였고, OPA12는 Cucurbitaceae보다 *Vitis vinifera*에 큰 상동성을 보였다.

Table 10. The selected random primers by RAPD analysis in PE12, PE85, and PE12 \times PE85 F₁ lines.

Primer	Nucleotide sequence (5' to 3')
OPL-08	AGC AGG TGG A
OPL-11	ACG ATG AGC C
OPA-04	AAT CGG GCT G
OPA-06	GGT CCC TGA C
OPA-11	CAA TCG CCG T
OPA-12	TCG GCG ATA G
OPA-18	AGG TGA CCG T

<p>AGCAGGTGGA</p> <p>TTGTGAGATACTACATCGATTGGAGAGAAGAACGGT AACTCTTTATCGTTTCACCTCACCATTTGAAGTTAA TTCTTCATTGATTTTTGGGAAATTTTTTCATGTGACT GAATGTTTTTTTTCTTTCACGAATCCTACAATACAAA ATAAATTCAGTGACATCAGTCATCACGAGGGCCCGC CGTTAGCTTTCTGGATTTGGTGATGGACGTAATGC TTTTCCATCTCTTGTGAGATGCAAACTGATTATGTT TTGATAAACTATTTGCTTTCAACGGGGTCTGAAAG CTCCATGGCTTCGATGACAAATGAAGACTCTTCATG AATATCACAGTACTTTGTGGAGAACTGTGAGCTCT ATTCTCATAAACACTTCCTGC TCCACCTGCT</p>	<p>ACGATGAGCC TGATGTTGAC</p> <p>CATAAAAAGGTTGCAATTTTTTATGGTTTTGTTTTCT CCATACTCCTTTGGCATTTTACTGGGCGAGGGCCAG AAATGTTGAAAAATAAAGTTGTTCTGTCTAGTCTAG TTTACCATTCTCTTCTCCCACCGATTTATTTACGAA GGGAGCTTTGCTTGAATACTACTCCCTTCTCCCATC ACAGCCATCCGTACAGGATGATATTTTGTATGTTTC CAAGTGCCAGTGCAGGACTATTGATCATTGGATGAG AAAATTTAATTTGTTAAAAAGTGAGAATGATGGGAT CAAGGAAGAAATGGTGAAGGGTCTGCATTCCGTTGT GTATAACGTTTTATGTTTCTGGTTTTTTCGCTCTTTT ACTATTTTGAAGAATATTTGTATTGTTTTCTTTTTCA TTCGCATCTTTTTATTGAGGCAAACCTCAGAGGGTATA TGCTTTCTTCATTGTTGGCAAATAATTTGCTTCA TGAGTCAGTTTTCAATTTGGTTCGTATCAGTTCTTTTTG TTATTTCTTAATTCCTGATCCCTTATTTTATTCTA TTATTTTGTCTAGTGAAATAGTTTGTCCATGTGCAAA TCATGGTTATTTGCAATTAGGGGAGCGTGTAGGCTT TTCATCCTATATTCTCTTTCTGCTGATGGTAGGAA TTTGTGTTTACTTCTTTTGTGCGATAAGTAATATG TAATGATACCTAACTGCCGCTCCTTTTTCTTTACTT TTGTTATAACGTCTATTATTCTTTGCAGAAGGATAA AGTTTGTGATCCCAGTACATATGAGGGAGAAGAAAT ATTGCGGGTGCCTGCTTAT GGCTCATCGT</p>
OPL-08	OPL-11
<p>AATCGGGCTG</p> <p>GAATAGCTCAGTTGGTTAGAGCGTGTGGCTGTTAACCACAA GGTCGGAGGTTCAACCCCTCCTTCTAGCGTACCCTCTTATC TTCTTGTTCTCAATAACACAAAGTTAAGTGCTGGACAAGGC TGGAATAACTAAACTCAAAATGACATGAGTTGAATAACAAA AAATGACATGAAAGAAACCCGTCCTTAGGCTGACATGAATC ACAAGAATCACAACCTGGACCTGGACCTCCTAGACAGACAT CTACAAGGTCATGTTTAGATAACACAAATACTTTTTCTCTG AGGGAAGTTTTCTCTGTTTAAATGATTCATATAACTGCCT TAACATGTTCTCCGAGTAGCCCAAAGCAACAATAGAGGAAA ATAACTCACTCTTGGCAG CAGCCCGATT</p>	<p>CAATCGCCGT</p> <p>CTTTTTATTACACGAGATTGTTTTTCTCTGCAGAGGCT GCTCGCTAAGTACGGTTCCCTGATCTCAGTGAACCTCATT GTCATTCTGTTCACTATCTTGTGGCCAGCCCATCAAAAT CTTCTGCAAAAGGAAGCAAGAAGAAGCGTTGATTACGAT TCGGAGATAGCTCGAAAAGTAGTTTTAACTGTGTTAAAAAT AGAGGATTTTCCCTGATACTTTGTTGGGTTAGCAAAGGTA CAGAACTTTTTGAACTGATAGGTTTTCTTCCGCCCCGAA TGAAGTCGAACCCGAGGAAACAGAGAGTTAATCACAGGA GAGTCGCCGAACACATGGTGCAGTAATTGACTTGTGATT TGTTAAGTTATATGCGGATTTGTTTCATCATATTTACAGAT TGGTTTCTTCTTTCTTAGCCATGAATCTTTGTGTTGTGT TCTTTTCTTCCGACATACGCAATGATTAGAAAAATTGAC AGGGTCTTAAACCAAGTTTGGTGTTCAACTTTTTTAATTT TTAGAAAATTTTTAGAAATAATATATATACAGTAGCAAAAC TCAGAGGCAGAATCGTATGATTTGGGTTTGGAGTAGCAAAAT TTCAAGGCTGAATCGAATGATTTGGGTTTGGAGTAGCAAAAT TTCAAGAACATAACGGGCTAAAGAGAACAATATCTACAAC TGATGGGTCTTAGTAGCAAAATGGGCTTAAGTGAACGATCG TTGGGTCTGAAGAGCAAAATTTGAGACTGACGATGATACG TAATAGGCTAAAGCGGATAATATCTACGATTGGGGGGGTT TGAATGAATAGCAAAATCGTAAAGCTAGCTA ACGGCGATTG</p>
OPA-04	OPA-11

Fig. 6. Sequencing results of selected powdery mildew resistant specific polymorphic bands.

TCGGCGATAG
 CTTACGTGAATATGAATAAGGCCAATAAAGAAGATA
 TGTGGTTTCCTTGACTCGGGATGTAGGATTCATATGT
 GTGGGAAGAAGGAATATTTTTTCAGATTTTGATGGAA
 GTTTCAAAGATTCAGTGAAGCTGGGAACCAACTCAA
 GCATGGATGTAACCGGAAAGGGTAATGTACAGTTGG
 CAGTGAATGGAATCATAATGATAATTACAGGAGTGT
 TCTATGTGCCAGACTTGAGGAACAATTTGTTGACTA
 GTGGTAAATTGCAAGCAGAGGGGGTTACCTTTTTTGT
 TTCAAATGGATCATGCAAGGTGTTTCATCCTGAGA
 GAGGCTTAATCATGGAGACAAAGATGTCTTTGAATC
 GAATGTTTCGTATTGCATGCTATATCTCAGCCTGTAG
 TAGACACTCAAACCTCAATAGAACTTATGGGGAGAA
 GTGGTTCAAGGTCTCTGTCATACACTCACCACCTCA
 ATTC CTATCGCCGA

OPA-12

AGGTGACCGT
 GTGAAGGCTCCCACCATTTCTAACGCTACGCAGGGC
 TGGTCTACCGGCACCTGTCAGTTGCCATAAAGTCTA
 ATAATAAGAGGGAGTTTATTGCAAAGGCCAAACAAGA
 TGAAGAAAATGTTGAAATTTAAATGGGAAAAAATA
 CTACAAAGATGTGCATGAGCAGCAGCAAGATAGAGG
 CAACAATGTCGACGTGAGTTTCAGAGATAGGCTTGT
 TAAAGGATCGAATAGGGCCTCAAGCCTTAATCTTGA
 AAGTCGGAGTTTCAAGGAAAATTTGGGTATGCAGTT
 CTAAATTCAAATTTGATAACA ACGGTCACCT

OPA-18

Fig. 6. Continued.

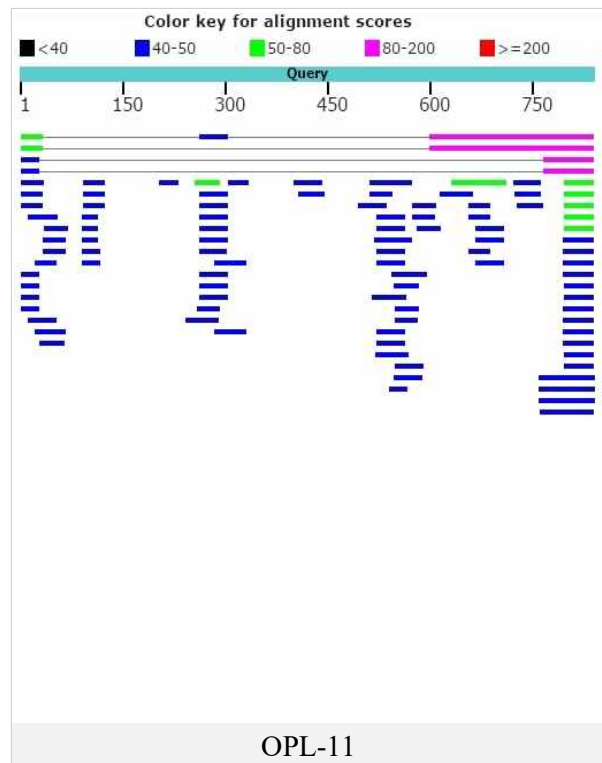
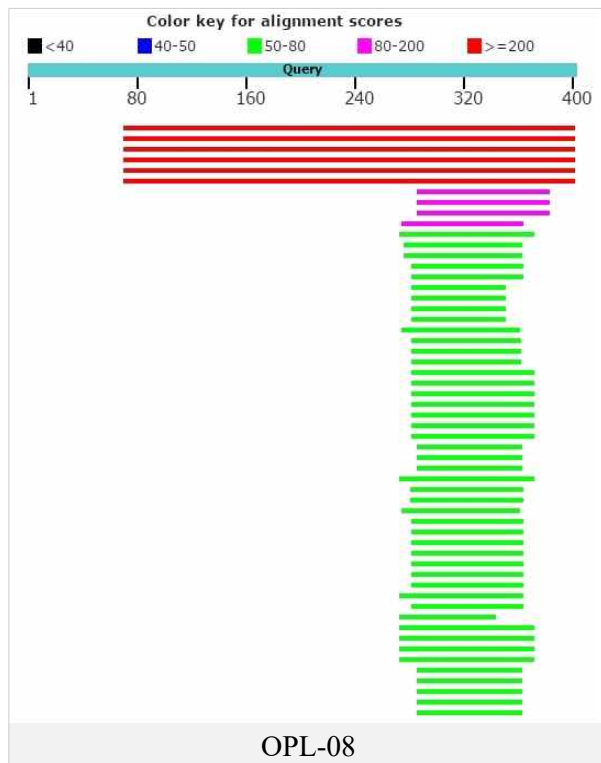


Fig. 7. Blast analysis of selected powdery mildew resistance specific polymorphic bands.

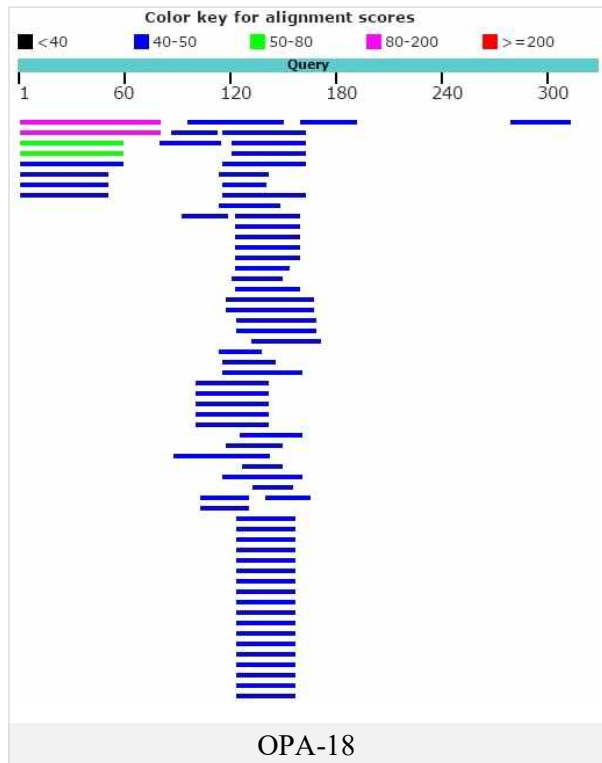
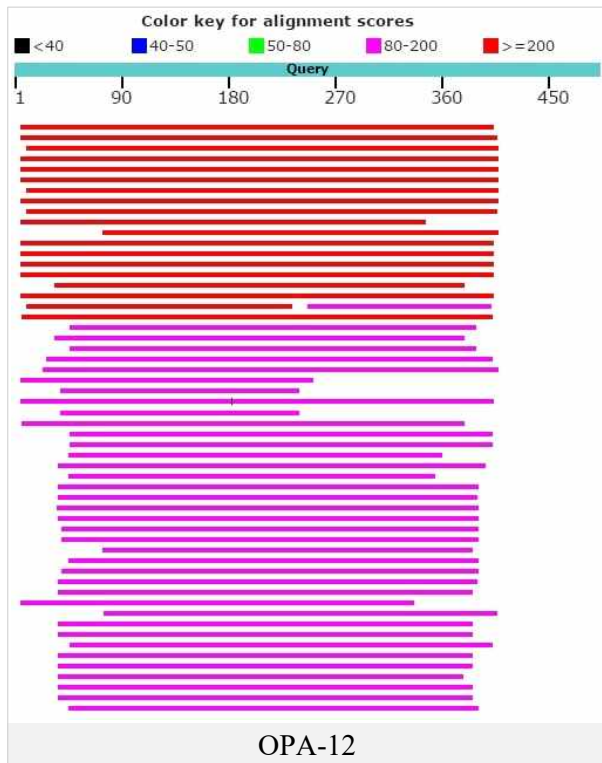
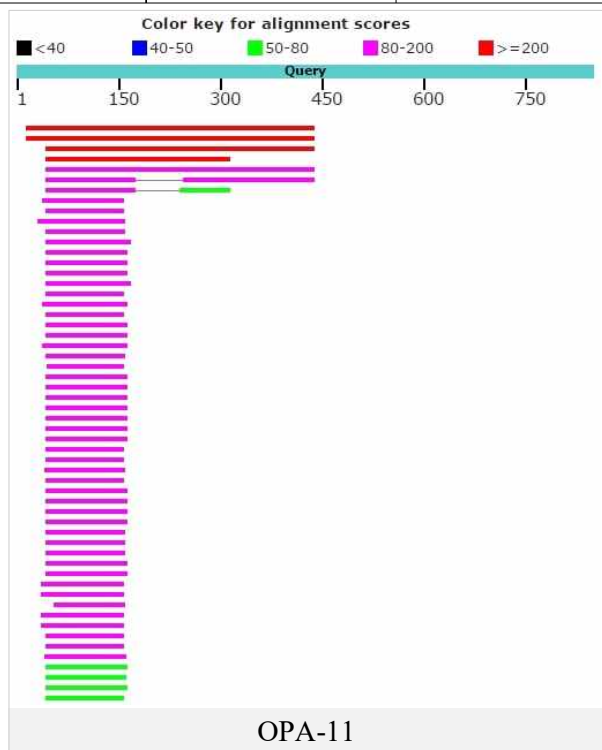
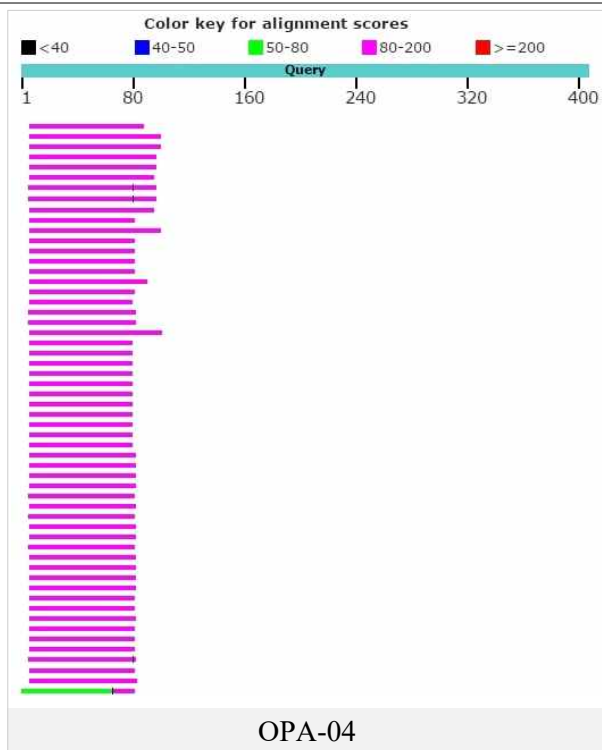


Fig. 7. Continued.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Cucumis melo genomic chromosome chr_8	268	268	82%	9e-68	79%	LN713262.1
Cucumis melo genomic scaffold_anchoredscaffold00007	268	268	82%	9e-68	79%	LN681875.1
PREDICTED: Cucumis melo probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5q45780 (LOC103484443), transcript variant X3, mRNA	257	257	82%	2e-64	78%	XM_017043793.1
PREDICTED: Cucumis melo probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5q45780 (LOC103484443), transcript variant X2, mRNA	257	257	82%	2e-64	78%	XM_017043792.1
PREDICTED: Cucumis melo probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5q45780 (LOC103484443), transcript variant X1, mRNA	257	257	82%	2e-64	78%	XM_008441506.2
PREDICTED: Cucumis sativus probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5q45780 (LOC101218118), mRNA	241	241	82%	1e-59	77%	XM_004134877.2
PREDICTED: Theobroma cacao probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5q45780 (LOC18596661), transcript variant X2, mRNA	80.6	80.6	24%	3e-11	78%	XM_007025279.2
PREDICTED: Theobroma cacao probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5q45780 (LOC18596661), transcript variant X1, mRNA	80.6	80.6	24%	3e-11	78%	XM_007025278.2
Theobroma cacao genome assembly chromosome_VI	80.6	80.6	24%	3e-11	78%	LT594793.1
PREDICTED: Fragaria vesca subsp. vesca probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5q45780 (LOC101313495), mRNA	80.6	80.6	22%	3e-11	80%	XM_004295537.2
PREDICTED: Pyrus x bretschneideri probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5q45780 (LOC103944074), mRNA	78.8	78.8	24%	9e-11	78%	XM_018646700.1
PREDICTED: Juglans regia probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5q45780 (LOC109013187), transcript variant X2, mRNA	77.0	77.0	21%	3e-10	79%	XM_018995180.1
PREDICTED: Juglans regia probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5q45780 (LOC109013187), transcript variant X1, mRNA	77.0	77.0	21%	3e-10	79%	XM_018995179.1
Vernicia montana clone comp146406_c0 LRR-RLK mRNA, complete cds	77.0	77.0	20%	3e-10	80%	KT805711.1
Vernicia fordii clone comp171131_c1 LRR-RLK mRNA, partial cds	77.0	77.0	20%	3e-10	80%	KT805476.1
PREDICTED: Daucus carota subsp. sativus probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5q45780 (LOC108193826), transcript variant X4, mRNA	75.2	75.2	17%	1e-09	84%	XM_017380677.1
PREDICTED: Daucus carota subsp. sativus probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5q45780 (LOC108193826), transcript variant X3, mRNA	75.2	75.2	17%	1e-09	84%	XM_017380670.1
PREDICTED: Daucus carota subsp. sativus probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5q45780 (LOC108193826), transcript variant X2, mRNA	75.2	75.2	17%	1e-09	84%	XM_017380662.1
PREDICTED: Daucus carota subsp. sativus probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5q45780 (LOC108193826), transcript variant X1, mRNA	75.2	75.2	17%	1e-09	84%	XM_017380654.1
PREDICTED: Prunus mume probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5q45780 (LOC103324999), mRNA	75.2	75.2	21%	1e-09	79%	XM_008227117.2
PREDICTED: Nelumbo nucifera probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5q45780 (LOC104589737), transcript variant X3, mRNA	73.4	73.4	19%	4e-09	80%	XM_010248158.2
PREDICTED: Nelumbo nucifera probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5q45780 (LOC104589737), transcript variant X2, mRNA	73.4	73.4	19%	4e-09	80%	XM_010248157.2
PREDICTED: Nelumbo nucifera probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5q45780 (LOC104589737), transcript variant X1, mRNA	73.4	73.4	19%	4e-09	80%	XM_010248156.2
PREDICTED: Nelumbo nucifera probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5q45780 (LOC104609754), transcript variant X7, mRNA	73.4	73.4	22%	4e-09	78%	XM_010276135.1
PREDICTED: Nelumbo nucifera probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5q45780 (LOC104609754), transcript variant X6, mRNA	73.4	73.4	22%	4e-09	78%	XM_010276134.1
PREDICTED: Nelumbo nucifera probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5q45780 (LOC104609754), transcript variant X5, mRNA	73.4	73.4	22%	4e-09	78%	XM_010276133.1

