

발간등록번호

11-1543000-001642-01

수출용 고품질 수박종자 처리 및 검정 체계 확립
(Treatment and Certification of High-Quality Watermelon
Seeds for Export)

강원대학교

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부장관 귀하

이 보고서를 “수출용 고품질 수박종자 처리 및 검정 체계 확립” 프로젝트 (제1세부프로젝트: 우량종자 생산을 위한 수박 채종조건 확립 및 종자처리 기술개발, 제2세부프로젝트: 세균성 과실썩음병(BFB) 방제기술 및 무균종자 처리기술 개발))의 보고서로 제출합니다.

2017년 03월 28일

프로젝트 연구기관명 : 강원대학교

프로젝트 책임자 : 이 윤 수

제1세부프로젝트 연구기관명 : 부산대학교

세부프로젝트 책임자 : 강 점 순

제2세부프로젝트 연구기관명 : 강원대학교

세부프로젝트 책임자 : 이 윤 수

보고서 요약서

과제고유번호	213002044CGS00	해 당 단 계 연구 기 간	42개월	단 계 구 분	1/2
연구사업명	단 위 사 업 명	채소,원예 : 농식품기술개발(R&D)			
	세부 사업명	Golden Seed 프로젝트			
연구과제명	프로젝트명	수출용 고품질 수박종자 처리 및 검정 체계 확립			
	세부 프로젝트명	우량종자 생산을 위한 채종, 종자선별 및 가공 기술 개발 (부산대/강점순)			
	(주관 연구기관 /연구책임자)	세균성 과실썩음병(BFB) 방제기술 및 무균종자 처리기술 개발 (강원대/이윤수)			
연구책임자	이 윤 수	해당단계 참 여 연구원 수	총: 74명 내부: 0명 외부: 74명	해당단계 연구 개발 비	정부: 720,000천원 민간: 0천원 계: 720,000천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 74명 내부: 0명 외부: 74명	총 연구개발비	정부: 720,000천원 민간: 0천원 계: 720,000천원
연구기관명 및 소속 부서명	강원대학교 농업생명과학대학 (식물자원응용과학과)			참여기업명: 삼성종묘, 농협종묘	
위탁 연구	연구기관명: 국립원예특작과학원			연구책임자: 이성찬, 백창기	

요약: 본 연구에서는 수박을 개화수분 후 성숙단계별로 수확하여 과실 및 종자의 형태적 특성 및 발아력을 검정한 결과, 종자의 성숙단계에 따른 종자 발아율이 변화하여 종자 발아성에 밀접하게 관련되어 있음을 확인하였다. 과절위에 따라 수박의 크기와 당도 및 종자의 발아성이 달랐다. 수박은 착과화방이 높아지면 과실의 무게는 증가하였다. 다양한 발아온도에서 priming 처리된 종자는 모든 발아온도에서 무처리보다 발아율이 증진되었고, T50은 단축되어 발아촉진에 유효하였다. 초분광 반사광 영상을 통하여 건전종자와 퇴화종자의 선별모형을 개발하였다. 국내 박과작물 재배지역으로부터 수집하여 분리된 *A. citrulli* 집단을 분석한 결과 KCC1과 KCC2 그룹으로 나뉘었고, KCC1 그룹은 KCC2 그룹보다 더 큰 유전적 변이를 보였다. 효율적인 감염된 종자를 확보하기 위해 종자에 감압처리를 실시하여 조건을 확립하였다. 감압 처리된 종자에 저온 플라즈마를 처리하여 발아율과 멸균력을 확인한 결과, 30W에서 처리 시간별 100%의 멸균력을 보여주었다. 토양에서 분리한 30종의 유용미생물 중 SN-21, 22, NSB-27 3종이 높은 길항력을 가지고 있는 것을 확인하였다. 현재 시판되고 있는 살균제 히노산이 높은 길항력을 나타냈다. 종피 수준에서 수박 종자에 BFB균을 방제하고자 Plasma 기술, 화학적 제조공정 및 감마선을 이용한 나노 기술 등을 활용하여 제작한 나노화합물을 실험에 사용하였다. 석회, Brass/CaCo- 3,000ppm 경우 높은 항균력을 확인하였다.

보고서 면수: 309

요 약 문

I. 제 목

수출용 고품질 수박종자 처리 및 검정 체계 확립

- 제1세부프로젝트 : 우량종자 생산을 위한 수박 채종조건 확립 및 종자처리 기술개발
- 제2세부프로젝트 : 세균성 과실썩음병(BFB) 방제기술 및 무균종자 처리기술 개발

II. 연구성과 목표 대비 실적

[제1세부과제]

가. 연구개발 성과목표 및 실적

(단위 : 건수)

성과목표	특허		논문		유전자원		학술발표		인력양성
	출원	등록	SCI	비SCI	수집	등록	국내	국외	
최종목표	4	4	4	14	-	-	-	-	8
1차년도(2013)	목표	-	-	2	-	-	-	-	-
	실적	-	-	1	-	-	-	-	-
2차년도(2014)	목표	1	-	1	1	-	-	-	-
	실적	0	-	1	0	-	-	-	-
3차년도(2015)	목표	-	1	-	2	-	-	-	1
	실적	-	0	-	2	-	-	5	2
4차년도(2016)	목표	1	-	1	1	-	-	-	1
	실적	2	-	0	0	-	-	1	0
소계	목표	2	1	2	6	-	-	-	2
	실적	2	0	1	3	-	-	6	2
종료 1차년도 (2013)	-	-	-	1	-	-	-	-	-
종료 2차년도 (2014)	0	-	1	0	-	-	-	-	-
종료 3차년도 (2015)	-	0	-	2	-	-	5	-	2
종료 4차년도 (2016)	2	-	0	0	-	-	1	-	0
소 계	2	0	1	3	-	-	6	-	2
합 계									

[제2세부과제]

가. 연구개발 성과목표 및 실적

(단위 : 건수)

성과목표		특허		논문		유전자원		학술발표		인력양성
		출원	등록	SCI	비SCI	수집	등록	국내	국외	
최종목표		3	3	5	13	-	3	-	-	9
1차년도(2013)	목표	-	-	-	2	-	-	-	-	-
	실적	-	-	-	1	-	-	-	-	1
2차년도(2014)	목표	-	-	-	2	-	-	-	-	1
	실적	-	-	-	0	-	-	-	-	2
3차년도(2015)	목표	-	-	1	1	-	-	-	-	1
	실적	-	-	-	5	-	-	-	-	2
4차년도(2016)	목표	1	-	1	1	-	1	-	-	1
	실적	0	-	2	1	-	1	-	-	1
소계	목표	1	-	2	6	-	1	-	-	3
	실적	0	-	2	7	-	1	-	-	6
종료 1차년도 (2013)		-	-	-	1	-	-	-	-	1
종료 2차년도 (2014)		-	-	-	0	-	-	-	-	2
종료 3차년도 (2015)		-	-	0	5	-	-	-	-	2
종료 4차년도 (2016)		0	-	2	1	-	1	-	-	1
소 계		0	-	2	7	-	1	-	-	6
합 계										

Ⅲ. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구 개발의 목적

우리나라가 종자 수출국으로서의 현 위상을 더 한층 제고하고 수출량을 증대하기 위해서는 수출대상국에 적합한 품종개발이 최우선이지만 이에 못지않게 중요한 것이 유전-육종적 특성 구별성 (distinctiveness), 균일성(uniformity), 안정성(stability)을 유지하기 위하여 무균종자를 생산하는 기술 개발을 통하여 종자의 품질을 높이고자 한다. 따라서 본 연구는 개발되는 품종 및 기존의 수출되는 품종을 대상으로 최상의 종자를 공급하는 체계적이고도 일관적인 기술을 개발하여 고품질 종자의 지속적인 안정공급에 기여코자 함

2. 연구개발의 필요성

종자의 품질은 유전적 조성 및 육종적 특성, 채종환경, 채종 및 탈종(脫種) 방법, 종자의 정선(精選) 및 품질관리방법, 종자의 다양한 가공(加工) 처리에 따른 품질 향상 등으로 대분할 수 있다. 일례로 우수한 특성을 지닌 품종(종자)이라고 하더라도 치료가 매우 어렵거나 불가능한 종자전염병에 감염되어 있는 경우 아예 수출입 대상국의 통관에서 불합격 처리되어 고가의 종자가 그대로 폐기처분되는 경우가 매우 흔히 발생하고 있는데 이들 중의 대표적인 병해가 박과채소 종자에서의 오이녹반모자이크바이러스(*Cucumber green mottle mosaic virus, CGMMV*)와 수박의 과실썩음병(*Bacterial fruit blotch, BFB*)으로 매년 막대한 양의 종자가 세계적으로 폐기처분되고 있는 실정이다. 가까운 일본의 경우 BFB가 일본 국내에서도 여러 차례에 걸쳐 발병한 사실이 있는 병이지만, 수입 통관 시 규제 대상에 올라 있고, 우리나라에서는 아직 검토 중으로 이에 대한 확고한 결정을 내리지 못하고 있는 단계이다. 그러나 이 병의 심각성이 널리 알려지고, 간략한 간이검출(진단)방법이 개발되면서 세관에서의 검역이 차후 강화될 것임을 쉽게 추정할 수 있다.

박과채소에서의 과실썩음병(BFB)은 박과채소류 전반에 걸쳐 모두에서 발생하지만, 완숙과(完熟果)를 이용하는 수박과 멜론에 특히 결정적 피해를 끼친다. BFB는 이미 오래 전부터 그 발생이 보고되어 왔지만 1998년 이후 미국에서의 대발생 이후 세계적으로 확산 일로를 거쳐 최근에는 우리나라는 물론이고, 우리나라 박과채소종자의 주요 채종장소인 중국, 태국, 동남아국가에서도 폭 넓게 발생하고 있어서 막대한 피해를 초래하고 있다. BFB는 전형적인 세균성 질병으로 오염종자가 주 전염원이지만 세균성이어서 완치용 농약도 개발된 바 없으며, 특히 상당수의 다른 병균이나 virus와는 달리 세균이 종피는 물론이고 종자의 내부 깊숙이까지 분포하므로(자엽, 유아, 유근), 설사 좋은 농약이 개발된다고 하더라도 반투성 내종피(내주피+배유외화층)의 원형질막을 통과해 들어가서 세균을 사멸할 수 없으므로 일단 감염이 확인된 종자들은 100% 폐기처분하도록 규정되어 있다. 시판용 종자에서의 BFB균의 검사는 채종집단별(seed lots)로 50,000립을 검사하여서 단 하나의 이병(罹病)개체라도 검출되면 이들 종자집단을 모두 폐기 처분하여야 하므로 그 손실은 실로 막대하다고 할 수 있다. 최근 검사에 소요되는 시료 수(종자 수)를 축소하는 경향이 있어서 이 또한 우려의 대상이 되고 있다. 따라서 감염종자에

서 효과적인 “BFB 무균처리기술”을 개발한다면 그 성과가 금액으로 환산하기 어려울 정도로 클 것임도 쉽게 추정할 수 있다. 세계적으로도 BFB를 국가 특정위해질병으로 선언하여 특별한 관리를 하고 있는 국가수도 빠르게 증가하고 있기도 하다(일본, 이태리, 터키 등).

BFB에 관한 연구는 미국에서 주로 수박을 중심으로 상당한 진전을 보이고 있다. 그러나 미국의 경우 수박을 거의 접목재배하지 않으므로 95% 이상 접목재배를 하고 있는 아시아나 유럽국가에서는 동일한 BFB 이병성인 다양한 종류의 수박과 멜론 등에 사용되는 대목에서의 독립적 연구가 동반되지 않으면 연구의 실용가치가 매우 떨어진다는 단점이 있다.

우리나라는 채소종자의 주요 수출국이다. 특히 최근 3년 사이에 괄목할만한 수출 신장을 보인 것으로도 유명하다. 수박종자의 경우를 보더라도 2011년에 비해서 2012년에는 총 수출량이나 수출액에서 5배 이상 신장한 기록을 보이고 있다(한국종자협회 2013년 자료). 그러나 이들 종자는 국내에서 채종한 것이 아니고, 90% 이상이 중국을 위시한 동남아 국가 등에서 채종되어 국내로 반입된 후 다양한 정선-선별-처리과정과 포장을 거쳐서 국내이용 및 재수출되고 있는데 최근에는 이들 국가들에서도 BFB 발생 빈도가 급증하고 있어서 근본적 대책 수립이 그 어느 때보다도 시급한 실정에 있다. 종자에 감염된 BFB균은 4℃~30℃에서는 종자가 살아있는 한 26개월 이상이나 정상적인 전염가능 병원성을 유지하고 있어서 특별한 종자무균처리기술의 개발 및 박과채소별 선택적용이 무엇보다 시급한 실정이며, 국내 수박 종자의 대부분은 중국, 동남아시아 등 노동력이 저렴하고 BFB 감염 적정 지역에서의 채종이 일반화되어 있고, 최근 고품질, 고기능성, 친환경재배와 온난화 등의 영향으로 세균병 발생증가 등을 감안할 때 국내 급속 확산과 방제비용 증가, 민원발생이 충분히 예상됨에도 불구하고 병의 심각성에 대한 국내 인식과 정보가 부족하고 연구지원에 대한 기반이 제대로 조성되어 있지 않은 실정이다.

따라서 국내 수박의 안정적 재배, 방제비용의 감소, 건전종자와 건전 묘 생산으로 종자산업과 육묘산업의 지속적 성장과 발전을 위해서는 국내 실정에 맞는 신속 정밀진단법을 확립, 병 발생생태 해석에 의한 국내정착 조기 차단, 병 발생 시 긴급처방이 가능한 방제용 약제등록 및 주기적인 교육과 홍보로 BFB의 피해를 최소화할 필요가 있다, 최근 육묘장과 시설재배 포장에 새로운 병해인 수박 과실썩음병이 발생하였으며 확산 가능성이 높아, 이에 대처하기 위한 체계적인 연구가 필요한 실정이다. 수박 과실썩음병 발생 생태 및 방제기술 개발 보고서, 2013; 국립원예특작원). 신물질을 이용한 BFB방제 효과를 확인 할 예정이다.

IV. 연구개발 내용 및 범위

[제1세부과제]

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
최종 목표 : 우량종자 생산을 위한 채종, 종자선별 및 가공 기술 개발			
1차년도	2013	우량종자 생산을 위한 수박 채종조건 확립 및 종자처리 기술개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 개화일수와 후숙일수의 상호요인에 의한 발아율과 종자 활력 구명 ○ 착과절위에 따른 과실중량, 종자생산량, 종자충실도, 발아성 검정 ○ Priming 처리조건 구명 ○ 필름코팅 피복물질 및 첨가농도에 따른 발아율 검정 ○ 초분광 Vis/NIR 영상기술을 이용한 수박종자 발아력 비파괴 측정기술 개발
2차년도	2014	우량종자 생산을 위한 수박 채종조건 확립 및 종자처리 기술개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 대과종, 중과종 적정 과수설정 ○ 착과부위에 따른 과실중량, 종자생산량, 종자 충실도 및 발아율 검정 ○ SMP 처리조건 구명 ○ 초분광 SWIR 영상기술을 이용한 수박종자 발아력 비파괴 측정 기술 개발
3차년도	2015	우량종자 생산을 위한 수박 채종조건 확립 및 종자처리 기술개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내 및 해외 수박채종지의 온도, 일조량, 강우량 분석 ○ 적정 줄기수 설정 ○ 발아촉진을 위한 drum priming 처리조건 구명 ○ 병원균에 대한 항균 활성과 발아촉진 유용미생물을 혼합하여 시너지 효과 검정 ○ 초분광 형광 영상기술을 이용한 수박종자 발아력 비파괴 측정 기술 개발
4차년도	2016	우량종자 생산을 위한 수박 채종조건 확립 및 종자처리 기술개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 우량종자 생산에 최적 재식간격을 구명 ○ 재식간격에 따른 과실중량, 종자생산량, 종자충실도, 발아력 검정 ○ 중, 대과종 적정 착과절위 구명 ○ Priming, drum priming 및 SMP 효율성 검정 ○ 초분광 Raman 영상기술을 이용한 수박종자 발아력 비파괴 측정 기술 개발

[제2세부과제]

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
최종 목표 : 세균성과실씩음병(BFB) 방제기술 확립 및 내병성 유전자원 개발			
1차년도	2013	수박의 세균성 과실씩음병(BFB) 방제기술, 종자무균처리 및 내병성 유전자원 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ BFB의 균 분리·수집 및 병원성검정 ○ 종자검정법 구축; 종자감염 및 종자감염의 경로 확인 ○ 발병형태, 토양내 생리연구 ○ 내병성 유전자원 확보 및 내병성 계통 개발 ○ 채종종자의 품질평가
2차년도	2014	수박의 세균성 과실씩음병(BFB) 방제기술 종자무균처리 및 내병성 유전자원 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ BFB의 균 분리·수집 및 병원성검정; 병원균의 유전 분석; 국내외의 우점균 확인 ○ BFB균 종자 검정법 구축: 종자감염 및 종자감염 외 경로 연구 ○ BFB균 감염 종자 검정 및 진단법 개발 ○ 수박 및 수박대목 품종을 대상으로 한 각종 BFB균의 병원성 검정 ○ 감염종자 멸균처리 기술개발/무균종자 생산 및 종자처리 기술 개발 ○ 유용미생물 활용 생물적 방제 ○ 화학약제 활용 방제 ○ Plasma 기술, 유용 신물질, 천연물 등을 활용한 방제
3차년도	2015	수박의 세균성 과실씩음병(BFB) 방제기술 종자무균처리 및 내병성 유전자원 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ BFB의 균 분리·수집 및 병원성검정; 병원균의 유전 분석; 국내외의 우점균 확인 ○ BFB균 발병 형태 및 토양내 생리 생태 ○ BFB균 종자 검정법 구축: 종자감염 및 종자감염 외 경로 연구 ○ BFB균 감염 종자 검정 및 진단법 개발 ○ 수박 및 수박대목 품종을 대상으로 한 각종 BFB균의 병원성 검정 ○ 감염종자 멸균처리 기술개발/무균종자 생산 및 종자처리 기술 개발 ○ 유용미생물 활용 생물적 방제 ○ 화학약제 활용 방제 ○ Plasma 기술, 유용 신물질, 천연물 등을 활용한 방제
4차년도	2016	수박의 세균성 과실씩음병(BFB) 방제기술 종자무균처리 및 내병성 유전자원 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ BFB의 균 분리·수집 및 병원성검정; 병원균의 유전 분석; 국내외의 우점균 확인 ○ BFB균 발병 형태 및 토양내 생리 생태 ○ BFB균 종자 검정법 구축: 종자감염 및 종자감염 외 경로 연구 ○ BFB균 감염 종자 검정 및 진단법 개발 ○ 수박 및 수박대목 품종을 대상으로 한 각종 BFB균의 병원성 검정 ○ 감염종자 멸균처리 기술개발/무균종자 생산 및 종자처리 기술 개발 ○ 유용미생물 활용 생물적 방제 ○ 화학약제 활용 방제 ○ Plasma 기술, 유용 신물질, 천연물 등을 활용한 방제

V. 연구개발 결과

[제1세부과제]

박과작물에서 적정 채종조건을 확립하기 위해 일련의 연구들이 수행되었고(Oh and Moon, 2012; Yoo et al., 1995; Yoo et al., 1999; Yoo et al., 2001; Moon et al., 2011), 이들 대부분의 연구들은 성숙일수와 후숙일수에 따라 종자발아성과 저장수명이 달라진다고 보고되고 있다.

본 연구에서는 수박을 개화수분 후 10일, 20일 및 30일 등 성숙단계별로 수확하여 과실 및 종자의 형태적 특성 및 발아력을 검정하였다. 개화수분 후 일수가 경과할수록 과실의 무게는 증가하였고 과실의 당도는 개화수분 후 30일부터 가빠르게 증가하였다. 종자발아력(seed vigor)은 40일 성숙시킨 종자에서 좋았다. 수박 종자를 성숙단계별로 채취한 후 후숙일수를 달리하여 실험 한 결과 40일간 성숙종자를 20일간 후숙처리하면 발아율과 유묘활력이 향상되었다. 종자의 성숙단계에 따른 종자 발아율이 변화하며, 머스크멜론 종자는 개화 후 45일에 채종할 경우 발아율이 95% 이상 높아졌으며(Welbaum and Bradford, 1989), 호박에서는 개화 후 50일에 채종했을 때 발아세가 90% 이상으로 높았다고 하였다(Holmes, 1953). 이와 같이 성숙단계가 종자 발아성에 밀접하게 관련되어 있음을 시사하고 있다. 또한 후숙처리에 의해 종자휴면을 타파시킬 수 있으며(Bewley and Blackd, 1984), 과실의 성숙기간과 더불어 종자발아에 관여하는 주된 요인이다(Bewley and Black, 1984; Delouche, 1958; Finkelstein and Grouch, 1984; Grabe, 1960; Velasco and Stoner, 1983). 박 종자의 불량발아 원인은 종자의 착과시기 차이에 의해 미숙종자 혹은 과숙종자에 혼재에 의한 것이며(Yoo, 1999), 채종 후의 최적화 된 후숙처리에 의해 발아력을 향상시킬 수 있다고 하였다. 채소작물의 수확 적기는 종자의 건물중이 최대에 도달한 시점이며, 적기에 수확한 종자는 종자활력이 높은 것이 일반적인 현상이다. 그러나 작물에 따라 수확적기가 달라지며, 수박의 채종재배일 경우 우량종자를 생산할 수 있는 최적 성숙일수와 후숙일수를 구명하는 것이 필요하다.

본 실험에서 고품질 우량종자를 생산할 수 있는 수박 채종조건은 40일 성숙과를 수확하여 20일간 후숙시킨 처리였다. 박과작물에서 품질을 결정하는 주요 요인으로서는 과실 크기, 모양, 당도 등이며, 이들 요인은 착과절위에 많은 영향을 받는다(Hwang et al., 1998). 또한 착과절위는 과실 뿐만 아니라 종자의 발아력에도 관련성을 있을 것으로 예측되어 우량종자를 생산할 수 있는 착과절위를 구명하고자 하였다. 착과절위에 따라 수박의 크기와 당도 및 종자의 발아성이 달랐다. 수박은 착과화방이 높아지면 과실의 무게는 증가하였다. 대과종인 '스피드'의 경우 6화방(31-33절)에 착과시키면 무게가 1.5배 증가하였다. 중과종인 '리코후레쉬' 또한 착과화방이 높아지면 과실무게는 증가되었다. 반면 소과종인 '꼬꼬마'에서는 착과화방에 따라 과실무게에는 큰 영향을 받지 않았다. 수박의 당도는 3-4화방에서 착과시키는 것이 고절위(5화방과 6화방)에서 착과시키는 것보다 좋았다. 수박 크기별로 우량종자를 생산할 수 있는 적정 착과화방을 구명 한 결과 적정 화방은 품종에 따라 착과 화방이 달랐다. 대과종인 '스피드'에서는 5화방(26-28절)에 착과하는 것이 좋았고, 중과종인 '리코후레쉬'와 소과종인 '꼬꼬마'에서는 4화방(21-23절)에 착과시키는 것이 우량종자 생산에 적합한 과였다. 수박재배에서 지상부의 과도한 영양생장을 방지하고 착과 및 과실 비대를 향상시키기 위해 줄기수를 제한하는 방법을 이용한다. 수박재배에서 적정 줄기수의 확보는 엽면적과 밀접한 관련성을 갖는다. 수박에서 줄기수에

따라 과실비대에 영향을 받으며, 본 연구에서도 수박의 줄기수가 많아지면 과실의 무게와 당도가 증가하였다. 이는 3순 재배에서 광합성을 할 수 있는 충분한 잎의 확보로 동화능력 증대 및 과실로의 전류 촉진에 의한 것으로 해석된다(Park et al., 1997). 과실당 총 종자수는 줄기수에는 유의적인 차이가 없었다. 또한 발아율도 줄기수에 관계없이 90% 이상의 높은 발아율을 보였고, 종자의 활력도 줄기수에 의한 차이는 크지 않았다. 이러한 결과는 수박을 채종목적으로 한다면 3순보다는 2순으로 초밀식 재배하여 토지이용율을 높이는 것이 경제적 측면에서 유용할 것으로 판단된다. 재식밀도는 작물의 생육과 수량에 영향을 주는 중요한 요인이다(Kahn et al., 1997; Leskovar et al., 2000; Maynard and Scott, 1998; Reiners and Riggs, 1999; Schultheis et al., 1999). 수박재배에서 재식밀도를 달리하여 과실변화 및 종자의 형태적 특성 그리고 발아성과의 관계를 구명하고자 하였다. 재식밀도가 가장 낮은 300cm x 40cm 처리에서는 다른 재식밀도에 비해 과실무게 및 과실크기가 증가하였고, 당도도 가장 높았다. Park et al(1997)은 무등산 수박에서 과실의 발육특성은 재식밀도가 낮을수록 당도가 높았고 과중도 높았다고 하였다. 본 연구에서도 재식밀도가 낮을수록 당도는 증가하였다. 그 원인은 재식밀도가 낮을수록 작물간 충분한 거리가 확보되어 잎들간 중첩되는 현상이 줄어들고 이에 따라 광합성량의 증대에 의한 것으로 판단된다. 본 연구에서 재식밀도에 따라 발아력을 검정한 결과 우량 종자 생산에는 주간 간격을 40cm로 재배하는 것이 좋았지만 30cm 큰 차이는 없었다. 따라서 단위면적당 채종 할 수 있는 과는 종자생산량을 감안한다면 수박의 채종재배에 적용할 수 있는 30cm가 좋을 것으로 판단된다. 발아촉진을 위한 priming 조건을 구명하기 위해 수박종자의 적정 priming 조건으로 밝혀진 200mM의 KNO₃ 용액으로 25°C에서 4일간 priming 처리 후 15, 20, 25, 30, 35°C의 다양한 발아온도에서 발아성을 조사하였다. 품종에 관계없이 priming 처리된 종자는 모든 발아온도에서 무처리보다 발아율이 증진되었고, T50은 단축되어 발아촉진에 유효하였다. 수박이 발아적온이 30°C임을 감안한다면 저온인 15°C와 20°C에서는 무처리보다 T50 단축에 현저한 효과가 있었으며, 발아적온에 근접할수록 처리 효과는 감소하는 경향이였다. 이는 priming 처리가 불량환경 조건에서 그 효과가 현저하였다는 기존의 연구들과 일치하는 결과였다. ‘꿀나라’ 수박종자를 drum priming 처리를 위한 적정 수분함량을 탐색하고자 하였다. Drum priming 수분함량에 따라 발아율에 차이가 있었으며, drum priming 과정 중 수분함량 34% 이상에서는 유근이 도출되었다. Drum priming 적합한 수분함량은 대체적으로 30-32%에서 발아세가 좋은 것으로 판명되었다. drum priming 처리에 의해 정상묘의 비율이 증가하는 작물의 품질 향상과 수량 증대에 유효하게 적용될 것으로 예측된다. 4종의 수박품종을 대상으로 osmo priming, SMP 및 drum priming 처리하여 25 및 30°C의 발아온도에서 발아성을 조사하였고, 또한 파종 후 5일째에 14일째의 유묘활력을 조사하였다. 품종에 관계없이 priming 처리된 종자는 모든 발아온도에서 무처리보다 발아율이 증진되는 경향이였고, T50은 단축되어 발아촉진에 유효하였다. 특히 priming 처리된 종자는 발아율 증진보다는 발아를 촉진하는 효과가 컸다. 또한 전반적으로 priming 처리된 종자는 무처리에 비해 정상묘 비율이 높은 경향을 보였다. 파종 후 5일째의 유묘세력 비교에서도 priming 처리된 종자는 무처리 종자의 유묘에 비해 전반적인 생육이 좋았다. 이와 같은 결과는 priming 처리된 종자는 신속한 발아에 이어서 유묘생장으로 전환됨으로 무처리에 비해 유묘생육이 좋았던 것으로 판단된다. 식물의 성장 및 토양병 방제에 효과적인 유의 미생물의 농도를 달리한 용액에 침지한 후 종자발아력과 유묘활력을 검정하기 위해 적정 처리농도를 구명하고자 하였다. 무처리된 종자는 발아율이 96.7% 였고, 유용미생물인 KACC12332 (*Pseudomonas fluorescens*)를 제외한 *Bacillus*속인 KACC13751, *Bacillus* 1, *Bacillus* 2, *Bacillus* 3

그리고 E.coli에서는 농도별로 침지처리한 종자에서는 90% 이상 높은 발아율을 보였다. 또한 발아속도는 유용미생물 종류와 따라 달랐으며, 대체적으로 표준용액에서는 발아속도가 지연되었으나 표준용액을 1/4 및 1/8 희석한 배양액에서는 발아가 촉진되는 경향이였다. 수박종자에 활용할 수 있는 유용미생물 종자처리는 bacillus 1 좋았고, 처리농도는 6.0×10^7 CFU(표준용액의 1/4희석 배양액) 였다. Bacillus 1 6.0×10^7 CFU 용액으로 침지처리한 종자는 발아에 이은 유묘 활력을 향상시켰다. 수박 필름 코팅종자의 적정 조건 확립을 위해 접착제, 착색제, 피복물질에 관한 실험을 수행하였다.접착제 중 Arabic gum(AG)와 Carboxymethyl cellulose(CMC), polyvinyl alcohol(PVA)은 처리농도에 관계없이 다른 접착제에 비해 높은 발아율을 보였다.

적정 처리농도는 접착제의 종류에 따라 다르지만 0.5~4.0% 범위가 적당하다고 알려져 있다 (Baxter와 Wates, 1986). 본 실험에 사용된 접착제 중 AG와 CMC는 2% 이상의 고농도에서 발아억제 현상이 나타났고, PVA는 고농도에서도 발아억제 현상이 낮았다. 경제적인 측면을 고려한다면 PVA의 경우 1% 첨가하더라도 접착능력이 우수하여 채소종자의 필름코팅용으로 적합하였다. 수입되는 착색제를 대체할 수 있는 물질을 탐색하고, 필름코팅 착색제들이 발아에 미치는 영향을 조사하였다. 액체 페인트 색소를 착색제로 사용한 결과 발아를 크게 저해하지 않았고, 필름코팅 종자의 외관이 고체 착색제에 비해 우수하였다. 또한 필름코팅한 종자에서 무처리에 비해 길이생장은 지연되나 초기묘가 튼튼하게 생육이 가능한 것을 볼 수 있었다. 아울러 색깔이 가미된 필름코팅 종자는 시각적 효과를 높일 수 있고, 부가적으로 토양색깔과 대비되는 색으로 필름 코팅된 종자는 과중위치를 정확하게 식별 할 수 있는 이점도 있었다.

초분광 가시광 및 적외선(Vis/Nir) 영상 획득 시스템을 이용한 수박종자의 분석을 수행하였다.

건전종자 48립과 퇴화종자 48립의 초분광 반사광 영상의 각 픽셀에 대한 스펙트럼 데이터를 추출하여 부분 최소 자승법(Partial Least Squares, PLS)을 적용하여 건전종자와 퇴화종자의 선별 모델을 개발하였다. 수박의 건전종자와 퇴화종자 스펙트럼을 이용하여 발아력 판별예측 모델을 개발하기 위해 PLS-DA 방법을 적용하였고 판별에 많은 영향을 미친 영역을 확인하기 위해 PLS 모델의 beta coefficient를 계산하였다. 결과에 따르면 건전종자는 100%, 퇴화종자는 100%의 정확도로 분류되었으며 전체적으로 100%의 분류 정확도를 보였다.

초분광 단파적외선(SWIR) 영상 획득 시스템을 이용한 수박종자의 분석을 수행하였다. 수박종자의 경우 건전종자 96개 퇴화 처리를 거친 퇴화종자 96개중 건전종자 72개 퇴화종자 72개를 통해 획득한 데이터를 이용하여 분석을 수행하였다. 전체적으로 건전종자의 스펙트럼이 퇴화종자의 스펙트럼보다 높게 나타나는 현상을 알아볼 수 있었다.

추출한 각 픽셀에 대한 분석은 PLS-DA를 적용하여 판별 모델을 개발하였다. 또한 최적으로 제안된 모델의 beta coefficient를 이용하여 PLS 영상을 구성하였다. PLS 영상에 영상처리를 이용하고 임계값을 적용하여 퇴화종자 검출 알고리즘을 개발하였다. 이 마스킹 이미지에 건전종자와 퇴화종자를 판별하는 PLS 모델의 beta coefficient를 이용한 PLS 영상을 곱하기 연산하여 종자 이외의 배경부분을 제거하였다. 또한 PLS 모델에 의한 건전종자와 퇴화종자를 판별하는 기준을 임계값으로 적용하여 퇴화종자만 검출하는 최종 결과 영상을 얻을 수 있었다. 또한 픽셀수를 고려한 영상처리로 정확도를 높였다. 종자의 평균 크기(픽셀수)와 판별정확도를 기준으로 검출 알고리즘을 개발하였다. 이미지의 픽셀값의 면적값을 이용하여 설정된 픽셀 이미지보다 큰 값은 통과시키고 작은 값은 통과시키는 필터를 이용하여 최적화된 도출영상을 획득할 수 있었다.

[제2세부과제]

본 연구는 무균종자를 생산하는 기술개발을 통하여 종자의 품질을 높이고자 현재 개발되는 품종 및 기존의 수출되는 품종을 대상으로 기술을 개발하여 고품질 종자의 지속적인 안정공급에 목적을 두고 있다. 2011년부터 2014년까지 메론, 참외, 수박에 발생한 과실썩음병 병징에서 분리배양을 실시하여 총 54개의 과실썩음병 균주를 수집하였으며, 이 중 2014년 하반기에 6개 균주를 추가로 수집하였다. 이들 분리균주를 배양하여 이들의 total genomic DNA를 이용하여 동정 의뢰한 결과, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* 동정되었다. 2011년부터 농촌진흥청 국립원예특작과학원에서 수집한 과실썩음병 균주의 대부분은 *A. citrulli*로 동정된 바 있어, 국내 박과작물(수박, 메론, 오이 등)에서 발생하는 과실썩음병 균주는 모두 동일한 종으로 확인되었다. 수박유묘를 이용하여 2014년도에 분리한 과실썩음병 균주를 1×10^8 CFU/ml 농도로 인공 접종하여 이병엽울을 확인하였다. 이병엽울은 39~100%로 기주식물과 분리균주별로 다소 차이는 보였으나 메론>수박>참외 순으로 기주식물별로 과실썩음병의 이병엽울이 높았다. 분리균주의 병원성에 대해 확인해본 결과, 14-194, 14-201 균주의 이병엽울이 다른 분리균주에 비해 월등히 높았으며 메론, 수박, 참외에 모두 이병성이 있는 것을 확인하였다. 2014년도부터 2016년도까지 수집한 균주는 총 12종이며 *A. citrulli*, *A. valerianellae*으로 동정되었으며, 이들에 대한 기주식물의 병원성 검정 결과, 모두 병원성을 가지는 것으로 확인되었다. 2016년도 채집한 과실썩음병 균주 중 *A. citrulli*와 *A. valerianellae* 2종을 이용하여 3종의 박과작물에 대해 병원성 검정을 실시한 결과, *Acidovorax* spp. 균주들은 모두 교차병원성을 가지는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 일부 박과작물에서 발생한 과실썩음병 균주가 육묘단계에 다른 박과작물로 감염될 수 있다는 것으로 의미된다.

국내 박과작물 재배지역으로부터 수집하여 분리된 *A. citrulli* 집단에 대해 16s rRNA, *pilT*, *glyA*, *gmc*, *adk*, *ugpB* 6개의 유전자 영역에서 그룹 특이적인 단일 변이 site가 존재하였는데 *gltA* 의 영역에서는 그룹 특이적인 3개의 변이 site가 밝혀졌다. 한편 *phaC* 유전자를 이용하여 국내 *A. citrulli* 집단을 분석한 결과 KCC1과 KCC2 그룹 균주들 내에 84번째 염기 위치에서 A type과 G type 모두 존재함을 확인하였으며 국내에서 특이적 변이가 발생한 것으로 추정된다. KCC1 그룹 균주들은 KCC2 그룹에 비해 수박보다는 멜론에서의 분리비율이 더 높았고 KCC2 균주들은 수박 분리 균의 비율이 약 70%로 우세하였으며 KCC1 균주에 비해 전국적으로 더 넓게 발생하였다. RAPD 분석에서 *A. citrulli* 집단은 multi-locus analysis에서와 마찬가지로 KCC1과 KCC2 그룹으로 크게 나뉘어졌으나 그룹 내 균주들 간의 다양한 유전적 변이를 확인할 수 있었으며 이들 중 KCC1 그룹은 KCC2 그룹보다 더 큰 변이를 보였다. 병원성이 다소 강했던 11-251 와 11-073, 12-091, 12-158 균주를 유전체 분석 결과, 유전체의 크기는 5,308,653 bp ~ 5,350,245 bp로 분석되었고, G+C contents는 각각 68.54%, 68.55%, 68.56%, 68.56%로 4균주 모두 A+T에 비해 높게 나타났으며 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 predicted CDS (coding DNA sequence)는 약 5,000개, 4,825개, 4,856개, 4,861개 이상이 존재하며, 4균주 모두 circular type으로 확인되었다. 유전자분석 결과, 12-091, 12-158 두 균주는 KCC1 그리고 11-073, 11-251 두 균주는 KCC2로 두 그룹으로 분류된 것을 확인하였다. 감압 처리하여 준비된 종자의 종자 감염여부를 확인하기 위하여 3개 품종을 대상으로 감압처리를 실시한 결과, 종피 와 종실 모두 감염이 되었음을 확인하였다. 효율적인 감염 종자 확보를 위하여 포미나 품종을 이용하여 감압 처리된 종자

를 마쇄하여 실험을 실시하였다. 결과, 20분 동안 5rpm의 일정한 교반속도로 20kpa 압력의 조건에서 가장 많은 colony 형성을 하였다. 또한 30분 동안 5rpm의 일정한 교반속도로 3가지 다른 압력 조건에서 인공감염 정도를 확인하였다. 결과, 20kpa에서 가장 많은 colony 형성을 하였고 다음으로 25kpa, 15kpa 순으로 colony 수를 확인하였다.

세균성 과실썩음병 방제기술 확립 및 내병성 유전자원 선발을 위하여 공시재료를 확보하며 건열처리와 습열 처리 등의 실험으로 수박 품종간의 처리온도 및 기간에 대한 유묘의 성장 반응성을 평가하였다. 다양한 과정에 따른 처리종자의 발아 및 활력변화를 TGT와 사각밀폐용기를 사용하여 조사하였고 같은 조건에서 BFB 발현증상의 소멸정도를 파악하여 다면 비교평가하였다. 90°C에서 3일간 건열 처리된 종자는 유묘 성장상태가 상대적으로 불량하였고 85°C에서 처리한 종자는 파종 후 7일 동안 발아율이 상당히 낮았지만 경과실수가 길어지면서 그 억제 정도가 현저히 감소되어지는 것을 확인하였다. BFB균 증상발현은 1차 검정으로 건열 처리된 종자는 접종 후 건열 처리하지 않은 삼복꿀 10⁶, 10⁸ cfu/mL 감압종자에서 생육후기에 BFB 증상이 발현되었다. 다운도발아상을 이용한 BFB 불활성화 건열처리에 따른 후숙 4주차와 후숙 8주차의 유묘생장을 비교한 결과, 후숙 4주차 종자가 후숙 8주차 종자들보다 전반적으로 유묘성장상태가 더 좋은 것으로 확인되었다. TGT에서 건열 처리된 수박 종자 4품종에서는 BFB 발현 증상이 전혀 나타나지 않았으며, 삼복꿀 10⁶cfu/mL 감압 처리된 종자에서 BFB 증상이 13%, 10⁸cfu/mL 감압 처리된 종자에서는 73%의 증상을 보였다. 사각밀폐용기에 파종한 삼복꿀 10⁶cfu/ml, 10⁸cfu/ml 감압종자는 BFB 발현증상이 약하거나 증상이 나타나지 않은 것을 확인하였다. 또한 발아된 시료를 선발하여 Agdia 진단막대로 BFB 균의 발생여부를 광학현미경으로 관찰한 결과 수많은 BFB 균이 발병부위에서 확산해 나오는 것이 확인되었다. 이후 2차 검정으로 조건을 약간 변형하여 온도별 고온처리와 35°C부터 온도구배를 주어 서서히 온도별 고온 처리하였을 때 두 방법 모두 발아율이 좋았으며 멸균 효과가 95%이상으로 높았다. 감압 처리한 종자에 저온 플라즈마를 처리하여 종자 내부의 온도를 측정된 결과, 전력이 높을수록 종자 내부온도가 올라가는 것을 확인하였다. 또한 20°C 이상의 온도에서는 발아력이 30%대로 낮은 반면, 20°C 이하에서는 70~90%의 발아력을 확인하였다. 아르곤 : 산소(9:1)혼합 기체를 주입하여 플라즈마 처리 시 대부분의 샘플 내 세균 사멸 효과를 확인하였다. 무처리 종자에 플라즈마 처리 시 30W에서 5분 처리조건이 발아율과 멸균력이 우수하였다. 종자의 양에 따른 공정 조건은 30W에서 처리시간별로 모두 100%의 멸균력을 보여주었다. 조건별 종자 발아율은 80W에 20분 처리한 종자가 가장 높았다.

유용미생물을 활용한 48종의 BFB균의 길항능력을 확인한 결과, 토양에서 분리한 30종의 유용미생물 중 SN-21, 22, NSB-27 3종이 높은 길항력을 가지고 있는 것을 확인하였다. 또한 현재 시판되고 있는 살균제를 대상으로 31가지 BFB균에 대한 살균력을 확인해본 결과, 히노산이 가장 높은 길항력을 보여주었으며 귀퉁 또한 다음으로 높은 길항력을 보여주었다.

종피 수준에서 수박 종자에 BFB균을 방제하고자 Plasma 기술, 화학적 제조공정 및 감마선을 이용한 나노 기술 등을 활용하여 제작한 나노화합물을 실험에 사용하였다. 석회, Brass/CaCo-3,000ppm 경우 높은 항균력을 확인하였고 은/소금-300ppm, 구리/소금-1,000ppm는 KCC1그룹에 속해있는 균주들에 효과가 있는 것을 확인하였다. 차아염소산수 역시 BFB균을 방제하기 위하여 실험을 실시하였으나 본 연구에서는 항균력을 보여주지 못하였다. 이후 미산성 차아염소산수를 세포현탁액과 직접 접촉시킨 후 즉시 NA배지에 평판 도말하여 2-4일간 균총 발생율을 관찰한 결과 식물병원세균들은 모두 100% 살균효과가 나타남을 확인 할 수 있었다.

VI. 연구성과 및 성과활용 계획

- "수박우량종자생산방법" 특허 출원 완료하였다.
- “채소 종자의 고온발아 촉진 방법” 특허 출원 완료하였다.
- “Detection of Cracks on Tomatoes Using a Hyperspectral Near-Infrared Reflectance Imaging System” Sensors지에 SCIE 논문을 작성하였다.
- “박과작물에 병을 일으키는 *Acidovorax* sp. 균주들을 검출하기 위한 PCR primer를 이용한 검출 키트 및 방법”에 대해서 특허 등록을 진행하고 한다.
- 국내에서 처음 보고된 *Acidovorax konjaci*를 농촌진흥청의 농업유자원센터(KACC)에 균주를 유전자원으로 등록 완료 하였다.

SUMMARY

[제1세부과제]

The purpose of this study is to establish a seed-harvesting method for the production of high-quality seed of watermelon. To this end we examined 1) optimum days after anthesis (DAA) and fruit after-ripening period (FAP), 2) optimum fruit set node, 3) optimum stem number, 4) optimum planting interval, and 5) the effects of defoliation on seed germination. The effect of days after anthesis (DAA) and fruit after-ripening period (FAD) of watermelon seeds on the germination rate was investigated. Fruit weight and the seed number set in a fruit increased as FAD prolonged. On the other hand, DAA did not affect these traits. Regardless of DAA and FAD, the proportion of cotyledons in watermelon seeds was slightly higher than that of seed coat. On the other hand, as the number of days of FAD increased, the percentage of seed coat in whole seed decreased slightly. The germination of watermelon seeds was affected by FAD not by AAD. The percent germination was 50% lower after 30 days of DAA with no FAD. However, when the seeds were treated for 10 days of FAD, the germination rate increased to 92%. In general, percent germination was higher in seeds extracted from mature fruits after 40 days of DAA. When seedling vigor test was performed using BP assay, seedling vigor such as hypocotyl length and hypocotyl diameter was higher in seeds extracted from the mature fruits after 40 days of DAA followed by 20 days of FAD. Considering the productivity of the seeds, the optimal treatment days to maximize seed vitality for DAA and FAD were 40 days and 20 days respectively. As fruit set internode is expected to be related not just to the fruit but to the seed germination, we examined the effect of fruit set internode on the quality of watermelon seeds. The size and sugar content of the watermelon and the germination of the seeds were varied with the fruit set internode. The watermelon increased in weight when the position of flower cluster was high. In the case of 'Speed', the large size fruit variety, the weight increased by 1.5 times when it was set in the 6th flower cluster (i.e., 31-33 internodes). 'Ricofresh', which is medium size fruit variety, also increased in weight when the position of flower cluster was high. By contrast, 'Kkokkoma', the small size fruit variety, were not affected for the weight of fruit by the position of flower cluster. The sugar content of watermelon increased when the position of flower cluster was 3 or 4, and the position of node was high (i.e., 21-23 nodes).

In order to gain information on the optimum position of flower clusters, we examined germination, seedling vigor, field emergence, and seedling growth under controlled and field conditions. The optimum position of flower clusters was varied for the fruit size. The results indicated that the 5th flower cluster (26-28절) for the large size fruit variety, Speed, and the 4th flower cluster for the medium and small size fruit varieties, 'Ricofresh' and 'Kkokkoma', were best for fruit set. Appropriate number of stems in watermelon cultivation is closely related with leaf area. In this study, the fruit size, the sugar content of fruits and the morphological characteristics and germination of seeds were examined by changing the stem number of watermelon in the order

of 1, 2 and 3. As stem number increased, fruit weight and sugar content increased. In general, the number of seeds per fruit increased and the germination rate and seed vigor tended to be high when watermelon was cultivated with 3 stems, but there was no statistical significance. Thus, if watermelon was to be used for seed-harvesting, it would be economically beneficial to increase the density of planting and minimize the utilization of land area. Compared to other planting density, the lowest density 300 x 40cm increased the fruit weight, size, and sugar content of watermelon.

Seed germination was better at planting density of 40cm, but there was no significance from 30 cm. Considering the seed production per unit area, the planting density applicable to the cultivation of watermelon was 30cm.

[제2세부과제]

The purpose of this study was to produce high quality diseases-free seeds through the development of methods to produce diseases-free seeds, and to establish stable supply of diseases-free seeds. A total of 54 fruit rot bacteria were collected from 2011 to 2014 by isolation from the fruit rot disease symptoms of melon, oriental melon and watermelon. Six isolates were collected in the second half of 2014. These isolates were cultured and their total genomic DNAs were used for identification, and these were identified as *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Most of the fruit rot bacterial isolates were collected from the National Institute of Horticultural and Herbal Science since, 2011, and all the fruit rot bacteria isolated from symptoms of melon, oriental melon and watermelon were identified as *A. citrulli*.

Test with watermelon seedlings artificially inoculated with *A. citrulli* isolated in 2014 at a concentration of 1×10^8 cfu/ml showed high infection rate. The infection rate of the leaves were 39~100%, and the infection rate was slightly different among the host plants and isolates. Infection rate of melon was the highest and infection rate of oriental melon was the lowest. As a result of confirming the pathogenicity of the isolates, it was found that the isolates 14-194 and 14-201 were significantly higher in pathogenicity than those of the other isolates, and that the melon, watermelon and oriental melon were all susceptible. A total of 12 isolates were collected from 2014 to 2016, and they were identified as *A. citrulli* and *A. valerianellae*, and the pathogenicity test confirmed their pathogenicity on the host plants.

As a result of pathogenicity test using *A. citrulli* and *A. valerianellae* collected in 2016, all the *Acidovorax* spp. isolates were found to have cross pathogenicity. This result implies that BFB can infect at the nursery stage. In the case of *A. citrulli* collected from domestic cultivation areas, there were group specific single sites in six gene regions of 16s rRNA, pilt, glyA, gmc, adk and ugpB. In the region of gltA, three mutation sites were revealed. Analysis of Korean *A. citrulli* group using phaC gene revealed that both A type and G type were present at the 84th nucleotide position in the KCC1 and KCC2 group strains. It is assumed that a specific mutation occurred in Korea. The number of KCC1 group isolates were higher in melon than watermelon group and KCC2 isolates were dominant in watermelon isolates with a ratio of about 70%, and were more widely distributed than KCC1 isolates nationwide. In the RAPD analysis, the *A. citrulli* population was divided into

KCC1 and KCC2 groups as in the multi-locus analysis, but various genetic variations among the strains in the group were confirmed. Among them, the KCC1 group showed a larger variation than the KCC2 group.

As a result of the genomic analysis of 11-251, 11-073, 12-091, and 12-158 strains, the size of the genome was analyzed as 5,308,653bp~5,350,245bp, and the G+C contents were 68.54%, 68.55%, 68.56%, and 68.56%, respectively, which were higher than those of A+T. In addition, predicted CDS (coding DNA sequence) is about 5,000, 4,825, 4,856, and 4,861, and all four strains were found to be circular type. As a result of the genetic analysis, it was confirmed that two strains, 12-091 and 12-158 were classified into KCC1, and 11-073 and 11-251 were classified into KCC2, respectively. In order to confirm the infection of the seeds prepared by the vacuum inoculation technique, three kinds of seedlings were inoculated and the seeds and seedlings were infected. In order to obtain artificially infected seeds, the seeds were vacuum inoculated by using Pomina variety, and the seeds were crushed and tested. As a result, the most efficient artificial inoculation was found to be at a constant stirring speed of 5 rpm for 20 minutes under the condition of 20 kpa pressure. In addition, the degree of artificial infection was confirmed at three different pressure conditions at a constant stirring speed of 5 rpm for 30 minutes. As a result, the most efficient artificial inoculation was observed at 20 kpa, followed by the order of 25 kpa and 15 kpa, respectively.

The germination and vitality of the treated seeds were investigated using TGT and square enclosed containers. The degree of extinction of BFB was evaluated under the same conditions. Seeds treated at 90 °C for 3 days showed relatively poor seedling growth and seeds treated at 85 °C showed significantly lower germination rate for 7 days after sowing. BFB symptoms were expressed in the late stage of growth at 10^6 cfu/mL vacuum inoculated seeds of Sambukhul were not subjected to dry heat treatment after inoculation.

As a result of comparing the seedling growth between 4th postnatal day and 8th postnatal day by heat treatment of BFB inactivated seeds, it was found that the 4th seeds exhibited better seedling growth than those of 8th seeds. In the TGT, four kinds of watermelon seeds showed no symptoms of BFB expression. BFB symptoms were observed in 13% in 10^6 cfu / mL vacuum inoculated seeds in 73% of seeds treated with 10^8 cfu / mL of Sambukhul. The reduced pressure seeds of 10^6 cfu / ml and 10^8 cfu / ml of Sambukhul in a square sealed container were confirmed to have weak symptoms or no symptoms of BFB expression. Moreover, the germinated specimens were examined and the presence of BFB bacteria on the Agdia diagnostic rods was examined by optical microscope. As a result, it was confirmed that many BFB bacteria were diffused from the onset area. The germination rate was better and the sterilization effect was more than 95% in both methods when the conditions were changed slightly from the second test to the high temperature treatments, the temperature gradients gradually from 35 °C. The decompression treated seeds were treated with low temperature plasma to measure the temperature inside the seeds. As a result, it was confirmed that the seed internal temperature increased as the power was increased.

In addition, germinability was as low as 30% at 20 °C or higher, while germination was 70 ~ 90% at 20 °C or lower. The effect of argon: oxygen (9 : 1) gas mixture was investigated in plasma treatment. The germination rate and sterilization power of the untreated seeds were superior to those of the untreated seeds at 30W for 5 minutes. The processing conditions according to the amount of seed showed 100% sterilization power at 30 W for each treatment time. Seed

germination rate was the highest in seeds treated for 20 minutes at 80W. As a result of confirming the antagonistic ability of useful microorganisms against 48 species of BFB, using the useful microorganisms, it was confirmed that among 30 useful microorganisms isolated from the soil, SN-21, 22, and NSB-27 3 species have high ability of antagonism.

In addition, the commercially available fungicides was examined against 31 BFB bacteria against. As a result, Hinosan showed the highest inhibition rate. In order to control BFB bacteria in watermelon seeds at the level of seed coat, nano-materials prepared by using plasma technology, chemical manufacturing process and nanotechnology using gamma ray were used in the experiments. Lime, Brass/CaCo-3,000ppm, and silver/salt-300ppm and copper/salt-1,000ppm were found to be effective against the strains belonging to the KCC1 group. Hypochlorous acid water was also tested to control BFB bacteria, but this study did not show the antibacterial activity. After hypochlorous acid water was directly contacted with the cell suspension, it was immediately plated on NA medium and observed bacterial growth rate for 2-4 days. As a result, 100% bactericidal effect was observed in all of the plant pathogenic bacteria.

CONTENTS

Chapter 1 Project Outline and Performance Goals	33
1. Purpose of the Project	33
2. Necessity of the Project	33
3. Scope of the Project	37
가. R&D Scope by Year	37
4. Research Achievement Relative to Goals	39
가. Research Achievement Goals and Performance	39
나. Variety Development	39
다. Patent	39
라. Articles Published	40
마. Molecular Marker	40
바. Genetic Resources	40
사. Domestic Sales	40
아. Seed Exports/import Substitution Effect	40
자. Technology Transfer	41
차. Marketing Strategies Report	41
카. Manpower Training	41
타. DB Construction	41
파. DH System Development / Resource Distribution	41
하. Service	41
Chapter 2 Status of Domestic and Overseas Technology Development	46
1. Production and Market Status of Domestic Products	46
2. Foreign Product Production and Market Status	46
Chapter 3 Research and Development Contents and Results	47
[Project 1]	
1. Germination test during ripening and after-ripening days of watermelon	47
가. Objective of the study	47
나. Materials and methods	48
(1) Estimation of germination test during ripening and after-ripening days	48
(2) Fruit weight, seed production, seed productivity according to mature days	48
다. Results and Discussion	48
(1) Estimation of germination test during ripening and after-ripening days	48
(2) Estimation of germination test during ripening and after-ripening days	52
2. Fruit weight, seed production, seed productivity and germination rate according to fruit position	60
가. Objective of the study	60
나. Materials and Methods	60

(1) Germination rate according to fruit position	60
(2) Fruit weight and seed production according to fruit position	61
(3) Germinability according to fruit position	61
다. Results and Discussion	61
(1) Germination rate according to fruit position	61
(2) Fruit weight, seed production, seed productivity according to fruit position	62
(3) Germination rate according to fruit position	64
3. Adequate fruit number of heavy and middle sized species	67
가. Objective of the study	67
나. Materials and Methods	67
(1) Adequate fruit number of heavy and middle sized species per plant	67
다. Results and Discussion	67
(1) Adequate fruit number of heavy and middle sized species per plant	67
4. Priming condition for germination of watermelon seeds	68
가. Objective of the study	68
나. Materials and Methods	69
(1) Determination of germination temperature of watermelon seeds	69
(2) Effect of seed / pear ratio on seed germination rate	70
(3) Priming condition of watermelon seeds	70
(4) Seed vitality according to priming treatment	71
(5) Seed vitality according to germination temperature	71
다. Results and Discussion	71
(1) Germinability of watermelon seeds	71
(2) Effect of seed / pear ratio on seed germination rate	72
(3) Priming condition of watermelon seeds	76
(4) Seed vitality according to priming treatment	78
(5) Seed vitality according to germination temperature	87
5. Germination rate according to film coating material and concentration	105
가. Objective of the study	105
나. Materials and Methods	105
다. Results and Discussion	105
6. SMP treatment condition for improving germination of watermelon seeds	108
가. Objective of the study	108
나. Materials and Methods	109
(1) SMP treatment condition of watermelon seeds	109
(2) Seed vitality according to SMP treatment	109
다. Results and Discussion	109
(1) SMP treatment condition of watermelon seeds	109
(2) Seed vitality according to SMP treatment	114
7. Nondestructive measurement technique of watermelon seed germination using ultra-spectroscopic Vis / NIR and SWIR imaging technology Development	128

ㄱ. Materials and Methods	128
(1) Ultraspectral visible and infrared (Vis / Nir) image acquisition system	128
(2) Construction of ultraspectral visible and infrared (Vis / Nir) reflected light imaging system	129
(3) Short wavelength infrared reflectance (SWIR) image acquisition system	132
(4) Construction of short-wave infrared ultrasound reflection light image system	132
(5) Data Analysis	135
(6) Seed germination experiment	136
ㄴ. Results and discussion	137
(1) Analysis of watermelon seeds by using Ultraspectral visible and infrared (Vis / Nir) image acquisition system	137
(2) Analysis of watermelon seeds using ultrasound short-wave infrared (SWIR) image acquisition system	144

[Project 2]

1. Seed Processing Technology Development	149
ㄱ. Materials and Methods	149
(1) Securing Watermelon Seed and Seed Processing Equipment	149
1) Securing Materials	149
2) Bulk purchase of triploid watermelon seeds	151
3) BFB securing seeds inoculated with reduced pressure of $10^6 \sim 10^8$ cfu/ml	151
(2) Securing and supplementing major equipment for experiment	152
1) TGT (Thermogradient Table)	152
2) DHT(Dry Heat Treatment)	152
3) Water bath	152
ㄴ. Results	152
(1) Detailed evaluation of growth-reactivity for processing temperature and duration among the varieties of watermelon by dry heat treatment (using among large and small dry heat devices)- TGT Using TGT and Incu Tissue	152
1) Comparison of Seedling Growth of Watermelon Seed by Heat Treatment Temperature and Period	153
2) Expression of BFB symptoms with or without heat treatment	153
3) Influence of matured period on seedling growth after heat treatment	153
4) Comparison of seedling growth of watermelon seeds according to BFB inactivation dry treatment using Incu Tissue in a Incubator	157
(2) Identification of the disappearance of BFB expression symptoms in the temperature and duration of treatment between watermelon varies by dry heat treatment (using large and small appliances)	160
1) Identify the degree of disappearance of BFB expression symptoms among cultivars and treatments by sowing on Petri dish	162
2) Identify the degree of disappearance of BFB expression symptoms among cultivars and treatments by sowing on Incu Tissue in the Incubator	163

(3) Multidimensional Comparison study for Optimizing the expression of BFB symptoms in the temperature and period of treatment between watermelon varieties by dry heat treatment	163
1) Using TGT - Sowing on Blue paper and Petri-dish	163
2) Conduct in a 6×6×10 Incu Tissue in BOD Incubator	164
3) Comparison of Growth response of BFB Bacteria by various treatments using selective medium	164
4) Grow-Out Test	165
5) Seeding and Germination Experiment in isolated Greenhouse	165
(4) Wet heat treatment - Seed germination and vitality change by various processes	166
(5) Treatment of 'onepiece' triploid watermelon seeds	167
1) Germination stimulation experiment by seed coat treatment	167
2) Seed germination according to time and seed soaking	167
3) Identification of sterilization by dry heat inoculated seed of BFB bacteria	167
(6) Decompress treatment in order to improve the efficiency of inoculation of BFB bacteria in dried seed	168
㉔. Invited lectures by foreigners and related researchers and peasant lectures	169
2. BFB (Bacterial Fruit Blotch) Separating and collecting BFB bacteria, investigating onset type	170
㉕. Methods	170
(1) BFB (Bacterial Fruit Blotch) Separating and collecting BFB bacteria, investigating onset type	170
1) Collection, separation and identification of BFB bacteria	170
2) Investigation on leaf infection rate and investigation on stem wither ratio	170
㉖. Results	171
(1) BFB (Bacterial Fruit Blotch) Separating and collecting BFB bacteria, investigating onset type	171
1) Collecting BFB bacteria strain and conduct separating culture	171
2) Pathogenicity assays for separated strains of watermelon BFB bacteria	173
① Investigation on leaf infection rate	173
② Investigation on stem wither ratio	174
③ Secondary Pathogenicity assays for collected BFB bacteria	175
3. BFB (Bacterial Fruit Blotch) Genetic and genome analysis of BFB bacteria	176
㉕. Methods	176
(1) Separation of strains and DNA (assay 1, 2, 3)	176
(2) Analysis of phylogenetic relationship (assay 1, 3)	176
(3) Multi-locus genetic analysis (assay 2)	177
(4) DNA sequencing (assay 2)	178
(5) RAPD analysis (assay 2)	178
(6) Selection of species specific primer	179
1) Selection of species particular primer of <i>A. citrulli</i> and conducting sensitivity test	179
2) Selection of species particular primer of <i>A. valerianellae</i> , <i>A. konjaci</i>	180

3) Detection of bacteria from plants	181
(7) Genome analysis of watermelon BFB	181
(8) Investigation of watermelon BFB occurrence and existence in soil	181
(9) Cross-pathogenicity test for strains of BFB in gourd crops	181
나. Results	182
(1) Relationship analysis first test	182
(2) Relationship analysis secondary test	190
1) Multi-locus relationship analysis	190
2) DNA fingerprinting analysis by RAPD analysis	195
(3) Relationship analysis tertiary test	197
(4) Results of species-specific primer selection	197
1) Selection of species particular primer of <i>A. citrulli</i> and Conducting sensitivity test	197
2) Selection of species particular primer of <i>A. valerianellae</i> , <i>A. konjaci</i>	200
3) Detection of bacteria form plants	203
(5) Genome analysis of watermelon BFB	203
(6) Investigation of watermelon BFB occurrence and existence in soil	212
(7) Result of cross-pathogenicity test for strains of BFB in gourd crops	213
4. BFB bacteria decompression treatment and testing infected seeds	214
가. Methods	214
(1) Decompression of BFB bacteria	214
(2) Transfer of decompression processing manufacturing technology (National Gardening Research Center → Kangwon University)	215
(3) Testing of BFB infected seed	215
(4) Securing infected seeds through artificial fertilization in watermelon packing	215
나. Results	216
(1) Decompression of BFB bacteria	216
(2) Transfer of decompression processing manufacturing technology (National Gardening Research Center → Kangwon University)	217
(3) Securing infected seeds through artificial fertilization in watermelon packing	218
5. Pathogenicity assays of various BFB bacteria	219
가. Methods	219
(1) Securing watermelon seeds	219
(2) Pathogenic vitality test of each strain	219
나. Results	219
6. Development of sterilization treatment technology for infected seeds/ production of aseptic seed and development of seed treatment technology	221
가. Methods	221
(1) Utilization of high temperature treatment technology (dry and wet heat treatment)	221
나. Results	221
(1) Testing germination rate by high temeprature treatment method	221
(2) Testing sterilization effect of BFB infected watermelon seeds using wet heat treatment	222
7. Development of small volume seed sterilization method using low temperature plasma	223

가. Methods	223
(1) Manufacture of low temperature plasma equipment for seed sterilization	223
(2) Experiment for optimum conditions which does not affect germination of watermelon seed	224
(3) Test seed germination optimum condition of low temperature plasma treatment	224
(4) Measurement of temperature change of watermelon seed after low temperature plasma treatment and germination rate	224
(5) Identification of internal bacterial infection in untreated group seeds	224
(6) Identification of the bacterial killing effect of RF plasma inside and outside of watermelon seed	225
(7) Identification of bacterial killing effect by power change	225
(8) Plasma treatment of seed by changing injection gas	225
(9) Identification of plasma-treated watermelon seed germination rate	225
나. Results	226
(1) Experiment for optimum conditions which does not affect germination of watermelon seed	226
(2) Seed germination test for optimum condition of low temperature plasma treatment	227
(3) Measurement of temperature change of watermelon seed after low temperature plasma treatment and germination rate	227
(4) Identification of internal bacterial infection in group of untreated seeds	228
(5) Identification of the bacterial killing effect of RF plasma inside and outside of watermelon seed	230
(6) Identification of bacterial killing effect by power change	232
(7) Plasma treatment of seed by changing injection gas	235
(8) Testing sterilization effect of plasma treated watermelon seed and germination rate	237
1) Identification of health and infectious bacterial killing effect	237
2) Results of plasma treated germination rate	239
8. Building optimum condition of large capacity seed sterilization method using low temperature plasma	239
가. Methods	239
(1) Optimization of low temperature plasma system for large capacity seed treatment	239
(2) Optimization of low temperature plasma system process for large capacity seed treatment	240
나. Results	240
(1) Building optimized condition of low temperature plasma process system for large capacity seed treatment	240
(2) Optimization of low temperature plasma system process for large capacity seed treatment	241
9. Use of beneficial microbes and biological control	243
가. Methods	243
나. Results	244

10. Chemical Control	247
가. Methods	247
나. Results	247
11. Antibacterial activity test of BFB using nano-materials	260
가. Methods	260
나. Results	260
12. Bacterial sterilization of BFB using hypochlorous acid water	270
가. First test for bacterial sterilization effect of BFB using hypochlorous acid water	270
(1) Methods	270
(2) Results	270
나. Secondary test for bacterial sterilization effect of BFB using hypochlorous acid water	283
(1) Research methods and results	283
다. Bacterial sterilization effect of BFB bacteria by mixed treatment of ground water and hypochlorous acid water	285
(1) Research content and results	285
13. Preliminary experiment for development of marker through PCR assay of plasma-non-treated infected seeds	285
가. Research content and results	285
Chapter 4 Achievement of goal and contribution to related field	287
1. Achievement goal by year	287
Chapter 5 R&D performance and performance utilization plan	290
Chapter 6 Overseas science and technology information collected during R&D	291
Chapter 7 References	292

목 차

제 1 장	프로젝트의 개요 및 성과목표	33
1.	연구개발의 목적	33
2.	연구개발의 필요성	33
3.	연구개발 범위	37
가.	연차별 연구개발 범위	37
4.	연구성과 목표 대비 실적	39
가.	연구개발 성과목표 및 실적	39
나.	품종개발	39
다.	특허	39
라.	논문	40
마.	분자마커	40
바.	유전자원	40
사.	국내매출액	40
아.	종자수출액/수입대체 효과	40
자.	기술이전	41
차.	마케팅 전략수립 보고서	41
카.	인력양성	41
타.	DB구축	41
파.	DH계통개발/자원분양	41
하.	서비스	41
제 2 장	국내외 기술개발 현황	46
1.	국내 제품생산 및 시장 현황	46
2.	국외 제품생산 및 시장 현황	46
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과	47
[제1세부과제]		
1.	수박 성숙일수 및 후숙 일수에 의한 발아력 검정	47
가.	연구목적	47
나.	재료 및 방법	48
(1)	성숙일수 및 후숙일수에 의한 발아력 검정	48
(2)	성숙일수 따른 과실중량, 종자생산량, 종자충실도 검정	48
다.	결과 및 고찰	48
(1)	성숙일수 및 후숙 일수에 의한 발아력 검정	48
(2)	성숙일수 따른 과실중량, 종자생산량, 종자충실도 검정	52

2. 착과부위에 따른 과실중량, 종자생산량, 종자 충실도 및 발아율 검정	60
가. 연구목적	60
나. 재료 및 방법	60
(1) 착과부위 따른 발아율 검정	60
(2) 착과절위에 따른 과실중량, 종자생산량	61
(3) 착과절위에 따른 발아성 검정	61
다. 결과 및 고찰	61
(1) 착과부위 따른 발아율 검정	61
(2) 착과절위에 따른 과실 중량, 종자생산량, 종자충실도 검정	62
(3) 착과절위에 따른 발아성 검정	64
3. 대과종 및 중과종 적정 착과수 설정	67
가. 연구목적	67
나. 재료 및 방법	67
(1) 대과종 및 중과종 주당 적정 착과수 설정	67
다. 결과 및 고찰	67
(1) 대과종 및 중과종 주당 적정 착과수 설정	67
4. 수박종자의 발아력 증진을 위한 priming 조건 구명	68
가. 연구목적	68
나. 재료 및 방법	69
(1) 수박 종자의 발아적온 검정	69
(2) 종피/ 배의 비율이 종자의 발아율에 미치는 영향	70
(3) 수박 종자의 priming 처리조건 구명	70
(4) Priming 처리에 따른 종자활력	71
(5) 발아온도에 따른 종자활력	71
다. 결과 및 고찰	71
(1) 수박종자의 발아성 구명	71
(2) 종피/ 자엽 비율이 종자의 발아율에 미치는 영향	72
(3) 수박 종자의 priming 처리조건 구명	76
(4) Priming 처리에 따른 종자 활력	78
(5) 발아온도에 따른 종자 활력	87
5. 필름코팅 피복물질 및 첨가농도에 따른 발아율 검정	105
가. 연구목적	105
나. 재료 및 방법	105
다. 결과 및 고찰	105
6. 수박종자의 발아력 증진을 위한 SMP 처리조건 구명	108
가. 연구목적	108
나. 재료 및 방법	109
(1) 수박 종자의 SMP 처리조건 구명	109
(2) SMP 처리에 따른 종자활력 검정	109

다. 결과 및 고찰	109
(1) 수박 종자의 SMP 처리조건 구명	109
(2) SMP 처리된 종자의 활력검정	114
7. 초분광 Vis/NIR, SWIR 영상기술을 이용한 수박종자 발아력 비파괴 측정기술	
개발	128
가. 재료 및 방법	128
(1) 초분광 가시광 및 적외선(Vis/Nir) 영상 획득 시스템	128
(2) 초분광 가시광 및 적외선(Vis/Nir) 반사광 영상 시스템 구축	129
(3) 단파적외선 초분광(Short wavelength infrared Reflectance : SWIR) 영상 획득	
시스템	132
(4) 단파적외선 초분광 반사광 영상 시스템 구축	132
(5) 데이터 분석	135
(6) 종자의 발아력 실험	136
나. 실험결과 및 고찰	137
(1) 초분광 가시광 및 적외선(Vis/Nir) 영상 획득 시스템을 이용한 수박종자의 분석	137
(2) 초분광 단파적외선(SWIR) 영상 획득 시스템을 이용한 수박종자의 분석	144

[제2세부과제]

1. 종자 처리기술 개발	149
가. 연구 방법	149
(1) 수박 종자 및 종자 처리 기자재 확보	149
1) 공시재료의 확보	149
2) 3배체 수박종자의 대량 매입	151
3) BFB $10^6 \sim 10^8$ cfu/ml 로 감염 접종한 종자 확보	151
(2) 실험용 주요기자재 확보 및 보완	152
1) TGT (다운도 발아상, Thermogradient Table)	152
2) DHT(건열처리장치, Dry Heat Treatment)	152
3) Water bath(온탕기, 항온수조)	152
나. 연구 결과	152
(1) 건열처리(대형 및 소형건열기기 이용) 에 의한 수박의 품종간의 처리온도 및	
기간에 대한생장반응성 세밀 평가 - TGT 및 사각밀폐용기 이용	152
1) 건열처리온도와 기간에 따른 수박종자의 유묘생장비교	153
2) 건열처리 유무에 따른 BFB 증상발현	153
3) 건열처리 후, 후숙 기간이 유묘생장에 미치는 영향	153
4) Incubator(항온기)내 사각밀폐 용기를 이용한 BFB 불활성화 건열처리에 따른	
수박종자의 유묘생장비교	157
(2) 건열처리(대형 및 소형기기 이용)에 의한 수박의 품종간의 처리온도 및 기간에	
대한 BFB 발현증상의 소멸정도 파악	160

1) TGT(다운도발아상) - Petri dish에 파종하여 품종간, 처리별 BFB 발현증상의 소멸정도 파악	162
2) Incubator(항온기)내 Incu Tissue(사각밀폐용기)에 파종하여 품종간, 처리별 BFB 발현증상의 소멸정도 파악	163
(3) 건열처리에 의한 수박의 품종간의 처리온도 및 기간에 대한 BFB 증상발현의 최적화를 위한다면 비교평가	163
1) TGT 이용 - Blue paper와 Perti-dish에 파종	163
2) BOD Incubator 내 6×6×10 사각밀폐용기에서의 실험	164
3) 선택배지를 사용하여 각종 처리에 따른 BFB균의 성장반응비교	164
4) Grow-Out Test	165
5) 격리온실에서 파종, 발아실험	165
(4) 습열처리-다양한 과정에 따른 처리종자의 발아 및 활력변화	166
(5) ‘이편한’ 3배체수박종자의 처리반응	167
1) 종피 처리에 따른 발아촉진실험	167
2) 침종 여부 및 시간에 따르는 종자발아	167
3) BFB 균 접종종자에서의 건열에 의한 멸균확인	167
(6) 건조종자에 BFB균을 접종시에 접종효율제고를 위한 감압처리	168
다. 외국인 초청연사 강연 및 관련업체 연구자 및 대농민 강연회	169
2. BFB (Bacterial Fruit Blotch)균 분리·수집, 발병 형태 조사	170
가. 연구 방법	170
(1) BFB (Bacterial Fruit Blotch)균 분리·수집, 발병 형태 조사	170
1) BFB균 수집 및 분리 동정	170
2) 이병엽을 조사 및 줄기 고사율 조사	170
나. 연구 결과	171
(1) BFB (Bacterial Fruit Blotch)균 분리·수집, 발병 형태 조사	171
1) 과실썩음병원균 균주수집 및 분리배양 실시	171
2) 수박과실썩음병원균 분리균주에 대한 병원성 검정	173
① 이병엽을 조사	173
② 줄기 고사율 조사	174
③ 수집된 과실썩음병원균 대한 병원성 검정 2차	175
3. BFB (Bacterial Fruit Blotch)균 유전 분석 및 유전체 분석	176
가. 연구 방법	176
(1) 사용균주 및 DNA 분리(1, 2, 3차 검정)	176
(2) 유연관계 분석(1, 3차 검정)	176
(3) Multi-locus 유전분석(2차 검정)	177
(4) DNA 염기서열 분석(2차 검정)	178
(5) RAPD analysis (2차 검정)	178
(6) 종 특이적 primer 선발	179
1) <i>A. citrulli</i> 대상 종 특이적 프라이머 선발 및 민감도 확인	179

2) <i>A. valerianellae</i> , <i>A. konjaci</i> 종 특이적 primer 선발	180
3) 식물체로부터 균 검출	181
(7) 수박과실썩음병 유전체 분석	181
(8) 수박과실썩음병 발생조사 및 토양 내 생존유무 검정	181
(9) 박과작물에 대한 과일썩음병균 균주별 교차병원성 검정	181
나. 연구 결과	182
(1) 유연관계 분석 1차 검정	182
(2) 유연관계 분석 2차 검정	190
1) Multi-locus 유연관계 분석	190
2) RAPD 분석을 통한 DNA fingerprinting 분석	195
(3) 유연관계 분석 3차 검정	197
(4) 종 특이적 primer 선발 결과	197
1) <i>A. citrulli</i> 대상 종 특이적 프라이머 선발 및 민감도 확인	197
2) <i>A. valerianellae</i> , <i>A. konjaci</i> 대상 종 특이적 프라이머 선발	200
3) 식물체로부터 균 검출	203
(5) 수박 과실썩음병균 유전체 분석 결과	203
(6) 수박 과실썩음병 발생조사 및 토양 내 생존 여부 확인	212
(7) 박과작물에 대한 과일썩음병균 균주별 교차병원성 검정 결과	213
4. BFB (Bacterial Fruit Blotch)균 감압처리 및 감염 종자 검정	214
가. 연구 방법	214
(1) BFB균 감압처리	214
(2) 감압처리 제작기술 이전(국립원예특작과학원 → 강원대)	215
(3) BFB균 감염 종자 검정	215
(4) 수박 포장에서의 인공수정을 통한 감염 종자 확보	215
나. 연구 결과	216
(1) BFB균 감압처리	216
(2) 감압처리 제작기술 이전(국립원예특작과학원 → 강원대)	217
(3) 수박 포장에서의 인공접종을 통한 BFB균 종자 감염 경로 확인	218
5. 각종 BFB (Bacterial Fruit Blotch)균의 병원성 검정	219
가. 연구 방법	219
(1) 수박 종자 확보	219
(2) 각 균주의 병원성 활력 테스트	219
나. 연구 결과	219
6. 감염종자 멸균처리 기술개발/무균종자 생산 및 종자처리 기술 개발	221
가. 연구 방법	221
(1) 고온처리기술 활용(건열 및 습열 처리)	221
나. 연구 결과	221
(1) 고온 처리 방법별 발아율 테스트	221
(2) 습열처리를 이용한 BFB 감염 수박종자의 멸균 효과 테스트	222

7. 저온 플라즈마를 이용한 소용량 종자소독법 개발	223
가. 연구방법	223
(1) 종자소독용 저온 플라즈마 장비 제조	223
(2) 수박종자 발아에 영향을 미치지 않는 플라즈마 적정 조건 실험	224
(3) 저온 플라즈마 처리의 종자 발아 최적조건 검정	224
(4) 저온 플라즈마 처리 후 수박종자 내부 온도 변화 및 발아율 측정	224
(5) 무처리군 종자 내부 세균 감염 확인	224
(6) RF 플라즈마의 수박 종자 내·외부의 세균 사멸 효과 확인	225
(7) 전력 변화에 따른 세균 사멸 효과 확인	225
(8) 주입 가스 변경을 통한 종자내 플라즈마 처리 실험	225
(9) 플라즈마 처리된 수박 종자 발아율 확인	225
나. 연구 결과	226
(1) 수박종자 발아에 영향을 미치지 않는 플라즈마 적정 조건 실험	226
(2) 저온 플라즈마 처리의 종자 발아 최적조건 검정	227
(3) 저온 플라즈마 처리 후 수박종자 내부 온도 변화 및 발아율 측정	227
(4) 무처리군 종자 내부 세균 감염 확인	228
(5) RF 플라즈마의 수박 종자 내·외부의 세균 사멸 효과 확인	230
(6) 전력 변화에 따른 세균 사멸 효과 확인	232
(7) 주입 가스 변경을 통한 종자 내 플라즈마 처리 실험	235
(8) 플라즈마 처리된 수박종자 감염세균 살균효과 및 수박종자 발아율 검정	237
1) 건진 및 감염 종자 세균 사멸 효과 확인	237
2) 플라즈마 처리 발아율 측정 실험 결과	239
8. 저온플라즈마를 이용한 대용량 종자소독법 최적화 조건 구축	239
가. 연구 방법	239
(1) 대용량 종자 처리를 위한 저온플라즈마 시스템 최적화	239
(2) 대용량 종자 처리를 위한 저온플라즈마 시스템 공정의 최적화	240
나. 연구 결과	240
(1) 대용량 종자 처리를 위한 저온플라즈마 시스템 최적화 조건 구축	240
(2) 대용량 종자 처리를 위한 저온플라즈마 시스템 공정의 최적화	241
9. 유용미생물 활용 생물적 방제	243
가. 연구 방법	243
나. 연구 결과	244
10. 화학약제 활용 방제	247
가. 연구 방법	247
나. 연구 결과	247
11. 나노화합물을 활용한 BFB균 항균활성 검정	260
가. 연구 방법	260
나. 연구 결과	260

12. 차아염소산수를 이용한 BFB균 살균효과 검정	270
가. 차아염소산수를 이용한 BFB균 살균효과 1차 검정	270
(1) 연구 방법	270
(2) 연구 결과	270
나. 차아염소산수를 이용한 BFB균 살균효과 2차 검정	283
(1) 연구 방법 및 결과	283
다. 지하수 와 차아염소산수 혼용처리에 의한 BFB균 살균효과 검정	285
(1) 연구 내용 및 결과	285
13. 플라즈마 무처리 감염종자의 PCR 검정을 통한 마커 개발 예비실험	285
가. 연구 내용 및 결과	285
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	287
1. 연차별 목표 달성도	287
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	290
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	291
제 7 장 참고문헌	292
<첨부> 특허, 논문 및 시장분석 보고서	301

제 1 장 프로젝트의 개요 및 성과목표

1. 연구개발의 목적

우리나라가 종자 수출국으로서의 현 위상을 더 한층 제고하고 수출량을 증대하기 위해서는 수출대상국에 적합한 품종개발이 최우선이지만 이에 못지않게 중요한 것이 유전-육종적 특성 구별성 (distinctiveness), 균일성(uniformity), 안정성(stability)을 유지하기 위하여 무균종자를 생산하는 기술 개발을 통하여 종자의 품질을 높이고자 한다. 따라서 본 연구는 개발되는 품종 및 기존의 수출되는 품종을 대상으로 최상의 종자를 공급하는 체계적이고도 일관적인 기술을 개발하여 고품질 종자의 지속적인 안정공급에 기여코자 함

2. 연구개발의 필요성

종자의 품질은 유전적 조성 및 육종적 특성, 채종환경, 채종 및 탈종(脫種) 방법, 종자의 정선(精選) 및 품질관리방법, 종자의 다양한 가공(加工) 처리에 따른 품질 향상 등으로 대분할 수 있다. 일례로 우수한 특성을 지닌 품종(종자)이라고 하더라도 치료가 매우 어렵거나 불가능한 종자전염병에 감염되어 있는 경우 아예 수출입 대상국의 통관에서 불합격 처리되어 고가의 종자가 그대로 폐기처분되는 경우가 매우 흔히 발생하고 있는데 이들 중의 대표적인 병해가 박과채소 종자에서의 오이녹반모자이크바이러스(*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV)와 수박의 과실썩음병(*Bacterial fruit blotch*, BFB)으로 매년 막대한 양의 종자가 세계적으로 폐기처분되고 있는 실정이다. 가까운 일본의 경우 BFB가 일본 국내에서도 여러 차례에 걸쳐 발병한 사실이 있는 병이지만, 수입 통관 시 규제 대상에 올라 있고, 우리나라에서는 아직 검토 중으로 이에 대한 확고한 결정을 내리지 못하고 있는 단계이다. 그러나 이 병의 심각성이 널리 알려지고, 간략한 간이검출(진단)방법이 개발되면서 세관에서의 검역이 차후 강화될 것임을 쉽게 추정할 수 있다.

박과채소에서의 과실썩음병(BFB)은 박과채소류 전반에 걸쳐 모두에서 발생하지만, 완숙과(完熟果)를 이용하는 수박과 멜론에 특히 결정적 피해를 끼친다. BFB는 이미 오래 전부터 그 발생이 보고되어 왔지만 1998년 이후 미국에서의 대발생 이후 세계적으로 확산 일로를 거쳐 최근에는 우리나라는 물론이고, 우리나라 박과채소종자의 주요 채종장소인 중국, 태국, 동남아국가에서도 폭 넓게 발생하고 있어서 막대한 피해를 초래하고 있다. BFB는 전형적인 세균성 질병으로 오염종자가 주 전염원이지만 세균성이어서 완치용 농약도 개발된 바 없으며, 특히 상당수의 다른 병균이나 virus와는 달리 세균이 종피는 물론이고 종자의 내부 깊숙이까지 분포하므로(자엽, 유아, 유근), 설사 좋은 농약이 개발된다고 하더라도 반투성 내종피(내주피+배유퇴화층)의 원형직막을 통과해 들어가서 세균을 사멸할 수 없으므로 일단 감염이 확인된 종자들은 100% 폐기처분하도록 규정되어 있다. 시판용 종자에서의 BFB균의 검사는 채종집단별(seed lots)로 50,000립을 검사하여서 단 하나의 이병(罹病)개체라도 검출되면 이들 종자집단을 모두 폐기 처분하여야 하므로 그 손실은 실로 막대하다고 할 수 있다. 최근 검사에 소요되는 시료수(종자수)를 축소하는 경향이 있어서 이 또한 우려의 대상이 되고 있다. 따라서 감염종자에서 효과적인 “BFB 무균처리기술”을 개발한다면 그 성과가 금액으로 환산하기 어려울 정도로 클

것임도 쉽게 추정할 수 있다. 세계적으로도 BFB를 국가 특정위해질병으로 선언하여 특별한 관리를 하고 있는 국가수도 빠르게 증가하고 있기도 하다(일본, 이태리, 터키 등).

BFB에 관한 연구는 미국에서 주로 수박을 중심으로 상당한 진전을 보이고 있다. 그러나 미국의 경우 수박을 거의 접목재배하지 않으므로 95% 이상 접목재배를 하고 있는 아시아나 유럽국가에서는 동일한 BFB 이병성인 다양한 종류의 수박과 멜론 등에 사용되는 대목에서의 독립적 연구가 동반되지 않으면 연구의 실용가치가 매우 떨어진다는 단점이 있다.