OPL-08

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Cucumis melo genomic chromosome chr_5	140	241	37%	7e-29	73%	LN713259.1
Cucumis melo genomic scaffold_anchoredscaffold00003	140	191	32%	7e-29	73%	LN681847.1
PREDICTED: Cucumis sativus mediator of RNA polymerase II transcription subunit 14 (LOC101219239), mRNA	91.5	136	11%	3e-14	88%	XM_011650455.1
PREDICTED: Cucumis melo mediator of RNA polymerase II transcription subunit 14 (LOC103496018), mRNA	87.8	132	11%	4e-13	86%	XM_008457733.2
Toxocara canis genome assembly T. canis Equador_scaffold TCNE_scaffold0000788	53.6	53.6	9%	0.008	76%	LM036649.1
PREDICTED: Theobroma cacao mediator of RNA polymerase II transcription subunit 14 (LOC18600190), mRNA	51.8	51.8	5%	0.027	86%	XM_007030508.2
Theobroma cacao genome assembly chromosome_V	51.8	51.8	5%	0.027	86%	LT594792.1
PREDICTED: Gossypium hirsutum mediator of RNA polymerase II transcription subunit 14-like (LOC107899159), mRNA	51.8	51.8	5%	0.027	86%	XM_016824786.1
PREDICTED: Gossypium raimondii mediator of RNA polymerase II transcription subunit 14 (LOC105792585), transcript variant X2, mRNA	51.8	51.8	5%	0.027	86%	XM_012621224.1
PREDICTED: Gossypium raimondii mediator of RNA polymerase II transcription subunit 14 (LOC105792585), transcript variant X1, mRNA	51.8	51.8	5%	0.027	86%	XM_012621223.1
Triticum aestivum chromosome 3B, genomic scaffold, cultivar Chinese Spring	51.8	51.8	4%	0.027	89%	HG870306.1
PREDICTED: Ricinus communis mediator of RNA polymerase II transcription subunit 14 (LOC8269332), transcript variant X2, mRNA	50.0	50.0	5%	0.095	84%	XM_015726673.1
PREDICTED: Ricinus communis mediator of RNA polymerase II transcription subunit 14 (LOC8269332), transcript variant X1, mRNA	50.0	50.0	5%	0.095	84%	XM_015726672.1
Cucumis melo genomic chromosome chr_11	50.0	50.0	5%	0.095	86%	LN713265.1
Cucumis melo genomic chromosome chr_2	50.0	50.0	5%	0.095	86%	LN713256.1
Cucumis melo genomic scaffold_anchoredscaffold00020	50.0	50.0	5%	0.095	86%	LN681918.1
Cucumis melo genomic scaffold_anchoredscaffold00009	50.0	50.0	5%	0.095	86%	LN681846.1
Cucumis melo genomic scaffold_anchoredscaffold00024	50.0	50.0	5%	0.095	86%	LN681807.1
Chaetomium thermophilum var. thermophilum DSM 1495 hypothetical protein (CTHT_0033050), partial mRNA	50.0	50.0	5%	0.095	85%	XM_006693680.1
Populus trichocarpa STRUJWELPETER family protein (POPTR_0013s03850g) mRNA, complete cds	48.2	48.2	4%	0.33	91%	XM_002319605.2
Populus trichocarpa STRUJWELPETER family protein (POPTR_0005s05520g) mRNA, complete cds	48.2	48.2	3%	0.33	94%	XM_006382733.1
Populus trichocarpa clone POP036-C05, complete sequence	48.2	48.2	3%	0.33	94%	AC237587.1
Mus musculus chromosome 1, clone RP24-200D3, complete sequence	48.2	48.2	4%	0.33	86%	AC124338.11
PREDICTED: Juglans regia mediator of RNA polymerase II transcription subunit 14-like (LOC108998180), transcript variant X2, mRNA	46.4	46.4	5%	1.2	82%	XM_018974659.1
PREDICTED: Juglans regia mediator of RNA polymerase II transcription subunit 14-like (LOC108998180), transcript variant X1, mRNA	46.4	46.4	5%	1.2	82%	XM_018974658.1
PREDICTED: Gossypium arboreum mediator of RNA polymerase II transcription subunit 14 (LOC108469658), mRNA	46.4	46.4	5%	1.2	84%	XM_017770633.1
Theobroma cacao genome assembly chromosome_VIII	46.4	46.4	7%	1.2	78%	LT594795.1

OPL-11

Fig. 7. Continued.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Solanum pennellii chromosome ch01, complete genome	140	602	20%	3e-29	98%	HG975440.1
Medicago truncatula chromosome 8 clone mth2-10g9, complete sequence	140	140	23%	3e-29	94%	AC124954.14
Medicago truncatula chromosome 8 clone mth2-29f13, complete sequence	140	140	23%	3e-29	94%	AC152403.17
PREDICTED: Cucumis melo 5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase-like protein COG0212 (LOC103485607), transcript variant X2, mRNA	138	138	22%	1e-28	93%	XM_008443283.2
PREDICTED: Cucumis melo 5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase-like protein COG0212 (LOC103485607), transcript variant X1, mRNA	138	138	22%	1e-28	93%	XM_008443282.2
Medicago truncatula phenylpropanal double-bond reductase mRNA	138	138	21%	1e-28	94%	XM_003596926.2
Cucumis melo genomic chromosome, chr_3	138	657	22%	1e-28	93%	LN713257.1
Cucumis melo genomic scaffold, anchoredscaffold00008	138	396	22%	1e-28	93%	LN681815.1
Medicago truncatula chromosome 2 BAC clone mte1-36o22, complete sequence	138	138	21%	1e-28	94%	AC165275.5
Vigna angularis var. angularis DNA, chromosome 3, almost complete sequence, cultivar Shumari	136	811	18%	4e-28	100%	AP015036.1
Solanum lycopersicum chromosome ch01, complete genome	136	409	23%	4e-28	93%	HG975513.1
Medicago truncatula chromosome 8 clone mth2-34n4, complete sequence	136	136	18%	4e-28	100%	AC146723.28
Medicago truncatula chromosome 8 clone mth2-157b12, complete sequence	136	136	18%	4e-28	100%	AC171499.14
Medicago truncatula clone mth2-4h4, complete sequence	136	136	18%	4e-28	100%	AC146785.12
Medicago truncatula clone mth2-31d24, complete sequence	136	136	18%	4e-28	100%	AC138130.9
Medicago truncatula clone mth2-10a12, complete sequence	136	136	20%	4e-28	96%	AC146308.2
Medicago truncatula chromosome 5 clone mth4-39c23, COMPLETE SEQUENCE	136	136	18%	4e-28	100%	CT025840.2
Medicago truncatula hypothetical protein partial mRNA	134	134	18%	1e-27	100%	XM_003627840.1
Orzya officinalis clone OO_Ba0026H17, complete sequence	134	134	18%	1e-27	99%	AC232884.1
Orzya officinalis clone OO_Ba0018M10, complete sequence	134	134	18%	1e-27	99%	AC232883.1
Vitis vinifera contig VV78X069031.7, whole genome shotgun sequence	134	134	23%	1e-27	93%	AM430729.2
Medicago truncatula chromosome 5 clone mte1-43g8, COMPLETE SEQUENCE	134	134	18%	1e-27	100%	CT963115.2
Medicago truncatula chromosome 5 clone mth2-60f21, COMPLETE SEQUENCE	134	134	18%	1e-27	100%	CT573052.2
Medicago truncatula clone mth2-18111, complete sequence	134	306	18%	1e-27	100%	AC124958.13
Medicago truncatula clone mth2-10i9, complete sequence	134	134	18%	1e-27	100%	AC119409.25
Medicago truncatula clone mth2-47n14, complete sequence	134	134	18%	1e-27	100%	AC152936.21
Medicago truncatula chromosome 2 clone mte1-30k4, complete sequence	134	134	18%	1e-27	100%	AC161399.2
Medicago truncatula clone mth2-15i5, complete sequence	134	306	18%	1e-27	100%	AC144474.22
Medicago truncatula chromosome 5 clone mte1-79f1, COMPLETE SEQUENCE	134	134	18%	1e-27	100%	CT573216.1

OPA-04

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Cucumis melo genomic chromosome, chr_6	289	289	50%	6e-74	74%	LN713260.1
Cucumis melo genomic scaffold, anchoredscaffold00023	289	289	50%	6e-74	74%	LN681857.1
PREDICTED: Cucumis melo translocon-associated protein subunit beta (LOC103491721), transcript variant X1, mRNA	277	277	46%	4e-70	75%	XM_008451782.2
PREDICTED: Cucumis sativus translocon-associated protein subunit beta (LOC101222897), transcript variant X1, mRNA	233	233	31%	4e-57	78%	XM_004145647.2
PREDICTED: Cucumis melo translocon-associated protein subunit beta (LOC103491721), transcript variant X2, mRNA	179	179	46%	8e-41	69%	XM_008451783.2
PREDICTED: Cucumis melo translocon-associated protein subunit beta (LOC103491721), transcript variant X3, mRNA	167	276	38%	5e-37	88%	XM_017045315.1
PREDICTED: Cucumis sativus translocon-associated protein subunit beta (LOC101222897), transcript variant X2, mRNA	161	238	24%	2e-35	87%	XM_004145648.2
Theobroma cacao genome assembly, chromosome IV	113	113	14%	1e-20	80%	LT594791.1
PREDICTED: Theobroma cacao translocon-associated protein subunit beta (LOC18601094), mRNA	104	104	13%	5e-18	80%	XM_007031915.2
Vitis vinifera, whole genome shotgun sequence, contig VV78X094068.6, clone ENTAV 115	100	100	15%	6e-17	77%	AM480871.1
PREDICTED: Pyrus x bretschneideri translocon-associated protein subunit beta-like (LOC103936092), mRNA	98.7	98.7	13%	2e-16	78%	XM_009345923.2
PREDICTED: Pyrus x bretschneideri translocon-associated protein subunit beta-like (LOC103966569), mRNA	98.7	98.7	14%	2e-16	77%	XM_009379741.2
PREDICTED: Malus x domestica translocon-associated protein subunit beta-like (LOC103411111), mRNA	98.7	98.7	14%	2e-16	78%	XM_008349768.2
PREDICTED: Malus x domestica translocon-associated protein subunit beta-like (LOC103411294), partial mRNA	98.7	98.7	14%	2e-16	78%	XM_008349935.2
PREDICTED: Malus x domestica translocon-associated protein subunit beta-like (LOC103442096), mRNA	98.7	98.7	14%	2e-16	78%	XM_008380845.2
PREDICTED: Malus x domestica translocon-associated protein subunit beta-like (LOC103404166), mRNA	98.7	98.7	14%	2e-16	77%	XM_008343054.2
PREDICTED: Prunus mume translocon-associated protein subunit beta (LOC103330283), mRNA	95.1	95.1	13%	3e-15	78%	XM_008232826.2
Medicago truncatula translocon-associated protein beta family-like protein mRNA	95.1	95.1	14%	3e-15	77%	XM_013594003.1
Prunus persica hypothetical protein (PRUPE_ppa010572mq) mRNA, complete cds	95.1	95.1	13%	3e-15	78%	XM_007215821.1
Glycine max uncharacterized LOC100500066 (LOC100500066), mRNA	95.1	95.1	14%	3e-15	78%	NM_001249413.2
Soybean clone JCV1-FLGm-5A14 unknown mRNA	95.1	95.1	14%	3e-15	78%	BT090744.1
Medicago truncatula clone mth2-27f3, complete sequence	95.1	95.1	14%	3e-15	77%	AC133780.33
PREDICTED: Vitis vinifera translocon-associated protein subunit beta (LOC100241257), mRNA	93.3	93.3	13%	9e-15	78%	XM_002274489.4
Morus notabilis Translocon-associated protein subunit beta partial mRNA	93.3	93.3	13%	9e-15	78%	XM_010097756.1
Glycine max strain Williams 82 clone GM_WBb0113B18, complete sequence	93.3	93.3	14%	9e-15	77%	AC235385.1
Medicago truncatula translocon-associated protein beta family-like protein mRNA	91.5	91.5	14%	3e-14	77%	XM_003624411.2
PREDICTED: Cicer arietinum translocon-associated protein subunit beta (LOC101504771), mRNA	91.5	91.5	14%	3e-14	77%	XM_004492950.2
Glycine max uncharacterized LOC100306406 (LOC100306406), mRNA	91.5	91.5	14%	3e-14	77%	NM_001251422.2
Medicago truncatula clone JCV1-FLM1-4I16 unknown mRNA	91.5	91.5	14%	3e-14	77%	BT144107.1
Soybean clone JCV1-FLGm-4J11 unknown mRNA	91.5	91.5	14%	3e-14	77%	BT090488.1

OPA-11

Fig. 7. Continued.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Vitis vinifera contig VV78X206727.13, whole genome shotgun sequence	435	435	80%	4e-118	84%	AM445350.2
Vitis vinifera contig VV78X241126.4, whole genome shotgun sequence	383	383	81%	2e-102	82%	AM428719.2
Vitis vinifera, whole genome shotgun sequence, contig VV78X134357.11, clone ENTAV 115	381	381	80%	7e-102	81%	AM447650.1
Vitis vinifera contig VV78X238680.5, whole genome shotgun sequence	378	378	81%	8e-101	81%	AM459397.2
Vitis vinifera contig VV78X155726.18, whole genome shotgun sequence	372	372	81%	4e-99	81%	AM430618.2
Vitis vinifera contig VV78X111980.3, whole genome shotgun sequence	372	372	81%	4e-99	81%	AM451889.2
Vitis vinifera contig VV79X004819.12, whole genome shotgun sequence	349	349	80%	4e-92	80%	AM459948.2
Vitis vinifera contig VV78X074857.6, whole genome shotgun sequence	345	345	81%	5e-91	78%	AM453348.2
Vitis vinifera contig VV78X023854.2, whole genome shotgun sequence	338	338	80%	7e-89	79%	AM476928.2
PREDICTED: Vitis vinifera probable (S)-N-methylcoclaurine 3'-hydroxylase isozyme 2 (LOC10026)	325	325	69%	5e-85	81%	XM_002274550.3
Vitis vinifera contig VV78X187030.7, whole genome shotgun sequence	284	284	67%	1e-72	79%	AM460153.2
Vitis vinifera contig VV78X200971.11, whole genome shotgun sequence	279	279	80%	6e-71	75%	AM487433.2
Vitis vinifera contig VV78X177940.7, whole genome shotgun sequence	279	279	80%	6e-71	75%	AM436288.1
Vitis vinifera contig VV78X193752.3, whole genome shotgun sequence	269	269	80%	3e-68	75%	AM460859.2
Vitis vinifera contig VV78X038664.6, whole genome shotgun sequence	266	266	80%	4e-67	75%	AM488287.2
Gossypium raimondii clone GR_Ba0042P16-1fl, complete sequence	228	228	70%	1e-55	76%	AC243115.1
Vitis vinifera contig VV78X112013.5, whole genome shotgun sequence	226	226	80%	3e-55	73%	AM433944.2
Vitis vinifera contig VV78X271294.9, whole genome shotgun sequence	214	214	45%	2e-51	82%	AM482745.2
Populus trichocarpa clone POP051-N24, complete sequence	205	205	80%	1e-48	72%	AC216943.1
Vigna angularis var. angularis DNA, chromosome 6, almost complete sequence, cultivar: Shumar	197	285	69%	2e-46	73%	AP015039.1
Gossypium raimondii clone GR_Ba0222F01-hob, complete sequence	194	194	70%	2e-45	72%	AC243127.1
Vigna angularis var. angularis DNA, chromosome 7, almost complete sequence, cultivar: Shumar	188	237	69%	8e-44	72%	AP015040.1
Populus trichocarpa clone POP025-M11, complete sequence	187	187	76%	3e-43	72%	AC217586.1
PREDICTED: Jatropha curcas uncharacterized LOC105635626 (LOC105635626), mRNA	183	183	77%	4e-42	71%	XM_012218705.1
Vitis vinifera contig VV78X204561.14, whole genome shotgun sequence	165	165	50%	1e-36	75%	AM437301.2

OPA-12

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Cucumis melo genomic chromosome, chr_12	86.0	86.0	24%	5e-13	84%	LN713266.1
Cucumis melo genomic scaffold, anchored scaffold00004	86.0	86.0	24%	5e-13	84%	LN681928.1
PREDICTED: Cucumis sativus serine carboxypeptidase-like 51 (LOC101220744), mRNA	66.2	66.2	17%	4e-07	85%	XM_004139414.2
PREDICTED: Cucumis melo serine carboxypeptidase-like 51 (LOC103500527), mRNA	62.6	62.6	17%	5e-06	83%	XM_008463871.2
Ascaris lumbricoides genome assembly A_lumbricoides_Ecuador_v1_5_4, scaffold ALUE_scaffold0000255	50.0	50.0	9%	0.035	94%	LK872111.1
PREDICTED: Jatropha curcas serine carboxypeptidase-like 51 (LOC105627989), mRNA	48.2	48.2	17%	0.12	78%	XM_012209274.1
Soboliphyme baturini genome assembly S_baturini_Dall_Island_scaffold SBAD_scaffold0001458	48.2	48.2	16%	0.12	80%	LM014978.1
PREDICTED: Juglans regia serine carboxypeptidase-like 51 (LOC109000659), mRNA	46.4	46.4	15%	0.42	80%	XM_018977612.1
Plasmodium gaboni hypothetical protein partial mRNA	46.4	46.4	14%	0.42	86%	XM_018783720.1
PREDICTED: Cimex lectularius calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1 (LOC106667176), transcript variant X2, mRNA	46.4	46.4	12%	0.42	86%	XM_014394934.1
PREDICTED: Cimex lectularius calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1 (LOC106667176), transcript variant X1, mRNA	46.4	46.4	12%	0.42	86%	XM_014394932.1
Plasmodium reichenowi conserved Plasmodium protein, unknown function partial mRNA	46.4	46.4	14%	0.42	86%	XM_012905480.1
Mycoplasma yeatsii GM274B	46.4	46.4	8%	0.42	96%	CP007520.1
Trichobilharzia regenti genome assembly T_regenti_v1_0_4, scaffold TRE_scaffold00050525	46.4	92.7	7%	0.42	100%	LL051252.1
PREDICTED: Glycine max serine carboxypeptidase-like 51 (LOC100794318), mRNA	46.4	46.4	15%	0.42	80%	XM_003543396.2
Xenopus laevis DNA, BAC clone: XLB1-297110, complete sequence	46.4	46.4	10%	0.42	89%	AP013021.1
Soybean clone JCVI-FLGM-26J21 unknown mRNA	46.4	46.4	15%	0.42	80%	BT098347.1
Plasmodium falciparum 3D7 conserved Plasmodium protein (PFB0235w) mRNA, complete cds	46.4	46.4	14%	0.42	86%	XM_001349527.1
Mus musculus chromosome 3, clone RP24-527P22, complete sequence	46.4	46.4	10%	0.42	89%	AC119163.23
Plasmodium berghei strain SP11 RIL genome assembly, chromosome: 12	44.6	44.6	11%	1.5	89%	LT608276.1
Plasmodium berghei strain SP11 Antwerp1 genome assembly, chromosome: 12	44.6	44.6	11%	1.5	89%	LT608260.1
Plasmodium berghei strain NK65e genome assembly, chromosome: 12	44.6	44.6	11%	1.5	89%	LT614638.1
Plasmodium berghei strain NK65 ny genome assembly, chromosome: 12	44.6	44.6	11%	1.5	89%	LT608148.1
Plasmodium berghei strain K173 genome assembly, chromosome: 12	44.6	44.6	11%	1.5	89%	LT160032.1
Hymenolepis diminuta genome assembly H_diminuta_Denmark_scaffold HDID_contig0000073	44.6	44.6	9%	1.5	94%	LM383662.1
Paratronglroides trichosuri genome assembly P_trichosuri_KNP_scaffold PTRK_scaffold0000014	44.6	44.6	8%	1.5	93%	LM523171.1
Plasmodium berghei ANKA genome assembly PBANKA01, chromosome: 12	44.6	44.6	11%	1.5	89%	LK023127.1
Medicago truncatula chromosome 5 clone mth2-17416, COMPLETE SEQUENCE	44.6	44.6	15%	1.5	80%	CU469562.1

OPA-18

Fig. 7. Continued.

Table 11. The developed 7 specific RAPD markers that related to powdery mildew resistance in resistant lines.

Line	RAPD markers and expected sizes related to powdery mildew resistance
Powdery mildew resistant lines (PE12, F ₁ hybrid)	OPL-08 (401 bp)
	OPL-11 (841 bp)
	OPA-04 (407 bp)
	OPA-11 (850 bp)
	OPA-12 (492 bp)
	OPA-18 (329 bp)

(나) 개발된 RAPD 마커를 이용한 SCAR 마커로의 전환

① 목적

본 실험은 이전 실험에서 개발한 호박 흰가루병 저항성 관련 RAPD 마커 개발 결과를 토대로 보다 높은 재현성을 위하여 RAPD 분석 결과에서 선발한 저항성 특이적인 band들을 SCAR 마커로 전환하였다. SCAR 마커는 RAPD보다 더 간편하고 정확하게 저항성 개체를 선발할 수 있고 이를 저항성 품종 육성 과정에서 Marker Assisted Selection(MAS)에 이용하기 위하여 수행하였다.

② 재료 및 방법

㉞ Sequence 분석결과를 토대로 SCAR primer 제작 및 SCAR 마커 검정

RAPD 분석 결과 확인한 6개의 RAPD 마커의 sequence(Table 12)를 바탕으로 SCAR primer set를 제작하였는데 각각의 SCAR primer는 RAPD primer의 염기서열 10개가 모두 포함되도록 디자인하였다(Table 13). 디자인 할 때 18~25 base pair 크기로, GC Content Plot Online에서 GC content를 계산하였고 Macrogen 사에서 제공하는 primer melting temperature(T_m) 계산식을 이용하여 Foward와 Reverse primer 사이의 T_m 값이 크게 차이나지 않도록 하였다(Table 13). 제작한 primer는 RAPD 분석에서 사용했던 동일한 식물재료, 즉, 흰가루병 저항성 PE12 line과 흰가루병 감수성 PE85 line 및 PE12 × PE85 F₁ line의 개체들에 적용해 검정하였다.

Table 12. The selected random primers by RAPD analysis in PE12, PE85, and PE12 × PE85 F₁ lines.

Primer	Nucleotide sequence (5' to 3')
OPL-08	AGC AGG TGG A
OPL-11	ACG ATG AGC C
OPA-04	AAT CGG GCT G
OPA-11	CAA TCG CCG T
OPA-12	TCG GCG ATA G
OPA-18	AGG TGA CCG T

Table 13. The information of designed SCAR primer sets.

Primer name	Primer sequence	%GC	Strand	Size (bases)	T _m (°C)
OPL-08 SCAR F	AGC AGG TGG ATT GTG AGA TAC TAC	45.83	Fwd	24	63.5
OPL-08 SCAR R	AGG TGG ACG AGC AGG AAG TGT	57.14	Rev	21	63.3
OPL-11 SCAR F	ACG ATG AGC CTG ATG TTG AC	50.0	Fwd	20	58.4
OPL-11 SCAR R	ACG ATG AGC CAT AAG CAC G	52.63	Rev	19	57.3
OPA-04 SCAR F	AAT CGG GCT GGA ATA GCT CAG TT	47.82	Fwd	23	62.9
OPA-04 SCAR R	AAT CGG GCT GCT GCC AAG AGT	57.14	Rev	21	63.3
OPA-11 SCAR F	CAA TCG CCG TCT TTT TAT TCA CA	39.13	Fwd	23	59.3
OPA-11 SCAR R	CAA TCG CCG TTA GCT AGC TTT	47.61	Rev	21	59.4
OPA-12 SCAR F	TCG GCG ATA GCT TAC GTG AA	50	Fwd	20	58.4
OPA-12 SCAR R	TCG GCG ATA GGA ATT GAG GT	50	Rev	20	58.4
OPA-18 SCAR F	AGG TGA CCG TGT GAA GGC TC	60	Fwd	20	62.5
OPA-18 SCAR R	AGG TGA CCG TTG TTA TCA AAT TTG A	36	Rev	25	60.9

㉔ 흰가루병 저항성 관련 특이적 band 추출

앞서 디자인한 SCAR primer 6개를 적용하여(Table 13) P₁과 F₁ 각 5개체와 대조군으로 P₂ 5개체에서 SCAR 분석을 진행하였고, 증폭된 band의 크기를 확인하여 저항성 특이적인 band를 추출하였다. 추출한 특이적 band는 iNtRON사의 MEGAquick-spin™ Total Fragment DNA Purification Kit를 이용하여 elution을 진행하였다. 수율을 높이기 위하여 P₁과 F₁에서 증폭된 band는 하나의 1.5ml tube에 gel을 2개(약 100~200mg)씩 넣어 BNL buffer에 녹였고, 총 10개의 gel을 녹였다. 이 용액을 2개의 kit column에 20여초씩, 여러 번 centrifuge 하여 한 꺼번

코드번호	D-05
------	------

에 추출하는 방법으로 진행하였다. Elution은 kit의 BNL buffer를 1.0% gel 100mg 당 300ul 넣은 뒤 55°C heat block에 10분간 heating 처리하였고 처리 중 2~3분마다 vortex해서 gel을 완전히 녹여주었다. 녹은 용액은 kit의 column tube에 옮겨 1분간 10000rpm으로 centrifuge처리 후 2ml tube에 걸러진 용액을 제거했다. 그 후 kit의 washing buffer를 700ul 넣고 12000rpm으로 2분 centrifuge 하여 washing하는 과정을 2회 반복하고 2분간 12000rpm으로 centrifuge하여 건조시켰다. 건조된 column은 새 1.5ml tube에 끼우고 filter의 가운데에 elution buffer를 25~35ul 넣어 3분간 상온에 반응시킨 후 12000rpm에 1분 centrifuge하여 DNA를 추출하였다.

㊤ 추출한 band의 DNA 분리 및 cloning

Ligation에는 PROMEGA 사의 pGem-T easy vector와 T4 ligase 및 2× ligase buffer를 이용하였다. 위 실험에서 elution으로 추출한 DNA는 새로운 1.5ml tube에 농도가 100~200ng가 되게 3ul~8ul씩 분주한 후 각 DNA 당 pGem-T easy vector 1ul, 2× buffer 5~10ul, T4 ligase 1ul의 조성을 갖는 mixture를 만들어 분주하여 총 10~20ul의 volume을 만들고 4°C에 overnight하여 ligation을 진행하였다. Transformation은 life technologies사의 *E. coli* (*Escherichia coli*) DH10β에 CaCl₂ 처리를 하여 competent cell을 직접 제조한 후, competent cell에 transformation하였다. Transformation 과정은 다음과 같다. -80°C에 보관된 competent cell을 ice bucket에서 3분 정도 천천히 녹인 후 살짝 녹은 competent cell에 ligation된 DNA를 10ul 모두 첨가하여 tapping, ice bucket에 30분 배양한 후 42°C heat block으로 90초 heat shock 처리했다. 처리 후 ice bucket에 옮겨 5분간 배양하고 LB liquid broth 200ul를 첨가하여 37°C shaking incubator에서 60분 배양했다. 배양이 끝나기 전 ampicillin이 50mg/L 농도로 첨가된 고체 LB배지에 40mg/L 농도의 X-gal 용액을 40ul씩 분주해 spreading했고 배양이 끝난 *E. coli* cell을 그 위에 100ul씩 분주해 spreading하여 37°C incubator에 12~16시간 배양하여 콜로니를 확인했다. 선명한 white colony는 X-gal을 이용하여 재검정을 하였다. Plasmid DNA를 추출하는 방법은 다음과 같다. X-gal로 재검정하고 선명한 white colony를 ampicillin이 50mg/L 농도로 첨가된 5ml LB 액체배지에 넣어 37°C incubator에서 12~16시간 배양하여 iNtRON사의 DNA-spin™ Plasmid DNA Purification Kit를 이용, plasmid DNA를 추출하였다. Kit의 세부 과정은, 먼저 2ml tube에 배양액을 옮겨 12,000 rpm에서 2분 centrifuge하여 pellet을 만들었다. 그 후 상등액을 버리고 plasmid kit의 Resuspension buffer를 250ul 넣어 vortex로 섞고 1분 배양, Lysis buffer를 250ul 넣고 5회 invert 후 3분 배양, Neutralization buffer를 350ul 넣고 invert하여 용액의 보라색이 사라지고 투명해지는 것을 확인한 후 ice에서 5분 배양한 용액을 12,000 rpm에서 5분 centrifuge 처리하였다. 원심분리된 용액의 상등액을 column tube에 옮긴 후 12,000 rpm에서 1분 centrifuge하여 걸러내고 Wash solution 700ul을 넣어 12,000 rpm에서 1분간 washing하였다. Washing이 끝난 용액은 제거하고 12,000 rpm에서 2분 centrifuge하여 column을 완전히 건조시킨 후 1.5ml tube로 column을 옮겨 elution buffer를 30ul 첨가하고 2분 반응시켰다. 반응이 끝난 용액은 12,000 rpm에서 1분 centrifuge 처리하여 plasmid DNA를 추출하였다. 추출한 plasmid DNA는 마크로젠 사에 sequencing 분석 의뢰를 보내 sequence를 얻었다.

③ 결과 및 고찰

㉞ Sequence 분석결과를 토대로 SCAR primer 제작 및 SCAR 마커 검정

SCAR primer 6개(OPL8-SCAR, OPL11-SCAR, OPA4-SCAR, OPA11-SCAR, OPA12-SCAR, OPA18-SCAR)를(Table 13) 흰가루병 저항성 PE12 line과 흰가루병 감수성 PE85 line 및 PE12 × PE85 F₁ 개체에 적용한 결과(Fig. 8), OPL11-SCAR 과 OPA18-SCAR 은 흰가루병 감수성 PE85 line에서 band를 증폭했고, OPL8-SCAR, OPA4-SCAR, OPA11-SCAR, OPA12-SCAR는 흰가루병 저항성 PE12 line과 PE12 × PE85 F₁ 개체에서만 예상한 크기의 밴드를 증폭하고 동시에 흰가루병 감수성 PE85 line에서는 밴드를 증폭하지 않았기에 SCAR 마커로의 전환을 성공한 것으로 보였다. 따라서 이 4개의 SCAR 마커를 cloning하여 sequencing한 결과(Fig. 9), OPA4-SCAR의 350bp 위치의 'T'염기가 'C'로 바뀐 점 외에 다른 SCAR 마커의 sequence는 RAPD 마커의 sequence와 동일하였다. 따라서 NCBI BLAST에서 상동성을 검색하여 RAPD 분석과 동일한 결과를 얻었다(Fig. 10).

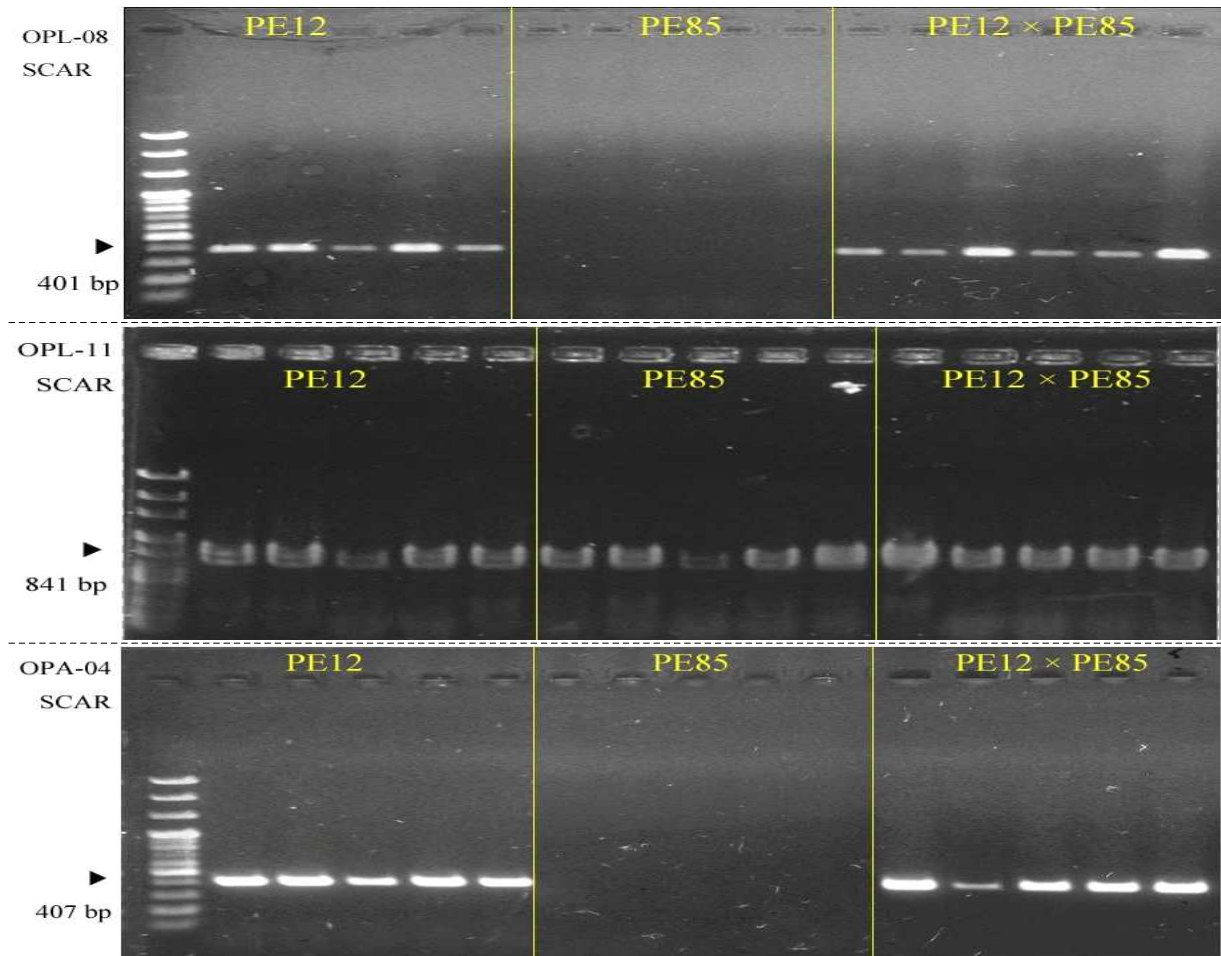


Fig. 8. PCR analysis of developed SCAR primers.

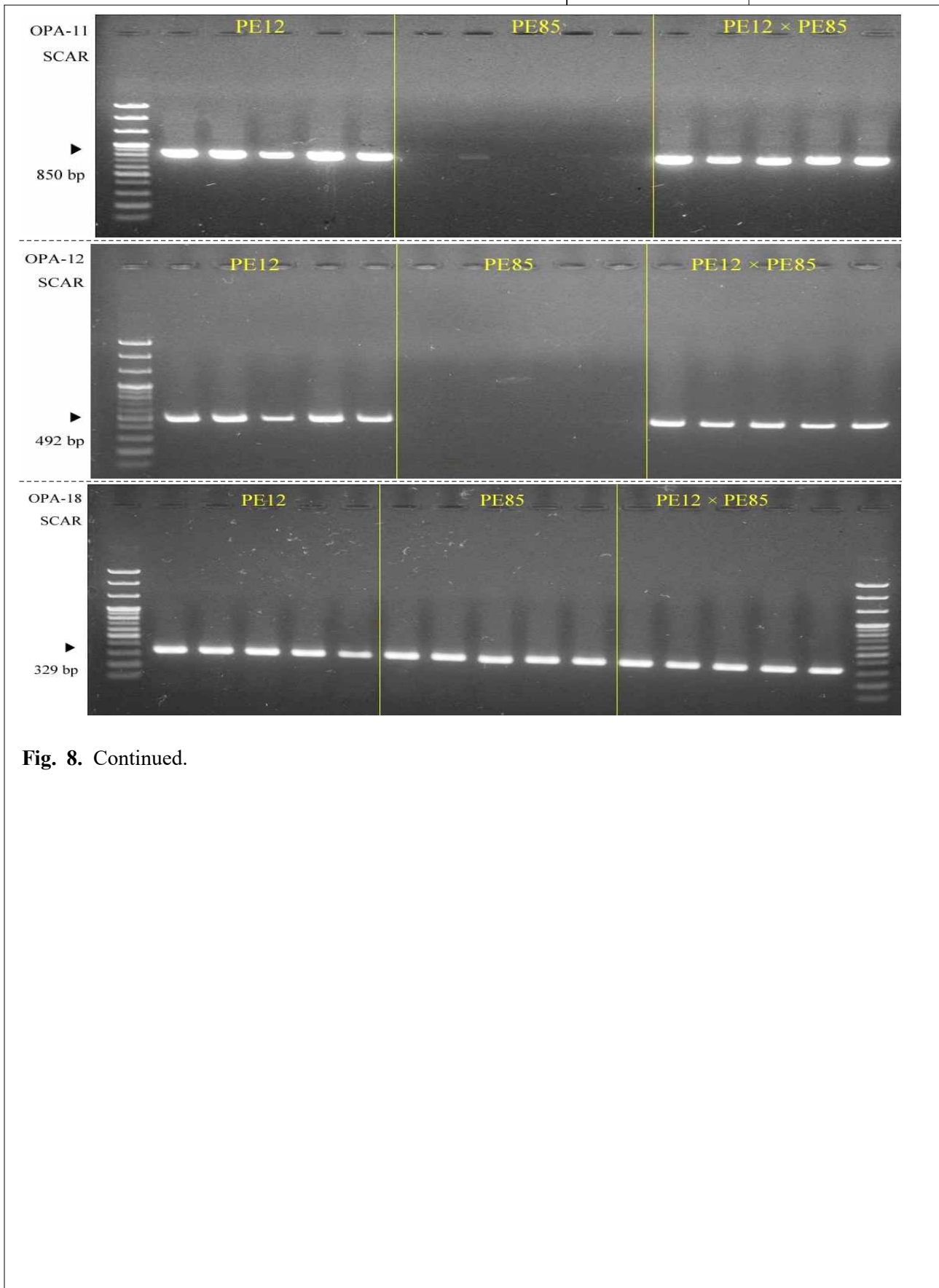


Fig. 8. Continued.