우리나라는 채소종자의 주요 수출국이다. 특히 최근 3년 사이에 괄목할만한 수출 신장을 보인 것으로도 유명하다. 수박종자의 경우를 보더라도 2011년에 비해서 2012년에는 총 수출량이나 수출액에서 5배 이상 신장한 기록을 보이고 있다(한국종자협회 2013년 자료). 그러나 이들 종자는 국내에서 채종한 것이 아니고, 90% 이상이 중국을 위시한 동남아 국가 등에서 채종되어 국내로 반입된 후 다양한 정선-선별-처리과정과 포장을 거쳐서 국내이용 및 재수출되고 있는데 최근에는 이들 국가들에서도 BFB 발생 빈도가 급증하고 있어서 근본적 대책 수립이 그 어느 때보다도 시급한 실정에 있다. 종자에 감염된 BFB균은 4℃~30℃에서는 종자가 살아있는 한 26개월 이상이나 정상적인 전염가능 병원성을 유지하고 있어서 특별한 종자무균처리기술의 개발 및 박과채소별 선택적용이 무엇보다 시급한 실정이며, 국내 수박 종자의 대부분은 중국, 동남아시아 등 노동력이 저렴하고 BFB 감염 적정 지역에서의 채종이 일반화되어 있고, 최근 고품질, 고기능성, 친환경재배와 온난화 등의 영향으로 세균병 발생증가 등을 감안할 때 국내 급속 확산과 방제비용 증가, 민원발생이 충분히 예상됨에도 불구하고 병의 심각성에 대한 국내 인식과 정보가 부족하고 연구지원에 대한 기반이 제대로 조성되어 있지 않은 실정이다. 또한, 국내에서 과채류 중 생산량이 가장 많은 작물인 수박(농림축산식품부, 2014)에는 대략 25종의 다양한 병들이 발생하며 피해를 주고 있다(한국식물병리학회, 2009). 이들 중 과실썩음병, BFB (Bacterial fruit blotch)를 일으키는 *Acidovorax citrulli*는 1989년 미국의 조지아에서 처음 발견된 이후 유럽, 일본, 중국 등 전 세계적으로 수박을 비롯한 오이, 호박, 멜론 등의 많은 박과작물들을 재배 시 경제적으로 매우 큰 피해를 주고 있으며(Burdman *et al.*, 2012, Schaad *et al.*, 2008, Shirakawa *et al.*, 2000) 국내에서는 전북 고창 수박 재배지역에서의 발생이 최초로 확인된 이후 현재까지도 지속적으로 병발생과 피해가 보고되고 있다(Seo *et al.*, 2006, Song *et al.*, 1991). 주로 감염된 종자를 통해 잎과 열매에 1차적인 병발생과 접목 시나 토양 내 이병잔재로부터의 감염을 일으키며 수확직전의 과실에 증상이 나타나고, 일단 발병하면 전반속도가 매우 빨라 피해가 급속히 증가한다(Dutta *et al.*, 2012, Walcott *et al.*, 2003). 하지만 이에 대한 병 관리 대책으로 가장 효과적인 것으로 알려진 병저항성 품종의 개발은 *A. citrulli*의 큰 유전적 다양성으로 인해 그 효과가 미비하다(Hopkins *et al.*, 2002, Walcott *et al.*, 2008). 이를 극복하기 위해 많은 연구자들이 세균학적, 병리학적 특성 및 유전학적 다양성에 관련된 연구를 수행해왔다. Schaad 등(2008)은 박과작물의 식물병원균인 *A. avenae* subsp. *citrulli*에 대해 다른 *Acidovorax* 속 식물병원균들과는 다른 특성들을 확인하고 개별종인 *A. citrulli*로 부를 것을 제안했다. Walcott 등(2004)은 *A. citrulli* 집단 내에는 주로 수박 이외의 기주로부터 분리한 균주들로 구성된 그룹I과 수박 분리균이 대다수를 차지하는 그룹II가 존재함을 보고했다. 또한, Feng 등(2009)은 multi-locus DNA 염기서열을 이용한 유전적 다양성 분석을 통해 전 세계적으로 분포하는 *A. citrulli* 집단을 크게 수박과 멜론 분리균의 비율이 비슷한 CC1과 수박 분리균이 우세한 CC2 그룹으로 나뉘었음을 확인하였다. 이들 연구를 통해 수박과 멜론으로부터 분리된 전 세계의 *A. citrulli* 집단 균주들이 각 그룹으로 나뉘어져 기주와 관련된 유전적 다양성이 존재함을

확인하였으나 이들 연구에 포함된 한국 수박 분리균은 1균주 뿐이었으며, CC2 그룹에 포함된다는 점을 확인 할 수 있었을 뿐이었다. 현재까지 국내 *A. citrulli* 집단과 관련된 연구는 주로 수박, 멜론, 오이 등에서 최초 발생이 보고된 상태이며, 기주별 발생 특성에 따른 유전적 다양성에 관련된 연구는 거의 전무한 실정이다.

한편, 최초 콘 샐러드에 있어서 종자 및 토양전염을 통해 병을 일으키는 것으로 알려졌던 *A. valerianellae* (Gardan *et al.*, 2003)는 박과작물에서도 세균검은점무늬병, bacterial black spot을 일으키는 것이 보고되었다(Han *et al.*, 2012). 국내에서도 수박포장에서 *A. citrulli*에 의한 병징과 유사하게 잎에 형성된 반점으로부터 병 발생이 최초 보고되었으며 인위적 접촉을 통해 수박으로부터 분리된 *A. valerianellae*가 오이, 호박, 멜론 및 대목용 박에 병을 일으킬 수 있음이 확인되었고(김., 2016), 최근 Song 등(2015)에 의해 수박, 오이, 멜론 육묘장 및 재배포장에서의 병 발생이 보고됐다. *Acidovorax* 속의 또 다른 종인 *A. konjaci*는 국내 무에서 bacterial black rot을 일으키는 것이 처음 보고 되었지만(Myung *et al.*, 2010) 최근 국내 오이에서도 세균검은점무늬병을 일으키는 것이 확인되었다(Back *et al.*, 2016). 이들 유사종들은 *A. citrulli*와 박과작물에서 동시발생 가능성이 있는데 *A. citrulli*가 일으키는 BFB의 병징 및 병원균과 유사하기 때문에 잘못 동정되는 경우가 종종 발생해(Song *et al.*, 2015) 병방제 대책을 세우는데 혼선을 초래할 우려가 있어 이들을 구분할 신속 정확한 종 동정방법의 개발이 필요하다. *A. citrulli*는 종자전염을 하는 균으로 한번 발생하면 병의 전염속도가 매우 빠르고 수확 직전에 병징이 나타나 막대한 경제적 피해를 입힌다. 이를 예방하기 위해 건열 처리하여 종자를 소독하는 방법이 사용되고 있지만 건열 처리된 종자는 종자의 수명이 극도로 짧아지며 발아세와 발아율이 현저하게 저하된다(장 *et al.*, 1997). 또한 곰팡이 병해와는 달리 병 방제에 효과적인 유기합성 농약이 알려지지 않아 일단 발병 시 효과적인 방제대책을 수립하기가 매우 어려우므로(Gitaitis *et al.*, 2007) 감염된 종자의 선별 또는 육묘 시 이병주의 선별 및 제거가 바람직하다. *Acidovorax* 속 균주들의 토양 및 식물체로부터의 검출법으로는 Grow-out 육묘검정(Venette *et al.*, 1987), 반선택검정(Jones *et al.*, 2001, Schaad *et al.*, 2008), ELISA검정(Walcott *et al.*, 2000), PCR 기법 등이 알려져 있는데(Walcott *et al.*, 2000, Schaad *et al.*, 2000) 이들 중 육묘를 이용한 병원성 검정(USDA National Seed Health System (http://www.seedhealth.org/Other_Act.html, Method Cb1.1)에는 18-25일 정도가 소요되고(Venette *et al.*, 1987), 반선택배지를 이용한 검출기법은 정확한 종 동정이 어려우며(Schaad and Sechler, 1999, Zhao *et al.*, 2009), 혈청학적 기법은 매우 빠르나(Himananto *et al.*, 2011; Hui *et al.*, 2007; Walcott and Gitaitis, 2000; Walcott *et al.*, 2006) 항체의 비특이성과 관련된 오류가 발생하는 것으로 알려져 있다(Feng *et al.*, 2013). 반면 PCR 기법은 이들 중 상대적으로 신속 정확한 결과물을 도출하는 것으로 알려져 가장 많이 활용되고 있다(Feng *et al.*, 2013).

종자 전염을 통해 전염되는 *A. citrulli*를 검출하기 위한 PCR 기법으로는 IMC-PCR (Immuno-capture PCR), MCH-PC (magnetic capture-hybridisation PCR technique) 등이 사용되었는데(Walcott *et al.*, 2000, Sano *et al.*, 1992, Zhao *et al.*, 2006, Xu *et al.*, 2008, Zhao *et al.*, 2009, Feng *et al.*, 2008) 많은 시간이 소요되거나 일부 균주에만 적용이 가능하다는 문제점이 있다. 또한 Walcott 등(2000)이 16s rDNA 영역을 이용하여 개발한 종 특이적 마커 WFA1/WFB2는 매우 민감하여 *Acidovorax* 속의 종동정을 위해 광범위하게 사용되었지만 *A. konjaci*, *A. cattleyae* 등의 가까운 유연관계의 균들이 함께 검출되는 비 특이성을 나타냈다. 한편 동시감염 가능성이 있는 여러 종류의 병원균의 동시분석을 위해 multiplex PCR 기법이 개발되었는데

여러 primer를 이용하여 한번의 PCR에 의해 동시에 균을 동정하고 검출하는 것이 가능해 분석 시간을 단축할 수 있다는 장점이 있다(Elnifro *et al.*, 2000). 하지만 *Acidovorax* 속 균들에 대해 multiplex PCR기법을 적용한 연구는 보고된 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 박과 작물에서 과실썩음병을 일으키는 국내 *A. citrulli*집단에 대한 효율적인 방제전략을 수립하는데 기초 자료로 활용하고자 MLST (Multi-locus Sequence Type) 분석과 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 분석을 통한 분리 기주별 종내 유전적 다양성 분석을 실시하고, 박과작물로부터 *A. citrulli*의 신속하고 정확한 검출을 위한 종 특이적 프라이머를 개발하고 PCR 활용기법의 최적화를 통해 종합적인 병 진단 시스템을 구축하고자 한다. 따라서 국내 수박의 안정적 재배, 방제비용의 감소, 건전종자와 건전묘 생산으로 종자산업과 육묘산업의 지속적 성장과 발전을 위해서는 국내 실정에 맞는 신속정밀진단법을 확립, 병 발생생태 해석에 의한 국내정착 조기 차단, 병 발생 시 긴급처방이 가능한 방제용 약제등록 및 주기적인 교육과 홍보로 BFB의 피해를 최소화할 필요가 있다, 최근 육묘장과 시설재배 포장에 새로운 병해인 수박 과실썩음병이 발생하였으며 확산 가능성이 높아, 이에 대처하기 위한 체계적인 연구가 필요한 실정이다. 수박 과실썩음병 발생 생태 및 방제기술 개발 보고서, 2013; 국립원예특작원). 신물질을 이용한 BFB방제 효과를 확인 할 예정이다.

3. 연구개발 범위

가. 연차별 연구개발 범위

[제1세부과제]

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
최종 목표 : 우량종자 생산을 위한 채종, 종자선별 및 가공 기술 개발			
1차년도	2013	우량종자 생산을 위한 수박 채종조건 확립 및 종자처리 기술개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 개화일수와 후숙일수의 상호요인에 의한 발아율과 종자 활력 구명 ○ 착과절위에 따른 과실중량, 종자생산량, 종자충실도, 발아성 검정 ○ Priming 처리조건 구명 ○ 필름코팅 피복물질 및 첨가농도에 따른 발아율 검정 ○ 초분광 Vis/NIR 영상기술을 이용한 수박종자 발아력 비파괴 측정기술 개발
2차년도	2014	우량종자 생산을 위한 수박 채종조건 확립 및 종자처리 기술개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 대과종, 중과종 적정 과수설정 ○ 착과부위에 따른 과실중량, 종자생산량, 종자 충실도 및 발아율 검정 ○ SMP 처리조건 구명 ○ 초분광 SWIR 영상기술을 이용한 수박종자 발아력 비파괴 측정기술 개발
3차년도	2015	우량종자 생산을 위한 수박 채종조건 확립 및 종자처리 기술개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내 및 해외 수박채종지의 온도, 일조량, 강우량 분석 ○ 적정 줄기수 설정 ○ 발아촉진을 위한 drum priming 처리조건 구명 ○ 병원균에 대한 항균 활성과 발아촉진 유용미생물을 혼합하여 시너지 효과 검정 ○ 초분광 형광 영상기술을 이용한 수박종자 발아력 비파괴 측정기술 개발
4차년도	2016	우량종자 생산을 위한 수박 채종조건 확립 및 종자처리 기술개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 우량종자 생산에 최적 재식간격을 구명 ○ 재식간격에 따른 과실중량, 종자생산량, 종자충실도, 발아력 검정 ○ 중, 대과종 적정 착과절위 구명 ○ Priming, drum priming 및 SMP 효율성 검정 ○ 초분광 Raman 영상기술을 이용한 수박종자 발아력 비파괴 측정기술 개발

[제2세부과제]

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
최종 목표 : 세균성과실씩음병(BFB) 방제기술 확립 및 내병성 유전자원 개발			
1차년도	2013	수박의 세균성 과실씩음병(BFB) 방제기술, 종자무균처리 및 내병성 유전자원 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ BFB의 균 분리·수집 및 병원성검정 ○ 종자 검정법 구축; 종자감염 및 종자감염의 경로 확인 ○ 발병형태, 토양내 생리연구 ○ 내병성 유전자원 확보 및 내병성 계통 개발 ○ 채종종자의 품질평가
2차년도	2014	수박의 세균성 과실씩음병(BFB) 방제기술 종자무균처리 및 내병성 유전자원 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ BFB의 균 분리·수집 및 병원성검정; 병원균의 유전 분석; 국내외의 우점균 확인 ○ BFB균 종자 검정법 구축: 종자감염 및 종자감염 외 경로 연구 ○ BFB균 감염 종자 검정 및 진단법 개발 ○ 수박 및 수박대목 품종을 대상으로 한 각종 BFB균의 병원성 검정 ○ 감염종자 멸균처리 기술개발/무균종자 생산 및 종자처리 기술 개발 ○ 유용미생물 활용 생물적 방제 ○ 화학약제 활용 방제 ○ Plasma 기술, 유용 신물질, 천연물 등을 활용한 방제
3차년도	2015	수박의 세균성 과실씩음병(BFB) 방제기술 종자무균처리 및 내병성 유전자원 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ BFB의 균 분리·수집 및 병원성검정; 병원균의 유전 분석; 국내외의 우점균 확인 ○ BFB균 발병 형태 및 토양내 생리 생태 ○ BFB균 종자 검정법 구축: 종자감염 및 종자감염 외 경로 연구 ○ BFB균 감염 종자 검정 및 진단법 개발 ○ 수박 및 수박대목 품종을 대상으로 한 각종 BFB균의 병원성 검정 ○ 감염종자 멸균처리 기술개발/무균종자 생산 및 종자처리 기술 개발 ○ 유용미생물 활용 생물적 방제 ○ 화학약제 활용 방제 ○ Plasma 기술, 유용 신물질, 천연물 등을 활용한 방제
4차년도	2016	수박의 세균성 과실씩음병(BFB) 방제기술 종자무균처리 및 내병성 유전자원 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ BFB의 균 분리·수집 및 병원성검정; 병원균의 유전 분석; 국내외의 우점균 확인 ○ BFB균 발병 형태 및 토양내 생리 생태 ○ BFB균 종자 검정법 구축: 종자감염 및 종자감염 외 경로 연구 ○ BFB균 감염 종자 검정 및 진단법 개발 ○ 수박 및 수박대목 품종을 대상으로 한 각종 BFB균의 병원성 검정 ○ 감염종자 멸균처리 기술개발/무균종자 생산 및 종자처리 기술 개발 ○ 유용미생물 활용 생물적 방제 ○ 화학약제 활용 방제 ○ Plasma 기술, 유용 신물질, 천연물 등을 활용한 방제

4. 연구성과 목표 대비 실적

[제1세부과제]

가. 연구개발 성과목표 및 실적

(단위 : 건수)

성과목표	특허		논문		유전자원		학술발표		인력양성
	출원	등록	SCI	비SCI	수집	등록	국내	국외	
최종목표	4	4	4	14	-	-	-	-	8
1차년도(2013)	목표	-	-	2	-	-	-	-	-
	실적	-	-	1	-	-	-	-	-
2차년도(2014)	목표	1	-	1	1	-	-	-	-
	실적	0	-	1	0	-	-	-	-
3차년도(2015)	목표	-	1	-	2	-	-	-	1
	실적	-	0	-	2	-	-	5	2
4차년도(2016)	목표	1	-	1	1	-	-	-	1
	실적	2	-	0	0	-	-	1	0
소계	목표	2	1	2	6	-	-	-	2
	실적	2	0	1	3	-	-	6	2
종료 1차년도 (2013)	-	-	-	1	-	-	-	-	-
종료 2차년도 (2014)	0	-	1	0	-	-	-	-	-
종료 3차년도 (2015)	-	0	-	2	-	-	5	-	2
종료 4차년도 (2016)	2	-	0	0	-	-	1	-	0
소 계	2	0	1	3	-	-	6	-	2
합 계									

나. 품종개발 : 해당사항 없음

구 분	품종 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기 타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	

다. 특허

구 분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기 타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
지식재산권	수박우량종자생산 방법	한국	강점순박은지이규빈	2015.10.14	10-2015-0143567				
지식재산권	채소 종자의 고온 발아 촉진 방법	한국	강점순박은지이규빈	2015.10.14	10-2015-0143560				

라. 논문

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)
1	Nondestructive Evaluation for the Viability of Watermelon (Citrullus lanatus) Seeds Using Fourier Transform Near Infrared Spectroscopy(2013)	한국농업기계학회	Santosh Lohumi	38(4)	국내	한국농업기계학회	비SCI급
2	Detection of Cracks on Tomatoes Using a Hyperspectral Near-Infrared Reflectance Imaging System(2014)	Sensors	이훈수	14	국외	MDPI	SCIE
3	우량 수박종자 생산을 위한 적정 성숙일수 및 후숙일수 확립(2015)	한국환경과학회지	박은지	24(12)	국내	한국환경과학회	비SCI급
4	수박의 착과절위가 종자 발아 및 유묘활력에 미치는 영향(2015)	한국환경과학회지	박은지	24(12)	국내	한국환경과학회	비SCI급
5	수박종자의 Osmotic Priming 처리가 종자활력 및 유묘생장에 미치는 영향(2016)	한국환경과학회지	박은지	25(4)	국내	한국환경과학회	비SCI급

마. 분자마커 : 해당사항 없음

번호	특성	보유건수	주요내용	활용년도

바. 유전자원 : 해당사항 없음

번호	특성	수집	등록			기타
			등록인	등록일	등록번호	

사. 국내매출액 : 해당사항 없음

번호	일자	판매처	매출액

아. 종자수출액/수입대체 효과 : 해당사항 없음

종자수출액(USD)			
번호	수출품목	수출액	
		수출일	수출국
			수출금액

자. 기술이전 : 해당사항 없음

번호	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)

차. 마케팅 전략수립 보고서 : 해당사항 없음

기타 활용 및 홍보실적(단행본 발간, CD 제작 등)			
번호	일자	활용명칭	활용내역

카. 인력양성

연구인력 활용/양성 성과													
번호	분류	기준년도	인력양성 현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	강원권
1	졸업논문	2016년		1				1			1		
2	졸업논문	2016년			1			1			1		
3	졸업논문	2017년	1				1				1		

타. DB구축 : 해당사항 없음

번호	DB명	주요내용	구축년도	기타

파. DH계통개발/자원분양 : 해당사항 없음

구분	계통명	계통특성	분양처	기타

하. 서비스 : 해당사항 없음

서비스(성분분석, 분자마커, 병리검정, 표현형검정)				
번호	서비스 종류	점 수	주요내용	기타

[제2세부과제]

가. 연구개발 성과목표 및 실적

(단위 : 건수)

성과목표	특허		논문		유전자원		학술발표		인력양성
	출원	등록	SCI	비SCI	수집	등록	국내	국외	
최종목표	3	3	5	13	-	3	-	-	9
1차년도(2013)	목표	-	-	2	-	-	-	-	-
	실적	-	-	1	-	-	-	-	1
2차년도(2014)	목표	-	-	2	-	-	-	-	1
	실적	-	-	0	-	-	-	-	2
3차년도(2015)	목표	-	1	1	-	-	-	-	1
	실적	-	-	5	-	-	-	-	2
4차년도(2016)	목표	1	-	1	1	-	1	-	1
	실적	0	-	2	1	-	1	-	1
소계	목표	1	-	2	6	-	1	-	3
	실적	0	-	2	7	-	1	-	6
종료 1차년도 (2013)	-	-	-	1	-	-	-	-	1
종료 2차년도 (2014)	-	-	-	0	-	-	-	-	2
종료 3차년도 (2015)	-	-	0	5	-	-	-	-	2
종료 4차년도 (2016)	0	-	2	1	-	1	-	-	1
소 계	0	-	2	7	-	1	-	-	6
합 계									

나. 품종개발 : 해당사항 없음

구 분	품종 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기 타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	

다. 특허 : 해당사항 없음

구 분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기 타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	

라. 논문

논문(국내외 전문학술지) 게재							
번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)
1	나노화합물을 이용한 <i>Acidovorax citulli</i> 및 식물병원성 미생물의 항균활성 효과검정 (2015)	식물병연구	김상우	21(1)	국내	한국식물병리학회	비SCI
2	국내 박과 작물에서 과실썩음병을 일으키는 <i>Acidovorax citulli</i> 집단의 유전적 특성 (2015)	식물병연구	송정영	21(2)	국내	한국식물병리학회	비SCI
3	수박과실썩음병을 일으키는 <i>Acidovorax</i> spp.에 대한 화학 약제의 항균활성 검정 (2015)	강원농업생명환경연구	김형승	27(3)	국내	강원대학교 농업생명과학연구원	비SCI
4	Antibacterial Effect of Nickel Nano particles on <i>Acidovorax citrulli</i> the Causal Agent of Bacterial Fruit Blotch of Cucurbits (2015)	강원농업생명환경연구	박미리	27(3)	국내	강원대학교 농업생명과학연구원	비SCI
5	Nanoparticles as alternative pesticides: Concept, manufacturing and activities (2015)	한국균학회지	아흐메드	43(3)	국내	한국균학회	비SCI
6	First report of bacteria black spot disease in cucumber caused by <i>Acidovorax konjaci</i> in Korea (2016)	Plant Disease	백창기	100(7)	국외	The American Phytopathological Society	SCI
7	Biological Control of Bacterial Fruit Blotch of Watermelon pathogen <i>Acidovorax citrulli</i> with Rhizosphere Associated Bacteria (2016)	The Plant Pathology Journal	마헤시	-	국외	한국식물병리학회	SCIE
8	최근 문제시 되는 수박 과일썩음병에 대한 방제효과 분석 (2016)	한국농약과학회지	백창기	20(1)	국내	한국농약과학회	비SCI
9	Seed Germination and Seedling Characteristics of 'SS-Ggulplus' Watermelon as Affects by SMP Conditions (2013)	생명자원과학연구논문집	이정명	32	국내	경희대학교	비SCI

마. 분자마커 : 해당사항 없음

번호	특성	보유건수	주요내용	활용년도

바. 유전자원

번호	특성	수집	등록			기타
			등록인	등록일	등록번호	
1	<i>Acidovorax konjaci</i> 13-024	전라남도(영암)	백창기	2016. 7. 25	KACC 18959	

사. 국내매출액 : 해당사항 없음

국내 종자 판매 실적			
번호	일자	판매처	매출액

아. 종자수출액/수입대체 효과 : 해당사항 없음

종자수출액(USD)				
번호	수출품목	수출액		
		수출일	수출국	수출금액

자. 기술이전 : 해당사항 없음

기술이전					
번호	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)

차. 마케팅 전략수립 보고서 : 해당사항 없음

기타 활용 및 홍보실적(단행본 발간, CD 제작 등)			
번호	일자	활용명칭	활용내역

카. 인력양성

연구인력 활용/양성 성과													
번호	분류	기준년도	인력양성 현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	강원권
1	졸업논문	2014년	1	1	1		3		1				2
2	졸업논문	2016년	2				2						2
3	졸업논문	2017년		1			1						1

타. DB구축 : 해당사항 없음

DB구축				
번호	DB명	주요내용	구축년도	기타

과. DH계통개발/자원분양 : 해당사항 없음

DH계통개발				
구분	계통명	계통특성	분양처	기타

하. 서비스 : 해당사항 없음

서비스(성분분석, 분자마커, 병리검정, 표현형검정)				
번호	서비스 종류	접 수	주요내용	기타

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내 제품생산 및 시장 현황

- 국내 수박 재배면적은 1995년 정점으로 급격히 감소하여 2000년 이후에는 연평균 감소
- 2010년 수박재배 면적은 16,396ha 이며, 노지면적은 줄고 시설수박은 꾸준히 증가
- 국내의 수박시장 규모는 약 120억원이며, 수입액은 1억원 정도로 추정(종자협회, 2011)
- 국내시장 국산품종 점유율은 97% 이상으로 국산화 비율이 높음
- 수박종자의 수입은 적으나 국내시장은 이미 포화상태
 - 해외시장의 진출 필요성 제기
- 고 활력, 고품질, 고기능성, 식품안정성, 고부가가치 품종요구도 증대
 - 해외의 수박 선호도가 고당도로 이동 중이며, 이에 따른 우량종자의 생산이 필요
 - 미국의 경우, 라이코펜 리더(Lycopene Leader)라는 품종으로 수박의 기능성 활용 홍보
 - 전 세계 적으로 수박 품종 요구도 재래종에서 고가의 F1으로 약 80% 까지 상승
 - 고가의 F1품종 선호도 증가로 고부가가치 종자개발 필요성 증대
- 한국의 수박종자 산업은 품종개발은 세계적 수준이나 종자처리 및 가공분야는 열악
 - 2008년 몬산토의 R&D 투자는 9.8억 달러로 국내 종자시장규모의 2배를 능가
- 현재 우리나라의 종자가공 기술은 이미 상용화 된 분야도 있으나 아직까지 연구 개발단계
- 종자가공 처리 및 비파괴 우량종자 선별분야 기술의 원천기술 확보가 시급
- 이와 같이 연구와 축적된 기술을 바탕으로 수박종자의 가공 산업 활성화시킨다면 수출 활성화에 기여할 수 있을 것임
- 본 연구에 활용될 수 있는 기본적 멸균장치는 개발되어 있음. 그러나 BFB용으로는 각각의 작물에 대한 사용방법이나 기준이 전혀 개발되지 않고 있음.

2. 국외 제품생산 및 시장 현황

- 수박은 전 세계 채소종자 시장의 주요 품목으로 대표적인 글로벌 작물임
- 수박 재배면적의 지속적 확대
 - 전 세계 수박 재배면적 3,200,257 ha(2004) 대비하여, 2009년 20% 확대되었으며, 특히 중국에서 급속히 확대되어 2004년 대비하여 32%증가함
- 전 세계 및 아시아 시장에서 수박의 중요성
 - 전 세계 수박 생산량은 '08년 기분으로 95백만 톤으로 매년 꾸준한 증가율을 보이고 있으며 최대 수박생산국은 중국으로서 67백만 톤을 기록하고 있음
- 선진외국 종자가공 분야에 집중적인 연구 이루어짐
- 종자가공 처리의 선도 기업
 - 미국의 INCOTEC, 일본의 스미도 - 종자처리와 공정기술은 대외비임
- 외국 기술을 답습하는 모방형 종자처리 기술을 탈피하여 순수 국내기술에 의한 종자가공 기술의 확보가 절실
- 네덜란드를4 제외한 기타 국가에서는 한국 제품을 수입-이용하고 있음.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

[제1세부과제]

우량종자 생산을 위한 수박 채종조건 확립 및 종자처리 기술개발

1. 수박 성숙일수 및 후숙 일수에 의한 발아력 검정

가. 연구목적

종자의 건물 중이 최대가 되는 시점을 성숙종자라 하며(Harrington, 1959), 개화수분 후 종자 채취까지의 일수를 종자 채취일수라 한다. 일반적으로 성숙일수가 길수록 종자의 발아속도, 발아율, 수명 등이 좋아진다.

박과작물은 개화수분 후 45일 성숙된 종자가 최고의 활력을 보이며(Welbaum and Bradford, 1988), 발아력이 생성되기까지 개화수분 후 최소일수는 가지 20일, 토마토는 5~10일, 양파는 14일, 고추는 10일이 필요하다. 오이는 채종 후 10~20일의 후숙 처리가 필요하며, 호박은 25일, 참외는 10일간 후숙 처리하면 발아율과 발아세가 향상된다고 하였다(中村, 1982).

종자는 외견상 성숙되어도 발아력이 없는 경우가 있으며, 성숙후의 부가적인 성숙을 후숙(after ripening)이라 한다. 채소작물에서 채종 후 후숙은 종자의 속도를 균일하게 하고 충실도를 높여주는 효과가 있다.

무를 채종한 후 10일간 후숙 처리는 발아에 영향을 미친다고 하였고(有村, 1964), 安藤 (1930)은 수박에서 청과 수확시 보다 3~4일 더 완숙시켜 40일 이상 성숙과에서 수확하여 4~5일 후숙하면 발아율이 높아진다고 하였다. 당근, 양파, 파 종자도 예취 직후 통풍이 잘되는 장소에서 건조하는 것으로 후숙 효과를 얻을 수 있다고 하였다.

종자의 발아력을 향상시키기 위한 여러 가지 방법 중 육종과 선발이 가장 근원적인 방법이나 많은 비용과 시간이 소요되는 단점이 있다. 종자의 발아성은 종자 성숙과정중의 환경요인과 종자의 성숙일수에 따라 영향을 크게 받는다. 호박은 개화수분 후 50일, 박에서는 70일간 성숙된 과실을 수확하는 것이 높은 발아력을 보였다고 하여 종자의 성숙정도가 발아성에 관여하는 중요한 요인임을 증명하였다(Holmes, 1953).

멜론에서 종자의 성숙정도와 종자발아성과 관계를 규명하고자 한 연구는 있으나(Welbaum and Bradford, 1989), 수박에서는 실제 우량종자 생산에 적용할 만한 기준 설정에는 미흡한 점이 많았다. 채종 후 후숙 또한 수박 종자의 발아성에 관여하는 요인이나 이에 관한 연구도 없었다.

따라서 수박종자에서 높은 종자활력을 유지할 수 있는 적정 종자 성숙일수와 후숙일수를 구명하는 것은 우량종자 생산을 위해서 우선적으로 검토되어야 할 요인이다.

본 연구는 수박 종자의 성숙정도와 후숙일수가 발아력에 미치는 효과를 검토하여 적정 채종 방법을 모색하기 위해 수행되었다.

나. 재료 및 방법

(1) 성숙일수 및 후숙 일수에 의한 발아력 검정

본 실험에 사용된 수박은 농우바이오의 ‘스피드’ 였으며, 실험 장소는 경남 창원시 대산면 11월 비닐하우스에서 정식하여 재배하였다. 재식거리는 1m 였으며, 각 주당 2개의 줄기를 남기고 적심 하였고, 인공수분에 의해 과실은 18~23절 사이에 1과만 착과시켰다. 수박의 성숙일수에 따른 발아력을 조사하기 위하여 개화수분 후 30일, 40일, 50일 및 60일간 성숙된 과실을 채취하여 탈종 후 수세 및 건조시켰다.

또한 개화수분 후 30일, 40일, 50일 및 60일간 성숙된 과실을 수확하여 후숙 처리가 발아력에 미치는 영향을 조사하였다. 후숙 처리는 종자의 성숙정도에 따라 처리일수를 달리하였다. 30일 성숙종자에서는 0일, 10일, 20일 및 30일간 후숙 하였고, 40일 성숙종자는 0일, 10일, 20일간 후숙 처리하였다. 50일간 성숙된 종자는 0일, 10일간 후숙 하였고, 60일 성숙종자는 후숙하지 않고 탈종한 종자를 치상하여 발아력을 조사하였다. 발아조사는 30℃에서 항온기에서 50립씩 3반복으로 치상하여 발아력을 검정하였다. 또한 성숙일수와 후숙 일수가 수박종자의 활력에 미치는 영향을 조사하기 위해 BP 검정을 실시하였다.

BP 검정법에 의한 종자의 활력조사는 BP 검정용 용지인 heavy 용지와 regular 용지를 증류수에 흡습시켜 25℃에서 1일간 보관하였다. 그 후 수분을 적당히 제거한 heavy 용지에 100립의 종자를 동일한 간격으로 배열시킨 후 regular 용지를 덮어 30℃ 항온기에 치상하여 종자활력을 조사하였다. 종자활력 조사는 2회에 걸쳐 시행되었으며, 1차 조사는 치상 5일 후 정상 묘와 비정상묘, 불발아종자 등을 검정하였고, 최종조사인 2차 조사는 치상 14일 후에 실시하였다. 최종 조사일에는 하배축 길이, 하배축 직경, 뿌리수, 길이길이, 생체중 및 건물중을 측정하였다.

(2) 성숙일수 따른 과실중량, 종자생산량, 종자충실도 검정

품종은 ‘스피드’ 였고, 성숙일수와 후숙 일수는 실험 (1)의 방법과 동일하였다. 수박종자의 성숙일수와 후숙 일수가 수박 과실의 중량, 종자수, 종자크기, 천립중 및 전체종자중량에 대한 종피 및 자엽 비율에 미치는 영향을 조사하였다. 수박 과실의 중량과 종자수 및 종자크기 조사는 5개 과실을 3반복으로 조사하였다. 종자의 종단 직경과 종단 직경 조사는 Vernier Callipers를 이용하여 품종별 종자의 종/횡단 길이를 측정한 후 그 비율을 조사하였다. 또한 전체종자 중량에 대해 종피의 구성비율이 조사하기 위해 핀셋으로 100립의 종자를 3반복으로 종피와 자엽을 각각 분리하여 천칭한 값을 전체 종자 무게에 대한 자엽 및 종피 비율로 산출하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) 성숙일수 및 후숙 일수에 의한 발아력 검정

종자의 건조저항성은 건조저항성 종자(Orthodox seeds)와 비건조저항성 종자(Recalcitrant seeds)로 분류된다. 건조에 저항성이 있는 종자는 성숙 중반부터 건조 저항성이 서서히 증가하여 성숙후반기에 건조 저항성이 완전히 획득하게 된다. 비건조저항성 종자는 성숙 후에 종자를 건조시키면 발

아력이 상실된다. 수박은 건조저항성 종자로서 종자의 건조중이 최고에 도달했을 때가 채종적이라고 알려져 있다.

수박 종자를 성숙단계별로 채취하여 발아력을 조사한 결과이다(Table 1.1). 수박 종자의 발아성은 개화수분후의 성숙일수에는 큰 영향을 받지 않았지만 후숙 일수에는 유의성이 인정되었다.

‘스피드’ 수박은 개화수분 후 30일 성숙과를 후숙 시키지 않고 탈종하여 30°C에서 발아력을 검정한 결과 50%의 낮은 발아율을 보였다. 그러나 이들 종자를 10일간 후숙 처리하더라도 발아율이 92%로 증진되었다. 20일 후숙 처리는 10일과 30일 후숙 처리에 비해 유의성은 인정된다고는 볼 수 없으나 초기발아율이 향상되는 경향이였다. 전반적으로 개화수분 후 40일 성숙된 종자에서는 발아율이 높았으나, 개화수분 후 30일간 성숙된 종자는 발아력이 감소하였다. 이러한 결과는 Welbaum과 Bradford (1989)가 멜론종자는 개화수분 후 35일째 건물 중이 최대로 도달해 성숙상태에 이르나, 종자활력은 60일째까지 지속적으로 증가한다고 한 보고와 동일한 의미로 풀이된다.

개화수분 후 40일간 성숙종자의 후숙 처리는 최종발아율에는 큰 차이가 없었다. 그러나 개화수분 후 50일간 성숙종자를 후숙하면 후숙하지 않은 종자에 비해 초기발아율과 최종발아율이 약간 감소하는 경향을 보였다.



Fig. 1.1. Appearance of early growth of 'Speed' watermelon seeds in green house at 25°C

Table 1.1. Effect of days after anthesis(DAA) and fruit afterripening periods(FAP) on percent germination of 'Speed' watermelon seeds at 30°C.

Days after anthesis(DAA)	Fruit after ripening period (FAP)	Germination (%)	T ₅₀ (days)
30	0	50.2	3.12
	10	92.0	2.78
	20	94.6	1.82
	30	94.0	1.86
40	0	86.7	1.96
	10	89.1	1.83
	20	96.6	1.76
50	0	92.0	1.89
	10	88.6	1.87
60	0	86.8	1.98
LSD(0.05)		4.4	0.20
Significance			
DAA (A)		NS ^z	NS
FAP (B)		*	*
A × B		NS	NS

^z NS, *, **, *** Nonsignificant or significant at $P = 0.05, 0.01, \text{ or } 0.001$, respectively.

‘스피드’ 수박종자에서 종자활력을 극대화시킬 수 있는 최적 성숙도와 후숙 일수는 30일간 성숙된 종자를 20일간 후숙시킨 처리였다. 이러한 결과는 수박의 채종 방법 확립에 중요한 단초를 제공하고 있다. 수박을 개화수분 후 30일 성숙과를 조기 수확하여 후숙 시킴으로써 60일 채취하는 것보다 재배노력과 종자 생산단가를 현저히 절감시킬 수 있었다. 또한 토지이용율의 향상과 과실 성숙과정 중 각종 병해충의 위험성으로부터 탈피하여 채종 효율성이 향상될 것으로 판단된다.

본 실험에서 개화수분 후 30일간 성숙된 종자에서 발아율이 낮았던 원인은 건물중은 최고에 도달하여 생리적으로 성숙되었지만 배나 자엽이 형태적으로 미숙하여 발아율이 낮았던 것으로 해석된다. 이에 반해 60일간 성숙된 종자에서 발아율이 약간 저하되는 경향을 보였다.

또한 채종적기보다 늦게 수확하면 종자내의 높은 수분함량에 의하여 과실이 변질되고 종자는 세포막 치유조직의 손상으로 퇴화가 진행된 결과 발아력이 저하된 것으로 풀이된다(Welbaum, 1993).

종자의 성숙일수 및 후숙 일수가 종자의 발아성에 관여 한다는 사실은 선행 연구에서도 보고되고 있고, 강낭콩 종자는 성숙일과 후숙일을 합한 값이 30일이면 완전한 발아력을 보유하며, 35일간 성숙된 종자는 후숙 없이도 발아하며 완두의 성숙일은 35일 이라고 하였다.

박과작물에서는鈴木 등(1959)이 오이에서 개화수분 후 15~30일간 성숙된 종자를 후숙하지 않으면 발아율은 높으나 저장 양분의 부족으로 발아세는 낮다고 하였다. 또한 개화수분 후 15일간 성숙시킨 과실을 수확하여 후숙시키면 98% 이상 발아하였고, 35일간 성숙된 종자를 수확하여 후숙하지 않은 것보다 30일간 성숙된 종자를 수확하여 5일간 후숙한 종자가 발아율이 더 높다고 하여 후숙 효과를 증명하였다.

李(1978)는 호박에서도 교배 후 25일간 성숙된 종자는 전혀 발아하지 않으나 10일간 후숙 하면 48% 발아하였고 후숙 기간을 25일로 연장하면 발아율이 98%로 높아지는 반면 교배 후 50일에 수확한 종자를 후숙을 하지 않으면 발아율이 88%로 낮아져 박과작물에서는 채취기간 보다는 후숙 기간이 발아에 더 큰 영향을 미친다고 하였다.

鈴木(1963)과 長友(1949)는 가지에서 교배 후 50일간 성숙된 종자는 발아율이 34%이나 5일간 후숙하면 59%까지 증가하였고, 55일 성숙된 종자는 발아율이 78%로 낮았으나 60일 이상 성숙된 종자에서는 96~99% 발아하여 후숙 보다는 종자의 성숙정도가 발아력에 더 큰 영향을 미친다고 하였다.

오이(鈴木, 1959)에서는 배유가 미숙한 종자는 발아율은 높으나 저장양분의 부족으로 발아세가 낮아진다고 하였다. 유 등(1996)은 대목용 박은 30일간 성숙된 종자를 30일간 후숙 처리하여 발아력을 향상시킨 예도 보고되고 있다.

(2) 성숙일수 따른 과실중량, 종자생산량, 종자충실도 검토

○ 성숙일수 및 후숙일수 에 따른 과실중량, 종자 생산량

무한화서에 속하는 대부분의 작물은 성장하여 개화, 결실하는데 수일에서 수주일 많게는 수개월이 걸리기 때문에 동일한 식물체 내에서도 종자가 동시에 성숙하지 못하는 경우가 많다. 따라서 일시에 수확하게 되게 되면 미숙종자에 성숙종자가 혼재하게 발아력과 저장성에도 영향을 미치게 된다. 수박을 성숙 및 후숙 정도를 달리하여 과실 중량, 종자 생산량을 조사하였다(Table 1.2-1.4 및 Fig. 1.2-1.3). 수박은 성숙일수가 경과하면 과실의 무게는 증가하였다. 개화수분 후 30일째 수확한 수박의 과실무게는 2,882g 였으나 60일째 수확한 과실의 무게는 5,760g 이었다. 이와 같이 성숙일수가 길어질수록 과실무게는 증가하였다. 과실당 종자수는 수분 후 성숙일수(DAA) 및 후숙 일수(FAP)에 따른 통계적인 유의성은 없었으나, 성숙일수가 길어지면 종자수는 증가하는 경향이였다. 반면 후숙일수에 따른 차이는 크지 않았다. 수박은 성숙일수에 따라 차이는 있으나 과실당 대략 280-430개의 종자가 생산되었다(Table 1.2).

수박의 수분 후 성숙일수(DAA) 및 후숙일수(FAP)에 따른 종자의 종단 직경과 횡단직경은 성숙일수(DAA)에 차이가 있었으며, 후숙 일수에 의한 차이는 없었다. 전반적으로 성숙일수가 길어지면 종자의 크기는 작아지는 경향을 보였다. 전반적으로 수박종자의 종단 직경이 횡단직경보다 1.5 배 정도 긴 장타원 형태를 유지하였다. 종피색은 채과 직후에는 옅은 갈색을 탈중하여 후 시일이 경과하며 갈색을 유지하였다(Fig. 1.3). 천립중은 수분 후 성숙일수(DAA)에 경과하면 천립중이 약간 감소하였다. 이러한 원인은 수분 후 성숙일수가 경과하면 종자수가 증가하여 동화산물이 분산되어 천립중이 감소한 것으로 해석된다.

DAA 및 FAP에 따른 종자의 종피무게, 자엽무게 및 총종자 무게에 대한 종피 무게를 조사하였다. 수박 종자에서 종피는 배를 보호하고 휴면성과 저장력을 높이는 요인이지만 발아할 때는 기계적 장벽으로 작용한다. Table 1.4는 성숙일수 및 후숙 일수에 따른 수박종자의 전체중량에 대한 자엽 및 종피의 구성비율을 나타낸 것이다. 성숙 및 후숙 일수에 관계없이 수박종자에서 자엽이 차지하는 비율이 종피보다 약간 높았다. 반면 종피는 종자전체 중량비율의 44-50% 차지하였다. 그러나 성숙 및 후숙 일수에 따라 자엽과 종피의 구성비율에는 차이가 인정되지 않았다(Fig. 1.4).

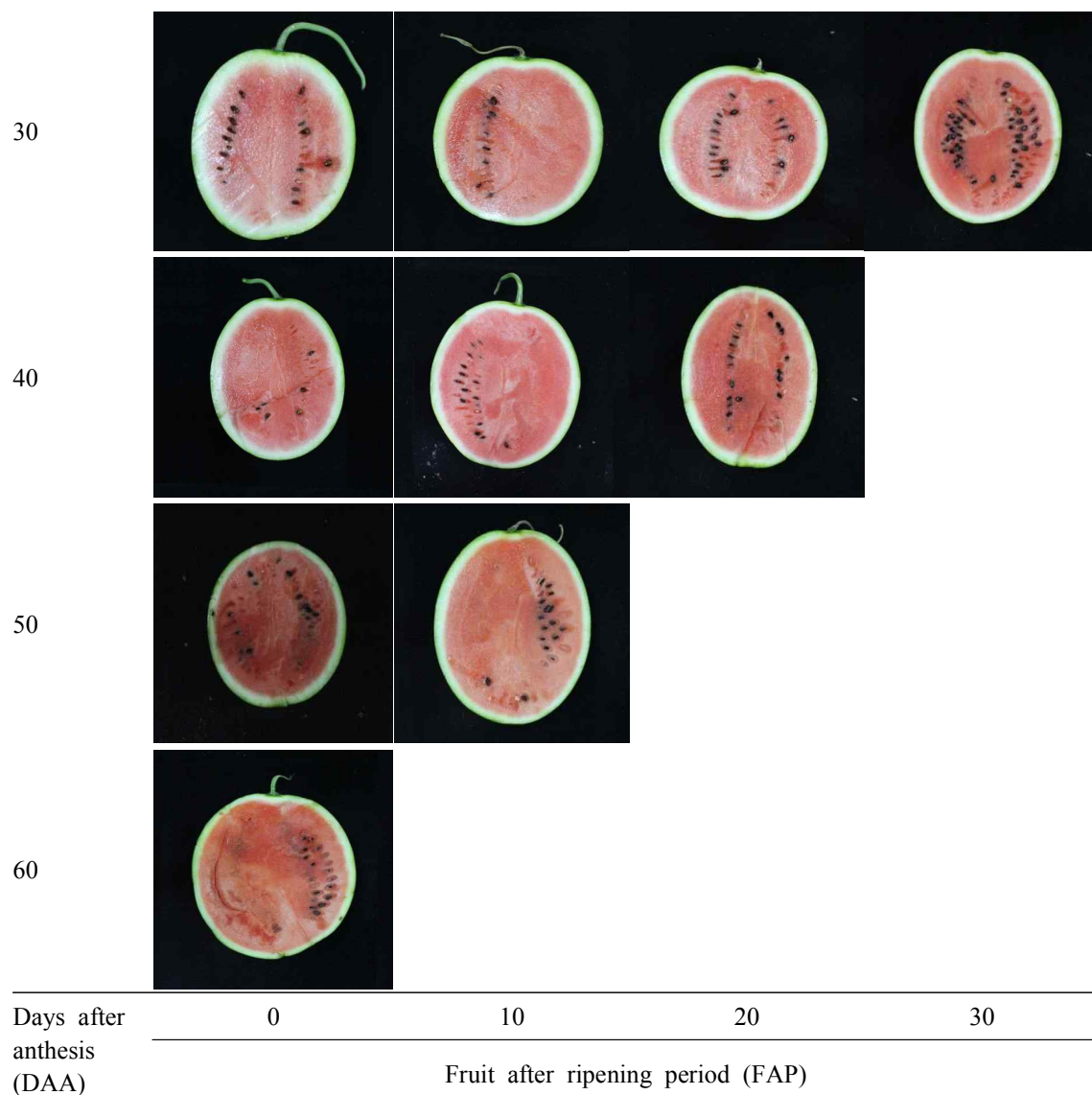


Fig. 1.2. Changes in fruit as affected by the degree of days after anthesis(DAA) and fruit after-ripening of 'Speed' watermelon.

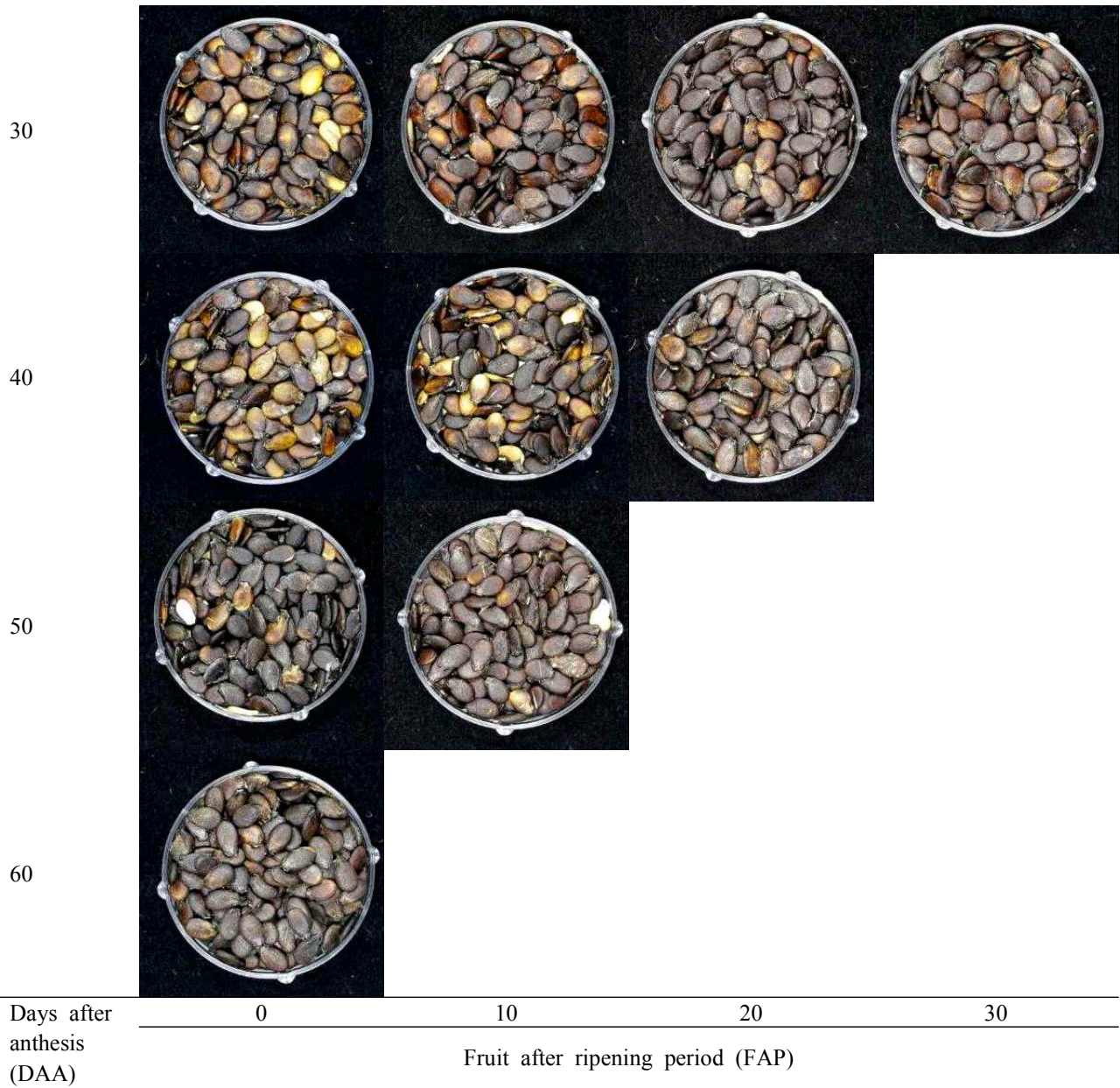


Fig. 1.3. Changes in morphological seed characteristics as affected by the degree of days after anthesis(DAA) and fruit after-ripening(FAP) of 'Speed' watermelon.

Table 1.2. Effect of seed maturity and after-ripening on fruit weight and seed production of 'Speed' watermelon.

Days after anthesis (DAA)	Fruit after ripening period (FAP)	Weight of fruit (g)	No. of seed	Weight of seed (g)	
				Fresh weight	Dry weight
30	0	2882.8	244.0	0.10	0.05
	10	3101.5	204.7	0.09	0.06
	20	2716.5	276.3	0.08	0.05
	30	2681.6	289.3	0.08	0.05
40	0	4477.9	327.6	0.09	0.05
	10	4272.6	353.8	0.09	0.05
	20	4041.4	353.6	0.08	0.06
50	0	4333.0	413.1	0.08	0.04
	10	4181.9	340.0	0.07	0.05
60	0	5760.5	378.8	0.08	0.05
Significance					
DAA (A)		*** ^z	NS	NS	NS
FAP (B)		NS	NS	NS	NS
A × B		NS	NS	NS	NS

^z NS, *, **, *** Nonsignificant or significant at P = 0.05, 0.01, or 0.001, respectively.

Table 1.3. Effect of seed maturity and after-ripening on seed size and seed weight of 'Speed' watermelon.

Days after anthesis (DAA)	Fruit after ripening period (FAP)	Diameter(mm)		Radio of long size/ short size	Seed coat color	1,000 seed weight (g)
		Long size	Short size			
30	0	8.50±0.36	5.37±0.24	1.59±0.08	Light brown	51.87±0.18
	10	8.60±0.33	5.21±0.27	1.65±0.06	Dark brown	51.03±0.05
	20	8.26±0.55	5.25±0.22	1.58±0.12	Dark brown	47.07±0.08
	30	8.67±0.26	5.18±0.18	1.67±0.07	Dark brown	49.90±0.18
40	0	8.21±0.47	5.15±0.29	1.60±0.12	Light brown	45.03±0.08
	10	8.61±0.68	5.20±0.31	1.66±0.08	Light brown	44.43±0.09
	20	8.55±0.39	4.96±0.24	1.73±0.13	Dark brown	49.00±0.10
50	0	8.12±0.40	5.18±0.27	1.56±0.09	Dark brown	42.77±0.12
	10	8.17±0.55	4.71±1.25	1.67±0.08	Dark brown	43.20±0.07
60	0	8.33±0.35	5.14±0.24	1.62±0.10	Dark brown	47.53±0.05
Significance						
DAA (A)		* ^z	*	NS		***
FAP (B)		NS	NS	NS		NS
A × B		NS	NS	NS		*

^z NS, *, **, *** Nonsignificant or significant at P = 0.05, 0.01, or 0.001, respectively.

Table 1.4. Effect of seed maturity and after-ripening on weight of whole seed, cotyledon and seed coat of 'Speed' watermelon.

Days after anthesis (DAA)	Fruit after ripening period (FAP)	Seed coat weight (g)	Cotyledon weight(g)	Whole seed weight(g)	Ratio of coat/seed	Ratio of cotyledon /seed
30	0	0.02±0.01	0.03±0.00	0.05±0.01	0.44±0.06	0.56±0.06
	10	0.02±0.00	0.03±0.00	0.05±0.01	0.48±0.03	0.52±0.03
	20	0.02±0.00	0.03±0.00	0.05±0.01	0.45±0.05	0.55±0.05
	30	0.02±0.00	0.03±0.00	0.05±0.00	0.46±0.04	0.54±0.04
40	0	0.04±0.05	0.02±0.00	0.06±0.05	0.50±0.12	0.50±0.12
	10	0.02±0.01	0.03±0.01	0.05±0.01	0.49±0.04	0.51±0.04
	20	0.02±0.00	0.02±0.00	0.05±0.00	0.49±0.04	0.51±0.04
50	0	0.02±0.00	0.02±0.00	0.04±0.01	0.49±0.05	0.51±0.05
	10	0.02±0.00	0.02±0.00	0.05±0.00	0.49±0.04	0.51±0.04
60	0	0.02±0.00	0.02±0.00	0.05±0.01	0.48±0.04	0.52±0.04
Significance						
DAA (A)		NS ^z	***	NS	**	**
FAP (B)		NS	NS	NS	NS	NS
A × B		NS	NS	NS	NS	NS

^z NS, *, **, *** Nonsignificant or significant at P = 0.05, 0.01, or 0.001, respectively.

○ 성숙일수 및 후숙 일수에 따른 종자 활력검정

수박 종자를 성숙단계별로 채취한 후 후숙 일수를 달리하여 30℃에서 BP 검정에 의한 종자활력을 조사하였다(Table 1.5~1.7 및 Fig. 1.4~1.5). 수박 종자를 성숙단계별 수확한 후 후숙 일수를 달리하여 5℃에서 1년간 저장한 종자는 98% 이상의 높은 발아율을 보였다. 이러한 결과는 수박 종자를 성숙단계별로 수확하여 6개월 저장한 후 발아성을 조사한 결과와는 약간의 차이가 있었다.

성숙단계를 달리한 수박종자를 수확하여 6개월간 저장한 종자는 성숙일수와 후숙 일수에 따라 수박종자의 발아력이 차이가 있었으나 5℃에서 1년간 저장한 종자는 성숙일수와 후숙 일수에 관계없이 높은 발아율을 보였다.

전반적으로 DAA 40일 종자를 20일간 후숙 처리하면 치상 후 5일째의 정상 발아율도 높았고, 14일째의 최종발아율도 높았다. 반면 비상정상 발아율은 낮았다. 이에 반해 DAA 30일 종자는 치상 후 5일째 초기발아율이 DAA 40일, 50일 및 60일에 비해 낮았다. 또한 종자의 성숙단계가 같더라도 종자를 후숙하지 않으며 발아율과 종자활력이 저하되었고, 후숙 처리에 의해 초기발아율과 정상 발아율이 높았다(Table 1.5~1.6 및 Fig. 1.4).

BP 검정에 의한 유묘활력 정도는 종자의 성숙 및 후숙 일수에 따라 차이가 있었다. 치상 후 5일째의 유묘생육은 전반적으로 40일간 성숙종자를 20일간 후숙 처리한 종자에서 높았다. 또한 조사 최종일인 14일째의 유묘활력도 5일째와 유사하였고, 40일간 성숙종자를 20일간 후숙 처리 종자에서 하배축 길이, 하배축 직경 등 전반적인 유묘활력이 높았다(Table 1.7 및 Fig. 1.5). 반면 유묘의 생체중과 건물중은 종자의 성숙단계 및 후숙 일수에 따른 차이는 없었다.

Table 1.5. Effect of days after anthesis(DAA) and fruit after-ripening periods(FAP) on percent germination and seed viability of 'Speed' watermelon seeds at 30°C.

Days after anthesis (DAA)	Fruit after ripening period (FAP)	Germination (%)	Viability			
			5 days		14 days	
			Normal (%)	Abnormal (%)	Normal (%)	Abnormal (%)
30	0	100.0	66.7	0.0	95.6	4.4
	10	100.0	87.8	0.0	96.7	3.3
	20	100.0	98.9	1.1	98.9	1.1
	30	100.0	97.8	0.0	98.9	1.1
40	0	98.9	46.7	1.1	91.1	7.8
	10	98.9	80.0	0.0	94.4	4.4
	20	100.0	97.8	0.0	100.0	0.0
50	0	100.0	92.2	0.0	95.6	4.4
	10	100.0	88.9	0.0	98.9	1.1
60	0	100.0	92.2	0.0	100.0	0.0
Significance						
DAA (A)		NS ^z	***	NS	**	*
FAP (B)		NS	***	NS	**	**
A × B		NS	***	NS	NS	NS

^z NS, *, **, *** Nonsignificant or significant at P = 0.05, 0.01, or 0.001, respectively.

Table 1.6. Effect of days after anthesis(DAA) and fruit after-ripening periods(FAP) on hypocotyl length, hypocotyl diameter, root growth of 'Speed' watermelon seeds. Seedling growth measured at 5 days after planting at 30°C.

Days after anthesis (DAA)	Fruit after ripening period (FAP)	Hypocotyl length (cm)	Hypocotyl diameter (mm)	Root length (cm)	No. of root
30	0	4.90	2.93	6.30	25.7
	10	4.90	2.87	5.90	17.7
	20	4.70	3.02	4.70	11.3
	30	5.77	3.27	6.63	21.3
40	0	3.50	2.97	4.73	14.0
	10	12.37	5.30	3.45	19.3
	20	6.93	2.81	5.50	10.0
50	0	6.97	2.64	4.60	15.3
	10	4.67	2.81	5.00	11.0
60	0	5.33	2.81	4.83	18.0
Significance					
DAA (A)		*** ^z	NS	NS	NS
FAP (B)		**	NS	NS	NS
A × B		***	*	NS	NS

^z NS, *, **, *** Nonsignificant or significant at P = 0.05, 0.01, or 0.001, respectively.

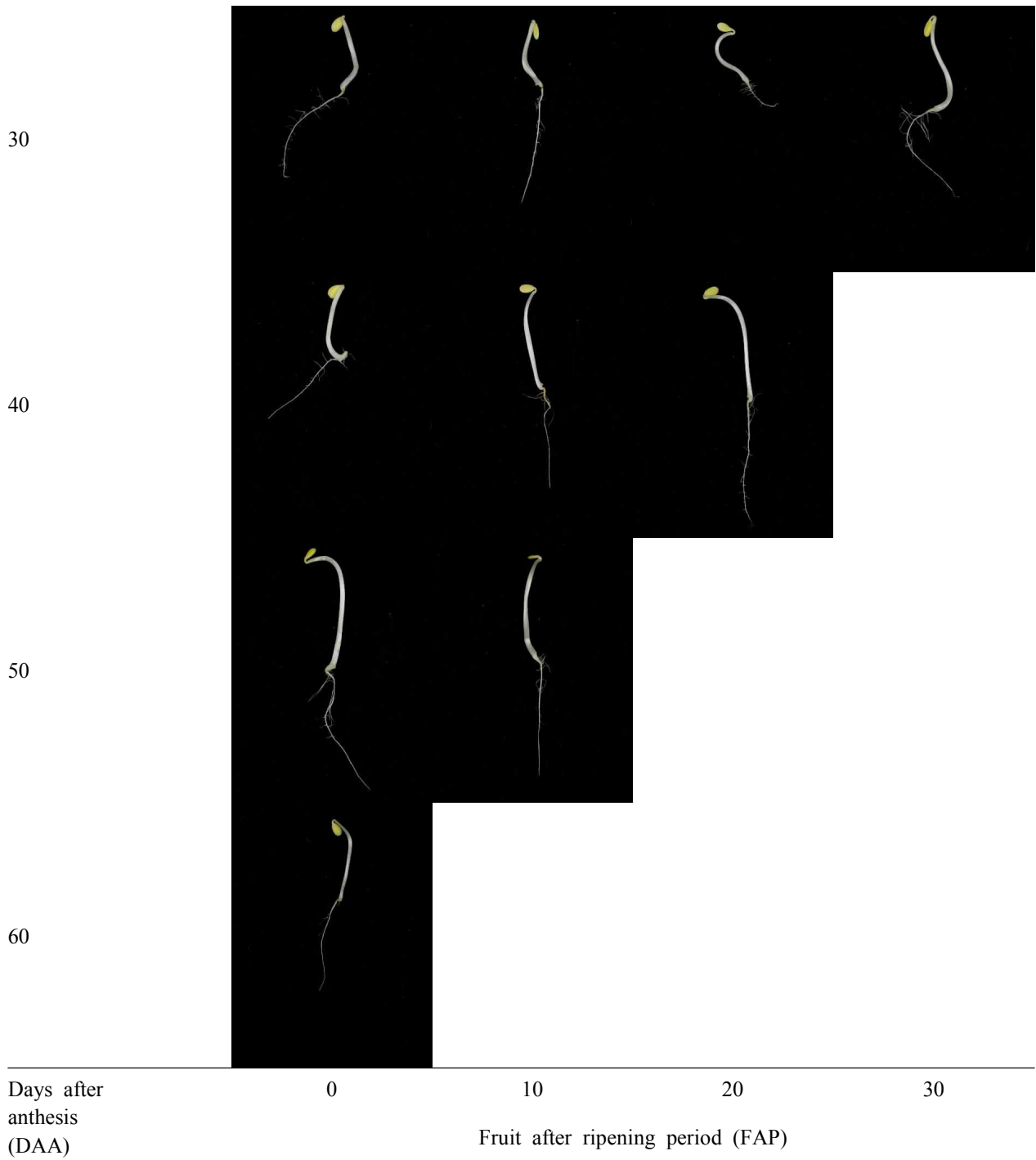


Fig. 1.4. Changes in seedling growth as affected by the seed maturity and after-ripening of Speed' watermelon seeds. Seedling growth measured 5 days after sowing at 30°C.

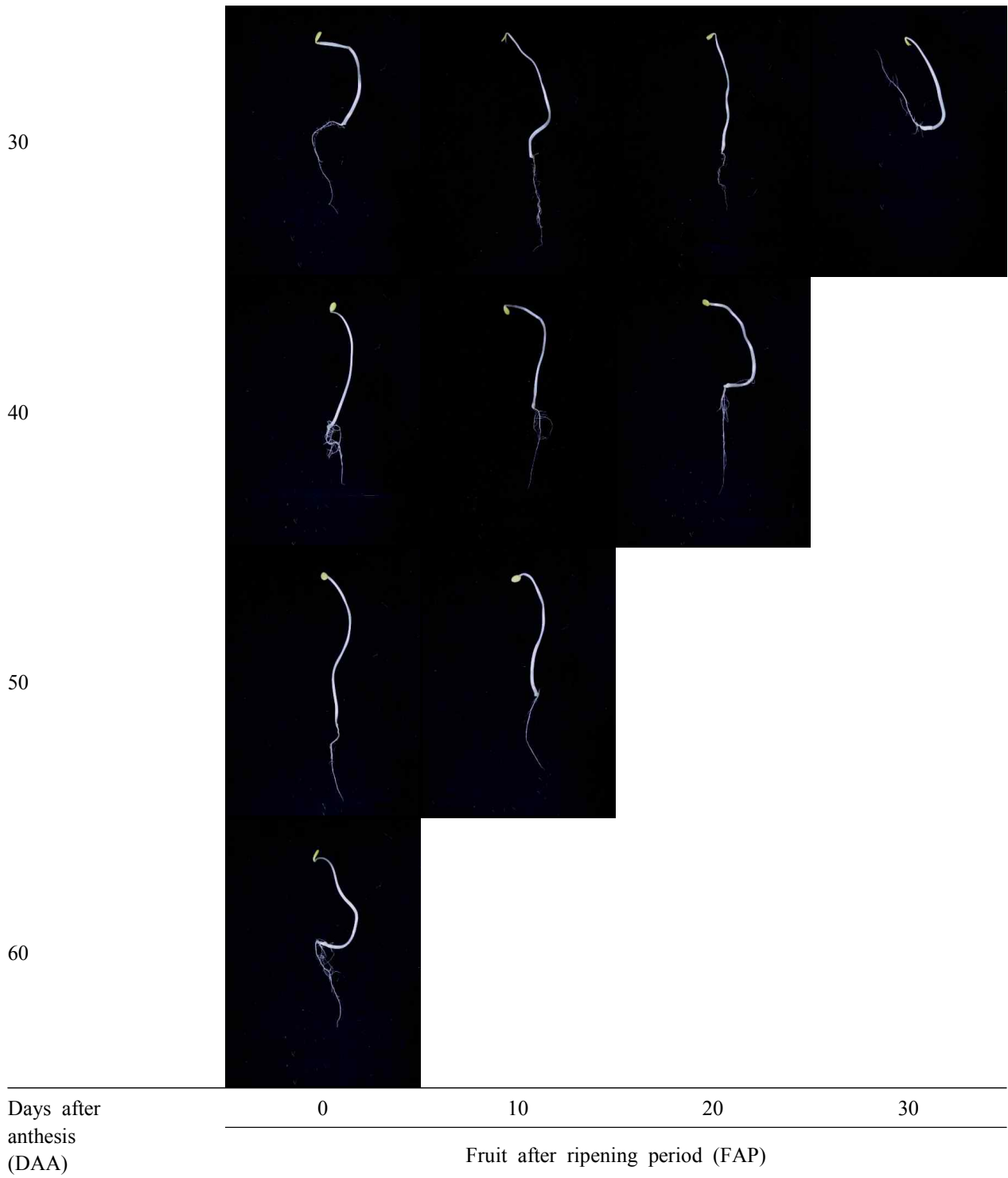


Fig. 1.5. Changes in seedling growth as affected by the seed maturity and after-ripening of Speed' watermelon seeds. Seedling growth measured 14 days after sowing at 30°C.

Table 1.7. Effect of days after anthesis(DAA) and fruit after-ripening periods(FAP) on hypocotyl length, hypocotyl diameter, root length, number of root, fresh and dry weight of 'Speed' watermelon seeds measured at 14 days after planting.

Days after anthesis (DAA)	Fruit after ripening period (FAP)	Hypocotyl length (cm)	Hypocotyl diameter (mm)	Root length (cm)	No. of root	Fresh weight (g)	Dry weight (g)
30	0	21.32	2.26	6.94	28.20	0.66	0.02
	10	20.80	2.35	7.72	27.60	0.64	0.02
	20	17.60	2.20	5.70	23.20	0.58	0.02
	30	20.90	2.15	7.30	26.40	0.68	0.02
40	0	21.28	2.28	10.38	40.80	0.50	0.02
	10	24.18	1.89	9.74	33.40	0.58	0.02
	20	23.68	2.89	6.68	28.60	0.61	0.02
50	0	18.92	1.96	5.88	30.60	0.45	0.01
	10	11.18	2.50	5.68	23.40	0.53	0.02
60	0	21.42	1.70	6.14	26.40	0.58	0.02
Significance							
DAA (A)		NS ^z	NS	***	*	NS	NS
FAP (B)		NS	NS	*	NS	NS	NS
A × B		NS	NS	***	NS	NS	NS

^z NS, *, **, *** Nonsignificant or significant at P = 0.05, 0.01, or 0.001, respectively.

2. 착과부위에 따른 과실중량, 종자생산량, 종자 충실도 및 발아율 검정

가. 연구목적

수박 종자의 품질은 과실당 채종량과 착과위치, 착과수에 영향을 받는다. 특히 박과작물은 무한화사이므로 같은 수확한 종자라도 착과위치에 따라 종자 품질이 달라진다. 따라서 우량종자 확보에 수박의 착과부위는 매우 중요하다. 하위절위에 착과는 소과가 되어 채종량이 적어지지만 종자의 충실도 높아 우량종자의 생산이 가능하며, 재배기간이 짧아져 병해나 자연재해의 피해가 경감된다. 그에 반해 상위절위에 착과는 과일성숙기가 고온기에 해당되어 종자의 충실도가 떨어지고, 재배기간이 길어지기 때문에 병해나 자연재해에 노출될 기회가 많아진다. 따라서 충실한 종자량 확보와 발아력이 우수한 착과절위 구멍이 필요하다.

나. 재료 및 방법

(1) 착과부위 따른 발아율 검정

본 실험에 사용된 수박은 농우바이오의 '스피드'로 하였으며, 실험 장소는 경남 창원시 대산면 11월 비닐하우스에서 정식하여 재배하였다. 재식거리는 1m로 하였으며, 각 주당 2개의 줄기를 남기고 적심하였다. 이외의 시배관리는 농시관행에 준하여 재배하였다. 수박의 착과부위에 따른 발아력을 조사하기 위하여 5-10절, 15-20절, 20-25절, 25절 이상에 과실을 착과하여 40일간 성숙시킨 과실을 수확하여 20일간 후숙시킨 후 탈종한 종자를 치상하여 발아력을 조사하였다. 발아조사는 30℃에서 항온기에서 50립씩 3반복으로 치상하여 발아력을 검정하였다.

(2) 착과절위에 따른 과실중량, 종자생산량

사용된 품종과 재배방법은 실험 (1)의 방법과 동일하였다. 수박의 착과절위에 따른 과실중량, 종자생산량, 발아력을 조사하기 위하여 3화방(16-18절), 4화방(21-23절), 5화방(26-28절), 6화방(31-33절)에 착과하여 40일간 성숙시킨 과실을 채종하여 20일간 후숙시킨 후 과실 중량과 종자생산량을 조사하였다.

착과절위가 수박의 중량, 과실당 종자수, 종자크기, 천립중 및 전체종자중량에 대한 종피 및 자엽 비율에 미치는 영향을 조사하였다. 조사방법은 수박의 중량과 과실당 종자수 및 종자크기 조사는 5개 과실을 3반복으로 평균치를 나타내었다. 종자의 종단 직경과 횡단직경 조사는 100립의 종자를 3반복하여 Vernier Callipers를 이용하여 종자의 종/횡단 길이를 측정 후 그 비율을 나타내었다. 또한 전체종자 중량에 대해 종피의 구성비율을 조사하기 위해 핀셋으로 100립의 종자를 3반복으로 종피와 자엽을 각각 분리하여 천칭한 값을 전체 종자 무게에 대한 자엽 및 종피 비율로 산출하였다.

(3) 착과절위에 따른 발아성 검정

사용된 품종과 재배방법은 실험 (1)의 방법과 동일하였다. 수박의 착과절위에 따른 과실 중량, 종자생산량, 발아력을 조사하기 위하여 3화방(16-18절), 4화방(21-23절), 5화방(26-28절), 6화방(31-33절)에 착과하여 40일간 성숙시킨 과실을 채종하여 20일간 후숙 시킨 후 탈종한 종자를 치상하여 발아력을 조사하였다. 발아조사는 30℃에서 항온기에서 50립씩 3반복으로 치상하여 발아력을 검정하였다. BP 검정법에 의한 종자의 활력조사는 BP 검정용 용지인 heavy 용지와 regular 용지를 증류수에 흡습시켜 25℃에서 1일간 보관하였다. 그 후 수분을 적당히 제거한 heavy 용지에 100립의 종자를 동일한 간격으로 배열시킨 후 regular 용지를 덮어 30℃ 항온기에 치상하여 종자활력을 조사하였다. 종자활력 조사는 2회에 걸쳐 시행되었으며, 1차 조사는 치상 5일 후 정상 묘와 비정상묘, 불발아종자 등을 검정하였고, 최종조사인 2차 조사는 치상 14일 후에 실시하였다. 최종 조사일에는 하배축 길이, 하배축 직경, 뿌리수, 길이길이, 생체중 및 건물 중을 측정하였다.

유묘 출현을 조사는 부산대학교 첨단 온실(경남 밀양시 삼랑진읍 청학리 산50번지)의 25℃로 제어된 온실에서 시행하였다. 묘출현을 조사를 위해 50구 플러그판에 상토를 충전한 후 30립의 종자를 3반복으로 파종하였다. 파종 후 30일까지 1일 간격으로 묘 출현율을 조사하였으며, 초기 생육조사는 파종 후 30일째에 생체중과 건물 중을 조사하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) 착과부위 따른 발아율 검정

수박을 저절위에 착과시키면 과실의 비대성이 불량하고 변형과가 되기 쉽고, 과피가 두껍워지며, 공동과 발생되기 쉽다. 또한 착과절위에 따라 발아력이 달라짐으로 우량종자 확보에 의한 수박의 절적한 착과절위 구명한 매우 중요하다. 이러한 목적으로 수박의 착과위치별 인공수분하여 40일간 성숙시킨 과실을 채종하여 20일간 후숙 시킨 후 탈종하여 30℃에서 발아력을 조사하였다(Table 1.8).

Table 1.8. Effect of fruit set internode on percent germination of 'Speed' watermelon seeds at 30°C.

Fruit set internode	Germination (%)	T ₅₀ (days)
5-10	90.2	1.89
15-20	92.0	1.91
20-25	98.6	1.78
25<	98.0	1.80
LSD	3.3	0.1

^z NS, *, **, *** Nonsignificant or significant at $P = 0.05, 0.01, \text{ or } 0.001$, respectively.

발아율은 착과절위에 차이가 있었으며, 전반적으로 20~25절에 착과시킨 과실에서 발아율이 가장 높았다. 반면 저절 위인 5~10절 착과시킨 과실은 발아율이 낮았다. 반면 25절 이상 착과시킨 과실은 발아율은 높았으나 발아속도가 약간 지연되는 경향이었으나 20~25절에 비해 뚜렷한 차이는 없었다. 전반적으로 우량종자를 확보할 수 있는 적정 착과절위는 20~25절이었다. 그러나 25절 이상에서도 종자활력이 우수한 것으로 판단되어 25절 이상의 절위에 착과하여 발아성을 더 검정할 필요가 있었다.

(2) 착과절위에 따른 과실 중량, 종자생산량, 종자충실도 검정

원예작물 중에서 수박은 종자가격이 비싼 편에 속한다. 따라서 수박에서는 고품질의 종자를 확보하기 위한 방안은 최적 채종조건의 확립하며, 또 다른 방안은 종자처리 기술의 개발이다. 수박에서 고품질의 종자를 생산하기 위해서는 종자의 성숙일수와 후숙 일수 및 착과절위를 구명할 필요가 있다. 착과부위에 관한 실험에서 수박은 20~25절에 착과시키며, 발아력이 높았다. 그러나 25절 이상에도 종자 활력이 높은 것으로 나타나 이에 대한 면밀한 실험이 요구되었다.

이러한 관점에서 수박을 3화방(16-18절), 4화방(21-23절), 5화방(26-28절), 6화방(31-33절)에 착과하여 40일간 성숙시킨 과실을 채종하여 20일간 후숙 시킨 후 수박의 중량, 종자 생산량 및 종자의 형태적 특성을 조사하였다(Table 1.9-1.11 및 Fig. 1.6-1.7).

수박은 착과절위가 높아지면 과실의 무게는 증가하였다. 3화방(21-23절)에 착과하면 과실의 무게는 4,555g 였으나 6화방(31-33절)에 착과시킨 과실은 무게가 7,252g으로 1.5배 증가하였다. 반면 과실당 종자수는 착과절위에 관계없이 380개 정도로 착과절위에 따른 차이는 없었다. 또한 종자무게도 착과절위에 따른 유의적인 차이는 인정되지 않았다. 수박의 착과절위에 따른 종자의 횡단 및 종단 직경 등 종자크기에도 큰 차이가 없었으나 천립중은 착과절위가 높아질수록 약간 감소하였다.

Table 1.9. Effect of fruit weight and seed production as affected by the different flower cluster of 'Speed' watermelon.

Flower cluster (Fruit set internode)	Weight of fruit (g)	No. of seed	Weight of seed (g)	
			Fresh weight	Dry weight
3 (16-18)	4555.1	380.4	28.0	16.5
4 (21-23)	5903.2	378.9	29.2	14.7
5 (26-28)	5294.6	375.9	26.5	15.9
6 (31-33)	7252.1	388.9	27.8	16.3
LSD(0.05)	1120.9	NS	NS	NS

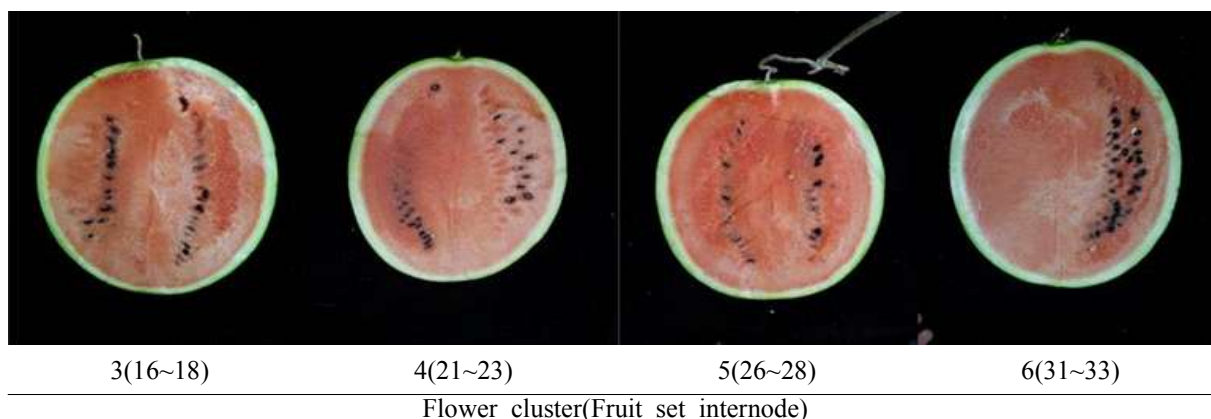


Fig.1.6. Changes in fruit as affected by the different flower cluster of 'Speed' watermelon.

Table 1.10. Effect of seed size and seed weight as affected by the different flower cluster of 'Speed' watermelon.

Flower cluster (fruit set internode)	Diameter(mm)		Radio of long size/ short size	Seed coat color	1,000 seed weight (g)
	Long size	Short size			
3 (16-18)	8.11±0.53	5.15±0.20	1.58±0.07	Dark brown	46.50±0.04
4 (21-23)	8.29±0.44	5.06±0.16	1.64±0.08	Light brown	45.43±0.03
5 (26-28)	7.82±0.35	4.89±0.27	1.60±0.10	Dark brown	41.10±0.03
6 (31-33)	7.98±0.55	7.55±10.5	1.55±0.40	Dark brown	40.37±0.05
LSD(0.05)	NS	NS	0.07		0.07

Table 1.11. Effect of ratio seed coat of whole seed weight as affected by the different flower cluster of 'Speed' watermelon.

Flower cluster (fruit set internode)	Seed coat weight (g)	Cotyledon weight(g)	Whole seed weight(g)	Ratio of coat/seed	Ratio of cotyledon /seed
3 (16-18)	0.02±0.00	0.02±0.00	0.05±0.01	0.48±0.02	0.52±0.02
4 (21-23)	0.02±0.00	0.02±0.00	0.05±0.01	0.49±0.03	0.51±0.03
5 (26-28)	0.02±0.00	0.02±0.00	0.04±0.01	0.47±0.04	0.53±0.04
6 (31-33)	0.02±0.00	0.02±0.00	0.04±0.00	0.48±0.03	0.52±0.03
LSD(0.05)	NS	NS	NS	NS	NS

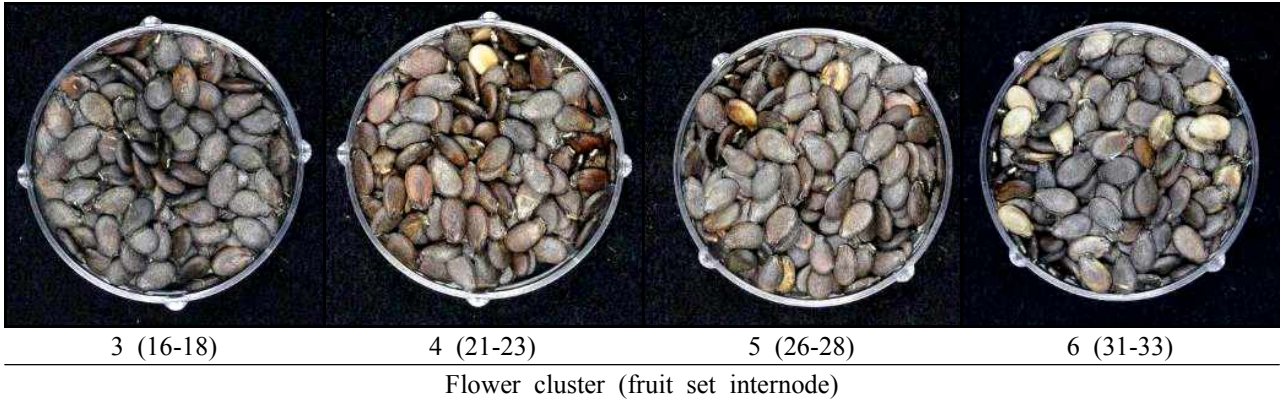


Fig. 1.7. Changes in morphological seed characteristics as affected by the different flower cluster of 'Speed' watermelon.

수박의 착과절위에 따른 종자의 종피 무게, 자엽무게 및 총 종자 무게에 대한 종피 무게를 조사하였다. 수박종자에서 자엽이 차지하는 비율이 종피보다 약간 높았다. 반면 종피는 종자전체 중량 비율의 48% 차지하였다. 그러나 착과절위에 자엽과 종피의 구성비율에는 큰 차이가 없었다(Fig. 1.7). 이러한 결과는 수박종자에 종피 비율이 낮으면 기계적 장벽이 감소하여 휴면성이 짧아지고, 높은 발아율을 유지시킬 수 있지만 저장성이 짧아질 수 있다. 그러나 본 실험에서는 착과절위가 종자의 종피비율에는 큰 영향을 주지 않은 것으로 판단되었다(Table 1.11).

(3) 착과절위에 따른 발아성 검정

착과절위를 달리한 수박을 수확하여 30°C에서 BP 검정에 의한 종자활력을 조사하였다(Table 1.12~1.15 및 Fig. 1.8~1.9). 수박 종자의 발아율은 착과절위에 관계없이 100% 발아하였다. 그러나 착과절위에 따라 치상 후 5일째의 발아세에는 차이가 있었다. 전반적으로 5화방(26-28절)에서 착과된 종자들은 100% 정상발아 하였다. 반면 3화방(16-18절), 4화방(21-23절) 및 6화방(31-33절)에 착과된 종자들은 발아율은 높았지만 건전한 유묘로 성장할 수 없는 비정상 발아가 2~3% 되었다.

BP 검정에 의한 유묘활력 정도는 착과절위에 따라 유의적인 차이는 없었으나 전반적으로 5화방(26-28절)에서 착과된 종자들은 하배축 길이, 하배축 직경 유묘활력이 높았다(Table 1.13 및 Fig. 1.9). 반면 유묘의 생체중과 건물중은 종자의 착과절위에 따른 차이는 없었다. 착과절위별로 채종한 종자를 온실의 상토에서 유묘활력 정도를 비교한 실험에서도 유의성은 인정되지 않으나 5화방(26-28절)에서 채종한 종자들은 유묘의 하배축 길이, 하배축 직경 등 유묘활력이 높았다(Table 1.15 및 Fig. 1.10).

Table 1.12. Effect of different flower cluster on percent germination and seed viability of 'Speed' watermelon seeds at 30°C.

Flower cluster (fruit set internode)	Germination (%)	Viability			
		5 days		14 days	
		Normal (%)	Abnormal (%)	Normal (%)	Abnormal (%)
3 (16-18)	100.0	94.4	0.0	96.7	3.3
4 (21-23)	100.0	94.4	0.0	97.8	2.2
5 (26-28)	100.0	100.0	0.0	100.0	0.0
6 (31-33)	100.0	95.6	1.1	96.7	3.3
LSD(0.05)	NS	NS	NS	NS	NS

Table 1.13. Effect of different flower cluster on hypocotyl length, hypocotyl diameter, root length, and number of root of 'Speed' watermelon seeds measured at 5 days after planting.