<p>AGCAGGTGGA TTGTGAGATA CTAC ATCGATTGGAGAGAAGAACGGTAACTCTTTATCGTTTCACT TCACCATTTGAAGTTAATTCTTCATTGATTTTGGGAAATTT TTTCATGTGACTGAATGTTTTTTCTTTCACGAATCCTACA ATACAAAATAAATTCAGTGACATCAGTCATCACGAGGGCCC GCCGTTAGCTTTCTGGATTTGGTGATGGACGTAAATGCTTT CCATCTCTGTGAGATGCAAACTGATTATGTTTTGATAAA CTATTTGCTTTCAACGGGGTCTGAAAGCTCCATGGCTTCG ATGACAAATGAAGACTCTTCATGAATATCACAGTACTTTGT GGAGAACTGTGAGCTCTATTCTCATAA A CACTTCCTGC TCCACCTGCT</p> <p style="text-align: center;">OPL-08</p>	<p>AATCGGGCTG GAATAGCTCA GTT GGTTAGAGCGTGTGGCTGTTAACCACAAGGTCGGAGGTTTC AACCCCTCCTTCTAGCGTACCCTCTTATCTTCTTGTTC AATAACACAAAGTTAAGTGTGGACAAGGCTGGAATAACT AACTCAAATGACATGAGTTGAATAACAAAAAATGACAT GAAAGAAACCCGTCCTTAGGCTGACATGAATCACAGAAT CACAACTTGGACCTGGACCTCCTAGACAGACATCTACAAG GTCATGTTTAGATAACACAAATACTTTTTCTCTGAGGGAA GTTTTCTCTTGTTTAATGATTCATATAACTGCTTTAACA TGCCTCTCCGAGTAGCCCAAAGCAACAATAGAGGAAAATAA CTC A CTCTTGGCAG CAGCCCCATT</p> <p style="text-align: center;">OPA-04</p>
<p>CAATCGCCGT CTTTTATTC ACA CGAGATTGTTTTTCTCTGCAGAGGCTGCTCGCTAAGTACG GTTCCCTGATCTCAGTGAACCTCCATTCTGTTCATC TATCTTGTGGCCAGCCCATCAAATCTTCTGCAAAAGGAAG CAAGAAGAAGCGTTGATTTACGATTCGAGATAGCTCGAAA AGTAGTTTTAACTGTGTAAAATAGAGGATTTTCCCTGATA CTTTGTTGGGTTAGCAAAGGTACAGAACTTTTTGAACTGAT AGGTTTTCTTCCGCCCGAATGAAGTCAACCCGAGGAAA CAGAAGAGTTAATCACAGGAGAGTCGCCGAACACATGGTGC AGTAATTGACTTGTGTGATTTGTTAAGTTATATGCGGATTTG TTCATCATATTTTCAAGTGGTTTTCTTCTTTTCTTAGCCAT GAATCTTTGTGTTGTGTTCTTTTCTTCCGACATACGCAAA TGATTAGAAAATTGACAGGGTCTTAAACCAAGTTTGGTGTT TCACTTTTTAATTTTTTAGAAATTTTTTAGAATAATATATA TACAGTAGCAAACTCAGAGGCAGAATCGTATGATTTGGGT TTGAGTAGCGAATTTCAAGGCTGAATCGAATGATTTGGGTT TGAGTAGCAAATTTCAAGAACATAACGGGCTAAAGAGAACA ATATCTACAACCTGATGGGTCTTAGTAGCAAATGGGCTTAAG TGAACGATCGTTGGGCTGAAGAGCAAATTTTGGACTGAC GATGATACGTAATAGGCTAAAGCGGATAATATCTACGATTG GGGGGTTTGAATGAATAGCAAATCGT A AAGCTAGCTA ACGGCGATTG</p> <p style="text-align: center;">OPA-11</p>	<p>TCGGCGATAG CTTACGTGAATATGAATAAGGCCAATAAAGAAGATATGTG GTTCCCTGACTCGGGATGTAGGATTCATATGTGTGGGAAG AAGGAATATTTTTTCAAGATTTTGTGGAAGTTTCAAGATT CAGTGAAGCTGGGAACCAACTCAAGCATGGATGTAACCGG AAAGGTAATGTACAGTTGGCAGTGAATGGAATCATAATG ATAATTACAGGAGTGTCTATGTGCCAGACTTGAGGAACA ATTTGTTGACTAGTGGTAAATTGCAAGCAGAGGGGTTAC CTTTTTGTTTCAAATGGATCATGCAAGGTGTTTTCATCCT GAGAGAGGCTTAATCATGGAGACAAAGATGTCTTTGAATC GAATGTTGATTTGCATGCTATATCTCAGCCTGTAGTAGA CACTCAAACCTCAATAGAACTTATGGGGAGAAGTGGTTCA AGGTCTCTGTCATACACTCACCCCTCAATTC CTATCGCCGA</p> <p style="text-align: center;">OPA-12</p>

Fig. 9. Sequencing results of selected powdery mildew resistant specific polymorphic bands.

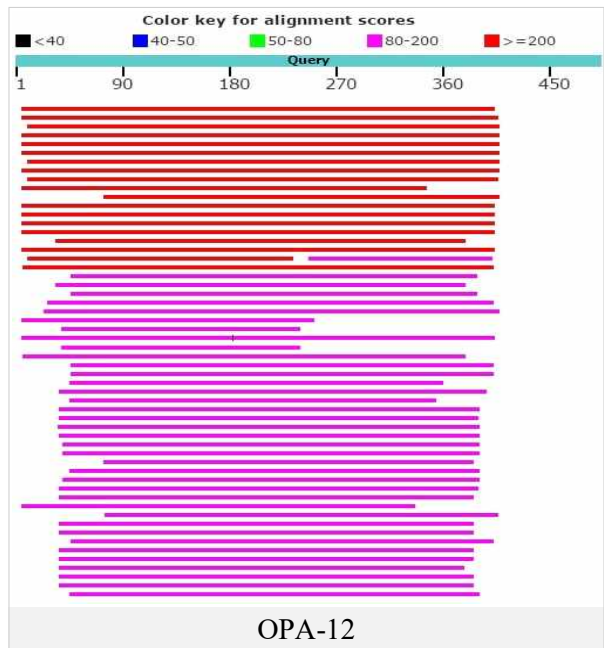
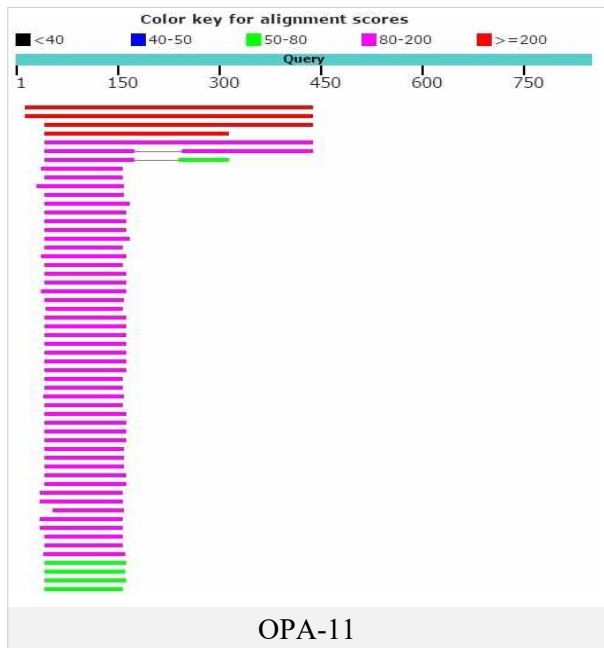
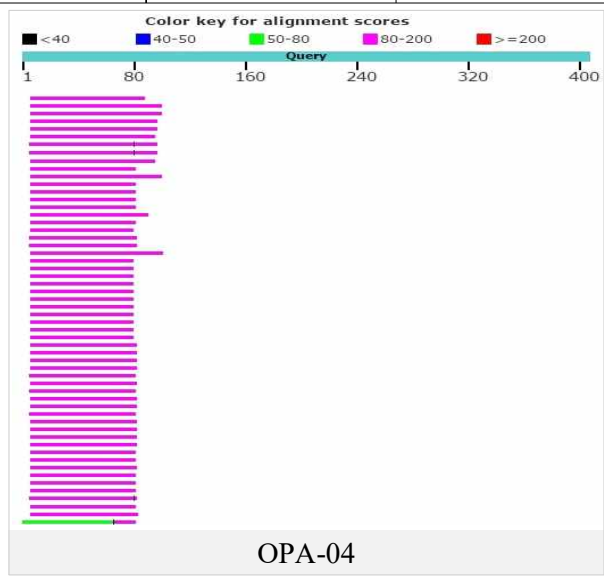
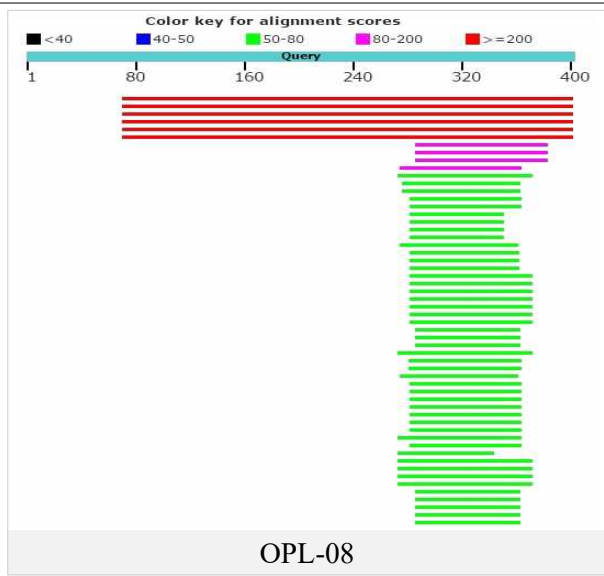


Fig. 10. Blast analysis of selected powdery mildew resistance specific polymorphic bands.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Cucumis melo genomic chromosome, chr_6	289	289	50%	6e-74	74%	LN713260.1
Cucumis melo genomic scaffold_anchoredscaffold00023	289	289	50%	6e-74	74%	LN681857.1
PREDICTED: Cucumis melo translocon-associated protein subunit beta (LOC103491721), transcript variant X1, mRNA	277	277	46%	4e-70	75%	XM_008451782.2
PREDICTED: Cucumis sativus translocon-associated protein subunit beta (LOC101222897), transcript variant X1, mRNA	233	233	31%	4e-57	78%	XM_004145647.2
PREDICTED: Cucumis melo translocon-associated protein subunit beta (LOC103491721), transcript variant X2, mRNA	179	179	46%	8e-41	69%	XM_008451783.2
PREDICTED: Cucumis melo translocon-associated protein subunit beta (LOC103491721), transcript variant X3, mRNA	167	276	38%	5e-37	88%	XM_017045315.1
PREDICTED: Cucumis sativus translocon-associated protein subunit beta (LOC101222897), transcript variant X2, mRNA	161	238	24%	2e-35	87%	XM_004145648.2
Theobroma cacao genome assembly, chromosome: IV	113	113	14%	1e-20	80%	LT594791.1
PREDICTED: Theobroma cacao translocon-associated protein subunit beta (LOC18601094), mRNA	104	104	13%	5e-18	80%	XM_007031915.2
Vitis vinifera, whole genome shotgun sequence, contig VV78X094068.6, clone ENTAV.115	100	100	15%	6e-17	77%	AM480871.1
PREDICTED: Pyrus x bretschneideri translocon-associated protein subunit beta-like (LOC103936092), mRNA	98.7	98.7	13%	2e-16	78%	XM_009345923.2
PREDICTED: Pyrus x bretschneideri translocon-associated protein subunit beta-like (LOC103966569), mRNA	98.7	98.7	14%	2e-16	77%	XM_009379741.2
PREDICTED: Malus x domestica translocon-associated protein subunit beta-like (LOC103411111), mRNA	98.7	98.7	14%	2e-16	78%	XM_008349768.2
PREDICTED: Malus x domestica translocon-associated protein subunit beta-like (LOC103411294), partial mRNA	98.7	98.7	14%	2e-16	78%	XM_008349935.2
PREDICTED: Malus x domestica translocon-associated protein subunit beta-like (LOC103442096), mRNA	98.7	98.7	14%	2e-16	78%	XM_008380845.2
PREDICTED: Malus x domestica translocon-associated protein subunit beta-like (LOC103404166), mRNA	98.7	98.7	14%	2e-16	77%	XM_008343054.2
PREDICTED: Prunus mume translocon-associated protein subunit beta (LOC103330283), mRNA	95.1	95.1	13%	3e-15	78%	XM_008232826.2
Medicago truncatula translocon-associated protein beta family-like protein mRNA	95.1	95.1	14%	3e-15	77%	XM_013594003.1
Prunus persica hypothetical protein (PRUPE_ppa010572mg), mRNA, complete cds	95.1	95.1	13%	3e-15	78%	XM_007215821.1
Glycine max uncharacterized LOC100500066 (LOC100500066), mRNA	95.1	95.1	14%	3e-15	78%	NM_001249413.2
Soybean clone JCVI-FLGm-5A14 unknown mRNA	95.1	95.1	14%	3e-15	78%	BT090744.1
Medicago truncatula clone mth2-27f3, complete sequence	95.1	95.1	14%	3e-15	77%	AC133780.33
PREDICTED: Vitis vinifera translocon-associated protein subunit beta (LOC100241257), mRNA	93.3	93.3	13%	9e-15	78%	XM_002274489.4
Monus notabilis Translocon-associated protein subunit beta partial mRNA	93.3	93.3	13%	9e-15	78%	XM_010097756.1
Glycine max strain Williams 82 clone GM_WBb0113B18, complete sequence	93.3	93.3	14%	9e-15	77%	AC235385.1
Medicago truncatula translocon-associated protein beta family-like protein mRNA	91.5	91.5	14%	3e-14	77%	XM_003624411.2
PREDICTED: Cicer arietinum translocon-associated protein subunit beta (LOC101504771), mRNA	91.5	91.5	14%	3e-14	77%	XM_004492950.2
Glycine max uncharacterized LOC100306406 (LOC100306406), mRNA	91.5	91.5	14%	3e-14	77%	NM_001251422.2
Medicago truncatula clone JCVI-FLMt-4I16 unknown mRNA	91.5	91.5	14%	3e-14	77%	BT144107.1
Soybean clone JCVI-FLGm-4J11 unknown mRNA	91.5	91.5	14%	3e-14	77%	BT090488.1

OPA-11

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Cucumis melo genomic chromosome, chr_12	86.0	86.0	24%	5e-13	84%	LN713266.1
Cucumis melo genomic scaffold_anchoredscaffold00004	86.0	86.0	24%	5e-13	84%	LN681928.1
PREDICTED: Cucumis sativus serine carboxypeptidase-like 51 (LOC101220744), mRNA	66.2	66.2	17%	4e-07	85%	XM_004139414.2
PREDICTED: Cucumis melo serine carboxypeptidase-like 51 (LOC103500527), mRNA	62.6	62.6	17%	5e-06	83%	XM_008463871.2
Ascaris lumbricoides genome assembly A_lumbricoides_Ecuador_v1_5_4_scaffold ALUE_scaffold0000255	50.0	50.0	9%	0.035	94%	LK872111.1
PREDICTED: Jatropha curcas serine carboxypeptidase-like 51 (LOC105627989), mRNA	48.2	48.2	17%	0.12	78%	XM_012209274.1
Soboliphyme baturini genome assembly S_baturini_Dall_Island_scaffold SBAD_scaffold0001458	48.2	48.2	16%	0.12	80%	LM014978.1
PREDICTED: Juglans regia serine carboxypeptidase-like 51 (LOC109000659), mRNA	46.4	46.4	15%	0.42	80%	XM_018977612.1
Plasmodium gaboni hypothetical protein partial mRNA	46.4	46.4	14%	0.42	86%	XM_018783720.1
PREDICTED: Cimex lectularius calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1 (LOC106667176), transcript variant X2, mRNA	46.4	46.4	12%	0.42	86%	XM_014394934.1
PREDICTED: Cimex lectularius calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1 (LOC106667176), transcript variant X1, mRNA	46.4	46.4	12%	0.42	86%	XM_014394932.1
Plasmodium reichenowi conserved Plasmodium protein, unknown function partial mRNA	46.4	46.4	14%	0.42	86%	XM_012905480.1
Mycoplasma yeastii GM274B	46.4	46.4	8%	0.42	96%	CP007520.1
Trichobilharzia regenti genome assembly T_regenti_v1_0_4_scaffold TRE_scaffold0050525	46.4	92.7	7%	0.42	100%	LL051252.1
PREDICTED: Glycine max serine carboxypeptidase-like 51 (LOC100794318), mRNA	46.4	46.4	15%	0.42	80%	XM_003543396.2
Xenopus laevis DNA_BAC clone: XLB1-297110, complete sequence	46.4	46.4	10%	0.42	89%	AF013021.1
Soybean clone JCVI-FLGm-26J21 unknown mRNA	46.4	46.4	15%	0.42	80%	BT098347.1
Plasmodium falciparum_3D7 conserved Plasmodium protein (PFB0235w), mRNA, complete cds	46.4	46.4	14%	0.42	86%	XM_001349527.1
Mus musculus chromosome 3, clone RP24-527P22, complete sequence	46.4	46.4	10%	0.42	89%	AC119163.23
Plasmodium berghai strain SP11_RLL genome assembly, chromosome: 12	44.6	44.6	11%	1.5	89%	LT608276.1
Plasmodium berghai strain SP11_Antwerpcl1 genome assembly, chromosome: 12	44.6	44.6	11%	1.5	89%	LT608260.1
Plasmodium berghai strain NK65e genome assembly, chromosome: 12	44.6	44.6	11%	1.5	89%	LT614638.1
Plasmodium berghai strain NK65_nv genome assembly, chromosome: 12	44.6	44.6	11%	1.5	89%	LT608148.1
Plasmodium berghai strain K173 genome assembly, chromosome: 12	44.6	44.6	11%	1.5	89%	LT160032.1
Hymenolepis diminuta genome assembly H_diminuta_Denmark_scaffold HDID_contig0000073	44.6	44.6	9%	1.5	94%	LM383662.1
Parastrongyloides trichosuri genome assembly P_trichosuri_KNP_scaffold PTRK_scaffold0000014	44.6	44.6	8%	1.5	93%	LM523171.1
Plasmodium berghai ANKA genome assembly PBANKA01_chromosome : 12	44.6	44.6	11%	1.5	89%	LK023127.1
Medicago truncatula chromosome 5 clone mth2-174I6, COMPLETE SEQUENCE	44.6	44.6	15%	1.5	80%	CU469562.1

OPA-18

Fig. 10. Continued.

(2) 호박 바이러스 저항성 계통 개체들을 이용한 RAPD 및 SCAR 마커 개발 및 분석

(가) 바이러스 저항성 관련 RAPD 마커 개발

① 목적

호박 바이러스 저항성 관련 분자마커 개발을 위해 병 저항성 및 감수성 형질을 가진 계통을 선발하고 RAPD 실험을 수행하였다. 해당 실험을 통해 바이러스 저항성 관련 분자마커를 개발하고 line 별 개체간 유연관계를 밝히며 이를 바탕으로 SCAR 마커로의 전환을 위한 특이적 band 선발을 위함이다.

② 재료 및 방법

㉞ 호박 바이러스 저항성 관련 식물재료 DNA 추출

호박 바이러스 저항성 분자마커를 위한 실험재료로서 선발된 바이러스 저항성 SP213-4 line과 바이러스 감수성 SP203-6 line 및 SP213-7 × SP203-4 F₁ line, SS39-1 F₂ line 그리고 SS37-9 × SP203 BC₁ line 종자들을 제1세부과제(홍익바이오)로부터 제공받았다 (Table 1). 제공받은 종자들은 경희대학교 온실에 파종하여 본엽이 2~3매 정도 출현할 시기에 sampling 하였다(Fig. 1).

Table 1. Squash materials for development of molecular markers related to virus resistance.

Sample	P ₁ (FVR)	P ₂ (FVS)	F ₁	F ₂	BC ₁
			SP213-7		SS39-7
Line	SP213-1	SP203-6	×	SS39-1	×
			SP203-4		SP203

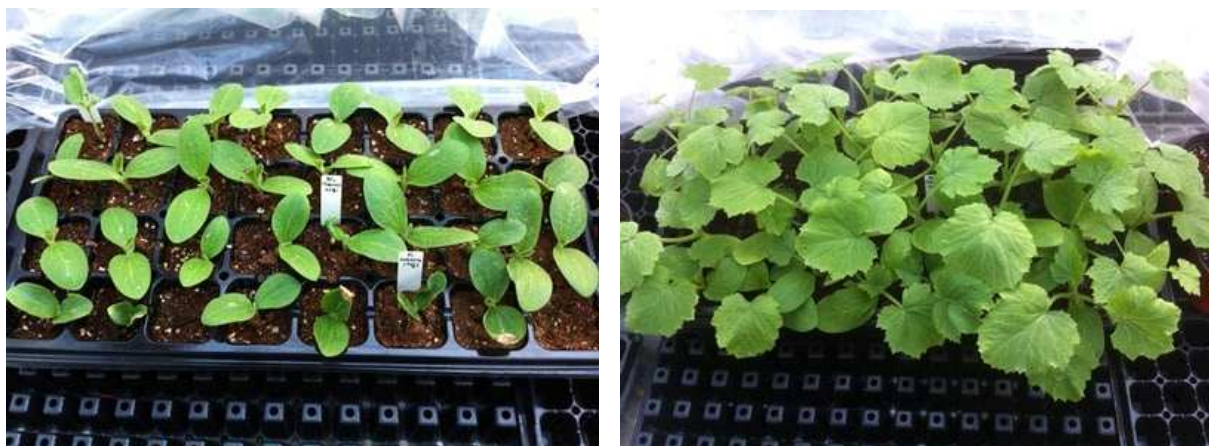


Fig. 1. Squash materials cultivated in the greenhouse in KyungHee Univ.

㉔ 바이러스 저항성 관련 RAPD 마커 개발

본 실험에는 바이러스 저항성 SP213-1 line과 바이러스 감수성 SP203-6 line 및 SP213-7 × SP203-4 F₁ line, SS39-1 F₂ line, SS39-7 × SP203 BC₁ line 종자를 이용하였다. 이 종자들을 경희대학교 온실에서 파종하여 본엽이 2~3매 정도 전개된 유묘기에 sampling해 사용하였으며 사용된 개체는 각각 바이러스 저항성 4개체, 감수성 3개체, F₁ line 4개체, SS39-1 F₂ line 2개체, BC₁ line 3개체이다. RAPD는 OPERON random primer 80개(Table 2)를 이용해 실험을 진행하였다. PCR 반응조건은 i-Taq polymerase를 이용하여 94℃에서 3분 pre-denature 후 94℃에서 1분, 37℃에서 1분, 72℃에서 1분을 1 cycle로 총 40회 반복하고 72℃에서 10분간 처리 후 반응을 종료하였다. 반응결과를 확인하기 위하여 1.5% agarose gel에서 전기영동 하였다.

Table 2. Random Primers tested for SP213-1, SP203-7, SP213-7×SP203-4 F₁ lines, SS39-1 F₂ lines, and SS39-7×SP203 BC₁ lines.

Primer	Nucleotide sequence (5' to 3')
OPA-01	CAG GCC CTT C
OPA-02	TGC CGA GCT G
OPA-03	AGT CAG CCA C
OPA-04	AAT CGG GCT G
OPA-05	AGG GGT CTT G
OPA-06	GGT CCC TGA C
OPA-07	GAA ACG GGT G
OPA-08	GTG ACG TAG G
OPA-09	GGG TAA CGC C
OPA-10	GTG ATC GCA G
OPA-11	CAA TCG CCG T
OPA-12	TCG GCG ATA G
OPA-13	CAG CAC CCA C
OPA-14	TCT GTG CTG G
OPA-15	TTC CGA ACC C
OPA-16	AGC CAG CGA A
OPA-17	GAC CGC TTG T
OPA-18	AGG TGA CCG T
OPA-19	CAA ACG TCG G
OPA-20	GTT GCG ATC C
OPL-01	GGC ATG ACC T
OPL-02	TGG GCG TCA A
OPL-03	CCA GCA GCT T
OPL-04	GAC TGC ACA C
OPL-05	ACG CAG GCA C
OPL-06	GAG GGA AGA G
OPL-07	AGG CGG GAA C
OPL-08	AGC AGG TGG A
OPL-09	TGC GAG AGT C
OPL-10	TGG GAG ATG G
OPL-11	ACG ATG AGC C
OPL-12	GGG CGG TAC T

Table 2. Continued.

Primer	Nucleotide sequence (5' to 3')
OPL-13	ACC GCC TGC T
OPL-14	GTG ACA GGC T
OPL-15	AAG AGA GGG G
OPL-16	AGG TTG CAG G
OPL-17	AGC CTG AGC C
OPL-18	ACC ACC CAC C
OPL-19	GAG TGG TGA C
OPL-20	TGG TGG ACC A
OPAN-01	ACT CCA CGT C
OPAN-02	CAC CGC AGT T
OPAN-03	AGC CAG GCT G
OPAN-04	GGC GTA AGT C
OPAN-05	GGG TGC AGT T
OPAN-06	GGG AAC CCG T
OPAN-07	TCG CTG CGG A
OPAN-08	AAG GCT GCT G
OPAN-09	GGG GGA GAT G
OPAN-10	CTG TGT GCT C
OPAN-11	GTC CAT GCA G
OPAN-12	AAC GGC GGT C
OPAN-13	CTT CCA GGA C
OPAN-14	AGC CGG GTA A
OPAN-15	TGA TGC CGC T
OPAN-16	GTG TCG AGT C
OPAN-17	TCA GCA CAG G
OPAN-18	TGT CCT GCG T
OPAN-19	ACC ACG CCT T
OPAN-20	GAG TCC TCA C
OPX-01	CTG GGC ACG A
OPX-02	TTC CGC CAC C
OPX-03	TGG CGC AGT G
OPX-04	CCG CTA CCG A
OPX-05	CCT TTC CCT C
OPX-06	ACG CCA GAG G
OPX-07	GAG CGA GGC T
OPX-08	CAG GGG TGG A
OPX-09	GGT CTG GTT G
OPX-10	CCC TAG ACT G
OPX-11	GGA GCC TCA G
OPX-12	TCG CCA GCC A
OPX-13	ACG GGA GCA A
OPX-14	ACA GGT GCT G
OPX-15	CAG ACA AGC C
OPX-16	CTC TGT TCG G
OPX-17	GAC ACG GAC C
OPX-18	GAC TAG GTG G
OPX-19	TGG CAA GGC A
OPX-20	CCC AGC TAG A

③ 결과 및 고찰

㉞ 호박 바이러스 저항성 관련 식물재료 DNA 추출

호박 바이러스 저항성 분자마커를 위한 실험재료로 육성된 바이러스 저항성 SP213-4 line과 바이러스 감수성 SP203-6 line 및 SP213-7 × SP203-4 F₁ line, SS39-1 F₂ line 그리고 SS37-9 × SP203 BC₁ line 개체들을 sampling 한 뒤 DNA를 추출하였다. CTAB 2.5%, 2.0M Tris-HCl(pH 8.0), 5.0M NaCl, 0.5M EDTA, 2-Mercaptoethanol로 구성된 2.5× CTAB을 이용하여 sample powder에 800 μ l을 넣어준 뒤 65°C에서 30분간 반응시켰다. 그 뒤 PCI(phenol : chloroform : isoamyl alcohol = 25 : 24 : 1)용액을 동량 넣어준 뒤 invert하여 12000rpm, 20°C, 10분간 원심분리하였다. 그 후 상층액에 1/10 volume의 3M sodium acetate(pH 8.0)와 2배 volume의 100% EtOH를 처리하여 -20°C에서 1시간 반응시켰다. 마지막으로 1시간 후 70% EtOH를 이용하여 washing한 후 pellet을 건져서 건조시켰다. 그 결과 추출된 DNA의 농도 및 순도가 RAPD 및 관련 마커 실험을 하기에 충분한 결과를 보였다(Table 3, 4, 5, 6, 7).

Table 3. DNA concentration and degree of purity of SP213-4 line.

Sample	Conc. (ng/ μ l)	A260/A280	A260/A230
P1-1	3228.00	1.82	1.97
P1-2	4509.22	1.78	1.89
P1-3	1604.16	1.86	2.03
P1-4	1720.55	1.88	1.91
P1-5	2133.49	1.83	2.12

Table 4. DNA concentration and degree of purity of SP203-6 line.

Sample	Conc. (ng/ μ l)	A260/A280	A260/A230
P2-1	3806.13	1.78	1.96
P2-2	2294.06	1.85	1.97
P2-3	2452.47	1.84	2.02
P2-4	2876.18	1.83	1.89
P2-5	4430.11	1.76	1.91

Table 5. DNA concentration and degree of purity of SP213-7 × SP203-4 F₁ line

Sample	Conc. (ng/ μ l)	A260/A280	A260/A230
F1-1	3332.67	1.77	1.89
F1-2	3347.64	1.75	1.85
F1-4	3701.72	1.79	1.86
F1-5	3584.19	1.81	1.92
F1-6	3602.12	1.78	1.89
F1-7	3500.87	1.83	1.97

Table 6. DNA concentration and degree of purity of SS39-1 F₂ line.

Sample	Conc. (ng/ μ l)	A260/A280	A260/A230
F2-1	2784.76	1.76	1.78
F2-2	3031.39	1.75	1.87
F2-3	3191.04	1.76	1.81
F2-4	2554.63	1.75	1.75
F2-5	3752.45	1.85	1.95
F2-6	2568.71	1.69	1.97
F2-7	3023.32	1.75	1.87
F2-8	3000.62	1.74	1.85
F2-9	3401.96	1.68	1.79
F2-10	3412.35	1.65	1.95
F2-11	3301.17	1.74	1.87
F2-12	2637.52	1.76	1.83
F2-13	3937.98	1.65	1.89
F2-14	2809.22	1.76	1.81
F2-15	2854.64	1.77	1.81
F2-16	2491.49	1.78	1.82
F2-17	2146.24	1.63	1.79
F2-18	3256.05	1.73	1.89
F2-19	2892.87	1.79	1.92
F2-20	2650.05	1.81	1.97
F2-21	3155.87	1.83	1.97
F2-22	2678.85	1.73	1.92
F2-23	2967.68	1.81	1.98
F2-24	3201.75	1.73	1.89
F2-25	4021.37	1.84	1.93
F2-26	4447.93	1.75	1.81
F2-27	4797.76	1.67	1.76
F2-28	4135.53	1.69	1.99
F2-29	3798.34	1.75	1.93
F2-30	4178.67	1.81	1.98
F2-31	4613.72	1.71	1.84

Table 7. DNA concentration and degree of purity of SS37-9 × SP203 BC₁ line.

Sample	Conc. (ng/ μ l)	A260/A280	A260/A230
BC1-1	2466.80	1.82	1.93
BC1-2	1921.21	1.81	1.87
BC1-3	2160.33	1.71	1.75
BC1-4	3251.90	1.77	1.77
BC1-5	3494.24	1.77	1.94
BC1-6	3119.26	1.79	1.95
BC1-7	3525.12	1.71	1.93
BC1-8	3539.34	1.77	2.02
BC1-9	3251.76	1.81	2.04
BC1-10	3613.29	1.71	1.87
BC1-11	3104.24	1.78	1.95
BC1-12	2954.04	1.81	1.97
BC1-13	3546.41	1.77	1.92
BC1-14	3984.45	1.82	1.98
BC1-15	2135.48	1.67	1.87

㊤ 바이러스 저항성 관련 RAPD 마커 개발

바이러스 저항성 SP213-1 line과 바이러스 감수성 SP203-6 line 및 SP213-7 × SP203-4 F₁ line, SS39-1 F₂ line, SS39-7 X SP203 BC₁ line을 이용한 RAPD 실험을 진행하였다. 본 RAPD 실험 결과 80개 random primer에 따른 개체별 다형성을 확인하였다(Fig. 2). 또한 차후 SCAR로 전환 가능성이 있는 저항성과 감수성에 특이적인 band가 나타나는 14개의 primer를 확인하였다(Fig. 3).

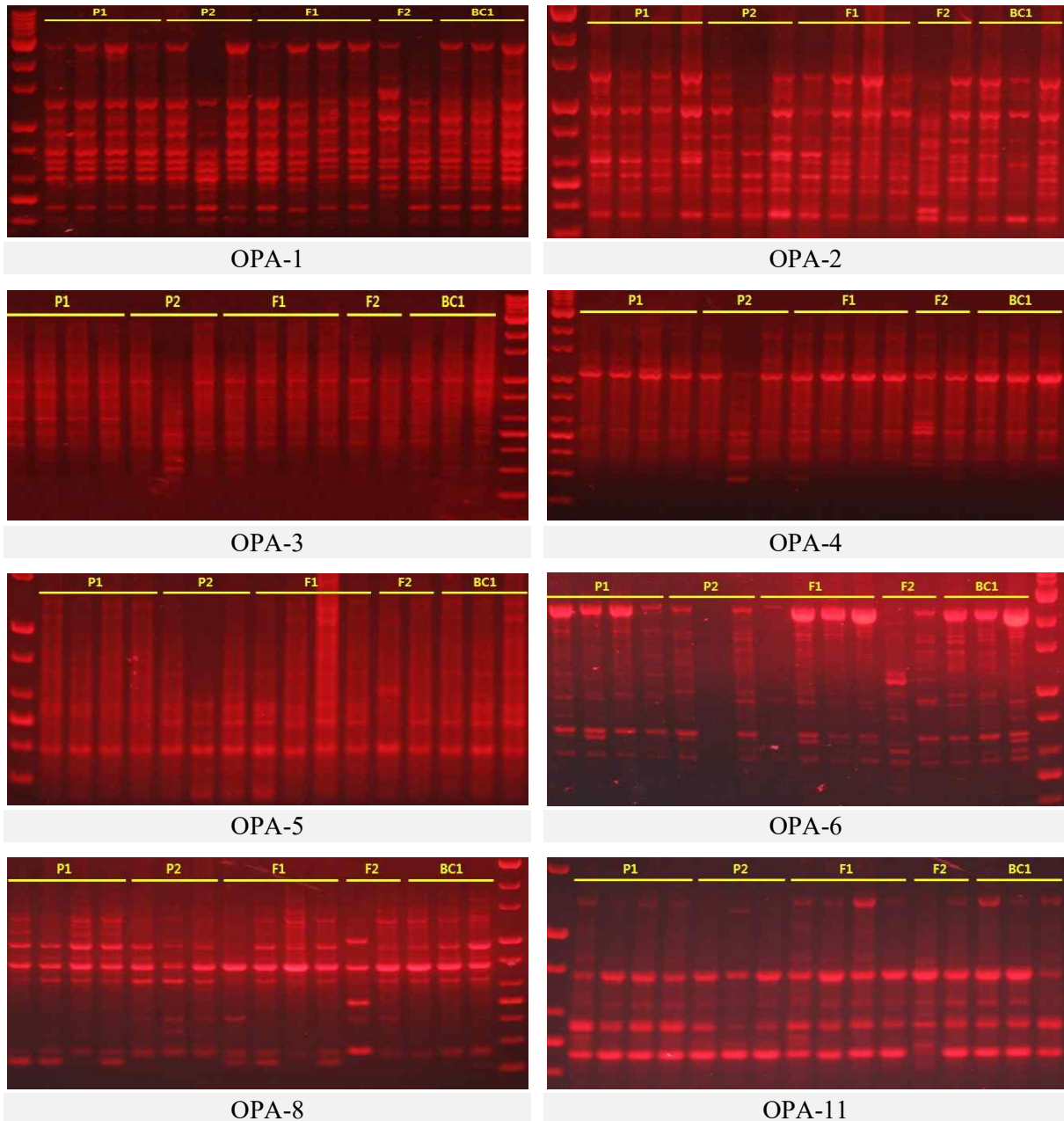
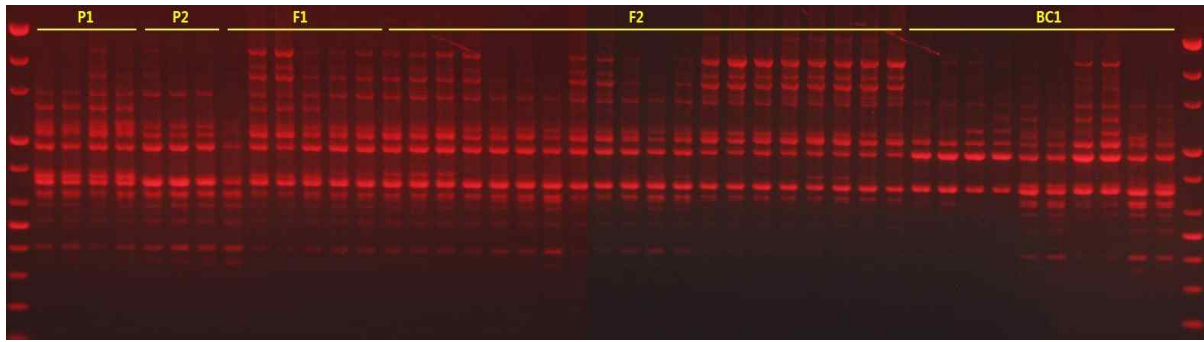
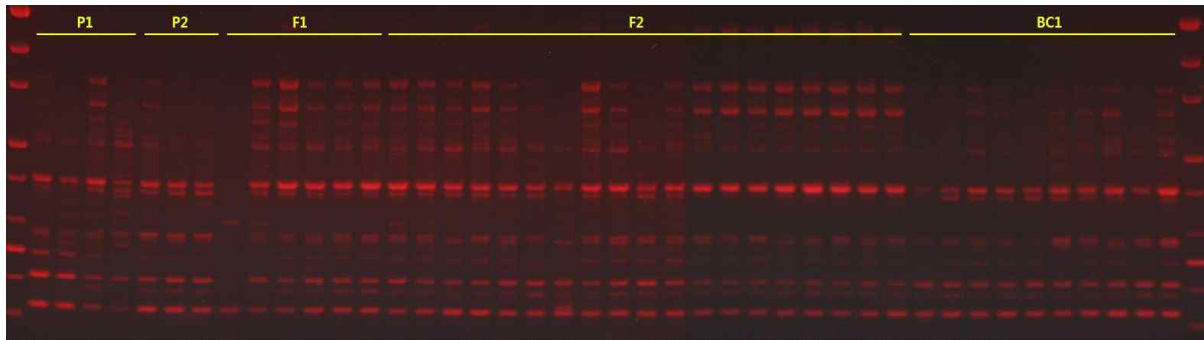


Fig. 2. RAPD results from SP213-1, SP203-7, SP213-7×SP203-4 F₁ lines, SS39-1 F₂ lines, and SS39-7×SP203 BC₁ lines using different random primers.

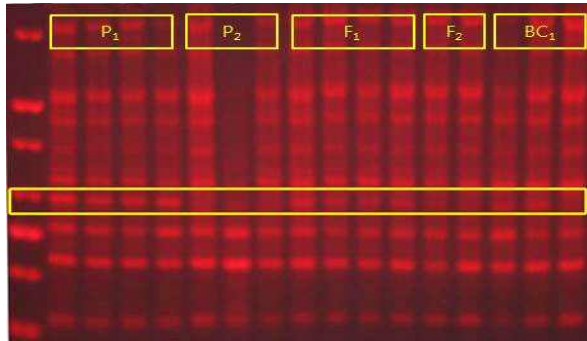


OPX-19

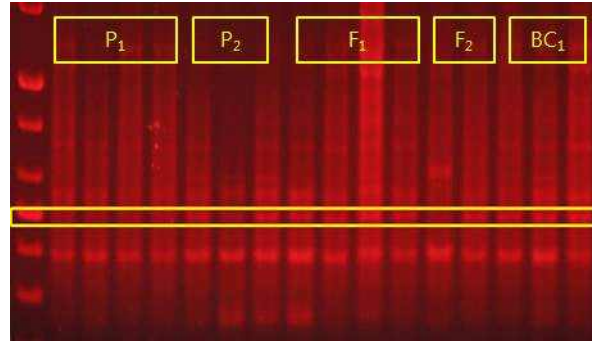


OPX-20

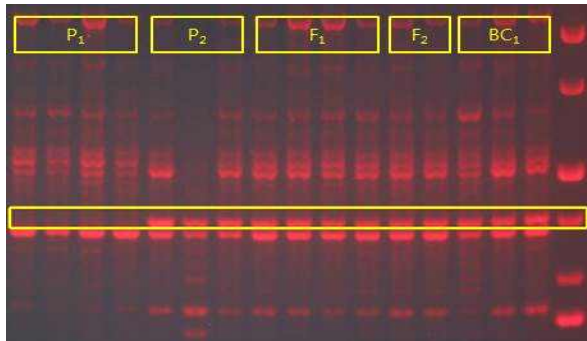
Fig. 2. Continued.