Flower cluster (fruit set internode)	Hypocotyl length (cm)	Hypocotyl diameter (mm)	Root length (cm)	No. of root
3 (16-18)	9.90	2.41	5.10	11.3
4 (21-23)	10.00	2.03	4.90	16.3
5 (26-28)	12.00	2.31	6.47	20.7
6 (31-33)	11.67	2.14	5.77	19.7
LSD(0.05)	NS	NS	NS	NS

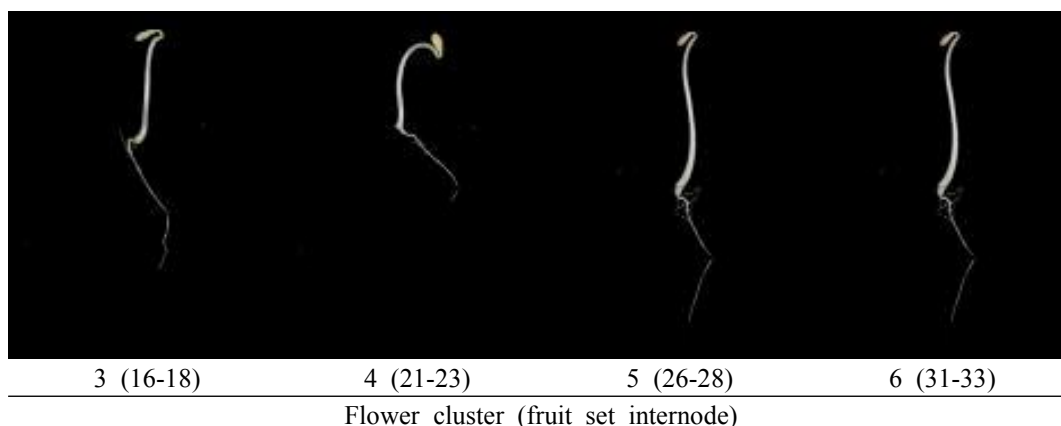


Fig. 1.8. Changes in seedling growth as affected by the different flower cluster of 'Speed' watermelon seeds. Seedling growth measured 5 days after sowing at 30°C.

Table 1.14. Effect of different flower cluster on hypocotyl length, hypocotyl diameter, root length, number of root, fresh and dry weight of 'Speed' watermelon seeds measured at 14 days after planting.

Flower cluster (fruit set internode)	Hypocotyl length (cm)	Hypocotyl diameter (mm)	Root length (cm)	No. of root	Fresh weight (g)	Dry weight (g)
3 (16-18)	23.22	2.14	8.86	29.00	0.56	0.02
4 (21-23)	21.64	1.76	8.22	25.80	0.51	0.02
5 (26-28)	18.10	1.89	7.12	28.40	0.43	0.01
6 (31-33)	19.48	1.91	7.18	26.60	0.46	0.01
LSD(0.05)	2.39	NS	NS	NS	NS	NS

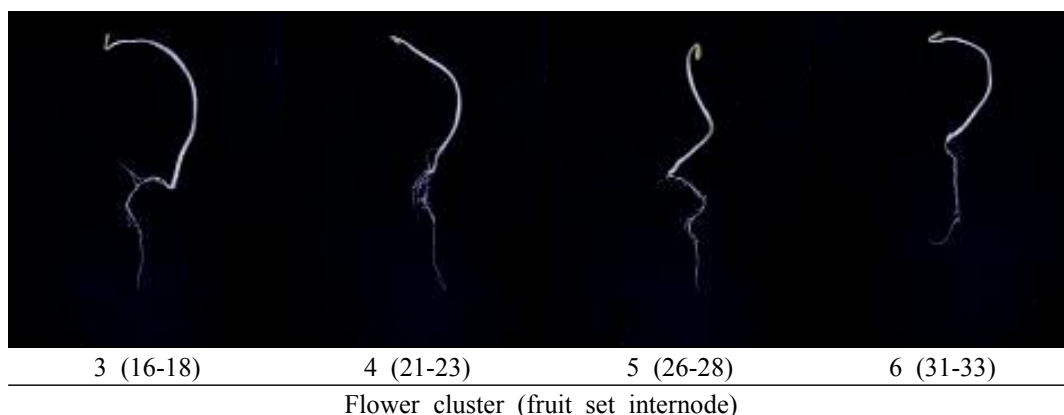


Fig. 1.9. Changes in seedling growth as affected by the different flower cluster of 'Speed' watermelon seeds. Seedling growth measured 14 days after sowing at 30°C.

Table 1.15. Effect of different flower cluster on hypocotyl length, hypocotyl diameter, root length, number of root, fresh and dry weight of 'Speed' watermelon seeds measured at 30 days after planting in greenhouse.

Flower cluster (fruit set internode)	Height (cm)	Root length (cm)	Hypocotyl diameter (mm)	Fresh weight(g)		Dry weight(g)	
				Tree	Root	Tree	Root
3 (16-18)	13.3	6.2	3.4	0.80	0.07	0.03	0.00
4 (21-23)	12.7	5.0	3.5	0.88	0.11	0.05	0.00
5 (26-28)	11.2	5.2	3.3	0.69	0.10	0.03	0.00
6 (31-33)	12.3	5.1	2.9	0.69	0.12	0.03	0.01
LSD(0.05)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS



Fig. 1.10. Changes in seedling growth as affected by the different flower cluster of 'Speed' watermelon seeds. Seedling growth measured 30 days planting in greenhouse.

3. 대과종 및 중과종 적정 착과수 설정

가. 연구목적

종묘시장이 개방됨에 따라 수박종자도 외국회사와의 가격 및 품질 등 무한 경쟁시대가 도래하였다. 향후 수박 시장규모는 종자의 발아율 향상, 고품질 가공종자 생산 등 육종 및 육묘기술의 발달 등으로 그 규모가 크게 증가할 것으로 보기는 어렵다. 따라서 수박종자산업의 지속적 성장과 발전을 위해서는 국내 시장에서의 경쟁보다는 해외시장으로 진출이 시급하다.

수박은 세계적으로 90여 개국에서 생산되고 있으며, 우리나라의 수박 생산량은 904,895톤으로 세계 9위에 달하고 있다. 최근 노지재배보다 시설재배 면적비율이 꾸준히 증가하여 전체 재배면적에 약 83%가 시설재배 되고 있다. 재배면적과 국민 1인당 소비량은 점차 줄어들 것으로 예상되나, 오히려 웰빙 바람으로 기능성 수박은 증가될 것으로 예측된다. 수박의 최근 소비 추세는 가족 구성원의 소규모화로 인하여 대과종(10kg 이상)에서 중과종(6~8kg)으로 기호 전환되고 있다.

현재 국내에서 유통되고 있는 수박 품종수는 약 150여 품종으로 대부분 대과종 계통이다. 그러나 최근 쓰레기 문제 등 환경적인 차원에서 소과종 품종을 선호하는 소비자가 늘어나면서 소과종 품종 육성도 활발하여 20개 품종 정도가 유통되고 있다.

따라서 외국수출 및 국내 소비자의 중, 소과종을 선호 현상에 부응하기 위해서는 이들 품종에 대한 우량종자를 생산할 수 있는 적정 채종조건을 확립하는 것이 필요하다. 이러한 관점에서 본 연구는 대과종 및 중과종 수박의 주당 착과수에 따라 과실의 중량의 변화 및 발아력을 검정하여 주당 적정 착과수를 구명하는데 있다.

나. 재료 및 방법

(1) 대과종 및 중과종 주당 적정 착과수 설정

본 실험에 사용된 수박은 대과종으로 농우바이오의 ‘스피드’ 중과종으로 현대종묘(주) ‘감로꿀수박’을 이용하였다. 실험 장소는 경남 창원시 대산면 11월 비닐하우스에서 정식하여 재배하였다. 재식거리는 1m로 하였으며, 각 주당 2개의 줄기를 남기고 적심하였다. 대과종과 중과종 모두 인공수분에 의해 주당 착과수를 1과 및 2과로 분류하였다. 주당 1과 착과는 4화방(21-23절)에서, 주당 2개 착과는 4화방(21-23절) 및 5화방(26-28절)에서 착과시켰다. 착과된 수박은 개화수분 후 40일간 성숙시켜 수확하여 20일간 후숙한 후 발아력을 조사하였다. 발아조사는 30℃에서 항온기에서 50립씩 3반복으로 치상하여 발아력을 검정하였다. 수박의 주당 착과수에 따른 과실중량, 종자생산량을 조사하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) 대과종 및 중과종 주당 적정 착과수 설정

수박의 소비패턴도 과거에는 대형수박이었으나, 가족구성이 핵가족화 되어 감에 따라 중, 소과종 수박품종을 선호하고 있다. 또한 농자재의 개발과 재배기술의 향상으로 재배양식도 다양

화되어 연중재배가 가능한 수박품종들의 요구도가 증가하고 있다. 이와 같이 최근 수요가 급증하고 있는 중, 소과종 품종에서 고품질의 종자를 생산할 수 있는 채종조건이 확립이 시급하다.

수박에서 종자수를 많이 확보하기 위해서는 주당 착과수를 많게 하는 것이 좋으나, 발아력이 저하될 수 있다. 또한 대과종과 중과종에 따라 주당 적정 착과수를 다를 수 있으므로 이에 대한 연구가 필요하다.

대과종과 중과종에 모두 주당 과실을 1개 착과시키는 것이 발아율이 높았고, 발아속도도 빨랐다. 반면 주당 2과를 착과시키면 1과 착과에 비해 발아율이 3~4% 낮았고, 발아속도는 지연되었다. 주당 착과수에 따라 과실무게도 차이가 있었으며, 1과에 비해 2과를 착과시키면 과실무게가 현저하게 감소하였다. 또한 천립중도 주당 2과를 착과시키면 낮아졌다. 반면 주당 2과를 착과시키면 1과를 착과시킨 처리에 비해 종자수는 감소하고, 종자크기는 작아지는 경향이 있으나 통계적인 유의성은 없었다. 전반적으로 대과종 및 중과종에서 우량종자를 생산할 수 있는 주당 적정 착과수는 1과 좋았다.

Table 1.16. Effect of number of fruit set on percent germination of large and middle fruit watermelon seeds at 25°C.

Fruit size	Fruit set	Germination (%)	T ₅₀ (days)
Large	1	94.2	3.34
	2	92.0	3.58
Middle	1	90.7	2.46
	2	87.1	2.56
LSD(0.05)		3.0	0.23

Table 1.17. Effect of fruit set of plant on seed characteristics of large and middle fruit watermelon seeds at 25°C.

Fruit size	Fruit set	Fruit weight(g)	No. of Seed	1,000 seed weight (g)	Diameter(mm)	
					Long size	Short size
Large	1	7,934	388	46.5	8.21	5.14
	2	6,343	373	45.4	8.19	5.06
Middle	1	4,754	358	42.1	7.52	4.79
	2	3,346	333	41.3	7.58	7.65
LSD(0.05)		246	22	0.2	0.20	0.2

4. 수박종자의 발아력 증진을 위한 priming 조건 구명

가. 연구목적

우리나라 채소종자의 시장규모는 연간 200만L로 금액상으로 1,500억원으로 추산하며, 종묘시장이 개방됨에 따라 외국회사와의 가격 및 품질의 무한 경쟁시대가 도래하였다. 특히 종자 산업은 농업 분야 가운데 가장 기술집약적인 고부가가치 산업이고, 생명 공학적 산업이다. 향후 수박종자 시장은 내병성 및 높은 발아율을 보유한 고품질 종자의 요구도가 크게 증가할 것으로 예측된다. 또한 국내 수박종자의 지속적 성장과 발전을 위해서는 국내 시장에서의 경쟁보다는 해외시장으로 진출해서 그 돌파구를 찾아야 할 상황에 있다.

작물재배에 있어서 급속하고 균일한 묘출현은 작물의 수량 증대 및 수확물의 품질 향상 측면에 많은 이점이 있다. 수박의 경우 저온기 육묘에서 신속한 묘출현과 출현의 균일성은 육묘생산비 절감에도 유용하다. 종자처리는 소량의 물질로 종자에 처리함으로써 경제적이고, 처리 효율성을 극대화시킬 수 있는 방안으로, 독자적 종자처리 기술에 의한 고품질 수박종자 생산은 국제경쟁력 우위의 전제조건이다. 따라서 고효율 건전 종자생산이 가능한 독자적 종자처리 기술 개발이 절실하며, priming 및 solid matrix priming 등의 발아촉진 처리, 필름코팅 등 무병화 처리, 비파괴 우량종자 선별기술 등의 연구가 필요하다.

종자처리방법 중 priming 처리는 불량환경조건에서도 발아력을 증강시키는 종자처리이며, 사용하는 물질의 조제방법이나 종류에 따라 osmotic priming, solid matrix priming, membrane priming, drum priming 등 세분화되어 있으며 작물의 종류, 종자활력 등에 처리조건이 다르다. 선진국의 종묘회사에서는 priming 처리된 종자를 시판하여 종자의 부가가치를 상승시킨다.

낮은 수분포텐셜 용액에서 종자를 침지하는 priming은 종자의 유근출현을 방지하는 범위내에서 생리, 생화학적 변화가 일어나 파종 후 급속, 균일한 묘 출현이 유지된다. 이와 같은 종자 priming은 원예작물에서 묘출현 속도의 단축과 묘출현의 균일성 확보를 위한 종자 처리법으로 제시되고 있다. 종자 priming은 여러 가지 다른 수분흡수 조절 처리인 물리적, 화학적, 생물적 요인인 산소 공급, 습도조절처리, 열쇼크, 광조사, 종자코팅 및 유용 미생물과의 통합처리도 가능하다. 넓은 의미에서 SMP도 동일한 개념으로 볼 수 있으나, 두 처리의 차이점은 SMP는 액체용액의 삼투포텐셜 대신에 매트릭포텐셜에 의해 수분흡수가 조절된다.

수박은 고가종자이고 육묘와 접목과정을 거치게 되므로 불량조건에서도 입모를 향상시키기 위해 높은 발아력을 지닌 종자가 요구된다. 본 연구에서는 불량조건에서 수박 종자의 안전발아와 발아의 균일성을 유지시킬 수 있는 종자처리 방법들을 모색하기 위한 priming 적정 조건을 확립하고자 하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 수박 종자의 발아적온 검정

수박종자의 발아적온을 검정하기 위해 사용된 수박종자는 현대종묘의 ‘초고속꿀’이었다. 발아 실험은 암 조건에서 다점도 발아기(thermo gradient table, seed processing, Holland)를 이용하여 15~30℃로 설정하여 수박종자의 적정 발아온도를 구명하고자 하였다.

발아조사는 9cm petridish에 흡습지 2매를 깔고 수박종자를 50립씩 3반복으로 완전임의 배치하여 5ml의 증류수를 공급한 후 암 조건에서 실시하였다. 발아판정은 유근이 1mm 나온 것을 발아로 간주하였고, 발아조사는 종자를 치상한 후 7일까지 12시간 간격으로 실시하였다. 기타 실험절차는 ISTA(1985) rule에 준해서 실시하였다. 최종 발아율의 50%가 발아하는데 소요되는 일수(T50)는 아래의 공식에 의해 산출하였다.

$$T50 = T_i + \frac{(N + 1)/2 - N_i}{(N_j - N_i)} \times (T_j - T_i)$$

N : 발아조사 마감시간까지 발아된 종자수의 합계

N_i: N에 대한 50% 직전까지 발아된 종자수의 합계

N_j: N에 대한 50% 직후에 발아된 종자수의 합계

T_i: N_i 시점까지 소요된 발아기간

T_j: N_j 시점까지 소요된 발아기간

(2) 종피/배의 비율이 종자의 발아율에 미치는 영향

공시된 수박 종자는 해찬꿀(농협종묘), 핵가족(농협종묘), 꿀나라(농협종묘), 포미나(농협종묘), 리코후레쉬 2호(파트너종묘), 리코스위트 1호(파트너종묘), A-1031(파트너종묘), 스피드꿀(농우바이오), 우리꿀(농우바이오), 현대꿀(현대종묘), 활기찬(현대종묘) 총 11개 품종 이었다.

종자의 종단 및 횡단직경을 측정하기 위해 디지털 버니어 캘리퍼스를 이용하여 품종별 종자의 종/횡단 길이를 측정한 후 그 비율을 조사하였다.

전체종자 중량에 대해 종피의 구성비율이 발아에 미치는 영향을 조사하기 위해 종자를 100립씩 3반복으로 종피와 자엽을 각각 분리하여 천칭한 값을 전체 종자 무게에 대한 자엽 및 종피 비율로 산출하였다.

배의 신장을 기계적으로 억제하고 있는 자엽과 종피(발아공 정단) 및 외종피가 발아에 미치는 영향을 조사하기 위해 ‘현대꿀수박’과 ‘스피드’ 종자의 발아공 정단을 면도날을 이용하여 3mm 절단하였다. 외종피 제거는 핀셋을 이용하여 배나 자엽이 손상되지 않도록 주의 깊게 제거하였다. 이들 종자를 20℃ 및 25℃에 치상하여 발아력을 검정하였다.

(3) 수박 종자의 priming 처리조건 구명

Priming 조건을 확립하기 위해 사용된 수박종자는 현대종묘의 ‘초고속꿀’과 농우바이오의 ‘스피드’ 였다. Priming 적정 화학제를 구명하기 위하여 사용된 화학제는 Ca(NO₃)₂, K₃PO₄, KCl, KNO₃ 였고, 처리수준은 150, 200mM 였다. 반면 무기염인 PEG의 처리수준은 -0.5 MPa, -0.7 5MPa 였다. 처리방법은 10cm의 petri-dish에 100립의 종자를 넣고 priming 화학제를 20ml 공급한 후 용액증발을 방지하기 위하여 밀봉하여 25℃의 항온기에서 4일간 처리하였다. 처리 후 종자 표면에 흡착되어 있는 화학제 제거를 위해 흐르는 물로 세척하였으며, 실내에서 4시간 건조시켰다.

Priming 적정 기간을 구명하기 위해 화학제 선발시험에서 적정 화학제로 판명된 200mM의 KNO₃ 용액으로 25℃에서 priming 처리기간을 1, 2, 3, 4, 5, 6일간 달리하여 발아성을 비교하였다. Piriming 적정 온도를 구명하기 위해서 200mM의 KNO₃ 처리기간을 4일간 고정한 후 처리온도를 15, 20, 25, 30, 35℃로 달리하여 발아성을 검정하였다. 또한 priming 처리된 수박종자가 다양한 온도에서 발아성을 조사하기 위하여 항온기의 온도를 15, 20, 25, 30, 35℃로 달리하여 발아성을 조사하였다. 초기생육은 종자를 치상한 후 7일과 14일째 근장, 하배축장, 하배축 직경을 조사하였다.

(4) Priming 처리에 따른 종자활력

200mM KNO₃ 용액으로 20℃에서 4일간 priming 처리하였다. Priming 처리된 해찬꿀(농협종묘), 핵가족(농협종묘), 꿀나라(농협종묘), 포미나(농협종묘), 리코후레쉬 2호(파트너종묘), 리코스위트 1호(파트너종묘), A-1031(파트너종묘), 스피드꿀(농우바이오), 우리꿀(농우바이오), 현대꿀(현대종묘), 활기찬(현대종묘)를 포함한 11품종의 종자를 무처리 종자의 발아성을 조사하였다. 이올리 BP 검정을 이용한 종자활력 및 유묘출현율 및 생육정도를 조사하였다.

BP 검정법에 의한 종자의 활력조사는 BP 검정용 용지인 heavy 용지와 regular 용지를 증류수에 흡습시켜 25℃에서 1일간 보관하였다. 그 후 수분을 적당히 제거한 heavy 용지에 100립의 종자를 동일한 간격으로 배열시킨 후 regular 용지를 덮어 25℃ 항온기에 치상하여 종자활력을 조사하였다. 종자활력 조사는 2회에 걸쳐 시행되었으며, 1차 조사는 치상 5일 후 정상묘와 비정상묘, 불발아종자 등을 검정하였고, 최종조사인 2차 조사는 치상 14일 후에 실시하였다. 최종 조사일에는 하배축 길이, 하배축 직경, 뿌리수, 길이길이, 생체중 및 건물중을 측정하였다.

유묘 출현율 조사는 부산대학교 첨단 온실(경남 밀양시 삼랑진읍 청학리 산50번지)의 25℃로 제어된 온실에서 시행하였다. 묘출현율 조사를 위해 50구 플러그판에 상토를 충전한 후 30립의 종자를 3반복으로 파종하였다. 파종 후 30일까지 1일 간격으로 묘 출현율을 조사하였으며, 초기 생육조사는 파종 후 30일째에 생체중과 건물중을 조사하였다.

(5) 발아온도에 따른 종자활력

수박종자의 최적 발아온도를 구명하기 위하여 15℃부터 5℃ 간격으로 15℃, 20℃, 25℃, 30℃, 35℃ 온도조건에서 발아조사를 실시하였다. 조사항목은 (1)에 제시한 것과 동일한 방법으로 온도별 치상된 종자의 발아성 및 BP검정을 이용한 종자 활력을 조사하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) 수박종자의 발아성 구명

우리나라의 수박재배는 여름철 하계재배와 겨울철 시설하우스에서 재배되는 동계재배로 대별될 수 있는데, 하계재배에서는 수박을 자가 육묘하더라도 큰 문제가 되지 않으나, 겨울철에는 저온으로 인한 저조한 발아율과 발아지연으로 강건한 묘 생산에 많은 어려움이 있다. 이러한 관점에서 수박종자의 발아적온 구명하여 육묘관리를 효율화하기 위한 기준을 마련하고자 하고자 다점도 발아기를 이용하여 적정 발아온도를 구명하고자 하였다.

Table 1.18. Effect of germination temperature on percent germination and number of days to 50% of the final percentage (T_{50}) of watermelon seeds.

Temperature (°C)	Germination (%)	T_{50} (days)
15	1.70	8.83
17	11.6	17.0
18	33.6	8.01
20	40.0	7.76
22	39.3	8.66
24	72.6	7.34
26	89.3	6.09
27	81.6	4.58
29	91.0	3.48
30	93.7	2.78
LSD.05	2.3	1.10

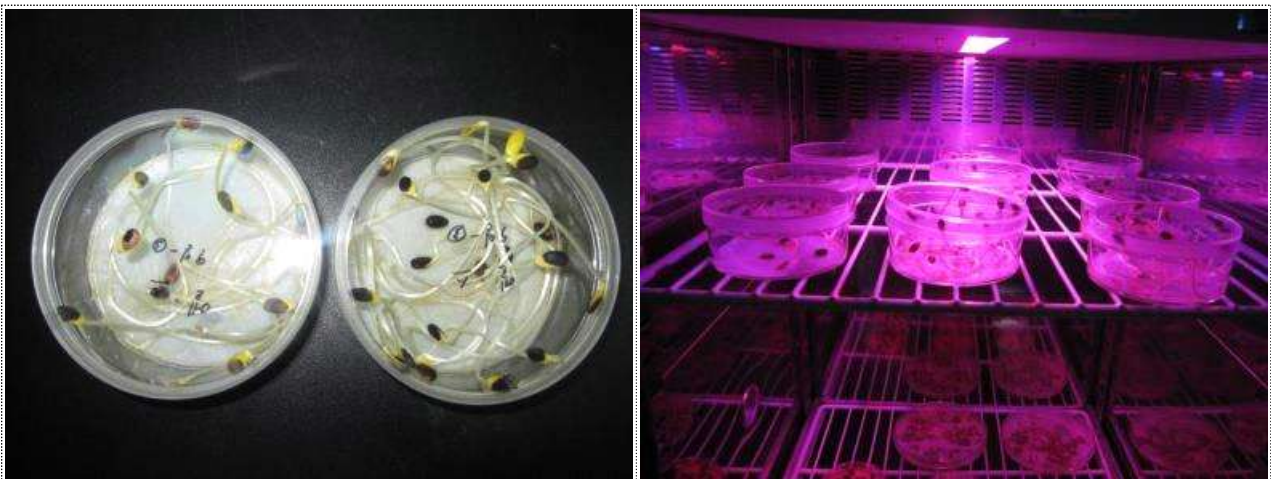


Fig. 1.11. Appearance on germination of watermelon seeds in growth chamber at 25°C

수박종자의 발아적온은 26~30°C로 판명되었고, 30°C 까지 발아온도가 높아지면 발아율을 향상되었으며, 발아속도 개념인 T_{50} 도 2.78일로 신속하게 발아 하였다. 반면 22°C 이하의 온도에서는 발아율이 40% 이하로 급속하게 감소하였고, 17°C에서는 11%, 15°C에서는 1.7% 발아율을 보여, 수박은 고온 발아성 종자임이 확인되었다(Table 1.18).

(2) 종피/ 자엽 비율이 종자의 발아율에 미치는 영향

수박종자는 크게 배(embryo)와 자엽 그리고 종피로 구성되어 있다. 쌍자엽 식물에서 자엽은 식물의 모체가 될 배를 보호하고 발아할 때 저장양분으로 이용된다. 종자의 외곽부를 구성하고 있는 종피는 수분흡수, 공기순환 및 내생 억제물질의 배출에 중요한 역할을 한다(Leviatov et al., 1994). 그러나 유근정단을 감싸고 있는 자엽과 종피는 배팽창과 유근신장을 억제하는 물리적 장벽으로서 발아에도 밀접한 관련이 있다.

본 실험에 사용된 11종의 수박 종자의 형태적 특성을 조사한 결과는 Table 1.19와 같다. 수박 종자의 종단 직경은 횡단직경보다 품종에 따라 차이는 있으나 1.5배~1.73배 높았다. 종피색은 ‘핵

가족', '해찬꿀', '포미나', '꿀나라', '현대꿀', '리코후레쉬', '리코스위트', 'A-1031' 등은 짙은 갈색이었고, '우리꿀', '스피드', '활기찬' 등은 옅은 갈색이었다(Table 1.19 및 Fig. 1.3.). 천립중은 351g~487g 범위였고, 천립중이 가장 무거운 품종은 '핵가족' 이었고 가장 낮은 품종은 '활기찬' 이었다.

Table 1.19. Morphological characteristics of various watermelon seeds

Cultivar	Diameter(mm)		Ratio of long size/short size	Seed coat color	1,000 seed weight (g)
	Long size	Short size			
Hackgajok (핵가족)	7.79±0.5	5.22±0.4	1.50±0.12	Dark brown	498.7±7.0
Haechangual (해찬꿀)	8.62±0.5	5.10±0.2	1.69±0.10	Dark brown	338.3±6.1
Pomina (포미나)	7.86±0.4	5.11±0.3	1.54±0.10	Dark brown	372.0±8.2
Gualnara (꿀나라)	7.61±0.6	5.06±0.3	1.50±0.10	Dark brown	344.3±5.7
Hyundaegual (현대꿀)	7.87±0.5	4.84±0.2	1.63±0.09	Dark brown	484.7±4.7
Speed (스피드)	8.47±0.4	5.64±0.2	1.51±0.09	Light Brown	536.0±9.4
Uriginal (우리꿀)	8.75±0.4	5.69±0.3	1.54±0.10	Light Brown	351.3±6.8
Hwalgichan (활기찬)	7.75±0.3	4.78±0.2	1.62±0.06	Light Brown	437.3±3.1
Rico fresh (리코후레쉬)	8.34±0.5	5.25±0.3	1.59±0.12	Dark brown	333.7±2.3
Rico sweet (리코스위트)	8.60±0.4	5.34±0.8	1.64±0.20	Dark brown	390.7±5.5
A-1031	8.71±0.5	5.04±0.3	1.73±0.12	Dark brown	390.7±5.5

Table 1.19는 본 실험에 사용된 수박품종의 전체 중량에 대한 자엽 및 종피의 구성비율을 나타낸 것이다. 종자 중량은 품종에 따라 차이는 있으나 대체적으로 0.17mg~0.98mg 범위내에 있었다. 종자중량이 가장 낮은 품종은 '포미나'(0.17g), '활기찬'(0.17g), '핵가족'(0.18g) 등이었고, '현대꿀수박'(0.98g), '리코후레쉬'(0.29g), '우리꿀'(0.28g) 등은 종자 중량이 무거운 품종이었다. 종자중량에 대해 종피 비율이 높은 품종은 '리코스위트'(53%), 'A-131'(53%) 였고, 종비비율이 가장 낮은 품종은 '현대꿀수박'으로 종피 비율이 8%에 불과 하였다. 반면 '해찬꿀', '꿀나라', '우리꿀', '활기찬', '리코후레쉬' 등의 품종은 종자전체 중량에 대해 종피 비율이 46~48%를 차지하였다.

종자 크기와 발아력은 부의 상관관계가 있으며, 소립 종자들이 대립보다 발아력이 높은 원인은 유근신장을 억제하는 배유의 물리적 장벽이 상대적으로 낮기 때문이다(Whittington and Fierlinger, 1972). 종자가 발아하기 위한 전제조건은 유근이 견고한 자엽이나 배유층을 통과할 수 있는 물리적인 힘과 자엽조직을 연약화시킬 수 있는 효소의 활성이 필요하다(Leviatov et al., 1995).

본 실험에서 종피 비율이 낮은 품종에서 발아력이 전반적으로 높았는데 이는 배 신장을 기계적으로 억압하고 있는 종피의 구성비가 상대적으로 낮았던 것에 기인하는 것으로 해석된다(Table 1.19) 종자의 횡단직경은 품종에 따라 차이는 있으나 7.75~8.75mm 범위였고, 종단 직경은 4.78~5.64mm 범위였다.

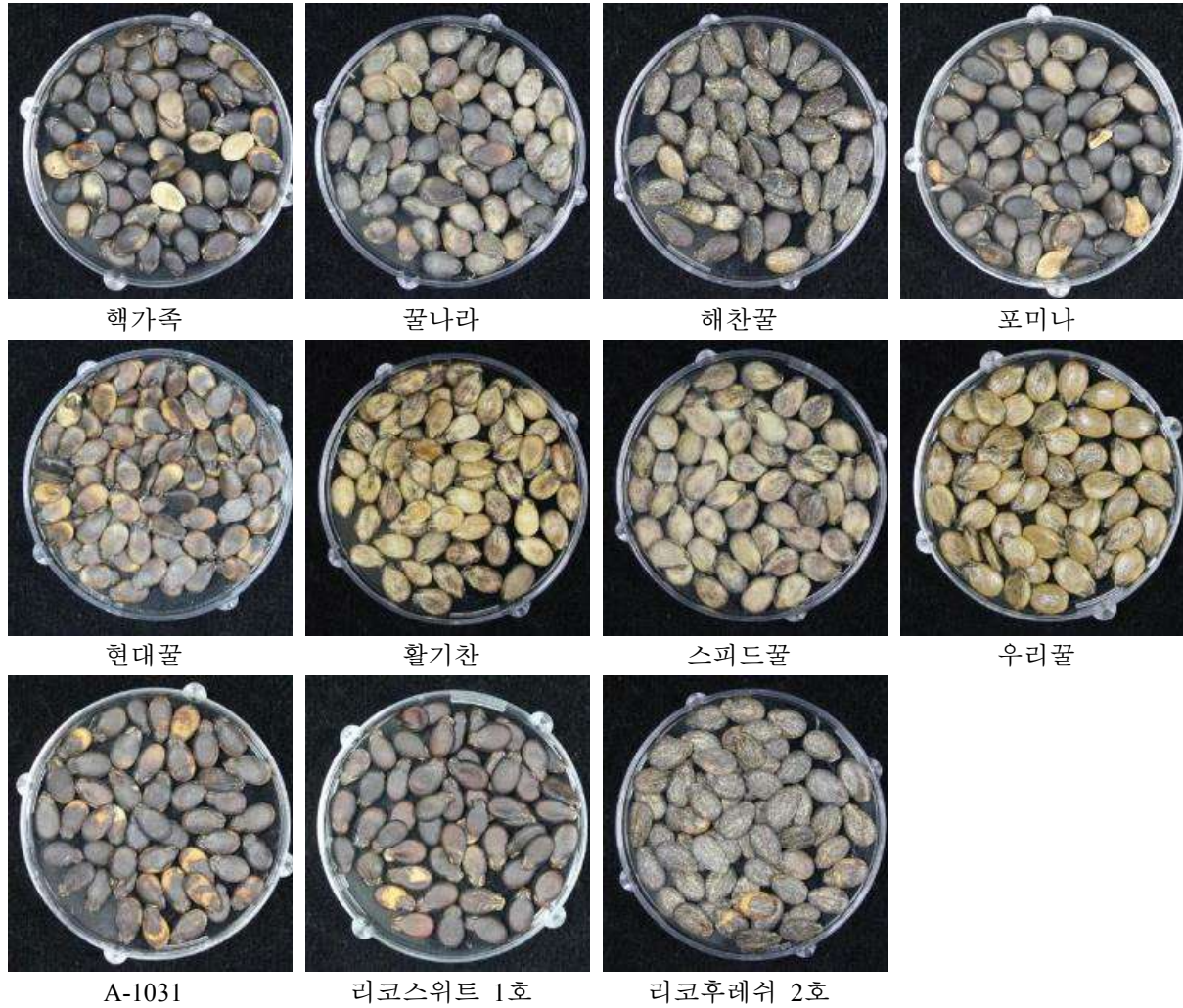


Fig. 1.12. Appearance of various watermelon seeds used by this experiment.

Table 1.20. Dry weight of whole seed, cotyledon and seed coat on percent germination and T50 of various watermelon seeds at 25°C.

Cultivar	Seed coat weight (g)	Cotyledon weight (g)	Whole seed weight (g)	Ratio of coat/seed	Ratio of cotyledon/seed	Germ. (%)	T50 (days)
Hackgajok (핵가족)	0.09±0.01	0.09±0.0	0.18±0.01	0.50±0.03	0.50±0.03	75.6±5.0	4.14±0.8
Haechangual (해찬꿀)	0.11±0.01	0.13±0.0	0.25±0.01	0.46±0.02	0.54±0.02	55.6±22	2.60±0.1
Pomina (포미나)	0.09±0.01	0.08±0.0	0.17±0.01	0.52±0.03	0.48±0.03	94.4±5.0	3.49±0.1
Gualnara (꿀나라)	0.10±0.01	0.11±0.0	0.21±0.04	0.49±0.04	0.51±0.04	90.0±3.3	3.85±0.4
Hyundaegual (현대꿀)	0.08±0.00	0.90±0.0	0.98±0.00	0.08±0.00	0.92±0.00	98.9±1.9	1.76±0.1
Speed (스피드)	0.11±0.01	0.12±0.0	0.23±0.03	0.48±0.02	0.52±0.02	97.8±3.8	1.70±0.0
Urigual (우리꿀)	0.13±0.01	0.15±0.0	0.28±0.01	0.48±0.01	0.52±0.01	65.6±6.7	2.11±0.3
Hwalgichan (활기찬)	0.08±0.01	0.09±0.0	0.17±0.01	0.48±0.00	0.52±0.02	95.6±5.0	2.37±0.1
Rico fresh (리코후레쉬)	0.14±0.01	0.15±0.0	0.29±0.01	0.49±0.01	0.51±0.01	98.9±1.9	1.87±0.1
Rico sweet (리코스위트)	0.10±0.01	0.09±0.0	0.19±0.01	0.53±0.03	0.47±0.03	72.2±6.7	1.32±0.2
A-1031	0.11±0.02	0.10±0.0	0.20±0.04	0.53±0.03	0.47±0.03	97.8±1.9	1.70±0.0

배 신장을 억제하는 물리적 저항요인은 종피와 배유로 대별될 수 있다. 배유나 자엽의 유연화는 배에서 생성되는 지베렐린에 의해서이며(Groot et al., 1988; Karssen et al., 1989), 고온 및 산소공급은 지베렐린 생성을 촉진하여 배유의 유연화를 촉진시키지만, ABA, 삼투스트레스 및 저온은 배유나 자엽의 유연화를 지연시켜 발아를 억제시킨다(Groot and Karssen, 1987).

배 신장을 억제하는 기계적 장벽이 발아에 미치는 영향을 보고자 종피 제거 및 발아공 정단을 제거하여 그 효과를 조사한 결과는 Table 1.21과 같다. 품종과 발아온도에 관계없이 종피와 발아공 정단을 제거하여 배의 신장을 억제하는 기계적 장벽을 제거하면 발아율이 향상되었다. 그 효과는 발아공 정단을 제거한 것보다 종피를 제거한 처리에서 현저하였다.

종피를 제거하여 배 신장의 기계적 장벽 요인을 제거하면 두 품종 모두 발아적온을 벗어난 저온인 20°C에서도 무처리 종자에 비해 발아율이 향상되었다. 또한 종피나 발아공 정단 제거는 발아율 증진 뿐 아니라 발아촉진 효과도 있었다(Table 1.21).

수박 종자에서 종피는 발아억제 물질의 함유, 수분흡수 및 공기교환의 억제, 배생장의 기계적 장벽으로 작용하여 발아에 관여한다. 종피의 기계적 저항은 발아직전까지 지속되며(Groot and Karssen, 1987), Watkins와 Cantliffe (1983)은 배유정단을 5 mm 제거하면 발아촉진 효과가 뚜렷하나, 종피를 제거하면 그 효과가 미약하다고 하였다. 또한 Leviatov 등(1994)은 토마토 종자에서도 종피 연화처리보다는 배유정단을 제거하면 저온 내성 및 감수성 계통이 갖는 고유 발아성이 없어져 저온에서도 신속하게 발아되었다고 하였다.

그러나 본 실험에서는 발아공 정단을 제거한 처리보다 종피를 제거함으로써 발아율이 향상되었고, 발아도 촉진되었다. 또한 무처리 종자는 20°C에서는 발아율이 극히 저조 하였으나 종피를 제거하면 20°C에서도 발아 가능하여 최저발아온도를 5°C 이상 낮출 수 있었다. 따라서 수박종자에서는 종피의 기계적 저항이 발아 억제에 주된 역할을 하며, 유근신장을 억제하는 자엽의 기계적 저항은 부가적인 장벽으로 작용하는 것으로 추정된다.

Table 1.21. Effect of removal seed coat, de-micropylar tip on percent germination and T₅₀ of 'Speed' and 'Hyundaegual' watermelon seeds.

Seed treatment	'Speed'		'Hyundaegual'	
	Germ. (%)	T ₅₀ (days)	Germ. (%)	T ₅₀ (days)
<i>Germinated at 20°C</i>				
De-coated	86.8 a	2.72 c	88.3 a	2.34 b
De-micropylar tip	86.3 a	5.21 b	72.0 b	3.73 a
Intact	44.0 b	9.64 a	0.0 c	-
<i>Germinated at 25°C</i>				
De-coated	84.0 a	1.74 c	90.0 a	1.78 b
De-micropylar tip	82.0 a	2.21 b	86.2 a	2.12 b
Intact	78.6 b	3.16 a	78.6 b	2.56 a

^z Means in columns with each germination temperature were separated by DMRT at *P* = 0.05

^y Unable to calculate due to low percent germination

(3) 수박 종자의 priming 처리조건 구명

○ Priming 화학제 선발

현재 널리 사용되고 있는 priming 화학제는 유기용질인 PEG와 무기염인 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, K_3PO_4 , KCl , KNO_3 등이며, 화학제의 종류 및 농도는 발아를 억제하는 수준으로 조절하면 효과적이다. 화학제의 구비조건은 종자에 독성이 없어야 하며 일정한 수분포텐셜 유지 및 식물생장에 촉진적으로 작용하여야 한다.

Table 1.22 Effect of priming chemical and their concentrations on percent germination and T_{50} of 'Hyundaegual' watermelon seeds.

Chemicals	Conc. (mM)	Germination (%)	T_{50} (days)
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	150	94.4 a	3.44 bc
	200	95.6 a	3.74 bc
K_3PO_4	150	72.2 c	4.56 b
	200	83.3 bc	5.61 a
KCl	150	90.0 a	1.78 d
	200	95.6 a	1.80 d
KNO_3	150	95.0 a	2.06 c
	200	98.9 a	1.61 d
PEG	-0.5 MPa	95.6 a	1.95 c
	-0.75 MPa	97.8 a	1.84 d
Untreated		95.6 a	2.25 c

Seeds were dark-treated with various chemicals at 25°C for 4 days and dark-germinated at 25°C for up to 7 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seed package.

Priming 용액의 삼투압은 일반적으로 -0.8~-1.6MPa가 적당하다. 수박 priming에 적합한 화학제 종류 및 농도를 선발하기 위해 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, K_3PO_4 , KCl , KNO_3 , PEG를 priming 처리하여 무처리 종자와 그 효과를 비교하였다. 발아율 증진에 가장 효과적이었던 화학제 KNO_3 였고, 최적 처리농도 200mM로 확인되었다. 반면 K_3PO_4 로 priming 처리된 종자는 무처리 보다도 발아율도 떨어지고 발아속도(T_{50})도 매우 저조하여 화학제로는 적합하지 않았다(Table 1.22).

○ Priming 적정기간 확립

Priming 처리는 삼투용액에 종자를 침지하는 것으로서 처리용액과 종자간 수분평형이 이루어지면 종자의 팽압에 의해 더 이상의 수분 흡수는 일어나지 않는다. 즉 수분유도기를 연장시켜 종자가 발아준비를 위한 대사적 활성물질을 증가시키는 처리이다. 그러나 처리기간의 과도한 연장은 수분흡수의 3단계로 진입하게 되어 유근이 돌출하게 되는데, priming 처리동안 유근돌출 방지와 priming 처리효율의 극대화를 위해서는 기간의 설정이 중요하다.

수박의 최적 priming 기간을 설정하기 위하여 200 mM의 KNO_3 용액으로 처리기간을 달리하여 발아성에 미치는 영향을 조사하였다. Priming 처리기간에 따른 발아율과 발아속도에 차이가

있었는데, 전반적으로 4일간 priming 처리가 발아율이 가장 높았고, 발아속도 개념인 T_{50} 이 단축되어 조기발아 하였다. 따라서 수박종자의 발아촉진에 적용할 수 있는 최적 priming 처리기간은 4일 이었다(Fig. 1.13).

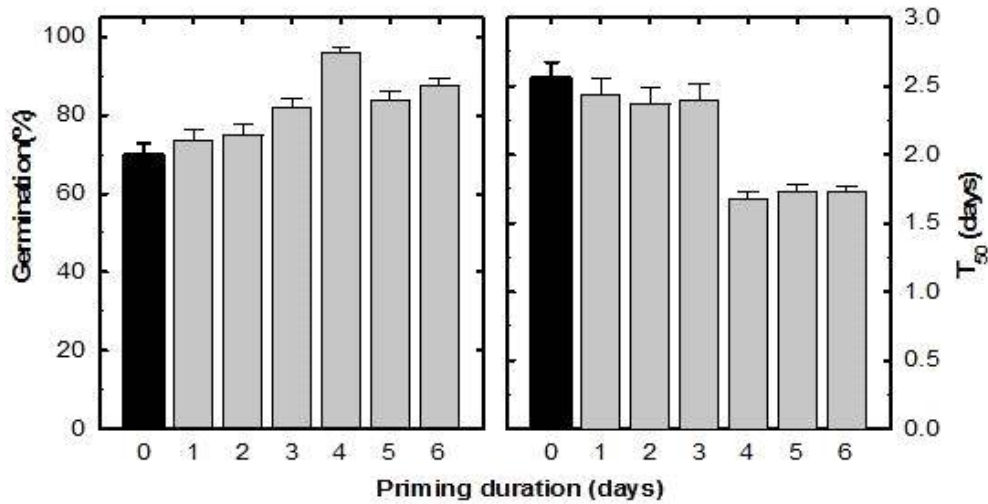


Fig. 1.13. Effect of priming duration on percent germination and T_{50} of 'Hyundaegual' watermelon seeds at 25°C. Seeds were dark-primed for various priming duration at 25°C and dark-germinated at 25°C for up to 7 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seeds package.

○ Priming 적정 처리온도 확립

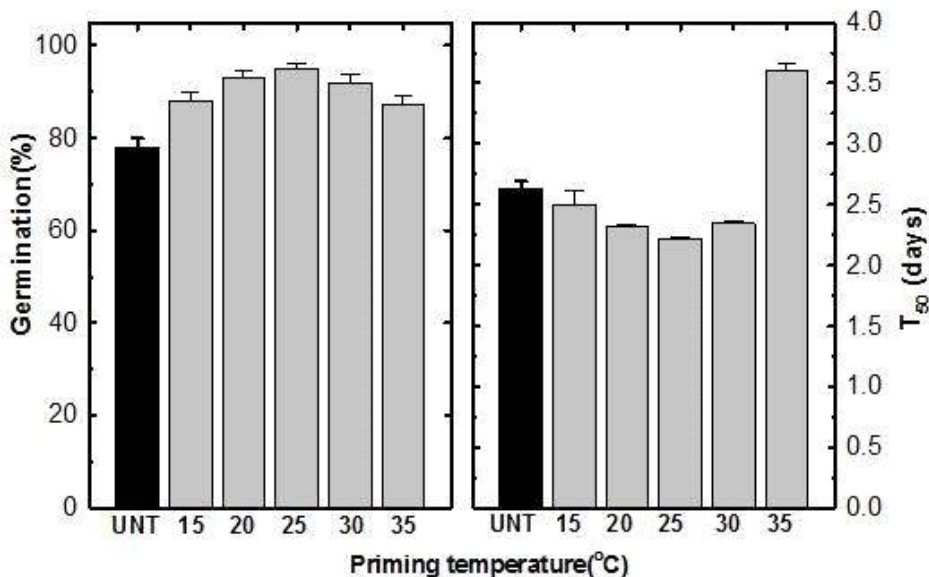


Fig. 1.14. Effect of priming temperature on percent germination and T_{50} of 'Hyundaegual' watermelon seeds at 25°C. Seeds were dark-primed with various priming temperature for 4 days and dark-germinated at 25°C for up to 7 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seed package.

Priming 처리온도는 기간과 더불어 중요한데, 15°C로 priming 처리된 종자는 발아율이 다른 처리온도에 비해 낮았고, 발아속도도 지연되었다. 반면 25°C에서 priming 처리된 종자는 발아율도 높았고, 발아속도도 단축되어 수박종자에 적용할 수 있는 최적 priming 처리온도 였다(Fig. 1.14).

(4) Priming 처리에 따른 종자 활력

11종의 수박종자를 priming 처리하여 발아율과 T_{50} 및 종자활력을 조사한 결과이다(Table 1.8). '포미나'와 '꿀나라'를 제외한 모든 공시 품종에서 priming 처리에 의해 발아율이 무처리에 비해 향상되었다. 또한 발아속도도 무처리에 비해 촉진되었다. Priming 발아증진 효과가 인정된 품종은 '핵가족', '해찬꿀', '현대꿀', '스피드', '우리꿀', '활기찬', '리코후레쉬', '리코스위트', 'A-1031' 등이었고, 대체적으로 priming 처리에 의해 발아속도가 무처리 종자에 비해 빨랐다. 종자의 발아능을 알기 위하여 실시하는 발아검사 방법 중 BP(between paper) 검사법은 흡습지를 이용하여 수분을 흡습시킨 후 그 위에 종자를 치상하고 그 위에 다시 흡습지를 덮는 방법으로 종자 발아능 뿐만 아니라 유묘활력 추정도 가능하다. 이러한 관점에서 11종의 수박종자를 priming 처리하여 BP 검사법에 의해 25°C에 종자를 치상한 후 10일째의 유묘활력을 조사한 결과는 Fig. 1.15~1.17에 나타내었다.

품종에 따라 약간의 차이는 있으나 priming 처리된 종자는 BP 종자활력 검정에서도 정상묘의 비율이 무처리에 비해 높은 경향을 보였다. 반면 무처리 종자는 생육이 진전될수록 비정상묘 비율이 priming 처리종자에 비해 높았다. 정상 묘는 재배 생육환경에서 정상식물로 성장 가능성이 있는 식물체로써 정상묘의 비율이 높다는 것은 작물의 품질을 수량을 결정하는 요인이 된다. Priming 처리에 의해 정상묘의 비율이 증가는 작물의 품질 향상과 수량 증대에 유효하게 적용될 것으로 예측된다.

Table 1.23. The effect of seed priming on percent germination, number of days to 50% of the final germination percentage(T_{50}) and seed viability of different cultivar watermelon seeds at 25°C

Cultivar	Seed treatment	Germination (%)	T_{50} (days)	Viability			
				5 days		14 days	
				Normal (%)	Abnormal (%)	Normal (%)	Abnormal (%)
Hackgajok (해가죽)	Primed	75.6	4.1	75.6	0.0	75.6	0.0
	Untreated	50.0	9.7	50.0	0.0	50.0	0.0
	LSD 0.05	NS	1.8	18.5	NS	18.5	NS
Haechangual (해찬팔)	Primed	82.2	1.9	68.5	13.7	68.5	13.7
	Untreated	55.6	2.6	55.6	0.0	44.4	11.2
	LSD 0.05	NS	0.1	NS	2.2	NS	NS
Pomina (포미나)	Primed	74.4	4.3	94.4	0.0	94.4	0.0
	Untreated	94.4	3.5	74.4	0.0	74.4	0.0
	LSD 0.05	15.4	0.4	NS	NS	NS	NS
Gualnara (꿀나라)	Primed	80.0	4.6	80.0	0.0	80.0	0.0
	Untreated	90.0	3.9	90.0	0.0	90.0	0.0
	LSD 0.05	9.1	NS	NS	NS	NS	NS
Hyundaegual (현대팔)	Primed	98.9	1.6	98.9	0.0	98.9	0.0
	Untreated	98.9	1.8	70.6	28.3	70.6	28.3
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Speed (스피드)	Primed	98.9	1.5	98.9	0.0	98.9	0.0
	Untreated	97.8	1.7	97.8	0.0	97.8	0.0
	LSD 0.05	NS	0.1	0.3	NS	NS	NS
Urigual (우리팔)	Primed	96.7	1.6	89.8	6.9	89.8	6.9
	Untreated	65.6	2.1	56.9	8.7	56.9	8.7
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Hwalgichan (활기찬)	Primed	98.9	1.7	98.9	0.0	98.9	0.0
	Untreated	95.6	2.4	95.6	0.0	95.6	0.0
	LSD 0.05	NS	0.2	NS	NS	NS	NS
Rico fresh (리코후레쉬)	Primed	97.8	1.5	97.8	0.0	97.8	0.0
	Untreated	98.9	1.9	98.9	0.0	98.9	0.0
	LSD 0.05	NS	0.3	NS	NS	NS	NS
Rico sweet (리코스위트)	Primed	76.7	1.7	76.7	0.0	76.7	0.0
	Untreated	72.2	1.3	72.2	0.0	72.2	0.0
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
A-1031	Primed	96.7	1.6	96.7	0.0	96.7	0.0
	Untreated	97.8	1.7	97.8	0.0	97.8	0.0
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Seeds were dark-primed with 200mM KNO_3 at 25°C for 4 days and dark-germinated at 25°C for up to 7 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seed package. Means in columns within germination temperature are separated by LSD at $P = 0.05$.

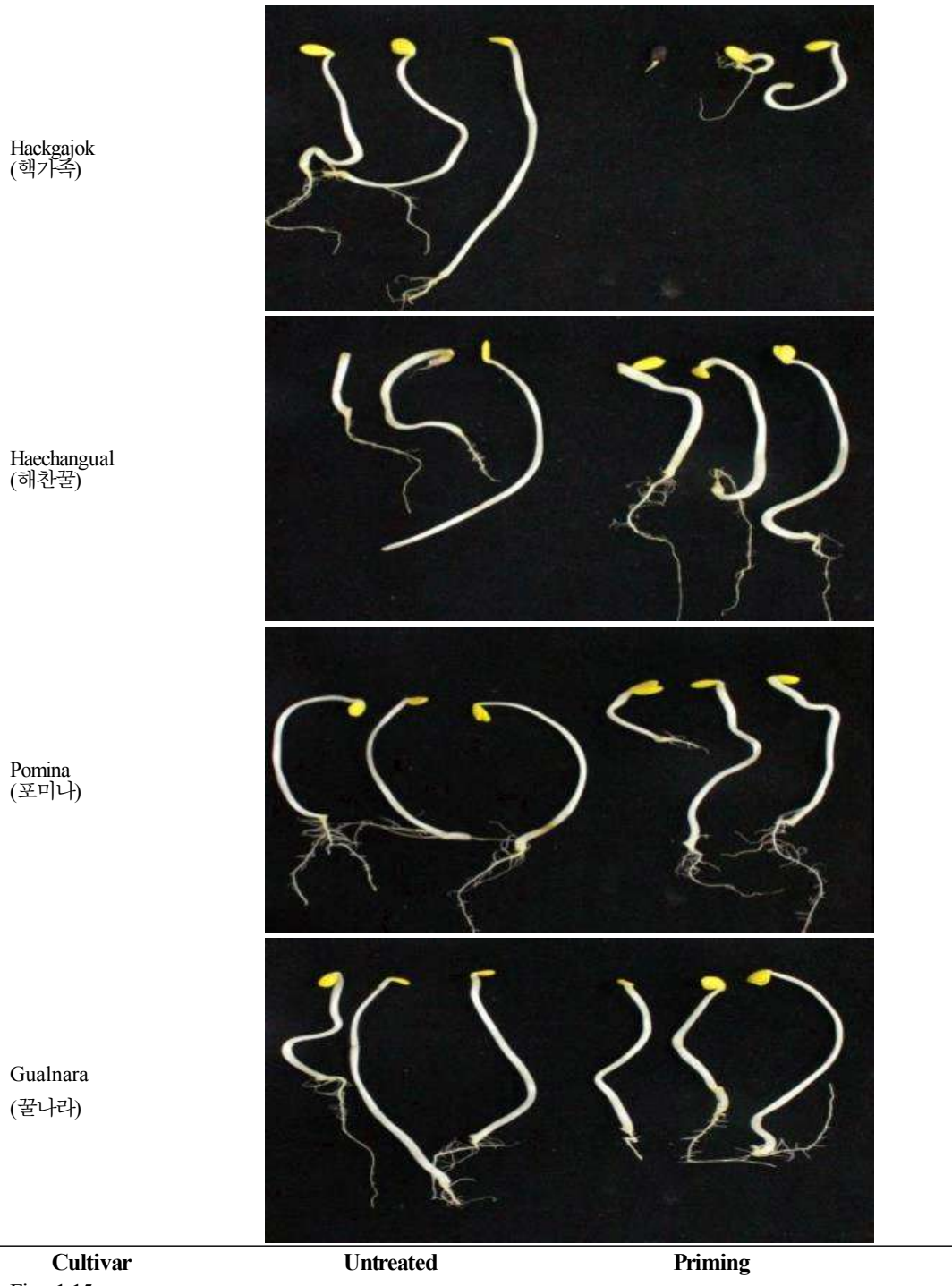


Fig. 1.15. Effect of seed priming on seedling growth of 'Hackgajok', 'Haechangual', 'Pomina' and 'Gualnara' watermelon seeds. Seeds were dark-primed with 200mM KNO₃ at 25°C for 4 days and seedling growth was tested for 14 days at 25°C.

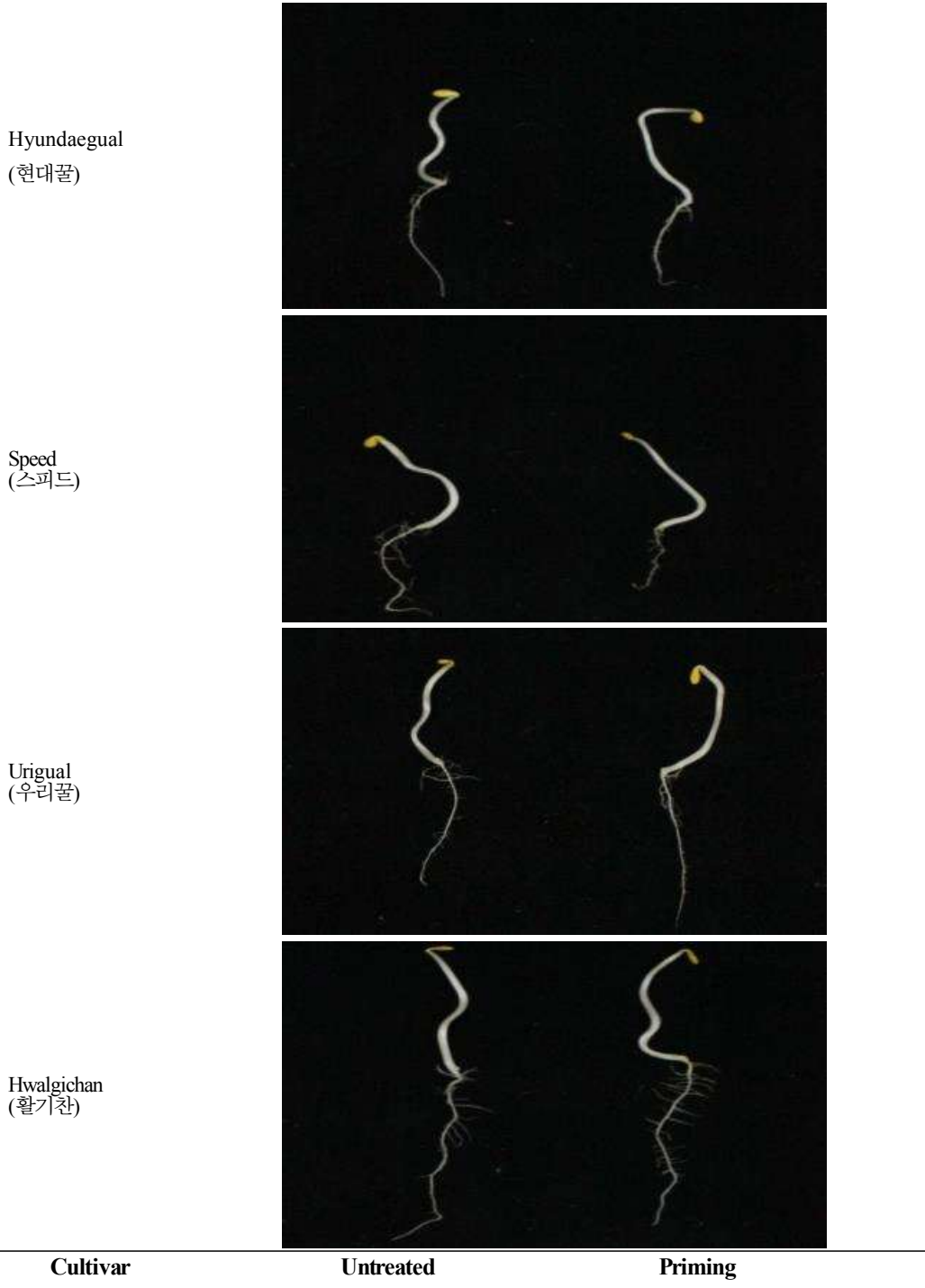


Fig. 1.16. Effect of seed priming on seedling growth of 'Hyundaegual', 'Speed', 'Uriginal' and 'Hwalgichan' watermelon seeds. Seeds were dark-primed with 200mM KNO₃ at 25°C for 4 days and seedling growth was tested for 14 days at 25°C.

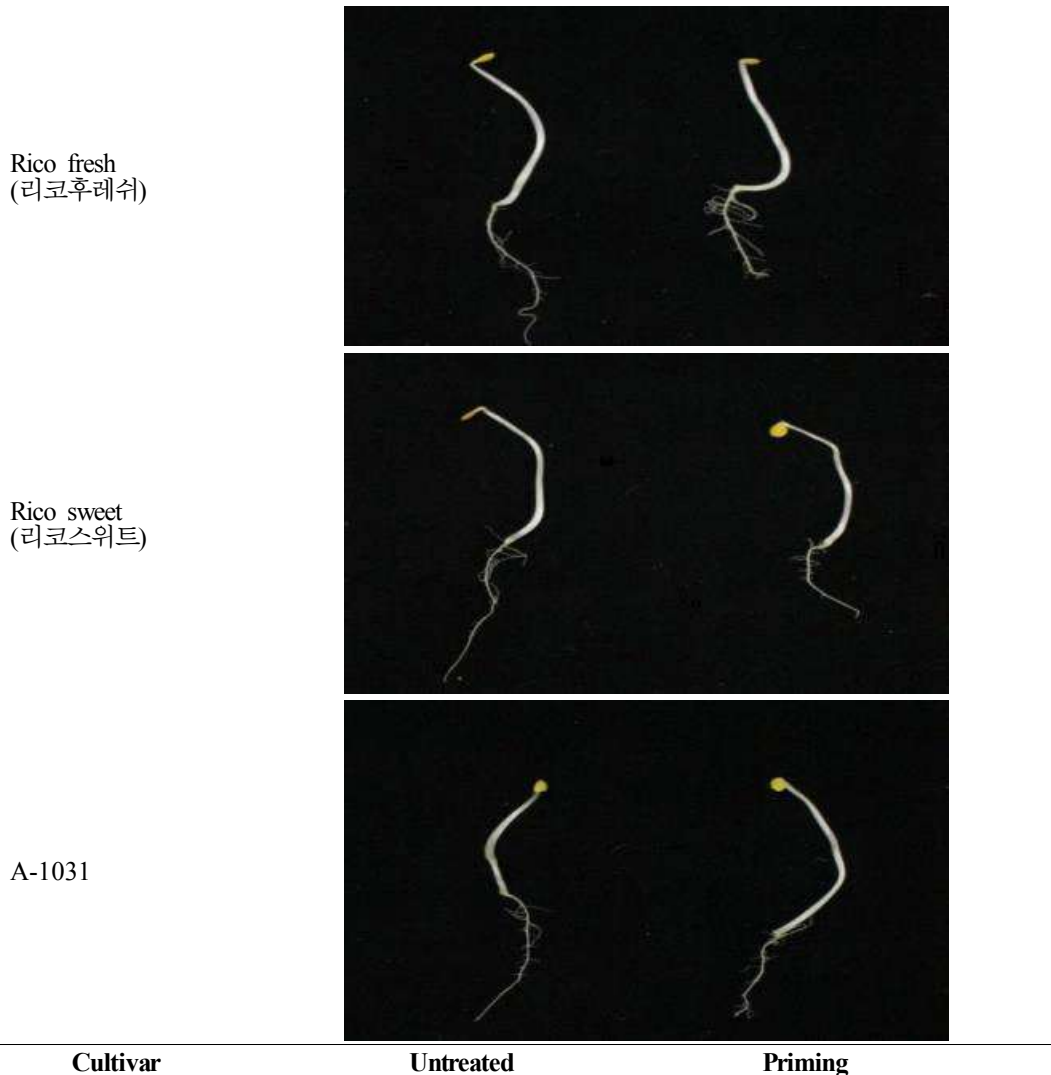


Fig. 1.17. Effect of seed priming on seedling growth of 'Rico fresh', 'Rico sweet', and 'A-1031' watermelon seeds. Seeds were dark-primed with 200mM KNO₃ at 25°C for 4 days and seedling growth was tested for 14 days at 25°C.

○ Priming 처리된 종자의 포장조건에서 유묘활력 검정

원예작물 재배에서 묘 출현율은 파종될 때의 환경조건에 의해 영향을 받게 되며, 한발, 과습, 저온 등은 묘 출현율을 저하시키는 요인이 된다. 지금까지 입묘율을 증진시키는 방안으로 실내에서 종자처리를 한 후 파종하는 방법이 제안되고 있다. 그러나 실내 실험을 통해 얻어진 발아촉진 효과들이 포장조건에서 그대로 재현되지 않아 영농현장에 적용되지 않는 경우도 있었다. 따라서 실내에 확인된 priming 처리 효과들이 포장조건에서도 묘출현과 초기생육 향상으로 연결될 수 있는지를 검토하였다(Table 1.9, Fig 1.9~1.11).

전반적으로 priming 처리된 종자는 ‘핵가죽’, ‘포니아’를 제외한 모든 품종에서 종자처리를 가하지 않은 무처리 종자에 비해 묘 출현율이 향상되었고, 출현속도도 빨랐으나 통계적인 유의성은 인정되지 않았다. 품종에 따라 차이는 있으나 priming 처리된 종자는 무처리에 비해 약 0.3일 정도 빨랐다.

수박종자를 priming 처리 후 파종하여 30일 후 초기생육을 결과 품종에 따라 약간의 차이는 있으나 유묘의 생체중과 건물중이 높아지는 경향이나 유의성은 인정된다고는 볼 수 없었다. Priming 처리의 유용 효과는 불량발아 조건에서 뚜렷하다는 선행연구들의 결과와 본 연구의 결과를 종합하여 볼 때 priming 처리종자의 사용은 묘 현율과 초기생육을 향상시킬 수 있었다.



Fig. 1.18. Effect of seed priming on percent emergence of various watermelon seeds in a greenhouse. Seeds were dark-primed with 200mM KNO_3 at 25°C for 4 days.

Seed treatment

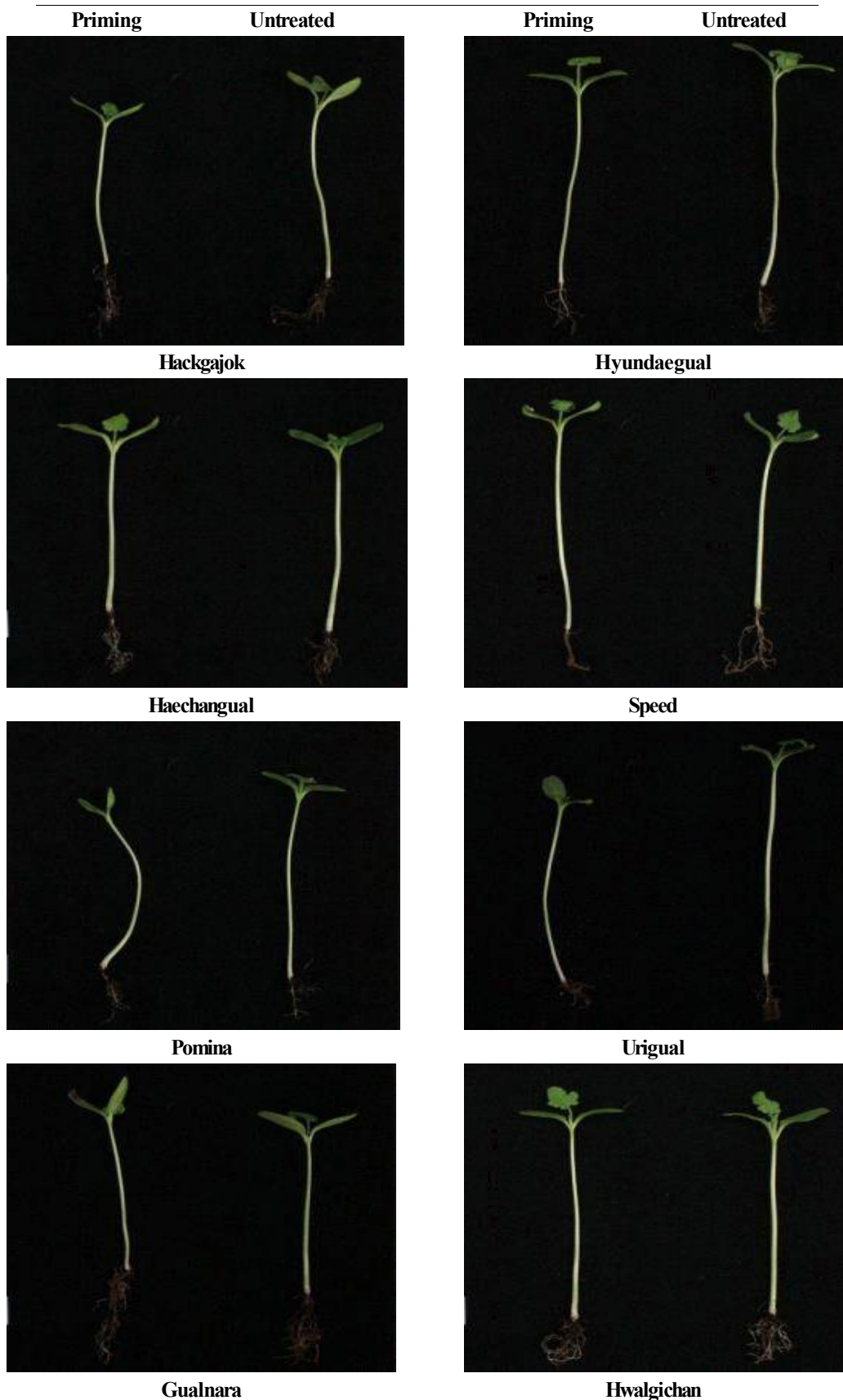


Fig. 1.19. Effect of seed priming on early growth of various watermelon seeds in a greenhouse. Seedling growth measured at 30 days after planting. Seeds were dark-primed with 200mM KNO_3 at 25°C for 4 days.

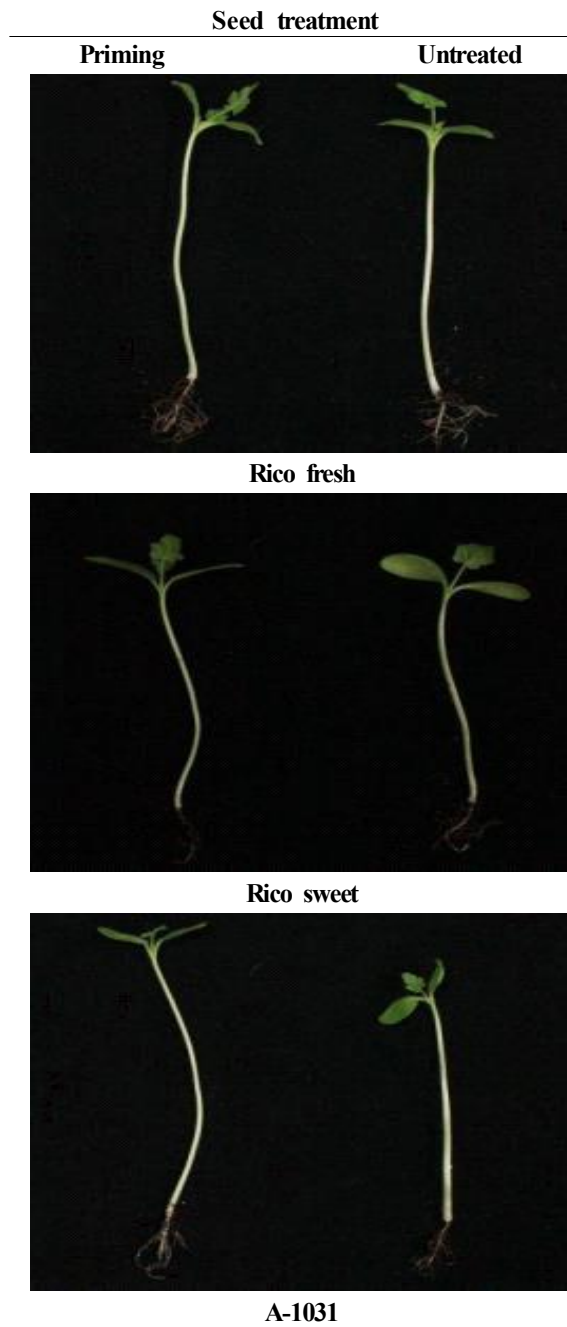


Fig. 1.20. Effect of seed priming on early growth of 'Rico fresh', 'Rico sweet', and 'A-1031' watermelon seeds in a greenhouse. Seedling growth measured at 30 days after planting. Seeds were dark-primed with 200mM KNO_3 at 25°C for 4 days.

Table 1.24. The effect of seed priming on percent emergence and early growth of different cultivar watermelon seeds in greenhouse at 25°C

Cultivar	Seed treatment	Emergency (%)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)
Hackgajok (핵가족)	Primed	50.6	0.48	0.02
	Untreated	66.7	0.44	0.02
	LSD 0.05	10.1	NS	NS
Haechangual (해찬꿀)	Primed	98.9	0.93	0.05
	Untreated	100.0	0.89	0.05
	LSD 0.05	NS	NS	NS
Pomina (포미나)	Primed	71.6	0.56	0.03
	Untreated	88.9	0.62	0.04
	LSD 0.05	12.7	NS	0.01
Gualnara (꿀나라)	Primed	87.0	0.48	0.02
	Untreated	87.8	0.59	0.03
	LSD 0.05	NS	NS	NS
Hyundaegual (현대꿀)	Primed	94.4	0.70	0.04
	Untreated	96.7	0.71	0.04
	LSD 0.05	NS	NS	NS
Speed (스피드)	Primed	100.0	0.67	0.04
	Untreated	91.1	0.74	0.03
	LSD 0.05	NS	NS	NS
Urigual (우리꿀)	Primed	98.3	0.38	0.03
	Untreated	100.0	0.79	0.04
	LSD 0.05	NS	0.59	0.03
Hwalgichan (활기찬)	Primed	87.8	0.71	0.04
	Untreated	86.7	0.62	0.03
	LSD 0.05	NS	NS	NS
Rico fresh (리코후레쉬)	Primed	95.6	0.62	0.03
	Untreated	95.6	0.60	0.03
	LSD 0.05	NS	NS	NS
Rico sweet (리코스위트)	Primed	88.9	0.57	0.03
	Untreated	86.7	0.64	0.03
	LSD 0.05	NS	NS	NS
A-1031	Primed	96.7	0.55	0.03
	Untreated	91.1	0.49	0.03
	LSD 0.05	NS	NS	NS

Seeds were dark-primed with 200mM KNO₃ at 25°C for 4 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seed package. Seedling growth measured at 30 days after planting.

Means in columns within germination temperature are separated by LSD at $P = 0.05$.

(5) 발아온도에 따른 종자 활력

수박종자의 적정 priming 조건으로 밝혀진 200mM의 KNO₃ 용액으로 25℃에서 4일간 priming 처리후 15, 20, 25, 30, 35℃의 다양한 발아온도에서 발아성을 조사하였고, 또한 파종 후 10일째의 초기생육을 조사하였다(Table 1.25~1.46 Fig. 1.21~1.26) 공시작물은 ‘핵가족’을 비롯한 11개 품종이었다.

품종에 관계없이 priming 처리된 종자는 모든 발아온도에서 무처리보다 발아율이 증진되었고, T₅₀은 단축되어 발아촉진에 유효하였다. 수박이 발아적온이 30℃임을 감안한다면 저온인 15℃와 20℃에서는 무처리보다 T₅₀ 단축에 현저한 효과가 있었으며, 발아적온에 근접할수록 처리 효과는 감소하는 경향이였다. 이는 priming 처리가 불량환경 조건에서 그 효과가 현저하였다는 기존의 연구들과 일치하는 결과였다.

품종별 경향을 보면 ‘핵가족’ 수박은 priming 처리에 의해 모든 발아온도에서 무처리 종자에 비해 발아율이 현저하게 향상되었으며, 유묘세 평가에서 무처리에 비해 생육이 저하되었다. 차후 이를 보완할 수 있는 처리 화학제 개발이 수행되어야 할 것으로 판단되었다. ‘해찬꿀’에서는 priming 처리에 의해 발아율이 향상되었고 발아속도 또한 빨랐다. 특히, priming 효과는 발아적온을 벗어난 15℃와 35℃에서 발아증진 효과가 높았다. 발아후 10일째의 유묘세력도 priming 처리된 무처리에 비해 좋았다. ‘포미아’에서도 priming 처리에 의해 발아율 및 유묘세력이 증진 효과가 뚜렷하지 않았으나, ‘꿀나라’에서는 priming 처리에 의해 발아율 증진 효과와 더불어 유묘세력이 향상되었다. ‘현대꿀’에서는 priming 처리는 종자는 저온인 15℃에서 76%의 발아율을 보여 10%의 발아율을 보인 무처리종자에 비해 발아율이 무려 67% 증진되었고, 발아속도도 약 4일 단축되었다.

Priming 처리된 종자는 다양한 발아온도에서 무처리에 비해 생육이 좋았으나 통계적인 유의성은 인정되지 않았다. ‘스피드’에서도 priming 처리에 의해 저온인 15℃에서 무처리 종자는 전혀 발아하지 않았으나, priming 처리종자는 72%의 발아하여 저온발아성이 증진되었다. 또한 발아속도 단축되어 조기발아 하였다. 반면 유묘세력은 무처리에 비해 좋았으나 통계적인 유의성은 없었다. 이외에도 ‘우리꿀’, ‘활기찬’, ‘리코프레쉬’, ‘리코스위트’ 및 ‘A-1031’ 등의 품종의 품종에서도 priming 처리에 의한 저온발아성과 고온발아성이 증진되었다. 이상의 결과에서 priming 처리는 발아적온보다는 불량발아조건에서 그 효과가 현저한 것으로 판명되었다(Table 1.25~1.46 Fig. 1.21~1.26).

선진외국에서는 고가인 대부분의 종자들이 priming 처리되고 있는데, priming 종자의 활력에 관여하는 주요 요인은 산소공급, priming 온도, 처리기간, 광의 존재 유무, priming후의 탈수 및 저장 조건 등이며, 작물의 종류에 따라서도 효과가 달라질 수 있다(Parera and Cantliffe, 1994).

Priming 종자의 발아촉진 원인은 배에 축적된 용질에 의한 것보다는 priming 동안 수분흡수의 2 단계를 인위적으로 도달하게 하여 처리 최종기에는 세포벽의 신전성이 촉진되어 유근정단에 근접된 배유세포의 연약화를 유도하여 신속한 발아가 유리된다고 하였다.

Priming 처리에 의해 신속하고 균일한 발아가 가능함은 널리 알려진 사실이지만 이러한 여러 장점에도 불구하고 산업화에 이용되고 있는 작물수는 한정되어 있다. 그 원인은 무처리 종자에 비해 priming 종자는 고가이고, 유용효과에 대한 인식부족에 의한 것으로 풀이된다.

Table 1.25 Effect of germination temperature on percent germination, days to 50% of the final germination percentage(T_{50}), and viability of primed 'Hackgajok' watermelon seeds.

Germination Temp.(°C)	Seed treatment	Germination (%)	T_{50} (days)	Viability			
				5 days		14 days	
				Normal (%)	Abnormal (%)	Normal (%)	Abnormal (%)
15	Primed	22.2	12.8	22.2	0.0	22.2	0.0
	Untreated	13.3	14.6	13.3	0.0	13.3	0.0
	LSD 0.05	3.05	NS	NS	NS	NS	NS
20	Primed	76.7	8.7	76.7	0.0	76.7	0.0
	Untreated	13.3	9.9	13.3	0.0	13.3	0.0
	LSD 0.05	21.40	NS	0.0	NS	0.0	NS
25	Primed	75.6	4.1	75.6	0.0	75.6	0.0
	Untreated	50.0	9.7	50.0	0.0	50.0	0.0
	LSD 0.05	NS	1.82	18.5	NS	18.5	NS
30	Primed	70.0	2.4	70.0	0.0	70.0	0.0
	Untreated	32.2	4.7	32.2	0.0	32.2	0.0
	LSD 0.05	24.61	2.11	37.5	NS	0.0	NS
35	Primed	63.3	2.9	63.3	0.0	63.3	0.0
	Untreated	17.8	6.5	17.8	0.0	17.8	0.0
	LSD 0.05	39.40	NS	18.5	NS	18.5	NS

Seeds were dark-primed with 200mM KNO_3 at 25°C for 4 days and dark-germinated at 25°C for up to 14 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seed package. Means in columns within germination temperature are separated by LSD at $P = 0.05$.

Table 1.26. Effect of germination temperature on hypocotyl length, hypocotyl diameter, root length, number of root, fresh and dry weight of primed 'Hackgajok' watermelon seeds measured at 14 days after planting.

Germination Temp.(°C)	Seed treatment	Hypocotyl length (cm)	Hypocotyl diameter (mm)	Root length (cm)	No. of root	14 day old seedling	
						Fresh weight(g)	Dry weight (g)
15	Primed	0.0	0.0	0.0	0.0	0.55	0.15
	Untreated	0.0	0.0	0.0	0.0	0.05	0.03
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	0.04	0.01
20	Primed	0.00	0.00	1.48	0.0	0.56	0.18
	Untreated	6.22	2.85	7.50	24.4	0.44	0.01
	LSD 0.05	2.21	0.37	4.12	16.3	NS	0.02
25	Primed	1.68	1.46	2.36	6.0	0.81	0.08
	Untreated	11.30	2.05	6.20	31.6	0.57	0.02
	LSD 0.05	3.37	NS	NS	13.9	NS	0.01
30	Primed	1.00	1.17	1.66	1.0	0.73	0.16
	Untreated	7.92	1.70	6.06	26.8	0.37	0.01
	LSD 0.05	2.85	NS	3.81	7.7	0.05	0.01
35	Primed	4.06	1.26	2.78	11.80	1.37	0.10
	Untreated	11.12	2.43	5.46	28.20	0.54	0.02
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	0.10	0.01

Seeds were dark-primed with 200mM KNO_3 at 25°C for 4 days and dark-germinated at 25°C for up to 7 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seed package. Means in columns within germination temperature are separated by LSD at $P = 0.05$.

Table 1.27 Effect of germination temperature on percent germination, days to 50% of the final germination percentage(T_{50}), and viability of primed 'Haechangual' watermelon seeds.

Germination Temp.(°C)	Seed treatment	Germination (%)	T_{50} (days)	Viability			
				5 days		14 days	
				Normal (%)	Abnormal (%)	Normal (%)	Abnormal (%)
15	Primed	41.1	11.7	35.2	5.9	35.2	5.9
	Untreated	16.7	12.9	16.7	0.0	16.7	0.0
	LSD 0.05	15.43	NS	18.51	NS	18.51	NS
20	Primed	56.7	8.1	56.7	0.0	56.7	0.0
	Untreated	35.6	6.9	35.6	0.0	35.6	0.0
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
25	Primed	82.2	1.9	68.5	13.7	68.5	13.7
	Untreated	55.6	2.6	55.6	0.0	55.6	0.0
	LSD 0.05	NS	0.16	NS	NS	NS	NS
30	Primed	100.0	0.3	100.0	0.0	100.0	0.0
	Untreated	48.9	1.4	48.9	0.0	48.9	0.0
	LSD 0.05	32.21	0.41	NS	NS	NS	NS
35	Primed	100.0	0.5	90.9	8.4	90.9	9.1
	Untreated	65.6	2.4	53.7	11.9	53.7	11.9
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Seeds were dark-primed with 200mM KNO_3 at 25°C for 4 days and dark-germinated at 25°C for up to 7 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seed package. Means in columns within germination temperature are separated by LSD at $P = 0.05$.

Table 1.28. Effect of germination temperature on hypocotyl length, hypocotyl diameter, root length, number of root, fresh and dry weight of primed 'Haechangual' watermelon seeds measured at 14 days after planting.

Germination Temp.(°C)	Seed treatment	Hypocotyl length (cm)	Hypocotyl diameter (mm)	Root length (cm)	No. of root	14 day old seedling	
						Fresh weight(g)	Dry weight (g)
15	Primed	0.16	0.93	0.50	0.40	0.40	0.21
	Untreated	0.00	0.00	0.44	0.00	0.39	0.22
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
20	Primed	4.48	3.19	6.28	13.80	2.31	0.14
	Untreated	6.78	2.43	5.46	18.00	2.26	0.12
	LSD 0.05	NS	0.59	NS	NS	NS	NS
25	Primed	6.94	3.50	22.30	34.60	3.57	0.12
	Untreated	5.34	0.88	2.56	9.40	1.37	0.10
	LSD 0.05	NS	1.35	NS	19.52	0.25	NS
30	Primed	4.80	5.84	3.13	15.00	3.00	0.12
	Untreated	4.22	1.65	3.34	9.60	2.24	0.14
	LSD 0.05	NS	2.75	NS	NS	NS	NS
35	Primed	11.26	3.10	4.46	11.60	3.01	0.08
	Untreated	7.88	1.51	4.50	15.20	2.77	0.09
	LSD 0.05	NS	1.50	NS	NS	NS	NS

Seeds were dark-primed with 200mM KNO_3 at 25°C for 4 days and dark-germinated at 25°C for up to 7 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seed package. Means in columns within germination temperature are separated by LSD at $P = 0.05$.

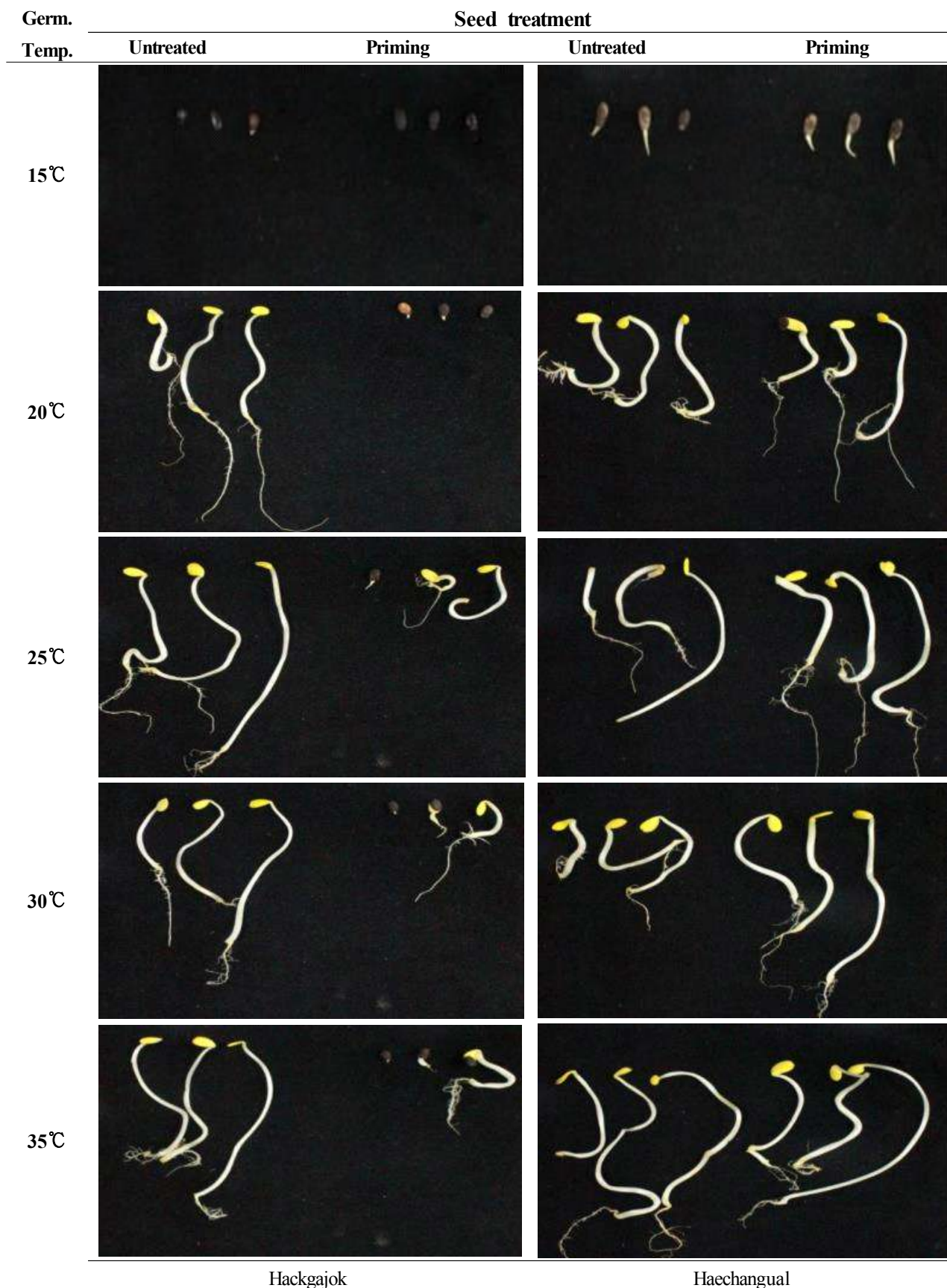


Fig. 1.21. Effect of germination temperature on seedling growth of primed 'Hackgajok' and 'Haechangual' watermelon seeds. Seeds were dark-primed with 200mM KNO₃ at 25°C for 4 days and seedling growth was tested for 14 days at 25°C. Seed viability measured at 14 days after planting.

Table 1.29 Effect of germination temperature on percent germination, days to 50% of the final germination percentage(T_{50}), and viability of primed 'Pomina' watermelon seeds.

Germination Temp.(°C)	Seed treatment	Germination (%)	T_{50} (days)	Viability			
				5 days		14 days	
				Normal (%)	Abnormal (%)	Normal (%)	Abnormal (%)
15	Primed	34.4	12.8	0.0	0.0	34.4	0.0
	Untreated	31.1	13.1	0.0	0.0	31.1	0.0
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
20	Primed	98.9	8.6	31.1	0.0	98.9	0.0
	Untreated	67.8	5.6	1.1	0.0	67.8	0.0
	LSD 0.05	NS	2.41	NS	NS	NS	NS
25	Primed	94.4	4.3	80.0	0.0	94.4	0.0
	Untreated	64.4	3.5	42.2	0.0	64.4	0.0
	LSD 0.05	17.45	0.49	NS	NS	NS	NS
30	Primed	85.6	2.1	84.4	0.0	85.6	0.0
	Untreated	84.4	2.0	78.9	0.0	84.4	0.0
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
35	Primed	71.1	1.9	71.1	0.0	71.1	0.0
	Untreated	55.6	1.8	54.4	0.0	55.6	0.0
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Seeds were dark-primed with 200mM KNO_3 at 25°C for 4 days and dark-germinated at 25°C for up to 7 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seed package. Means in columns within germination temperature are separated by LSD at $P = 0.05$.

Table 1.30. Effect of germination temperature on hypocotyl length, hypocotyl diameter, root length, number of root, fresh and dry weight of primed 'Pomina' watermelon seeds measured at 14 days after planting.

Germination Temp.(°C)	Seed treatment	Hypocotyl length (cm)	Hypocotyl diameter (mm)	Root length (cm)	No. of root	14 day old seedling	
						Fresh weight(g)	Dry weight (g)
15	Primed	0.0	0.0	0.0	0.0	0.46	0.17
	Untreated	0.0	0.0	0.0	0.0	0.47	0.15
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
20	Primed	3.42	1.86	4.04	12.80	1.01	0.08
	Untreated	7.34	2.36	7.28	18.80	2.07	0.06
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	0.15	NS
25	Primed	9.88	2.50	9.42	29.40	2.01	0.06
	Untreated	10.72	2.62	7.26	29.80	2.44	0.08
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
30	Primed	3.59	0.31	2.44	11.40	1.26	0.15
	Untreated	2.54	1.37	2.08	5.80	1.05	0.15
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
35	Primed	10.52	2.77	6.54	34.20	2.53	0.10
	Untreated	7.54	2.88	4.84	23.60	2.29	0.06
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Seeds were dark-primed with 200mM KNO_3 at 25°C for 4 days and dark-germinated at 25°C for up to 7 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seed package. Means in columns within germination temperature are separated by LSD at $P = 0.05$.

Table 1.31. Effect of germination temperature on percent germination, days to 50% of the final germination percentage(T_{50}), and viability of primed 'Gualnara' watermelon seeds.

Germination Temp.(°C)	Seed treatment	Germination (%)	T_{50} (days)	Viability			
				5 days		14 days	
				Normal (%)	Abnormal (%)	Normal (%)	Abnormal (%)
15	Primed	52.2	13.6	0.0	0.0	52.2	0.0
	Untreated	31.1	13.4	0.0	0.0	31.1	0.0
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
20	Primed	61.1	9.1	1.1	0.0	61.1	0.0
	Untreated	86.7	6.0	20.0	0.0	86.7	0.0
	LSD 0.05	NS	1.93	NS	NS	NS	NS
25	Primed	70.0	4.6	43.3	0.0	70.0	0.0
	Untreated	90.0	3.9	72.2	0.0	90.0	0.0
	LSD 0.05	11.95	NS	NS	NS	NS	NS
30	Primed	77.8	3.5	52.2	0.0	77.8	0.0
	Untreated	96.7	1.8	94.4	0.0	96.7	0.0
	LSD 0.05	6.17	0.77	NS	NS	NS	NS
35	Primed	60.0	3.6	41.1	0.0	60.0	0.0
	Untreated	98.9	1.6	93.3	0.0	98.9	0.0
	LSD 0.05	14.47	0.64	18.5	NS	26.2	NS

Seeds were dark-primed with 200mM KNO_3 at 25°C for 4 days and dark-germinated at 25°C for up to 7 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seed package. Means in columns within germination temperature are separated by LSD at $P = 0.05$.

Table 1.32. Effect of germination temperature on hypocotyl length, hypocotyl diameter, root length, number of root, fresh and dry weight of primed 'Gualnara' watermelon seeds measured at 14 days after planting.

Germination Temp.(°C)	Seed treatment	Hypocotyl length (cm)	Hypocotyl diameter (mm)	Root length (cm)	No. of root	14 day old seedling	
						Fresh weight(g)	Dry weight (g)
15	Primed	0.0	0.0	0.0	0.0	0.45	0.16
	Untreated	0.0	0.0	0.0	0.0	0.37	0.16
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	0.01
20	Primed	7.94	3.07	5.02	21.00	1.60	0.08
	Untreated	6.38	3.36	4.00	19.00	2.85	0.08
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
25	Primed	9.38	2.74	6.06	18.20	2.38	0.06
	Untreated	8.77	2.42	2.66	11.20	2.87	0.07
	LSD 0.05	NS	NS	3.09	NS	NS	NS
30	Primed	5.46	2.18	4.44	15.40	1.71	0.04
	Untreated	5.18	2.33	1.78	7.60	1.28	0.04
	LSD 0.05	NS	NS	1.44	NS	NS	NS
35	Primed	10.14	2.49	3.86	15.20	2.13	0.07
	Untreated	9.56	1.63	2.18	7.60	2.39	0.07
	LSD 0.05	NS	0.58	NS	NS	NS	NS

Seeds were dark-primed with 200mM KNO_3 at 25°C for 4 days and dark-germinated at 25°C for up to 7 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seed package. Means in columns within germination temperature are separated by LSD at $P = 0.05$.

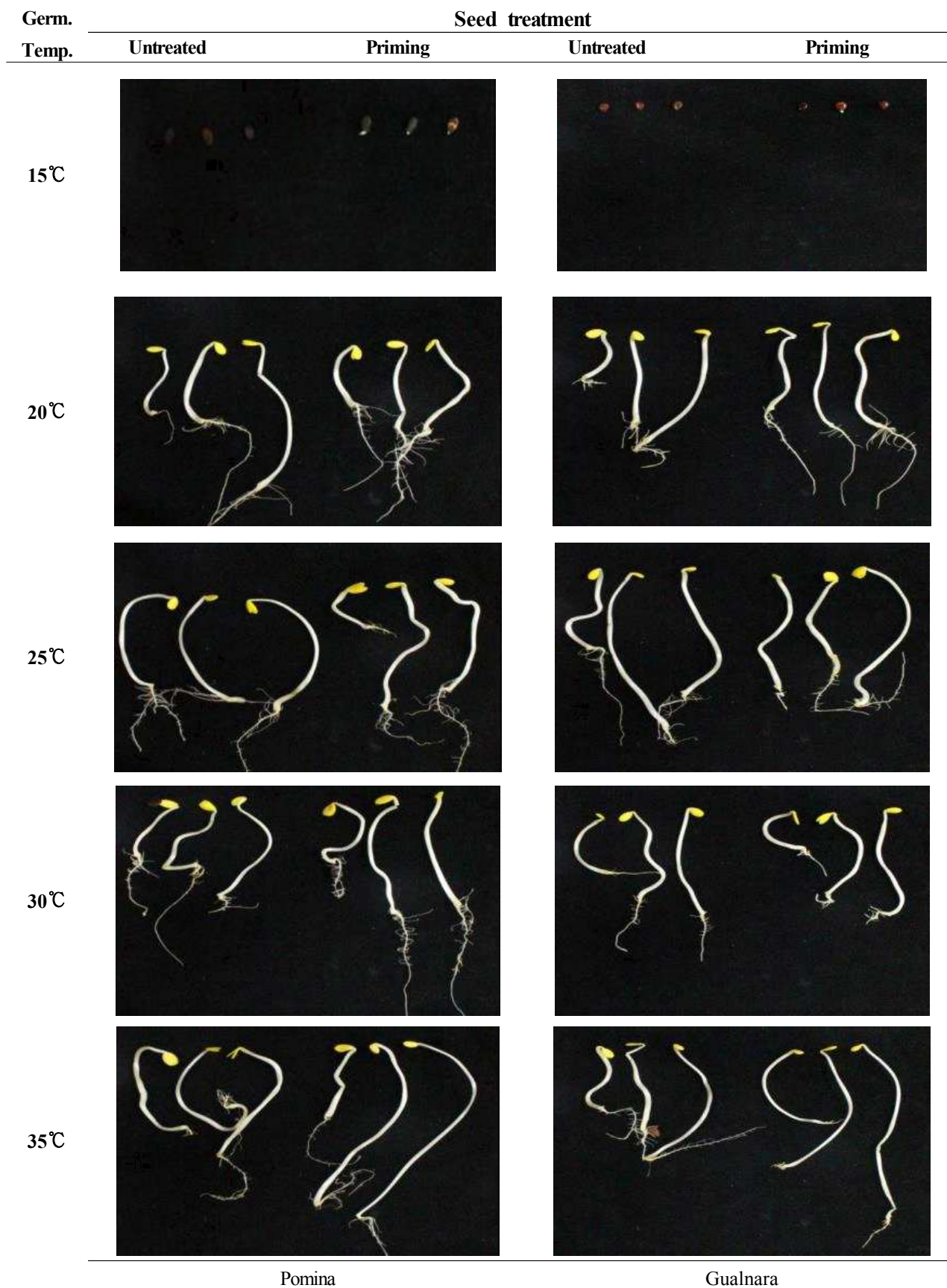


Fig. 1.22. Effect of germination temperature on seedling growth of primed 'Pomina' and 'Gualnara' watermelon seeds. Seeds were dark-primed with 200mM KNO₃ at 25°C for 4 days and seedling growth was tested for 14 days at 25°C. Seed viability measured at 14 days after planting.

Table 1.33. Effect of germination temperature on percent germination, days to 50% of the final germination percentage(T_{50}), and viability of primed 'Hyundaegual' watermelon seeds.

Germination Temp.(°C)	Seed treatment	Germination (%)	T_{50} (days)	Viability			
				5 days		14 days	
				Normal (%)	Abnormal (%)	Normal (%)	Abnormal (%)
15	Primed	76.7	9.9	0.0	0.0	76.7	0.0
	Untreated	10.0	13.9	0.0	0.0	10.0	0.0
	LSD 0.05	16.90	0.67	NS	NS	18.5	NS
20	Primed	98.9	2.9	77.8	0.0	98.9	0.0
	Untreated	98.9	3.5	96.7	0.0	98.9	0.0
	LSD 0.05	NS	0.37	NS	NS	NS	NS
25	Primed	98.9	1.6	98.9	0.0	98.9	0.0
	Untreated	98.9	1.8	69.8	28.0	70.6	28.3
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
30	Primed	97.8	2.6	94.4	0.0	97.8	0.0
	Untreated	95.6	2.6	96.7	0.0	95.6	0.0
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
35	Primed	98.9	0.9	97.8	0.0	98.9	0.0
	Untreated	97.8	1.2	97.8	0.0	91.7	6.1
	LSD 0.05	NS	0.13	NS	NS	NS	NS

Seeds were dark-primed with 200mM KNO_3 at 25°C for 4 days and dark-germinated at 25°C for up to 7 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seed package. Means in columns within germination temperature are separated by LSD at $P = 0.05$.

Table 1.34. Effect of seed germination temperature on hypocotyl length, hypocotyl diameter, root length, number of root, fresh and dry weight of primed 'Hyundaegual' watermelon seeds measured at 14 days after planting.

Germination Temp.(°C)	Seed treatment	Hypocotyl length (cm)	Hypocotyl diameter (mm)	Root length (cm)	No. of root	14 day old seedling	
						Fresh weight(g)	Dry weight (g)
15	Primed	0.0	0.0	0.00	0.00	0.39	0.15
	Untreated	0.0	0.0	0.32	0.60	0.35	0.05
	LSD 0.05	NS	NS	NS	0.56	NS	0.01
20	Primed	3.10	2.89	4.62	16.40	1.14	0.11
	Untreated	2.64	2.04	4.26	12.40	1.14	0.1
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
25	Primed	6.96	2.26	4.52	21.801	2.28	0.06
	Untreated	8.36	2.63	6.62	26.40	1.89	0.09
	LSD 0.05	NS	NS	1.85	NS	NS	NS
30	Primed	8.32	2.40	6.32	20.80	2.28	0.06
	Untreated	10.02	2.57	6.90	24.60	1.73	0.05
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
35	Primed	11.02	2.59	6.76	31.80	2.76	0.07
	Untreated	12.16	2.69	7.90	33.60	2.55	0.07
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Seeds were dark-primed with 200mM KNO_3 at 25°C for 4 days and dark-germinated at 25°C for up to 7 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seed package. Means in columns within germination temperature are separated by LSD at $P = 0.05$.

Table 1.35. Effect of germination temperature on percent germination, days to 50% of the final germination percentage(T_{50}), and viability of primed 'Speed' watermelon seeds.

Germination Temp.(°C)	Seed treatment	Germination (%)	T_{50} (days)	Viability			
				5 days		14 days	
				Normal (%)	Abnormal (%)	Normal (%)	Abnormal (%)
15	Primed	41.1	11.7	0.0	0.0	41.1	0.0
	Untreated	72.2	9.8	1.1	0.0	72.2	0.0
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
20	Primed	56.7	8.1	3.3	0.0	56.7	0.0
	Untreated	98.9	2.8	98.9	0.0	98.9	0.0
	LSD 0.05	NS	0.20	NS	NS	NS	NS
25	Primed	82.2	1.9	82.2	0.0	82.2	0.0
	Untreated	55.6	2.6	54.4	0.0	55.6	0.0
	LSD 0.05	NS	0.18	0.4	NS	NS	NS
30	Primed	100.0	0.3	98.9	0.0	100.0	0.0
	Untreated	48.9	1.4	44.4	0.0	48.9	0.0
	LSD 0.05	3.09	NS	NS	NS	NS	NS
35	Primed	100.0	0.5	100.0	0.0	100.0	0.0
	Untreated	100.0	2.4	50.0	0.0	100.0	0.0
	LSD 0.05	NS	0.06	NS	NS	NS	NS

Seeds were dark-primed with 200mM KNO_3 at 25°C for 4 days and dark-germinated at 25°C for up to 7 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seed package. Means in columns within germination temperature are separated by LSD at $P = 0.05$.

Table 1.36. Effect of germination temperature on hypocotyl length, hypocotyl diameter, root length, number of root, fresh and dry weight of 'Speed' primed watermelon seeds measured at 14 days after planting.

Germination Temp.(°C)	Seed treatment	Hypocotyl length (cm)	Hypocotyl diameter (mm)	Root length (cm)	No. of root	14 day old seedling	
						Fresh weight(g)	Dry weight (g)
15	Primed	0.0	0.0	0.0	0.0	0.46	0.18
	Untreated	0.0	0.0	0.0	0.0	0.37	0.16
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
20	Primed	3.34	3.19	6.32	20.60	1.66	0.22
	Untreated	3.62	2.96	8.76	41.80	1.68	0.19
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
25	Primed	6.98	2.54	7.16	32.00	2.57	0.11
	Untreated	7.92	3.18	10.44	34.80	2.62	0.11
	LSD 0.05	NS	0.32	NS	NS	NS	NS
30	Primed	10.56	2.47	9.42	36.60	2.54	0.10
	Untreated	10.36	2.88	10.30	34.00	2.53	0.11
	LSD 0.05	NS	0.32	NS	NS	NS	NS
35	Primed	10.66	2.98	8.00	31.60	3.40	0.11
	Untreated	11.32	2.84	8.54	33.40	3.27	0.11
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Seeds were dark-primed with 200mM KNO_3 at 25°C for 4 days and dark-germinated at 25°C for up to 7 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seed package. Means in columns within germination temperature are separated by LSD at $P = 0.05$.

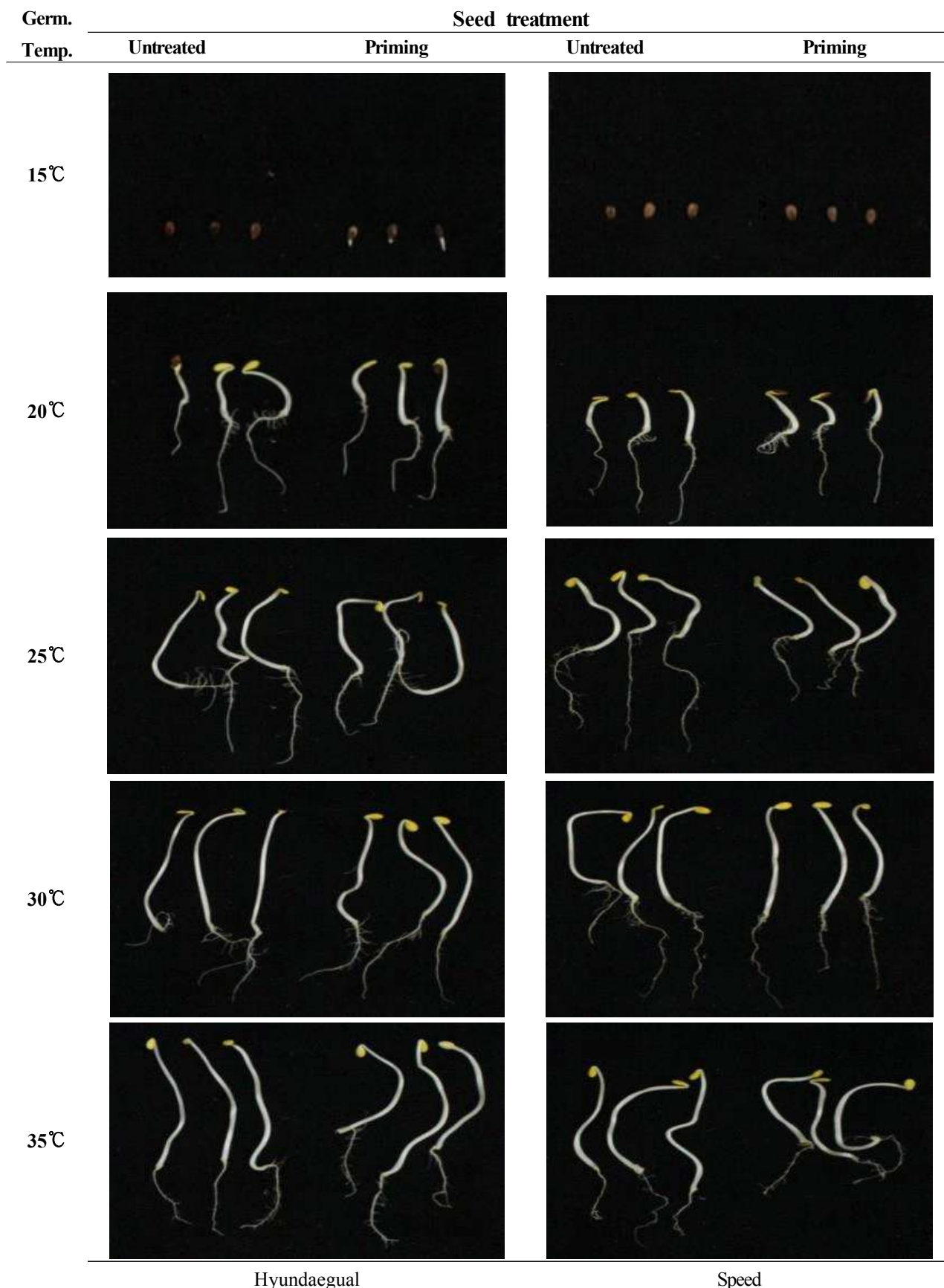


Fig. 1.23. Effect of germination temperature on seedling growth of primed 'Hyundaegual' and 'Speed' watermelon seeds. Seeds were dark-primed with 200mM KNO₃ at 25°C for 4 days and seedling growth was tested for 14 days at 25°C. Seed viability measured at 14 days after planting.

Table 1.37. Effect of germination temperature on percent germination, days to 50% of the final germination percentage(T_{50}), and viability of primed 'Urigual' watermelon seeds.

Germination Temp.(°C)	Seed treatment	Germination (%)	T_{50} (days)	Viability			
				5 days		14 days	
				Normal (%)	Abnormal (%)	Normal (%)	Abnormal (%)
15	Primed	5.6	6.4	0.0	0.0	5.6	0.0
	Untreated	44.4	10.5	0.0	0.0	44.4	0.0
	LSD 0.05	20.47	NS	NS	NS	32.1	NS
20	Primed	100.0	3.6	98.9	0.0	100.0	0.0
	Untreated	71.1	5.1	1.1	0.0	66.3	4.8
	LSD 0.05	11.13	1.41	NS	NS	NS	NS
25	Primed	96.7	1.6	74.3	5.7	89.8	6.9
	Untreated	65.6	2.1	36.6	5.6	56.9	8.7
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
30	Primed	100.0	2.9	73.2	11.2	86.7	13.3
	Untreated	82.2	3.3	73.6	5.3	76.7	5.5
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
35	Primed	97.8	1.3	71.1	0.0	97.8	0.0
	Untreated	97.8	1.3	54.4	0.0	97.8	0.0
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Seeds were dark-primed with 200mM KNO_3 at 25°C for 4 days and dark-germinated at 25°C for up to 7 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seed package. Means in columns within germination temperature are separated by LSD at $P = 0.05$.

Table 1.38. Effect of germination temperature on hypocotyl length, hypocotyl diameter, root length, number of root, fresh and dry weight of 'Urigual' primed watermelon seeds measured at 14 days after planting.

Germination Temp.(°C)	Seed treatment	Hypocotyl length (cm)	Hypocotyl diameter (mm)	Root length (cm)	No. of root	14 day old seedling	
						Fresh weight(g)	Dry weight (g)
15	Primed	0.0	0.0	0.0	0.0	0.43	0.24
	Untreated	0.0	0.0	0.0	0.0	0.39	0.26
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
20	Primed	3.56	2.86	7.40	23.40	1.73	0.14
	Untreated	3.36	2.49	7.04	22.00	1.46	0.16
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
25	Primed	9.22	2.76	9.10	37.20	3.14	0.11
	Untreated	7.46	3.23	11.82	40.00	2.92	0.11
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
30	Primed	9.46	2.81	8.60	32.40	2.81	0.10
	Untreated	8.10	3.10	11.10	32.80	3.13	0.11
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
35	Primed	14.00	3.19	10.56	36.20	4.14	0.10
	Untreated	11.68	2.35	10.94	50.00	3.20	0.11
	LSD 0.05	11.88	0.54	NS	11.88	NS	NS

Seeds were dark-primed with 200mM KNO_3 at 25°C for 4 days and dark-germinated at 25°C for up to 7 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seed package. Means in columns within germination temperature are separated by LSD at $P = 0.05$.

Table 1.39. Effect of germination temperature on percent germination, days to 50% of the final germination percentage(T_{50}), and viability of primed 'Hwalgichan' watermelon seeds.

Germination Temp.(°C)	Seed treatment	Germination (%)	T_{50} (days)	Viability			
				5 days		14 days	
				Normal (%)	Abnormal (%)	Normal (%)	Abnormal (%)
15	Primed	27.8	10.8	27.8	0.0	27.8	0.0
	Untreated	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	LSD 0.05	26.89	0.93	NS	NS	NS	NS
20	Primed	100.0	3.5	98.9	0.0	100.0	0.0
	Untreated	76.7	4.1	1.1	0.0	76.7	0.0
	LSD 0.05	23.29	0.59	NS	NS	NS	NS
25	Primed	98.9	1.7	72.2	0.0	98.9	0.0
	Untreated	95.6	2.4	43.3	0.0	95.6	0.0
	LSD 0.05	NS	0.18	NS	NS	NS	NS
30	Primed	96.7	2.7	94.4	0.0	96.7	0.0
	Untreated	94.4	2.7	52.2	0.0	94.4	0.0
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
35	Primed	95.6	1.1	93.3	0.0	95.6	0.0
	Untreated	96.7	1.3	41.1	0.0	96.7	0.0
	LSD 0.05	NS	0.09	NS	NS	NS	NS

Seeds were dark-primed with 200mM KNO_3 at 25°C for 4 days and dark-germinated at 25°C for up to 7 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seed package. Means in columns within germination temperature are separated by LSD at $P = 0.05$.

Table 1.40. Effect of germination temperature on hypocotyl length, hypocotyl diameter, root length, number of root, fresh and dry weight of 'Hwalgichan' primed watermelon seeds measured at 14 days after planting.

Germination Temp.(°C)	Seed treatment	Hypocotyl length (cm)	Hypocotyl diameter (mm)	Root length (cm)	No. of root	14 day old seedling	
						Fresh weight(g)	Dry weight (g)
15	Primed	0.0	0.0	0.48	0.80	0.39	0.12
	Untreated	0.0	0.0	0.00	0.00	0.40	0.18
	LSD 0.05	NS	NS	0.47	0.47	NS	NS
20	Primed	3.10	3.28	7.34	19.20	1.45	0.13
	Untreated	2.70	3.18	5.72	10.40	1.10	0.09
	LSD 0.05	NS	NS	NS	0.47	NS	NS
25	Primed	8.76	3.18	10.40	40.20	2.39	0.10
	Untreated	7.32	2.85	8.00	99.20	1.97	0.06
	LSD 0.05	NS	NS	1.87	NS	NS	NS
30	Primed	10.56	3.81	8.44	34.00	2.53	0.08
	Untreated	10.32	2.65	10.30	35.60	2.34	0.02
	LSD 0.05	NS	NS	1.78	NS	NS	0.01
35	Primed	9.62	2.93	8.80	38.20	2.15	0.01
	Untreated	9.58	3.14	8.22	33.00	1.84	0.07
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	0.01

Seeds were dark-primed with 200mM KNO_3 at 25°C for 4 days and dark-germinated at 25°C for up to 7 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seed package. Means in columns within germination temperature are separated by LSD at $P = 0.05$.

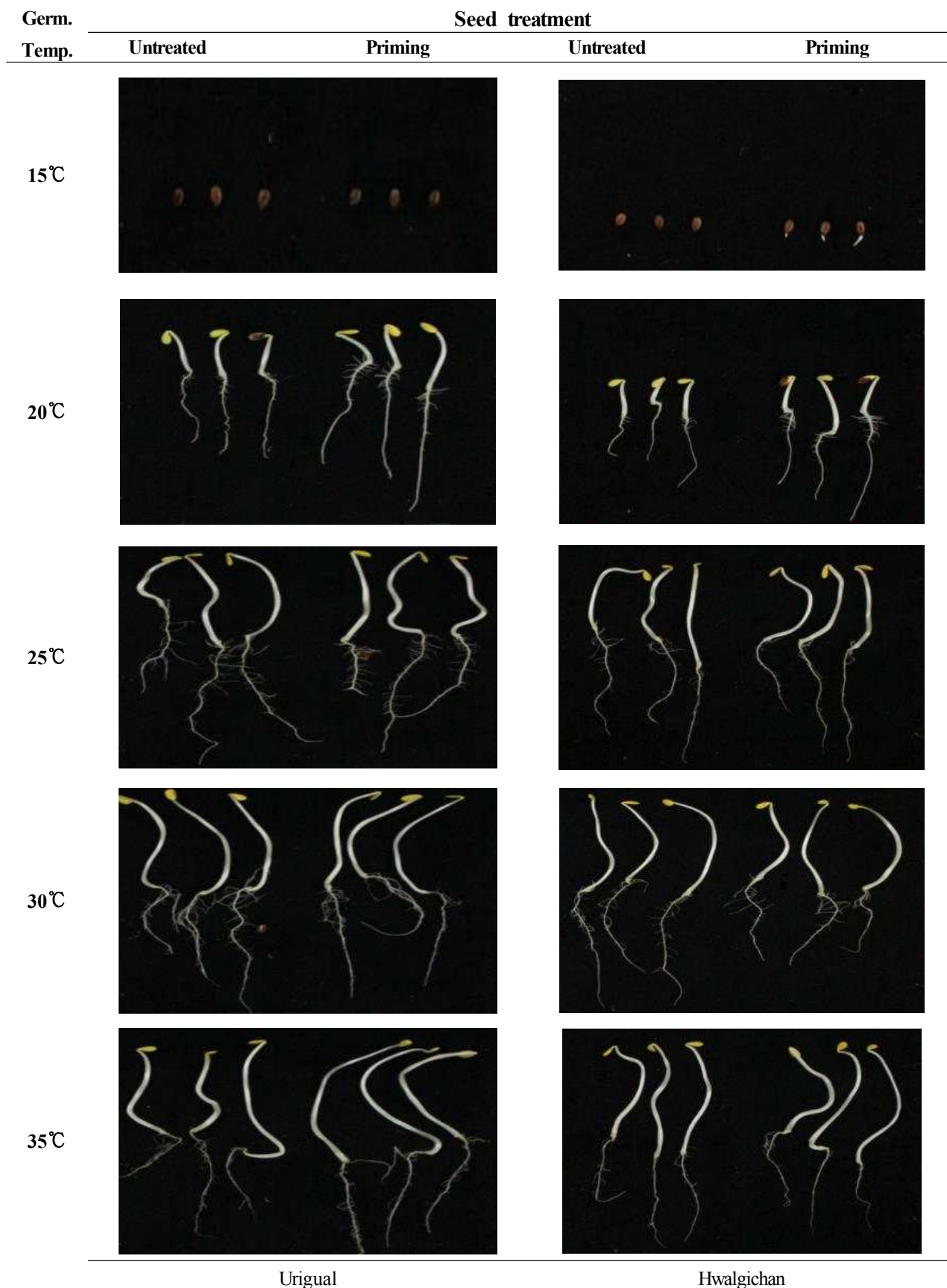


Fig. 1.24. Effect of germination temperature on seedling growth of primed 'Uriginal' and 'Hwalgichan' watermelon seeds. Seeds were dark-primed with 200mM KNO₃ at 25°C for 4 days and seedling growth was tested for 14 days at 25°C. Seed viability measured at 14 days after planting.

Table 1.41. Effect of germination temperature on percent germination, days to 50% of the final germination percentage(T_{50}), and viability of primed 'Rico fresh' watermelon seeds.

Germination Temp.(°C)	Seed treatment	Germination (%)	T_{50} (days)	Viability			
				5 days		14 days	
				Normal (%)	Abnormal (%)	Normal (%)	Abnormal (%)
15	Primed	41.1	9.7	41.1	0.0	41.1	0.0
	Untreated	16.7	13.3	0.0	0.0	16.7	0.0
	LSD 0.05	NS	2.52	NS	NS	NS	NS
20	Primed	97.8	3.3	97.8	0.0	97.8	0.0
	Untreated	96.7	3.3	95.3	0.0	96.7	0.0
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
25	Primed	97.8	1.5	72.2	0.0	97.8	0.0
	Untreated	98.9	1.9	43.3	0.0	98.9	0.0
	LSD 0.05	NS	0.34	NS	NS	NS	NS
30	Primed	92.22	2.9	90.0	0.0	92.2	0.0
	Untreated	100.0	2.7	97.0	0.0	100.0	0.0
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
35	Primed	97.8	1.2	93.3	0.0	97.8	0.0
	Untreated	97.8	1.3	85.0	0.0	97.8	0.0
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Seeds were dark-primed with 200mM KNO_3 at 25°C for 4 days and dark-germinated at 25°C for up to 7 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seed package. Means in columns within germination temperature are separated by LSD at $P = 0.05$.

Table 1.42. Effect of germination temperature on hypocotyl length, hypocotyl diameter, root length, number of root, fresh and dry weight of 'Rico fresh' primed watermelon seeds measured at 14 days after planting.

Germination Temp.(°C)	Seed treatment	Hypocotyl length (cm)	Hypocotyl diameter (mm)	Root length (cm)	No. of root	14 day old seedling	
						Fresh weight(g)	Dry weight (g)
15	Primed	0.0	0.0	0.26	0.60	0.57	0.19
	Untreated	0.0	0.0	0.00	0.00	0.35	0.21
	LSD 0.05	NS	NS	2.45	0.56	NS	NS
20	Primed	3.78	2.53	5.40	14.80	1.57	0.13
	Untreated	3.42	3.31	7.02	14.80	1.20	0.15
	LSD 0.05	NS	0.61	NS	NS	NS	NS
25	Primed	8.30	4.22	7.96	32.20	2.51	0.08
	Untreated	8.90	2.64	9.76	27.00	2.49	0.08
	LSD 0.05	NS	NS	1.65	NS	NS	NS
30	Primed	8.22	2.24	5.46	26.80	2.16	0.07
	Untreated	10.48	2.84	10.64	32.20	2.37	0.10
	LSD 0.05	1.73	NS	3.73	NS	NS	NS
35	Primed	9.00	2.41	6.62	19.00	2.59	0.08
	Untreated	12.46	3.19	8.58	32.40	3.28	0.08
	LSD 0.05	9.24	0.59	1.65	9.24	NS	NS

Seeds were dark-primed with 200mM KNO_3 at 25°C for 4 days and dark-germinated at 25°C for up to 7 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seed package. Means in columns within germination temperature are separated by LSD at $P = 0.05$.

Table 1.43. Effect of germination temperature on percent germination, days to 50% of the final germination percentage (T_{50}), and viability of primed 'Rico sweet' watermelon seeds.

Germination Temp.(°C)	Seed treatment	Germination (%)	T_{50} (days)	Viability			
				5 days		14 days	
				Normal (%)	Abnormal (%)	Normal (%)	Abnormal (%)
15	Primed	30.0	11.8	0.0	0.0	30.0	0.0
	Untreated	21.1	11.3	0.0	0.0	21.1	0.0
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	18.51	NS
20	Primed	84.4	3.0	80.0	0.0	84.4	0.0
	Untreated	35.6	3.6	1.1	0.0	35.6	0.0
	LSD 0.05	14.79	0.28	NS	NS	NS	NS
25	Primed	76.7	1.7	76.0	0.0	76.7	0.0
	Untreated	72.2	1.3	42.2	0.0	72.2	0.0
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
30	Primed	63.3	2.4	76.0	0.0	63.3	0.0
	Untreated	70.0	2.8	70.0	0.0	70.0	0.0
	LSD 0.05	NS	0.44	NS	NS	NS	NS
35	Primed	80.0	0.9	71.1	0.0	80.0	0.0
	Untreated	80.0	1.1	54.4	0.0	80.0	0.0
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Seeds were dark-primed with 200mM KNO_3 at 25°C for 4 days and dark-germinated at 25°C for up to 7 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seed package. Means in columns within germination temperature are separated by LSD at $P = 0.05$.

Table 1.44. Effect of germination temperature on hypocotyl length, hypocotyl diameter, root length, number of root, fresh and dry weight of 'Rico sweet' primed watermelon seeds measured at 14 days after planting.

Germination Temp.(°C)	Seed treatment	Hypocotyl length (cm)	Hypocotyl diameter (mm)	Root length (cm)	No. of root	14 day old seedling	
						Fresh weight(g)	Dry weight (g)
15	Primed	0.0	0.0	0.00	0.0	0.28	0.15
	Untreated	0.0	0.0	0.06	0.0	0.26	0.10
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
20	Primed	8.16	4.66	2.69	9.00	1.15	0.05
	Untreated	3.42	1.99	6.66	15.80	1.09	0.12
	LSD 0.05	NS	1.85	2.55	4.80	NS	0.01
25	Primed	8.76	2.62	8.42	22.00	2.18	0.08
	Untreated	7.26	2.16	7.30	26.00	1.86	0.04
	LSD 0.05	NS	0.43	NS	NS	NS	NS
30	Primed	9.02	2.27	19.54	16.60	1.42	0.05
	Untreated	7.34	1.86	5.72	19.60	1.57	0.05
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
35	Primed	8.06	2.21	8.68	29.60	2.20	0.03
	Untreated	9.64	2.39	6.96	22.80	2.08	0.01
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Seeds were dark-primed with 200mM KNO_3 at 25°C for 4 days and dark-germinated at 25°C for up to 7 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seed package. Means in columns within germination temperature are separated by LSD at $P = 0.05$.

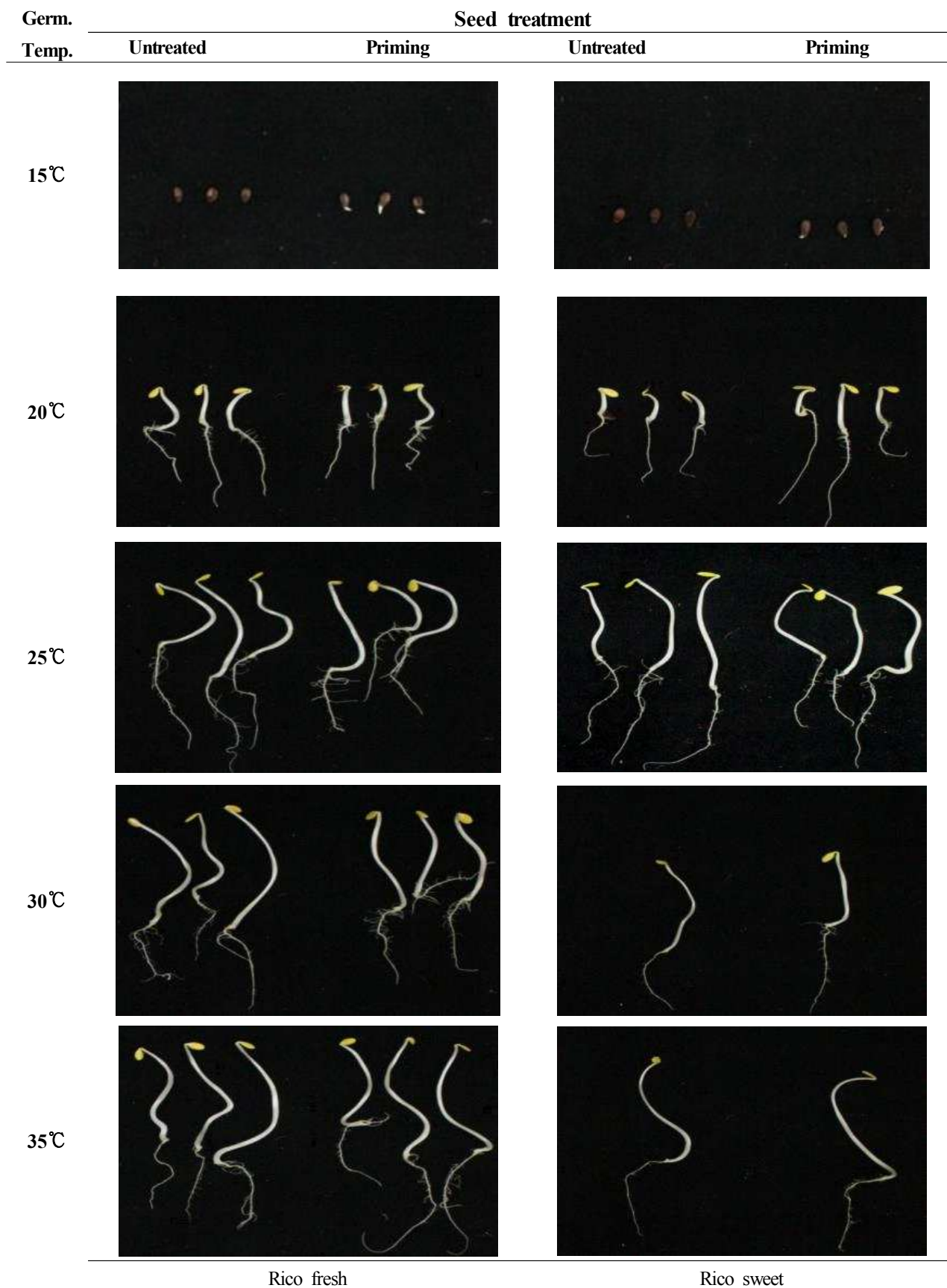


Fig. 1.25. Effect of germination temperature on seedling growth of primed 'Rico fresh' and 'Rico sweet' watermelon seeds. Seeds were dark-primed with 200mM KNO₃ at 25°C for 4 days and seedling growth was tested for 14 days at 25°C. Seed viability measured at 14 days after planting.

Table 1.45. Effect of germination temperature on percent germination, days to 50% of the final germination percentage(T_{50}), and viability of primed 'A-1031' watermelon seeds.



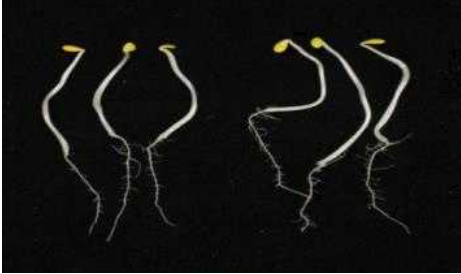

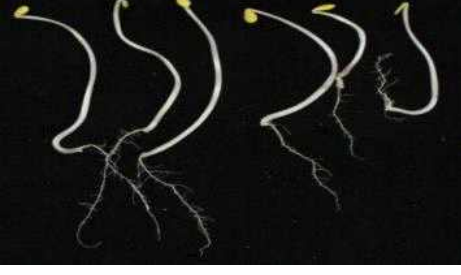
Germination Temp.(°C)	Seed treatment	Germination (%)	T_{50} (days)	Viability			
				5 days		14 days	
				Normal (%)	Abnormal (%)	Normal (%)	Abnormal (%)
15	Primed	72.2	10.1	0.0	0.0	72.2	0.0
	Untreated	60.0	11.2	0.0	0.0	60.0	0.0
	LSD 0.05	NS	0.85	NS	NS	NS	NS
20	Primed	97.8	3.0	1.1	0.0	97.8	0.0
	Untreated	97.8	3.1	20.0	0.0	97.8	0.0
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
25	Primed	96.7	1.6	43.3	0.0	96.7	0.0
	Untreated	97.8	1.7	72.2	0.0	97.8	0.0
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
30	Primed	94.4	2.6	52.2	0.0	94.4	0.0
	Untreated	87.8	2.3	94.4	0.0	87.8	0.0
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
35	Primed	97.8	1.0	41.1	0.0	97.8	0.0
	Untreated	100.0	1.4	93.3	0.0	100.0	0.0
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Seeds were dark-primed with 200mM KNO_3 at 25°C for 4 days and dark-germinated at 25°C for up to 7 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seed package. Means in columns within germination temperature are separated by LSD at $P = 0.05$.

Table 1.46. Effect of germination temperature on hypocotyl length, hypocotyl diameter, root length, number of root, fresh and dry weight of 'A-1031' primed watermelon seeds measured at 14 days after planting.

Germination Temp.(°C)	Seed treatment	Hypocotyl length (cm)	Hypocotyl diameter (mm)	Root length (cm)	No. of root	14 day old seedling	
						Fresh weight(g)	Dry weight (g)
15	Primed	0.0	0.0	2.90	0.60	0.44	0.44
	Untreated	0.0	0.0	0.00	0.00	0.38	0.11
	LSD 0.05	NS	NS	NS	0.56	NS	0.03
20	Primed	4.00	2.85	6.04	13.20	1.38	1.38
	Untreated	3.40	2.61	4.46	11.40	1.20	0.14
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	0.13	0.10
25	Primed	8.00	2.32	7.34	26.00	1.07	1.07
	Untreated	8.64	2.41	7.78	23.80	2.17	0.08
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	0.07
30	Primed	7.98	2.48	6.02	21.80	2.44	2.44
	Untreated	8.20	2.60	5.12	17.60	1.71	0.05
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	0.16
35	Primed	10.48	2.87	6.66	19.40	3.04	3.04
	Untreated	9.82	2.12	7.62	36.40	2.67	0.01
	LSD 0.05	12.55	0.67	NS	12.55	NS	0.20

Seeds were dark-primed with 200mM KNO_3 at 25°C for 4 days and dark-germinated at 25°C for up to 7 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seed package. Means in columns within germination temperature are separated by LSD at $P = 0.05$.

Germ. Temp.	Seed treatment	
	Untreated	Priming
15°C		
20°C		
25°C		
30°C		
35°C		

Rico fresh

Fig. 1.26. Effect of germination temperature on seedling growth of primed 'A-1031' watermelon seeds. Seeds were dark-primed with 200mM KNO₃ at 25°C for 4 days and seedling growth was tested for 14 days at 25°C. Seed viability measured at 14 days after planting.

5. 필름코팅 피복물질 및 첨가농도에 따른 발아율 검정

가. 연구목적

병충해 방제를 위한 종자처리는 종자 또는 토양 속에 있는 미생물이나 해충에 의하여 유발되는 병이나 피해를 최소화하기 위하여 처리하는 것이다. 종자처리법에는 다음과 같이 기계적 방법, 물리적 방법, 화학적 방법 및 생물학적 방법으로 구분할 수 있다.

그중 살균제나 살충제를 종자에 피막 처리하여 소독하는 화학적 방법이 간편하고 효과가 명확하여 재배농가에서 널리 시행하고 있으나 먼저 발생량이 많고 처리자의 건강을 해치는 단점이 있었다. 필름 코팅된 종자는 먼지발생량을 줄여 재배자가 안전하게 이용할 수 있을 뿐만 아니라 병원균의 침입으로부터 종자와 유묘를 보호할 수 있다.

최근에는 우리나라의 종묘회사에서도 종자의 원래 형태와 모양을 유지시키면서 크기만 2% 증가시킨 필름 코팅 종자를 산업화하고 있다. 필름 코팅 종자의 포함되는 물질로는 살균제, 살충제, 생물 방제제, 색소 및 착색제 그리고 요구하는 바에 따라 성장조절물질을 첨가되기도 한다.

지금까지 필름코팅 종자 생산기술은 괄목할 만한 많은 진전이 있었으나, 불량조건에서 높은 발아력과 유지한 수박 코팅종자 생산에는 아직까지 미흡한 점이 많다. 이러한 관점에서 본 연구는 고품질의 수박 필름코팅종자를 생산하기 위한 전제조건은 필름코팅의 피복물질 종류 및 첨가농도를 구명하기 위해 수행되었다.

나. 재료 및 방법

공시 종자는 스피드풀(농우바이오)수박종자였다. 회전드럼식의 펠렛 제조기(Seed processing, Holland)에 종자 200립을 넣은 후 필름코팅 혼합 용액을 공급하면서 필름 코팅하였다. 필름코팅에 적합한 증량제(피복물질)를 선별하기 위해 사용된 물질은 Calcium carbonate(CC), Diatomaceous earth (DME), Igalite (IG), Kaolin (KL), Phyrophyllite (PP), Talc, Zeolite 등 6종류였고, 첨가농도는 1.0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% 였다. 이때 필름 코팅혼합 용액의 착색제는 0.15% Farboso Blue 3G를 사용하였고, 접착제는 PVA 1% 용액을 사용하였다.

필름코팅 종자생산을 위해 코팅제조기의 회전속도를 60~70rpm 유지하면서 30분간 필름 코팅하였다. 증량제 및 농도별 필름코팅 용이성 조사하였다. 아울러 필름코팅 후 실온에서 2일간 건조시킨 후 25℃ 발아력을 조사하였다.

다. 결과 및 고찰

필름 코팅종자는 종자의 원래 형태와 모양을 유지시키면서 착색제, 살균제, 살충제, 접착제 첨가하여 크기만 2% 증가시킨 종자이다. 고품질의 필름코팅 종자는 운반, 수송, 기계화 파종 중에 종자끼리 서로 달라붙은 것이 없어야 하며, 처리된 약제들이 종피에 잘 부착되어야 한다. 또한 필름코팅에 사용되는 증량제들이 종자의 발아, 출현, 입묘에 지장을 주어서는 안 된다.

따라서 필름코팅 증량제의 종류에 따라 필름코팅 된 종자의 발아율이 달라질 수 있다. 따라서 높은 발아력을 유지시킬 수 있는 종자에 무독한 증량제의 선별은 필름코팅의 종자의 산업

화에 중요하다. 이러한 관점에서 Table 1.32은 수박필름 코팅종자에 적합한 저비용 고효율의 증량제를 선발하고자 하였다. 필름코팅의 증량제 종류에 따라 코팅용이성 달랐다. 전반적으로 Talc에서 코팅형성능이 우수하였고, zeolite에서도 코팅형성능이 좋았다. 반면 calcium carbonate (CC)와 phyrophyllite (PP) 에서는 코팅형성능이 낮았다.

필름코팅 증량제의 종류에 관계없이 첨가농도가 낮을수록 필름코팅 공정이 쉬웠고, 증량제의 첨가량이 높으면 코팅공정이 어려웠다. 증량제 1% 첨가에서는 코팅공정은 용이하지만 종자 크기를 증가시켜 표면의 균질화를 위해서는 2.5%의 첨가가 좋을 것으로 판단되었다.

수박 필름코팅 증자는 증량제의 종류 및 첨가농도에 따라 발아율에는 큰 차이가 없었다. 또한 발아속도도 증량제의 종류 및 첨가농도에 의해 큰 차이가 없었다. 따라서 수박의 필름코팅 증자 증량제로 사용된 talc는 발아에 무독한 우수한 증량제였다. 또한 tale로 필름 코팅된 종자에서 코팅형성능력이 우수하였고, 종피에 증량제의 부착성도 우수하여 수박의 필름코팅에 적합한 증량제 였다.

Table 1.47. Effect of different kinds of film coating particulate matters and their concentration on coating capacity, percent germination and T₅₀ of film coated 'speed' watermelon seeds at 25°C.

Film coating particulate matter	Concentration (%)	Coating capacity ^z	Germination (%)	T ₅₀ (days)
Calcium carbonate(CC)	1.0	+	96.8	1.7
	2.5	+	96.3	1.8
	5.0	+	98.0	1.9
	7.5	-	96.3 NS	1.7 NS
Diatomaceous earth(DME)	1.0	+	96.3	1.6
	2.5	+	97.3	1.9
	5.0	+	98.0	1.6
	7.5	+	95.0 NS	2.0 NS
Igalite(IG)	1.0	+	96.7	1.6
	2.5	+	97.0	1.8
	5.0	+	98.0	1.9
	7.5	-	95.3 NS	1.9 NS
Kaolin(KL)	1.0	++	98.7	1.8
	2.5	+	98.0	1.7
	5.0	+	97.7	1.7
	7.5	+	97.7 NS	1.8 NS
Phyrophyllite(PP)	1.0	+	98.2	1.9
	2.5	+	97.0	2.1
	5.0	+	98.3	2.5
	7.5	+	96.0 NS	2.5 NS
Talc,	1.0	++	98.0	1.7
	2.5	++	98.8	1.8
	5.0	++	96.7	1.8
	7.5	+	98.7 NS	1.8 NS
Zeolite	1.0	++	97.7	1.8
	2.5	++	99.0	1.7
	5.0	+	96.4	1.7
	7.5	+	98.2 NS	1.8 NS
Untreatment			98.4	1.6

+ good, ++ very good, - bad

Means in columns are separated by LSD at P = 0.05.

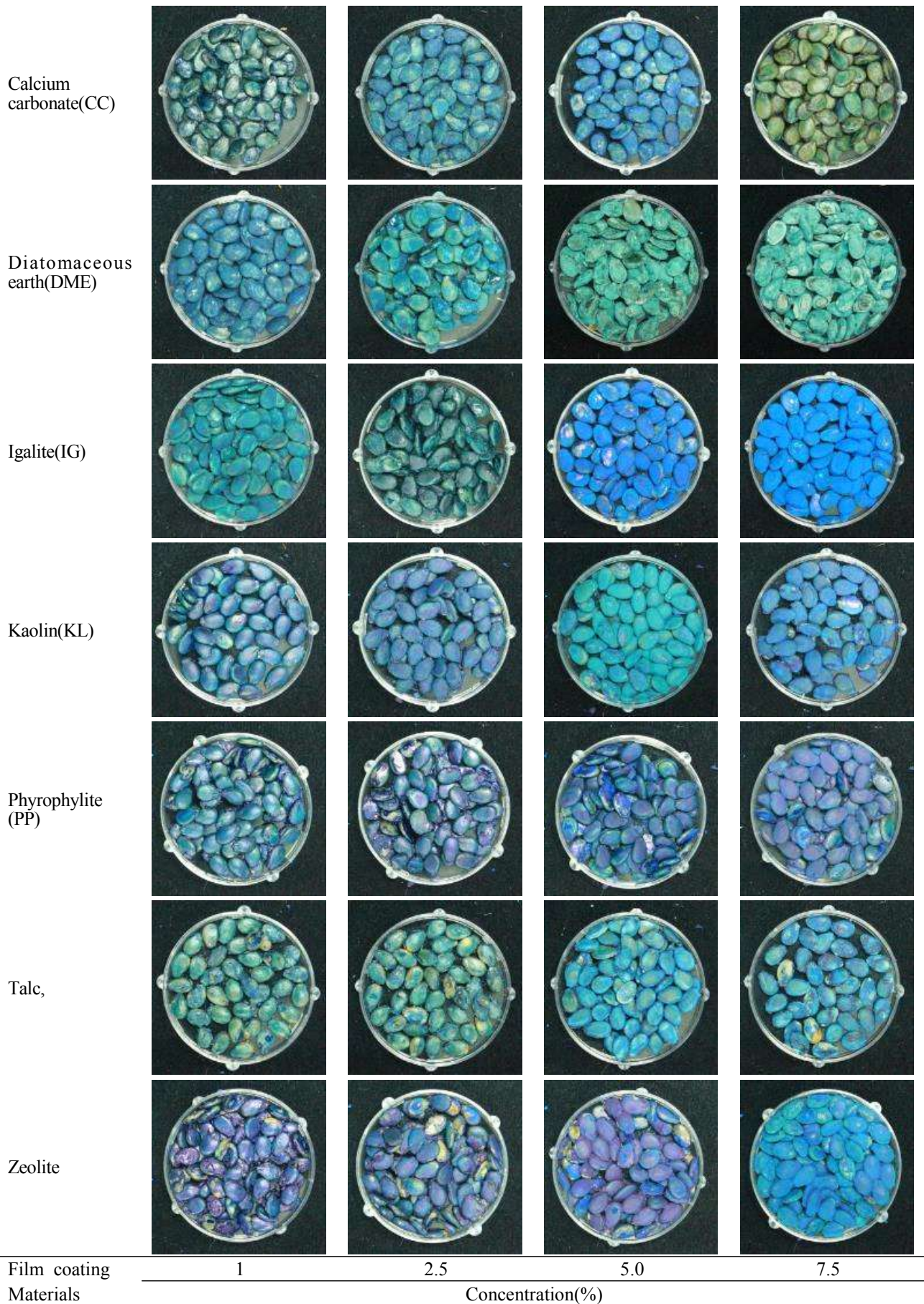


Fig. 1.27. Appearance of watermelon film coated seeds with different kinds of film coating particulate matters and their concentration.

6. 수박종자의 발아력 증진을 위한 SMP 처리조건 구명

가. 연구목적

지금까지 발아 촉진을 위해 PEG와 같은 액체 삼투용액에 종자를 침지시키는 priming 처리가 널리 이용되었다. 그러나 PEG는 높은 점성으로 인해 용존산소가 부족하여 대립종자인 대두, 콩, 및 옥수수 등에서는 발아력 증진에 그다지 효과적이지 못했다. 또한 처리과정중과 처리후 종자가 손상되어 발아력이 저하되는 경우가 많았다. 따라서 대립종자를 대규모로 priming 처리할 경우 종자당 요구되는 용액량과 산소공급 문제를 고려해야 한다. 또한 PEG와 같은 고가인 priming 처리제는 처리비용 문제와 처리된 종자의 저장을 위해 처리제를 종자에서 분리시켜야 하는데, 이때 발생하는 염 및 PEG 폐기물들은 환경오염을 유발시키기도 한다.

토양의 높은 염 농도는 종자의 수분흡수를 억제하여 발아는 이루어지지 않으나, 발아준비를 위한 대사활성이 촉진되어 자연적으로 발아촉진 처리가 된다. 이들 종자를 파종하면 신속한 묘출현이 유도되는데, 이러한 현상은 근거로 한 종자처리가 SMP이다. Solid matrix priming (SMP) 기술을 최초로 도입한 연구자는 Kubik 등과 Taylor 등이며, 삼투용액 대신에 고체 carrier로 처리하는 것으로 priming과 같이 발아력 증진을 위한 종자처리 기술이다. 미국의 Eastine박사는 SMP 처리공정을 특허로 출원한 바 있고 Khan 등에 의해 체계화된 Matricconditioning은 SMP와 유사한 처리개념이다.

SMP 처리 과정은 고체 carrier, 종자, 수분을 일정비율로 혼합하여 carrier의 매트릭포텐셜에 의해 종자의 수분흡수를 조절하는 것으로 종자처리의 새로운 분야이다. SMP는 소립과 대립종자에서 대량처리가 가능할 만큼 효율적이고 이용 잠재력이 높으며, 많은 작물에서 발아력 향상에 유용한 처리로 보고되고 있다. SMP 시스템의 특성은 처리과정중 산소공급을 최소화시킬 수 있으며, 유용 미생물과의 조합처리가 용이하다.

SMP에 적합한 물질로는 (a) 매트릭 포텐셜은 높으나, 용질 또는 삼투포텐셜이 거의 없을 것 (b) 물에 용해되지 않을 것 (c) 화학적으로 재활성이 낮으면서 (d) 수분보유력이 우수하고 수분 변화에도 가동성이 있을 것, 건조보유력 또한 우수하여야 하며, 미세분말 일 것 (e) 입자크기, 구조, 공극성이 다양할 것 (f) 표면적이 높으면서 (g) 부피는 크고 용적밀도는 낮을 것, 첨가량이 적어도 결과가 나타날 것 (h) 종자표면에 부착능력이 우수할 것 (i) 발아에 독성을 주지 않을 것 (j) 처리 후 종자에서 분리가 쉬운 것 등이 적합하다고 알려져 있다. 이러한 특성을 가진 물질 중에는 Marville사의 특허품인 여러 가지 등급의 Celite와 Micro-cell E 및 W.R. Grace사의 특허품인 zomolite vermiculite 등이 시판되고 있다. 다른 고체 carrier로는 버미큘라이트 및 GrowSorb도 SMP 물질로 사용되고 있다.

본 연구의 목적은 불량조건에서 수박종자의 안전발아와 발아의 균일성을 유지시킬 수 있는 SMP의 carrier 물질을 탐색하고 적정 혼합비율 및 처리방법을 확립하는데 있다. 아울러 SMP에 사용되는 고체 carrier로 Micro cell-E가 보편적으로 사용되고 있지만 이를 국내에서 생산되는 원료로 대체할 수 있는 물질 탐색에도 연구의 주안점을 중점을 두었다.

나. 재료 및 방법

(1) 수박 종자의 SMP 처리조건 구명

SMP 적정 물질을 선별하기 위해 사용된 수박품종은 농우바이오의 ‘스피드꿀’ 이었으며, SMP에 적합한 carrier를 선별하기 위해 Micro Cell-E (synthetic calcium silicate), kaolin, vermiculite, diatomaceous earth, zeolite, talc를 사용하였다. SMP 처리는 종자: carrier: 증류수를 10: 5: 4, 10: 5: 7 및 10: 5: 10(w/w/w) 비율로 혼합하여 25℃에서 각각 3일 및 6일간 처리하여 25℃에서 발아력을 검정하였다.

(2) SMP 처리에 따른 종자활력 검정

SMP 처리에 의한 발이촉진 효과를 검정하기 위하여 이용된 종자는 해찬꿀(농협종묘), 핵가죽(농협종묘), 꿀나라(농협종묘), 포미나(농협종묘), 리코후레쉬 2호(파트너종묘), 리코스위트 1호(파트너종묘), A-1031(파트너종묘), 스피드꿀(농우바이오), 우리꿀(농우바이오), 현대꿀(현대종묘), 활기찬(현대종묘), 흑미(삼성종묘), 신세계(삼성종묘), SS꿀(삼성종묘)를 포함한 14 품종이었다. 실험 (1)에서 SMP 처리의 최적조건은 Micro cell-E로 종자: carrier: 수분의 혼합비율을 10:5:10하여 6일간 처리했으나, 다양한 품종을 대상으로 처리효과를 비교한 예비실험에서 처리하는 과정에서 품종에 따라 유근이 돌출하는 경우가 발생하였다. 따라서 품종과 종자활력에 관계없이 범용화 된 SMP 종자처리 조건이 필요하였다. 따라서 예비 실험을 거쳐 SMP 처리하는 과정에서 유근이 돌출되지 않으면서 발이촉진 효과가 우수한 처리조건인 종자: carrier (Micro Cell-E): 수분량을 10:5:15 비율로 혼합하여 30℃에서 2일간 SMP 처리하였다. 이때 사용된 carriers는 Micro Cell-E (synthetic calcium silicate)였다.

SMP 처리된 종자를 30℃에서 BP 방법에 의한 발아율 및 유묘활력을 비교하였다. 또한 SMP 처리 종자가 유묘출현 및 생육에 미치는 효과를 검정을 검정하고자 부산대학교 첨단 온실(경남 밀양시 삼랑진읍 청학리 산50번지)의 25℃로 제어된 온실에서 시행하였다. 묘출현율 조사를 위해 50구 플러그판에 상토를 충전한 후 30립의 종자를 3반복으로 파종하였다. 파종 후 30일까지 1일 간격으로 묘 출현율을 조사하였으며, 초기 생육조사는 파종 후 30일째에 초장, 뿌리길이, 직경, 생체중과 건물중을 조사하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) 수박 종자의 SMP 처리조건 구명

○ 적정 SMP 물질 선별

Table 1.48는 농우바이오의 ‘스피드’ 수박품종을 공시하여 SMP carrier, 처리기간 및 혼합배율을 달리하여 25℃에서 발아성에 미치는 영향을 조사한 결과이다. 사용되는 carrier의 종류와 혼합배율에 따라 발아양상은 약간의 차이는 있었으나 SMP 처리된 종자는 64~99%의 높은 발아율을 보였다. 전반적으로 SMP 처리기간을 3일로 하면 처리과정중 유출돌출 현상은 나타나지

않았으나, 6일 처리에 비해 발아율과 발아속도가 지연되는 형상을 보였다. 반면 6일간 SMP 처리는 발아율 향상과 발아속도가 단축되었으나, 처리과정중 유근이 돌출되어 종자산업 현장에서 적용하기는 문제점이 있었다. SMP 처리된 종자는 carrier 종류에 따라 부분적인 차이는 있었으나, 무처리에 비해 발아속도가 현저히 단축되었다. 대체적으로 수분비율이 높으면 발아속도가 단축되는 경향을 보였으나, 처리 중에 유근이 돌출되는 종자의 비율도 높았다.

SMP의 물질로써 보편적으로 사용되고 있는 Micro cell-E에서 전체적으로 높은 발아율을 보였고, 발아속도 단축 효과도 우수하였다. 또한 Micro cell-E는 처리기간을 6일로 연장하고 수분비율이 높더라도 처리과정중 유근이 돌출되는 현상이 없었다. 본 연구는 국내에서 생산되는 물질 중 Micro cell-E를 대체할 수 있는 물질개발에도 연구의 초점을 두었으므로 diatomaceous earth에서 3일간 SMP 처리는 발아율도 높았으며, T₅₀도 단축되어 Micro cell-E 보다는 효과가 미약하지만 발아촉진 효과가 다른 carrier에 비해 높았다. 전체적으로 Micro cell-E가 가장 효과적인 SMP carrier 였고, 이를 대할 수 있는 물질은 diatomaceous earth 였다. 최적 SMP 처리조건은 Micro cell-E로 종자: carrier: 수분량을 10:5:10 혼합하여 6일간 처리였다.

SMP 처리는 종자, 고체 carrier, 증류수를 혼합하여 일정기간 동안 처리하는 것으로 osmo-priming과 동일하게 종자의 수분흡수량을 조절하여 유근을 돌출시키지 않는 범위내에서 생리적 발아를 완성시키는 것이다. SMP와 osmo priming 처리의 차이점은 SMP는 처리종자의 수분흡수가 고체 carrier의 매트릭포텐셜에 의해 조절되는데 반해, 액체 삼투용액에 침지하는 priming은 용액의 삼투압에 의해서 수분흡수가 조절된다. 따라서 SMP에 사용되는 carrier들은 매트릭포텐셜과 수분보유력은 높아야 하며, 처리과정중 수분과 혼합하더라도 용해되지 않는 물질이어야 한다. 또한 처리과정중 유용미생물을 첨가했을 때 미생물의 증식을 촉진하는 물질이면 더욱 좋다.

지금까지 액체 용액에 실시하는 osmo priming은 처리 후 수세하여 처리제를 제거해야만 발아력이 향상되나, SMP는 처리후 종자표면에 부착되어 있는 carrier들은 토양입자와 매트릭 성질이 비슷하여 토양에 쉽게 혼합되기 때문에 반드시 제거할 필요는 없다.

Table 1.48. Effect of SMP carrier type, duration and ratio of seed to carrier to water by weight on the performance of 'Speed' watermelon seeds at 25°C.

Seed treatment ^z					
Carrier	Duration (days)	Ratio (seed :carrier: water w/w)	Germ. (%)	T ₅₀ (days)	RPDP (%)
Microcell-E	3	10:5:4	77.5	5.15	-
		10:5:7	87.5	4.49	-
		10:5:10	85.8	2.37	-
	6	10:5:4	83.3	3.16	-
		10:5:7	95.0	2.07	-
		10:5:10	99.0	0.36	-
Kaolin	3	10:5:4	64.5	6.45	-
		10:5:7	70.0	2.74	-
		10:5:10	98.0	3.09	-
	6	10:5:4	92.5	1.03	-
		10:5:7	-	-	80.6
		10:5:10	-	-	84.2
Vermiculite	3	10:5:4	95.0	2.02	-
		10:5:7	-	-	50.6
		10:5:10	-	-	71.2
	6	10:5:4	87.5	2.76	-
		10:5:7	-	-	90.3
		10:5:10	-	-	95.4
Diatomaceous earth	3	10:5:4	93.3	4.08	-
		10:5:7	80.0	2.36	-
		10:5:10	98.3	2.02	-
	6	10:5:4	96.7	2.05	-
		10:5:7	-	-	81.2
		10:5:10	-	-	78.4
Zeolite	3	10:5:4	94.2	2.71	-
		10:5:7	95.8	2.02	-
		10:5:10	-	-	51.4
	6	10:5:4	77.5	3.76	-
		10:5:7	-	-	75.4
		10:5:10	-	-	85.8
Talc	3	10:5:4	70.8	3.09	-
		10:5:7	95.0	2.03	-
		10:5:10	96.7	1.34	-
	6	10:5:4	79.2	3.19	-
		10:5:7	-	-	90.2
		10:5:10	-	-	96.2
Untreated			84.6	3.94	-
LSD(0.05)			2.3	0.34	3.4

^z Seeds were dark-treated with various carriers at 25°C for 3 and 6 days and dark-germinated at 25°C for up to 18 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seed package.

^y Days to 50% of the final germination percentage.

^x Radicle protrusion during Solid matrix priming(SMP).

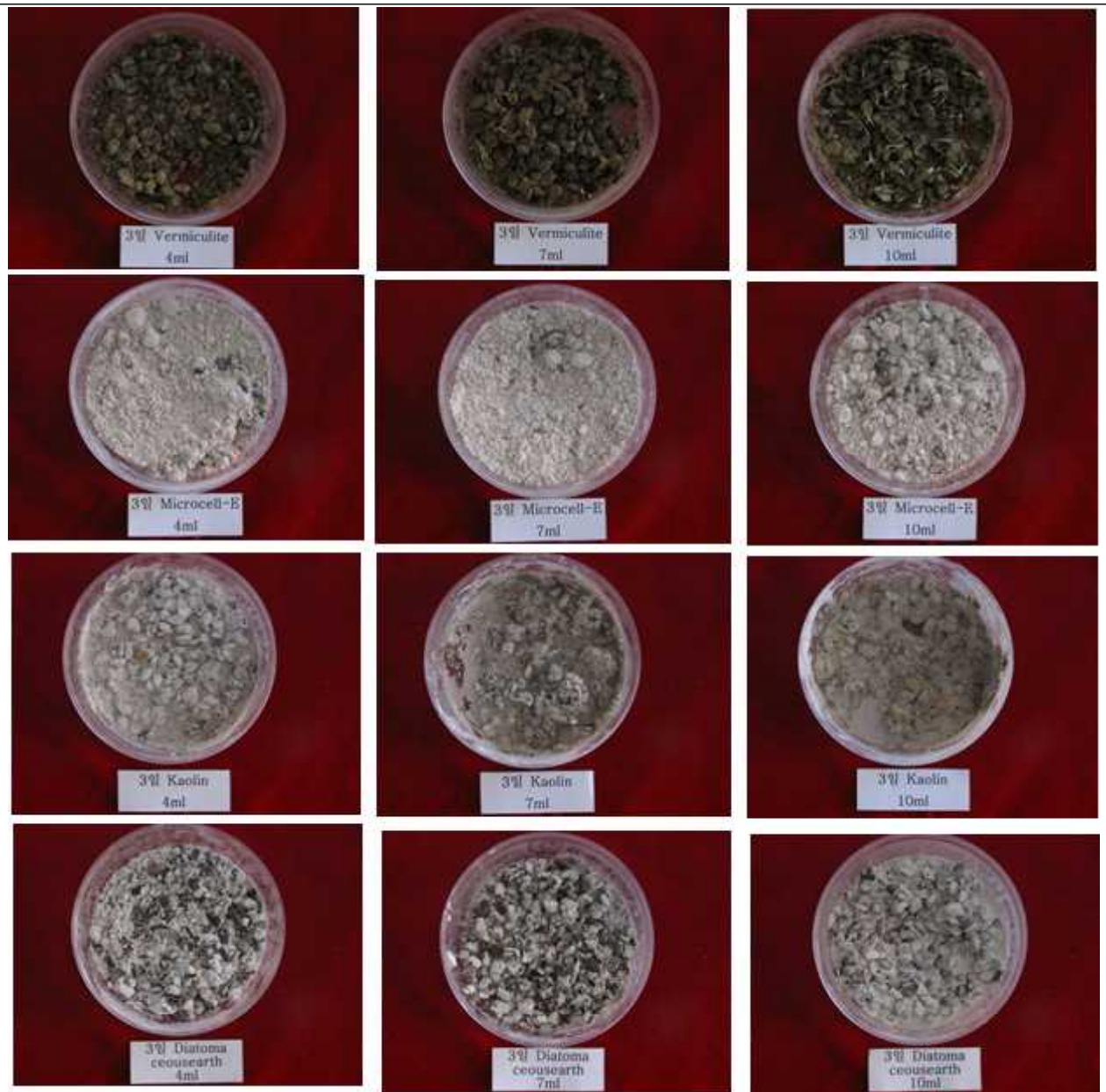


Fig. 1.28. Influence of SMP carrier type and ratio of seed to carrier to water by weight on the performance of 'Speed' watermelon seeds for 3 days at 25°C.

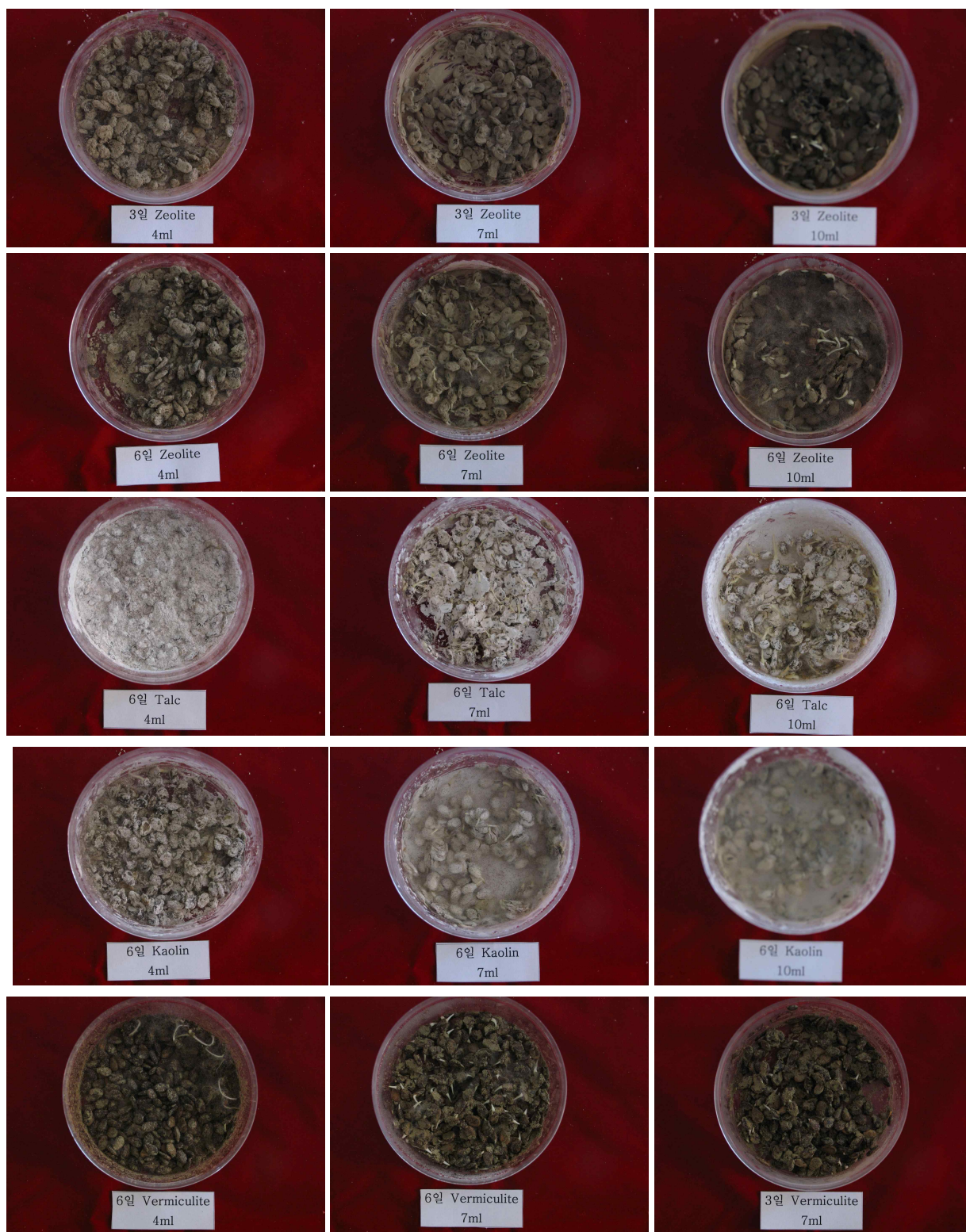


Fig. 1.29. Influence of SMP carrier type and ratio of seed to carrier to water by weight on the performance of 'Speed' watermelon seeds for 6 days at 25°C.

(2) SMP 처리된 종자의 활력검정

SMP 처리조건 확립 실험에서 Micro cell-E로 종자: carrier: 수분의 혼합비율을 10:5:10하여 6일간 처리가 좋았으나, 품종에 따라 처리과정중에 유근이 돌출하는 경우가 발생하였다. 따라서 고효율 종자와 저활력 및 다양화 품종에서 적용할 수 있는 범용화 된 SMP 종자처리 조건이 필요하였다. 이러한 목적으로 채종한 후 3개월간 실온에 저장하여 휴면이 온전히 타파되지 않는 종자를 대상으로 범용화 된 종자처리 조건을 확립하였다(Table 1.49). 이를 위하여 SMP carrier로 Micro-Cell E를 사용하여 종자: carrier: 수분량을 10:5:10, 10:5:13, 10:5:15 및 10:5:20 혼합비율로 30°C에서 2일간 처리하여 25°C에서 발아성을 조사하였다.

전반적으로 종자: carrier: 수분량을 10:5:15 처리조건에서 발아율이 가장 높았고, 발아속도가 빨랐다. 종자산업 현장에서 적용할 수 있는 최적 SMP 처리조건은 Micro cell-E로 종자: carrier: 수분량을 10:5:15 혼합비율로 하여 30°C에서 2일간 처리였다.

Table 1.49. Effect of SMP ratio of seed to carrier to water by weight on the performance of 'Speed' watermelon seeds at 25°C. Seed were stored for 3 months at room temperature.

Seed treatment	Germ. (%)	T ₅₀ (days)	RPDP (%)
Ratio (seed :carrier: water w/w)			
10:5:10	37.8	3.0	
10:5:13	56.7	2.8	
10:5:15	75.6	2.1	
10:5:20	44.4	1.7	
Untreated	7.8	7.0	
LSD(0.05)	16.60	0.68	

Seeds were dark-SMP treated for 2 days at 30°C

이러한 최적 조건으로 14종의 수박종자를 SMP 처리하여 발아율과 T₅₀ 및 종자활력을 조사한 결과는 Table 1.50~1.52 및 Fig. 1.30~1.33에서 보는 바와 같다.

공시된 모든 품종에서 SMP 처리된 종자는 무처리 종자에 비해 발아력이 향상되었고, 또한 발아속도도 무처리에 비해 촉진되었다. SMP 처리에 의해 유의적인 발아증진 효과가 확인된 품종은 ‘해찬꿀’, ‘리코스위트’ 였고, 공시된 전 품종에서 무처리에 비해 발아촉진 효과는 현저하였다(Table 1.50).

또한 BP (between paper) 방법에 의해 종자 활력 검정한 결과 모든 품종에서 SMP 처리된 종자는 무처리 종자에 비해 치상 5일째의 초기발아율이 향상되었고, 반면 비정상 발아율은 감소하였다. 비정상 발아한 개체는 건전한 유묘로 성장할 수 없음을 의미한다. 따라서 SMP 처리된 종자에서 비정상 발아율이 감소되었다는 것은 건전 묘로 성장할 수 있는 개체의 증가를 의미하므로 경종적인 측면에서는 입묘율 향상을 시사한다.

또한 공시된 대부분 품종에서 SMP 처리된 종자는 치상 후 5일째와 14일째의 하배축 길이, 하배축 직경, 뿌리길이 등 전반적인 유묘활력이 무처리에 비해 좋았으나 생체중과 건물중에는 유의적인 차이는 없었다(Table 1.51~1.52 및 Fig. 1.30~33). 이와 같이 SMP 처리에 의해 수박에서 발아율 향상 및 유묘활력의 증가는 재배적인 측면에서도 유용할 것으로 판단된다.

Table 1.50. The effect of seed SMP on percent germination, number of days to 50% of the final germination percentage(T_{50}) and seed viability of different cultivar watermelon seeds at 30°C

Cultivar	Seed treatment	Germination (%)	T_{50} (days)	Viability			
				5 days		14 days	
				Normal (%)	Abnormal (%)	Normal (%)	Abnormal (%)
Hackgajok (핵가족)	SMP	91.1	2.1	90.1	1.0	90.1	1.0
	Untreated	94.4	4.1	67.1	4.0	86.2	8.2
	LSD 0.05	NS	1.8	NS	NS	NS	5.4
Haechangual (해찬꿀)	SMP	88.9	2.5	84.8	4.1	83.7	4.1
	Untreated	36.7	3.4	23.3	1.1	33.9	2.7
	LSD 0.05	38.7	NS	24.2	NS	37.7	NS
Pomina (포미나)	SMP	94.4	1.8	94.4	0.0	94.4	0.0
	Untreated	86.7	3.2	84.3	1.2	83.3	3.3
	LSD 0.05	NS	1.1	NS	NS	NS	NS
Gualnara (꿀나라)	SMP	98.9	1.5	92.3	6.6	92.3	6.6
	Untreated	90.0	2.1	87.9	2.1	85.2	4.8
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Hyundaegual (현대꿀)	SMP	100.0	1.7	88.9	11.1	88.9	11.1
	Untreated	100.0	2.3	97.8	2.2	96.7	3.3
	LSD 0.05	NS	0.2	NS	NS	NS	NS
Speed (스피드)	SMP	97.8	1.4	74.9	22.9	74.9	22.9
	Untreated	92.2	1.5	86.0	5.1	87.1	5.1
	LSD 0.05	NS	NS	NS	17.4	NS	17.4
Urigual (우리꿀)	SMP	98.9	1.3	85.6	13.3	85.6	13.3
	Untreated	87.8	3.2	82.2	0.0	87.8	0.0
	LSD 0.05	NS	1.4	NS	NS	NS	NS
Hwalgichan (활기찬)	SMP	94.4	1.4	90.2	4.3	90.2	4.3
	Untreated	94.4	2.1	90.4	4.1	90.4	4.1
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Rico fresh (리코후레쉬)	SMP	98.9	1.5	83.4	15.5	83.4	15.5
	Untreated	77.8	2.5	76.7	0.0	77.8	0.0
	LSD 0.05	NS	0.9	NS	NS	NS	NS
Rico sweet (리코스위트)	SMP	90.0	2.0	85.9	4.1	84.9	4.0
	Untreated	42.2	2.7	40.3	1.9	39.7	2.5
	LSD 0.05	24.1	0.6	23.7	NS	23.8	NS
A-1031	SMP	93.3	1.8	91.2	2.1	91.2	2.1
	Untreated	96.7	2.1	95.5	1.2	95.6	1.1
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Heukmi (흑미)	SMP	100.0	1.3	97.8	2.2	97.8	2.2
	Untreated	86.7	3.1	82.0	1.3	84.5	2.1
	LSD 0.05	NS	1.2	NS	NS	NS	NS
Shinsegae (신세계)	SMP	100.0	1.1	97.8	2.2	97.8	2.2
	Untreated	96.7	2.7	89.2	7.4	89.2	7.4
	LSD 0.05	NS	0.4	NS	NS	NS	NS
Ss-gual (SS꿀)	SMP	100.0	1.1	100.0	0.0	100.0	0.0
	Untreated	92.2	2.8	92.2	0.0	91.3	1.0
	LSD 0.05	NS	0.4	NS	NS	NS	NS

Seeds were dark-solid matrix primed with ratio of seed: carrier :H₂O(10:5:15 w/w) at 30°C for 2 days and dark-germinated at 30°C for up to 14 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seed package.

Means in columns within germination temperature are separated by LSD at $P = 0.05$.

Table 1.51. Effect of SMP on hypocotyl length, hypocotyl diameter, root length, number of root, fresh and dry weight of different cultivar watermelon seeds measured at 5 days after planting.