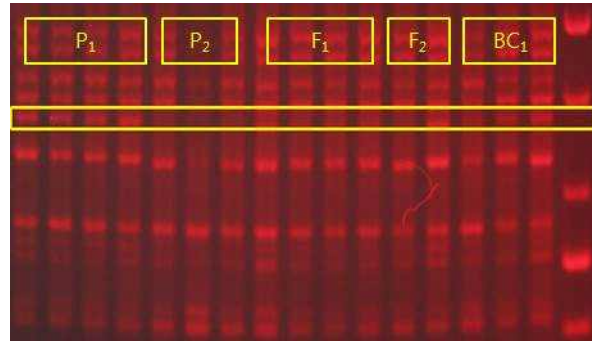
OPA-3



OPA-5

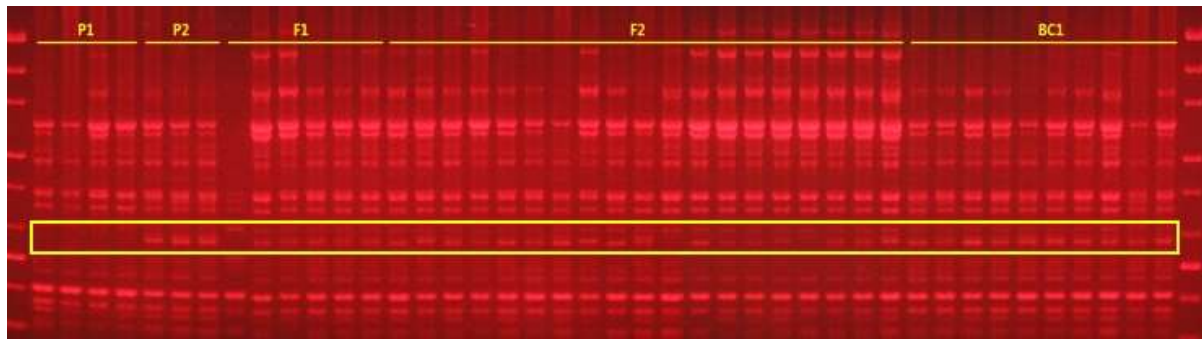


OPA-20

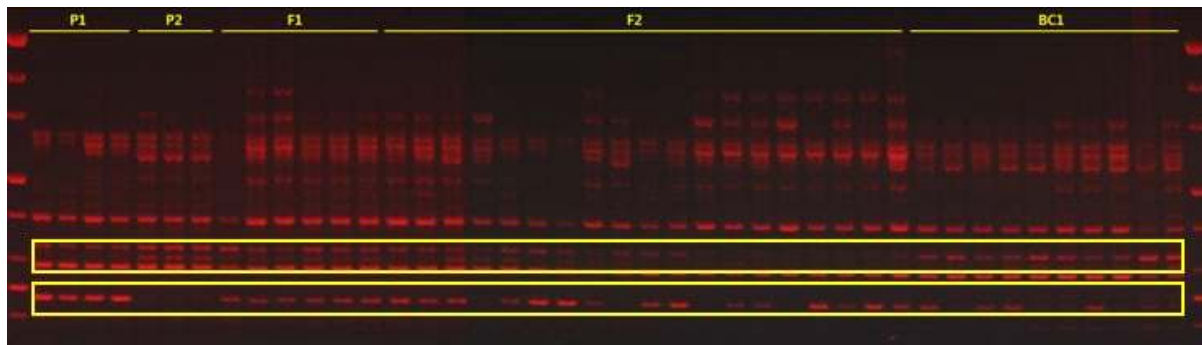


OPL-5

Fig. 3. RAPD showing specific polymorphism between virus resistance and susceptible materials.



OPAN-14



OPL-19

Fig. 3. Continued.

㊤ RAPD 실험 결과를 바탕으로 한 개체별 유연관계 분석

바이러스 저항성 SP213-1 line과 바이러스 감수성 SP203-6 line 및 SP213-7 × SP203-4 F₁ line, SS39-1 F₂ line, SS39-7 X SP203 BC₁ line을 이용하여 수행한 RAPD 실험을 분석하였다. 바이러스 저항성 4개체와 바이러스 감수성 3개체, F₁ 6개체, F₂ 19개체, BC₁ 10개체에 대하여 OPERON random primer 32개를 사용하여 수행한 결과값이 가장 신뢰도가 있었기에 이를 이용하였다. NTSYSpc 2.1 프로그램을 이용하여 개체별 유연관계를 확인하기 위한 UPGMA 방법에 따른 dendrogram을 작성하였으며, 유연관계 결과를 바탕으로 선발된 개체군간의 특이적 band를 선발하였다.

바이러스 저항성 SP213-1 line과 바이러스 감수성 SP203-6 line 및 SP213-7 × SP203-4 F₁ line, SS39-1 F₂ line, SS39-7 X SP203 BC₁ line에 대하여 OPERON random primer 32개를 이용하여 수행한 RAPD 결과 총 28개의 primer에서 다형성을 확인할 수 있었으며, 개체 간 유전적 유사도가 평균 58%의 값을 가지는 것을 확인하였다(Table 8).

Table 8. Genetic similarity and polymorphism from RAPD markers related to Virus resistance.

No. of accession analyzed	No. of polymorphic / total band	Percent of polymorphism (%)	GS AVG (min-max)
28 / 32	48 / 320	15 %	0.58 (0.42 - 0.98)

이러한 결과를 바탕으로 NTSYSpc 2.1 program을 이용하여 UPGMA 방법에 따른 dendrogram을 작성하였다. 바이러스 저항성 SP213-1 line과 바이러스 감수성 SP203-6 line 및 SP213-7 × SP203-4 F₁ line, SS39-1 F₂ line, SS39-7 X SP203 BC₁ line 전체 개체에 대한 dendrogram을 작성한 결과 바이러스 저항성 SP213-1 line과 바이러스 감수성 SP203-6 line에 대하여 90%이상의 높은 유전적 유사도를 확인할 수 있었으나, F₁, F₂ 및 BC₁ line 개체들과의 유연관계를 확인하는데 어려움이 있었다(Fig. 4). 이러한 이유로 우선 개체별 분리가 많이 일어날 수 있는 F₂ line을 제외한 바이러스 저항성 SP213-1 line과 바이러스 감수성 SP203-6 line 및 SP213-7 × SP203-4 F₁ line, SS39-7 X SP203 BC₁ line에 대한 dendrogram을 다시 작성하였다. 그 결과 위와 동일하게 바이러스 저항성 SP213-1 line에서는 약 92%, 바이러스 감수성 SP203-6 line에서는 약 95%의 높은 유전적 유사도를 확인할 수 있었으며, F₁ line의 경우 F₁-1 개체를 제외한 나머지 개체들이 바이러스 감수성 SP203-6 line 과 다소 높은 유전적 유사도를 보이며, BC₁ line 또한 바이러스 감수성 SP203-6 line 과 다소 높은 유전적 유사도를 보이는 것을 확인하였다. 이들 line들은 모두 같은 그룹을 형성하여 line 별 분리가 되는 결과를 볼 수 있었으므로 RAPD 결과에 대한 신뢰도를 확인할 수 있었다(Fig. 5).

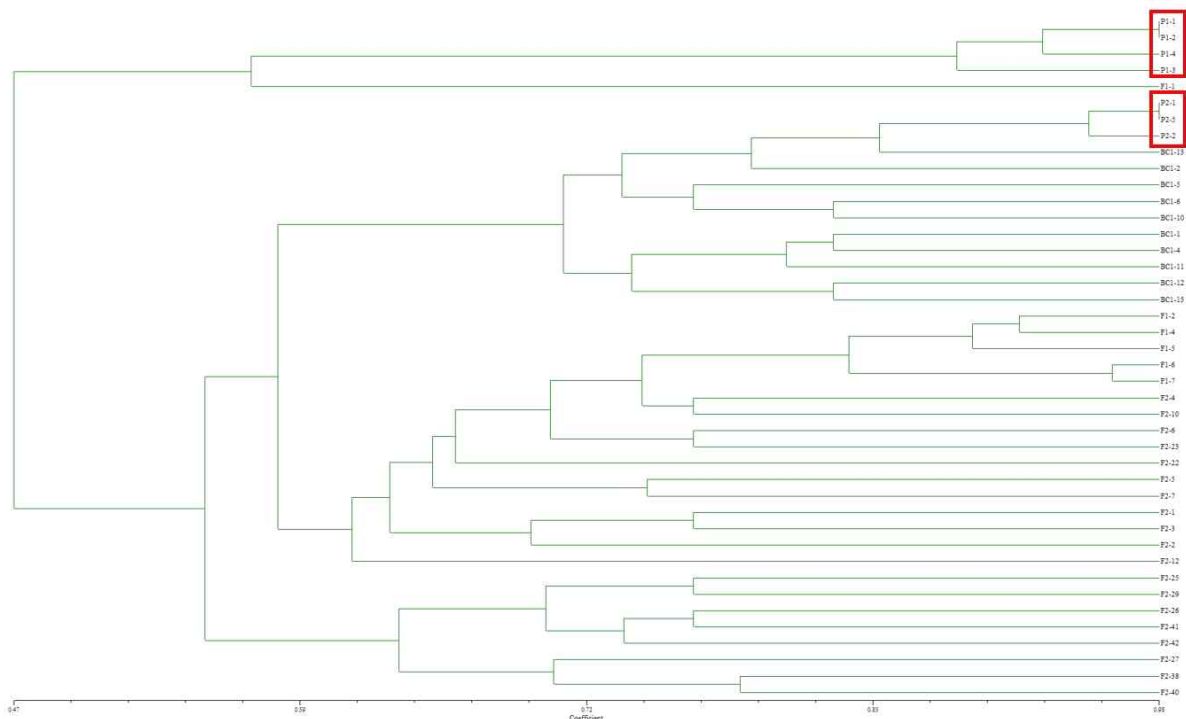


Fig. 4. Cluster dendrogram based on RAPD results for SP213-1, SP203-7, SP213-7 × SP203-4 F₁ lines, SS39-1 F₂ lines, and SS39-7×SP203 BC₁ lines.

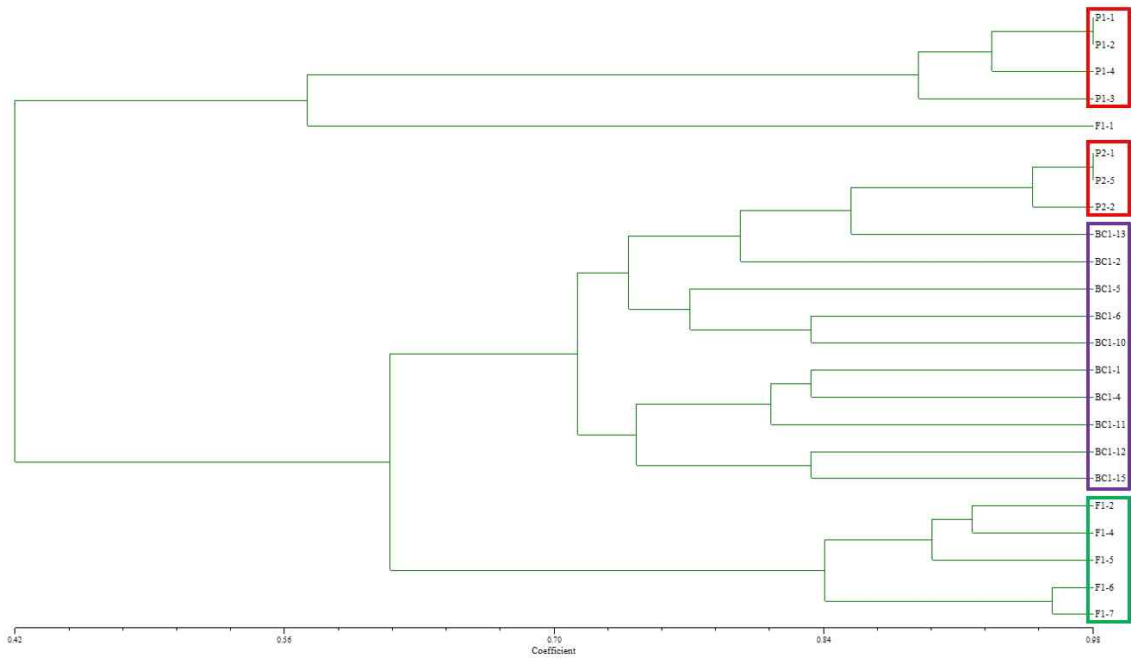


Fig. 5. Cluster dendrogram based on RAPD results for SP213-1, SP203-7, SP213-7 × SP203-4 F₁ lines and SS39-7×SP203 BC₁ lines.

위의 결과를 바탕으로 바이러스 저항성 SP213-1 line과 바이러스 감수성 SP203-6 line 및 SS39-7 X SP203 BC₁ line 간의 유연관계를 보다 확실히 확인하기 위하여 다시 한 번 dendrogram을 통해 확인하였다(Fig. 6). 동일하게 바이러스 저항성 SP213-1 line과 바이러스 감수성 SP203-6 line에서 높은 유전적 유사도로 그룹이 형성되는 것을 확인할 수 있었으며, BC₁ line의 경우 바이러스 감수성 SP203-6 line과 75% 이상의 유전적 유사도를 보여주고 있기에 이들 개체들을 활용하여 특이적 마커를 선발하기로 하였다.

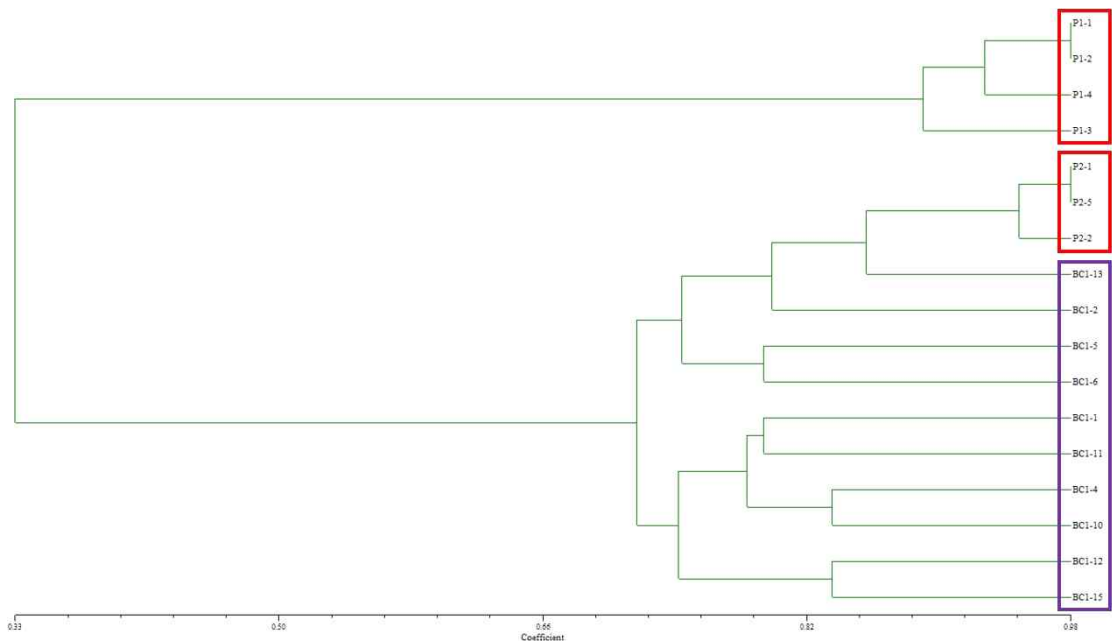


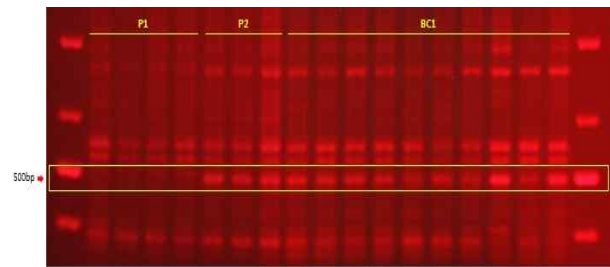
Fig. 6. Cluster dendrogram based on RAPD results for SP213-1, SP203-7 and SS39-7 × SP203 BC₁ lines.

㉔ RAPD 실험 결과를 바탕으로 한 특이적 primer 선발

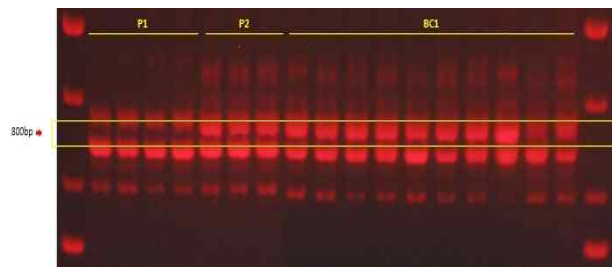
바이러스 저항성 SP213-1 line과 바이러스 감수성 SP203-6 line 및 SP213-7 × SP203-4 F₁ line, SS39-1 F₂ line, SS39-7 × SP203 BC₁ line에 대하여 OPERON random primer 32개를 이용하여 수행한 RAPD 결과에 대하여 공시재료를 이용한 RAPD 검정을 하기 위한 1차 특이적 primer를 선발하였다. 앞선 결과에서 기술한 바이러스 저항성 SP213-1 line과 바이러스 감수성 SP203-6 line 및 SS39-7 × SP203 BC₁ line 간 특이적인 band를 선발하였다. 저항성 특이적 2 band, 감수성 특이적 6 band를 선발하였으며, 이는 7개의 random primer를 이용한 결과이다(Table 9). 이들 primer를 이용한 RAPD 실험에서 선발된 8개의 특이적인 band를 1차적으로 적용하여 바이러스 저항성 마커를 선발할 예정이며, 차후 SCAR 마커로의 전환을 준비 하였다(Fig. 7).

Table 9. Development of 8 specific RAPD markers related to WMV, ZYMV resistances in SP213-1, SP203-7 and SS39-7 × SP203 BC₁ lines.