Cultivar	Seed treatment	Hypocotyl length (cm)	Hypocotyl diameter (mm)	Root length (cm)	No. of root
Hackgajok (핵가족)	SMP	5.6	2.55	4.6	19.3
	Untreated	5.8	2.93	7.0	17.7
	LSD 0.05	1.58	NS	1.70	9.84
Haechangual (해찬꿀)	SMP	5.6	3.15	7.2	19.3
	Untreated	5.8	3.03	5.7	19.0
	LSD 0.05	NS	NS	2.92	9.97
Pomina (포미나)	SMP	7.0	2.77	6.1	20.3
	Untreated	4.6	3.02	3.9	18.0
	LSD 0.05	1.33	NS	1.78	NS
Gualnara (꿀나라)	SMP	5.7	3.10	5.6	20.0
	Untreated	6.1	2.41	5.1	21.0
	LSD 0.05	1.31	NS	2.02	9.44
Hyundaegual (현대꿀)	SMP	6.9	2.58	3.9	14.3
	Untreated	5.8	2.78	5.5	18.5
	LSD 0.05	NS	NS	1.42	5.48
Speed (스피드)	SMP	4.9	2.95	4.9	19.0
	Untreated	7.6	3.10	7.6	19.0
	LSD 0.05	NS	NS	1.42	9.25
Urigual (우리꿀)	SMP	6.0	3.04	7.5	34.3
	Untreated	7.9	2.77	6.5	18.5
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS
Hwalgichan (활기찬)	SMP	4.6	2.91	4.7	12.7
	Untreated	6.2	2.70	3.4	9.0
	LSD 0.05	0.67	NS	NS	5.63
Rico fresh (리코후레쉬)	SMP	6.8	3.10	6.7	19.0
	Untreated	6.6	3.15	4.7	21.0
	LSD 0.05	1.82	NS	NS	3.70
Rico sweet (리코스위트)	SMP	6.8	2.93	6.4	19.3
	Untreated	5.5	2.68	5.2	13.0
	LSD 0.05	3.62	NS	0.82	2.45
A-1031	SMP	7.1	2.61	3.6	13.7
	Untreated	7.2	2.87	6.5	22.5
	LSD 0.05	NS	NS	NS	NS
Heukmi (흑미)	SMP	7.0	3.39	7.9	29.0
	Untreated	5.9	2.98	5.5	16.7
	LSD 0.05	NS	NS	2.03	18.97
Shinsegae (신세계)	SMP	7.3	3.21	6.6	27.7
	Untreated	4.2	2.81	5.4	16.0
	LSD 0.05	2.29	NS	1.95	9.39
Ss-gual (SS꿀)	SMP	7.8	3.00	5.7	25.7
	Untreated	5.3	2.99	4.7	10.5
	LSD 0.05	1.66	NS	NS	10.83

Seeds were dark-solid matrix primed with ratio of seed: carrier :H₂O(10:5:15 w/w) at 30°C for 2 days and dark-germinated at 30°C for up to 14 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seed package.

Means in columns within germination temperature are separated by LSD at $P = 0.05$.

Seed treatment

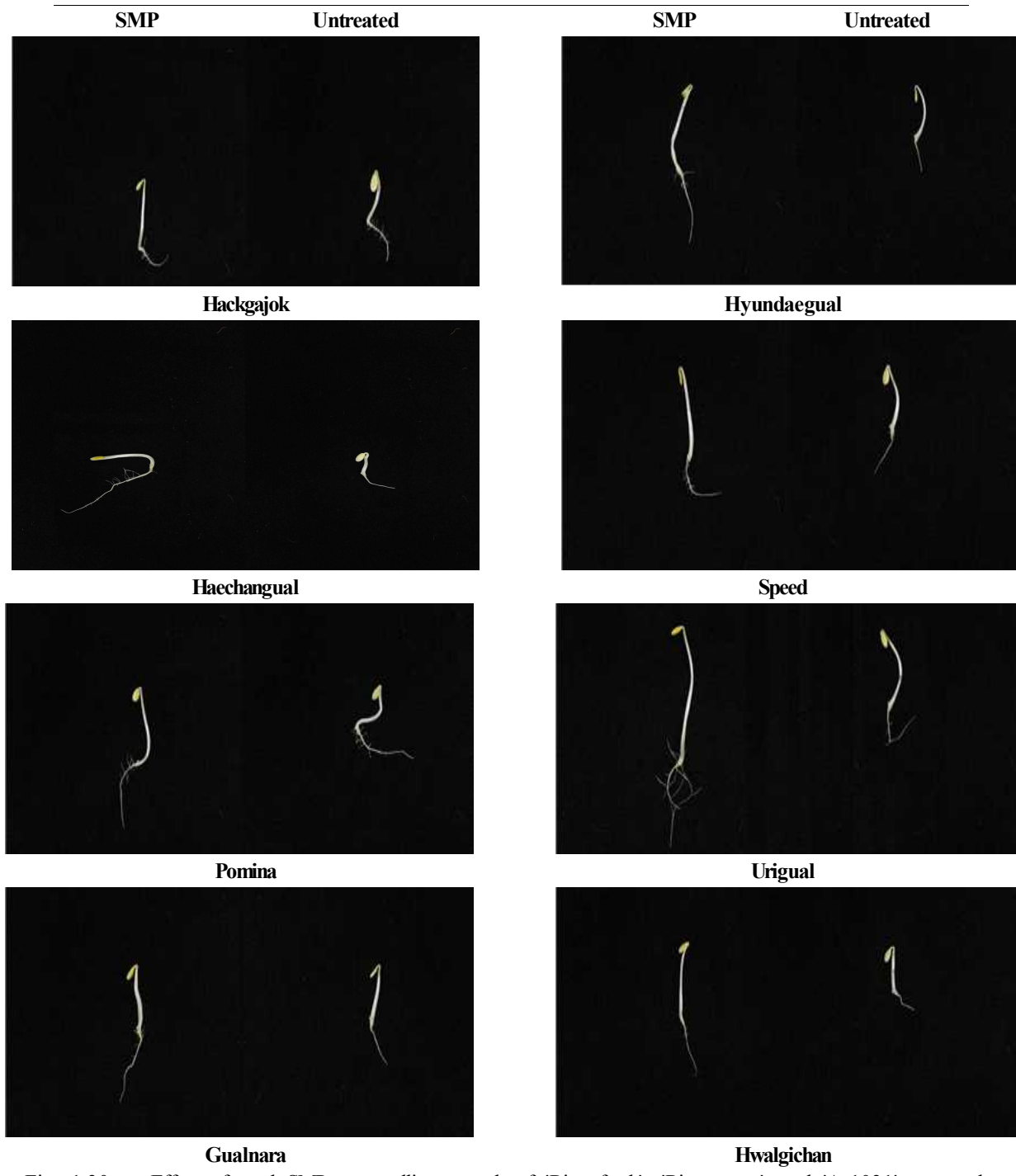


Fig. 1.30. Effect of seed SMP on seedling growth of 'Rico fresh', 'Rico sweet', and 'A-1031' watermelon seeds. Seeds were dark-solid matrix primed with ratio of seed: carrier :H₂O(10:5:15 w/w) at 30°C for 2 days and seedling growth was tested for up to 5 days at 30°C.

Seed treatment

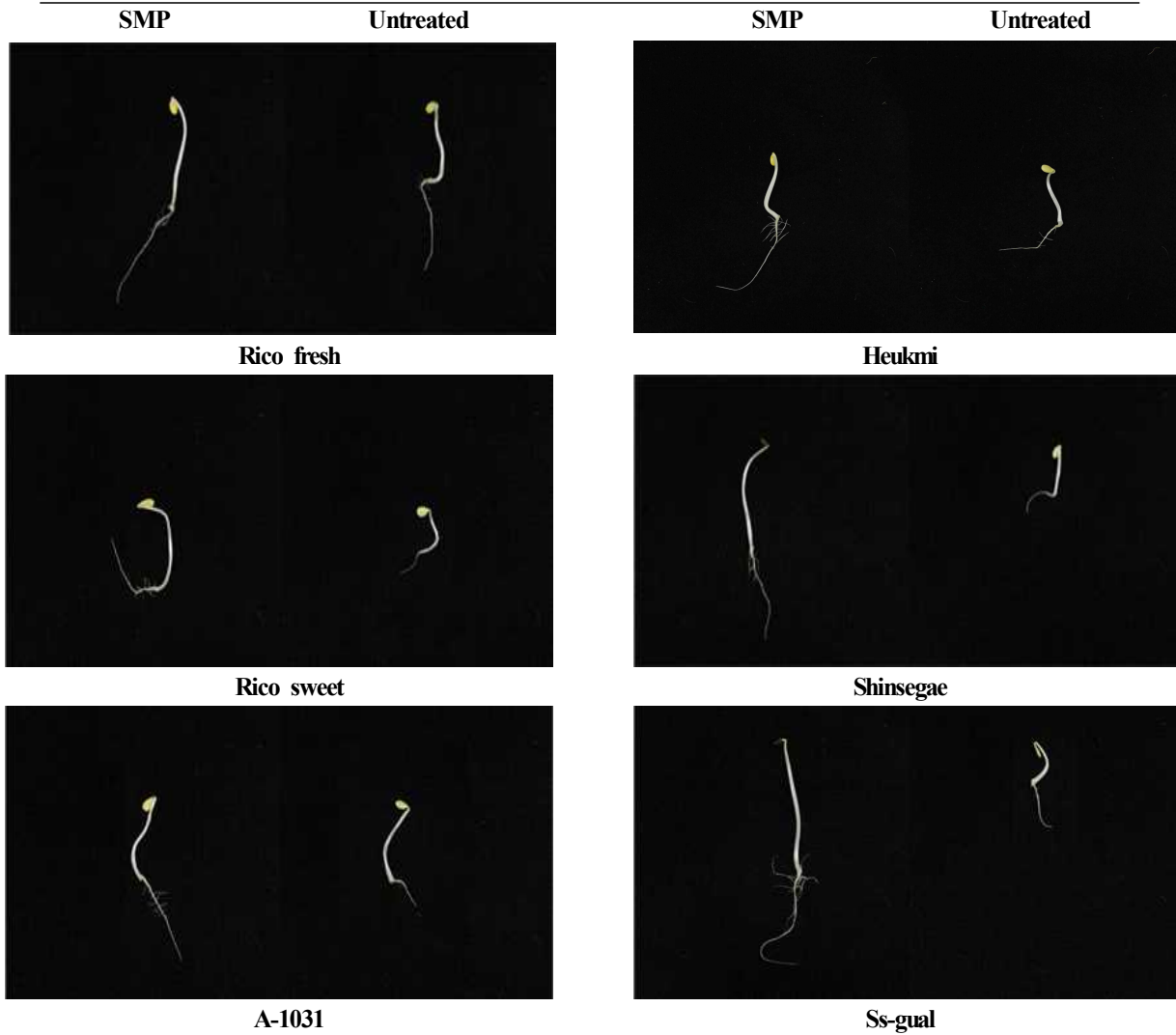


Fig. 1.31. Effect of seed SMP on seedling growth of 'Rico fresh', 'Rico sweet', and 'A-1031' watermelon seeds. Seeds were dark-solid matrix primed with ratio of seed: carrier :H₂O(10:5:15 w/w) at 30°C for 2 days and seedling growth was tested for up to 5 days at 30°C.

Table 1.52. Effect of SMP on hypocotyl length, hypocotyl diameter, root length, number of root, fresh and dry weight of different cultivar watermelon seeds measured at 14 days after planting.

Cultivar	Seed treatment	Hypocotyl length (cm)	Hypocotyl diameter (mm)	Root length (cm)	No. of root	14 day old seedling	
						Fresh weight(g)	Dry weight (g)
Hackgajok (핵가족)	SMP	12.7	2.79	6.5	27.8	0.58	0.02
	Untreated	14.4	1.64	9.5	21.3	0.79	0.02
	LSD 0.05	NS	0.27	NS	NS	NS	NS
Haechangual (해찬꿀)	SMP	10.4	3.24	7.6	21.8	0.65	0.02
	Untreated	15.5	1.69	10.8	18.3	0.84	0.03
	LSD 0.05	1.30	0.35	1.71	NS	0.08	NS
Pomina (포미나)	SMP	12.4	3.04	10.1	37.0	0.68	0.02
	Untreated	12.3	1.70	9.4	24.0	0.52	0.01
	LSD 0.05	NS	0.37	NS	NS	NS	NS
Gualnara (꿀나라)	SMP	10.0	3.04	4.3	11.4	0.59	0.02
	Untreated	12.9	1.93	8.1	28.3	0.65	0.02
	LSD 0.05	2.02	0.20	NS	4.96	NS	NS
Hyundaegual (현대꿀)	SMP	10.1	3.10	5.6	19.4	0.53	0.02
	Untreated	10.6	2.26	3.7	10.7	0.46	0.01
	LSD 0.05	NS	0.41	NS	NS	NS	NS
Speed (스피드)	SMP	11.2	3.34	7.3	32.2	0.65	0.02
	Untreated	12.2	1.80	8.1	18.0	0.72	0.02
	LSD 0.05	NS	0.49	NS	7.95	NS	NS
Uriginal (우리꿀)	SMP	10.5	3.20	9.5	45.8	0.76	0.02
	Untreated	10.9	2.07	4.0	13.7	0.42	0.01
	LSD 0.05	NS	NS	2.38	8.20	NS	NS
Hwalgichan (활기찬)	SMP	10.0	3.11	8.9	24.2	0.56	0.01
	Untreated	10.6	2.61	5.6	19.7	0.50	0.01
	LSD 0.05	NS	0.56	2.00	NS	NS	NS
Rico fresh (리코후레쉬)	SMP	11.9	2.86	6.7	20.0	0.62	0.02
	Untreated	13.3	1.83	4.7	22.3	0.66	0.02
	LSD 0.05	NS	0.52	NS	NS	NS	NS
Rico sweet (리코스위트)	SMP	12.4	2.95	7.5	19.2	0.62	0.01
	Untreated	13.5	1.83	6.7	22.0	0.68	0.01
	LSD 0.05	NS	0.65	2.30	NS	0.09	NS
A-1031	SMP	11.9	2.58	8.9	18.6	0.59	0.02
	Untreated	12.9	1.86	6.4	22.0	0.56	0.01
	LSD 0.05	1.91	NS	2.24	NS	NS	NS
Heukmi (흑미)	SMP	9.8	2.88	7.6	34.4	0.60	0.02
	Untreated	11.1	2.02	6.1	15.0	0.56	0.01
	LSD 0.05	1.65	NS	2.58	11.04	NS	NS
Shinsegae (신세계)	SMP	10.7	2.92	7.3	23.6	0.50	0.01
	Untreated	9.7	2.42	3.9	18.7	0.51	0.01
	LSD 0.05	NS	0.25	NS	9.14	NS	NS
Ss-gual (SS꿀)	SMP	10.7	2.85	7.8	29.0	0.55	0.01
	Untreated	9.8	2.28	5.4	22.7	0.48	0.01
	LSD 0.05	NS	0.65	1.65	NS	NS	NS

Seeds were dark-solid matrix primed with ratio of seed: carrier :H₂O =10:5:15 at 30°C for 2 days and dark-germinated at 30°C for up to 14 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seed package.

Means in columns within germination temperature are separated by LSD at $P = 0.05$.

Seed treatment

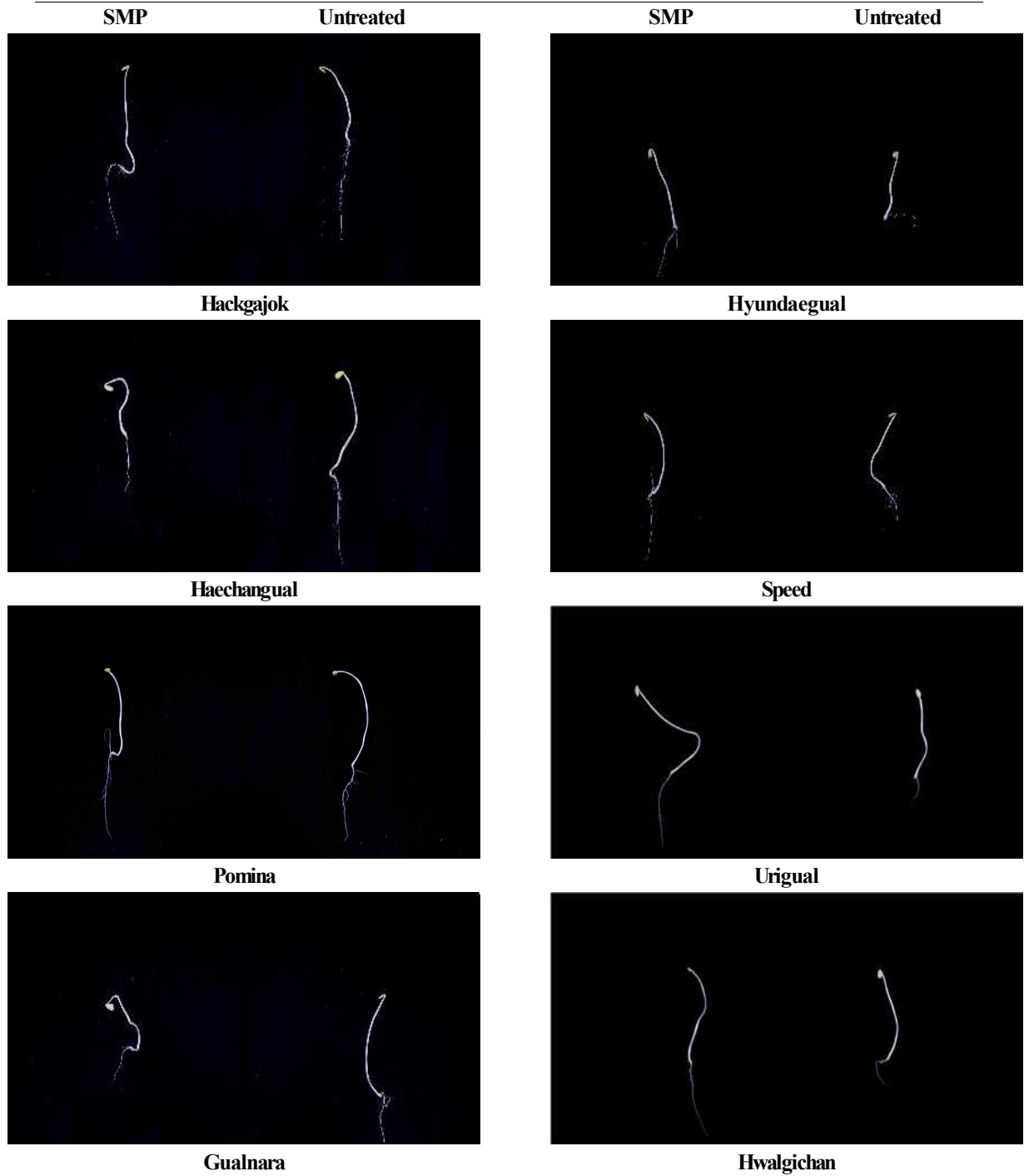


Fig. 1.32. Effect of seed SMP on seedling growth of 'Hyundaegual', 'Speed', 'Urigual' and 'Hwalgichan' watermelon seeds. Seeds were dark-solid matrix primed with ratio of seed: carrier :H₂O(10:5:15 w/w) at 30°C for 2 days and seedling growth was tested for up to 14 days at 30°C.

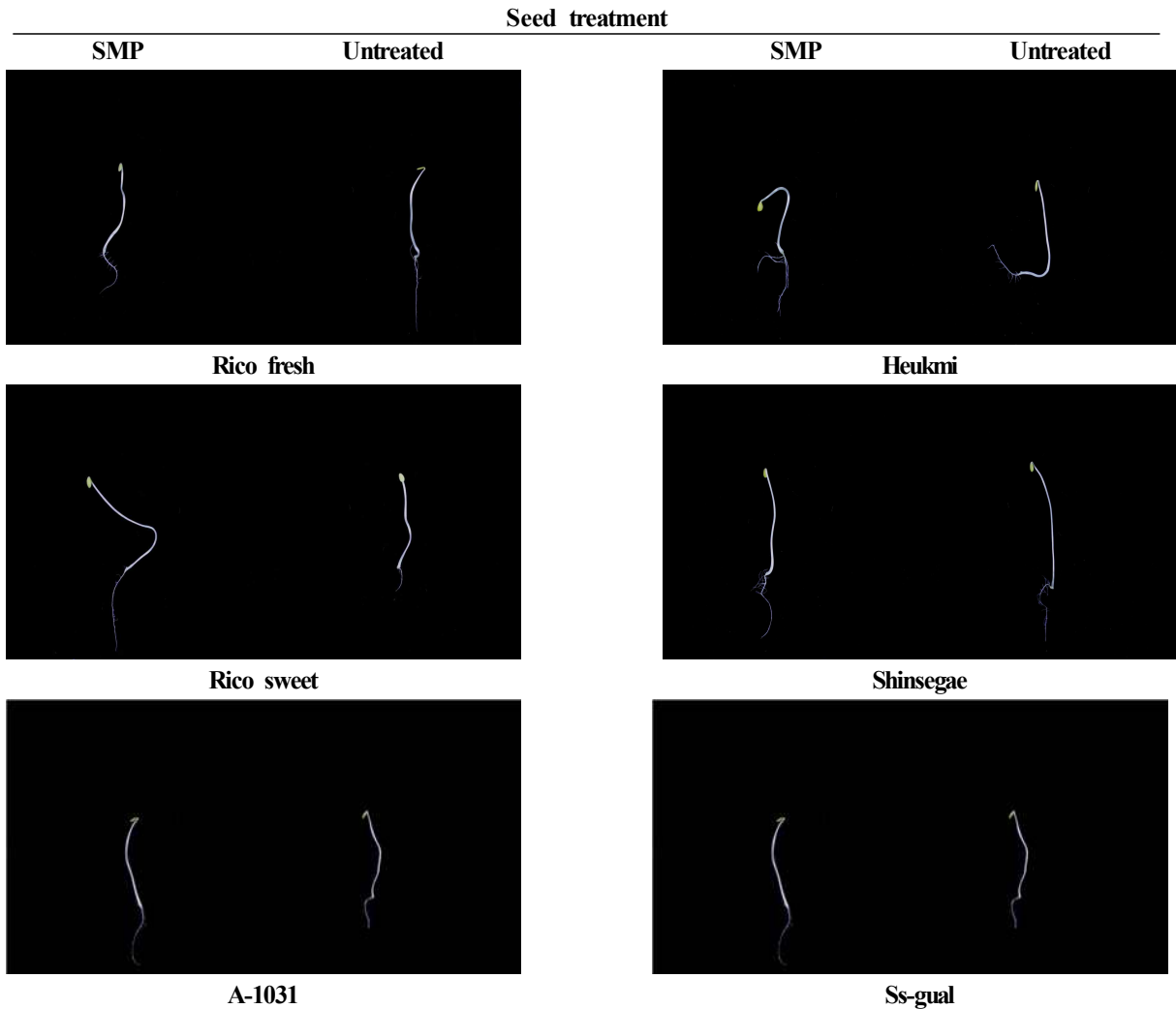


Fig. 1.33. Effect of seed SMP on seedling growth of 'Hyundaegual', 'Speed', 'Uriginal' and 'Hwalgichan' watermelon seeds. Seeds were dark-solid matrix primed with ratio of seed: carrier :H₂O(10:5:15 w/w) at 30°C for 2 days and seedling growth was tested for 14 days at 30°C.

○ SMP 처리된 종자의 포장조건에서 유묘활력 검정

21 세기의 농업분야는 생명공학이 폭넓게 사용됨으로써 유망산업으로 부각될 전망이고, 종자 산업은 그 중에서 중추적인 역할을 할 가능성이 크다. 특히 종자가공은 종자 산업을 한 단계 더 발전시킬 수 있는 분야이다. SMP 처리된 종자들은 실내조건에서 발아촉진 효과가 현저하였다. 이와 같이 SMP 처리를 통해 얻어진 발아촉진과 유묘활력 촉진 효과들이 포장조건에서도 초기생육 향상으로 연결될 수 있는지를 검토하고자 하였다(Table 1.53~1.54, Fig 1.34~1.37).

SMP 처리된 종자는 ‘꿀나나’, ‘리코후레쉬’ 품종에서는 무처리 종자에 비해 묘 출현율이 향상되었고, 나머지는 품종에서는 출현율이 향상되었으나 통계적인 유의성은 인정되지 않았다. 수박 종자를 SMP 처리 후 파종하여 30일 후 초기생육을 결과 품종에 따라 약간의 차이는 있으나 전반적으로 SMP 처리 종자는 유묘의 생체중과 건물중이 높아지는 경향이나 유의성은 인정된다고는 볼 수 없었다. 또한 SMP 처리종자들은 초장, 뿌리길이 및 하배축 직경 등의 생육이 무처리에 비해 좋았다. 이러한 결과는 SMP 처리의 유용 효과는 불량발아 조건에서 뚜렷하다는 선행연구들의 결과 일치하였다.

Table 1.53. The effect of solid matrix priming on percent of emergence, fresh and dry weight of different cultivar watermelon seeds in greenhouse at 25°C

Cultivar	Seed treatment	Emergency (%)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)
Hackgajok (핵가족)	SMP	95.2	1.02	0.06
	Untreated	90.5	0.48	0.04
	LSD 0.05	NS	0.19	NS
Haechangual (해찬굴)	SMP	96.4	1.13	0.06
	Untreated	95.2	0.75	0.05
	LSD 0.05	NS	0.36	NS
Pomina (포미나)	SMP	95.2	0.71	0.04
	Untreated	98.8	0.60	0.05
	LSD 0.05	NS	NS	NS
Gualnara (꿀나라)	SMP	98.8	0.85	0.04
	Untreated	86.9	0.44	0.04
	LSD 0.05	4.71	0.23	NS
Hyundaegual (현대굴)	SMP	98.8	0.83	0.04
	Untreated	90.5	0.91	0.06
	LSD 0.05	4.7	NS	NS
Speed (스피드)	SMP	97.6	0.96	0.06
	Untreated	98.8	1.19	0.08
	LSD 0.05	NS	0.22	NS
Urigual (우리굴)	SMP	82.1	0.85	0.03
	Untreated	86.9	0.63	0.04
	LSD 0.05	NS	NS	NS
Hwalgichan (활기찬)	SMP	96.4	0.95	0.05
	Untreated	79.8	0.53	0.03
	LSD 0.05	NS	0.10	NS
Rico fresh (리코후레쉬)	SMP	90.5	0.57	0.04
	Untreated	60.7	0.73	0.03
	LSD 0.05	20.9	0.15	NS
Rico sweet (리코스위트)	SMP	89.3	0.88	0.04
	Untreated	86.9	0.77	0.05
	LSD 0.05	NS	NS	0.01
A-1031	SMP	91.7	1.01	0.05
	Untreated	88.1	0.60	0.04
	LSD 0.05	NS	0.24	NS
Heukmi (흑미)	SMP	95.2	1.08	0.06
	Untreated	91.7	0.72	0.05
	LSD 0.05	NS	0.35	NS
Shinsegae (신세계)	SMP	94.0	0.95	0.05
	Untreated	70.2	0.54	0.03
	LSD 0.05	18.6	0.28	NS
Ss-gual (SS굴)	SMP	95.2	1.04	0.06
	Untreated	82.1	0.97	0.07
	LSD 0.05	NS	NS	NS

Seeds were dark-solid matrix primed with ratio of seed: carrier :H₂O(10:5:15 w/w) at 30°C for 2 days and dark-germinated at 30°C for up to 14 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seed package. Means in columns within germination temperature are separated by LSD at $P = 0.05$.

Table 1.54. The effect of solid matrix priming on early growth of different cultivar watermelon seeds in greenhouse at 25°C

Cultivar	Seed treatment	Height(cm)	Root length(cm)	Hypocotyl diameter (mm)
Hackgajok (핵가족)	SMP	16.3	4.8	3.08
	Untreated	10.8	3.8	2.77
	LSD 0.05	1.53	NS	NS
Haechangual (해찬꿀)	SMP	15.4	7.1	3.39
	Untreated	11.6	3.3	3.13
	LSD 0.05	2.65	NS	NS
Pomina (포미나)	SMP	12.3	3.6	2.90
	Untreated	15.4	6.0	2.16
	LSD 0.05	NS	NS	0.54
Gualnara (꿀나라)	SMP	14.7	8.2	3.27
	Untreated	12.7	7.2	2.10
	LSD 0.05	0.98	NS	0.86
Hyundaegual (현대꿀)	SMP	15.3	5.1	3.00
	Untreated	16.5	4.0	3.27
	LSD 0.05	NS	NS	NS
Speed (스피드)	SMP	13.4	2.9	2.81
	Untreated	16.9	4.2	3.23
	LSD 0.05	2.49	1.01	0.41
Uriginal (우리꿀)	SMP	12.4	5.0	2.92
	Untreated	7.8	3.0	2.58
	LSD 0.05	NS	NS	NS
Hwalgichan (활기찬)	SMP	14.7	5.3	3.04
	Untreated	9.2	4.9	2.74
	LSD 0.05	2.27	NS	NS
Rico fresh (리코후레쉬)	SMP	10.5	5.9	2.87
	Untreated	9.6	9.7	3.30
	LSD 0.05	NS	NS	NS
Rico sweet (리코스위트)	SMP	13.7	5.1	3.19
	Untreated	13.8	5.1	3.03
	LSD 0.05	NS	NS	NS
A-1031	SMP	17.3	4.8	3.45
	Untreated	12.4	2.8	2.81
	LSD 0.05	4.20	NS	0.56
Heukmi (흑미)	SMP	14.2	7.2	3.31
	Untreated	13.2	5.9	2.91
	LSD 0.05	NS	NS	NS
Shinsegae (신세계)	SMP	16.3	6.9	2.81
	Untreated	10.7	5.0	2.50
	LSD 0.05	2.47	NS	NS
Ss-gual (SS꿀)	SMP	15.1	5.1	2.66
	Untreated	16.0	4.2	3.07
	LSD 0.05	NS	NS	NS

Seeds were dark-solid matrix primed with ratio of seed: carrier :H₂O(10:5:15 w/w) at 30°C for 2 days and dark-germinated at 30°C for up to 14 days. Untreated seeds were those taken fresh from the seed package. Means in columns within germination temperature are separated by LSD at $P = 0.05$.

Seed treatment



Fig. 1.34. Effect of solid material priming on early growth of various watermelon seeds in a greenhouse. Seedling growth measured at 30 days after planting. Seeds were dark-solid matrix primed with ratio of seed: carrier :H₂O(10:5:15 w/w) at 30°C for 2 days.

Seed treatment



Fig. 1.35. Effect of solid material priming on early growth of various watermelon seeds in a greenhouse. Seedling growth measured at 30 days after planting. Seeds were dark-solid matrix primed with ratio of seed: carrier :H₂O(10:5:15 w/w) at 30°C for 2 days.

Seed treatment



Fig. 1.36. Effect of solid material priming on early growth of various watermelon seeds in a greenhouse. Seedling growth measured at 30 days after planting. Seeds were dark-solid matrix primed with ratio of seed: carrier :H₂O(10:5:15 w/w) at 30°C for 2 days.

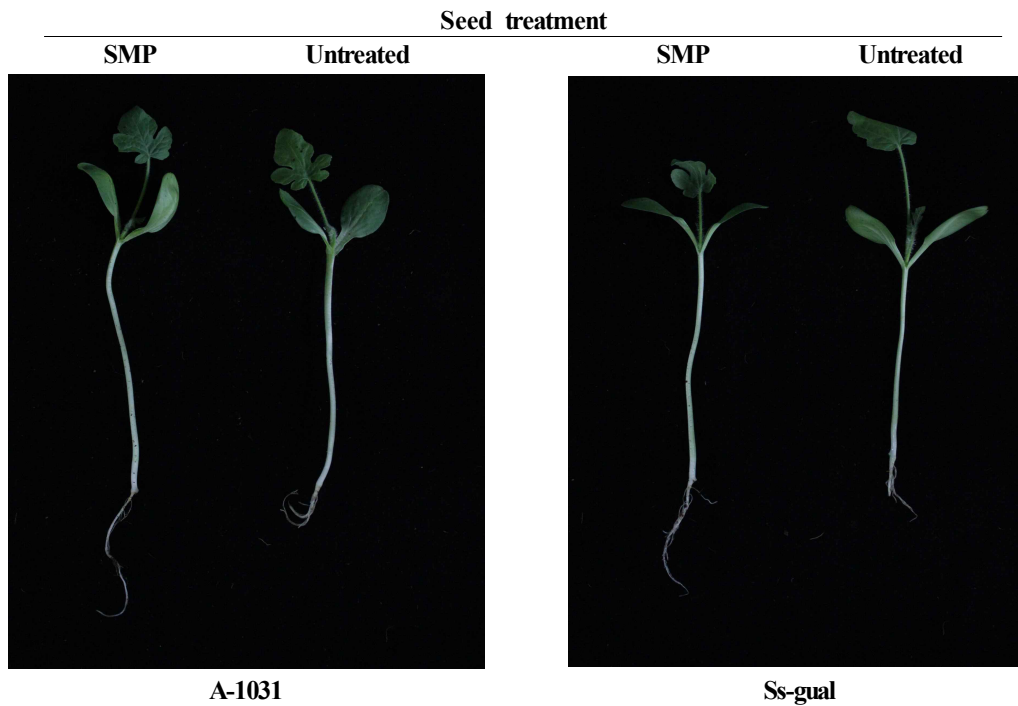


Fig. 1.37. Effect of solid material priming on early growth of various watermelon seeds in a greenhouse. Seedling growth measured at 30 days after planting. Seeds were dark-solid maric primed with ratio of seed: carrier :H₂O(10:5:15 w/w) at 3 0°C for 2 days.

7. 초분광 Vis/NIR, SWIR 영상기술을 이용한 수박종자 발아력 비파괴 측정기술 개발

가. 재료 및 방법

(1) 초분광 가시광 및 적외선(Vis/Nir) 영상 획득 시스템

분광분석을 통한 샘플 판별은 비파괴적인 방법으로 오늘날 화학, 생명과학, 환경, 제약, 농업 분야 등의 다양한 분야에서 사용되는 방법으로, 물질은 그 종류에 따라 빛 에너지를 흡수하여 전자전이 및 회전과 같은 여러 가지 분자운동을 일으키면서 고유의 흡수 스펙트럼을 나타내게 되는데, 분광분석법은 스펙트럼을 측정하여 측정하고자 하는 시료의 물리·화학적 특징을 파악하는 분석법이다.

현재 농산물 비파괴 선별을 위해 사용하고 있는 대부분의 카메라는 가시광 스펙트럼(390 nm ~ 750nm)을 사용하며, CCD또는 CMOS센서로 구성되어 있다. 하지만 가시광 파장 영역보다 근적외선 영역의 정보가 더 필요한 경우가 많다. 이러한 경우 가시광 스펙트럼 측정용 카메라는 한계성을 가질 수밖에 없다. 최근에는 가시광역역과 근적외선 영역을 동시에 영상으로 획득할 수 있는 초분광 영상기술이 점차적으로 활용되고 있다. 따라서 본 연구에서는 초분광 가시광 및 적외선 영상시스템을 이용하여 수박종자의 내부품질인 발아여부를 측정하는 기술을 개발하고자 하였다.

초분광 가시광 및 적외선(Vis/Nir)영상 기술은 빛의 각 파장별 전자기적 정보를 이용하여 영상을 분석하는 기술로 의학, 과학 수사, 군사 등의 분야에서 널리 이용되고 있으며 특히 농업분야에서 농축산물의 품질 및 안정성 계측 등에 최근 활발히 이용되는 첨단 기술이다. 기존의 분광측정법은 시료에 빛을 조사하여, 분자진동에 따라 발생하는 고유한 흡광도의 정보를 획득하여 물체의 물리화학적 특성을 예측하는 방법이었다. 하지만 초분광 가시광 및 적외선(Vis/Nir) 영상은 한점의 분광정보가 아니라 넓은 면적에 대한 세부적인 분광정보를 종합적으로 획득할 수 있는 분광분석법으로 대상물 세부 공간 영역에 대한 미세 영역별 분광정보를 제공하므로 대상물의 공간영역별 물리, 화학적 분석이 가능하다.

초분광 영상은 각 파장별 연속적으로 획득된 영상을 말하며, 획득원리는 Fig. 1.38 과 같다. 렌즈에 투사된 영상은 slit을 통과 하면서 1차원 정보가 되고 spectrograph를 통과하면서 분광정보가 포함된 2차원 정보로 변환된다. 이러한 영상들은 Fig. 1.39 에서 보는 것과 같이 3D hypercube라는 대용량 정보를 구성하게 되며 2차원의 영상 정보와 각 픽셀 별 스펙트럼 정보를 동시에 가지게 된다. 따라서 초분광 영상 기술은 분광에 영상을 융합한 기술로 기존의 분광기술이 대상물의 평균 분광정보를 제공하는 것과는 달리 대상물의 세부 공간 영역에 대한 미세 영역별 분광정보를 제공하므로 대상물의 공간영역별 물리, 화학적 분석이 가능하게 된다.

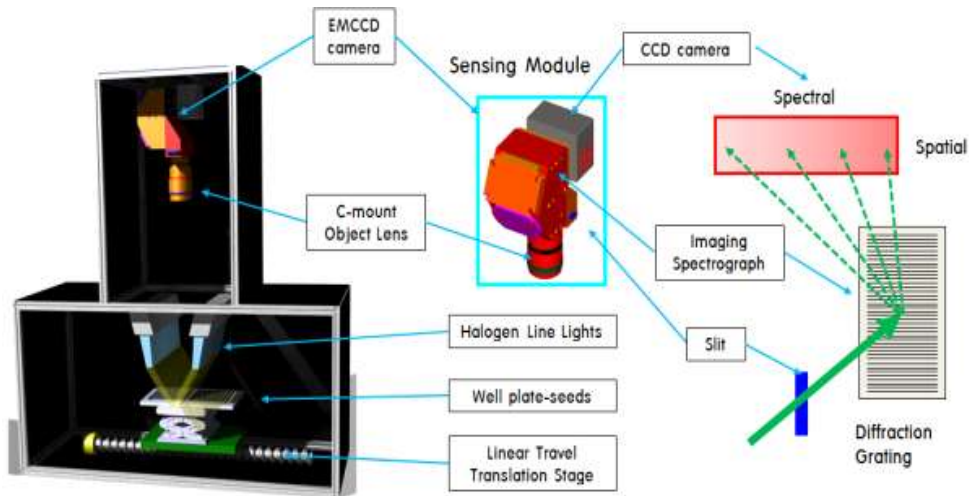


Fig. 1.38. Schematic of hyperspectral image system.

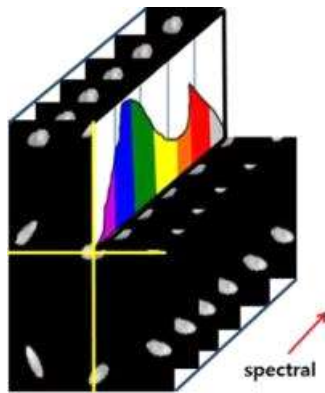


Fig. 1.39. Structure of the 3D hypercube.

(2) 초분광 가시광 및 적외선(Vis/Nir) 반사광 영상 시스템 구축

본 연구에서 구축한 초분광 영상 획득 시스템은 영상 획득을 위한 electron multiplying charge-coupled device (EMCCD) camera (Luca RDL- 604M, Andor Technology, South windor, CT, USA)와 imaging spectrograph (VNIR, Headwll photonics, Fitchburg, MA, USA), 그리고 step motor 로 구동되는 시료이송부로 구성되어 있다. 제어 시스템 소프트웨어는 Visual Basic 6.0을 이용하여 구라에 의해 증폭되어 이미지로 저장된다. 본 연구에서 초분광 영상은 Halogen lamp와 LED (400 nm) lamp 광원을 이용해 반사광 형태로 촬영되었으며 Table 1.55와 Table 1.56은 초분광 가시광 및 적외선(Vis/Nir) 반사광 영상 시스템의 자세한 구성사항을 나타낸다.

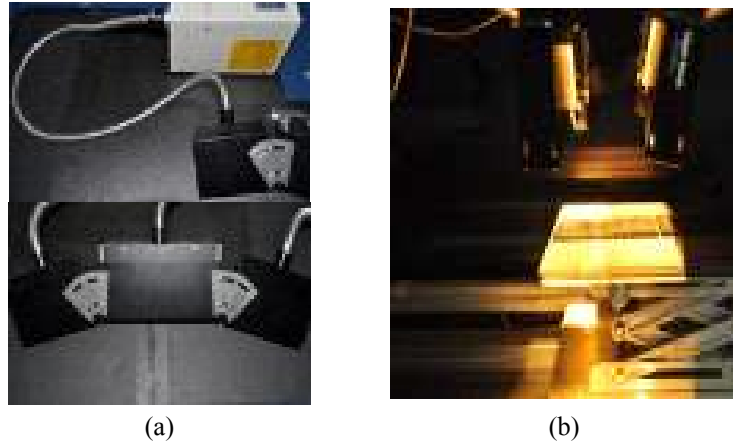


Fig. 1.40. Photo of the hyperspectral SWIR imaging system.

반사광 영상을 획득하기 위해 사용된 광원은 Fig. 1.40과 마찬가지로, 광량 조절이 가능한 100 W급 halogen lamp를 이용하였으며, halogen lamp에 가이드를 설치하여 광의 조사폭 조절이 가능하도록 설계하였다. 가이드는 3개를 1 set로 하였고, 수박 종자의 조명을 고르게 조사하기 위해 각 광원 set는 양쪽에서 시료를 비추도록 수직 방향으로 약 15°, 가이드와 가이드 사이는 약 30° 정도 기울어지도록 설치하여 반사광의 공간에 따른 불균일성을 최소화 하였다. (Fig. 1.40 (a)).

Table 1.55. Specifications of the hyperspectral imaging system

Part	Item	Specification
Vision System	EMCCD camera	Active pixels : 1004 × 1002 Pixel Size : 8 × 8 μm Image area : 8 × 8 mm Max readout rate : 13.5 MHz Frame rate : 12.4 fps Pixel readout rate : 13.5 MHz Digitization : true 14 bit Peak quantum efficiency : 65% Cooling : -20°C @ Air-cooled
	Spectrograph	Spectral range = 400-1000 nm Spectral dispersion = 100 nm/mm Aperture = F/2*1 Includes the choice of one slit assembly (12, 25, 40 or 60 μ × 18 mm)
	Lens	Lenses are designed for 400 - 1000 nm precision imaging and are useful while prototyping.
	Lighting	100 W halogen lamp × 3 (2 Set)
	Slit	25 μm slit
	Vision controller	Quad core(2.4 GHz) CPU, 2 Gbyte main memory

Table 1.56. Specifications of the conveying unit of the hyperspectral imaging system

Part	Item	Specification
Conveying unit	Motor	Step : 0.9° Torque required : 18 kg·mm
	Controller	Operation : RS-232 interface, 9600, 19200, 38400 baud rate settable Weight : 1.2 kg Electrical requirements : 24 VDC 2.5 A
	Slide Assembly	Repeatability (short term) : 0.0025 mm Straight line accuracy : 0.025 mm/25 cm Screw lead accuracy : 0.76 mm/25 cm

분광 영상을 획득 할 때 선명한 영상을 획득하기 위해서는 렌즈의 초점을 맞추어 아웃 포커스 현상을 방지하여야 한다. 초점 조절은 검정색과 백색만 존재하는 표를 이용하여 두 가지 색의 대비가 최대가 되도록 하여 초점을 맞추었다. 또한 초분광 영상 시스템에서 인지하는 광 파장은 실제 광파장과 차이가 있을 수 있으므로 파장보정을 통해 시스템에서 인지하는 파장과 실제 파장을 동기화 시키는 것은 매우 중요하다. 파장 보정은 이미 알고 있는 형광등의 스펙트럼 정보를 이용하여 실시하였다.

또한 초분광 반사광 영상은 노출시간(exposure time)을 8.5 ms로 설정하고 스텝 모터의 이동을 0.1 mm 간격으로 2300 스텝으로 하여 총 23 cm 길이의 면적을 2300 × 502 pixels의 해상도로 영상을 획득하였다. 측정된 스펙트럼의 영상의 범위는 400~1000 nm 이었으며, 실험에 사용한 수박의 건전종자 48립, 퇴화종자 48립을 반사광 영상 촬영과 발아력 검증 실험에 사용하였다.

(3) 단파적외선 초분광(Short wavelength infrared Reflectance : SWIR) 영상 획득 시스템

단파적외선 초분광(SWIR) 영상 획득 시스템은 초분광 가시광 및 적외선(Vis/Nir) 영상 획득 시스템과 마찬가지로 다양한 분야에서 사용되고 있는 최첨단 기술로써, 기존의 분광측정법이 시료에 빛을 조사하여, 분자진동에 따라 발생하는 고유한 흡광도의 정보를 획득하여 물체의 물리화학적 특성을 예측하는 방법 이었다면, 단파적외선 초분광 영상시스템은 샘플의 스펙트럼과 영상을 융합한 정보의 획득이 가능하다. 이는 한 점의 분광정보가 아니라 넓은 면적에 대한 세부적인 분광정보를 종합적으로 획득 할 수 있는 분광분석법으로 대상물 세부 공간 영역에 대한 미세 영역별 분광정보를 제공하므로 대상물의 공간영역별 물리, 화학적 분석이 가능하다.

단파적외선 초분광 영상은 초분광 가시광 및 적외선(Vis/Nir) 영상 획득 시스템과 마찬가지로 각 파장별 연속적으로 획득된 영상을 말하며, 획득원리는 Fig. 1.41와 같다. 렌즈에 투사된 영상은 slit을 통과 하면서 1차원 정보가 되고 spectrograph를 통과하면서 분광정보가 포함된 2차원 정보로 변환된다. 이러한 영상들은 Fig. 1.39에서 보는 것과 같이 3D hypercube라는 대용량 정보를 구성하게 되며 2차원의 영상 정보와 각 픽셀 별 스펙트럼 정보를 동시에 가지게 된다. 따라서 초분광 영상 기술은 분광에 영상을 융합한 기술로 기존의 분광기술이 대상물의 평균 분광정보를 제공하는 것과는 달리 대상물의 세부 공간 영역에 대한 미세 영역별 분광정보를 제공하므로 대상물의 공간영역별 물리, 화학적 분석이 가능하게 된다.

(4) 단파적외선 초분광 반사광 영상 시스템 구축

본 연구에서 구축한 초분광 단파적외선 영상 시스템의 구조는 Fig. 1.41와 같이 MCT (Mercury cadmium telluride sensor)센서(Xeva-2.5-320, Xenics, Belgium)와 Image spectrograph 탑재된 카메라(SWIR, Headwall photonics, Fitchburg, MA, USA), 초점 조절이 가능한 C-Mount 렌즈가 구비된 Imaging Spectrograph와 스텝 모터로 구동되는 시료 이송부, 광량 조절이 가능한 텅스텐-할로겐 선광원으로 구성되었으며, Table 1.57과 Table 1.58는 단파적외선 초분광 반사광 영상 시스템의 자세한 구성사항을 나타낸다. 초분광 영상 획득은 제작사에서 제공된 소프트웨어 개발 킷을 활용하여 개발된 Visual Basic 6.0 프로그램으로 구축되었다.

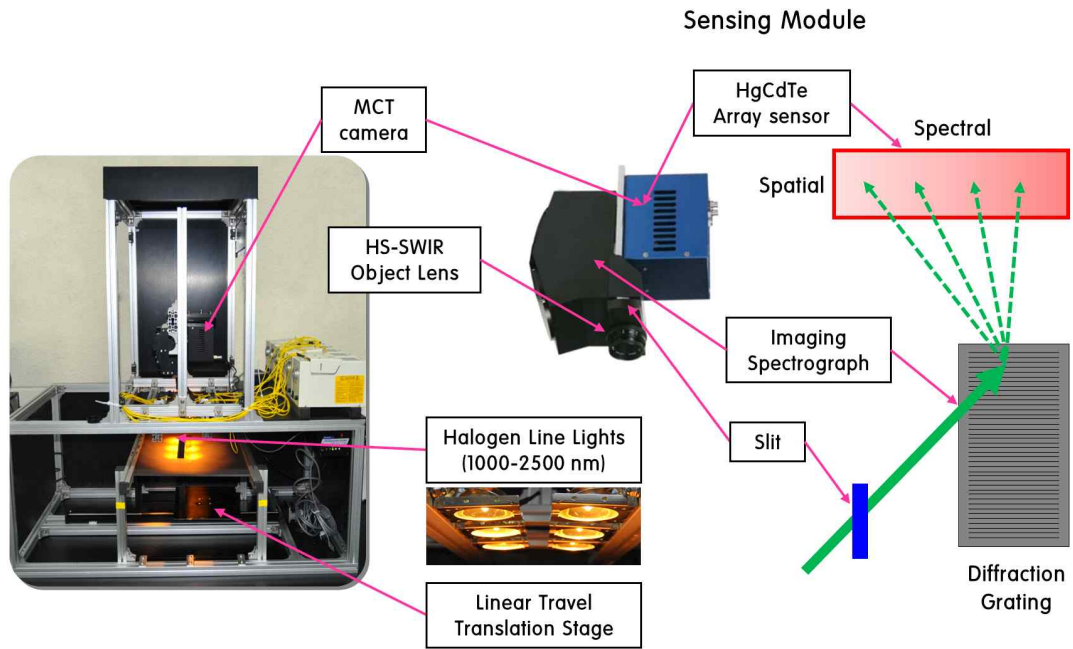


Fig 1.41. Schematic of hyperspectral image system.

Table 1.57. Specifications of the conveying unit of the hyperspectral imaging system

Part	Item	Specification
Conveying unit	Motor	Step : 0.9° Torque required : 18 kg-mm
	Controller	Operation : RS-232 interface, 9600, 19200, 38400 baud rate settable Weight : 1.2 kg Electrical requirements : 24 VDC 2.5 A
	Slide Assembly	Repeatability (short term) : 0.0025 mm Straight line accuracy : 0.025 mm/25 cm Screw lead accuracy : 0.76 mm/25 cm

Table 1.58. Specifications of the hyperspectral imaging system

Part	Item	Specification
Vision System	MCT sensor	Array Type : HgCdTe Spectral band : 850 nm ~ 2500 nm Pixels : 320 x 256 Pixel Pitch : 30 μm Array Cooling : TE2 Pixel operability : > 99 %
	Imaging performance	Frame rate : Video rate : 100 Hz Integration type : Snapshot Exposure time range : 100 μsec up to 20 $msec$ Noise level : 9.3 AD counts S/N ratio : 64 db A to D conversion resolution : 14 bit
	Lens	Focal length : 16 mm f/1.4 Optical interface : C-Mount, Spectrograph fixation holes (Board selection of lenses are available)
	Interfaces	Camera control : USB 2.0 Image acquisition : CameraLink Tigger : TTL level Graphical User Interface(GUI) : Xeneth Advanced
	Physical characteristics	Camera cooling : Forced convection cooling Cool-down time : < 300 sec Ambient operation temperature : 0 to 50°C
	Lighting	100 W halogen lamp \times 3 (2 Set)
	Slit	25 μm slit
	Vision controller	Quad core(2.4 GHz) CPU, 2 Gbyte main memory

(5) 데이터 분석

- 스펙트럼 전처리

원본 스펙트럼 데이터에서 기기 조건의 변화에 따른 영향을 제거하고 불규칙한 대상물의 형상에 의한 광산란을 보정하고 우수한 판별예측모델을 개발하기 위해 다양한 통계적인 방법에 의한 전처리(pretreatment)를 실시하였다. 본 연구에서 실시한 전처리는 평균, 최대값, 일정범위의 3가지 정규화를 사용하였으며, 종자의 불규칙한 형상에 의한 광산란의 영향을 제거하기 위해 MSC (Multiplicative Scatter Correction), SNV (Standard Normal Variate) 전처리를 실시하였다. 또한 광경로의 차이나 측정환경의 변화 등에 기인한 베이스라인의 이동을 제거하거나 미소성분의 스펙트럼 특성을 강조하기 위해 Savitzky-Golay 1차, 2차 미분법을 사용하였다.

- 부분최소제곱 판별분석(Partial Least Squares-Discriminant Analysis)

부분최소제곱(Partial Least Squares : PLS) 회귀 분석법은 주성분(PCA) 분석법을 보완한 방법으로 스펙트럼(독립변수) 데이터의 주성분을 구하고 그 주성분을 이용하여 회귀식을 구하는 주성분분석과는 다르게 스펙트럼뿐만 아니라 실제 측정된 종속변수 값을 동시에 고려하여 새로운 변수를 찾고 이를 이용하여 회귀식을 구하는 방법이다. 이와 같이 독립변수와 종속변수를 모두 고려하기 때문에 독립변수만을 고려하는 주성분 모델보다 더 안정적인 특징을 보인다. PLS 모델을 행렬로 표현하면 다음 식(1)과 같다(LEE 등, 2002).

$$\begin{aligned} X &= TP + E_X \\ Y &= UQ + E_Y \end{aligned} \quad [1]$$

where, T : the matrix of X score
P : the matrix of X factors
U : the matrix of Y score
Q : the matrix of Y factors
E : error

여기서 스펙트럼 X의 score 행렬 T와 측정된 농도 Y의 score 행렬 U는 다음과 같은 관계가 있다.

$$Y = TBQ + E \quad [2]$$

where, B : regression coefficients for PLSR

PLS 방법은 정량적 분석 외에 정성적 분석법도 활용이 되는데 대표적인 방법이 PLS-DA (Partial Least Squares-Discriminant Analysis) 방법이다. 기존의 PLS 모델과는 달리 PLS-DA는 종속변수로 연속적인 값 대신 판별하고자 하는 그룹들을 가상 변수로 설정하여 이를 판별 하는 회귀모델이다. 본 연구에서는 건전종자와 퇴화종자를 판별하기 위해 PLS-DA 모델을 이용하였다. 또한 스펙트럼 X의 score 행렬 T와 측정된 농도 Y의 score 행렬 U의 관계식으로 구한 beta

coefficient를 이용하여 초분광 영상에서 PLS 영상을 구성하고 이를 발아종자와 불발아 종자를 선별하는 영상 구성에 이용하였다. PLS 영상을 구하는 식은 아래와 같다.

$$PLS_image = \sum_{i=1}^n W_i H_i + constant \quad [3]$$

where, W_i : beta coefficients

H_i : image at i_{th} wavelength of a total of n spectral images

Constant : beta coefficients constant

모든 데이터 분석은 MATLAB(version 7.0.4, The Mathworks, Natick, MA, USA) 프로그램을 이용하였고, 그래프 분석에는 Origin Pro(version 8.1, OriginLab, USA)를 이용하였다.

(6) 종자의 발아력 실험

- 공시시료 및 종자 퇴화처리

본 연구에 사용된 종자는 H사에서 제공된 무 처리 리코핀 수박 종자를 이용하였다. 발아종자와 불발아 종자 판별을 위해 인위적으로 건전종자를 퇴화처리 하였다. 퇴화처리는 건전종자의 함수율을 20%로 조정된 후 진공 포장하여 45°C water bath에서 완전히 퇴화 할 때 까지 보관하였다. 이 후 20°C의 incubator에서 건전종자와 퇴화종자 모두 원래의 무게까지 건조하였다. 외관상으로는 건전종자와 퇴화종자의 종피의 색이나, 모양 모두 동일하여 구분하기 어려웠다. 모든 과정은 국제종자검정협회(ISTA) 규정에 따랐으며 퇴화처리가 완료된 후 4°C로 보관하며 실험에 사용하였다. 수박종자는 7일 후 완전히 퇴화된 것으로 확인되었으며, 사용된 종자는 개별종자에 대한 건전종자와 퇴화종자를 식별하기 위해 국제종자검정협회(ISTA) 규정에 따라 발아력 실험을 실시하였으며 발아온도와 발아법은 Table 1.59와 같다.

Table 1.59. Rules of germination tests suggested by ISTA

종자	학명	온도	최종발아확인일수	발아법
수박	Citrullus lanatus	25°C	14일	BP

- BP (Between of paper)법

종자의 발아란 종자가 적합한 환경조건하에서 정상적인 식물로 계속 발육할 수 있는 능력을 지닌 중요한 식물의 구조가 출현 발달하는 것으로 정의될 수 있다. 또는 완전한 뿌리와 줄기를 가지고 있어 좋은 조건 하에서 정상적인 생장을 할 수 있는 능력을 가진 배식물의 출현을 발아라고 보고 있다. ISTA 규정에 맞추어 BP (Between of paper)법을 이용하여 수박종자 발아실험을 하였다. 발아검사를 위한 배지로는 일반적으로 종이(papers ; P)또는 모래(sand ; S)를 사용한다. 국제종자검정협회의 규정에 따르면 종이는 성글고 다공질의 재료로 된 것으로 규정하고

있으며, 치상하는 방법도 각각 다르다. 종이 위에 치상하는 방법(top of paper ; TP), 종이사이에 치상하는 방법(Between of paper ; BP), 주름종이를 이용하는 방법(pleated papers ; PP)등으로 각각 작물의 종류에 따라 다르다. 수박종자의 경우 BP법에 해당하며 BP법을 통해 발아검사를 실시하였다. 또한 국제종자검정협회(ISTA)의 온도조건에 맞추어 Germination chamber에서 일정한 온도에서 실시하였다. 이와 같이 종자 발아 시험은 종자 모집단이 가진 최대 발아 잠재능력을 알아냄으로써 퇴화 처리된 종자의 그룹과 활력 종자 그룹간의 품질비교 자료를 마련 할 수 있다. 종자는 순도검사를 마친 정립종자를 무작위로 추출하여 사용하였으며, 발아조사의 결과는 백분율로 나타내었다.

Table 1.60. Percentage of germination of watermelon seeds using Vis/Nir hyperspectral system

Calibration	Total	Germin	Non-Germin	Accuracy
Viable seed	48	48	0	100 %
Non-viable seed	48	0	48	0 %

Table 1.61.. Percentage of germination of watermelon seeds using SWIR hyperspectral system

Calibration	Total	Germin	Non-Germin	Accuracy
Viable seed	96	72	24	75 %
Non-viable seed	96	0	96	100 %

나. 실험결과 및 고찰

(1) 초분광 가시광 및 적외선(Vis/Nir) 영상 획득 시스템을 이용한 수박종자의 분석

할로겐램프를 이용하여 획득된 반사광 스펙트럼, 400 nm ~ 1000 nm의 영역 대를 사용하여 종자별로 건전종자 48립과 퇴화종자 48립씩 두 그룹으로 나누어 비교·분석하였다. 건전종자 48립과 퇴화종자 48립의 초분광 반사광 영상의 각 픽셀에 대한 스펙트럼 데이터를 추출하여 부분 최소 자승법(Partial Least Squares, PLS)을 적용하여 건전종자와 퇴화종자의 선별모델을 개발하였다. 각 종자의 스펙트럼 데이터는 종자별로 스펙트럼을 추출하여 총 96개의 종자에서 400개의 스펙트럼을 추출하였다. 건전종자 200 Pixel, 퇴화종자 200 Pixel 이었으며, 이 중 건전종자 150 Pixel, 퇴화종자 150 Pixel 은 모델을 개발하는데 사용하였다. 모델 개발에 사용하지 않았던 건전종자 50 Pixel과 퇴화종자 50 Pixel 의 스펙트럼은 개발된 모델의 검증에 사용되었다.

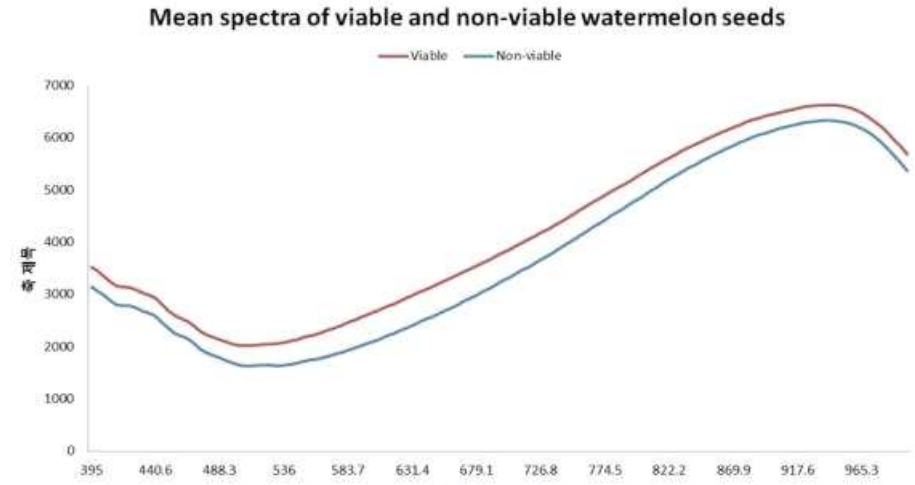


Fig. 1.42. Mean spectra of viable and non-viable watermelon seeds.

· 스펙트럼 분석

초분광 영상 시스템을 이용하여 측정된 초분광 반사광 영상에서 수박종자 영역의 스펙트럼을 추출하여 발아력시험을 통해 건전과 퇴화로 분류된 종자의 스펙트럼을 두 그룹으로 분류하여 분석하였다. 건전종자와 퇴화 종자의 평균 스펙트럼은 Fig. 1.42와 같다. 전체 측정된 400 ~ 1000 nm 영역을 분석에 이용하였다. 스펙트럼의 전체적인 경향은 서로 비슷하게 나타났다. 450 ~ 600 nm 범위에서 다소 다른 양상을 보이며, 이는 종자의 화학적 성분의 차이가 스펙트럼에 반영된 결과라고 볼 수 있는데 종자의 발아에 영향을 미치는 억제 물질인 abscisic acid (ABA)가 관련되어 있는 것으로 사료된다. 또한 ABA는 종자의 성숙과 관련되어 있는데(Muhammad 등, 1998), C-H 결합에 의한 화학적 작용기는 지질을 구성하며 유리기(free radicals)에 의해 발생된 과산화 지질은 종자가 퇴화하는 동안 종자를 둘러싸고 있는 종피의 세포막을 파괴하여 노화의 주된 원인으로 나타난다(Shetty 등, 2011). 종자의 세포막 상실은 발아에 이용되는 단백질, 아미노산, 가용성 당 등의 저장양분의 누출을 증가 시켜 발아를 억제시킨다(Kang and Choi, 2006). 이러한 수박종자의 주된 영향을 미치는 과장 대는 모두 종자 내 세포 구조적 조성물질의 변화와 세포막 상실에 의한 저장양분의 누출이 스펙트럼에 반영된 결과라 사료된다.

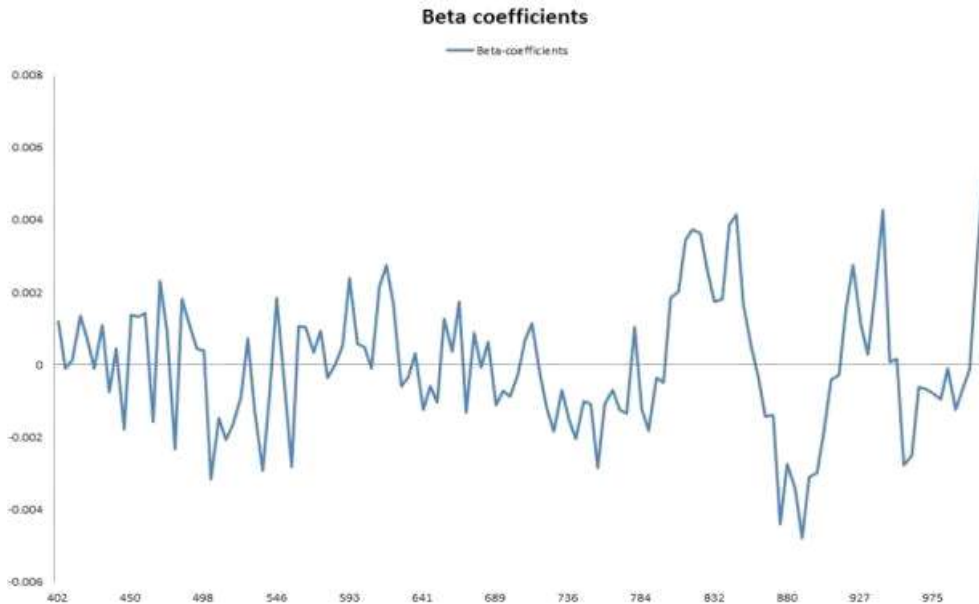


Fig. 1.43. Beta coefficients of the developed PLS model using hyperspectral reflectance data of watermelon seeds.

. 건전종자와 퇴화종자 판별예측 모델 개발

수박의 건전종자와 퇴화종자 스펙트럼을 이용하여 발아력 판별예측 모델을 개발하기 위해 PLS-DA 방법을 적용하였고 판별에 많은 영향을 미친 영역을 확인하기 위해 PLS 모델의 beta coefficient를 계산하였다. beta coefficient의 경우 Fig. 1.43에서 확인할 수 있으며, 주된 영향을 미친 파장대는 469 nm, 484 nm, 510 nm, 617 nm, 817 nm, 846 nm, 889 nm, 942 nm의 영역대로 확인되었다. 469 nm, 484 nm, 510 nm, 617 nm는 가시광선 영역대의 미세한 색소에 의한 영향이며 817 nm, 846 nm, 889 nm, 942 nm 영역대는 C-H 결합에 의한 화학적 작용기와 수분과 관련된 O-H 결합과 관련되어 있다. 이는 수박종자가 퇴화하는 과정에서 발생하는 조성물질의 변화와 세포막 상실에 의한 저장양분의 누출이 수박의 발아종자와 불발아 종자 사이에 스펙트럼 차이를 발생시킨 것이라 판단된다.

Table 1.62은 건전종자와 퇴화종자 픽셀의 스펙트럼 데이터를 이용한 PLS 모델의 calibration 결과를 보여준다. 각각 일반종자 48개와 퇴화종자 48개에서 스펙트럼을 추출하여 총 400개의 스펙트럼을 사용하였다. 한 그룹 당 200개씩 스펙트럼을 가지며, 200개의 스펙트럼 중 150개는 모델을 만드는 데 사용하였으며, 50개는 모델개발에 사용되었다. 결과에 따르면 건전종자는 100%, 퇴화종자는 100%의 정확도로 분류되었으며 전체적으로 100%의 분류 정확도를 보였다. 또한 Table 1.63는 개발된 PLS모델의 성능을 평가하기 위해 모델 개발에 사용하지 않은 미지의 수박종자에 대한 검증결과이다. 결과에 따르면 건전종자는 100% 그리고 퇴화종자는 100%의 정확도로 분류되었고 전체 100%의 분류 정확도를 보였다.

Table 1.62. Calibration results of the PLS-DA model for viable and nonviable watermelon seeds

Calibration	Total*	Correct*	Incorrect*	Accuracy
Viable seed	150	150	0	100 %
Non-viable seed	150	150	0	100 %
Total	300	300	0	100 %

*Number of pixels

Table 1.63. Test results of the PLS-DA model for viable and nonviable watermelon seeds

Test	Total*	Correct*	Incorrect*	Accuracy
Viable seed	50	50	0	100 %
Non-viable seed	50	50	0	100 %
Total	100	100	0	100 %

*Number of pixels

Table 1.64. Preprocessing methods

Preprocessing Methods
Smoothing
Mean normalization
Maximum normalization
Range normalization
MSC
SNV
Savitzky_Golay_1st
Savitzky_Golay_2st

Table 1.64은 분석에 사용된 전처리의 목록이다. 전처리의 경우 모두 8개이며 전처리를 사용하지 않은 경우와 합쳐서 총 9개로 처리된 분광데이터를 분석에 이용하였다. 전처리를 사용하여 분석과 결과는 아래의 표와 같다.

Table 1.65. Calibration results of PLS-DA models for viable and nonviable watermelon seeds with various preprocessing methods

Data set	Viable seed			Non-viable seed			Total				
	Total*	Correct*	Incorrect*	Total*	Correct*	Incorrect*	Total*	Correct*	Incorrect*	Accuracy(%)	
Smoothing	150	50	0	150	50	0	300	100	0	100	
Raw	150	50	0	150	50	0	300	100	0	100	
Normalization	Maximum	150	50	0	150	50	0	300	100	0	100
	Minimum	150	50	0	150	50	0	300	100	0	100
	Range	150	50	0	150	50	0	300	100	0	100
MSC ¹⁾	150	50	0	150	50	0	300	100	0	100	
SNV ²⁾	150	50	0	150	50	0	300	100	0	100	
1st derivative ³⁾	150	50	0	150	50	0	300	100	0	100	
2st derivative ³⁾	150	50	0	150	50	0	300	100	0	100	

*Number of pixel

¹⁾MSC : Multiplicative Scatter Correction

²⁾SNV : Standard Normal Variate

³⁾Savitzky-Golay derivative

Table 1.66. Test results of PLS-DA models for viable and nonviable watermelon seeds with various preprocessing methods

Data set	Viable seed			Non-viable seed			Total			
	Total*	Correct*	Incorrect*	Total*	Correct*	Incorrect*	Total*	Correct*	Incorrect*	Accuracy(%)
Smoothing	50	50	0	50	50	0	100	100	0	100
Raw	50	50	0	50	50	0	100	100	0	100
Maximum	50	50	0	50	50	0	100	100	0	100
Normalization Minimum	50	50	0	50	50	0	100	100	0	100
Range	50	50	0	50	50	0	100	100	0	100
MSC ¹⁾	50	50	0	50	50	0	100	100	0	100
SNV ²⁾	50	50	0	50	50	0	100	100	0	100
1st derivative ³⁾	50	50	0	50	50	0	100	100	0	100
2st derivative ³⁾	50	50	0	50	50	0	100	100	0	100

*Number of pixel

¹⁾MSC : Multiplicative Scatter Correction

²⁾SNV : Standard Normal Variate

³⁾Savitzky-Golay derivative

Table 1.64와 1.65는 수박 종자의 Calibration결과와 Test 결과를 보여준다. 결과에 따르면 전처리를 이용한 결과와 이용하지 않은 결과 모두 100%의 성능을 보였다.

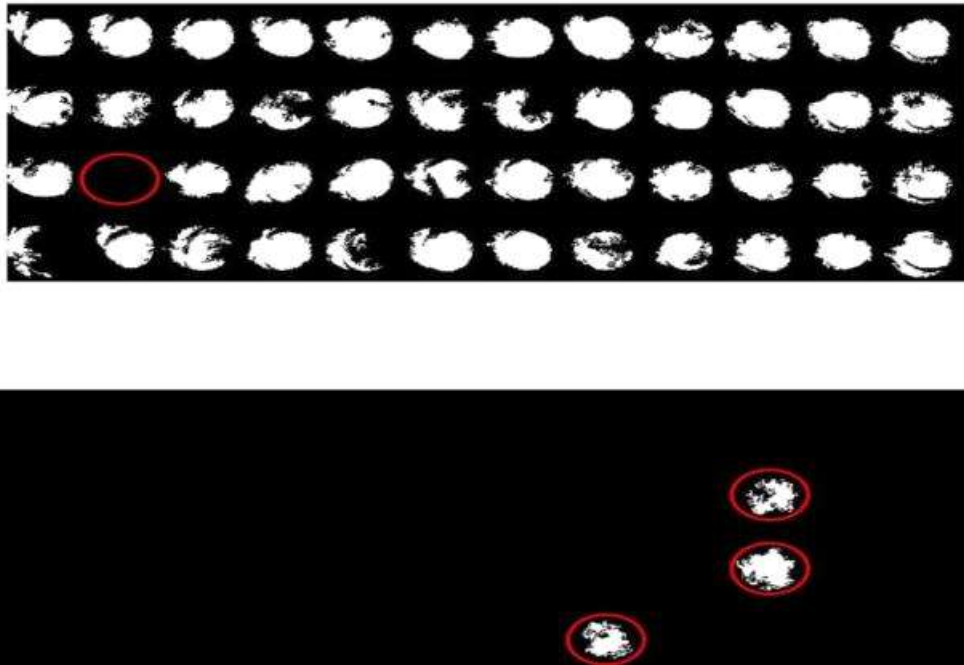


Fig. 1.44. PLS image for viable and non-viable watermelon seeds.

· 수박종자의 PLS image 구축

수박종자의 PLS image의 경우 Fig. 1.44과 같다. 먼저 531 nm의 파장 영상을 이용하여 수박종자의 영역을 1, 나머지 배경 영역은 0의 값을 가지도록 이진화 영상을 구성하여 종자를 제외한 나머지 부분은 제거되도록 masking image를 만들었다. PLS 모델과 beta coefficient를 초분광 영상에 적용하게 되는데, 이때 PLS 모델의 판별 기준 상수인 Threshold Value 값을 0.5를 임계값으로 하여 이진화 영상을 구성하였다. 또한 수박의 발아종자와 불발아 종자를 가장 잘 분리하는 최적의 임계값을 적용하여 이진화 한 후에 퇴화 종자만 검출 되도록 하는 영상을 구성하였다.

Table 1.67. Classification results of viable and non-viable watermelon seeds using PLS (531 nm) images

Classification	Total	Correct	Incorrect	Accuracy(%)
Total	96	81	4	84.4

Table 1.67은 PLS image를 통해 발아종자와 불발아 종자를 검출한 결과를 나타낸 값으로써 최적 파장 비율을 이용한 종자 판별 정확도는 전체 96립중 4립이 오분류 되어 84.4%의 정확도를 보였다.

(2) 초분광 단파적외선(SWIR) 영상 획득 시스템을 이용한 수박종자의 분석

수박종자의 경우 건전종자 96개 퇴화 처리를 거친 퇴화종자 96개중 건전종자 72개 퇴화종자 72개를 통해 획득한 데이터를 이용하여 분석을 수행하였다. 건전종자와 퇴화종자의 스펙트럼 평균 그래프는 Fig. 1.45과 같이 나타났다 또한 raw 스펙트럼은 Fig. 1.46과 같이 나타났다. Fig. 1.47과 Fig. 1.48은 PLS-DA 분석을 이용한 발아종자와 비발아종자의 분류와 Beta coefficient를 나타낸 것이다.

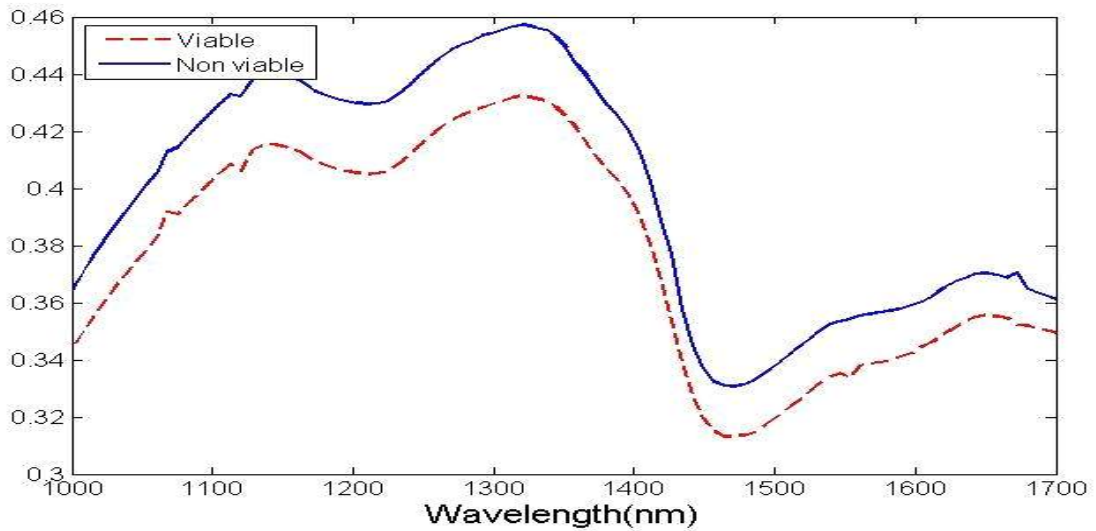


Fig. 1.45. Mean spectrum of watermelon seed of viable and non viable

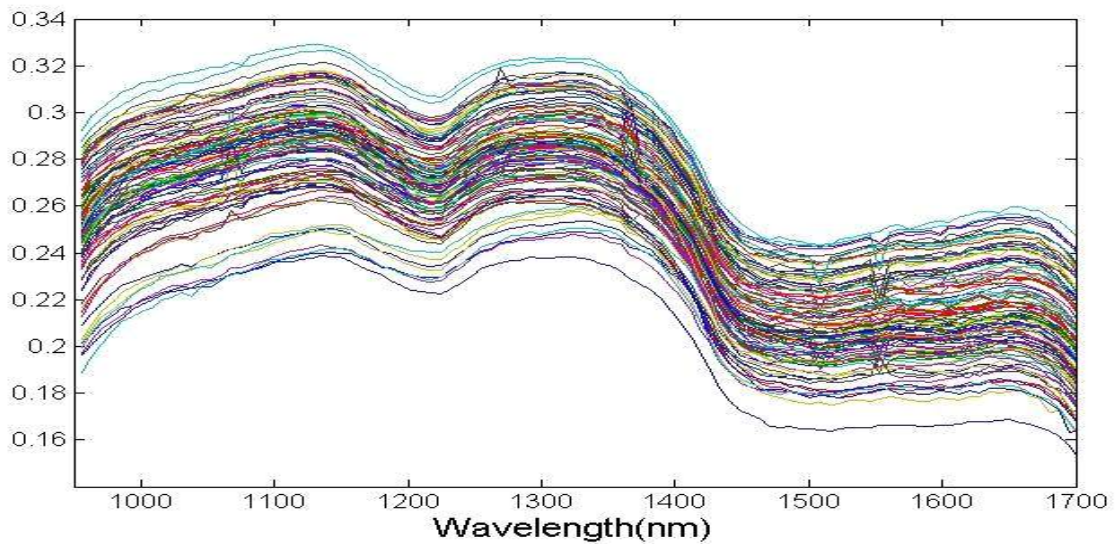


Fig. 1.46. Raw spectrum of watermelon seed of viable and non viable

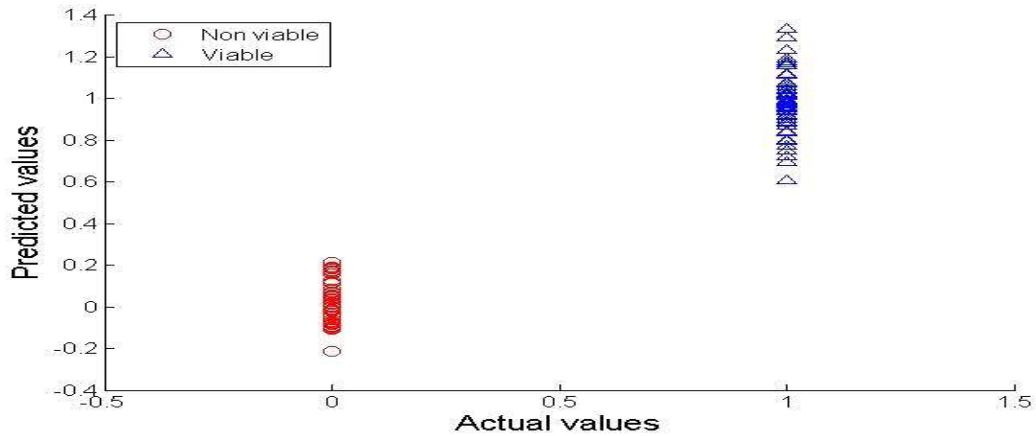


Fig. 1.47. Result of analysis of PLS-DA using watermelon seed of viable and non viable

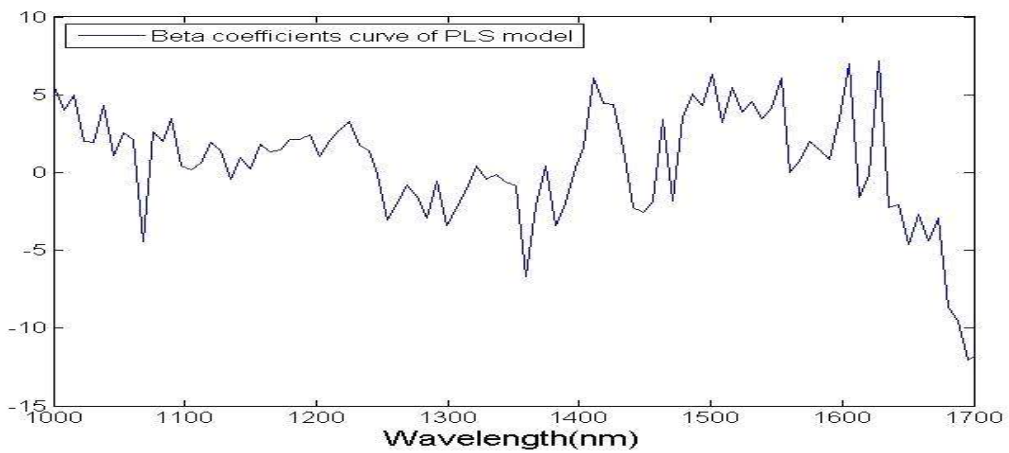


Fig. 1.48. Beta coefficient of analysis of PLS-DA using watermelon seed of viable and non viable

스펙트럼의 평균 그래프를 비교했을 때 건전종자가 퇴화종자보다 높은 것으로 나타났다. 이는 전체적으로 건전종자의 스펙트럼이 퇴화종자의 스펙트럼보다 높게 나타나는 현상을 알아볼 수 있었다. 두 그룹의 스펙트럼이 비슷한 형태로 나타났으나 beta coefficient 그래프를 통해 1068 nm, 1359 nm, 1411 nm, 1486 ~ 1553 nm 범위에서 다소 다른 양상을 나타남을 확인할 수 있었다. 이는 C-H 결합에 의한 CH₂, CH₃의 영향에 의한 것으로 판단되는데 이는 종자가 퇴화됨에 따라 유출되는 발아억제에 관련된 호르몬인 ABA (Abscisic acid), Auxin, Coumarin, NAA, MH (Maleic hydrazide) 등의 효소에 의한 영향에 의해 종자내의 화학적 특성의 변화로 인해 야기된 것으로 보인다. Table 1.68과 Table 1.69은 각각 PLS-DA 분석을 이용한 결과를 보여주며, Table 1.68은 모델의 정확도를 나타내며, Table 1.69은 모델검정 정확도를 나타낸다.

Table 1.68. Result of calibration model of analysis of PLS-DA using watermelon seed of viable and non viable

Data set		Viable seed		Non-viable seed		Total		Accuracy(%)
		correct	wrong	correct	wrong	correct	wrong	
Normalization	Mean	50	0	50	0	100	0	100.0
	Maximum	50	0	50	0	100	0	100.0
	Range	50	0	50	0	100	0	100.0
MSC		49	1	50	0	99	1	99.0
SNV		49	1	50	0	99	1	99.0
Savitzky-Golay	1st deri.	50	0	50	0	100	0	100.0
	2nd deri.	50	0	50	0	100	0	100.0
Raw		50	0	50	0	100	0	100.0

Table 1.69. Result of validation model of analysis of PLS-DA using watermelon seed of viable and non viable

Data set		Viable seed		Non-viable seed		Total		Accuracy(%)
		correct	wrong	correct	wrong	correct	wrong	
Normalization	Mean	19	3	22	0	41	3	93.2
	Maximum	19	3	21	1	40	4	90.9
	Range	16	6	22	0	38	6	86.4
MSC		17	5	22	0	39	5	88.6
SNV		17	5	22	0	39	5	88.6
Savitzky-Golay	1st deri.	22	0	22	0	44	0	100.0
	2nd deri.	21	1	18	4	39	5	88.6
Raw		20	2	22	0	42	2	95.5

· 수박종자의 PLS image 구축

추출한 각 픽셀에 대한 분석은 PLS-DA를 적용하여 판별 모델을 개발하였다. 또한 최적으로 제안된 모델의 beta coefficient를 이용하여 PLS 영상을 구성하였다. PLS 영상에 영상처리를 이용하고 임계값을 적용하여 퇴화종자 검출 알고리즘을 개발하였다. 퇴화된 종자를 검출하는 영상처리 과정은 Fig. 1.49와 같다. 최적의 파장영상을 이용하여 종자를 제외한 나머지 배경을 제거한 마스킹 이미지를 만들었다. 마스킹 영상은 종자 영역은 '1'이고 종자를 제외한 나머지 영역은 '0' 값을 가지게 된다. 이 마스킹 이미지에 건전종자와 퇴화종자를 판별하는 PLS 모델의 beta coefficient를 이용한 PLS 영상을 곱하기 연산하여 종자 이외의 배경부분을 제거하였다. 또한 PLS 모델에 의한 건전종자와 퇴화종자를 판별하는 기준을 임계값으로 적용하여 퇴화종자만 검출하는 최종 결과 영상을 얻을 수 있었다. 또한 픽셀수를 고려한 영상처리로 정확도를 높였다. 종자의 평균 크기(픽셀수)와 판별정확도를 기준으로 검출 알고리즘을 개발하였다. 종자의 평균 크기는 3시그마법에 의해 정하였다. 시그마는 통계 분석의 표준편차를 나타내는데 사용되는 기호로 평균과 표준편차는 평균에서 사용되는 가장 기본적인 방법이며, 표준편차는 분포도의 편평도를 나타내는 지표로 사용되기도 한다. 기본적인 시그마법의 경우 약 66%의 값들이 평균에서 양쪽으로 표준편차 범위에 포함되나 3시그마법은 정규분포일 경우 99.73%의 데이터를 포함한다.

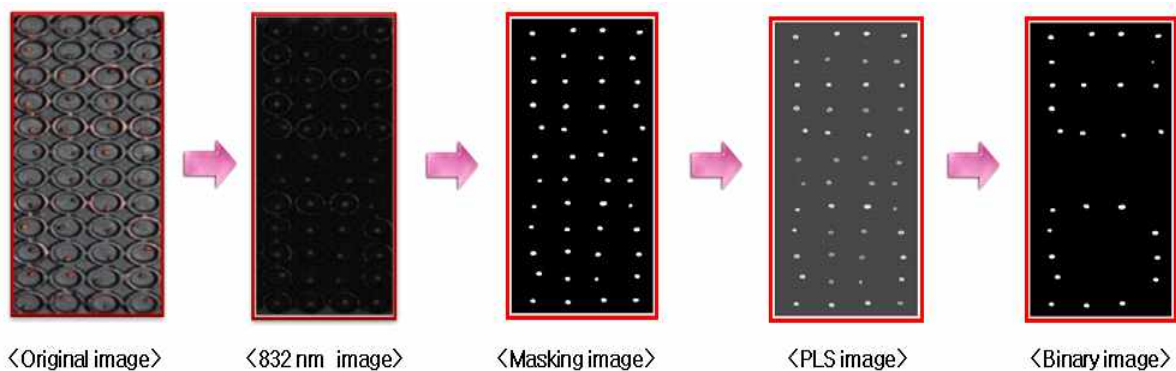
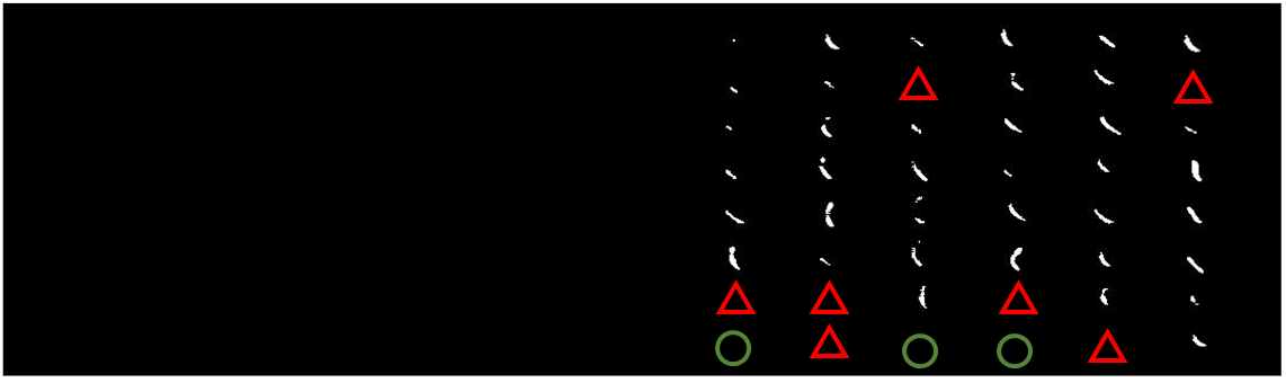


Fig. 1.49. Image processing for detecting of viable and non viable seeds.

Fig. 1.50은 PLS Image를 이용하여 수박종자의 발아종자와 비발아종자의 선별 결과를 나타낸다. PLS-DA 모델 개발 시 불발아 종자의 스펙트럼 그룹을 가상변수 '0'로, 발아 종자의 스펙트럼 그룹을 가상변수 '1'로 설정하여 모델을 개발하였다. 또한 두 그룹을 판별하기 위한 문턱값은 두 그룹의 가상변수의 중간 값인 0.5를 기준으로 하였다. 개발된 모델에 의한 예측 결과 값이 0.5보다 낮으면 불발아 종자, 0.5보다 높으면 발아 종자로 판단하였다. 따라서 불발아종자의 예측 결과 값이 '0'에 가깝고 발아 종자의 스펙트럼 예측 결과 값이 '1'에 근접할수록 모델의 판별 성능이 우수하다고 볼 수 있다. 이에 최적의 파장 1410 nm을 선정하여 배경을 제거한 Masking image를 구성하였다. 이미지에 PLS-DA 모델을 이용하여 문턱값 0.5를 사용하여 발아종자와 비 발아종자를 분류하였다. 이후 이미지의 픽셀값의 면적값을 이용하여 설정된 픽셀 이미지보다 큰 값은 통과시키고 작은 값은 통과시키는 필터를 이용하여 최적화된 도출영상을 획득할 수 있었다.



△: 오분류 (발아 중 비발아) ○: 정분류 (비발아 중 비발아)

Fig. 1.50. Result of detecting of watermelon of viable and non viable seed using PLS image

Fig. 1.50는 총 192립을 측정한 2개의 plate 중 첫 번째 플레이트의 분석 결과이다. 오분류 마킹은 건전종자이지만 검출되지 않은 미분류 된 종자를 나타낸다. 정분류 마킹은 건전종자 중 발아되지 않는 종자로 건전종자 검출에 검출되지 않은 종자를 나타낸다. 첫 번째 플레이트의 경우 첫 번째의 Plate 경우 전체 96립중 7개의 종자가 오분류 되어 94.8 %의 결과를 보였다. 두번째의 Plate 경우 전체 96립중 18개의 종자가 오분류 되어 81.3 %의 결과를 보였으며 전체 평균적으로 88.1 %의 결과를 보였다.

[제2세부과제]

세균성 과실썩음병(BFB) 방제기술 및 무균종자 처리기술 개발

1. 종자 처리기술 개발

본 과제의 최종 목표인 세균성 과실썩음병(BFB) 방제기술 확립 및 내병성 유전자원 선발을 위하여 공시재료를 확보하고, 실험용 주요기자체의 확보와 보관을 하였으며 건열처리와 습열처리 등의 실험으로 수박의 품종간의 처리온도 및 기간에 대한 유묘의 성장 반응성을 평가하였고, 다양한 과정에 따른 처리종자의 발아 및 활력변화를 조사하였다. 또한 BFB 증상발현의 최적화를 위한 다면비교평가를 하였다. 재배가 까다롭다는 삼성종묘에서 대량 구입한 3배체 ‘이편한’ 수박종자로 종피 처리에 대한 발아촉진실험과 BFB균 접종종자에서의 건열에 의한 멸균 확인실험도 수행하였다.

가. 연구 방법

(1) 수박 종자 및 종자 처리 기자체 확보

1) 공시재료의 확보

다양한 박과채소의 완숙과와 종자를 주요 종자회사를 대상으로 폭 넓게 수집하여 공시하였다 (그림 1, 2, 3).

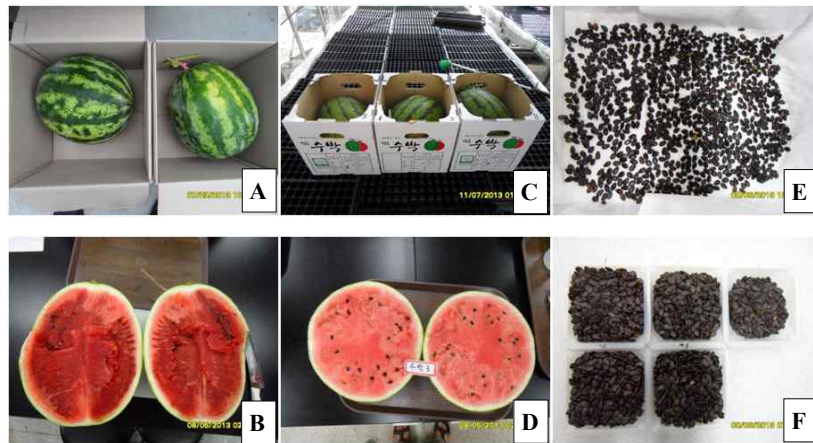


그림 1. Crimson Sweet 계의 수박 및 10일간 후숙 상태(A, B), 드래곤 수박 및 탈종종자(C, D) 및 과실별 종자 수(E, F).



그림 2. 접종한 수박과실 및 탈종전 과실; 오이 후숙과, 참의 후숙과 및 다양한 호박류의 성숙과 및 종자.

2) 3배체 수박종자의 대량 매입

국내 삼성종묘로부터 화학물질이 처리되지 않은 ‘이편한’ 3배체 수박(씨없는 수박)의 종자를 다량 구입하여 공시 중인데 이들 종자는 2013년에 중국에서 채종한 종자로 평균발아율은 60~80% 정도로서 발아방법에 따라 상당한 차이를 보였지만, 외관상으로는 매우 균일한 종자이었다(그림 3). 이들 종자의 일부도 국립원예특작과학원에서 감압 접종하여 무균처리에도 공시하고 있다(그림 4).



그림 3. 삼성종묘의 ‘이편한’ 3배체수박 종자

3) BFB $10^6 \sim 10^8$ cfu/ml 로 감압 접종한 종자 확보

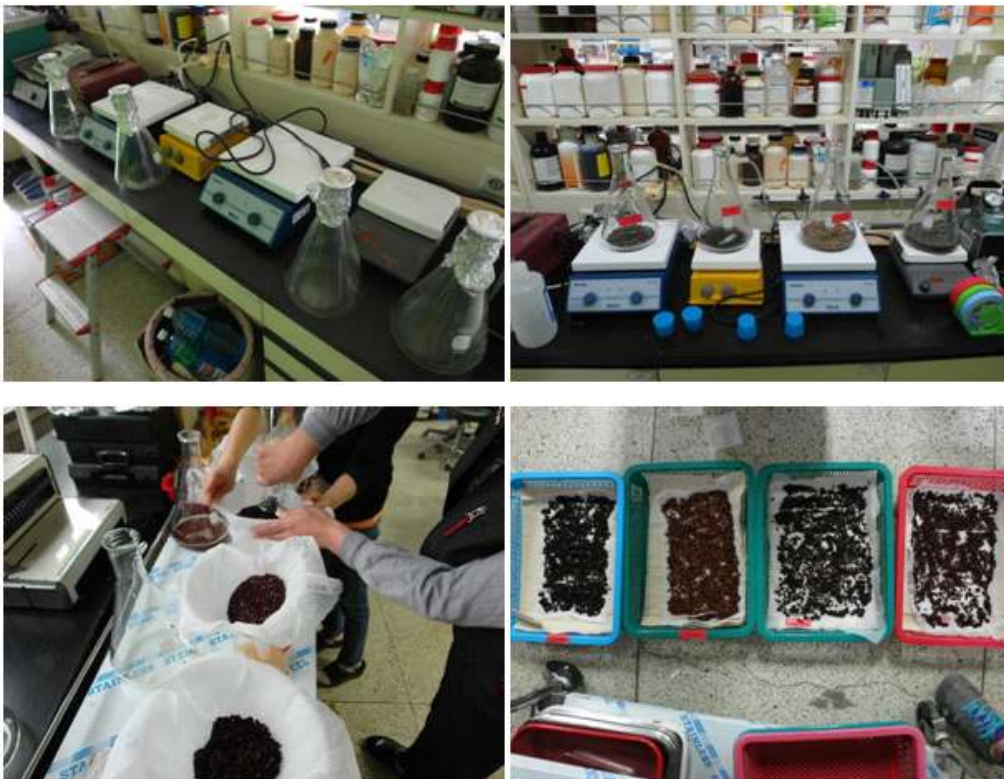


그림 4. 국립원예특작과학원에서 감압접종 중인 박과채소의 종자

(2) 실험용 주요기자재 확보 및 보완

1) TGT (다운도 발아상, Thermogradient Table)

화란의 Seed Processing Holland에서 이 기계를 구입하여 부속장치도 주문 제작하여 다양하게 사용 중에 있다(그림 5).

2) DHT(건열처리장치, Dry Heat Treatment)

보유기종 두 대 모두 control box를 95℃ 상한으로 조절하여(고려기기로 옮겨서 1개월 작업) 사용 중이다(그림 6).

3) Water bath(온탕기, 항온수조)

대전의 대덕과학에서 단계적 온도 상승 및 하강 장치를 갖춘 water bath를 주문 제작하여 습열처리용으로 공시 중에 있다(그림 7).



그림 5. 다운도발아상



그림 6. DHT control box.



그림 7. Water bath.

나. 연구 결과

건열처리기를 이용하여 처리온도 및 기간에 따른 수박의 품종간의 성장반응성과 처리종자의 발아 및 활력변화를 TGT와 사각밀폐용기(360 mL 마젠타 용기, 멸균내성 용기)를 사용하여 조사하였고 같은 조건에서 BFB 발현증상의 소멸정도를 파악하였으며, BFB 증상발현의 최적화를 위한 다면 비교, 평가를 하였다.

(1) 건열처리(대형 및 소형건열기기 이용) 에 의한 수박의 품종간의 처리온도 및 기간에 대한 성장반응성 세밀 평가 - TGT 및 사각밀폐용기 이용

2013년 10월부터 건열처리를 처리온도와 기간을 달리하여 수박의 여러 품종에 처리하였으며 건열처리 후 후숙 기간이 종자의 활력에 주는 영향에 대해서도 비교하기 위해 건열처리를 마친 종자를 4주, 8주 그리고 12주까지 실험실 상온에서 후처리하여 실험에 사용하였다. 건열처리 후 종자의 성장반응성을 평가하기 위해 TGT(다운도 발아상)와 incubator(항온기)내에 사각밀폐용기에 과중, 발아실험을 하였다.

1) 건열처리온도와 기간에 따른 수박종자의 유묘생장비교

2013년 11월 건열처리를 한 후 실온에서 4주간 후숙 처리하여 저온저장실(4°C)에서 보관 중이던 수박종자를 2014년 1월 9일 파종하여 1월 16일, 22일, 27일 3 차례 발아조사를 한 결과 75°C와 80°C에서 3일간 건열처리를 한 종자의 유묘 생장율이 높았으며 90°C에서 3일간 건열처리를 한 종자의 유묘 생장율이 가장 낮았다. 그리고 품종간의 비교에서는 큰 차이는 보이지 않았다 (표 1, 그림 8). 주요 내용을 더 구체적으로 살펴보면 다양한 건열처리조건에 따른 유묘생장 정도를 보면 후숙 4주된 종자의 파종 후 7일, 13일 및 18일에 조사한 결과에서는(표 1) 먼저 건열처리 조건에 따라서는 90°C에서 3일간 처리된 종자에서 유묘의 성장상태가 상대적으로 가장 불량하여서 과다한 고온처리에 의한 피해가능성을 보여 주었다. 그러나 85°C에서의 3일간 처리에서는 발아 초기인 파종 후 7일에는 상당히 낮았지만, 파종 후 경과실수가 길어지면서 그 억제 정도가 현저히 감소되어서 실용화에는 큰 지장이 없을 것으로 파악되었다. 각각의 처리에 대한 공시품종들의 반응성을 구체적으로 살펴보면 먼저 평균치에서 ‘삼복꿀수박’ 및 ‘원더풀꿀수박’이 매우 양호한 유묘생장을 보였던 것이 비해서 ‘삼성SS꿀수박’ 및 ‘스피드플러스꿀수박’(2013년 자가채종분)에서는 현저히 낮은 수치를 조사 말기에 까지 보여서 품종에 따른 차이가 매우 크게 나타남을 확인할 수 있었다. 그러나 이러한 품종에 따르는 차이는 특정 품종이 건열처리에 민감 또는 둔감하게 반응하고 있다고 보기 보다는 종자 자체의 충실도(채종환경이나 충실도 및 선종 기법)에 더 크게 의존하는 것으로 보는 것이 타당한 것으로 분석되고 있다. 즉, 종자충실도가 매우 좋았던 ‘원더풀꿀수박’은 90°C의 건열처리에도 크게 영향을 받지 않으면서 높은 발아율 및 유묘활력을 유지하고 있었던 반면, ‘스피드플러스꿀수박’종자에서는 90°C의 건열처리효과가 파종 후 18일까지도 강하게 나타나고 있음이 이를 뒷받침하여 주는 증거라고 할 수 있다. BFB 균을 10^6 cfu(colony forming unit)·mL⁻¹과 10^8 cfu로 접종한 ‘삼복꿀수박’에서의 발아반응은 무접종 종자와 유사하여 접종 자체(침종-접종-재건조)가 유묘생장에 영향을 끼치지 않았음이 확실하였다. BFB 증상발현에서는 10^8 로 접종한 종자에서는 유묘 단계에서부터 확실한 증상을 보였지만, 75°C에서 3일간 건열 처리된 종자에서는 극히 일부의 종자만이 매우 약한 증상을 보였으며 다른 건열 처리구(80, 85°C에서 3일간 및 75°C에서 5일간 처리)에서는 BFB 증상을 전혀 보이지 않아서 거의 완벽하게 불활성화 되었음을 보여 주었다.

2) 건열처리 유무에 따른 BFB 증상발현

BFB균 증상발현은 건열 처리된 종자에서는 육안으로는 보이지 않았으며 접종 후 건열 처리하지 않은 삼복꿀 10^6 , 10^8 cfu/mL 감압종자에서 생육후기에 BFB 증상이 발현되었으며 10^8 cfu/mL 감압종자에서는 유묘가 쓰러질 정도로 심하게 오염되었다(그림 9).

3) 건열처리 후, 후숙 기간이 유묘생장에 미치는 영향

다운도 발아상을 이용한 BFB 불활성화 건열처리에 따른 후숙 4주차와 후숙 8주차 수박종자의 유묘생장을 비교해볼 때 후숙 4주차 종자가 후숙 8주차 종자들보다 전반적으로 유묘생장상태가 더 좋았다 (표 1, 2). 다운도발아상을 이용한 BFB 불활성화 건열처리에 따른 후숙 4주 처리된 수박 종자의 유묘 생장 비교(2014). Anchor Blue Paper를 이용한 평면 open 실험(26°C).

표 1. TGT 발아상에서 Anchor Blue Paper를 이용한 후숙 처리

TGT 1월 9일 파종(후숙4주)							
1월16 조사	75°C-3D	80°C-3D	85°C-3D	90°C-3D	75°C-5D	Check	Mean
삼복꿀	2.4	2.6	1.5	1.4	2.6	2.7	2.20
삼성SS꿀	1.9	1.8	1.9	1.1	2.0	2.1	1.80
스피드꿀	1.9	2.3	2.1	1.0	2.1	1.9	1.88
원더풀꿀	2.6	2.8	2.5	2.0	2.5	2.8	2.53
삼복꿀10 ⁶	2.4	2.2	1.6	1.0	1.8	2.0	1.83
삼복꿀10 ⁸	2.5	2.6	1.6	1.1	2.5	2.3	2.10
Mean	2.28	2.38	1.87	1.27	2.25	2.30	2.06

*각각의 수치는 생장 등급별로 평가된 상대수치로, 높은 것이 양호한 상태임.

1월22 조사	75°C-3D	80°C-3D	85°C-3D	90°C-3D	75°C-5D	Check	Mean
삼복꿀	3.9	3.8	3.7	3.7	3.9	3.7	3.78
삼성SS	3.3	3.6	3.3	2.8	3.0	3.3	3.22
스피플	2.9	3.4	2.7	2.2	3.0	3.3	2.92
원더풀	3.5	3.6	3.8	3.7	3.5	3.5	3.60
삼복10 ⁶	3.8	3.4	3.3	2.9	2.9	2.9	3.20
삼복10 ⁸	3.8	3.4	3.3	2.9	2.9	2.9	3.20
Mean	3.53	3.53	3.35	3.03	3.20	3.27	3.32

1월27 조사	75°C-3D	80°C-3D	85°C-3D	90°C-3D	75°C-5D	Check	Mean
삼복꿀	3.5	3.4	3.3	3.3	3.5	3.3	3.38
삼성SS	2.9	3.2	2.9	2.6	3.1	2.6	2.88
스피플	2.5	3.3	2.2	1.8	2.9	3.3	2.67
원더풀	3.8	4.0	3.5	4.0	3.9	3.9	3.85
삼복10 ⁶	2.9	3.4	2.7	2.1	3.0	3.3	2.90
삼복10 ⁸	3.5	3.7	3.8	3.7	3.5	3.5	3.62
Mean	3.18	3.50	3.07	2.92	3.32	3.32	3.22

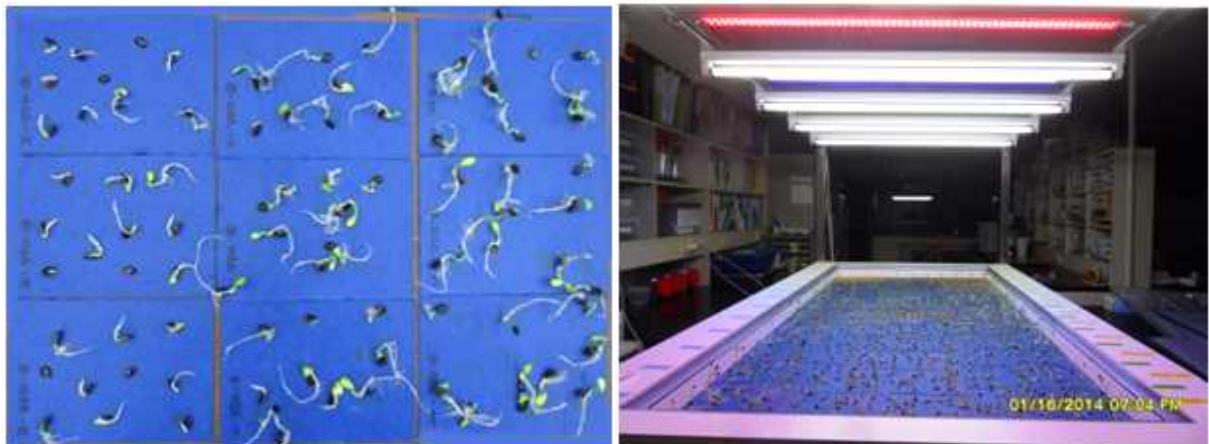


그림 8. TGT의 Blue Germination Paper를 이용한 발아 및 평가.



그림 9. TGT의 Blue Germination Paper를 이용한 발아 및 평가. 상: 건전 묘 및 하: BFB 증상 조기 발현 묘 및 증상.

표 2. 다운도발아상을 이용한 BFB 불활성화 건열처리에 따른 후숙 8주 처리된 수박종자의 유묘 생장 비교(2014). Petri dish를 이용한 평면 실험(26°C)임 (그림 10).

2월 7일 파종 (후숙 8주차)							
2월10 조사	75°C-3D	80°C-3D	85°C-3D	90°C-3D	75°C-5D	Check	Mean
삼복꿀	2.3	1.9	1.3	0.2	2.1	2.2	1.67
삼성SS	2.8	2.8	2	0.9	2.6	2.7	2.30
스피플	1.7	1.3	1.5	0.4	1	2	1.32
원더풀	3	3	2.4	1.5	2.6	2.9	2.57
삼복10 ⁶	2.2	1.8	0.8	0.1	1.8	2	1.45
삼복10 ⁸	1.8	1.8	1.2	0.1	1.9	2.2	1.50
Mean	2.30	2.10	1.53	0.53	2.00	2.33	1.80
*각각의 수치는 생장 등급별로 평가된 상대수치로, 높은 것이 양호한 상태임.							
2월13 조사	75°C-3D	80°C-3D	85°C-3D	90°C-3D	75°C-5D	Check	Mean
삼복꿀	2.2	2.1	2	1.3	2.1	2.7	2.07
삼성SS	2.1	2	2.1	1.4	2	2.2	1.97
스피플	1.5	1.3	1.5	0.8	1.2	2.2	1.42
원더풀	2.2	2	1.8	1.1	1.5	2.3	1.82
삼복10 ⁶	2.1	1.9	1.7	1.2	1.6	2	1.75
삼복10 ⁸	2	2.2	1.8	1	1.9	2.3	1.87
Mean	2.02	1.92	1.82	1.13	1.72	2.28	1.81
2월17 조사	75°C-3D	80°C-3D	85°C-3D	90°C-3D	75°C-5D	Check	Mean
삼복꿀	3	2.9	3.1	2.7	2.9	3.2	2.97
삼성SS	2.9	3.2	2.9	2.6	3	3.1	2.95
스피플	2.4	2.3	2.4	1.4	2	2.9	2.23
원더풀	3.3	3.4	2.4	3	2.8	3.3	3.03
삼복10 ⁶	2.9	2.9	2.7	2.6	2.9	2.8	2.80
삼복10 ⁸	2.8	2.9	3	2.8	2.8	2.6	2.82
Mean	2.88	2.93	2.75	2.52	2.73	2.98	2.80

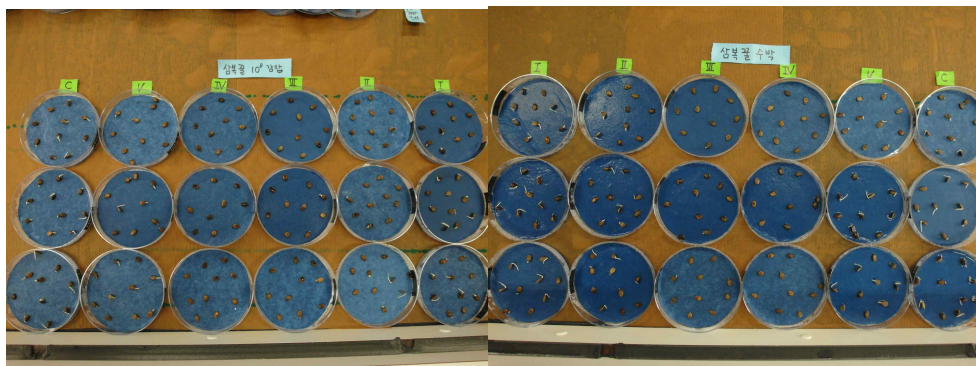


그림 10. 삼복꿀수박 종자의 BFB 접종 후 건열처리에 따른 Petri-dish 이용 종자발아 초기의 비교-균일한 초기 발아를 보였음.

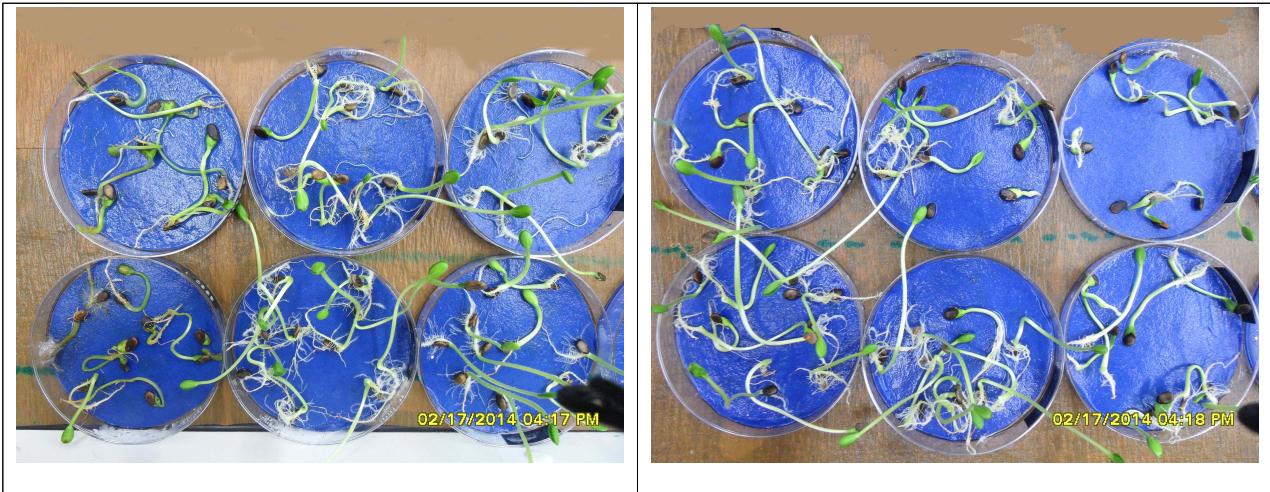


그림 11. 삼복꿀수박 종자의 BFB 접종 후 건열처리에 따른 Petri-dish 이용 종자발아 및 BFB 증상 발현 정도 비교(좌측 접종 후 무 건열처리 종자, 기타: 접종 후 건열처리 종자).

4) Incubator(항온기)내 사각밀폐 용기를 이용한 BFB 불활성화 건열처리에 따른 수박종자의 유묘생장비교

건열처리기간과 온도에 따른 유묘생장비교에서 85°C와 90°C 3일간 처리한 종자의 유묘생장 상태가 가장 안 좋았다(표 3). 그리고 건열처리 후 종자의 후숙 기간의 비교에서도 후숙 4주차 종자가 후숙 8주차 종자보다 현저히 유묘의 성장상태가 좋은 것으로 나타났다(표 3, 4). BFB 증상발현에서도 건열처리한 수박종자에서는 겉으로 전혀 나타나지 않았으나 접종 후 건열처리를 하지 않은 삼복꿀 감압종자에서는 BFB 증상이 발현되었다. 특히 10⁸ cfu/ml 감압종자에서 성장한 유묘는 심하게 오염되어 거의 쓰러져 죽을 정도로 BFB균에 심하게 감염되었다.

표 3. 3단 항온기내 사각밀폐 용기를 이용한 BFB 불활성화 건열처리에 따른 후숙 4주 처리된 수박종자의 유묘 성장 비교. 6.5 × 6.5 × 10.0 cm 의 멸균가능 플라스틱 용기 실험.

Incubator 1월 9일 과중(후숙4주)							
1월16조사	75°C-3D	80°C-3D	85°C-3D	90°C-3D	75°C-5D	Check	Mean
삼복꿀	2.4	2.1	1.1	1.0	1.6	2.7	1.82
삼성SS	1.1	1.5	0.6	0.6	1.7	1.2	1.12
스피플	0.6	0.7	0.1	0.1	0.6	0.9	0.50
윈더플	2.1	1.9	0.9	0.7	2.2	1.7	1.58
삼복10 ⁶	1.5	1.9	1.3	0.8	2.3	2.4	1.70
삼복10 ⁸	1.6	1.9	1.9	1.3	1.6	2.6	1.82
Mean	1.55	1.67	0.98	0.75	1.67	1.92	1.42

*각각의 수치는 성장 등급별로 평가된 상대수치로, 높은 것이 양호한 상태임.

1월22 조사	75°C-3D	80°C-3D	85°C-3D	90°C-3D	75°C-5D	Check	Mean
삼복꿀	3.5	4.0	3.5	3.6	3.6	3.8	3.67
삼성SS	3.6	3.5	2.9	2.1	3.1	3.3	3.08
스피플	2.3	2.2	0.6	0.5	2.3	2.1	1.67
원더풀	3.5	3.8	2.6	2.1	3.8	3.3	3.18
삼복10 ⁶	4.0	3.9	3.9	3.3	3.5	3.9	3.75
삼복10 ⁸	3.3	3.8	3.5	3.5	4.0	3.9	3.67
Mean	3.37	3.53	2.83	2.52	3.38	3.38	3.17

1월27 조사	75°C-3D	80°C-3D	85°C-3D	90°C-3D	75°C-5D	Check	Mean
삼복꿀	3.7	4.0	3.3	3.7	3.9	3.9	3.75
삼성SS	3.2	3.5	2.7	2.5	3.2	2.9	3.00
스피플	3.0	2.6	0.7	0.6	2.5	2.1	1.92
원더풀	3.5	3.9	2.5	2.7	3.8	3.4	3.30
삼복10 ⁶	4.0	4.0	3.6	3.5	3.8	3.4	3.72
삼복10 ⁸	3.5	4.0	3.5	3.3	4	3.5	3.63
Mean	3.48	3.67	2.72	2.72	3.53	3.20	3.22

표 4. 3단 항온기내 사각밀폐 용기를 이용한 BFB 불활성화 건열처리에 따른 후숙 8주 처리된 수박종자의 유묘 성장 비교 (2014).

Incubator 2월 7일 파종 (후숙 8주차)							
2월10 조사	75°C-3D	80°C-3D	85°C-3D	90°C-3D	75°C-5D	Check	Mean
삼복꿀	1.8	1.9	0.0	0.0	1.3	1.9	1.15
삼성SS	1.1	0.2	0.1	0.3	0.6	0.5	0.47
스피플	1.7	1.3	1.5	0.4	1.0	2.0	1.32
원더풀	2.1	2.2	0.5	0.5	1.1	2.2	1.43
삼복10 ⁶	2.2	1.3	0.0	0.0	1.1	1.9	1.08
삼복10 ⁸	1.8	1.8	1.2	0.1	1.9	2.2	1.50
Mean	1.78	1.45	0.55	0.22	1.17	1.78	1.16
*각각의 수치는 성장 등급별로 평가된 상대수치로 높은 것이 양호한 상태임.							
2월 13 조사	75°C-3D	80°C-3D	85°C-3D	90°C-3D	75°C-5D	Check	Mean
삼복꿀	2.3	1.7	2.9	0.5	1.9	2.7	2.00
삼성SS	1.9	0.9	0.8	0.9	1.2	1.2	1.15
스피플	0.9	0.7	0.0	0.0	0.6	0.6	0.47
원더풀	2.3	2.0	1.1	1.1	2.0	2.1	1.77
삼복10 ⁶	2.7	2.5	1.1	0.7	2.0	2.4	1.90
삼복10 ⁸	2.2	1.7	1.3	0.6	2.2	2.7	1.78
Mean	2.05	1.58	1.20	0.63	1.65	1.95	1.51

2월17 조사	75°C-3D	80°C-3D	85°C-3D	90°C-3D	75°C-5D	Check	Mean
삼복꿀	3.0	2.6	2.1	1.1	2.7	3.0	2.42
삼성SS	2.5	2.9	1.7	1.7	1.9	2.1	2.13
스피플	1.3	0.9	1.5	0.8	1.2	2.2	1.32
원더풀	2.2	0.0	0.0	0.8	0.7	2.3	1.00
삼복10 ⁶	3.1	3.1	2.2	2.2	2.8	3.1	2.75
삼복10 ⁸	2.9	2.7	2.5	1.4	2.8	2.7	2.50
Mean	2.50	2.03	1.67	1.33	2.02	2.57	2.02

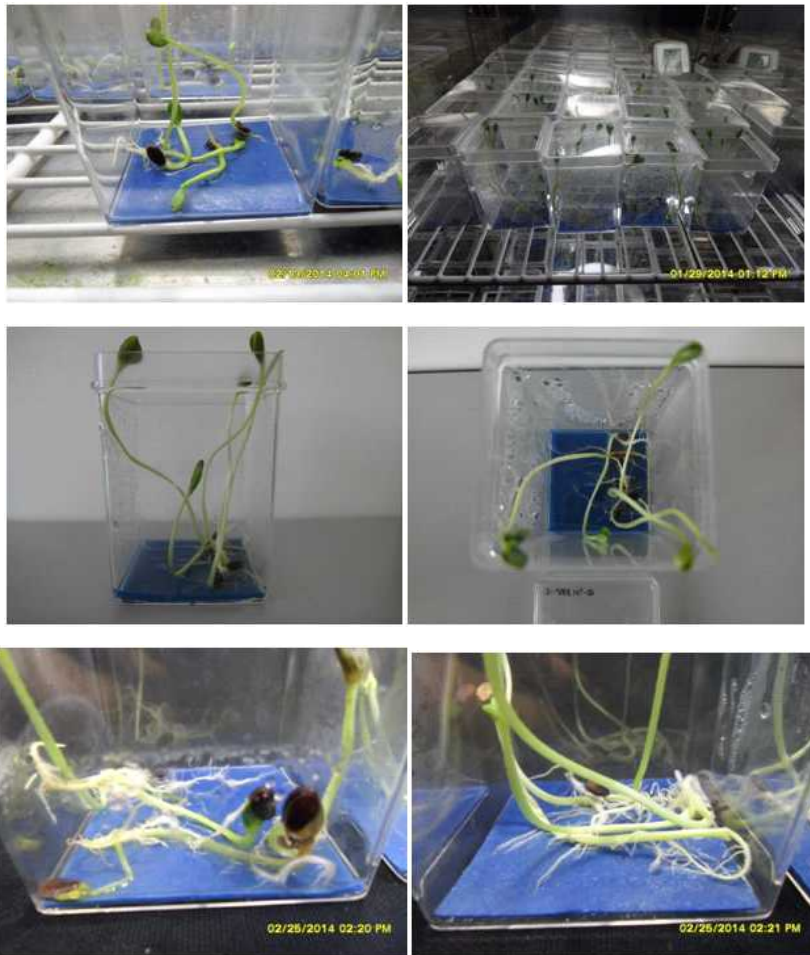


그림 12. BOD incubator에서 마젠타용기를 이용한 발아 및 BFB 증상 확인.

(2) 건열처리(대형 및 소형기기 이용)에 의한 수박의 품종간의 처리온도 및 기간에 대한 BFB 발현증상의 소멸정도 파악

이상의 실험결과는 TGT 상에서 blue germination paper를 이용하여 실험한 것이어서 실험이 진전될수록 인근 타 개체로 전이될 가능성이 있었다. 따라서 실험을 더욱 정밀을 위하여 TGT 상에 9-cm petri-dish를 이용하여 실험하였는데 후속 8주 처리된 2차실험결과를 보면(표 2) 앞서의 blue germination paper를 이용한 결과와 대동소이하였으며 병징 발현에서도 앞의 실험에서와 동등한 결과를 보여 주었다. 다만 후속 기간이 길어졌으므로 건열처리간의 오차가 다소 좁혀지기는 하였지만, 유의차라고 인정될 정도는 아니었다.

TGT 실험에 추가하여 3단 BOD incubator를 이용하여 실험한 결과를 보면(표 3) 후속 4주차의 실험에서도 역시 수박의 공시품종 및 건열처리 종류에 따른 차이가 심하게 나타났는데 이중 특히 ‘스피드풀플러스’의 종자발아 및 유효생장이 두드러지게 불량하였지만, 75°C의 건열처리에서는 3일처리나 5일처리가 큰 차이를 보이지 않아서 효과적으로 BFB 불활성화 처리가 수행되었음을 보여 주었다. 즉 8주차의 종자에서도(표 4) 유사한 결과를 보여 주었다. BFB 발병효는 접종 후, 무건 열 처리구에서만 나타났고, 건열 처리구에서는 발병개체를 보이지 않아서 효과적으로 불활성화가 이루어 졌음이 다시금 인정되기에 이르렀다.

품종에 따르는 불활성화 정도 및 여부만을 더 구체적으로 살펴보면 동일한 TGT 내에서 밀폐된 상태로 재배되었으므로 20여 일간의 재배기간 중에 다른 박으로의 전이 여부를 면밀하게 관찰하였으나, 10^6 및 10^8 cfu로 접종한 수박의 무건열처리구를 제외하면 어느 품종이나 어느 처리구에서도 BFB 증상을 보이지 않았다. 그러나 10^6 과 10^8 으로 처리하고 건열처리를 행하지 않았던 삼복꿀수박 종자에서는 10^6 처리에서는 30개체중 4개체(13%) 만이 BFB 증상을 보였던 것에 비하여 10^8 으로 접종한 종자에서는 30개체 중 22개체(73%)에서 BFB 증상이 나타나고 있었다.

BOD incubator를 이용하여 4각 밀폐용기(마젠타용기, $6 \times 6 \times 10$ cm, autoclaving 가능)에 5립씩 파종하여 실험한 결과에서도 그 정도는 다소 상이하기는 하였지만 상기 TGT 에서의 결과와 유사한 결과를 보였으며, 실험 시간중의 다른 개체로의 전이는 크게 문제시될 수 없음을 보여 주었다. 그러나 가장 약한 건열처리조건이었던 75°C 3일간 처리에서는 고농도 접종(10^8 cfu)한 종자에서도 BFB 증상이 나타나고 있어서 이 처리 수준은 경우에 따라서는 효과적인 종자 불활성화 처리로는 권장될 수 없음을 시사해 주고 있는데 이에 관하여는 더 구체적인 실험이 요청되고 있다. 많은 박과채소 종자가 과도한 고온에서는 쉽게 장애를 받으므로 위에 대한 대처 방법으로는 80°C에서의 3일 처리나 75°C에서 4-5일간 처리가 적용될 수 있을 것으로 판단되고 있다.

그러나 내열성(고온저항성)이 강한 수박을 제외한 다른 박채소의 종자를 처리하게 도는 경우에는 70-75°C 에서 5-7일간의 처리가 더 안정적일 것으로 예상되고 있다. 아울러 종자발아율이 낮고 건열처리나 각종 처리 등에 민감하게 반응하는 3배체 수박종자에서는 다른 처리가 적용될 수도 있다고 판단되고 있다. 우리나라에서의 3배체 종자의 식부면적은 5% 전후에 미치고 있으므로 크게 문제시되지는 않겠지만, 수출용으로는 이 문제를 더 적극적으로 연고하지 않으면 안될 것으로 판단되고 있다.



그림 13. TGT에서 9-cm petri-dish를 이용한 수박 품종들의 발아 반응.

1) TGI(다운도발아상) - Petri dish에 파종하여 품종간, 처리별 BFB 발현증상의 소멸정도 파악

건열 처리된 삼성SS꿀수박, 스피드플러스꿀수박, 윈더플꿀수박, 삼복꿀수박종자에서는 BFB 발현증상이 전혀 나타나지 않았으며(그림 13) 무처리구에서만 증상을 보였는데 삼복꿀 10^6 cfu/mL 감압 처리된 종자에서 BFB 증상이 4/30(13%), 10^8 cfu/mL 감압 처리된 종자에서는 22/30(73%)의 증상을 보였다(그림 14).



그림 14. 다양한 수박품종 종자의 건열처리가 유묘생육 및 BFB 집종종자의 병징 발현에 미치는 영향.

2) Incubator(항온기)내 Incu Tissue(사각밀폐용기)에 파종하여 품종간, 처리별 BFB 발현증상의 소멸정도 파악

삼복꿀 10⁶ cfu/mL 감압종자에서는 무처리(좌)구에서 5/15 개체가 약한 증상을 보였으며, 75°C, 3일 처리구(중)와 75°C, 5일 처리구(우)에서는 증상이 나타나지 않았다(그림 15). 삼복꿀 10⁸cfu/mL 감압종자에서는 무처리(좌)구에서 15/15로 강한증상을 보였으며, 75°C, 3일 처리구(중1)에서는 3/15 개체로 약한 증상을, 80°C, 3일 처리구(중2)와 85°C, 3일 처리구(우)에서는 증상이 나타나지 않았다(그림 15).



그림 15. 다양한 수박품종 종자의 건열처리가 유묘생육 및 BFB 접종종자의 병징 발현에 미치는 영향.

(3) 건열처리에 의한 수박의 품종간의 처리온도 및 기간에 대한 BFB 증상발현의 최적화를 위한다면 비교평가

1) TGT 이용 - Blue paper와 Perti-dish에 파종

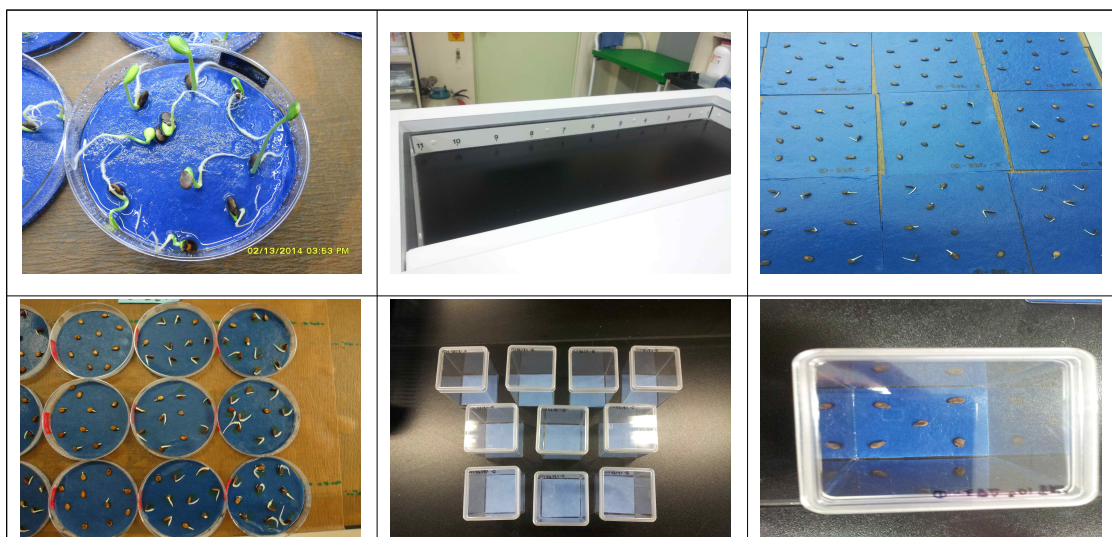


그림 16. 다양한 TGT 상에서의 발아실험 양상.

2) BOD Incubator 내 6×6×10 사각밀폐용기에서의 실험 결과는 이미 표 2와 그림 12에 보인 바 있다 (그림 17).

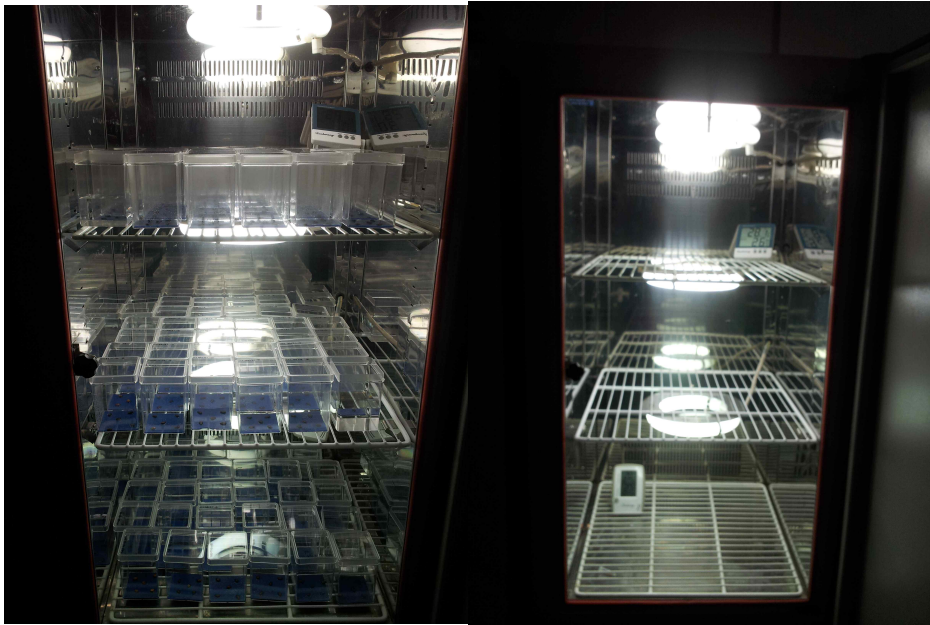


그림 17. 3단 조정된 BOD incubator 내에서 각 단에 36 용기(6 x 6)를 배치하고 각각에 blue germination paper를 1장 깔고 종자를 5립씩 치상하여 실험중인 장면.

3) 선택배지를 사용하여 각종 처리에 따른 BFB균의 성장반응비교

건열처리된 종자의 여러 발아실험에서 무처리구를 제외한 모든 처리에서 육안으로는 BFB균 발현증상이 나타나지 않았으나 선택배지에 균 배양해본결과 많은 균들이 나타났다. 여기에는 BFB균만이 아니라 다른 잡균들도 많이 나타나는 것으로 추정되며 앞으로 BFB균만을 배양시킬수 있는 배지의 선정과 배지에 추가되는 항생제의 종류와 농도에 대한 실험도 해야 할 것으로 사료된다(그림 18).

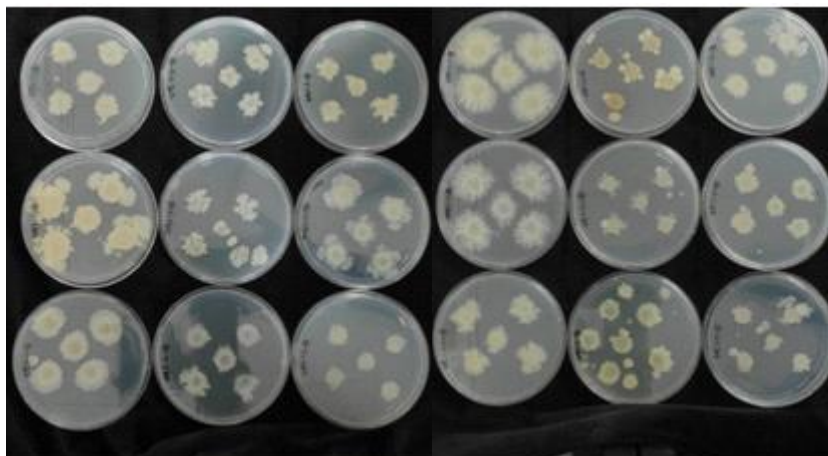


그림 18. 건열처리 전후의 배양배지에서의 BFB 추출액의 집중 효과. 좌측의 무처리에 비해 현저히 감소는 되었으나 75℃ 처리로는 완전 멸균은 되지 않고 있었음.

4) Grow-Out Tes

농우에서 분양받은 Crimson Sweet계 수박을 국립원예과학특작원에서 BFB균 과피접종, 감염시킨 종자를 채취하여 다시 농우종묘에 감염여부 및 정도관정을 의뢰한 결과(그림 19) BFB 발현 개체수가 기대한 만큼은 발현되지 않았다(그림 19). 즉, BFB 발현개체수가 접종한 종자였음에도 불구하고 매우 낮은 편이었는데 실험 당시의 외부 저온환경이 주요인이었던 것으로 판정되고 있었다.



그림 19. Grow Out Test 장면.

5) 격리온실에서 과종, 발아실험

위탁기관인 국립원예과학특작원의 격리온실내의 bench에서 고온다습의 조건에서 발아검정을 실시하였으며, BFB 병징이 나타난 잎을 채취하여 현미경으로 BFB균을 관찰하였다(그림 20).



그림 20. 과피 접종한 수박종자의 50공 cell tray 상에서의 발아 및 bfb 증상 발현과 Agdia immunostrip (BFB 진단막대)을 이용한 간이신속검정.

또한 발아된 시료를 선별하여 Agdia 진단막대로 BFB 균의 발생여부를 판정하였는데 육안으로는 보이지 않아도 균이 잠재되어있는 묘도 있는 것을 알 수가 있었다. 실제로 발병 부위를 취하여 100× 확대된 상태에서 물을 가하여 확대 관찰한 결과 수많은 BFB 균이 발병부위에서 빠른 속도로 확산해 나오는 것이 확인되었다(그림 21).



그림 21. BFB 병징이 나타난 유묘 조직에서 확대되고 있는 BFB 균.

(4) 습열처리-다양한 과정에 따른 처리종자의 발아 및 활력변화

Water bath (온탕기)를 사용하여 55℃ 와 60℃에서 60~120분간 처리하여 발아반응을 관찰하였으며, 55℃에서 90분간의 처리는 대부분의 수박종자발아에 현저한 영향을 미치지 않았다. 갖 채종한 종자의 경우는 오히려 발아에 촉진적인 영향을 미쳤다. 처리전의 흡습문제 및 처리후의 건조문제 등은 앞으로 해결해야 할 것이다(그림 22).



그림 22. 습열처리된 수박종자의 발아 상태.

(5) ‘이편한’ 3배체수박종자의 처리반응

3배체 ‘이편한’ 수박종자를 삼성종묘에서 대량 매입을 하였으나 입수한 지 오래되지 않아서 아직은 결정적인 활용성있는 결과를 요약하기에는 이르지만 여러 실험을 통하여 대체적으로 얻은 결과는 다음과 같다.

1) 종피 처리에 따른 발아촉진실험

종피의 여러 처리가 종자의 발아에 미치는 효과에 대한 실험을 하였다.

2) 침종 여부 및 시간에 따르는 종자발아

발아전 침종과 침종시간이 발아에 미치는 영향을 실험하였다.

3) BFB 균 접종종자에서의 건조에 의한 멸균확인

90℃에서 1일, 2일, 3일, 5일, 7일, 10일 동안 건조처리를 한 후 Incubator에서 발아실험을 한 결과 90℃ 7일 이상의 처리에서 멸균은 되었지만 접종농도에 따른 차이가 크게 나타났다(그림 23).



그림 23. ‘이편한’ 수박종자의 다양한 처리에 대한 종자발아 반응(현재 실험 실시 중임).

(6) 건조종자에 BFB균을 접종시에 접종효율제고를 위한 감압처리

건조한 종자에 BFB 균을 접종 시에 접종효과를 극대화하고 안정되게하기 위하여 희석액에 종자를 넣어 진동시에 감압조건을 10여 차례 주어서 종자 내부로의 균의 침입을 극대화하는 처리로 본 실험을 통해 확인되어서 차후로는 이 방법을 일률적으로 적용하고자 한다(표 5, 6, 7).

표 5. 건조종자에 접종 시 접종효율 제고를 위한 감압처리

Aspiration time	Ac density (CFU/ml)		
	5 ×*	10 ×	30 ×
1 min	2.3×10 ⁴	2.3×10 ⁵	1.4×10 ⁵
5 min	8.8×10 ³	7.1×10 ⁴	3.9×10 ⁵

* The number of times discharged

Method: Vacuum inoculation (Capacity = 30L/min)

Method: Vacuum inoculation (Capacity = 30L/min)

Inoculum density = O.D. 0.1 (600nm) = 1.2×10⁸ CFU/ml

표 6. 처리농도 및 처리시간에 따른 종자내 균 밀도.

Germination	4 DAS			7 DAS		
	5 ×*	10 ×	30 ×	5 ×*	10 ×	30 ×
1 min	56.1	50.1	41.1	57.9	62.5	57.1
5 min	75.4	58.9	58.3	78.7	62.5	66.7
Intact	87.5			90.4		

Infection efficiency	%		
	5 ×*	10 ×	30 ×
1 min	0.019	0.192	0.117
5 min	0.007	0.059	0.325

* 접종효율=접종후 종자의 균밀도/접종 균현탁액 균밀도*100

표 7. 순간감압처리횟수에 따른 종자 내 균 밀도.

Aspi. time	Discharge	균밀도(CFU/ml)					
		10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
1min	5회	-	-	2.27	-	-	-
	10회	-	-	-	2.33	-	-
	30회	-	-	-	1.40	-	-
5min	5회	-	8.80	-	-	-	-
	10회	-	-	7.07	-	-	-
	30회	-	-	-	3.93	-	-

다. 외국인 초청연사 강연 및 관련업체 연구자 및 대농민 강연회

박과채소의 과실썩음병(bacterial fruit blotch: BFB, *Acidovorax citrullii*)에 관한 적극적 대처방안 확립의 일환으로 일본에서 이 분야에 종사하면서 최근 여러 편의 영문논문도 발표한 바 있는 Kubota 박사를 초청하여 세미나를 개최하였다. 일본은 국가기관의 적극적인 대처로 BFB를 국가적 위해병해로 지정하여 “BFB-free 국가”로 인정받고 있는 상태여서 많은 정보를 얻을 수 있을 것으로 기대되었다. 세미나 장소는 국립원예과학특작원 이목동 청사 4층 대회의실에서 개최했으며 관련업체에서 많은 관심을 가지고 100여명 이상이 참석했으며 책자도 제작하여 배포하였다(그림 24).



그림 24. 일본 BFB 전문가 Dr. Kubota의 초청 강연.

2. BFB (Bacterial Fruit Blotch)균 분리·수집, 발병 형태 조사

가. 연구 방법

(1) BFB균 분리·수집, 발병 형태 조사

1) BFB균 수집 및 분리 동정

2011년부터 2014년 수박 과실썩음병에 감염된 이병식물체를 안성, 곡성, 이천, 부여 등의 지역에서 함. 재배지역별로 채집한 기주식물은 오이, 메론, 수박이며, 이들의 병징은 잎에 발생하는 수침상 병반과 줄기에 발생하는 무름 증상, 떡잎에 발생하는 수침상 반점 등임. 이들 이병식물체를 기내로 가져와 분리배양을 시도함. 이병식물체의 표면을 70% 에탄올과 1% 차아염소산나트륨으로 살균하고 멸균수로 세척함. 이 후 LB 배지에 치상하여 25°C배양기에서 배양함. 이 식물체 주변으로 배지색의 점액질 colony가 형성되면 이를 즉시 새로운 LB배지로 배양하여 보관함. 위와 같은 방법으로 다양한 작물에 발생한 과실썩음병 병징에서 분리배양을 실시하여 균주를 수집함. 2015년도 박과작물에 발생한 과실썩음병균 균주를 수집하였고, 이들의 배양학적 특성을 Luria Bertani 고체배지(LB배지)에 배양하여, 확인하고 국립원예특작과학원 병해관리연구실 균주로 등록하여 저온 저장함. 각각의 균주는 LB배지에 배양하고 세균의 colony를 이용하여 total genomic DNA를 추출하여 Total genomic DNA를 주형 DNA로 세균동정용 분자 마커는 16S ribosomal DNA 유전자 영역을 9F/1512r 프라이머 세트로 증폭, 염기서열 분석을 실시하였다.

2) 이병엽을 조사 및 줄기 고사율 조사

수박유묘를 이용하여 2014년도에 다양한 작물에서 분리한 과실썩음병균의 병원성 검정을 실시하였으며, 병원성 검정은 각각의 분리균주별로 인공접종을 위한 현탁액을 1×10^7 cfu/ml 농도로 희석하여 실험에 사용하였다. 병원성 검정에 사용한 식물체는 메론, 수박, 참외 총 3개 품종을 대상으로 실시하였다. 분리균주별 현탁액을 20주씩 재식한 수박유묘에 스프레이 접종을 실시한 후, 습실 처리는 25°C/24h 조건의 온실에 실시하였다. 접종한 식물체는 24시간이 지난 후 일반 온실조건에서 재배하면서 관찰 조사하였다. 인공접종 후 5일 이후부터 수침상 증상이 보이는 잎을 계수하여 각 시험구별로 이병엽율(%)을 조사하였다. 2015년 또한 수박, 메론에 병원성 검정을 수행하기 위해 LB배지에 배양한 균주를 접종농도 1×10^8 cfu/ml로 희석함. 수박, 메론 종자를 pot에 파종하여 5~6주간 배양한 식물체를 이용하여 병원성 검정을 실시함.

나. 연구 결과

(1) BFB (Bacterial Fruit Blotch)균 분리·수집, 발병 형태 조사

1) 과실썩음병균 균주수집 및 분리배양 실시

2011년부터 2104년 까지 다양한 작물에 발생한 과실썩음병 병징에서(그림 25) 분리배양을 실시하여 총 54개의 과실썩음병 균주를 수집하였으며, 이 중 2014년 하반기에 6개 균주를 추가로 수집하였다(표 8). 이들 분리균주를 LB배지에 배양하여 Bioneer(대전, 한국) 미생물 동정을 의뢰한 결과, 모두 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*로 동정됨. 2011년부터 농촌진흥청 국립원예특작과학원에서 수집한 과실썩음병균의 대부분은 *A. avenae* subsp. *citrulli*로 동정된 바 있어, 국내 박과작물(수박, 메론, 오이 등)에서 발생하는 과실썩음병균은 모두 동일한 종으로 확인됨(표 9). 이들 과실썩음병균 분리균주에 대한 유전학적, 계통학적 유연관계분석을 진행 중에 있음. 2015년 2개의 균주를 분리 하였으며, 수집된 균주는 16S rDNA 분석을 통하여 BFB균임을 확인 하였고 형태적으로 BFB균의 배양학적 특성인 크림색의 Colony를 확인 하였다(그림 26).

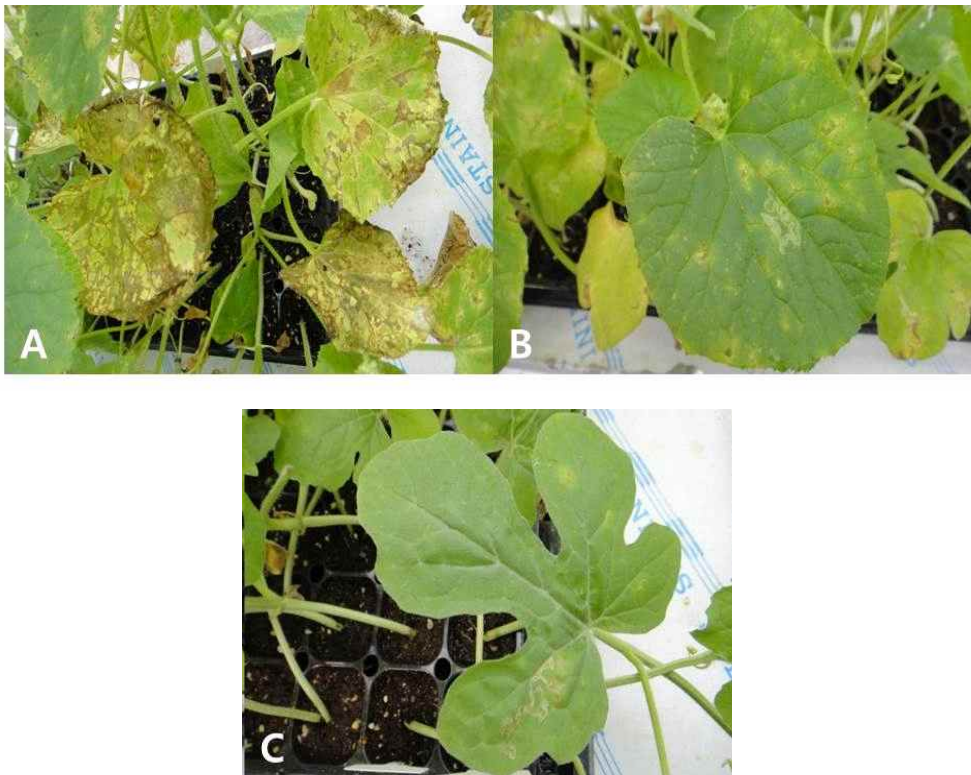


그림 25. 다양한 작물의 잎에 발생하는 과실썩음병의 병징(A: 메론, B: 참외, C: 수박)

표 8. List of Bacterial fruit blotch (BFB) species (2011~2014).

(수집된 BFB균 목록; KACC, 원예 특작원)

Strain No. and host No.	Host	Location of Isolation	Symptoms	Pathogens
Strain 1	수박	안동	대목 썩음(잎)	<i>Acidovorax valerianellae</i>
Strain 2	수박	영암	수박잎 썩음(갈변)	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 3	수박	고창	잎 점무늬	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 4	수박	부여	유묘	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 5	수박	부여	유묘	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 6	수박	논산	유묘	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 7	수박	논산	유묘	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 8	오이	안성	잎 점무늬(수침)	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 9	수박	진주	잎 반점 (유묘)	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 10	메론	곡성	잎반점 A	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 11	메론	곡성	잎반점 B	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 12	메론	곡성	잎반점 C	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 13	수박	수원	잎 수침	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 14	수박	함양	잎 수침	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 15	수박	농우	잎 점무늬	<i>Acidovorax valerianellae</i>
Strain 16	오이	안성	잎 갈변	<i>Acidovorax valerianellae</i>
Strain 17	오이	안성	잎 갈변	<i>Acidovorax valerianellae</i>
Strain 18	메론	순천	떡잎 반점	<i>Acidovorax valerianellae</i>
Strain 19	오이	논산	떡잎 수침	<i>Acidovorax valerianellae</i>
Strain 20	수박	부여	열매겉면 점무늬	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 21	수박	부여	열매 겉, 속 썩음	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 22	수박	부여	줄기 마름	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 23	수박	논산	잎 수침	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 24	오이	논산	잎 점무늬	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 25	-	KACC	16997	<i>Acidovorax valerianellae</i>
Strain 26	-	KACC	16998	<i>Acidovorax valerianellae</i>
Strain 27	-	KACC	10162	<i>Acidovorax avenae</i> sub sp. <i>avenae</i>
Strain 28	오이	영암	떡잎 둥근수침상	<i>Acidovorax konjaci</i>
Strain 29	수박	안성	잎 점무늬 수침	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 30	수박	영암	수박 잎 세균	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 31	오이	부여	오이 잎 세균	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 32	오이	영암	오이 잎 썩음	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 33	오이	안성	잎 점무늬 수침	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 34	메론	곡성	떡잎 둥근 수침상	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 35	메론	광주	잎 점무늬 수침	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 36	메론	곡성	잎 점무늬 수침	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 37	Soil	KACC	-	<i>Acidovorax</i> sp.
Strain 38	수박	KACC(여주)	-	<i>Acidovorax valerianellae</i>
Strain 39	오이	KACC(논산)	-	<i>Acidovorax valerianellae</i>
Strain 40	수박	KACC(부여)	-	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 41	수박	KACC(논산)	-	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 42	오이	KACC(안성)	-	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 43	수박	KACC(수원)	-	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 44	수박	KACC(안동)	-	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 45	수박	KACC(안동)	-	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 46	수박	KACC(안동)	-	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 47	수박	KACC(안동)	-	<i>Acidovorax citrulli</i>
Strain 48	호박종자	KACC(부산)	-	<i>Acidovorax citrulli</i>

표 9. 다양한 작물에서 분리한 수박과실썩음병균 균주 목록(2014~2016년)

No.	균주번호	기주식물	채집장소	병징	병원균
1	14-044	오이	안성	잎 수침 현상	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>
2	14-194	메론	곡성	잎 점무늬(수침)	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>
3	14-201	메론잎	광주농협육묘장	떡잎 수침, 반점	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>
4	14-202	메론	곡성	잎 수침	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>
5	14-222	수박	이천	잎 수침	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>
6	14-236	메론	부여	줄기무름, 수침	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>
7	15-1	메론	고창	잎 갈변 및 수침	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>
8	15-2	메론	부안		<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>

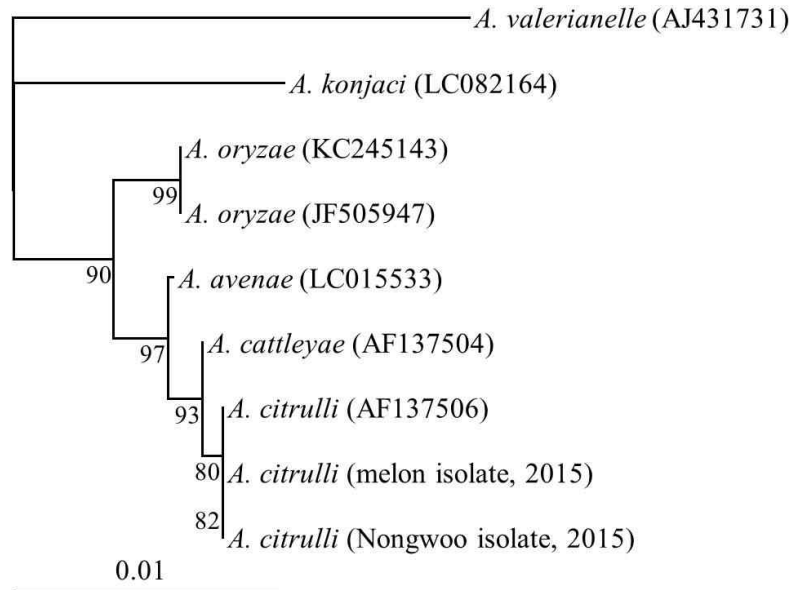


그림 26. 2015년에 확보한 과실썩음병균의 16S rDNA 유전자 염기서열을 이용한 계통학적 유연관계 분석결과

2) 수박과실썩음병균 분리균주에 대한 병원성 검정

① 이병엽을 조사

2014년에 분리한 과실썩음병균 균주 모두 병원성을 보이는 것으로 확인되었음. 이병엽율은 기주식물과 분리균주별로 다소 차이는 보였으나, 39~100%의 이병엽율을 나타냄. 기주식물별로 과실썩음병의 이병엽율이 높았던 작물은 메론>수박>참외 순임(표 10). 분리균주의 병원성에 대해 확인해본 결과, 14-194, 14-201 균주가 이병엽율의 비율이 다른 분리균주에 비해 월등히 높았으며, 메론, 수박, 참외에 모두 이병성을 띠며. 하지만 14-044, 14-236 균주의 경우 메론, 참외 등에서 이병엽율이 다른 분리균주에 비해 낮게 나타남(그림 27).

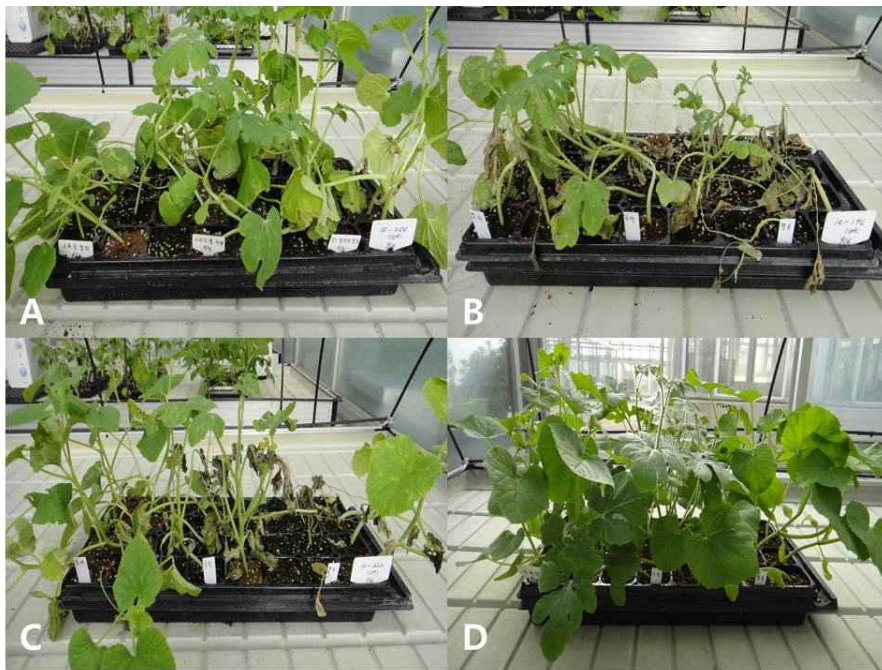


그림 27. 과실썩음병균 분리균주별 병원성 검정결과
(A: 14-044, B: 14-194, C: 14-222, D: 무처리)

표 10. 분리균주별 병원성 검정 결과

No.	접종균주	이병엽률(%)			병원성정도
		메론	수박	참외	
1	14 - 044	39.0	61.1	44.7	약
2	14 - 194	100.0	97.5	100.0	강
3	14 - 201	100.0	100.0	100.0	강
4	14 - 202	100.0	81.6	84.8	중
5	14 - 222	92.3	100.0	59.1	중
6	14 - 236	100.0	93.8	52.5	약

② 줄기 고사율 조사

수박, 메론, 참외의 기주식물에 접종한 과실썩음병균 분리균주별 줄기 고사율을 조사한 결과, 이병엽율이 높았던 14-194, 14-201 분리균주의 고사율이 매우 높게 나타남. 특히, 메론은 100% 고사하는 것으로 나타났으며, 수박이 12.5~37.5%, 참외가 12.5~50%의 고사율을 보임. 기주식물별로 줄기 고사율을 비교해보면 메론의 경우 14-044 균주를 제외한 모든 균주에 쉽게 감염되는 것으로 나타났으며, 수박, 참외의 경우 일부 균주에서는 줄기 고사율이 없었음. 과실썩음병균 분리균주 중 이병엽율이 낮았던 14-044, 14-236 분리균주의 고사율은 0~12.5%로 다른 분리균주에 비해 매우 낮게 나타남(표 11).

표 11. 분리균주별 줄기 고사율 검정 결과

No.	집중균주	줄기 고사율(%)			병원성
		멜론	수박	참외	
1	14 - 044	0	0	0	약
2	14 - 194	100.0	37.5	50.0	강
3	14 - 201	100.0	12.5	12.5	강
4	14 - 202	25.0	0	0	중
5	14 - 222	62.5	25.0	0	중
6	14 - 236	12.5	0	0	약

③ 수집된 과실썩음병원균 대한 병원성 검정 2차

2015년 수집한 BFB균의 병원성을 알아보기 위하여 수박(슈퍼꿀수박)을 이용하여 수박과 멜론 종자를 POT에 파종하여 병원성 검정 결과, 접종 앞에서 과실썩음병의 전형적인 수침상증상과 함께 갈변, 고사증상이 확인되었고, 2015년도 2가지 균주 모두 병원성이 있는 것으로 확인됨(그림 28).

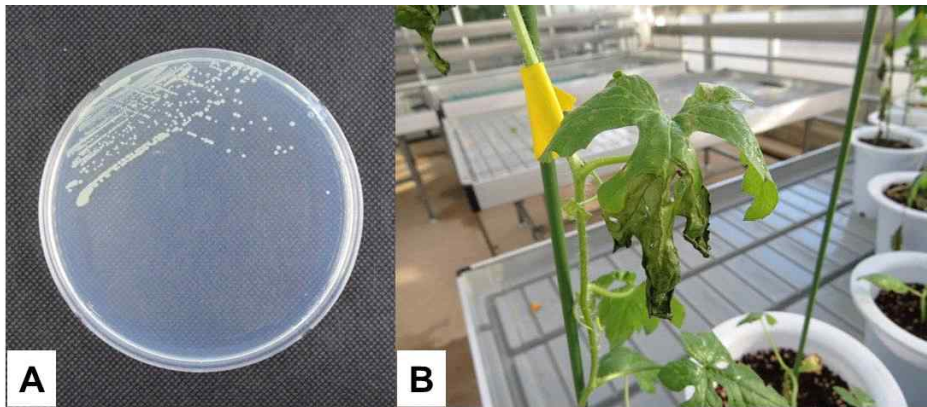


그림 28. 2015년도 분리균주를 이용한 병원성 검정 결과(A: 멜론 분리균주, B: 병원성 검정-수박)

3. BFB (Bacterial Fruit Blotch)균 유전 분석 및 유전체 분석

가. 연구 방법

(1) 사용균주 및 DNA 분리(1, 2, 3차 검정)

2011년부터 2016년까지 전국의 주요 박과 작물인 오이, 수박, 멜론 재배지역의 병든 식물체들로부터 수집하여 분리한 *A. citrulli* 29균주(2011~2014년) (표 8), 2015~2016년 추가 분리균주 5개 균주(표 12)를 Nutrient agar 또는 King's B 배지에 배양하여 글리세롤에 현탁한 후, -70°C로 유지된 초저온고에 보관하며 사용하였다. 유전적 다양성 분석을 위한 공시균주로 사용하기 위해서 접종원 농도(10^6 - 10^7 cfu/ml)를 조절하여 수박 유묘에 인공접종 후 병원성을 확인하였으며, 공시균주의 DNA는 DNeasy Tissue Kit (Quigen)을 이용하여 추출했다. 또한 국내에서 수박의 잎에서 발생이 보고된 *A. valerianellae* (12027, 수박)와 오이에서 발생되었지만 수박에서도 병 발생 가능성이 예상되는 *A. konjaci* (13024, 오이)의 수박유묘에 대한 줄기 상처 접종을 통해 병원성을 확인하여 본 실험에 공시하였다.

표 12. 2015 - 2016년 한국에서 추가 수집된 *Acidovorax* sp. 균주

Isolate	Year	Host	Geographic origin
15047	2015	melon	Goksung, Jeonnam
15280	2015	melon	Goksung, Jeonnam
17001	2012	watermelon	Nonsan, Chungnam
15200	2015	watermelon	-
16-088	2016	watermelon	Anseong, Gyeonggi

(2) 유연관계 분석(1, 3차 검정)

16S rRNA (1314bp) 유전자의 증폭은 27F와 1525R를 사용하였으며 *adk* (437bp), *gltA* (489bp), *glyA* (565bp), *pilT* (405bp)의 유전자 증폭을 위해 기존에 보고된 primer set을 활용하여 개별적인 유전자의 염기서열은 물론 총 3210bp 길이의 DNA 염기서열을 분석하였다. 각각의 유전자 영역은 primer 0.5pmol, 2ng의 genomic DNA, 0.2mM dNTP, 10mM Tris-HCl, 50mM KCL, 1.5mM MgCl₂, 2.5unit의 Taq DNA polymerase에 멸균수를 첨가하여, 최종 volume을 50ul로 한 후 Table 3의 조건으로 PCR을 수행하였다. 모든 PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동 하고 ethidium bromide로 염색하여 증폭 여부와 그 크기를 관찰하였다. 증폭된 PCR 산물은 Solgent PCR Purification Kit으로 정제하고, Genotech Co., Ltd.에 sequencing을 의뢰한 후, National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)를 이용하여 DNA 데이터베이스와 유사한 염기서열을 비교하였다. 염기서열은 MEGA 5를 이용하여 정렬하였고 1,000회의 bootstrap 분석을 통해 신뢰도를 평가하였으며 불분명하게 정렬된 부분은 분석에서 제외하였다(표 13, 14).

표 13. PCR primer 및 gene sequence

Gene name	Gene function	Primer sequences (forward/reverse)	Gene length (bp)
16s rRNA	16s rRNA	27F: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 1525R: AAGGAGGTGWTCCARCC	1314
<i>adk</i>	Adenylate kinase	adk1: GTTGGCCGGATCGTTCT adk2: TCCGCAGATCTCCACCG	437
<i>gltA</i>	Type II citrate synthase	gltA1: GAAGTCCACGTTTCGGGTAGA gltA2: TACATGTACCCGCAGAACCA	489
<i>glyA</i>	Serine hydroxymethyl transferase	glyA1: AACAAAGCCGATCCCGAAGT glyA2: GGCGATGTCCACCCAGAAG	565
<i>pilT</i>	Twitching motility protein	pilT1: GAGTACATCTGCGCCACCTT pilT2: GAATACGGGCACATCCTGAC	405

표 14. PCR 조건

Primer	Initial denature	Step cycles				Final extension
		Denature	Annealing	Extension	Cycle	
16s rRNA	95°C/5min	94°C/30sec	55°C/30sec	72°C/90sec	35	72°C/5min
Other genes	95°C/5min	95°C/30sec	60°C/30sec	72°C/30sec	30	72°C/5min

(3) Multi-locus 유전분석(2차 검증)

16s RNA, *gmc*, *lepA*, *trpB*, *adk*, *gltA*, *glyA*, *pilT*, *phaC*, *ugpB*의 유전자 증폭을 위해 기존의 연구에서 활용된 primer set을 활용하여 DNA 염기서열을 분석하였다(표 15). 각각의 유전자 영역의 DNA 염기서열을 얻기 위해 각각의 primer 0.5 pmol, 20-50 ng의 genomic DNA, 0.2 mM dNTP, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCL, 1.5 mM MgCl₂, 2.5unit의 Taq DNA polymerase (Toyobo)에 멸균수를 첨가하고 최종 volume을 50 µl로 맞추는 후 PCR을 수행했다. PCR 반응 조건으로 denaturation은 95°C에서 5분간 반응 후 cycle에서 94°C 30초, annealing은 60°C에서 30초, 합성은 72°C에서 90초로 총 35회 반복하였으며 최종 DNA 합성은 72°C에서 5분을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 솔젠트사의 PCR Purification Kit으로 정제하고, (주)제노텍에 sequencing을 의뢰한 후 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)를 이용하여 DNA 데이터베이스와 유사한 염기서열을 비교하였다(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). 또한 *gltA*, *phaC*, *pilT*, *ugpB* 등의 염기서열을 이용한 multi-locus 유연관계 분석을 위해 대조로 *A. citrulli* 2균주(ATCC29625; group I, AAC00-1; group II)와 *A. avenae* subsp. *avenae* (ATCC19860), *A. facilis* (ATCC11228) 그리고 *A. konjaci* (ATCC33996), 등의 기존에 밝혀진 DNA 염기서열들을 NCBI site로부터 얻어 활용하였다. 염기서열은 MEGA5를 이용하여 정렬하였고, 1,000회의 bootstrap 분석을 통해 신뢰도를 평가하였으며, 불분명하게 정렬된 부분은 분석에서 제외하였다.

표 15. Primer sequences for multi-locus phylogeny analysis

Gene	Gene function	Primer sequences (forward/reverse)	length (bp)
16s rRNA	16s ribosomal RNA	27F: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 1525R: AAGGAGGTGWTCCARCC	1314
adk	Adenylate kinase	adk1: GTTGGCCGGATCGTTCT adk2: TCCGCAGATCTCCACCG	437
gltA	Type II citrate synthase	gltA1: GAAGTCCACGTTCCGGGTAGA gltA2: TACATGTACCCGCAGAACCA	487
glyA	Serine hydroxymethyl transferase	glyA1: AACAAAGCCGATCCCGAAGT glyA2: GCGATGTCCACCCAGAAG	563
pilT	Twitching motility protein	pilT1: GAGTACATCTGCGCCACCTT pilT2: GAATACGGGCACATCCTGAC	405
gmc	Glucose-methanol-choline oxidoreductase	gmcF: TGGTTGACCTCGAAATAGCC gmcR: TTTCGACTTCATCGTCATCG	543
ugpB	Extracellular solute-binding protein, family 1	ugpBF: TGAAGGAAATCTCGGTCGTC ugpBR: CTTGACGTCGTTGCTGAAGA	452
lepA	GTP-binding protein	lepAF: GATCGACACGCCCGGACAC lepAR: TGATGTAGCCACCTCGCC	489
trpB	Tryptophan synthase subunit beta	trpBF: GCCACTTCGGCCGCTATG trpBF: CCTCGTTGAGCGCATCCTT	439
phaC	Poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase, class I	phaCF: ATCGCCAACCTGCTGCAC phaCR: GAACGTGGTGAGGAAGGTGG	431

(4) DNA 염기서열 분석(2차 검정)

adk, gltA, glyA, pilT, ugpB, gmc 유전자의 염기서열들은 모두 KCC1과 KCC2 그룹별로 모두 동일하였으므로 각 그룹을 대표하는 11248, 12158, 14202 (KCC1)와 13034, 13255, 17913, 14236 (KCC2) 균주들에 대해서만 GenBank에 등록하였다. 하지만 그룹별 특성이 나타나지 않았던 phaC 유전자의 염기서열들은 모든 공시균주들에 대해 GenBank accession 번호를 각각 부여 받았다. 또한 lepA, trp 유전자의 경우 모든 균주들의 염기서열이 동일하게 나타나 각기 그룹별로 대표적인 11248과 13034 균주들의 염기서열만 등록하였다.

(5) RAPD analysis (2차 검정)

URP 2, 5, 6, 8 primers (JK bio Tech.), BOXA1R and ERIC primers를 이용한 유전자 증폭을 위해 기존의 연구에서 활용된 primer set을 활용하여 DNA 염기서열을 분석하였다. 각각의 유전자 영역의 DNA 염기서열을 얻기 위해 각각의 primer 0.5 pmol, 20-50 ng의 genomic DNA, 0.2 mM dNTP, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCL, 1.5 mM MgCl₂, 2.5 unit의 Taq DNA polymerase (Toyobo)에 멸균수를 첨가하고 최종 volume을 50 µl로 맞춘 후 PCR을 수행했다. PCR 반응 조건으로 denaturation은 95°C에서 5분간 반응 후 cycle에서 94°C 30초, annealing은 60°C에서 30초, 합성은 72°C에서 90초로 총 35회 반복하였으며 최종 DNA 합성은 72°C에서 5분을 수행하였다. PCR 핵산지문 분석은 URP -PCR 핵산지문 Kit (JK BioTech.)에서 구입하여 제공된 프로토콜에 준하여 수행하였다. PCR 수행은 위에 기술된 방법과 동일하였으며, PTC-200 (MJ. Reasearch사)

의 PCR기기를 이용하여 처음 DNA변성을 위하여 94°C에서 5분간, 그 후 cycle에서 DNA변성은 94°C에서 1분, annealing은 55°C에서 1분 및 DNA합성은 72°C에서 2분으로 총 36 cycle을 실시하였으며, 최종 DNA합성은 5분으로 하였다. 증폭된 PCR 산물은 TBE 완충액(45mM Tris-borate, 1mM EDTA pH 8.0) 에 녹인 2%의 agarose gel에 loading한 후 50 vol/cm로 전기영동 한 후 UV lamp하에서 DNA밴드를 확인하였다. URP-PCR 다형성밴드를 유무로 하여 database 한 후 유사도 (similarity coefficient)를 산출하고, Dendrogram은 위의 유사도의 값을 근거로 UPGA (unweighted paired group methods with arithmetic average)법을 이용 작성 하였다. 유연관계분석을 위한 program은 Ntsys (numerical taxonomy system using multivariate statistical programs Ver. 1.60) 을 이용 하였다.

(6) 종 특이적 primer 선발

1) *A. citrulli* 대상 종 특이적 프라이머 선발 및 민감도 확인

*A. citrulli*를 대상으로 하는 종 특이적 프라이머를 선발하기 위해 선행연구에서 *A. citrulli*, *A. konjaci*, *Acidovorax avenae subsp. avenae*의 gmc 유전자 영역의 시퀀스를 분석한 결과(표 16)와 GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov>)를 통해 얻어진 DNA 염기서열 정보를 이용하였다(*Acidovorax valerianellae* : EU928172, *Acidovorax konjaci* : EU928115). 종 특이적 primer를 설계하기 위해 Primer3 프로그램과 Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu>) 를 이용하였다. Primer는 모두 내부에 hairpin을 형성하지 않으면서 primer들 사이에서 dimer나 internal loop가 형성되지 않도록 설계하였다.