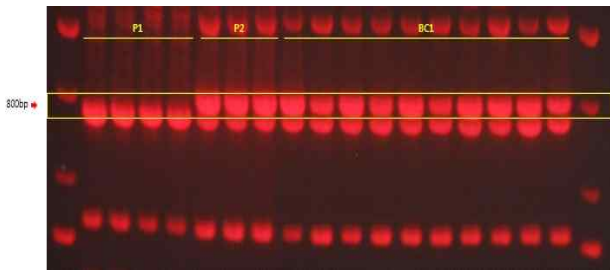
Primer	Sequence	Primer	Sequence
[Specific for WMV and ZYMV resistant SP213-1 line]			
OPL-19	GAG TGG TGA C	OPX-19	TGG CAA GGC A
[Specific for WMV and ZYMV susceptible SP203-7 and SS39-7 × SP203 BC ₁ lines]			
OPA-5	AGG GGT CTT G	OPA-10	GTG ATC GCA G
OPA-20	GTT GCG ATC C	OPL-19	GAG TGG TGA C
OPX-7	GAG CGA GGC T	OPAN-14	AGC CGG GTA A



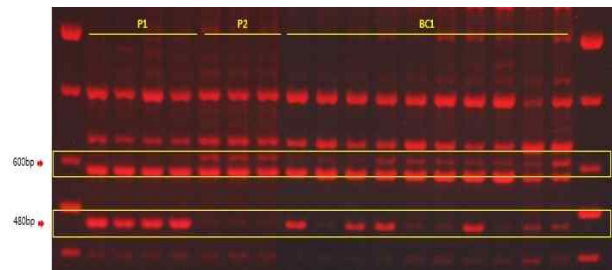
OPA-5



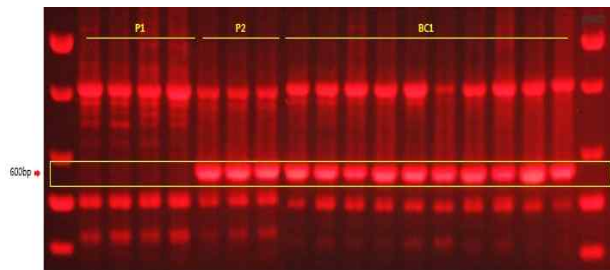
OPA-10



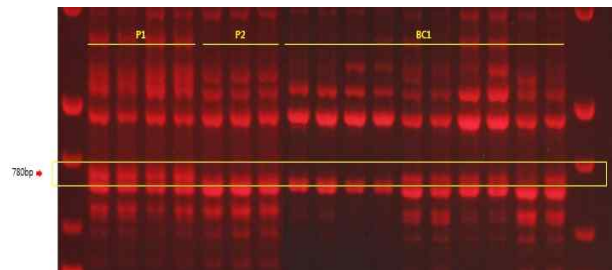
OPA-20



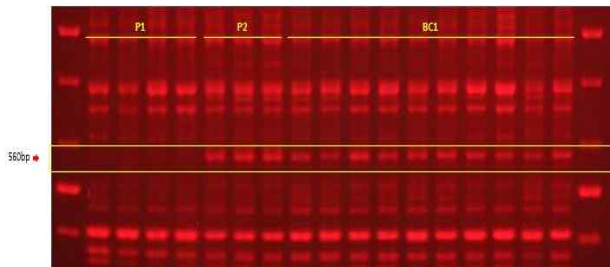
OPL-19



OPX-7



OPX-19



OPAN-14

Fig. 7. RAPD showing specific polymorphisms for SP213-1, SP203-6, and SS39-7 x SP203 BC₁ lines.

(2) 개발된 RAPD 분자마커를 이용한 SCAR 마커로의 전환**(가) 바이러스 저항성 관련 개발된 RAPD 분자마커의 SCAR 마커로의 전환****① 목적**

본 실험은 호박 바이러스 저항성 관련 분자마커 개발을 위해 수행한 RAPD 분석 결과를 바탕으로 저항성 특이적으로 선발한 band들을 이용, SCAR 마커로 전환하여 정확한 저항성 개체의 선발 및 Marker Assisted Selection(MAS)에 이용하기 위하여 수행하였다.

② 재료 및 방법**㉠ 바이러스 저항성 관련 특이적 band 추출**

2012년 9월 제공받은 바이러스 저항성 SP213-1 line과 바이러스 감수성 SP203-6 line 및 SP213-7 × SP203-4 F₁ line을 이용해 수행한 RAPD 분석에서 선발한 OPERON random primer 5개를 이용하여 P₁, P₂, F₁ 각 1개체에 RAPD 분석을 진행하였고, 나타난 band의 size를 확인하여 특이적인 band를 추출하였다. 추출한 gel은 iNtRON사의 MEGAquick-spin™ Total Fragment DNA Purification Kit를 이용하여 Elution을 진행하였다. Elution은 Kit의 BNL buffer를 600ul 넣은 뒤 55°C heat block에 10분 처리하였고 처리 중 2~3분마다 vortex 해서 gel을 완전히 녹여주었다. 녹은 용액은 kit의 column tube에 옮겨 1분간 12000 rpm으로 centrifuge처리 후 2ml tube에 걸러진 용액을 제거했다. 그 후 kit의 washing buffer를 700ul 넣고 12000rpm으로 2분 centrifuge 하여 washing하는 과정을 2회 반복하고 2분 12000rpm으로 centrifuge하여 건조시켰다. 건조된 column은 새 1.5ml tube에 끼우고 filter의 가운데에 elution buffer를 20ul 넣어 3분간 상온에 반응시킨 후 12000rpm에 1분 centrifuge하여 DNA를 분리하였다.

㉡ 추출한 band의 DNA 분리 및 cloning

위의 실험에서 추출한 DNA는 pGem-T easy vector에 ligation하여 *E. coli* DH10β competent cell에 transformation한 후 X-gal을 이용하여 colony를 선발하였다. ligation에는 PROMEGA 사의 pGem-T easy vector와 T4 ligase 및 2× ligase buffer를 이용하였다. Elution으로 추출한 DNA 새 1.5ml tube에 3ul씩 분주한 후 각 DNA 당 pGem-T easy vector 1ul, 2X buffer 5ul, T4 ligase 1ul의 조성을 갖는 mixture를 만들어 분주하여 총 10ul의 volume을 만들고 4°C에 overnight하여 ligation을 진행하였다. Transformation은 -80°C에 보관된 competent cell을 ice bucket에서 천천히 녹인 후 살짝 녹은 competent cell에 ligation된 DNA를 10ul 모두 첨가하여 tapping, ice bucket에 30분 배양한 후 42°C heat block으로 90초 heat shock 처리했다. 처리 후 ice bucket에 옮겨 5분간 배양하고 LB liquid broth 200ul를 첨가하여 37°C shaking incubator에서 60분 배양했다. 배양이 끝나기 전 ampicilin이 50mg/L 농도로 첨가된 고체 LB배지에 X-gal 용액을 40ul씩 분주해 spreading했고 배양이 끝난 *E.coli* cell을 그 위에 100ul씩 분주해 spreading하여 37°C incubator에 12~16시간 배양하여 콜로니를 확인했다. 선발한 white colony는 X-gal을 이용하여 재검정을 한 후 5ml LB 배지에 넣어 3

7°C incubator에서 12~16시간 배양하여 BIO BASIC CANADA INC.의 EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Kit를 이용, plasmid DNA를 추출하였다. Plasmid DNA는 다음과 같이 추출하였는데 먼저 1.5ml tube에 배양액을 옮겨 12,000 rpm에서 2분 centrifuge하여 pellet을 만들었다. 그 후 상등액을 버리고 plasmid kit의 solution I을 100ul 넣어 vortex로 섞고 1분 배양, solution II를 200ul 넣고 5회 invert 후 1분 배양, solution III을 350ul 넣고 tapping하여 1분 배양한 용액을 12,000 rpm에서 5분 centrifuge 처리 하였다. 나뉜 용액의 상등액을 column tube에 옮긴 후 10,000 rpm에서 2분 centrifuge하여 걸러내고 Wash solution 750ul을 넣어 10,000 rpm에서 2분간 washing하는 과정을 2번 반복하였다. Washing이 끝난 용액은 제거하고 10,000 rpm에서 2분 centrifuge하여 column을 완전히 건조시킨 후 1.5ml tube로 column을 옮겨 elution buffer를 50ul 첨가하고 2분 반응시켰다. 반응이 끝난 용액은 10,000 rpm에서 2분 centrifuge 처리하여 plasmid DNA를 추출하였다. 추출한 plasmid DNA는 마크로젠 사에 sequencing 분석 의뢰를 보내 sequence를 얻었다.

㉔ Sequence 분석을 통한 SCAR primer 제작 및 검증

얻어낸 sequence에서 RAPD primer의 염기서열을 기준으로 증폭된 band의 DNA가 제대로 들어 있는지 size를 확인하였고 확인한 sequence 정보는 NCBI blast를 통해 유전자 분석을 진행했다. 그 후 확인한 sequence를 바탕으로 SCAR primer를 제작하였다. SCAR primer는 RAPD primer의 염기서열 10개가 포함되도록 디자인하여 20~25 base size로 제작하였고 제작에는 Life technologies 사에서 제공하는 OligoPerfect™ designer program을 이용하였다. 제작한 primer는 바이러스 저항성 SP213-1 line과 바이러스 감수성 SP203-6 line 및 SP213-7 × SP203-4 F₁ line의 개체들에 적용해 검증하였다.

① 결과 및 고찰

㉔ 바이러스 저항성 관련 특이적 band 추출

2012년 9월 제공받은 바이러스 저항성 SP213-1 line과 바이러스 감수성 SP203-6 line 및 SP213-7 × SP203-4 F₁ line을 이용해 수행한 RAPD 분석에서 선발한 OPERON random primer 5개를 이용하여 P₁, P₂, F₁ 각 1개체에 RAPD 분석을 진행하였고, 나타난 band의 size를 확인하여 특이적인 band를 추출하였다(Fig. 1). 추출한 gel은 iNtRON사의 MEGAquick-spin™ Total Fragment DNA Purification Kit를 이용하여 elution을 진행, DNA를 분리하였다(Table 1). 그러나 분리결과 대부분의 DNA의 농도가 좋지 않아서 분리에 사용하는 band 수를 늘려 농도를 높이는 식으로 방법을 수정해서 진행할 계획이다.

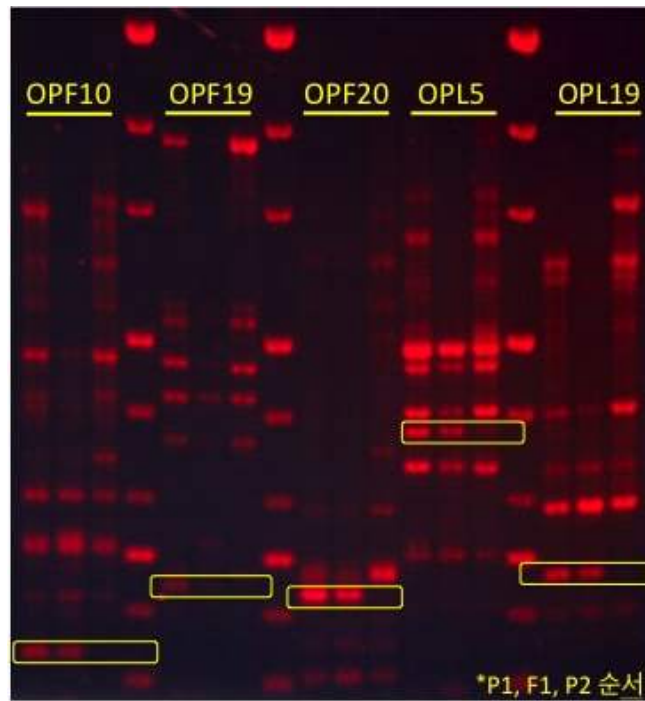


Fig. 1. RAPD analysis of SP213-1, SP203-7, and SP213-7 × SP203-4 F₁ line.

Table 1. DNA concentration and degree of purity of SP213-1 P₁ and SP213-7×SP203-4 F₁ line.

Sample	Conc. (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
OPF10-P ₁	9.52	1.62	0.38
OPF10-F ₁	7.97	1.63	0.19
OPF19-P ₁	5.80	1.78	0.02
OPF19-F ₁	4.77	1.69	0.21
OPF20-P ₁	9.08	1.52	0.55
OPF20-F ₁	5.08	1.36	0.28
OPL5-P ₁	8.32	1.84	0.49
OPL5-F ₁	10.04	1.66	0.03
OPL19-P ₁	20.61	2.01	0.10
OPL19-F ₁	12.65	3.68	0.14

㉔ 추출한 band의 DNA 분리 및 cloning

위의 실험에서 추출한 DNA는 pGem-T easy vector에 ligation하여 *E. coli* DH10β competent cell에 transformation한 후 X-gal을 이용하여 colony를 선발하였다. 선발한 white colony는 X-gal을 이용하여 재검정을 한 후(Fig. 2) 5ml LB 배지에 넣어 37°C incubator에서 12~16시간 배양하여 BIO BASIC CANADA INC.의 EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Kit를 이용, plasmid DNA를 추출하였다. 추출한 plasmid DNA는 마크로젠 사에 sequencing 분석 의뢰를 보내 sequence 정보를 확보하였다. OPL19 primer를 제외한 나머지 primer에서 추출한 DNA들은 sequencing 결과가 좋지 않았는데, 이는 DNA 농도가 낮아서 transformation이 잘 안되었기 때문일 것으로 예상된다.

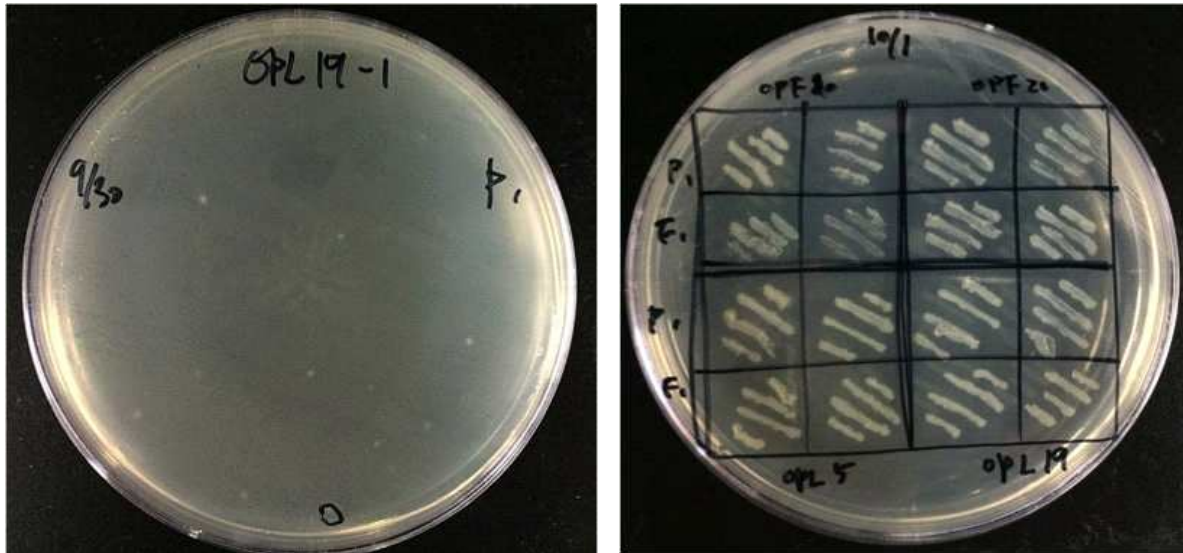


Fig. 2. Colonies with RAPD products from transformed *E. coli* cells.

㉔ Sequence 분석을 통한 SCAR primer 제작 및 검정

위의 실험을 통해 얻어낸 OPL19 primer에서 추출한 band sequence에서 RAPD primer의 염기서열을 기준으로 목적하는 band의 DNA가 제대로 들어 있는지 size와 sequence 일치 정보를 확인하였고(Fig. 3) 확인한 sequence 정보는 NCBI blast를 통해 유전자 분석을 진행하였다(Fig. 4). 분석 결과 크게 일치하는 자료는 없었으나 알려지지 않은 유전자이거나 유전자 주변의 intron 부분일 수 있기 때문에 확인한 sequence를 바탕으로 VirSq-1로 명명한 SCAR primer를 제작하였다. SCAR primer는 RAPD primer의 염기서열 10개가 포함되도록 디자인하여 20~25 base size로 제작하였고 제작에는 Life technologies사에서 제공하는 OligoPerfect™ Designer program을 이용하였다(Fig 5). 제작한 primer는 바이러스 저항성 SP213-1 line과 바이러스 감수성 SP203-6 line 및 SP213-7 × SP203-4 F₁ line의 개체들에 적용해 검정하였다(Fig. 6). 검정 결과 예상보다 조금 큰 size에서 band가 발견되었는데 저항성뿐만 아니라 모든 개체에서 발견되었기 때문에 band 추출 시 잘못된 DNA가 추출되었거나, ligation 과정에서 원하는 DNA가 아닌 목적 band 근처의 다른 DNA가 ligation 되었을 가능성이 있다. 따라서 SCAR를 통해 증폭된 band를 다시 추출하여 sequencing 후 primer 제작에 사용했던 sequence와 비교 및 확인할 예정이다. 아직 primer 제작에 이용되지 않은 다른 band들도 DNA 분리 농도를 높여서 이용할 수 있도록 수행할 계획이다.

P1-1_SP6 (1806b)

```
ACACCATGCATCAAACGCGTTGGGAGCTCCCTATGGTCGACCTGCAGGCGGGCCGG
AATTCAGTGTGAGCTCGAAAAACCCATCATAACATGGTTCTTCAAT
TTTATTGGCATTGGATGAGCACAAGTTATTTTGTAGTGTGGTCCCTGTACA
GACAATAAATATGGTACAATTCGCACAATTTGAATCAATTTGTTATATCATAATA
AAAGTTTTAATACCTAATTTAAGCTAATAAATAGATCAACTCAATCATCTTGAC
TATCTTTCTGAACCGCTACAACCCACTGGTAGCATATATTCCACTTTGGTTGT
TATGCATCTCGTCGGCCTCAGCGTTTAAAAATGTGCTTAGTCATGCAAGGAGTT
GAAGAGGTTTATTGGATTCTAGGCCAATTATGTTGTTAACACGAGCTTTGGGCTC
CAGATTACTCTAATCTACTCGCATTTTCTTAGTCTTGGAGTAATAGGGTCT
AGACCCCTTAATGTCACCACTCAATCGAATCCCGCGGGCCATGGCGGGCGGGAG
CATGGCAGCTCGGGCCAATTCGCCCTATAGTAGTGCATTTACAATCACTGGCCGT
CGTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAAACCTGGCGTTACCCCACTAATCGCCTTGCA
GCACATCCCTTTTCGCACGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCGACCGATCGCCCTT
CCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGGCCCTGTAGCGGGCCTAAGC
GGCGGGGTGGTGGTTACGGCAGCGTGACCGCTACACTTGGCAGCGCCCTAGCGC
CGCTCCTTTGCTTTTCCCTTCTTTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCGGTCAA
GCTCAAAATCGGGGGCTCCTTAGGGTTCGATTTAGTGCCTTACGGCAGCTCGACC
CAAAAAAATTTGGGCGGTAATAGGGTATGAGTGGATTTACAAAAAATTT
TAAGCCGAATTTAACAAAAATTAACCGTCCAATTTCCCTGGAAGGGGGATTTT
CTCCCTTACCCCACTTTGGCGGATTTTTCACCCGCCACGAGGGGGCACTTTGGT
GGGAAAATTTGCCGGGAACCCCTTTTGTGTTATTTTCTAAAAAATTCACA
AAATATGTTTCCGCCCTTTGAAACAAAAACCCCGGAAAAATGTCACCAAAATTT
TAAAAAAGAGGAGAAAAAGAGGGTTATTAACAATTAATCTGGTGGCCGCCACCC
CTCTCTTTCTTCGGGTTTCGCCCTCCTTTTGTGCCCCCAACACCCCGGGGG
GGAGAAAAAAGGAAAAAAGGGGGGAGAGGGGTGCAAAAAAGGGG
TCCCCCAAGGAAACAACAGGAAATTCGCCAAATCTCCCTTAATTAATAAAAAA
TATTTATATGAGGGTGGTTATAGGGGGAGAAACCCCTTGCATCGTAACCTGGTAA
```