선발된 종 특이적 primer set의 특이성을 확인하기 위하여 4종의 *Acidovorax* 속 균주들과 그 외 6종의 식물병원균을 대상으로 conventional PCR 및 SYBR Green I real-time PCR을 수행하였다(표 16, 17). Conventional PCR의 반응액은 10ng의 template DNA와 0.5 pmol의 primer, 800 mM NTP, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, Taq polymerase 1unit을 첨가하여 총량은 20μl로 조성하였으며 모든 conventional PCR의 증폭조건은 표 18와 같다. PCR 증폭 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동 하고 ethidium bromide로 염색하여 증폭 여부와 그 크기를 관찰하였다. Real-time PCR의 반응액은 Bio_RAD사의 iQTM SYBR Green I Supermix를 첨가하고 template DNA 2 μl와 각각의 primer를 0.5 pmol로 사용하여 총량 20 μl로 조성하였다. Real-time PCR의 증폭조건은 표 18와 같다. 또한 프라이머의 민감도를 확인하기 위해 각 균주로부터 추출한 DNA를 10배씩 희석하여 위와 같은 조건으로 real-time PCR을 시행하였다.

표 16. Primer 제작에 사용한 *Acidovorax* 속 균주들

Isolate	Species	Host	Group	PhaC
11171	<i>Acidovorax citrulli</i>	cucumber	KCC2	G
11247	<i>Acidovorax citrulli</i>	melon	KCC1	A
11147	<i>Acidovorax citrulli</i>	watermelon	KCC2	A
11162	<i>Acidovorax citrulli</i>	watermelon	KCC2	G
12027	<i>Acidovorax valerianellae</i>	watermelon	-	-
12063	<i>Acidovorax valerianellae</i>	melon	-	-
12066	<i>Acidovorax valerianellae</i>	cucumber	-	-
12318	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	melon	-	-
13024	<i>Acidovorax konjaci</i>	cucumber	-	-

표 17. 본 연구에서 사용한 식물병원균

Isolate	Origin
<i>Phytophthora capsici</i>	CNU
<i>Botrytis cinerea</i>	CNU
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	KACC 14004
<i>Xanthomonas oryzae</i>	KACC11143
<i>Burkholderia glumae</i>	KACC 15506
DNA in soil	CNU

표 18. PCR 조건

PCR	Initial denature	Step cycles			Cycle	Final extension
		Denature	Annealing	Extension		
Real-time PCR	95°C/3min	95°C/30sec	63°C/20sec	72°C/20sec	40	-
Conventional PCR	95°C/3min	95°C/30sec	63°C/20sec	72°C/20sec	35	72°C/5min

2) *A. valerianellae*, *A. konjaci* 종 특이적 primer 선발

수박에서도 병을 일으킬 것으로 판단되는 *A. valerianellae*와 *A. konjaci*를 대상으로 종 특이적 프라이머를 선발하기 위해 *A. citrulli*, *A. valerianellae*, *A. konjaci*, *A. avenae* subsp. *avenae*의 *gltA*, *PilT* 유전자 영역들의 DNA 염기서열들을 비교분석한 결과와 GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov>)를 통해 얻어진 DNA 염기서열 정보를 이용하였다(*A. avenae* subsp. *avenae* : EU928070, EU928481. *A. konjaci* : EU928012, EU928423). 또한 종 특이적 primer를 설계하기 위해 Primer3 프로그램과 Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu>)를 이용하였다. Primer는 모두 내부에 hairpin을 형성하지 않으면서 primer들 사이에서 dimer나 internal loop가

형성되지 않도록 설계하였다. 선발된 각각의 종 특이적 primer set들의 특이성을 확인하기 위하여 4종의 *Acidovorax* 속 균주들과 기타 식물병원균주들을 대상으로 conventional PCR 및 SYBR Green I real-time PCR을 수행하였다. Conventional PCR의 반응액은 10ng의 template DNA와 0.5 pmol의 primer, 800 mM NTP, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, Taq polymerase 1unit을 첨가하여 총량은 20 µl로 조성하였으며 모든 conventional PCR의 증폭조건은 표 18과 같다. PCR 증폭 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동 하고 ethidium bromide로 염색하여 증폭 여부와 그 크기를 관찰하였다. Real-time PCR의 반응액은 Bio_RAD사의 iQTM SYBR Green I Supermix를 첨가하고 template DNA 2 µl와 각각의 primer를 0.5 pmol로 사용하여 총량 20 µl로 조성하였다. Real-time PCR의 증폭조건은 표 18과 같다.

3) 식물체로부터 균 검출

제작한 프라이머로 이병식물체로부터 세균 검출이 가능한지 확인하기 위해 Nutrient broth에 *A. citrulli* 균주를 진탕 배양기에서 5일간 배양한 후 접종원 농도를 조절하여 수박 유묘에 분무 접종 하였다. 그 후 병징이 나타난 잎을 NaOCl 1%로 표면소독하고 검출 민감도를 높이기 위해 마쇄한 후 nutrient broth와 D.W에서 각각 1시간씩 진탕 배양하였다. 이어서 각각의 배양액 2 µl와 Bio_RAD사의 iQTM SYBR Green I Supermix를 첨가하고 각각의 primer를 0.5 pmol로 사용하여 총량 20 µl로 조성한 후 real-time PCR을 실시하였다.

(7) 수박과실썩음병 유전체 분석

국립원예특작과학원에서 보유중인 과실썩음병균 11-251 균주를 이용하여 과실썩음병균에 대한 유전체 분석을 실시함. LB고체배지에 일주일간 배양한 과실썩음병균 11-251 균주의 total genomic DNA를 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN사)를 통해 추출하고, 추출된 total genomic DNA의 정제도를 높이기 위해 동일한 추출키트로 1회 더 정제함. 최종 추출된 total genomic DNA는 흡광도 측정을 통해 1 µl당 100 ng의 농도 확인되었고, 이 산물을 70 µl (최종 농도 : 7,000 ng)를 솔젠트사(주)로 전달하여 유전체 분석을 의뢰함.

(8) 수박과실썩음병 발생조사 및 토양 내 생존유무 검정

2015년도에는 수박 과실썩음병의 발생생태를 6월과 7월에 걸쳐 2회 전북 고창, 전북 부안지역을 대상으로 농가 포장을 대상으로 조사하였으며, 이들 지역의 노지, 하우스 수박재배지역에서 토양샘플을 채취하여 토양 내 과실썩음병의 존재여부를 간이조사를 위하여 각각의 토양을 수집하여 증류수에 희석하여 BFB균 검정 kit를 이용하여 토양내의 BFB균의 생존 여부를 확인하였다.

(9) 박과작물에 대한 과일썩음병균 균주별 교차병원성 검정

2016년도 채집한 박과류에 발생하는 과일썩음병균 중 *Acidovorax citrulli*와 *A. valerianellae* 2종이 박과작물에서 과일썩음병을 일으키는 것으로 확인됨. 대부분 수박에서는 *A. citrulli*가 우

접하였고, *A. valerianellae*는 메론에서 발생하였음. 하지만 육묘단계에서는 박과류들이 대부분 동일한 육묘장에서 육묘가 되고 있으므로, 이들 세균병해가 박과류에 대해 교차 감염이 이뤄질 수 있다고 추측됨. 따라서, 박과류에서 분리한 세균 2종으로 수박, 오이, 메론 육묘에서 교차병원성을 검정함. 2종의 *Acidovorax* spp. 분리 균주를 3종의 박과작물(오이, 수박, 메론)에 대해서 병원성을 검정함. 우선 LB 액체배지에 이들 균주를 각각 배양하고, 접종농도를 1×10^8 cfu/ml로 희석함. 이 후 수박, 메론, 오이육묘(정식 후 5~6주)에 주사기를 이용하여 잎의 뒷면 기공으로 세균현탁액을 주입함. 인공접종을 마친 육묘들은 포화습도가 99% 이상인 비닐온실에서 24시간 방치하였다가, 25°C 온실에서 생장시킴. 인공접종 3일 후부터 각각의 식물체에 대해 병원성 발현 유무를 조사함.

나. 연구 결과

(1) 유연관계분석 1차 검정

전국의 주요 박과 작물 재배 지역으로부터 수집된 44개 *Acidovorax* 속의 유사 균들에 대한 종 동정을 위하여 16S rRNA (1314bp)에 대한 염기서열 분석을 실시하였다. 염기서열 중 불분명하게 정렬된 부분을 제외하고 얻어진 것들을 이용해 blast 분석을 수행한 결과 수박과 멜론 그리고 오이와 호박으로부터 분리된 33개의 *A. citrulli* 균주들과 오이, 수박, 멜론으로부터 1개의 *A. avenae*, 2개의 *A. konjaci* 그리고 8개의 *A. valerianella*가 동정되었으며, *A. valerianella*의 경우는 수박, 멜론, 오이 등에서 폭넓게 분리되었다(표 19, 20).

㉟ 19. *Acidivorax citrulli* and *Acidivorax* spp. isolated from cucurbit fields in Korea

Strains	Species	Year	Host	Geographic origin	Group
11073	<i>A. citrulli</i>	2011	watermelon	Yongam, Jeonam	KCC2
11147	<i>A. citrulli</i>	2011	watermelon	Gochang, Jeonbuk	KCC2
11162	<i>A. citrulli</i>	2011	watermelon	Buyeo, Chungnam	KCC2
11163	<i>A. citrulli</i>	2011	watermelon	Buyeo, Chungnam	KCC2
11164	<i>A. citrulli</i>	2011	watermelon	Nonsan, Chungnam	KCC2
11165	<i>A. citrulli</i>	2011	watermelon	Nonsan, Chungnam	KCC2
11171	<i>A. citrulli</i>	2011	cucumber	Nonsan, Chungnam	KCC2
11201	<i>A. citrulli</i>	2012	watermelon	Jinju, Gyongnam	KCC2
11246	<i>A. citrulli</i>	2012	melon	Gohksung, Jeonam	KCC1
11247	<i>A. citrulli</i>	2012	melon	Gohksung, Jeonam	KCC1
11248	<i>A. citrulli</i>	2012	melon	Gohksung, Jeonam	KCC1
11251	<i>A. citrulli</i>	2012	watermelon	Suwon, Gyeonggi	KCC2
11259	<i>A. citrulli</i>	2012	watermelon	Hamyang, Gyeongnam	KCC2
12089	<i>A. citrulli</i>	2012	watermelon	Buyeo, Chungnam	KCC2
12090	<i>A. citrulli</i>	2012	watermelon	Buyeo, Chungnam	KCC2
12091	<i>A. citrulli</i>	2012	watermelon	Buyeo, Chungnam	KCC1
12158	<i>A. citrulli</i>	2012	watermelon	Nonsan, Chungnam	KCC1
12170	<i>A. citrulli</i>	2012	cucumber	Nonsan, Chungnam	KCC2
13034	<i>A. citrulli</i>	2013	watermelon	Anseong, Gyeonggi	KCC2
13211	<i>A. citrulli</i>	2013	watermelon	Yongam, Jeonam	KCC2
13217	<i>A. citrulli</i>	2013	cucumber	Buyeo, Chungnam	KCC2
13255	<i>A. citrulli</i>	2013	cucumber	Yongam, Jeonam	KCC2
14194	<i>A. citrulli</i>	2014	melon	Anseong, Gyeonggi	KCC1
14201	<i>A. citrulli</i>	2014	melon	Gwangju city	KCC1
14202	<i>A. citrulli</i>	2014	melon	Anseong, Gyeonggi	KCC1
14222	<i>A. citrulli</i>	2014	watermelon	Yicheon, Kyunggi	KCC1
14236	<i>A. citrulli</i>	2014	melon	Kohksung, Jeonam	KCC2
17000	<i>A. citrulli</i>	2012	watermelon	Buyeo, Chungnam	KCC2
17001	<i>A. citrulli</i>	2012	watermelon	Nonsan, Chungnam	KCC1
17002	<i>A. citrulli</i>	2012	cucumber	Anseong, Gyeonggi	KCC1
17005	<i>A. citrulli</i>	2012	watermelon	Suwon, Gyeonggi	KCC2
17912	<i>A. citrulli</i>	2012	watermelon	Andong, Gyeongbuk	KCC2
17913	<i>A. citrulli</i>	2012	pumpkin seed	Busan city	KCC2

㉟ 20. *Acidivorax citrulli* and *Acidivorax* spp. isolated from cucurbit fields in Korea

Strains	Species	Year	Host	Geographic origin	Group
12318	<i>A. avenae</i>	2012	-	-	KAA
13024	<i>A. konjaci</i>	2013	cucumber	Yongam, Jeonam	KAK
14044	<i>A. konjaci</i>	2014	cucumber	Anseong, Gyeonggi	KAV
11070	<i>A. valerianellae</i>	2011	watermelon	Andong, Gyeongbuk	KAV
12316	<i>A. valerianellae</i>	2012	watermelon	-	KAV
12027	<i>A. valerianella</i>	2012	melon	-	KAV
12063	<i>A. valerianella</i>	2012	watermelon	Suncheon, Jeonam	KAV
12317	<i>A. valerianella</i>	2012	cucumber	-	KAV
12033	<i>A. valerianella</i>	2012	cucumber	Anseong, Gyeonggi	KAV
12034	<i>A. valerianella</i>	2012	cucumber	Nonsan, Chungnam	KAV
12066	<i>A. valerianella</i>	2012	cucumber	Anseong, Gyeonggi	KAV

또한 16s rRNA 염기서열을 분석을 통해 종 동정을 실시한 후 얻어진 33개 *A. citrulli* 균주들을 대상으로 *adk* (437bp), *gltA* (489bp), *glyA* (565bp), *pilT* (405bp)의 유전자 증폭을 통한 염기서열을 분석하고 병원균 집단내 유전적 다양성을 조사하였다(그림 29, 30, 31, 32).

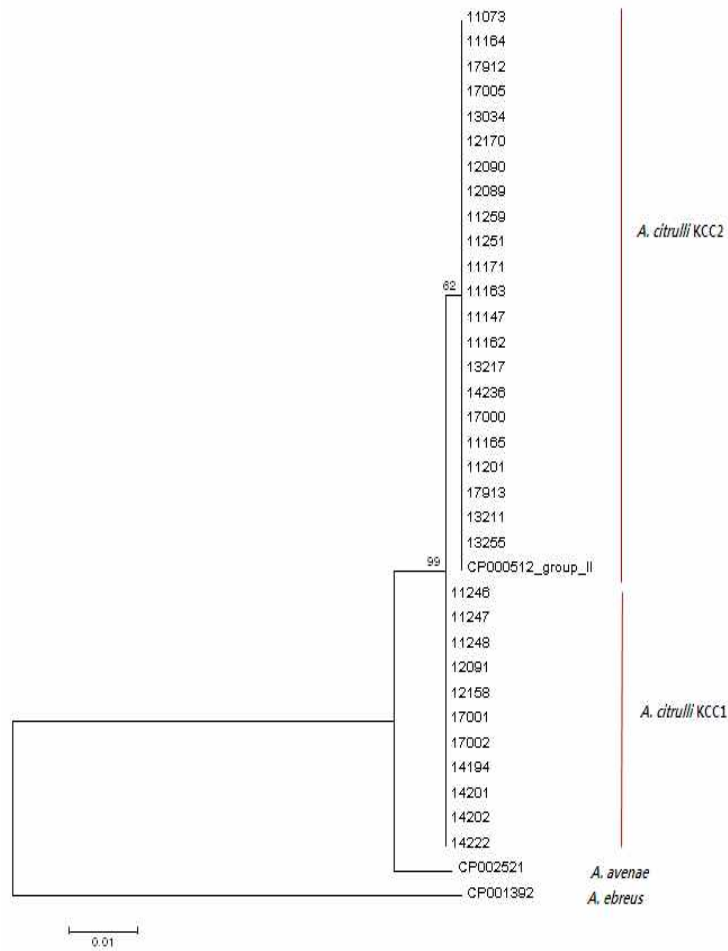


그림 29. Phylogenetic tree based on the *adk* sequences of *Acidovorax citrulli* strains of group KCC1 and KCC2 and 2 *Acidovorax* spp. using neighbour joining and Kimura two parameter distance estimation method. Bootstrap 1,000, MEGA version 5.

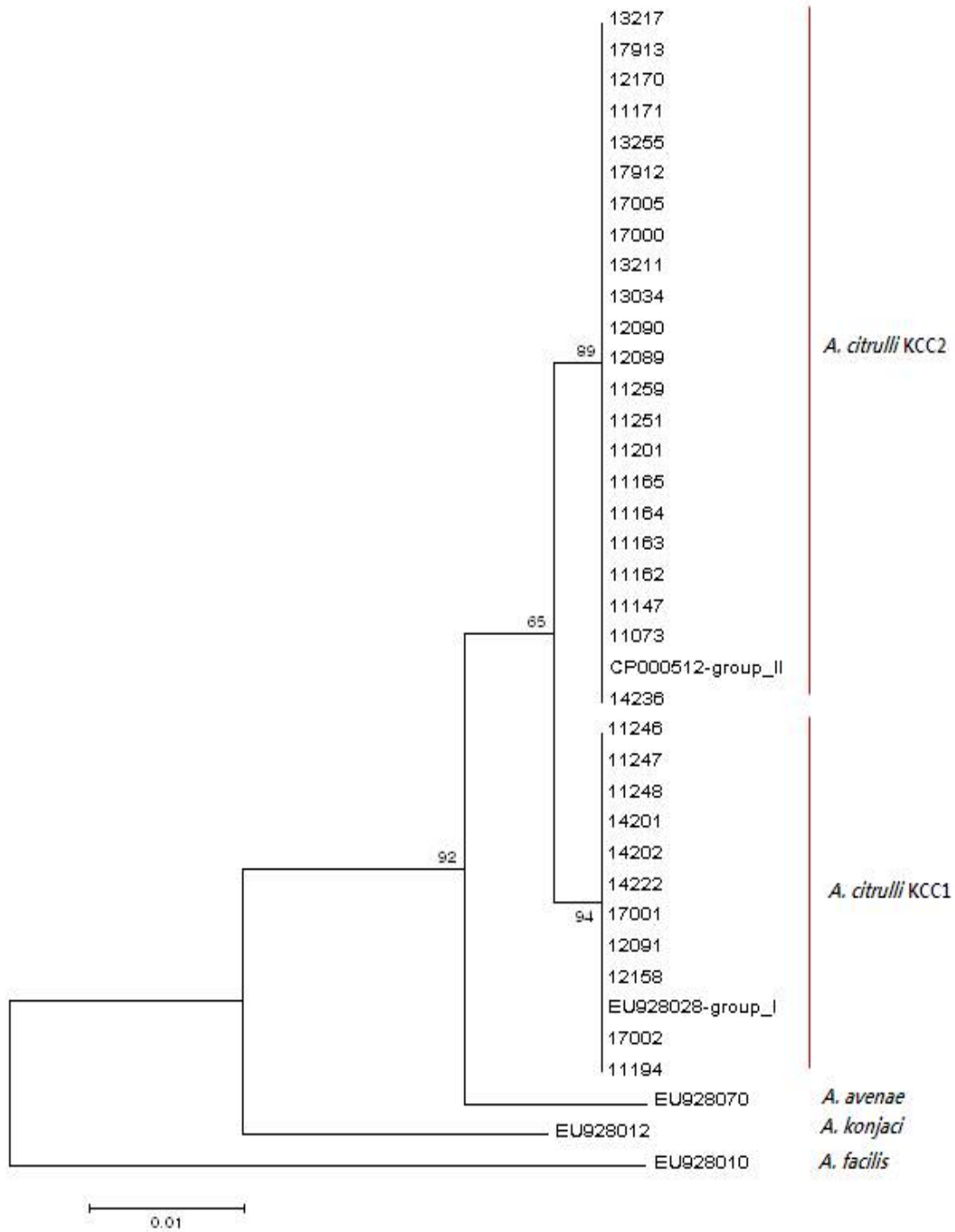


그림 30. Phylogenetic tree based on the *gltA* sequences of *Acidovorax citrulli* strains of group KCC1 and KCC2 and 3 other *Acidovorax* spp. using neighbour joining and Kimura two parameter distance estimation method. Bootstrap 1,000, MEGA version 5.

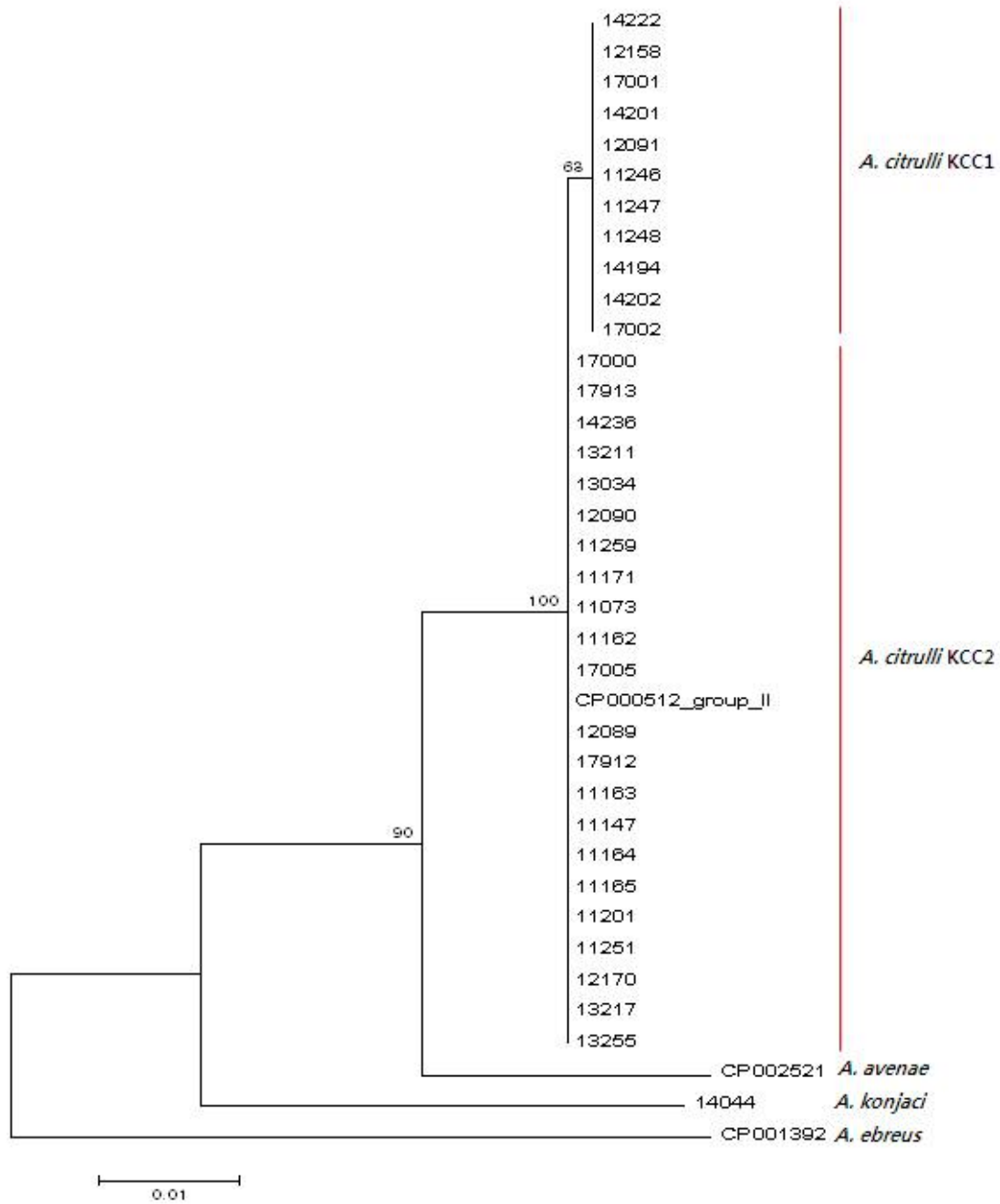


그림 31. Phylogenetic tree based on the *glyA* sequences of *A. citrulli* strains of group KCC1 and KCC2 and 3 other *Acidovorax* spp. using neighbour joining and Kimura two parameter distance estimation method. Bootstrap 1,000, MEGA version 5.

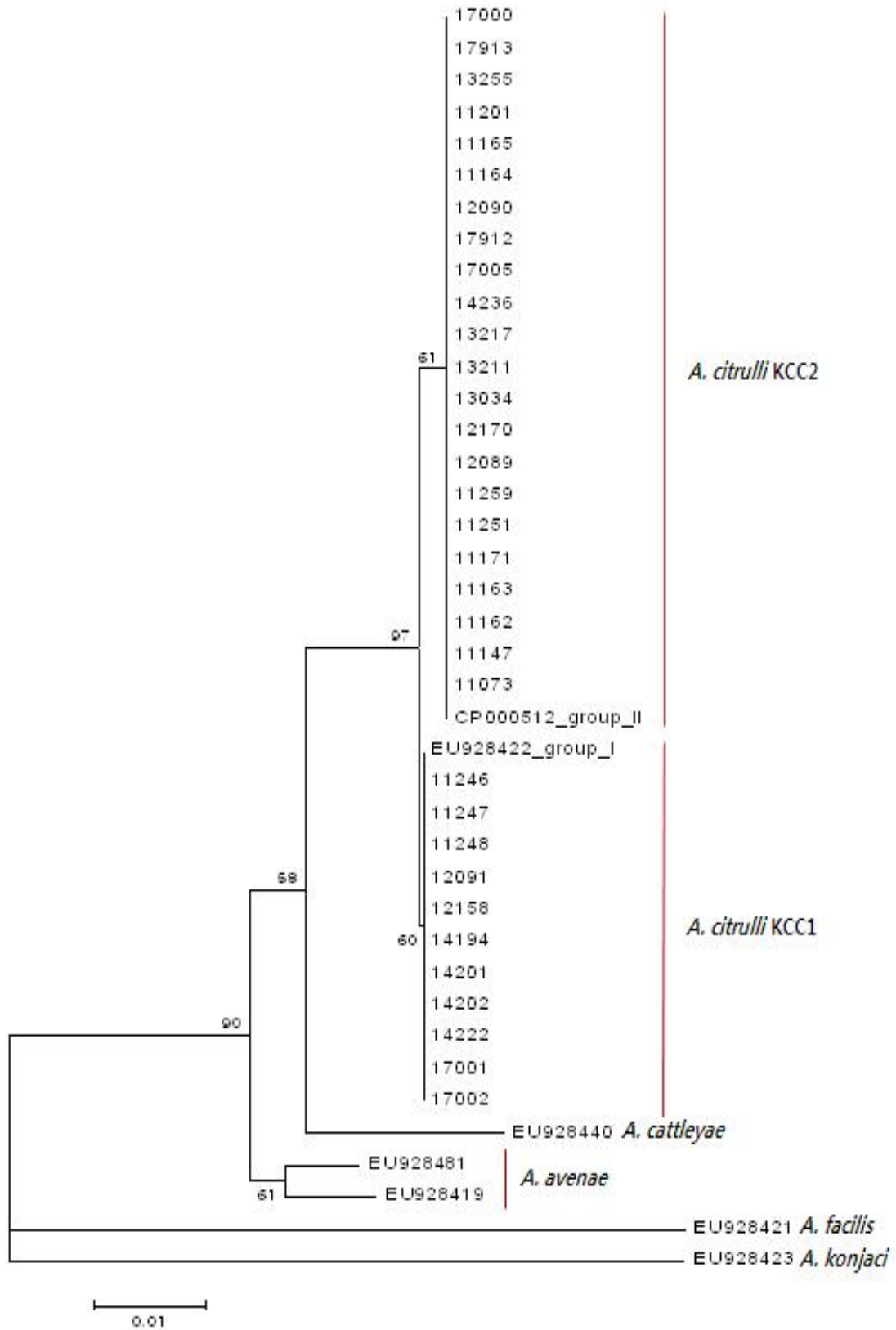


그림 32. Phylogenetic tree based on the *pilTA* sequences of *A. citrulli* strains of group KCC1 and KCC2 and 5 other *Acidovorax* spp. using neighbour joining and Kimura two parameter distance estimation method. Bootstrap 1,000, MEGA version 5.

특히 *A. citrulli* 균주들은 다른 종들과의 비교에서와는 달리 균주들간 염기서열 하나의 차이로 KCC1과 KCC2 그룹으로 나뉘어졌는데 *gltA*의 경우를 제외하고 16s rRNA, *adk*, *glyA*, *pilT*의 유전자들에 있어서 모두 종 특이적으로 각 그룹 균주들 간에 특이적인 단일 염기의 변이가 확인되었다. 한편, 집단 내 그룹 간 *gltA* 유전자 염기서열의 변이가 공통적으로 3개의 염기 위치에서 나타났지만 이들 또한 모두 *A. citrulli* 종 특이적이며 종내 그룹 특성에 따른 동일한 변이 양상을 나타냈다. 전 세계에 걸쳐 발생하고 있는 *A. citrulli* 집단에 대한 7개 유전자의 염기서열 분석을 통한 유전적 다양성 분석에 있어서도 마찬가지로 다른 유전자들은 2개 이하의 염기서열의 변이가 확인되었지만 *gltA*의 염기서열 비교에 있어서는 균주들 간에 좀더 많은 7개 이하의 변이가 나타났음을 보고했다. 국내 *A. citrulli* 집단에 있어서 나타나는 보다 적은 염기 변이는 발생 지역이 국내로 제한된 특성인 것으로 판단된다. 조사된 총 33개중 11개를 차지하는 KCC1 그룹 균주들은 기존의 연구자들에 의해 주로 수박이외의 기주로부터 분리한 균주들이 대부분이며 동제에 비교적 덜 민감한 것으로 알려진 그룹I 또는 CC1 그룹의 대표균주인 ATCC 29625와 16s rRNA, *gltA*, *pilT* 등의 유전자 염기서열들을 비교한 결과 100% 동일하였다. 또한 KCC1 그룹 균주들 간의 *gltA*, *glyA*의 염기서열에 대한 비교에서도 KCC2 그룹 균주들과는 달리 그룹 특이적으로 모두 100% 동일하였으며 수박 분리균의 발생비율이 매우 우세한 KCC2 그룹과는 달리 멜론에서의 비율이 더 높았다(그림 33, 표 21).

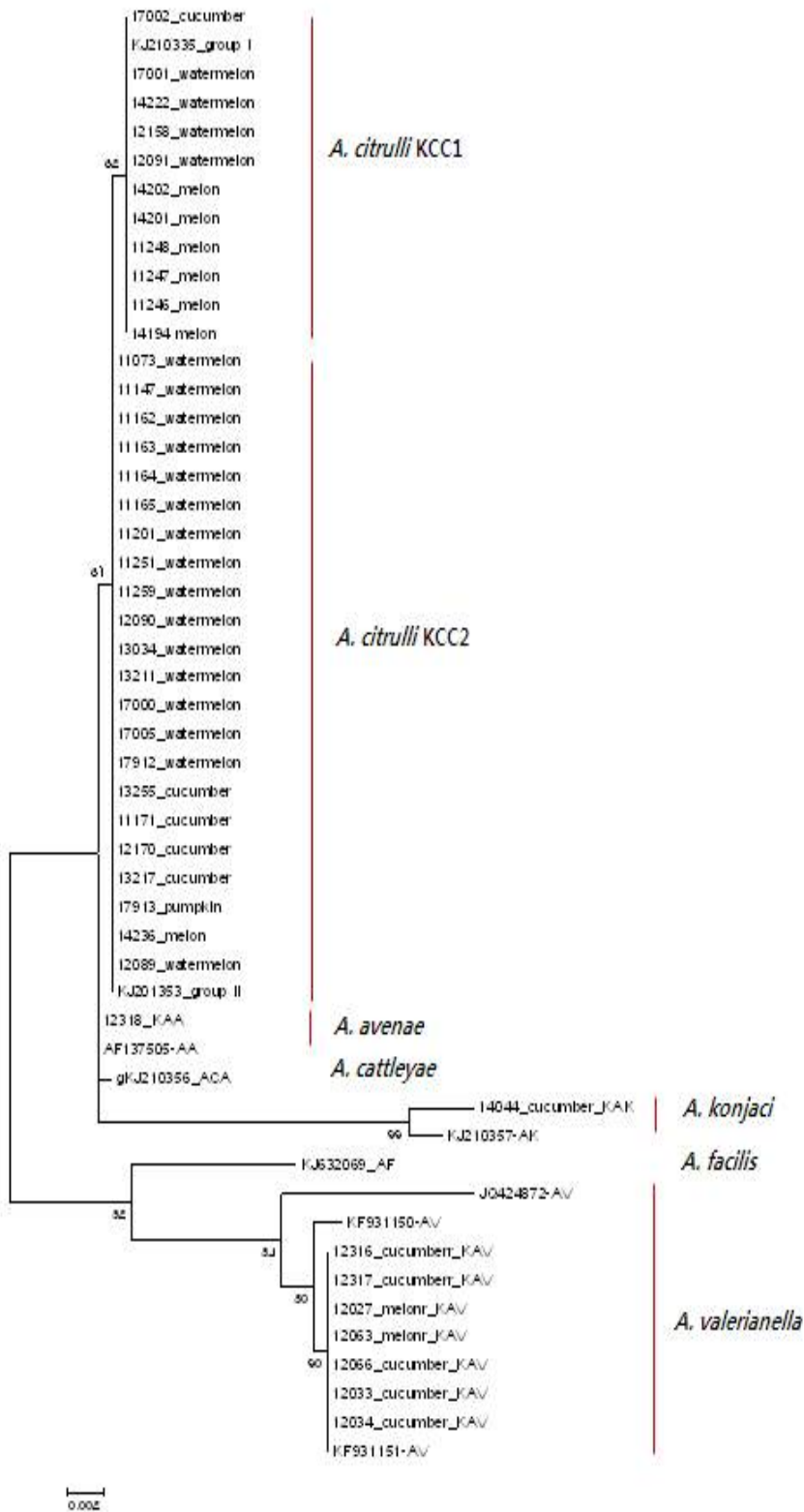


그림 33. Phylogenetic tree based on the 16S rRNA sequences of *Acidovorax citrulli* strains of group KCC1 and KCC2 according to isolated plants and 15 other *Acidovorax* spp. using neighbour joining and Kimura two parameter distance estimation method. Bootstrap 1,000, MEGA version 5.

표 21. Occurrence rate of Korean *Acidovorax citrulli* group isolates according to host plant

Host / Group	KCC1	KCC2	Total
Watermelon	4	16	20
Melon	6	1	7
Cucumber	1	4	5
Pumpkin	0	1	1
Total	11	22	33

KCC2 그룹의 대표균주인 AAC001 균주와 16s rRNA, adk, gltA, glyA, pilT 등의 유전자 염기서열들이 모두 100% 일치하였고 발생율도 67%로 KCC1 그룹보다 높았으며 그 중 수박 분리균의 발생비율이 73%로 우세했다. 하지만 두 그룹에서 모두 수박, 멜론, 오이 등지에서 발생이 확인되어 분리 기주에 따른 발생 특이성은 나타나지 않았다.

따라서 전국의 주요 박과 작물인 오이, 수박, 멜론 재배 지역으로부터 얻어진 *A. citrulli* 집단에 대해 16S rRNA (1314bp), adk (437bp), gltA (489bp), glyA (565bp), pilT (405bp)의 5개의 유전자 총 3210bp 길이의 DNA 염기서열을 분석한 결과 국내에서 발생하는 *A. citrulli* 집단은 모두 유전자 염기서열의 변이 특성에 따라 크게 KCC1과 KCC2 두 그룹으로 나뉘어졌다. 또한 그룹들 간에 조사된 5개 유전자들에 대한 전체 염기서열의 차이는 7개인 것으로 확인되었고 각기 그룹균주들은 특정 기주에서만 발견되지 않고 기주별로 발생 빈도에 따른 차이를 나타냈다. 특히 KCG1 그룹 균주들은 수박에서보다 멜론에서의 발생 비율이 약간 높았으며 KCG2 그룹 균주들은 타 기주에서보다 수박에서의 발생율이 월등히 높았다.

본 연구결과는 국내 *A. citrulli* 집단의 유전적 다양성에 관련된 최초 보고로 의미가 크지만 추후 좀더 이들 그룹 균주들 간의 다양한 기주들에 대한 병원성 차이 및 다양한 약제 반응에 대한 특성 비교 그리고 추가적인 유전적 다양성 분석이 수행된다면 효과적인 병방제 수립에 있어서 매우 유용한 자료로 활용될 것으로 판단된다.

(2) 유연관계 분석 2차 검정

1) Multi-locus 유연관계 분석

전국의 주요 박과작물 재배지역으로부터 분리된 29 *A. citrulli* 에 대한 adk, gltA, glyA, pilT, ugpB, phaC 유전자들의 총 3,004 bp에 대한 염기서열들의 alignment analysis를 실시하여 KCC1과 KCC2 그룹 균주들 간에는 종 특이적이며 그룹특이적인 8 site의 염기변이가 존재함을 확인했다(표 22). KCC1과 KCC2그룹 균주들은 각각 adk의 경우는 30번째 염기가 C (cytosine), T (thymine)이었고, gltA의 경우는 439, 442, 451번째에서 각기 C, G (guanine), A (adenine)와 G, A, C 이었으며, glyA은 452번째 염기가 A, G이었고 gmc에서는 161번째 염기가 G, T였다. 또한 pilT는 94번째 염기가 C, T 그리고 ugpB에서는 280번째 염기가 G, C였다. 한편 phaC 유전자 염기서열에서는 그룹 특이적인 변이가 나타나지 않았는데 개별균주들에 있어서 84번 염기위치에서만 20:9 (G:A)의 비율로 두 그룹 모두에서 임의적으로 나타나 각기 그룹 내에서도 또 다른

변이가 존재함을 확인 할 수 있었는데 전 세계적으로 분포하는 균주들에게 있어서 이러한 변이는 관찰되지 않았으며 단지 국내 균주들에게서만 독특한 변이가 존재함을 확인 할 수 있었다(표 23, 그림 34). 총 1,823bp의 *gltA*, *pilT*, *ugpB*, *phaC* 유전자에 대한 염기서열을 이용해 multi-locus 유연관계 분석을 수행한 결과 phylogenetic tree에 있어서 *A. citrulli* 집단은 모두 유전적으로 가장 유사한 *A. avenae* subsp. *avenae*와 *A. facilis* 그리고 *A. konjaci* 등과는 별도로 bootstrap value 95%를 지지하는 단일 clade 내에 두 그룹(KCC1과 KCC2)으로 구분되었으며 모두 유전적으로 매우 가까운 동일종임을 확인할 수 있었다(그림 35). 본 연구에서 KCC1 그룹 균주들은 KCC2 그룹과는 달리 그룹 내 구성비 6:3으로 수박에서보다 멜론에서의 분리비율이 더 높았다. 한편, 수박에서의 발생비율이 타 기주에 비해 15:5로 우세한 KCC2 그룹균주들은 KCC1 그룹보다 *A. citrulli* 집단 내 발생비율도 더 높았으며, 경기, 경북, 전남, 전북, 충남 등지의 좀 더 넓은 박과작물 재배지역에서 발생했다. 한편, 8개 유전자의 allelic profile 분석을 통해 *A. citrulli* 집단이 CC1과 CC2 그룹으로 나누어졌으며 각 그룹별로 5-6개의 sequence type이 존재함을 밝혔다. 또한 한국에 분포하는 *A. citrulli* 집단의 그룹별 기주에 따른 발생 특성과 유사하게 CC1 그룹 균주들이 수박과 멜론으로부터 비슷한 비율로 발생하며, CC2 그룹에는 주로 전 세계적으로 폭넓게 수집된 수박분리 균들로 구성되어 있음을 보여줬다. 이들 연구에 사용된 단일의 국내 수박분리 균주가 CC2 그룹의 86%를 차지하는 CC2-5 type에 속했는데 이들은 국내 KCC2 그룹과 *gltA*, *pilT*, *ugpB* 유전자의 염기서열을 비교 시 동일했으며 국내의 KCC1 그룹도 CC1 그룹의 82%를 차지하는 CC1-1 type과 염기서열이 같았다(표 23). 따라서 국내에 발생하고 있는 *A. citrulli* 집단의 두 그룹 모두는 미국에서 주류를 이루며 발생하고 있는 균주들(CC1; ATCC29625, CC2; AC00-1과 염기서열 분석결과가 매우 유사하게 나타나는 것으로 미루어 수박이나 멜론 종자를 통해 미국으로부터 유입되어졌을 것으로 판단된다. 한편, 2000년부터 2010년 동안 7개 지역의 중국에서 발생한 *A. citrulli* 집단이 우리나라와 매우 유사하게 수박보다 멜론에서의 발생비율이 상대적으로 높은 그룹1과 주로 수박으로부터 분리된 균주들로 구성된 그룹2를 구성하고 있으며, 그리고 특이적으로 한 균주이지만 유전적으로 크게 구별되는 그룹3이 존재함을 보고했다.

㉔ 22. Host, geographic origin and multi-locus genotypes of *Acidovorax citrulli* strains isolated from cucurbit cultivation fields in Korea

Isolate	Year	Host	Geographic origin	Multi-locus genotype	
				Group	phaC type
11246	2012	melon	Goksung, Jeonnam	KCC1	G
11247	2012	melon	Goksung, Jeonnam	KCC1	A
11248	2012	melon	Goksung, Jeonnam	KCC1	G
14194	2014	melon	Anseong, Gyeonggi	KCC1	G
14201	2014	melon	Gwangju City	KCC1	A
14202	2014	melon	Anseong, Gyeonggi	KCC1	G
12091	2012	watermelon	Buyeo, Chungnam	KCC1	A
12158	2012	watermelon	Nonsan, Chungnam	KCC1	G
14222	2014	watermelon	Yicheon, Gyeonggi	KCC1	A
11171	2011	cucumber	Nonsan, Chungnam	KCC2	G
12170	2012	cucumber	Nonsan, Chungnam	KCC2	G
13217	2013	cucumber	Buyeo, Chungnam	KCC2	G
13255	2013	cucumber	Youngam, Jeonnam	KCC2	G
14236	2014	melon	Goksung, Jeonnam	KCC2	G
17913	2012	pumpkin seed	Busan City	KCC2	G
11073	2011	watermelon	Youngam, Jeonnam	KCC2	G
11147	2011	watermelon	Gochang, Jeonbuk	KCC2	A
11162	2011	watermelon	Buyeo, Chungnam	KCC2	G
11163	2011	watermelon	Buyeo, Chungnam	KCC2	G
11164	2011	watermelon	Nonsan, Chungnam	KCC2	G
11165	2011	watermelon	Nonsan, Chungnam	KCC2	G
11201	2012	watermelon	Jinju, Gyeongnam	KCC2	A
11251	2012	watermelon	Suwon, Gyeonggi	KCC2	A
11259	2012	watermelon	Hamyang, Gyeongnam	KCC2	G
12089	2012	watermelon	Buyeo, Chungnam	KCC2	G
12090	2012	watermelon	Buyeo, Chungnam	KCC2	G
13034	2013	watermelon	Anseong, Gyeonggi	KCC2	A
13211	2013	watermelon	Youngam, Jeonnam	KCC2	G
17000	2012	watermelon	Buyeo, Chungnam	KCC2	G
17005	2012	watermelon	Suwon, Gyeonggi	KCC2	G
17912	2012	watermelon	Andong, Gyeongbuk	KCC2	A

㉔ 23. Comparison of DNA variation sites for nine genes of Korean KCC1 and KCC2 groups with two foreign groups of *Acidovorax citrulli*

Group	Gene ¹								
	gltA (439, 442, 451)	ugpB (280)	pilT (94)	adk (30)	glyA (452)	phaC (84)	gmc (161)	trp (439)	lepA (489)
Group I ²	C ³ , G, A	G	C	-	- ⁴	G	-	-	-
KCC1	C, G, A	G	C	C	A	A or G	G	N ⁵	N
Group II ²	G, A, C	C	T	T	G	G	-	-	-
KCC2	G, A, C	C	T	T	G	A or G	T	N	N

¹DNA variation sites within each gene.

²group I (CC1-1 type); ATCC29625 and 30081, group II (CC2-5 type); AAC00-1 and 30002 (Walcott et al., 2004 and Feng et al., 2009). DNA sequences for gltA, pilT, ugxB and phaC of *A. citrulli* strains are 30081; EU928015, EU928415, EU928623 and EU928313, and 30001; EU928015, EU928426, EU928634 and EU928322.

³A adenine, C; cytosine, G; guanine, T; thymine.

⁴ not compared.

⁵ not variable.

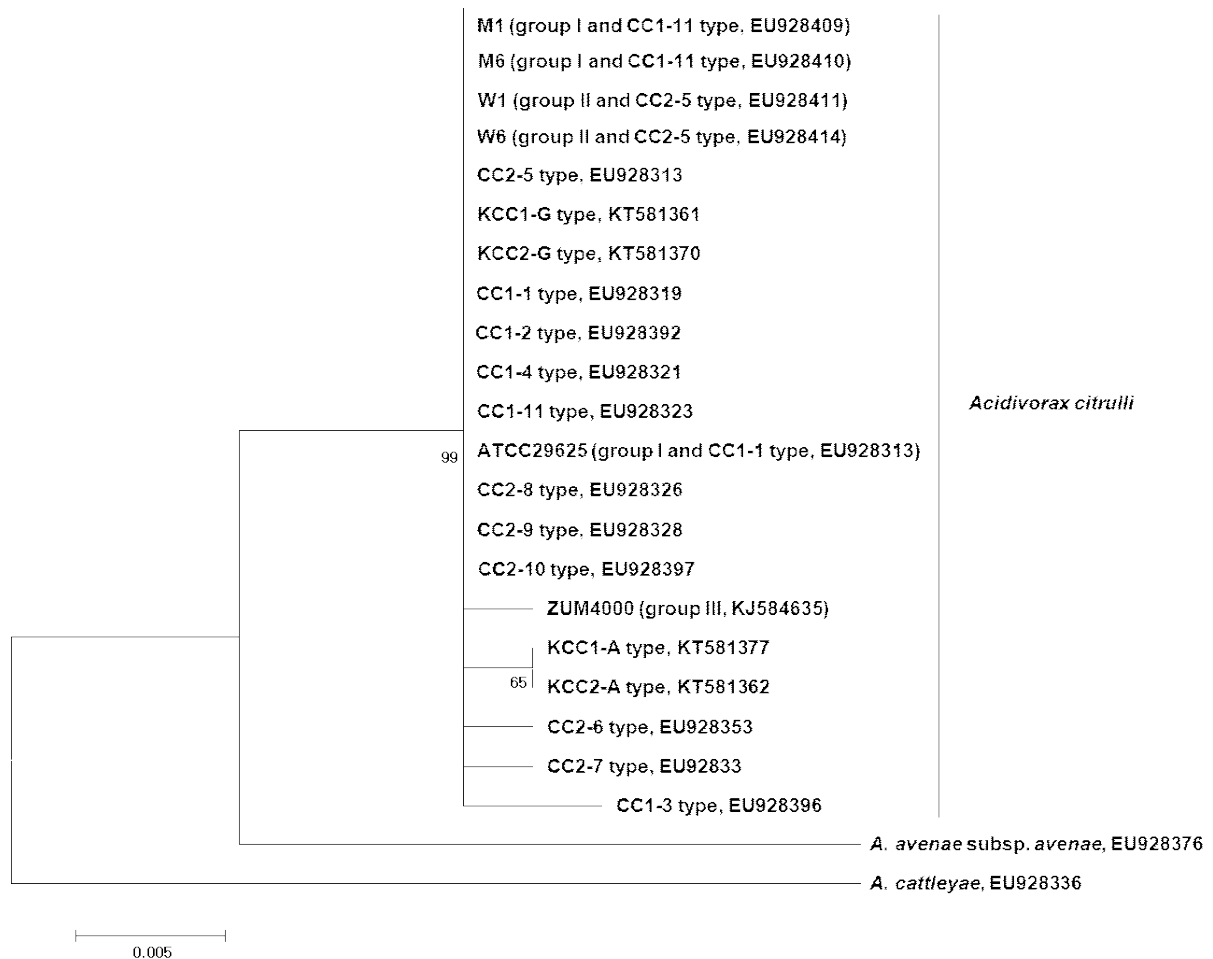


그림 34. Maximum likelihood phylogeny of Korean groups (KCC1-G, KCC1-A, KCC2-G and KCC2-A) of *Acidovorax citrulli* with foreign strains (*A. citrulli* group I, II and III: Eckshtain-Levi et al., 2015; CC1 and CC2 types: Feng et al., 2009) and two *Acidovorax* spp. as the outgroup. The tree was constructed from DNA sequences of *phaC*. Bootstrap values with 1,000 replicates for the major divisions of *A. citrulli* from the outgroups.

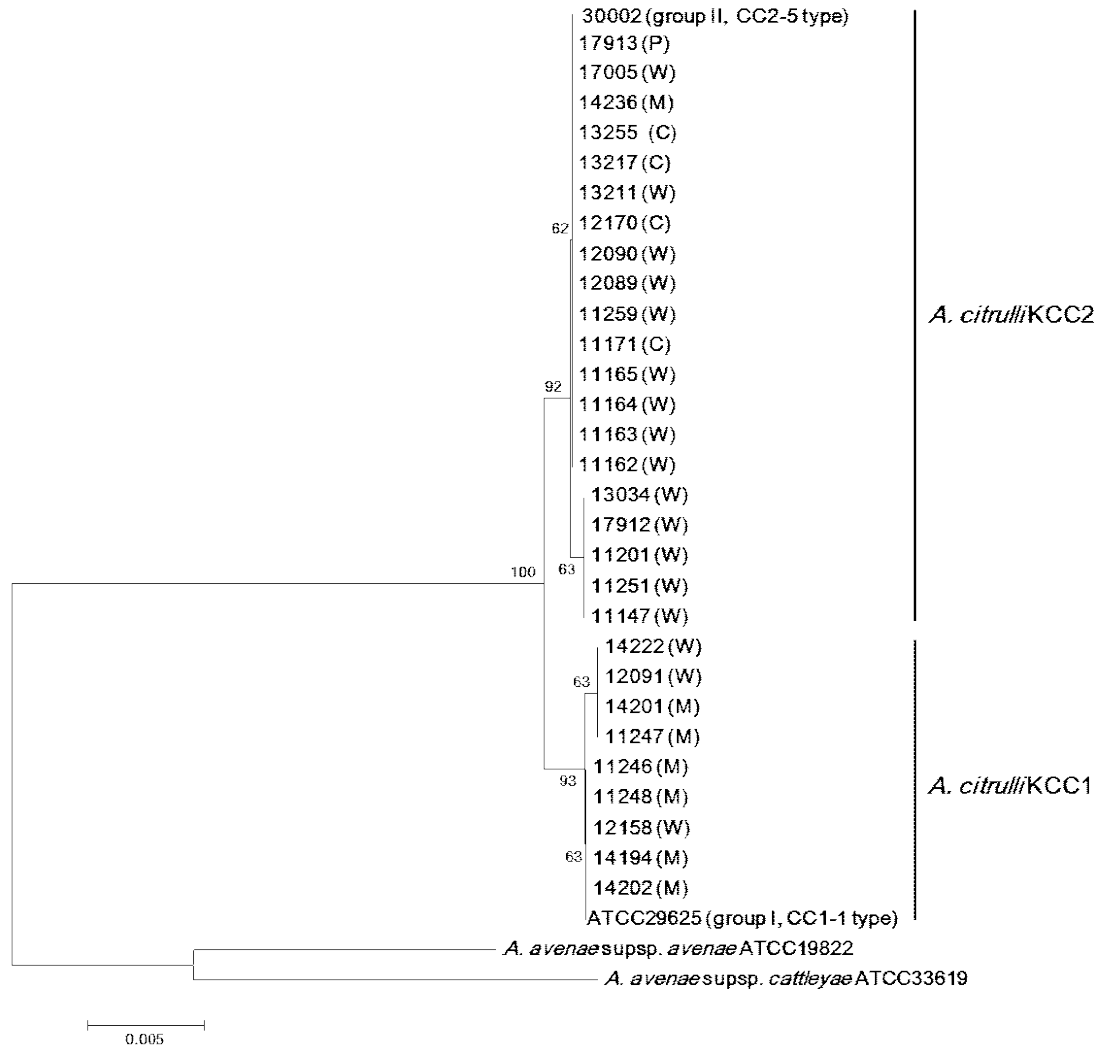


그림 35. Maximum likelihood phylogeny of 29 Korean strains of *Acidovorax citrulli* with two foreign strains; *A. citrulli* CC1 and CC2 types (Feng et al., 2009) and two *Acidovorax* spp. as the outgroup. The tree was constructed from 2,208 bp using four genes: *pilT*, *gltA*, *ugpB* and *phaC*. Bootstrap values with 1,000 replicates for the major divisions of *A. citrulli* from the outgroups. C; cucumber, M; melon, W; watermelon, P; pumpkin.

2) RAPD 분석을 통한 DNA fingerprinting 분석

URP 2, 5, 6, 8 primers, BOXA1R and ERIC primers에 의해 만들어진 103개 밴드 중 monomorphic한 밴드는 6개였으며 polymorphic한 밴드는 197를 나타냈다(그림 36). 이를 대상으로 DNA fingerprinting profile을 이용한 cluster analysis에 있어서 29 strains으로 부터 28 unique haplotypes가 형성되었으며 두 개의 cluster를 확인 할 수 있었다(그림 37). Cluster 간에는 64%의 유사도가 나타났으며 cluster1은 수박과 멜론으로부터 recovered 11 strains을 포함했으며 cluster 2는 수박, 멜론, 오이, 호박으로부터 recovered한 18 strains를 포함했는데 cluster들은 multi-locus analysis에 따른 KCC1, KCC2 그룹으로 각각 분류된 결과와 동일했다. KCC1의 그룹 내 유사도는 73%였으며 이들은 각기 수박과 멜론 분리 균들의 clade로 나뉘어졌다. KCC2의 경우는 KCC1 그룹 보다 높은 80%의 유사도 범위에서 cluster를 형성하였으며 분리 기주에 따른 clade를 형성치 않았다. 이 병원균 집단 내에는 수박 이외의 기주로부터 분리한 균주들이 대부분으로 동제에 비교적 덜 민감한 그룹 I과 주로 수박 분리 균들로 구성되어 있으며 동제에 민감하고 그룹I 보다 수박에 더 강한 병원성을 나타내는 그룹 II가 존재함을 보고했다. 또한 본 연구 결과와 마찬가지로 PFGE와 REP-PCR 분석을 통해 KCC1 그룹 균주들이 KCC2 그룹보다 더 heterogenous하다라는 것을 밝혔다. 우리의 RAPD 분석에 있어서도 *A. citrulli* 집단은 multi-locus analysis에서와 마찬가지로 KCC1과 KCC2 그룹으로 크게 구분되어졌으며, 이들 중 KCC1 그룹이 KCC2 그룹보다 더 heterogenous한 것을 확인 할 수 있었으며 90% 이상의 균주들에게서 좀 더 다양한 유전적 변이를 확인 할 수 있었다. 따라서 URP과 BOXA1R, 그리고 ERIC primer들을 이용한 RAPD 분석을 수행하여 multi-locus phylogenetic analysis 보다 좀더 reliable identification and genetic diversity에 관련된 fingerprinting data를 확보할 수 있었다.

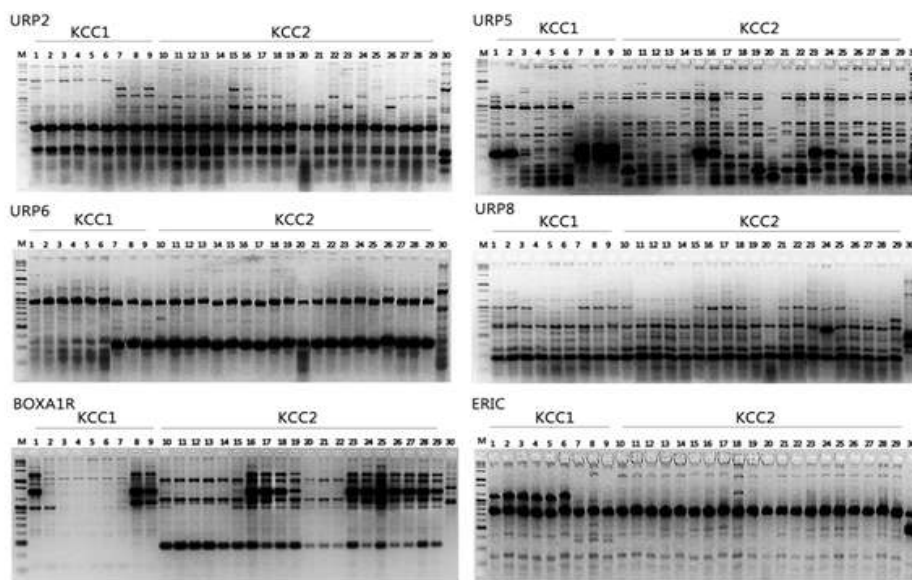


그림 36. Representative DNA fingerprinting by four URP-PCR and two repetitive elements amplification of *Acidovorax citrulli* strains. M; 100 bp plus DNA ladder, Lane 1; 11246, 2; 11247, 3; 11248, 4; 14194, 5; 14201, 6; 14202, 7; 12091, 8; 12158, 9; 14222, 10; 11147, 11; 11162, 12; 11163, 13; 11164, 14; 11165, 15; 11201, 16; 11251, 17; 11259, 18; 12089, 19; 12090, 20; 13034, 21; 13211, 22; 17005, 23; 17912, 24; 13255, 25; 11171, 26; 12170, 27; 13217, 28; 14236, 29; 17913 of *A. citrulli* and 30; *A. valerianella* 12066.

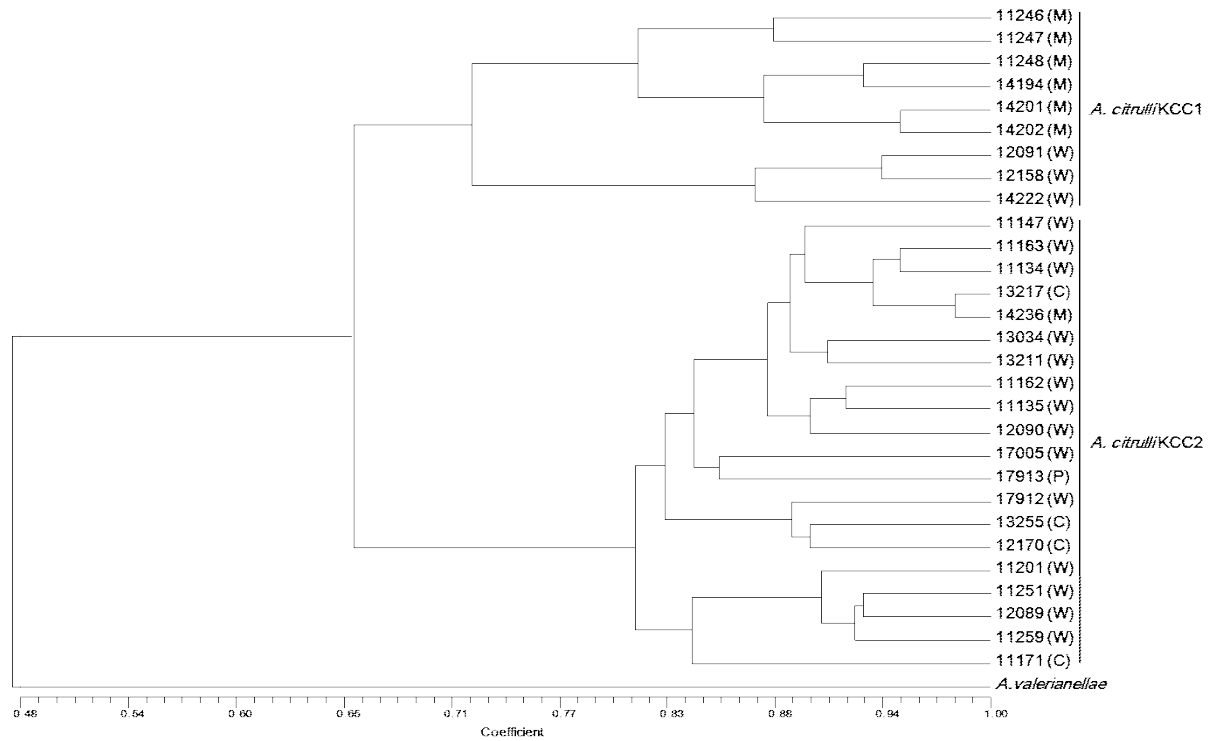


그림 37. Cluster analysis of *Acidovorax citrulli* strains and *A. valerianella* 12066 based on DNA fingerprint profiles generated by polymerase chain reaction (PCR) amplification of repetitive elements and URP primers. Distance matrix data was generated using Dice's (1945) coefficient of similarity and the dendrogram was constructed using the unweighted pairwise group method with arithmetic mean (UPGMA) algorithm. C; cucumber, M; melon, W; watermelon, P; pumpkin.

(3) 유연관계 분석 3차 검정

전국의 주요 박과 작물 재배지역으로부터 2015, 2016년에 수집된 *A. citrulli* 균주들 및 추가적으로 확보된 균주들을 대상으로 16S rRNA, *phaC*, *ugpB* 등의 유전자 염기서열 분석을 통해 유전 분석을 실시하였다. 염기서열 중 불분명하게 정렬된 부분을 제외하고 얻어진 것들을 이용해 blast 분석을 수행한 결과 선행 연구와 마찬가지로 16S rRNA와 *ugpB* 유전자 분석을 수행한 결과 각각의 균주들은 KCC1과 KCC2 그룹으로 소속되어지는 것을 확인 할 수 있었다 또한 2015, 2016년에 수집된 균주들은 *phaC* 유전자 분석을 통해 모두 G type의 유전자형을 가지고 있음을 추가적으로 확인할 수 있었다(표 24).

표 24. 2015 - 2016년 한국에서 수집된 *Acidovorax* sp. 균주

Isolate	Year	Host	Geographic origin	Multi-locus genotype	
				Group	phaC type
15047	2015	melon	Goksung, Jeonnam	KCC1	G
15280	2015	melon	Goksung, Jeonnam	KCC1	G
17001	2012	watermelon	Nonsan, Chungnam	KCC1	G
15200	2015	watermelon	-	KCC1	G
10122	2010	watermelon	Yeongju, Gyeongbuk	KCC2	G
10228	2010	watermelon	Suwon, Gyeonggi	KCC2	G
16-088	2016	watermelon	Anseong, Gyeonggi	KCC2	G
17911	2012	watermelon	KACC	KCC2	G
17910	2012	melon	KACC	KCC2	G

(4) 종 특이적 primer 선발 결과

1) *A. citrulli* 대상 종 특이적 프라이머 선발 및 민감도 확인

본 연구에서는 *A. citrulli* 대상 종 특이적 분자마커 개발을 위하여 *gmc* 영역에 대한 PCR 증폭을 통한 DNA 염기서열 분석 및 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.gov/>)에서 조사한 시퀀스를 이용하여 *A. citrulli*와 *A. konjaci*, *A. avenae* subsp. *avenae*의 염기서열을 비교하여 유전적 변이가 크게 나타나는 영역에서 종 특이적 primer를 디자인 하고 선발하였다(그림 38). 선발된 primer들은 16-18개의 염기로 구성되었으며, GC값의 분포는 53-60% 사이였고, TM값은 60-65도 범위를 나타냈다. 종 특이적 primer들은 각각의 조합에 의하여 다른 크기의 PCR 증폭산물을 형성하도록 365bp로 선발하였다(표 25). 선발된 종 특이적 primer set의 특이성을 확인하기 위하여 4종의 *Acidovorax* 속 균주들과 그 외 6종의 식물병원균을 대상으로 conventionall PCR 및 SYBR Green I real-time PCR을 수행하였다. SYBR Green I real-time PCR 결과에서도 다른 *Acidovorax* 속 균

과 식물병원균의 DNA와는 반응하지 않았고 *A. citrulli*의 DNA에 대해서만 종 특이적 증폭곡선을 나타냈다(그림 39). 또한 특정 melting peak 값이 나타나는 melt curve를 통해 디자인한 primer set이 단일 증폭산물을 형성시키며 증폭했다는 것을 확인할 수 있었다. Conventional PCR을 수행한 결과에서도 선발된 gmd1_f/gmd1_R은 다른 진균 및 유사 세균들에서와는 달리 *A. citrulli*에서만 365bp의 종 특이적 증폭산물을 형성시키는 것을 확인할 수 있었다(그림 40).

선발된 종 특이적 프라이머의 민감도를 확인하기 위해 *A. citrulli*의 DNA를 10배씩 희석하여 real-time PCR을 시행한 결과 conventional PCR에서는 1-10 pg/ μ l, real-time PCR에서는 1 pg-100 fg/ μ l의 검출 민감도를 확인할 수 있었다(그림 41, 42).

```

A. citrulli      GAAATAGCCACGCCCTCGTTGGTGC CGCCGTTGAAGTCGTCGGTGGCCGGAATGCCGGC
A. avenae       --AATAGCCACGCCCTCGTTGCTGCCGCCATGAAATCGTCGGTCCCGGGATGCCGGC
A. Konjaci      --AATAGCCACGCCCTCGTTGGTGC CGCCGTTGAAGTCGTCGGTGGAGGGAATGCCCGC
*****
A. citrulli      CTCTGCGCGCGCGCGCGAAAGCGTCCAGCACGTCCCAGCCGAGCGCGCTGGCGCTCCAC
A. avenae       CTGCTGCGCGCGCGCGCGAAAGCGTCCAGCACGTCCCAGCCGAGCGCGCTGGCGCTCCAC
A. Konjaci      CTGCTGCGCGCGCGCGCGAAAGCGTCCAGCACGTCCCAGCCGAGCGCGCTGGCGCTCCAC
*****
A. citrulli      CCGCCATTACCGCTGCCGCGCGTGGTCTTGCTGCCGTGCAGCTGCCGGAATGCCTCGCT
A. avenae       CCGCCATTGCGCGCGCGCGCGCGTGGTCTTGCTGCCGTGCAACCGCCGGAACGCTCGCT
A. Konjaci      GCGCCATTGCGCGCGTGGCGCGCGTGGTCTTGCTGCCGTGCAGCGCTGAATTCGTCGGT
*****
A. citrulli      CGCGGTGTCGGGCGCGTCCAGGCGCCAGTGGTCC-TCGTGGCGGGGGAAGGCCGCGCAGCA
A. avenae       CGCGGTGTCGGGCGCGTCCAGGCGCCAGTGGTCC-TCGTGGCGGGGGAAGGCCGCGCAGCA
A. Konjaci      GCGCGCATCCGGACCGTCCAGGCGCCAGTGGTCC-TCGTGGCGGGGGAAGGCCGCGCAGCA
*****
A. citrulli      CGGATCCCAGCGCCATGATCGTCCGCGCGTGGTCCCGCCACTGCTCGTAGTCCCCTG
A. avenae       CGGATCCCAGCGCCAGTGGTCCCGCGCGTGGTCCCGCCACTGCTCGTAGTCCCCTG
A. Konjaci      CGTGTCCCAGCGCCAGTGGTCCCGCGCGTGGTCCCGCCACTGCTCGTAGTCCCCTG
*****
A. citrulli      CCTGCCCGCGCATGTAGATCATGCCGTTGATGCTGCTGCAGCCGCCAGGGTCTTGCCGC
A. avenae       CCTGCCCGCGCATGTAGATCATGCCGTTGATGCTGCTGCAGCCGCCAGGGTCTTGCCGC
A. Konjaci      CCTGCCCGCGCATGTAGATCATGCCGTTGATGCTGCTGCAGCCGCCAGGGTCTTGCCGC
*****
A. citrulli      GCGGATAGCGCAGGCTGCCGCGCGTTCAGCCCTCGTCCGGTCCGGTCTGGTAGAGCCAGT
A. avenae       GCGGATAGCGCAGGCTGCCGCGCGTTCAGCCCTCGTCCGGTCCGGTCTGGTAGAGCCAGT
A. Konjaci      GCGGATAGCGCAGGCTGCCGCGCGTTCAGCCCTCGTCCGGTCCGGTCTGGTAGAGCCAGT
*****
A. citrulli      CGGTGCGCGCGTTCGCCGATGCAGTAGAGGTAGCCACGGGATGTGGATCCAGTGGTAA
A. avenae       CGGTGCGCGCGTTCGCCGATGCAGTAGAGGTAGCCACGGGATGTGGATCCAGTGGTAA
A. Konjaci      CGGTGCGCGCGTTCGCCGATGCAGTAGAGGTAGCCACGGGATGTGGATCCAGTGGTAA
*****
A. citrulli      CGTCCTTGC CGCGCGCTTCCACGAGCAGCAGCGGTGCCGCGGATCGGCGCTCAGCCGGT
A. avenae       CGTCCTTGC CGCGCGCGCTTCCACGAGCAGCAGCGGTGCCGCGGATCGGCGCTCAGCCGGT
A. Konjaci      CGTCCTTGC CGCGCGCGCTTCCACGAGCAGCAGCGGTGCCGCGGATCGGCGCTCAGCCGGT
*****
A. citrulli      TGCACAGCAGGCGCGCGCCGATACC GCGCCGAT
A. avenae       TGCACAG-----
A. Konjaci      TGCACAG-----
*****

```

그림 38. *A. citrulli* 대상 종 특이적 primer 디자인을 위한 유사 종들과 gmc 유전자 영역의 DNA 염기서열 비교.

표 25. 본 연구에서 개발된 *A. citrulli*, *A. valerianellae*, *A. konjaci* 종 특이적 primer set의 제반 특성

Primer	Target species	Region	Sequences (5→3)	TM value	GC (%)	Size
gmd1_F	<i>A. citrulli</i>	<i>gmc</i>	TCTTGCTGCCGTGCAGCT	58.4	61.1	365bp
gmd1_R			CGTGTGCTCGTGGAA	53.3	62.5	
Pi_AK3F	<i>A. konjaci</i>	<i>pilt</i>	CCTTGGTCTTGCACAGGGTT	60.5	55.0	84bp
Pi_AK2R			CCGCGGAAGAAAAGGAG	54.8	58.82	
Gt_AV3F	<i>A. valerianellae</i>	<i>gltA</i>	GCGGGTCGTAGTTCTTGTAT	56.1	55.56	151bp
Gt_AV2R			GCCAACGAAGCCGCAT	53.3	62.5	

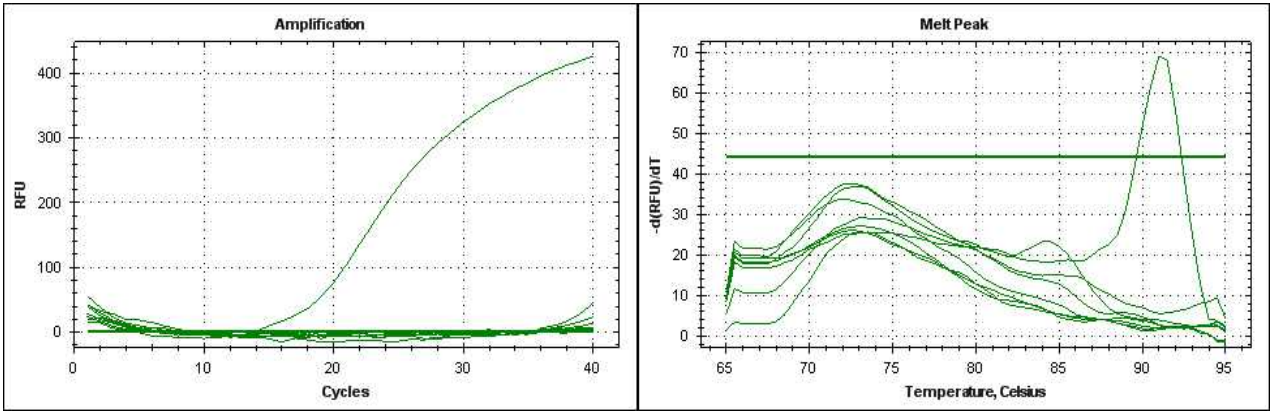


그림 39. *Acidovorax citrulli* 대상 종 특이적 프라이머 gmd1_F/gmd2_R을 이용한 SYBR Green I real-time PCR의 Specific amplification과 melting curve.

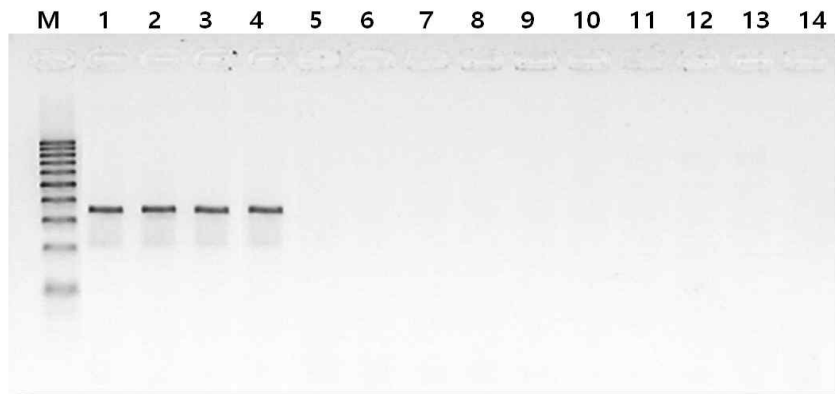


그림 40. *A. citrulli* 대상 종 특이적 primer의 특이성 확인. M, 100bp marker; lane 1-4, *A. citrulli*; 5, *A. valerianellae*; 6, *A. avenae* subsp. *avenae*; 7, *A. Konjaci*; 8, *Phytophthora capsici*; 9, *Botrytis cinerea*; 10, *Bacillus amyloliquefaciens*; 11, *Xanthomonax oryzae*; 12, *Burkholderia glimae*; 13, DNA in soil; 14, negative control.

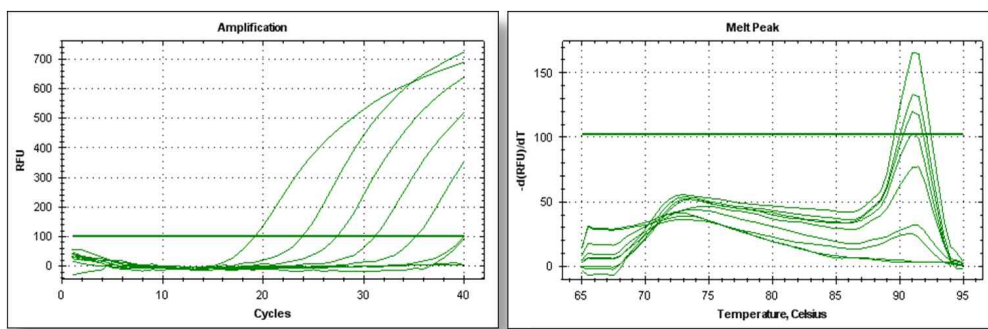


그림 41. *Acidovorax citrulli* 대상 종 특이적 프라이머 gmd1_F/gmd2_R의 민감도를 확인한 real-time PCR의 specific amplification과 melting curve.

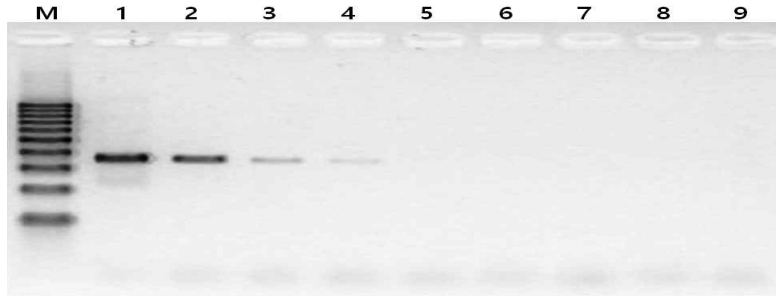


그림 42. *Acidovorax citrulli* 대상 종 특이적 프라이머 gmd1_F/gmd2_R을 이용한 conventional PCR 민감도 확인. M, 100bp marker; lane 1-9, diluted genomic DNA 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg/ul 와 negative control.

2) *A. valerianellae*, *A. konjaci* 대상 종 특이적 프라이머 선발

유전적으로도 매우 유사하며 국내에서 수박의 잎에서 발생이 보고된 *A. valerianellae* (12027, 수박)와 오이에서 발생되었지만 수박에서도 병발생 가능성이 예상되는 *A. konjaci* (13024, 오이)의 수박유묘에 대한 줄기 상처 접종을 통해 병원성을 확인하였다(그림 43). 이들에 대한 종 특이적 마커들은 유사균들의 염기서열을 비교하여 유전적 변이가 크게 나타나는 영역에서 선발되었다(그림 44, 45). 선발된 primer들은 16-21개의 염기로 구성되었으며, GC값의 분포는 55-65% 사이였고, TM값은 53-63도 범위를 나타냈다. 종 특이적 primer들은 서로 다른 크기의 PCR 증폭산물을 형성하도록 각각 151bp, 84bp로 선발하였다(표 25). 선발된 종 특이적 primer set들의 특이성을 확인하기 위하여 4종의 *Acidovorax* 속 균주들과 그 외 6종의 식물병원균을 대상으로 conventional PCR 및 SYBR Green I real-time PCR을 수행하였다.

Conventional PCR을 수행한 결과 선발된 primer set인 Gt_AV_F/Gt_AV2R와 Pi_AK3F/Pi_AK2R은 각각 151 bp와 84 bp의 종 특이적 증폭산물을 형성하였다(그림 46). 또한 SYBR Green I real-time PCR 결과에서도 다른 *Acidovorax* 속 균과 식물병원균의 DNA와는 반응하지 않았고 대상 균주의 DNA에 대해서만 종 특이적 증폭곡선을 나타냈다(그림 47, 48). 또한 특정 melting peak 값이 나타나는 melt curve를 통해 디자인한 primer set이 단일 증폭산물을 형성시키며 증폭했다는 것을 확인할 수 있었다. 이들 각각의 종 특이적 마커들은 개별적으로 혹은 *A. citrulli*의 종 특이적 마커와의 조합으로 수박 또는 박과 작물의 병원균 검출을 위한 multiplex PCR에 활용이 가능할 것으로 판단된다.

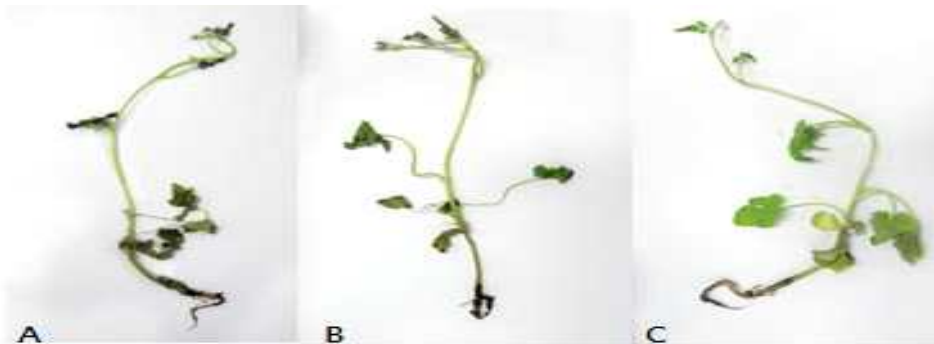


그림 43. 수박 유묘의 줄기에 상처 접종된 A, *Acidovorax citrulli*, B, *A. valerianellae*, C, *A. konjaci*

```

A. citrulli      -----GGTAGAGCTTGCGCTGCACGGAAGTAGTCGTCTCCAGTGCGGATCTTCTCGAGTT
A. avaeanae     -----GGTAGAGCTTGCGCTGCACGGAAGTAGTCGTCTCCAGGGGGGATCTTCTCGAGCT
A. Konjaci      -----GGTAGAGCTTGCGCTGCACGGAAGTAGTCGTCTCCAGGGGGGATCTTCTCGAGTT
A. valerianellae CGTTCCGGGGTAGAGCTTGCGCTGCACGGAAGTAGTCGTCTCCAGGGGGGATCTTCTCGAGTT
*****

A. citrulli      CCTTGCCAGGGGCGAACAGCGGGTCCTTTTCCAGGCCAGCTCGGCCAGCACCTCGTTGC
A. avaeanae     CCTTGCCAGGGGCGAACAGCGGGTCCTTTTCCAGGCCAGCTCGGCCAGCACCTCGTTGC
A. Konjaci      CCTTGCCAGGGGCGAACAGCGGGTCCTTTTCCAGGCCAGCTCGGCCAGCACCTCGTTGC
A. valerianellae CCTTGCCAGGGGCGAACAGCGGGTCCTTTTCCAGGCCAGCTCGGCCAGCACCTCGTTGC
*****

A. citrulli      AGGTTTCCTGCATGAGCTTGCGCGCGGGTCGTAGTTCTTGTACACGGCTGGCCGAAGC
A. avaeanae     AGGTTTCCTGCATGAGCTTGCGCGCGGGTCGTAGTTCTTGTACACGGCTGGCCGAAGC
A. Konjaci      AGGTTTCCTGCATGAGCTTGCGCGCGGGTCGTAGTTCTTGTACACGGCTGGCCGAAGC
A. valerianellae AGGTTTCCTGCATGAGCTTGCGCGCGGGTCGTAGTTCTTGTACACGGCTGGCCGAAGC
*****

A. citrulli      CCATGAGCTTGACGCCGGAGTCTTGTCTTGTGACCTGCTGTGATGAACTCGCCGATCTTCT
A. avaeanae     CCATGAGCTTGACGCCGGAGTCTTGTCTTGTGACCTGCTGTGATGAACTCGCCGATCTTCT
A. Konjaci      CCATGAGCTTGACGCCGGAGTCTTGTCTTGTGACCTGCTGTGATGAACTCGCCGATCTTCT
A. valerianellae CCATGAGCTTGACGCCGGAGTCTTGTCTTGTGACCTGCTGTGATGAACTCGCCGATCTTCT
*****

A. citrulli      CCACGCCGCCCTGGCCCTGGATGTCGTGCAGCATGTTACAGGGCCGCTTCTGTTGGCCCGC
A. avaeanae     CCACGCCGCCCTGGCCCTGGATGTCGTGCAGCATGTTACAGGGCCGCTTCTGTTGGCCCGC
A. Konjaci      CCACGCCGCCCTGGCCCTGGATGTCGTGCAGCATGTTACAGGGCCGCTTCTGTTGGCCCGC
A. valerianellae CCACGCCGCCCTGGCCCTGGATGTCGTGCAGCATGTTACAGGGCCGCTTCTGTTGGCCCGC
*****

A. citrulli      CGTGTGCGGGCCCCAGAGGCAGGCCACGCCGGCCGATGGCCGGGAAACGGTTGTTGC
A. avaeanae     CGTGTGCGGGCCCCAGAGGCAGGCCACGCCGGCCGATGGCCGGGAAACGGTTGTTGC
A. Konjaci      CGTGTGCGGGCCCCAGAGGCAGGCCACGCCGGCCGATGGCCGGGAAACGGTTGTTGC
A. valerianellae CGTGTGCGGGCCCCAGAGGCAGGCCACGCCGGCCGATGGCCGGGAAACGGTTGTTGC
*****

A. citrulli      CCGACGAGCCGCACAGGCCACGGTGGAGGTGGAGGCGTCTTCTGCTGCTGGTCCGGCTGCA
A. avaeanae     CCGACGAGCCGCACAGGCCACGGTGGAGGTGGAGGCGTCTTCTGCTGCTGGTCCGGCTGCA
A. Konjaci      CCGACGAGCCGCACAGGCCACGGTGGAGGTGGAGGCGTCTTCTGCTGCTGGTCCGGCTGCA
A. valerianellae CCGACGAGCCGCACAGGCCACGGTGGAGGTGGAGGCGTCTTCTGCTGCTGGTCCGGCTGCA
*****

A. citrulli      GGATGAAGATGCGGTCCAGCGCGCTCGAGCACGGGTTGACCTTGTACTCTCTCGCAGG
A. avaeanae     GGATGAAGATGCGGTCCAGCGCGCTCGAGCACGGGTTGACCTTGTACTCTCTCGCAGG
A. Konjaci      GGATGAAGATGCGGTCCAGCGCGCTCGAGCACGGGTTGACCTTGTACTCTCTCGCAGG
A. valerianellae GGATGAAGATGCGGTCCAGCGCGCTCGAGCACGGGTTGACCTTGTACTCTCTCGCAGG
*****

A. citrulli      GCGTCCGGAACATCA-----
A. avaeanae     GCGTCCGGAACATCA-----
A. Konjaci      GCGTCCGGAACATCA-----
A. valerianellae GCGTCCGGAACATCATGCGCAGGAAGT
*****

```

그림 44. *A. valerianellae* 대상 종 특이적 primer 디자인을 위한 위한 유사종들과 *gltA* 유전자 영역의 DNA 염기서열 비교

```

A. avaeanae      CACCTTGGCCTCGCGGATCAGGTTGCGGATGGCGCTGGTGGCCAGCATGATCTCGTGCCG
A. Konjaci       CACCTTGGCCTCCCGGATCAGGTTGCGGATGGCGCTGGTGGCCAGCATGATTTCCATGGG
A. citrulli      CACCTTGGCCTCGCGGATCAGGTTGCGGATGGCGCTGGTGGCCAGCATGATCTCGTGCCG
*****

A. avaeanae      CGCCACGCGGCCCTGGCCGCTCCTTGGTCTTGACACAGGCTCTGGGAGATCACGGCCTGCAG
A. avaeanae     CGCCACGCGGCCCTGGCCGCTCCTTGGTCTTGACACAGGCTCTGGGAGATCACGGCCTGCAG
A. Konjaci       CGCCACGCGGCCCTGGCCGCTCCTTGGTCTTGACACAGGCTCTGGGAGATCACGGCCTGCAG
A. citrulli      CGCCACGCGGCCCTGGCCGCTCCTTGGTCTTGACACAGGCTCTGGGAGATCACGGCCTGCAG
*****

A. avaeanae      CGATTGCGACAGCATGGCGCGCACCATTTCTTCTCTTCCGGGGGAAACAGTCGATGAT
A. avaeanae     CGATTGCGACAGCATGGCGCGCACCATTTCTTCTCTTCCGGGGGAAACAGTCGATGAT
A. Konjaci       CGATTGCGACAGCATGGCGCGCACCATTTCTTCTCTTCCGGGGGAAACAGTCGATGAT
A. citrulli      CGATTGCGACAGCATGGCGCGCACCATTTCTTCTCTTCCGGGGGAAACAGTCGATGAT
*****

A. avaeanae      CCGGTCGATGGTCTTGGCGCGCTGGAGGTGTGAGGGTGCCGAACACAGAGGTGGCCCGT
A. avaeanae     CCGGTCGATGGTCTTGGCGCGCTGGAGGTGTGAGGGTGCCGAACACAGAGGTGGCCCGT
A. Konjaci       CCGGTCGATGGTCTTGGCGCGCTGGAGGTGTGAGGGTGCCGAACACAGAGGTGGCCCGT
A. citrulli      CCGGTCGATGGTCTTGGCGCGCTGGAGGTGTGAGGGTGCCGAACACAGAGGTGGCCCGT
*****

A. avaeanae      CTCGGCGGCCGTCATGGCCAGGCGGATGGTCTCGAGGTCGCGCATTTACCCACGAGGAT
A. avaeanae     CTCGGCGGCCGTCATGGCCAGGCGGATGGTCTCGAGGTCGCGCATTTACCCACGAGGAT
A. Konjaci       CTCGGCGGCCGTCATGGCCAGGCGGATGGTCTCGAGGTCGCGCATTTACCCACGAGGAT
A. citrulli      CTCGGCGGCCGTCATGGCCAGGCGGATGGTCTCGAGGTCGCGCATTTACCCACGAGGAT
*****

A. avaeanae      GGCGTCCGGGTCTTCGCGCAGCGGGATTTTCAGCGCGGGCGGAAGGACAGCGTCATCGG
A. avaeanae     GGCGTCCGGGTCTTCGCGCAGCGGGATTTTCAGCGCGGGCGGAAGGACAGCGTCATCGG
A. Konjaci       GGCGTCCGGGTCTTCGCGCAGCGGGATTTTCAGCGCGGGCGGAAGGACAGCGTCATCGG
A. citrulli      GGCGTCCGGGTCTTCGCGCAGCGGGATTTTCAGCGCGGGCGGAAGGACAGCGTCATCGG
*****

A. avaeanae      CCGGACCTCCGCTGGTTGATCAGGCACCTCTTGGACTCGTGAC
A. avaeanae     CCGGACCTCCGCTGGTTGATCAGGCACCTCTTGGACTCGTGAC
A. Konjaci       CCGGACCTCCGCTGGTTGATCAGGCACCTCTTGGACTCGTGAC
A. citrulli      CCGGACCTCCGCTGGTTGATCAGGCACCTCTTGGACTCGTGAC
*****

```

그림 45. *A. konjaci* 대상 종 특이적 primer 디자인을 위한 유사종들과 *gltA* 유전자 영역의 DNA 염기서열 비교

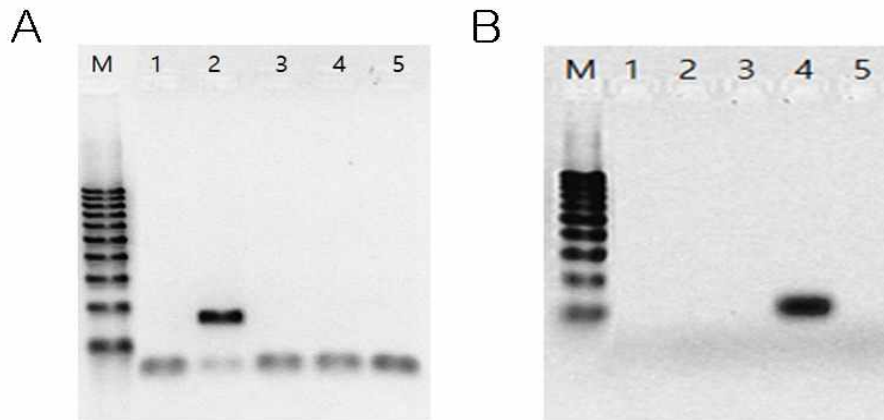


그림 46. A. *A. valerianellae* 대상 종 특이적 프라이머 Gt_AV_F/Gt_AV2R의 conventional PCR 증폭특이성 확인. B. *A. konjaci* 대상 종 특이적 프라이머 Pi_AK3F/Pi_AK2R의 conventional PCR 증폭특이성 확인. M, 100bp marker; lane 1, *A. citrulli.*, lane 2, *A. valerianellae.*, lane 3, *A. avenae* subsp. *avenae.*, lane 4, *A. konjaci.*, lane 5, negative control

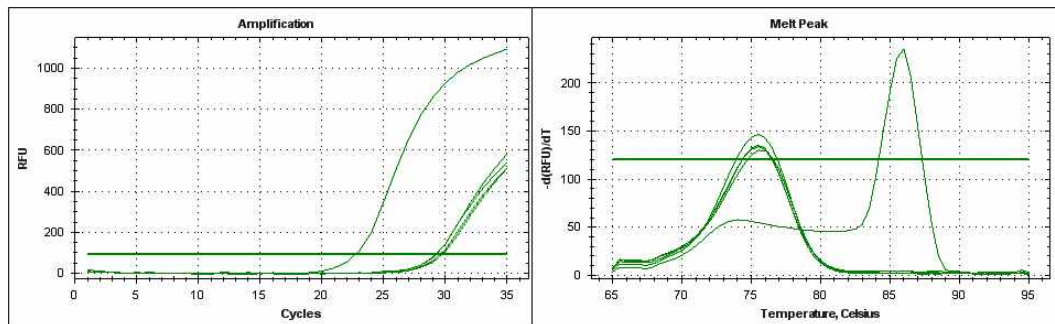


그림 47. *A. valerianellae* 대상 종 특이적 프라이머 Gt_AV_F/Gt_AV2R를 이용한 SYBR Green I real-time PCR의 specific amplification과 melting curve.