P1-2_T7 (1580b)

```
GGGGTCCGACGTCATGGCTCCGGCCGATGGCGGGCGGGAAATTCGATTGAGTG
GTGACATTAAGAGGGTCTAGACCCCTATTACTCCAAGACTAAAGAAATAGTCGAGTAG
TTAGAATAGAGTAATCTGGAGCCAAAAGCTCGTGTAAAGCAACATAATTTGGCCTAGG
AATCCAATAAACCTCTCAACTCCTTGACATGACTAAGACACATTTTAAACCGTGA
GGCCGACGAGGATGCATAAACAACCAAGTGGATAATATAGTCCACAGTGGTTGT
AGCGGTTACAAAAAGAATAGTCAAGATGATTGAGTGTATTTATTAGCTTATAA
ATTAGGTATTAATAAATTTTATTATGATAAACAATTTGAATTTCAAAATTTGTCAGA
TTGACCATATTTATTGCTGTACAGGAAACAAACACTCAAAAAATAAACTTTGTGCT
ACATCAAAATGCCAAATAAAATGAGAACCATGTTATGATGGGTTTTCGACGTCACC
ACTCAATCACTAGTGAATTCGCCGGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCA
ACGGTGGATGCATAGTTGAGTATCTATAGTGTCACTAAATAGCTTTGGCGTAA
TCATGGTCATAGCTGTTTCCGTGTGGAATTTGTTATCCGCTCACAAATTCACACAACA
TACGAGCGGAAAGCATAAAGTGAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCA
CATTAATGGGTTGGGCTCACTGCCGCTTTCAGTGGGAAACCTGCTGGCCAGCT
GCATTAATGAATCGGCCAACGCGGGGAGAGGGGTTTGGTATTGGGCGCTTTC
CGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGGCTGGTGGTGGTGGGCGAGCGGTATCA
GCTCACTAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAAATCAGGGGATACGCGAGGAAAG
AACTGTGAGGAAAAGGCCAGAAAAGGCCAGAACCTGAAAAAGCCGGCTTGGT
GGGTTTTTCATAGGCTCCGCCCTGACGAGGATCAAAAAATTCACGCTCAAAAT
CAAAAGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGTACCAGGCGTTTCCCTGGAAA
CTCCCTCGGGGGTCTCCTGTTCAACCTCGGGCTTACCGGAACTTTGGCGGCTTTT
TCCCTTTCGGAAGAGGTTGGGCTTCTCAACTCACCCCTGAGGGGTTCCCAATCCGG
GGGGGGGGTTTCTCCAACCTGGGGTGGTGGGGAACACCCCTTATACCCGAGG
GTGGGCTTATCCGGGATATATTTTGTTCACCCGGGAGAGCAAAATTTTCC
CCTTTGGGGGGCCCTGGCACAGGATAAAAAAAGGGGGTTTGGGGGGGGGTC
CAGAAATTTTTAAATGGGGGCTACCCGGTCCCCCAAAAAAATAAATTTAT
TTTTTTGCTTTCGGGGGATCTTTTCAAAAAAATAGGGTTTTTCGGGAAAAA
ACCCCGGGGGGGGTTTTTTTGGGGAATA
```

Range 1: 1 to 465 Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
859 bits(465)	0.0	465/465(100%)	0/465(0%)	Plus/Minus
Query 1	GAGTGGTGACGTCGAAAAACCCATCATAACATGGTTCTTCAATTTTATTGGCATTGATG	60		
Sbjct 465	GAGTGGTGACGTCGAAAAACCCATCATAACATGGTTCTTCAATTTTATTGGCATTGATG	406		
Query 61	TAGCACAAGTTTATTTTGTAGTGTGTTCCCTGTACAGACAATAAATATGGTACAATC	120		
Sbjct 405	TAGCACAAGTTTATTTTGTAGTGTGTTCCCTGTACAGACAATAAATATGGTACAATC	346		
Query 121	TGCACAAATTTGAATTCAAATTTGTTTATATCATAATAAAAGTTTTTAACTAATTTATA	180		
Sbjct 345	TGCACAAATTTGAATTCAAATTTGTTTATATCATAATAAAAGTTTTTAACTAATTTATA	286		
Query 181	AGCTAATAAATAGATCAACTCAATCATCTTGACTATTCTTCTGTAACCGCTACAAACCA	240		
Sbjct 285	AGCTAATAAATAGATCAACTCAATCATCTTGACTATTCTTCTGTAACCGCTACAAACCA	226		
Query 241	CTGGTAGCATATATTACCCTTTGGTTGTTATGCATCTCGTCGGCCTCAGGTTTTTA	300		
Sbjct 225	CTGGTAGCATATATTACCCTTTGGTTGTTATGCATCTCGTCGGCCTCAGGTTTTTA	166		
Query 301	AAATGTGCTTAGTCATGTCAAGGAGTTGAAGAGGTTTATTGGATTCTAGGCCAATTTAT	360		
Sbjct 165	AAATGTGCTTAGTCATGTCAAGGAGTTGAAGAGGTTTATTGGATTCTAGGCCAATTTAT	106		
Query 361	GTTGCTTAAACACGAGCTTTGGCTCCAGATTACTTATTCTAACTACTCGACTATTTCTT	420		
Sbjct 105	GTTGCTTAAACACGAGCTTTGGCTCCAGATTACTTATTCTAACTACTCGACTATTTCTT	46		
Query 421	TAGTCTTGGAGTAATAGGGTCTAGACCCCTTAAATGTCACCACCT	465		
Sbjct 45	TAGTCTTGGAGTAATAGGGTCTAGACCCCTTAAATGTCACCACCT	1		

Fig. 3. Sequence analysis of selected virus resistance specific band.

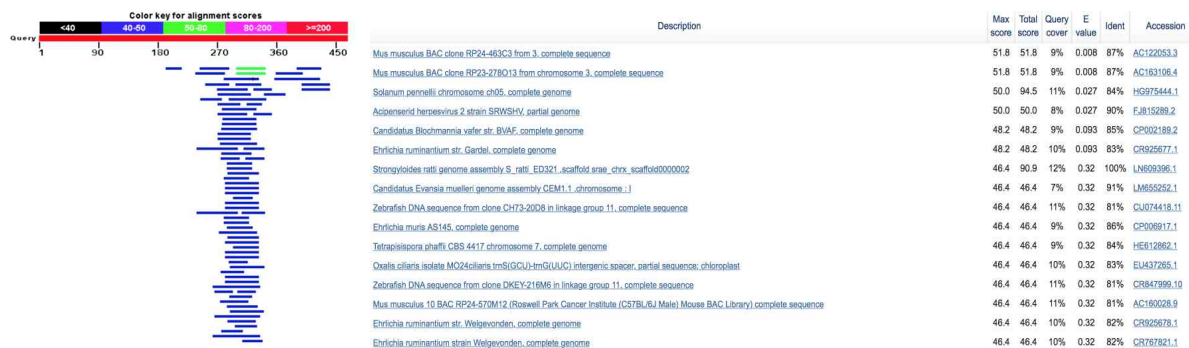


Fig. 4. Blast analysis of selected virus resistance specific band.

Sequence Name:
Sq-SCAR1

Target Sequence:

```

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90
1 GAGTGGTGACGTCGAAAAACCATCATAACATGGTCTTCAATTTATTTGGCATTGATGTAGCACAAAGTTATTTTGTAGTGTGGTTCCTGACAG
101 ACAATAAATATGGTACAATCTGCACAAATTTGAATTCATTTGTTATATCATAATAAAAGTTTTTAATACCTAATTAAGCTAATAAATAGATCAACT
201 CAATCATCTTGACTATCTTTCTGTAAACCGCTACAAACCACCTGGTAGCATATATTATCCAGTTTGGTTTGTATGCATCCTGGTCGGCCTCAGGGTTTA
301 AAATGTGCTTAGTCATGTCAAGGAGTTGAAGAGGTTTATTGGATTCCAGGCAATTAATGTGCTTAACACCGAGCTTTTGGCTCCAGATTACTCTATTC
401 TAACTACTCGACTATTECTTTAGTCTTGGAGTAATAGGGTCTAGACCCCTTAATGTCAOACCTC
    
```

Rank: 1	Product Length: 465	Product Region: 1 - 465		
Primer Name	%GC	Strand	Size (bases)	Tm (°C)
Sq-SCAR1 1 F	55.00	FWD	20	60.55
Sq-SCAR1 1 R	48.00	REV	25	59.62
5' Addition		Primer Sequence		
		GAGTGGTGACGTCGAAAAACC		
		GAGTGGTGACATTAAGAGGGTCTAG		

Highlight Target Sequence

Fig. 5 Designed SCAR primer using OligoPerfect™ program.

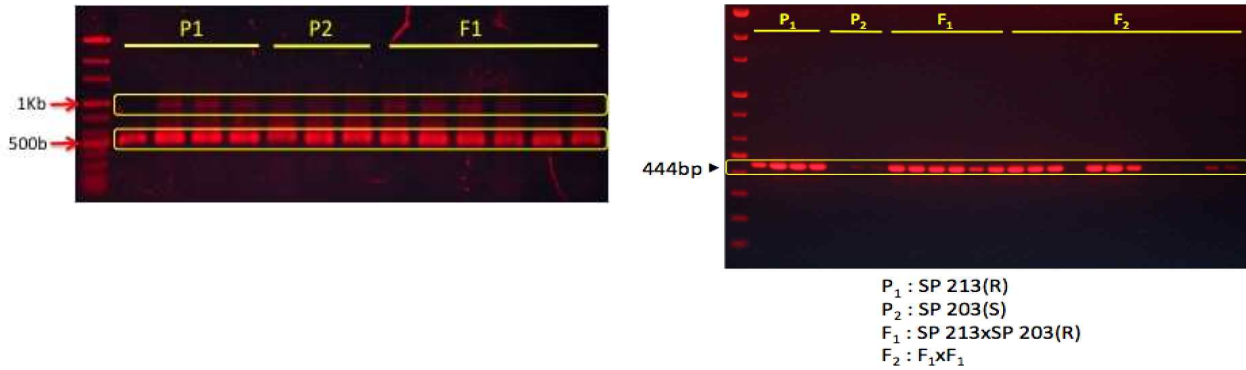


Fig. 6. PCR analysis of SCAR primer named VirSq-1.

(3) 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

(가) 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 과제의 제2협동과제 연구목표는 국내 소비량이 큰 호박을 대상으로 분자 육종 시스템을 이용한 호박의 흰가루병 및 바이러스 저항성 형질 관련 분자마커를 개발하여 복합 저항성 품종개발에 도입함으로써 생육초기단계에서 선발효율을 높여, 복합 저항성 형질을 가진 우수 품종을 육성하는데 있다. 이에 따라 2012년부터 2016년에 걸쳐 육성된 흰가루병 및 바이러스 저항성 표현형 개체와 이병성 표현형 개체를 이용한 호박 복합 저항성 형질 관련 분자마커 개발을 수행하였다. 그 결과 개체별 다형성을 확인하였고 호박 흰가루병 및 바이러스 저항성 형질 특이적 분자마커를 개발하였다. 다양한 실험 방법을 이용하여 RAPD 마커를 비롯해 SCAR, SSR 마커등을 이용한 분석을 수행하였으며, SSR 마커를 통해 저항성 관련 유전자인 bHLH143이 확인되어 차후 호박뿐만 아니라 다양한 작물에서 유전자를 이용한 심화 연구에 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

세부과제명	세부연구내용	주요결과	목표 달성도 (%)	기여도 (%)
바이러스 및 흰가루병 저항성 관련 분자마커 개발	복합 저항성 및 이병성 재료 확보	12~16년도 복합 저항성 및 이병성 표현형 계통 확보	100	100
	흰가루병 저항성 형질 관련 RAPD 및 SCAR 마커 개발	흰가루병 저항성 형질 관련 특이적 7개의 RAPD 마커 확인 및 4 SCAR 마커 전환.	100	100
	바이러스 저항성 형질 관련 RAPD 및 SCAR 마커 개발	바이러스 저항성 형질 관련 특이적 5 RAPD 마커 확인 및 1 SCAR 마커 전환.	100	100

(3) 연구개발 성과 및 성과활용 계획

(가) 연구개발 성과

호박에 주로 발병하는 바이러스 및 흰가루병으로 인해 수량 및 품질이 저하되며 방제 과정상의 시간적, 경제적 손실을 줄이기 위한 호박 바이러스 및 흰가루병 저항성 형질 관련 분자마커 개발에 있어 달성한 성과는 다음과 같다.

1. 호박을 이용한 실험 및 연구를 위한 최적의 DNA 추출 방법인 2.5X CTAB을 이용한 방법 확립
2. 흰가루병 저항성 관련 총 7개(OPL8, OPL11, OPA4, OPA6, OPA11, OPA12, 및 OPA18)의 RAPD 분자마커 개발
3. 흰가루병 저항성 특성에 관련된 7개 RAPD 마커 중에서 4개(OPL8, OPA4, OPA11, 및 OPA12)를 SCAR 마커로 전환
4. 바이러스 저항성 형질 특이적 5개 RAPD 분자마커(OPL5, OPL19, OPF10, OPF19 및 OPF20)를 이용하여 1개의 바이러스 저항성 형질 특이적 SCAR 분자마커 개발

라. 사업화성과 및 매출실적

(1) 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.4억원
			향후 3년간 매출	8억원
		관련제품	개발후 현재까지	0 억원
			향후 3년간 매출	0 억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 1 % 국외 : 0 %
			향후 3년간 매출	국내 : 15 % 국외 : 0 %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 0 % 국외 : 0 %
			향후 3년간 매출	국내 : 0 % 국외 : 0 %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		위

(2) 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	사업화 개시됨			
	소요예산(백만원)	200			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		0.4	8	15	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	1	15	30
		국외	0	0	0
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		차별화된 품종을 지속적으로 개발할 예정임.			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)				
	수 출				

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

		코드번호	D-06
4-1. 목표달성도			
주요 목표	평가기준	성과	달성도
단절간의 애호박과 주니호박 계통개발, 조합작성, 성능검정 및 종자생산능력검정	①우수계통 선발; 30계통 ②교배조합작성 및 성능검정; 30개 이상의 조합작성 ③교배친화성 및 종자생산능력 검정 여부	①우수계통 50계통 이상 선발 ②교배조합작성 및 성능검정; 600개 이상의 조합작성 ③교배친화성 및 종자생산능력 실시 후 최종 선발함	100%
바이러스(WMV, ZYMV) 및 흰가루병 내병성 계통의 진단기술개발 및 선발	①WMV, ZYMV 내병성 검정기술 개발여부 ②바이러스 내병성 계통의 선발여부 ③흰가루병 발병조건 확립 및 내병성 계통의 선발여부 ④호박 바이러스(WMV, ZYMV) 진단 키트개발 및 농가서비스 실시여부	①WMV, ZYMV 내병성 검정기술 개발완료 ②바이러스 내병성 20여계통 선발 ③흰가루병 발병조건 확립 및 내병성 10여 계통의 선발 ④호박바이러스(WMV, ZYMV) 진단키트개발 및 농가서비스 실시함	100%
바이러스(WMV, ZYMV) 및 흰가루병 내병성 분자마커 개발	①바이러스와 흰가루병에 대한 내병성 관련 mapping 집단 육성여부 ②바이러스와 흰가루병 내병성 관련 분자마커 개발여부	①바이러스와 흰가루병에 대한 내병성 관련 mapping 집단 육성완료 ②바이러스 및 흰가루병 내병성 관련 분자마커 개발완료	100%
고객선호 특성조사, 지역 적응성 농가시험재배 및 우수 조합선발	①농가 및 소비자 선호 품종특성에 대한 기초 설문조사여부 ②애호박 농가시험재배 4곳 이상 ③쥬키니호박 농가시험재배 4곳 이상 ④우수 조합의 선발; 최소 8조합 이상	①농가 및 소비자 선호 품종특성에 대한 기초 설문조사완료 ②애호박 농가시험재배 10곳 이상 실시 ③쥬키니호박 농가시험재배 4곳 이상 실시 함. ④우수 조합의 선발; 30조합 이상선발	100%
최종 품종선발, 품종보호 출원 및 종자생산	①우수한 5 조합 선발 및 시험용 종자 생산 ②최종 선발된 조합의 품종보호등록; 단간형 애호박, 쥬키니호박, 풋호박 각 1 품종개발 (총 3 등록된 품종에 대한 시판용 종자생산품종)	①우수한 10조합 이상 선발 및 시험용 종자생산 ②최종 선발된 조합의 품종보호 등록; 흰가루 내병계 애호박 1품종(파랑새애호박), 바이러스와 흰가루병에 강한 쥬키니호박(가야금쥬키니) 1 품종개발 보급 중임.	95%
품종의 농가보급	①지역별 농가시험재배 및 평가회; 최소 5 곳 5회 이상 ②농가 및 거래처 홍보여부 ③제품포장 및 판매 여부	①지역별 농가시험재배 및 평가회; 최소 15회 이상 실시 ②농가현장방문, 신문, TV 등을 통한 홍보실시 ③제품포장 및 판매 실시 중임.	100%
4-2. 관련분야 기여도			
<p>○ 국내에 시판되는 호박종자는 약 40여년 전에 육성된 것으로 그동안 품종적 개량이 이루어지지 않아 재배농가에서는 바이러스병과 흰가루병에 약한 대동소이한 품종으로 많은 어려움을 겪으며 지금까지 재배해 오고 있었다.</p> <p>본 연구과제를 통하여 바이러스병과 흰가루병에 강한 쥬키니 품종, ‘가야금쥬키니’와 흰가루병에 강한 애호박인 ‘파랑새애호박’을 육성, 보급함으로써 호박재배 농민들은 기존의 품종과는 완전히 차별화된 품종을 심을 수 있게 되었다.</p> <p>따라서 호박재배 농민들이 흰가루병 방제를 위하여 7일 ~10일 간격으로 계속 살포하던 농약을 거의 살포하지 않아도 재배가 가능하게 되었으며, 바이러스병의 경우는 방제약이 없는 관계로 일단 감염이 되면 수확이 힘들어 큰 손실을 가져왔는데 이를 막을 수 있는 길이 열렸다고 할 수 있다.</p>			

5. 연구결과의 활용계획

		코드번호	D-07
<ul style="list-style-type: none"> ○ 개발된 신품종을 이용한 매출 확보 본 과제를 통해 개발된 흰가루병 내병계인 과량새애호박과 바이러스병과 흰가루병에 강한 가야금쭈키니 호박품종에 대한 확대보급을 지속적으로 추진하여 국내 시장에서의 시장점유율 확보는 물론 매출을 극대화할 계획임. ○ 개발완료 되지 않은 품종의 개발 아직 개발과정에 있는 풋호박에 대한 품종개발 및 보급을 향후 2~3년내 실시할 예정임. ○ 개발과정에 선발된 우수계통을 이용한 신품종 개발 본 과제를 통해 개발된 많은 우수계통을 활용한 차세대 우수품종개발이 지속적으로 이루어질 것이며, 향후 우리나라는 물론 세계호박시장에서의 입지를 강화할 수 있도록 노력할 것입니다. 			

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

		코드번호	D-08
<ul style="list-style-type: none"> ○ 우리나라에서 소비되는 애호박 타입의 품종은 존재하지 않으나, 쭈키니 호박품종 중에 과피색이 연하면서 절간이 짧은 품종이 개발되어 시판되고 있다. 하지만 그 맛은 우리가 먹는 애호박과는 많은 차이가 있으며 쭈키니의 한계를 벗어나지 못하고 있다. ○ 내병계 품종도 많이 개발되고 있어, 향후 해외 진출에는 내병계가 필수사항이 될 것으로 보인다. 			

7. 연구개발결과의 보안등급

		코드번호	D-09
○			

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

					코드번호	D-10		
구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
○		

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	특허	면역크로마토그래피를 이용한 주키니황화모자이크 바이러스의 신속 진단키트 및 이를 이용한 진단방법	강원도		대한민국		2014.10.20.		10-2014-0141843
2	특허	수박모자이크바이러스(WMV) 및 주키니누런모자이크바이러스(ZYMV) 저항성 호박 관별용SCAR 마커 및 이의 용도	경희대학교		대한민국		2015.05.20		10-2015-0070638
3	특허	바이러스병과 흰가루병 복합내병성 주키니호박 신품종	홍익바이오		대한민국		2015.07.27		10-2015-0105796
4	기타	과량새애호박	홍익바이오		대한민국		2015.07.30		2015-486
5	기타	가야금주키니	홍익바이오		대한민국		2015.07.27.		2015-477

11. 기타사항

	코드번호	D-13
○		

12. 참고문헌

	코드번호	D-14
○		

주 의

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