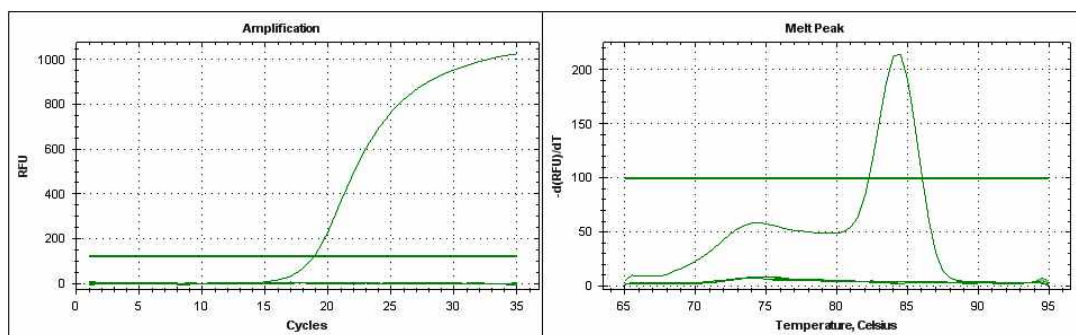


그림 48. *A. konjaci* 대상 종 특이적 프라이머 Pi_AK3F/Pi_AK2R를 이용한 SYBR Green I real-time PCR의 specific amplification과 melting curve.

3) 식물체로부터 균 검출

Acidovorax 속 대상으로 한 종 특이적 primer를 이용하여 감염된 이병식물체로부터 검출이 가능한지 확인하기 위해 *Acidovorax citrulli*를 인공감염 시킨 식물체를 이용하여 PCR 검출 실험을 시행하였다. 그 결과, 이병 식물체 병반을 마쇄 후 nutrient broth와 D.W에서 배양한 경우 모두 병원균 검출이 가능했으며 nutrient broth에서 배양한 샘플에서 좀더 낮은 CT값이 나타나 검출 민감도가 높아졌음을 확인할 수 있었다(그림 49). 종자 및 식물체 부위에 대한 검출 조건과 배양시간 및 배지 조건 등의 좀 더 다양한 조건들을 검토하여 최적의 검출조건을 확립할 경우 추후 이병 식물체로부터 PCR 기법을 이용한 병원균의 검출을 확인할 때 매우 유용하게 활용되어질 것으로 판단된다.

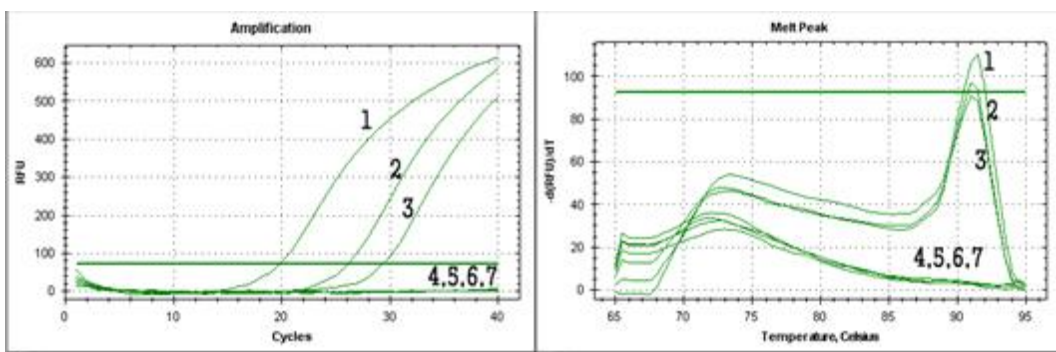


그림 49. *A. citrulli* 대상 종 특이적 프라이머를 이용해 감염된 식물체의 진탕배양을 통한 효과적인 균 검출법 개발. 1, *Acidovorax citrulli* genomic DNA; 2, NB 처리구; 3, D.W 처리구; 4, *A. valerianellae*; 5, *A. avenae* subsp. *avenae*; 6, *A. konjaci*; 7, negative control.

(5) 수박 과일썩음병원 유전체 분석 결과

2014년도 병원성 검정결과에서 병원성이 다른 균주에 비해 다소 강했던 과일썩음병원 11-251 와 11-073, 12-091, 12-158 균주를 이용하여 과일썩음병균에 대한 유전체 분석을 실시함. 현재 솔 쉐트(주)에 유전체 분석을 의뢰함. 그 결과, 11-251의 경우 5Mbp (5,350,245 bp)크기의 유전체가 분석되었으며, circular type으로 확인됨. 과일썩음병원 유전체의 G+C contents는 68.54%로 A+T에 비해 높게 나타났으며, 약 5,000개 이상의 predicted CDS (coding DNA sequence)가 존재함. 또한 총 9개의 rRNA를 가지고 있으며, 53개의 tRNA도 존재함. 11-073의 경우 5Mbp (5,308,653 bp)크기의 유전체가 분석되었으며, circular type으로 확인됨. 과일썩음병원 유전체의 G+C contents는 68.55%로 A+T에 비해 높게 나타났으며, 약 4,825개 이상의 predicted CDS (coding DNA sequence)가 존재함. 또한 총 9개의 rRNA를 가지고 있으며, 64개의 tRNA도 존재함. 12-091의 경우 5Mbp (5,331,070 bp)크기의 유전체가 분석되었으며, circular type으로 확인됨. 과일썩음병원 유전체의 G+C contents는 68.56%로 A+T보다 높게 나타났으며, 약 4,856개 이상의 predicted CDS (coding DNA sequence)가 존재함. 또한 총 9개의 rRNA를 가지고 있으며, 63개의 tRNA도 존재함. 12-158의 경우 5Mbp (5,331,045 bp)크기의 유전체가 분석되었으며, circular type으로 확인됨. 과일썩음병원 유전체의 G+C contents는 68.56%로 A+T에 비해 높게 나타났으며, 약 4,861개 이상의 predicted CDS (coding DNA sequence)가 존재함. 또한 총 9개의 rRNA를 가지고 있으며, 63

개의 tRNA도 존재함. 또한 11-251는 과일썩음병균 유전체 염기서열 분석결과에서 열린 해독틀 (open reading frame, ORF)을 검색하여 유전자군을 확인한 결과, helicase, DNA polymerase, multidrug efflux rmd transporter permease subunit, histidine kinase, type iv secretion protein, diguanylate cyclase, peptide synthetase 등 다양한 유전자군이 확인됨. 본 유전체 분석결과에서는 핵외 유전물질은 plasmid DNA의 유전체 분석결과에는 도출되지 않아, 병원성 관련유전자, 약제 내성관련유전자는 확인하지 못함(그림 50, 51, 52, 53, 표 26).

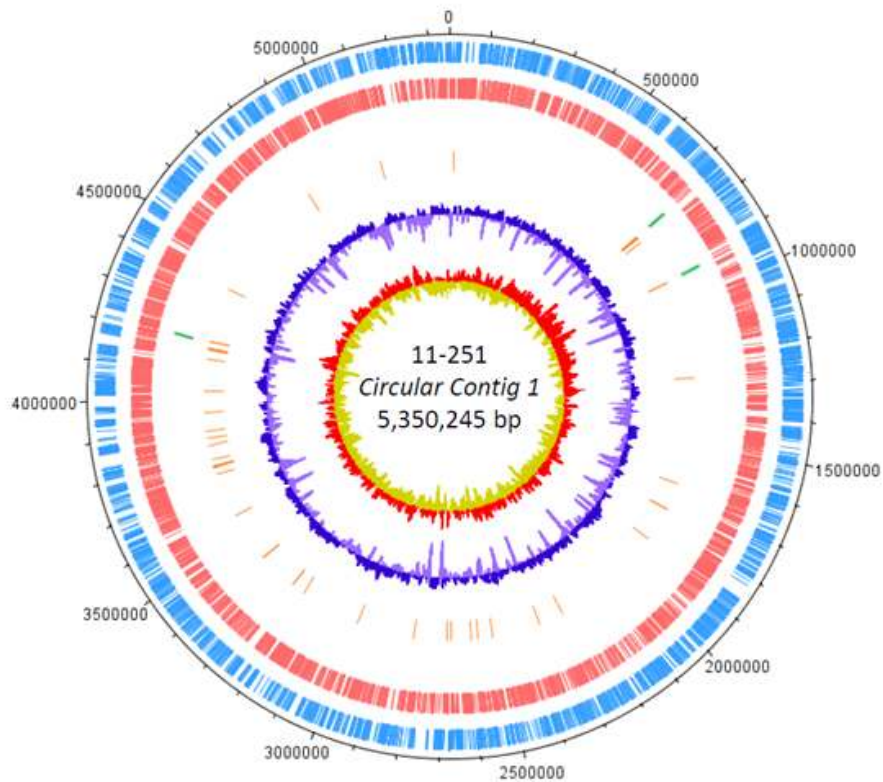


그림 50. 수박과일썩음병균 11-251 균주 유전체 분석결과

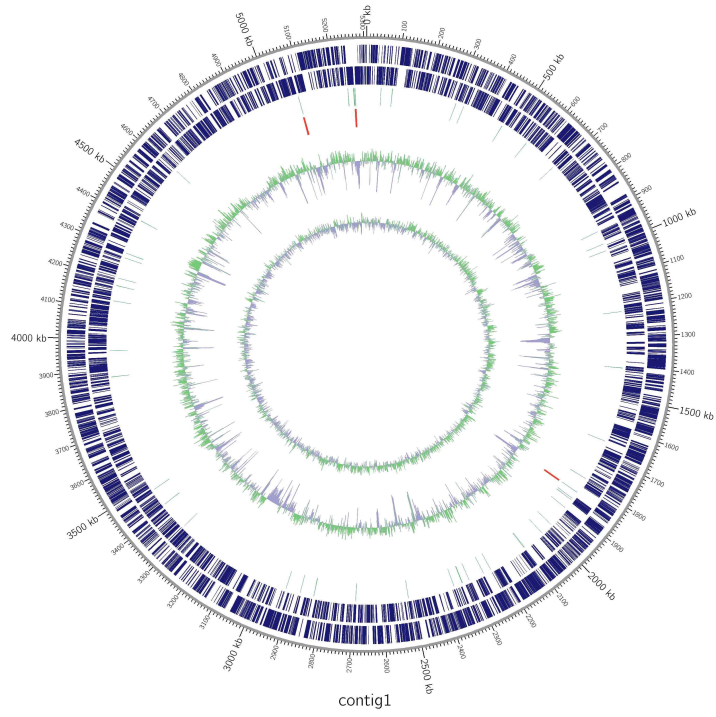


그림 51. 수박과일썩음병균 11-073 균주 유전체 분석결과

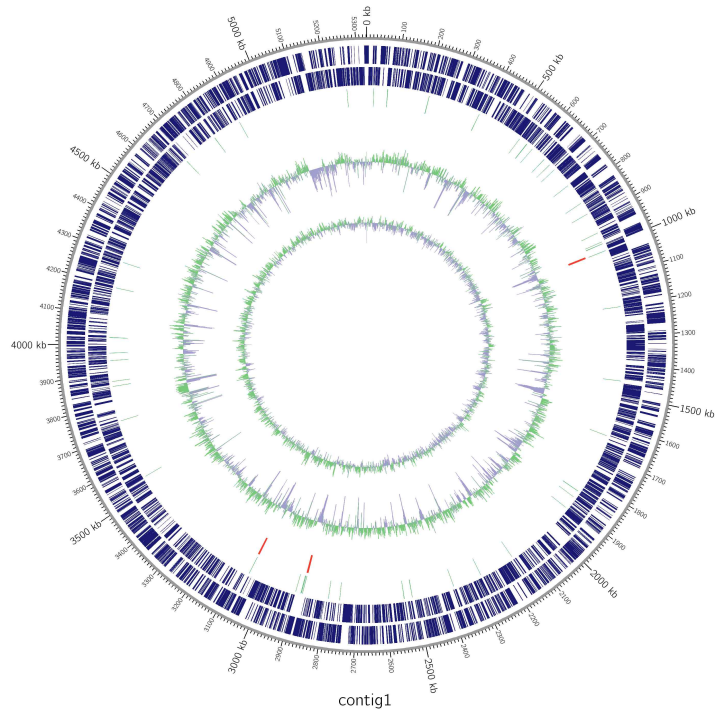


그림 52. 수박과일썩음병균 12-091 균주 유전체 분석결과

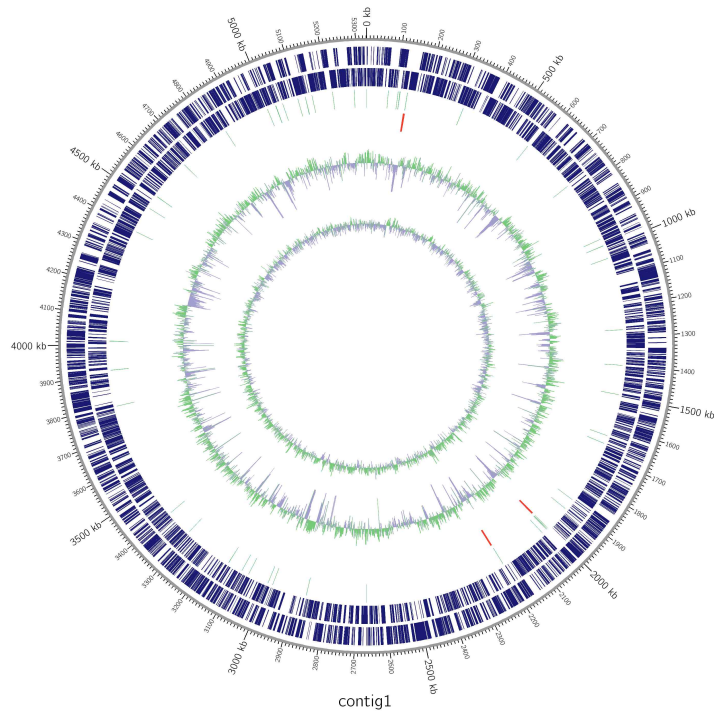


그림 53. 수박과일썩음병균 12-158 균주 유전체 분석결과

표 26. 수박과일썩음병균 *A. citrulli* (11-251)균주의 유전체 분석결과

No.	Description	Length	e-Value
1	type i restriction-modification system methyltransferase subunit	10185	0.00E+00
2	hypothetical protein Aave_1721 [<i>Acidovorax citrulli</i> AAC00-1]	8574	0.00E+00
3	peptide synthetase	7992	0.00E+00
4	chemotaxis protein	6495	0.00E+00
5	alpha-2-macroglobulin	6024	0.00E+00
6	excinuclease abc subunit a	5862	0.00E+00
7	tail length tape measure protein	5727	0.00E+00
8	prophage tail length tape measure	5508	0.00E+00
9	sugar-binding partial	5358	0.00E+00
10	thioester reductase	5340	0.00E+00
11	sugar-binding partial	5313	0.00E+00
12	sugar-binding partial	5040	0.00E+00
13	sugar-binding partial	5034	0.00E+00
14	4-alpha-glucanotransferase	4989	0.00E+00
15	type iv secretion protein rhs	4974	0.00E+00
16	damage-inducible protein	4908	0.00E+00
17	chemotaxis protein	4875	0.00E+00

18	sugar-binding protein	4815	0.00E+00
19	sugar-binding partial	4809	0.00E+00
20	yd repeat protein	4761	0.00E+00
21	type iv secretion protein partial	4752	0.00E+00
22	glutamate synthase	4743	0.00E+00
23	sugar-binding partial	4665	0.00E+00
24	chemotaxis protein	4608	0.00E+00
25	polyketide synthase	4608	0.00E+00
26	ntpase (nacht family)	4575	0.00E+00
27	pilus assembly protein	4503	0.00E+00
28	diguanylate cyclase	4464	0.00E+00
29	rhs element protein	4437	0.00E+00
30	hypothetical protein [<i>Acidovorax citrulli</i>]	4422	0.00E+00
31	peptide synthetase	4350	0.00E+00
32	dna-directed rna polymerase subunit beta	4236	0.00E+00
33	type iii effector	4197	0.00E+00
34	atp-dependent helicase	4164	0.00E+00
35	dna-directed rna polymerase subunit beta	4146	0.00E+00
36	peptide synthetase	4107	0.00E+00
37	membrane protein	4080	0.00E+00
38	o-antigen biosynthesis protein	4080	0.00E+00
39	phosphoribosylformylglycinamide synthase	4044	0.00E+00
40	proteophosphoglycan ppg4	4041	0.00E+00
41	tpr repeat-containing protein	4038	0.00E+00
42	a nuclease family of the hnh endo vii superfamily with conserved ahh	4008	0.00E+00
43	serine threonine protein kinase	3936	0.00E+00
44	fad-linked oxidase	3897	0.00E+00
45	glycosyl transferase family 2	3864	0.00E+00
46	protein of unknown function DUF748 [<i>Acidovorax citrulli</i> AAC00-1]	3846	0.00E+00
47	nitrate reductase a subunit alpha	3828	0.00E+00
48	diguanylate phosphodiesterase	3783	0.00E+00
49	transcriptional regulator	3750	0.00E+00
50	ribonucleoside reductase	3741	0.00E+00
51	conserved repeat domain protein	3684	0.00E+00
52	5-oxoprolinase	3663	0.00E+00
53	histidine kinase	3657	0.00E+00
54	type vi secretion protein	3630	0.00E+00
55	conserved hypothetical protein [<i>Acidovorax citrulli</i> AAC00-1]	3603	0.00E+00
56	conserved hypothetical protein [<i>Acidovorax citrulli</i> AAC00-1]	3603	0.00E+00
57	acriflavin resistance protein	3594	0.00E+00
58	atpase	3594	0.00E+00
59	mfs transporter	3576	0.00E+00

60	dna polymerase iii subunit alpha	3546	0.00E+00
61	chromosome segregation protein smc	3528	0.00E+00
62	helicase	3507	0.00E+00
63	chromosome segregation protein smc	3495	0.00E+00
64	transcription-repair coupling factor	3453	0.00E+00
65	histidine kinase	3438	0.00E+00
66	alpha-amylase	3429	0.00E+00
67	phage-related minor tail protein	3414	0.00E+00
68	tape measure domain protein	3414	0.00E+00
69	thioester reductase	3393	0.00E+00
70	diguanylate phosphodiesterase	3363	0.00E+00
71	carbamoyl phosphate synthase large subunit	3261	0.00E+00
72	multidrug efflux rnd transporter permease subunit	3246	0.00E+00
73	helicase	3237	0.00E+00
74	dna polymerase	3231	0.00E+00
75	nodulation protein	3213	0.00E+00
76	multidrug efflux rnd transporter permease subunit	3210	0.00E+00
77	acriflavin resistance protein	3204	0.00E+00
78	tpa: leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family partial	3189	0.00E+00
79	multidrug efflux rnd transporter permease subunit	3171	0.00E+00
80	cation transporter	3165	0.00E+00
81	awr type iii effector family protein	3165	0.00E+00
82	multidrug efflux rnd transporter permease subunit	3159	0.00E+00
83	diguanylate cyclase	3132	0.00E+00
84	ribonuclease e	3123	0.00E+00
85	dna polymerase	3099	0.00E+00
86	metal transporter	3087	0.00E+00
87	histidine kinase	3087	0.00E+00
88	acriflavin resistance protein	3078	0.00E+00
89	excinuclease abc subunit a	3072	0.00E+00
90	dead deah box helicase	3045	0.00E+00
91	type i restriction endonuclease subunit r	3024	0.00E+00
92	cation:proton antiporter	3021	0.00E+00
93	diguanylate phosphodiesterase	3015	0.00E+00
94	restriction endonuclease subunit r	2997	0.00E+00
95	transposase	2976	0.00E+00
96	glycine dehydrogenase	2967	0.00E+00
97	nitrate reductase subunit alpha	2961	0.00E+00
98	histidine kinase	2955	0.00E+00
99	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha	2952	0.00E+00
100	dna topoisomerase iii	2949	0.00E+00
101	conjugative transfer pfl_4706 family	2937	0.00E+00

102	cytochrome cbb3	2928	0.00E+00
103	helicase	2907	0.00E+00
104	conjugative transfer atpase	2895	0.00E+00
105	valyl-trna synthetase	2892	0.00E+00
106	aconitate hydratase	2892	0.00E+00
107	isoleucyl-trna synthetase	2880	0.00E+00
108	2-oxoglutarate dehydrogenase e1	2880	0.00E+00
109	molecular chaperone	2859	0.00E+00
110	hybrid histidine protein kinase	2856	0.00E+00
111	phosphoenolpyruvate carboxylase	2856	0.00E+00
112	alanyl-trna synthetase	2847	0.00E+00
113	competence protein	2847	0.00E+00
114	atpase aaa	2835	0.00E+00
115	translation initiation factor if-2	2832	0.00E+00
116	dna ligase	2820	0.00E+00
117	histidine kinase	2811	0.00E+00
118	membrane protein	2808	3.80E-15 5
119	dna polymerase i	2784	0.00E+00
120	atpase aaa	2778	0.00E+00
121	preprotein translocase subunit	2769	0.00E+00
122	signal peptide protein	2769	0.00E+00
123	(glutamate--ammonia-ligase) adenylyltransferase	2757	0.00E+00
124	gcn5 family acetyltransferase	2751	0.00E+00
125	proteophosphoglycan 5	2742	0.00E+00
126	diguanylate phosphodiesterase	2736	0.00E+00
127	rhs element vgr protein	2724	0.00E+00
128	methionine partial	2724	0.00E+00
129	aminopeptidase n	2712	0.00E+00
130	pyruvate dehydrogenase	2709	0.00E+00
131	hypothetical protein [<i>Acidovorax citrulli</i>]	2697	0.00E+00
132	leucyl-trna synthetase	2694	0.00E+00
133	nitric oxide synthase	2679	0.00E+00
134	dna mismatch repair protein	2673	0.00E+00
135	histidine kinase	2670	0.00E+00
136	virulence protein e	2664	0.00E+00
137	diguanylate cyclase	2661	0.00E+00
138	dna gyrase subunit a	2661	0.00E+00
139	exonuclease	2652	0.00E+00
140	excinuclease abc subunit a	2652	0.00E+00
141	pyruvate dehydrogenase	2643	0.00E+00
142	dna gyrase subunit b	2634	0.00E+00
143	diguanylate phosphodiesterase	2619	0.00E+00

144	protein disaggregation chaperone	2610	0.00E+00
145	pII uridylyl-transferase	2607	0.00E+00
146	glucose dehydrogenase	2607	0.00E+00
147	abc transporter permease	2601	0.00E+00
148	parB-like partition protein	2595	0.00E+00
149	pts fructose transporter subunit iia	2592	0.00E+00
150	bifunctional aconitate hydratase 2 2-methylisocitrate dehydratase	2592	0.00E+00
151	cyanophycin synthetase	2586	0.00E+00
152	hypothetical protein [<i>Acidovorax citrulli</i>]	2577	0.00E+00
153	mechanosensitive ion channel protein	2571	0.00E+00
154	peptidase	2553	0.00E+00
155	diguanilate phosphodiesterase	2553	0.00E+00
156	penicillin-binding protein 1a	2541	0.00E+00
157	abc transporter permease	2532	0.00E+00
158	dna methylase n-4	2532	0.00E+00
159	histidine kinase	2529	0.00E+00
160	type iv secretion protein rhs	2526	0.00E+00
161	rhs element vgr protein	2526	0.00E+00
162	rhs element vgr protein	2526	0.00E+00
163	histidine kinase	2520	0.00E+00
164	type iv secretion protein rhs	2517	0.00E+00
165	dna methylase n-4	2508	0.00E+00
166	coagulation factor 5 8 type domain protein	2505	0.00E+00
167	y4033_aciac ame: full/upf0753 protein aave_4033	2478	0.00E+00
168	aldehyde oxidase	2472	0.00E+00
169	lps-assembly protein	2463	0.00E+00
170	dna-dependent helicase	2457	0.00E+00
171	atpase p	2457	0.00E+00
172	general secretion pathway protein d	2454	0.00E+00
173	nitrite reductase	2454	0.00E+00
174	conjugal transfer protein	2451	0.00E+00
175	phenylalanyl-trna synthetase subunit beta	2439	0.00E+00
176	general secretion pathway protein d	2433	0.00E+00
177	atp-dependent protease 1a	2427	0.00E+00
178	fimbrial assembly protein	2421	0.00E+00
179	acylase	2412	0.00E+00
180	phosphohydrolase	2406	0.00E+00
181	3-hydroxyacyl-dehydrogenase	2403	0.00E+00
182	atp-dependent dna helicase	2397	0.00E+00
183	phosphoenolpyruvate synthase	2391	0.00E+00
184	hypothetical protein [<i>Acidovorax citrulli</i>]	2388	0.00E+00
185	lysine decarboxylase	2382	0.00E+00

186	radical sam protein	2379	0.00E+00
187	crispr-associated protein cas3	2379	0.00E+00
188	aldehyde oxidase	2376	0.00E+00
189	family type vi secretion-associated protein	2367	0.00E+00
190	helicase	2367	0.00E+00
191	rna-binding protein	2367	0.00E+00
192	rhs element vgr protein	2358	0.00E+00
193	dna topoisomerase iv subunit a	2358	0.00E+00
194	penicillin-binding protein 1c	2355	0.00E+00
195	atp-dependent clp protease atp-binding protein	2352	0.00E+00
196	diguanylate phosphodiesterase	2349	0.00E+00
197	rna polymerase sigma factor	2346	0.00E+00
198	conserved protein	2343	0.00E+00
199	chemotaxis protein	2343	0.00E+00
200	family type vi secretion-associated protein	2343	0.00E+00
201	conserved protein	2343	0.00E+00
202	uncharacterized protein precursor	2340	0.00E+00
203	salicylyl-5-hydroxylase	2337	0.00E+00
204	oxidoreductase alpha subunit	2334	0.00E+00
205	fha domain containing protein	2334	0.00E+00
206	hydroxymethylpyrimidine phosphomethylpyrimidine kinase	2325	0.00E+00
207	ribonuclease r	2316	0.00E+00
208	malic enzyme	2313	0.00E+00
209	penicillin-binding 1a family	2313	0.00E+00
210	dead deah box helicase	2313	0.00E+00
211	fusc-like domain-containing protein	2307	0.00E+00
212	diguanylate cyclase	2307	0.00E+00
213	heavy metal translocating p-type atpase	2304	0.00E+00
214	s n-oxide molybdopterin guanine dinucleotide-dependent	2304	0.00E+00
215	malic enzyme	2301	0.00E+00
216	membrane protein	2298	0.00E+00
217	portal protein	2298	0.00E+00
218	aldehyde dehydrogenase	2295	0.00E+00
219	membrane assembly protein	2289	0.00E+00
220	cell division protein	2280	0.00E+00
221	histidine kinase	2277	0.00E+00
222	phospholipase c	2274	0.00E+00
223	hypothetical protein [<i>Acidovorax citrulli</i>]	2274	0.00E+00
224	type iii secretion system effector protein	2274	0.00E+00
225	family integral membrane protein	2271	0.00E+00
226	rhs element vgr protein	2271	0.00E+00
227	polynucleotide phosphorylase polyadenylase	2271	0.00E+00

228	protein-disulfide reductase	2268	0.00E+00
229	ppgpp synthetase	2268	0.00E+00
230	rhs element vgr protein	2268	0.00E+00
231	gtp pyrophosphokinase	2262	0.00E+00
232	conjugal transfer protein	2259	0.00E+00
233	3-hydroxyacyl-dehydrogenase	2253	0.00E+00
234	histidine kinase	2253	0.00E+00
235	xanthine dehydrogenase	2250	0.00E+00
236	rhs element vgr protein	2247	0.00E+00
237	peptidase	2244	0.00E+00
238	ligand-gated channel protein	2238	0.00E+00
239	chemotaxis protein	2238	0.00E+00
240	polyphosphate kinase	2232	0.00E+00
241	abc transporter	2232	0.00E+00
242	diguanylate phosphodiesterase	2232	0.00E+00
243	hydroperoxidase	2232	0.00E+00
244	diguanylate cyclase	2229	0.00E+00
245	atp-dependent dna helicase	2226	0.00E+00
246	hypothetical protein [<i>Acidovorax citrulli</i>]	2226	0.00E+00
247	ligand-gated channel protein	2214	0.00E+00
248	malate synthase	2214	0.00E+00
249	transposase	2211	0.00E+00
250	membrane protein	2211	0.00E+00

(6) 수박 과실썩음병 발생조사 및 토양 내 생존 여부 확인

2015년 6월과 7월 사이 전북 2개소에서 과실썩음병의 발생을 조사한 결과, 발병이 없었음. 또한, 토양 내 과실썩음병의 생존여부를 과실썩음병 진단용 키트로 조사한 결과, 토양 내에는 과실썩음병균이 존재하지 않았으며, 2015년도의 경우, 6월과 7월 강우가 적어, 과실썩음병 발생 조건을 좋지 않았음. 향후 육묘장을 중심으로 발생 조사를 계획함. 2015년 6월과 7월 전북 고창과 부안의 수박 재배 농가를 대상으로 과실썩음병 발생상태를 조사한 결과, 과실썩음병 발생이 없었음. 지역별 3개 이상 농가를 조사하였고, 하우스와 노지를 조사하였으나 발생하지 않았음. 또한, 토양 내 과실썩음병균의 생존여부를 확인하기 위해 토양샘플을 채취, 희석 후 과실썩음병균 간이 검정키트로 확인해본 결과, 과실썩음병균이 검출되지 않았음. 2015년도 고창의 경우 강우량이 전년도에 비해 감소하였기 때문에 과실썩음병 발생이 없는 것으로 판단되며, 노지, 하우스 모두에서 발생이 없었음. 따라서 내년 2월까지 박과작물을 재배하는 육묘장을 중심으로 과실썩음병 발생유무를 조사할 예정임(그림 54, 55).

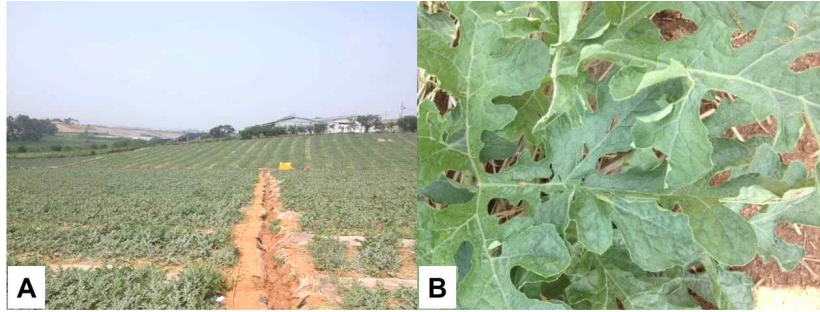


그림 54. 전북 고창 수박 과실썩음병 조사 지역
(A: 조사농가 전경, B: 건전 수박 잎)

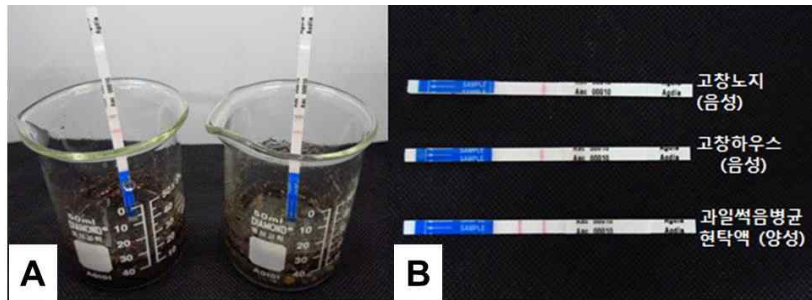


그림 55. 토양 내 존재하는 과실썩음병원균 조사 결과
(A: 토양샘플 희석조사, B: 조사결과-음성)

(7) 박과작물에 대한 과실썩음병원균 균주별 교차병원성 검정 결과

2016년도 채집한 박과류에 발생하는 과실썩음병원균 중 *Acidovorax citrulli*와 *Acidovorax valerianellae* 2종을 이용하여 3종의 박과작물에 대해 병원성 검정을 실시함. 그 결과, 수박에서 분리한 *Acidovorax citrulli* 분리균주는 오이, 수박, 메론에서 모두 병원성이 있는 것으로 확인됨. 또한, 메론에서 분리한 *A. valerianellae* 역시 오이, 수박, 메론에 모두 병원성을 가지는 것으로 확인됨. 3종의 박과작물에서 발생하는 *Acidovorax* spp. 균주들은 모두 교차병원성을 가지는 것으로 확인됨. 이러한 결과가 가지는 중요성은 국내 육묘장의 경우, 박과작물을 대부분 육묘, 재배하여 판매하기 때문에 일부 박과작물에서 발생한 과일썩음병원균이 육묘단계에서 다른 박과작물로 감염될 수 있다는 것을 의미함. 또한, 육묘장의 대부분이 배드를 구분하지 사용하므로, 오염된 상토나 오염된 배드를 세척하지 않고 반복적으로 사용할 경우에도 과일썩음병의 발생이 조장될 수 있다는 우려가 있음(그림 56).

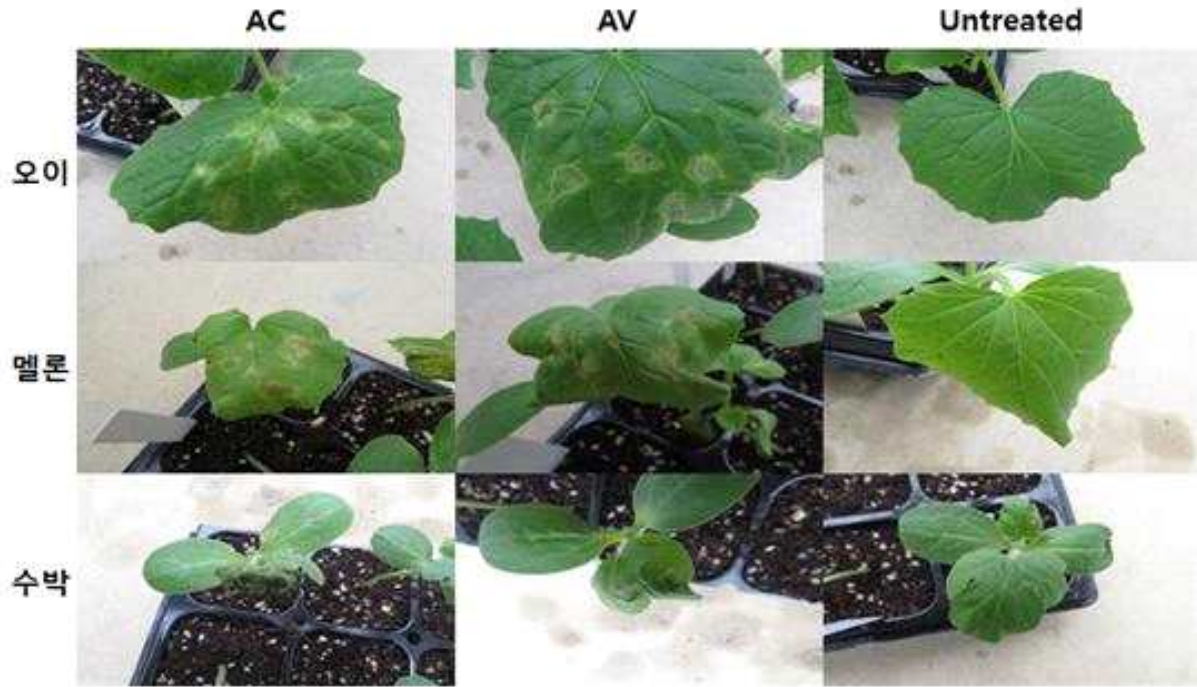


그림 56. 박과작물에 발생하는 *Acidovorax* spp. 균주의 교차병원성 검정 (AC: *A. citrulli*, AV: *A. valerianellae*, untreated: 무처리)

4. BFB (Bacterial Fruit Blotch)균 감압처리 및 감염 종자 검정

가. 연구 방법

(1) BFB균 감압처리

기존의 침지처리법을 이용한 이병 수박종자 생산은 감염효율이 떨어지는 단점으로 인해 살균제 처리 및 열수처리에 따른 과실썩음병 방제에 대한 연구에 어려움을 겪고 있었음. 이에 감압처리에 따른 이병 수박종자를 제작하는 방법을 고안하였고, 최적의 감압처리 조건을 설정하고 수박 이병종자 생산을 대량화하고 그 감염비율을 높이하고자 함. 수박종자의 품종별로 감압처리 조건에 따른 감염율을 확인하고자 포미나 수박, 슈퍼꿀 수박, 꿀나라 수박 등 3품종에 대해 동일한 조건으로 감압처리를 실시함. 한 품종 당 36 g씩 15개의 처리구로 나눠 감압처리를 수행하였고, 감압처리에 사용한 균주는 국립원예특작과학원에서 보유한 수박에서 분리한 과실썩음병균 11-251 균주를 사용함(병원성 확인). 본 균주를 감압처리에 사용하기 위해 LB액체 배지에 160 rpm 으로 24시간 배양함. 감압처리 조건으로 과실썩음병균의 접종농도를 단계별(10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9)로 나누고 접종시간을 단계별(10분, 20분, 30분)로 나눠서 이병종자를 생산하고 그 효율을 검정함.

(2) 감압처리 제작기술 이전(국립원예특작과학원 → 강원대)

감압종자의 효율적인 생산을 위하여 원예특작과학원으로부터 수박 종자 생산 기술을 이전 받아 강원대학교 에서도 감압 처리된 이병 종자를 생산 하였다. 이전 받은 기술 내용은 각각의 3개 품종을 농협 종묘로부터 분양받아 수집된 균주(11-251)를 LB배지에 24시간 16 rpm 배양하여 필요 농도로 PBS버퍼를 이용하여 희석하여 접종농도 및 처리시간별로 나누어 처리하는 방법을 이전 받아 실시하였다.

(3) BFB균 감염 종자 검정

BFB균 감염 종자의 확보를 위하여 감압 접종법을 이용하여 감염종자를 확보하였다. 감염 종자는 먼저 1×10^8 으로 액체 배양하여 감압 장치에 종자를 함께 넣어 감압하여 종피 및 종실내부에 균이 침투 할 수 있도록 하여 감염종자를 확보 하였다. 3개 품종의 수박 종자를 확보하여 실험하였으며, 실험 방법은 감염종자의 종피 및 종실의 감염 여부를 확인하기 위하여 종피의 경우 감염 종자 10개를 Serial dilution법을 이용하여 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} 까지 순차적으로 희석 하여 TSA배지에 도말 접종 $28^{\circ}\text{C}/48\text{h}$ 동안 배양하여 균수를 조사하였다(그림 57). 종실의 경우 10개의 감염종자를 표면살균(Ethanol 70% 1min, 15% 30sec, 3회 세척)을 한 후, 종피를 제거하여 종자의 배유(Endosperm)부분을 재취하여 같은 방법으로 희석하여 감염 정도를 조사 하였다.

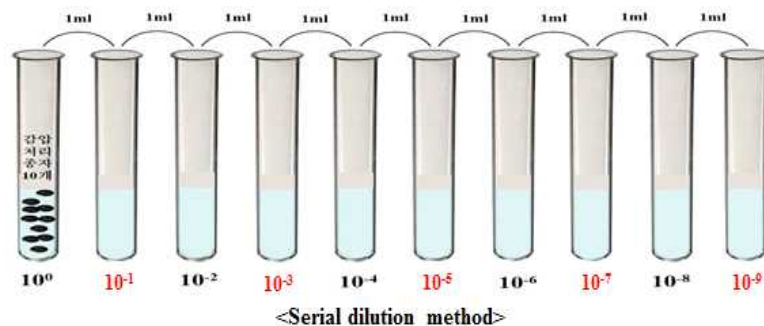


그림 57. 감염종자의 Serial dilution방법

(4) 수박 포장에서의 인공수정을 통한 감염 종자 확보

기내의 감압처리를 통한 감염종자 확보뿐만 아니라 포장에서의 인공 접종에 의한 감염 종자를 확보하기 위하여 4개의 품종을 대상으로 포장 접종 실험을 실시하였다. 각각의 품종을 정식하여 꽃이 피기를 기다렸다가 수집된 균주 11-251을 TSB배지에 24시간 배양하여 배양액을 4배 희석하여 인공수정 접종 하였다. 1차로 접종을 한 후 수정 하였으며, 2차는 수정 후 접종하여 두 가지 방법을 이용하여 실시하였다. 인공 접종은 암꽃의 주두에 수꽃의 화분을 접촉하여 수정 하여 감염 여부를 확인 하였다.

나. 연구 결과

(1) BFB균 감압처리

감압 처리하여 준비된 종자의 종자 감염여부를 확인하기 위하여 3개 품종을 대상으로 감압 처리를 실시하였다. 실험은 각각 종피와 종실의 감염여부를 확인 하였는데, 종피의 경우 희석 배수 별로 확인 결과 3개 품종 모두에서 감염이 되었음을 확인 할 수 있었다. 감염 정도는 높은 것으로 보이지 않으나 건전 종자에 비하여 많은 균이 분리된 것을 확인 하였다. 종실의 경우 역시 종피에 비하여 감염 정도는 낮으나 감압처리가 종실에까지 세균을 감염 시킨 것을 확인 하였다(표 27). 현재 감염 정도가 낮아 여러 가지 농도와 감압처리 시간을 달리하여 종자 감염 실험실시하고 있으며, 계속 여러 방법을 이용하여 감염종자 확보에 주력할 계획이다. 또한 2015년 감압처리를 이용한 이병 수박종자 제작을 통해 2015년도 3회 이병 수박종자를 생산하여 제 1세부과제 연구재료로 사용함. 또한, 제 1 세부과제 책임자에게 이병 수박종자 제작기술을 이전하고, 시스템을 구축함. 감압처리 조건에 따른 이병 수박종자 제작기술을 이용하여 3종의 수박품종(슈퍼꿀, 포미나, 꿀나라 수박)을 이병 수박종자로 제작하여 제 1세부과제로 전달 함. 감압처리별로 이병 수박종자의 감염율은 처리시간이 길수록, 접종농도가 1×10^7 cfu/ml 일수록 높게 나타남. 하지만 1×10^9 cfu/ml에서는 감염율이 증가하진 않았음.

표 27. 수박 종피 및 종실 감염 콜로니 카운팅

수박 종피		Dilution rate				
		10^{-1}	10^{-3}	10^{-5}	10^{-7}	10^{-9}
3배체 수박	Vacuum inoculation	1,689.33	62.22	7017	1.92	1.78
	Control	23.67	0.22	0.44	0	0.84
세로나꿀 수박	Vacuum inoculation	120.5	1.56	1.00	0	0.42
	Control	60.4	2	0.33	0.33	18.17
꿀나라 수박	Vacuum inoculation	16.55	0.83	1.67	6.17	31.88
	Control	4.83	0.84	0.67	0	1.16
수박 종실		Dilution rate				
		10^{-1}	10^{-3}	10^{-5}	10^{-7}	10^{-9}
3배체 수박	Vacuum inoculation	UC*	507.39	41.77	45.63	43.13
	Control	UC*	563.73	343.41	355.83	348.97
세로나꿀 수박	Vacuum inoculation	129.92	79.83	71.65	71.49	75.73
	Control	289.89	533.74	477.78	572.47	440.35
꿀나라 수박	Vacuum inoculation	17.02	0.58	0.15	0.17	0.11
	Control	217.48	144.04	153.93	145.56	142.72

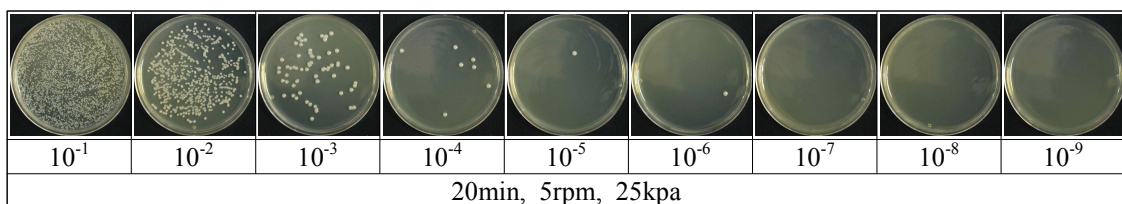
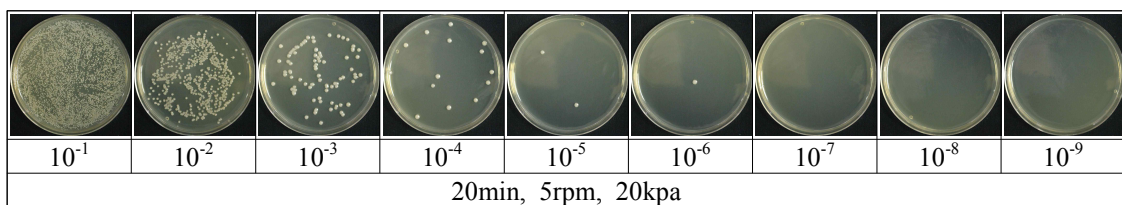
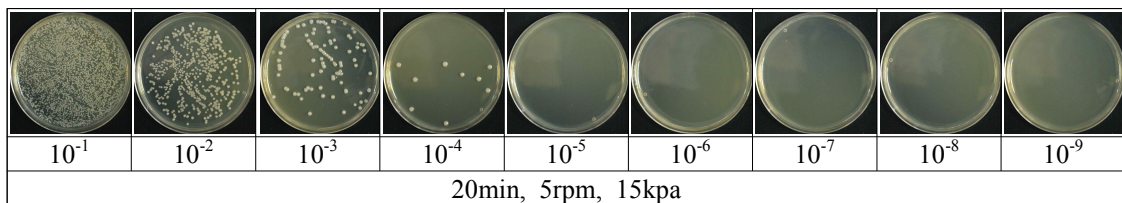
*UC : Uncountable

(2) 감압처리 제작기술 이전(국립원예특작과학원 → 강원대)

감압처리는 원예특작과학원에서 이전 받은 방법을 약간 변형하여 효율적인 감염종자 확보를 위하여 실험을 실시하였다. 실험은 포미나 품종을 이용하여 실험하였다. 실험 결과 20분 동안 감압 처리에서는 5 rpm의 일정한 교반속도로 20분 동안 3가지 다른 압력 조건에서 인공감염이 잘 되는지 확인하였다. 감압 처리한 종자의 종실을 잘게 으깨 희석하여 도말하여 colony counting한 결과, 20 kpa 압력의 조건에서 가장 많은 colony 형성을 하였다. 3가지 압력으로 처리한 종자를 도말하여 나타난 colony 형성은 10배 희석하였을 때 가장 많이 나타났다. 또한 30분 동안 감압 처리한 조건에서는 5 rpm의 일정한 교반속도로 30분 동안 3가지 다른 압력 조건에서 인공감염이 잘 되는지 확인하였다. 감압 처리한 종자의 종실을 잘게 으깨 희석하여 도말하여 colony counting한 결과, 20분 동안 감압처리를 한 결과와 마찬가지로 20 kpa 압력의 조건에서 가장 많은 colony 형성을 하였다. 다음을 25 kpa에서 많은 colony 수를 확인하였고 15 kpa에서 가장 적은 colony 수를 확인하였다(표 28, 그림 58).

표 28. 감압처리 조건을 달리한 감염종자 콜로니 개수

시간	속도	압력	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
20min	5rpm	15kPa	5,170.00	933.33	84.33	10.33	0.67	0.67	0.00	0.00	0.00
		20kPa	5,616.00	966.00	94.67	12.33	1.33	0.33	0.00	0.00	0.00
		25kPa	3,669.33	708.67	64.67	6.00	0.33	0.33	0.00	0.00	0.00
30min	5rpm	15kPa	4,626.67	775.33	78.33	5.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		20kPa	6,246.00	1,866.67	264.67	40.67	5.00	5.67	1.33	0.00	0.00
		25kPa	5,495.33	1,458.00	281.00	29.33	2.67	1.00	0.00	0.00	0.00



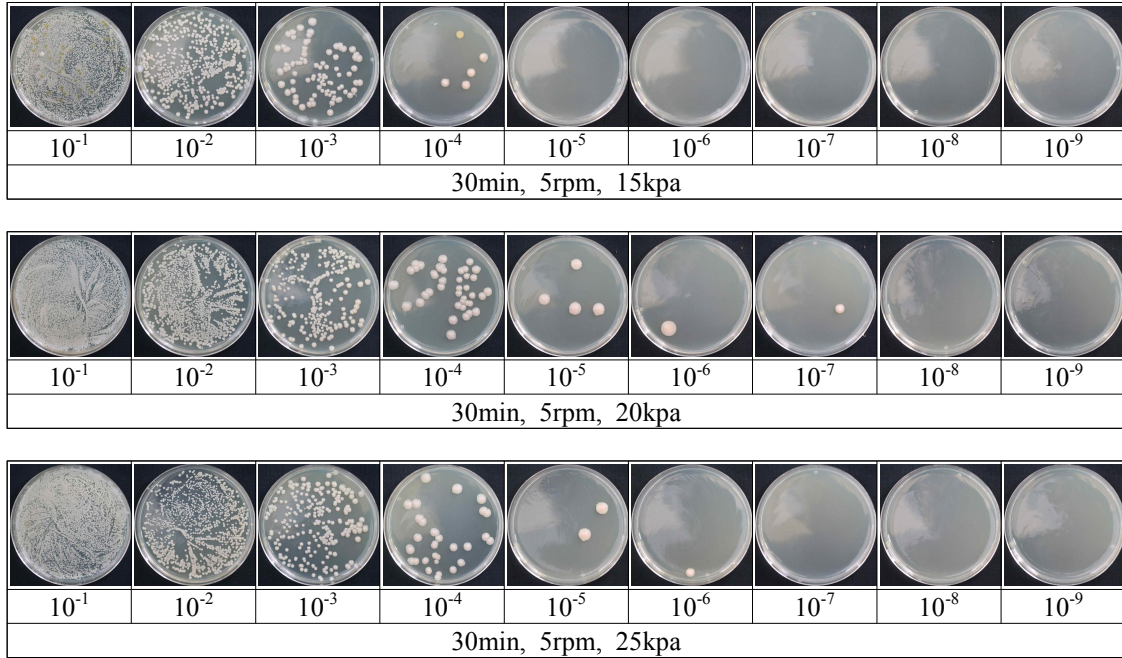


그림 58. 처리시간 및 감압조건을 달리한 접종 종자의 감염 정도 검정

(3) 수박 포장에서의 인공접종을 통한 BFB균 종자 감염 경로 확인

수박의 개화기 동안 BFB균 종자감염 및 감염경로를 확인하기 위하여 강원대학교 농장 포장에서 실험을 실시하였다. 각각의 처리는 4개 품종을 이용하여 실시하였으며, 수정 후 접종, 접종 후 수정으로 실험 결과, 실험당시 접종 농도가 너무 높아 포장 전체에 수박 과실썩음병이 발병하여 더 이상 실험을 진행할 수 없었다. 하지만 처리조건별로 결실 과실을 확보 할 수 있었으며, 확보한 과실에서 종자를 채종 하여 감염여부를 확인 하였으며, 4개 품종 모두에서 BFB균 감염을 확인할 수 있었다(표 29). 하지만 무처리 구에서도 감염이 확인 되었으며, 이는 포장 전체에 과실썩음병 발병으로 감염되어진 것으로 사료 된다. 추후 실험에서는 접종 농도를 조절하여 실험을 할 계획이다.

표 29. 하우스 포장에서의 인공수정을 통한 종자의 감염여부 검정

Dilution factor	Name of variety											
	태양꿀			삼복꿀			복중꿀			종은꿀		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
10 ⁻¹	5.6	UC	UC	-	UC	UC	4.5	UC	UC	UC	UC	UC
10 ⁻²	1.5	UC	UC	-	UC	UC	2	UC	UC	UC	UC	UC
10 ⁻³	1.5	204	UC	-	UC	76.6	1	UC	UC	UC	UC	UC
10 ⁻⁴	0.8	103	UC	-	UC	39.8	-	489.6	UC	UC	UC	UC
10 ⁻⁵	0.6	39	566.3	-	UC	11	-	356.3	406.1	42.5	601.8	509.1
10 ⁻⁶	3.6	13	395.3	-	UC	-	-	150.6	195.1	20	464	192.1
10 ⁻⁷	-	-	190	-	180.5	-	-	53	190.6	10.5	218.3	42.5
10 ⁻⁸	-	-	51.3	-	150	-	-	31.6	82.5	6	71.5	30.5
10 ⁻⁹	-	-	12.1	-	119	-	-	16.5	38.5	1	19.8	9.6

Note: A: Control, B: 접종 후 수정, and C: 수정 후 접종. UC: Uncountable.

5. 각종 BFB (Bacterial Fruit Blotch)균의 병원성 검정

가. 연구 방법

(1) 수박 종자 확보

시판되는 수박 품종들 중 BFB 균에 대해 저항성을 가지는 품종을 스크리닝을 위해 농우바 이오에서 시판되는 품종인 스피드꿀수박, 우리꿀수박, 환상꿀수박, 금보수박, 부라보꿀 수박, 윈더풀꿀 수박, 스피드플러스꿀수박, 태양꿀수박 8종류를 확보하였고, 농협종묘에서 시판되는 신동꿀수박, 해동꿀수박, 새로나꿀 수박, 꿀나라 수박, 슈퍼꿀수박 5종류를 확보하였다. 또한 국내 종자회사인 동부한농, 신젠타 코리아, 아시아종묘, 코레곤, 삼성종묘 등 각사의 수박종자를 수집 중에 있다.

(2) 각 균주의 병원성 활력 테스트

BFB 균주 48종의 활력을 테스트하기 위해 각각의 균을 TSA배지에 배양 후 1×10^8 cfu/ml 농도로 희석하여 사용하였다. 수박은 50공 포트에 발아 파종하여 3주간 생육시킨 후, 각각의 배양된 균을 스프레이 처리하여 접종하였으며, 접종 후 3일 동안 100% 습도를 유지하였고, 10일 후 발병정도를 조사하였다.

나. 연구 결과

KACC에서 분양받은 12종류의 균주 중 정도의 차이는 있었지만 10종류는 발병이 확인되었으나 2종류에서는 발병이 되지 않았다. 또한 농촌진흥청에서 수집한 34종류 중 수집 시기별로 정리된 균주 12종류의 균주를 접종하였고 발병을 모두 확인할 수 있었다(그림 59). 또한, 현재까지 확보한 13종류의 수박종자에 대해 저항성 스크리닝을 준비하고 있으며, 접종균주는 KACC 16998로 수행할 예정이다. 또한 시판되고 있는 타사의 수박종자를 확보하여 저항성 정도를 확인해 볼 예정이다.

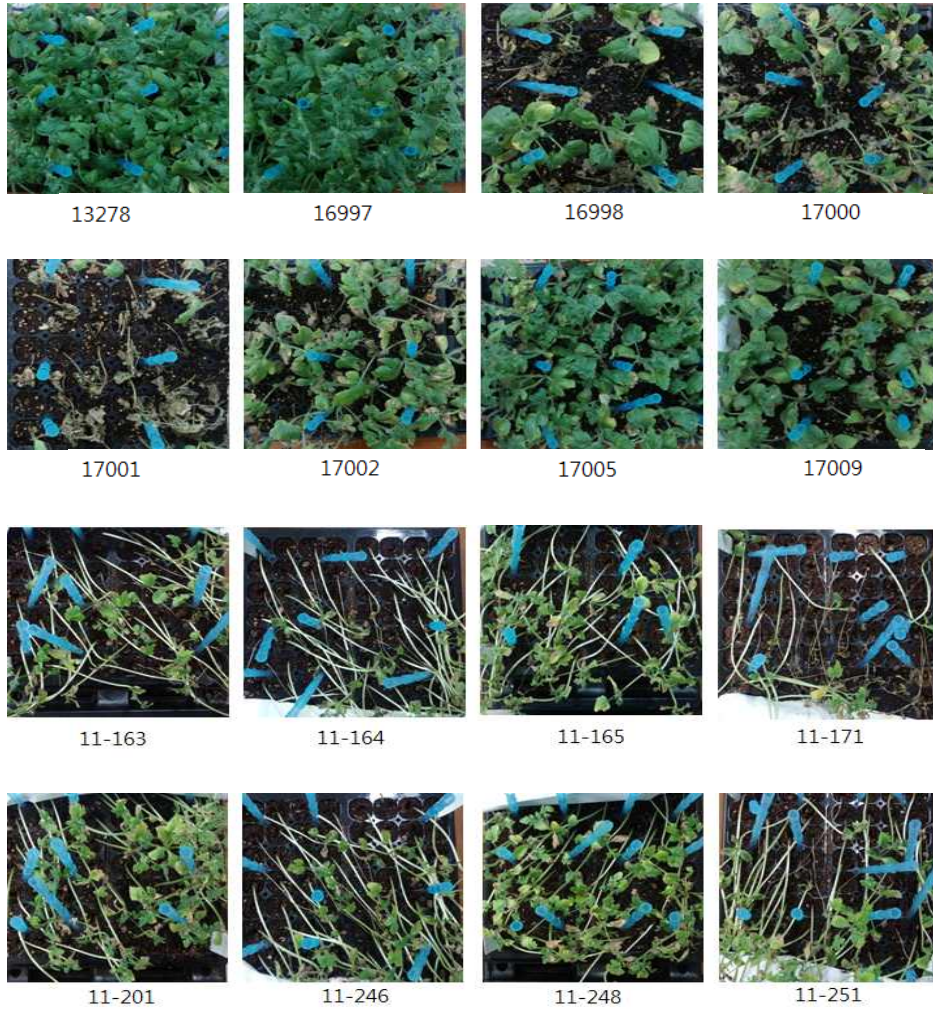


그림 59. 수박을 파종 육묘하여 수집된 BFB균의 병원성 검정

6. 감염종자 멸균처리 기술개발/무균종자 생산 및 종자처리 기술 개발

가. 연구 방법

(1) 고온처리기술 활용(건열 및 습열 처리)

BFB (Bacterial Fruit Blotch)균 감염종자의 멸균처리 기술 개발을 위하여 최고 65°C를 이용하여 한계 온도설정을 검정하기 위하여 건열처리와 습열처리 두 가지 방법을 수행하였다. 실험은 3반복 실시하였으며, 건조처리는 감압처리 한 종자를 건조하여 사용하였으며, 습열 처리는 7시간 동안 실온에서 침지하여 습열처리에 사용하였다. 온도 조건은 최초 35°C에서 시작하여 한 시간 간격으로 5°C씩 천천히 온도를 올려 최종 65°C가 되도록 처리하였다(그림 60, 61).



그림 60. 감염 수박 종자의 건열처리 및 습열 처리 방법

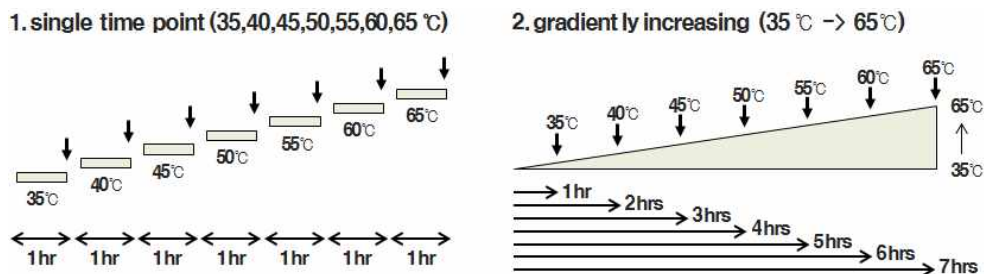


그림 61. 온도별 고온처리(1)와 35°C에서부터 온도구배를 주어 서서히 온도별 고온처리(2) 조건

나. 연구 결과

(1) 고온 처리 방법별 발아율 테스트

위의 두 가지 방법으로 온도별 열처리한 종자를 파종하고 4일후 발아율을 관찰 하였으며, 흰색 점선 박스는 발아되지 않은 종자를 나타낸다. 65°C에서 1시간 습열처리의 경우, 발아율이 0% 였으며, 반면에 온도를 서서히 올려 65°C에서 1시간 습열처리한 수박종자의 경우, 95% 이상의 발아율을 확인 하였다. 전반적으로 습열처리 종자의 경우, 발아 속도가 빨랐음. 고온 처리 방법별 발아율 테스트를 통해, 종자의 발아율에 영향을 주지 않으면서 멸균 효과를 보일 것으로 생각되는 방법 및 온도를 선정함(온도를 서서히 올려 65°C에서 습열처리한 방법) (그림 62).

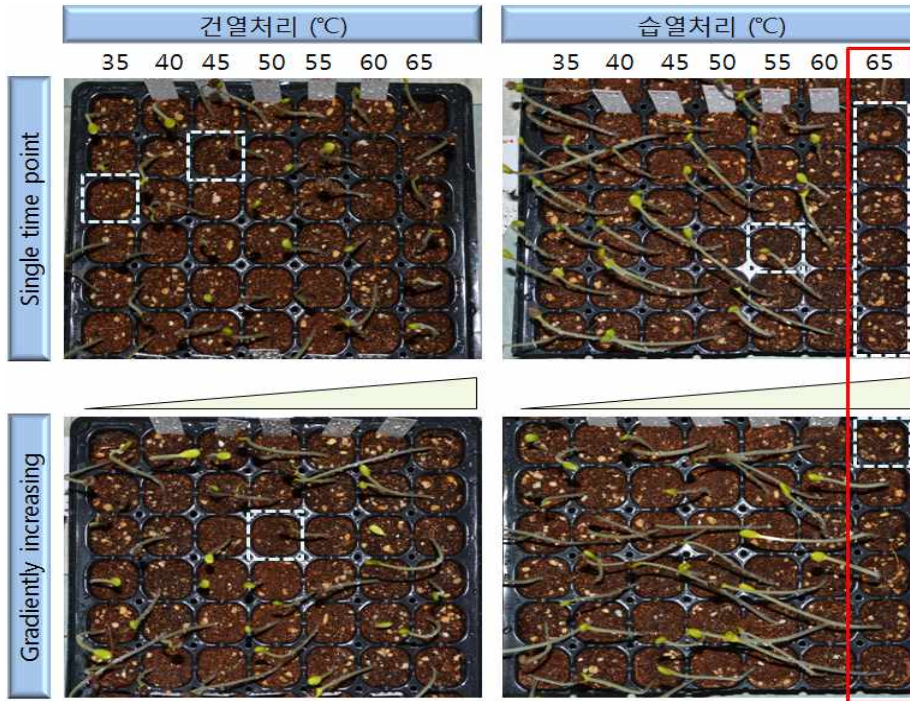


그림 62. 각 온도별 고온처리(윗줄)와 35°C에서부터 온도구배를 주어 서서히 온도별 고온처리(아랫줄)한 종자의 발아율 관찰

(2) 습열처리를 이용한 BFB 감염 수박종자의 멸균 효과 테스트

감압장치를 이용한 BFB 감염 수박종자 이용하여, 서서히 온도를 65°C까지 올린 시점에서 각각 0, 1, 2, 3시간 습열처리 후, 종자 파종 및 BFB 병징 관찰, 각각 시간별 5개씩 처리하여 파종 후 발아 및 병징 상태 비교. 2시간 습열처리에서 4개중 1개의 수박 새싹에서만 병징을 확인. 서서히 습열처리를 하여 65°C에서 각각 0 ~ 3시간 처리를 한 BFB 감염된 수박종자에서 95% 이상의 살균효과를 보임(그림 63, 표 30).

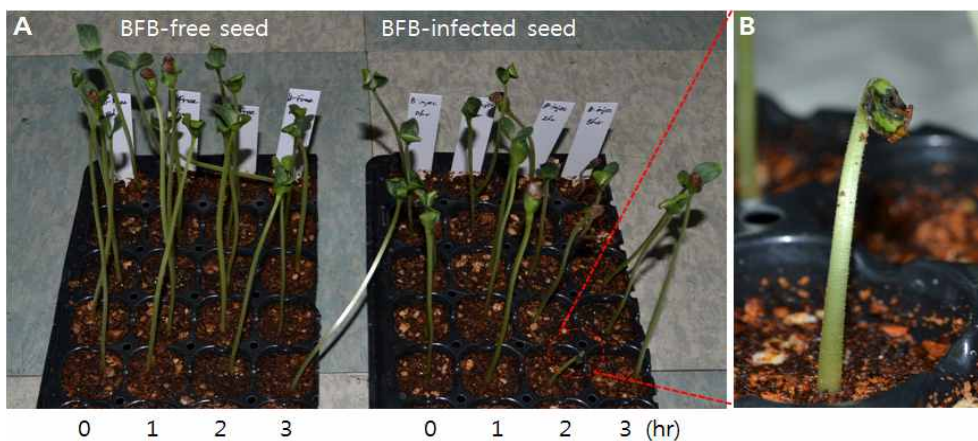


그림 63. BFB 감염 수박종자의 습열처리. (A) 습열처리 후, 건전 수박종자(BFB-free seed)와 BFB 감염 수박종자(BFB-infected seed)의 발아 상태 및 새싹에서의 병징 관찰을 통한 BFB 병원균 사멸 효과 비교. (B) 습열처리로 BFB 멸균되지 않은 수박 새싹의 병징 관찰

표 30. 건전 수박종자(H)와 BFB 감염 수박종자(B)의 시간별 습열처리 후 BFB 병징 관찰

sample No.	습열처리 (hr)							
	0		1		2		3	
	H	B	H	B	H	B	H	B
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	+	-	-
Avg.	0	0	0	0	0	1	0	0

∴ 무병징 수박 새싹, +: 병징을 보이는 수박 새싹, H: 건전 종자, B: BFB세균 감염 종자

7. 저온 플라즈마를 이용한 소용량 종자소독법 개발

가. 연구방법

(1) 종자소독용 저온플라즈마 장비 제조

플라즈마를 이용한 종자 소독법 개발을 위하여 저온플라즈마 장치를 철원플라즈마기술원에
서 제조하였다. 플라즈마 발생장치는 인가 전력은 30~1kw, 플라즈마는 기체는 공기와 아르곤을
이용하였다. 플라즈마 발생 압력은 진공으로 0.3pa 이다. 구성은 플라즈마 전력조절장치, RF 플
라즈마발생장치로 구성 되어있다(그림 64).



그림 64. 종자소독용 소형 저온플라즈마장비. (A) 장비 전경, (B) 플라즈마 발생 챔버, (C) 플라즈마 발생 챔버 내 유리 챔버, (D) 플라즈마 power 조절기

(2) 수박종자 발아에 영향을 미치지 않는 플라즈마 적정 조건 실험

플라즈마처리 장치를 이용한 종자 소독법은 플라즈마 세기별 power (Watt, W) 범위를 각각 30-34W, 60-68W, 80-90W, 100-110W, 200-220W로 플라즈마 처리 세기로 처리하였으며, 초기 플라즈마 power를 고정하는 것이 쉽지 않아 임의로 위와 같이 범위를 정하여 실험을 실시하였다. 플라즈마 처리 시간은 종자(7개씩) 당 power별 각각 5분, 10분 3반복 실험 수행하였으며, 처리된 종자를 파종 10일 후, 발아율, 전력 상승별 종자에 미치는 온도 변화 등을 조사하였다.

(3) 저온 플라즈마 처리의 종자 발아 최적조건 검증

저온 플라즈마 처리에 의하여 종자 발아에 최적 조건을 확인하기 위하여 실험을 실시하였다. 실험에 사용된 수박 품종은 해동꿀을 이용하였으며, 각 조건 당 30립을 처리하였다. 플라즈마 처리 조건은 1min (150, 200, 250, 300W), 5min (50, 100, 150, 200, 250W), 10min (50, 100, 150, 200W)로 처리하여 온도 30°C 습도 99%에서 발아율을 조사 하였다.

(4) 저온 플라즈마 처리 후 수박종자 내부 온도 변화 및 발아율 측정

저온플라즈마 처리에 따른 수박 종자 내부의 온도 변화를 확인하고 발아율을 조사하기 위하여 실험을 실시하였으며, 품종은 해동꿀을 이용하였다. 각각의 처리조건은 1min (30, 50, 80W), 3min (30, 50, 80W), 5min (30W)로 처리하여 종자의 온도 변화를 확인 하였으며, 발아 테스트는 30°C에서 습도 99% 조건으로 확인 하였다.

(5) 무처리군 종자 내부 세균 감염 확인

내부 세균 검출을 위해 종자를 분쇄하여 액체 배지에 배양표면 세균 검출은 종자 자체를 액체 배지에 배양표면 및 내부 세균 검출 실험을 진행함으로써 플라즈마 처리 전 종자의 세균 감염 여부를 확인하고, 표면과 내부의 세균 수를 비교함으로써 세균 감염 실험 시 세균이 주로 머무는 영역 확인고체 배지 도달 후 세균 배양을 진행하였을 때 콜로니 수계산 및 비교가 원활히 진행될 수 있도록 액체 배지 내 배양 시간을 2, 4시간으로 조절하여 실험하였으며, 건전 종자 및 세균 감염 실험을 거친 종자 5닐씩을 크기, 색깔에 맞추어 선별 하여 5닐의 종자 중 2닐을 분쇄하고, 정상 및 분쇄된 종자 5닐을 각각 2 mL tube에 옮겨 담은 후 액체 배지 200 µl씩 각 tube에 넣었다. 액체 배지는 Triptone, Yeast extract, NaCl, 항생제로 제작하여 29°C/180 rpm의 속도로 2시간, 4시간동안 Aeration 진행 세균의 성장 억제를 위하여 30분 동안 4°C 냉각하고 고체 배지에 도달하여 72시간 동안 28°C에서 Incubation을 하여 colony 수를 계수 하였다.

(6) RF 플라즈마의 수박 종자 내·외부의 세균 사멸 효과 확인

RF 플라즈마를 다양한 조건하에서 Air 방전을 진행하여 종자 표면과 내부의 세균 사멸 효과에 적합한 최적의 조건 확인하기 위하여 실시하였으며, 수박 종자의 내·외부의 세균 잔존 여부를 확인함으로써 플라즈마 침투 가능 영역 확인하고 플라즈마 처리된 수박 종자의 발아율을 확인함으로써 세균 사멸 효과 및 수박 종자 발아에 미치는 영향 확인 하였다. 무처리 종자 및 감염 처리 종자 15뿔을 석영 셀 안에 균일하게 분포하게 하고 30W/5min, 50W/3min의 조건으로 Air 방전 RF 플라즈마 처리하여 경향성 확인을 위해 2회 반복 실험하였으며, 처리된 종자 5뿔은 배지의 세균 배양 실험 진행하였다. 세균 배양은 50 × 15 mm 사이즈의 petri dish를 90개 준비 Agar, Trypton, Yeast extract, NaCl을 증류수에 녹여 Agar plate solution 제작하여 petri-dish에 solution을 넣은 후 cooling (overnight)하고 각 조건별 종자를 현탁액에 넣은 후, 2시간 동안 shaking incubation 현탁액을 배지에 도말한 후 24시간 배양 도말한 배지 표면 세균 번식에 의해 발생한 Colony 수를 확인하여 플라즈마 처리하지 않은 데이터와의 비교하였다.

(7) 전력 변화에 따른 세균 사멸 효과 확인

플라즈마 전력 증가를 통하여 종자 표면 및 내부의 고 에너지의 플라즈마를 주입함으로써 세균 사멸 효과 향상을 조사하였다. 플라즈마 처리 시간을 증가시킴으로써 세균이 에너지를 주입받는 양을 증가시킴으로써 세균의 사멸 효과와 수박 종자 발아 실험을 진행하여 전력 및 시간의 변화가 발아율에 미치는 영향 조사하였다. 처리 조건은 슈퍼꿀 품종을 이용하였으며, 무처리 종자, 10⁹, 30min 처리된 감염 처리 종자를 이용하였다. 무처리 종자 및 감염 처리 종자 20뿔을 석영 셀 안에 균일하게 분포 각각 처리 조건에 맞추어 Air 방전 RF 플라즈마 처리하였으며, 처리 조건은 30W (5, 7, 10min), 50W (3, 5min), 80W (1, 2min)로 처리하여 처리된 종자 수 중 10뿔은 생장 실험, 10뿔은 배지의 세균 배양 실험 진행하였다.

(8) 주입 가스 변경을 통한 종자내 플라즈마 처리 실험

주입 가스를 기존에 Air가 아닌 아르곤, 산소 (9:1) 혼합 기체를 주입함으로써 기존 플라즈마 처리한 결과와 세균 사멸 효과 비교하기 위하여 실시하였으며, 품종은 10⁷/ 30min 처리된 슈퍼꿀을 이용하여 실험을 실시하였다. 무처리 종자 및 감염 처리 종자 20뿔을 석영 셀 안에 균일하게 분포하게 하고 각각 처리 조건에 맞추어 Air 및 아르곤, 산소 혼합가스 방전 RF 플라즈마 처리 처리된 종자 수 중 10뿔 생장 실험, 10뿔은 배지의 세균 배양 실험 진행

(9) 플라즈마 처리된 수박 종자 발아율 확인

플라즈마에 의해 인가된 에너지가 세균 사멸 효과뿐만 아니라 발아율에 미치는 영향을 확인하여, 종자 처리에 적용 가능한 조건을 확인하기 위하여 아르곤 : 산소(9:1) 혼합기 0.02 bar의 진공 상태에서 처리 하였으며, 발아율 실험 조건은 30℃ 72시간 petri-dish 내에서 발아 진행 하였다. Tissue 내 15 mL의 물을 흡수시킨 후 건조 및 발아 관찰 각 전력 인가 및 시간 조건에

맞추어 건전 및 수박 종자 20년씩 플라즈마 처리 실험 진행 플라즈마 처리된 종자 중 10립은 발아율 실험, 나머지는 세균 배양 실험을 진행하여 세균 사멸 및 발아 효과 확인하였다.

나. 연구 결과

(1) 수박종자 발아에 영향을 미치지 않는 플라즈마 적정 조건 실험

각각의 처리별 종자 발아에 미치는 영향을 확인 한 결과 5min 동안 처리한 것은 200-220W 처리한 것을 제외하고는 모두 정상 적으로 발아되는 것을 확인 하였으며, 10min 동안 처리한 경우 80-90W에서 3반죽 발아실험을 하였으나 발아 결과가 일정 하지 않았으며, 장시간 플라즈마 처리 시 플라즈마 발생이 일정하지 않음을 확인 하였다(그림 65). 또한 전력 상승이 종자 온도에 미치는 영향을 확인 한 결과 플라즈마에 인가된 전력으로 인하여 종자 내부로 주입되는 것을 확인 하였으며, 주입된 에너지는 종자 내에서 운동에너지로 전환되어 분자 진동이 일어나니 때문에 종자 온도가 상승하는 것으로 확인되었다(그림 66).

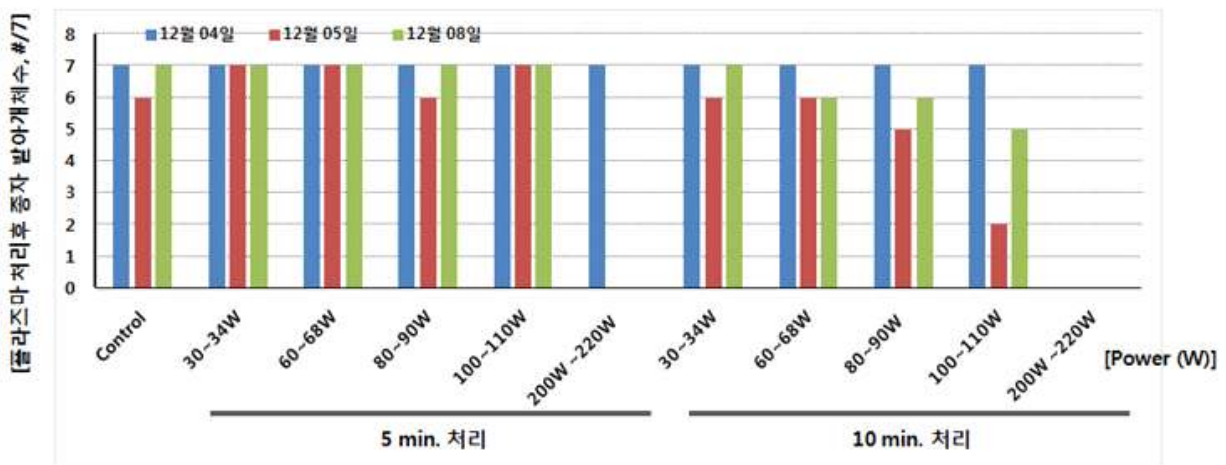


그림 65. 플라즈마 처리 후, 종자 발아

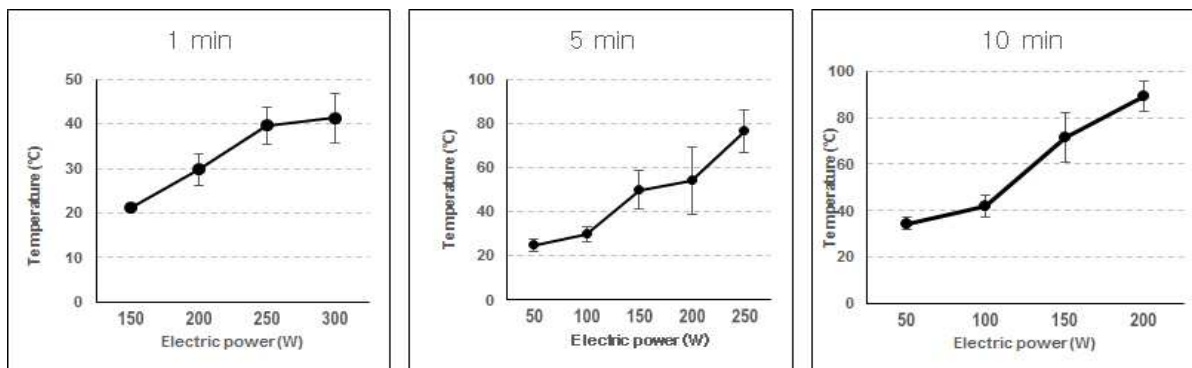


그림 66. 시간대별 전력 상승에 따른 온도 변화 그래프

(2) 저온 플라즈마 처리의 종자 발아 최적조건 검정

플라즈마 처리한 종자의 발아력을 알아보기 위하여 실험을 실시하였다. 각각 1, 5, 10분을 처리한 결과, 무처리의 경우 모두 발아하는 것을 확인하였으며, 1분 처리의 경우 150W 2개 정도 발아되는 것이 확인되었으며, 5분 처리의 경우 50W에서 3개, 100W에서 4개, 150W에서 2개 정도의 발아력을 확인하였다. 10분의 경우 50W, 100W에서 각각 1개의 발아력을 확인하였다. 본 실험은 예비 실험으로서 종자 처리 시 적정 처리 시간과 전력량을 알아보기 위하여 실시하였으며, 현재 적정 처리 조건을 위한 실험을 실시하고 있다(그림 67).

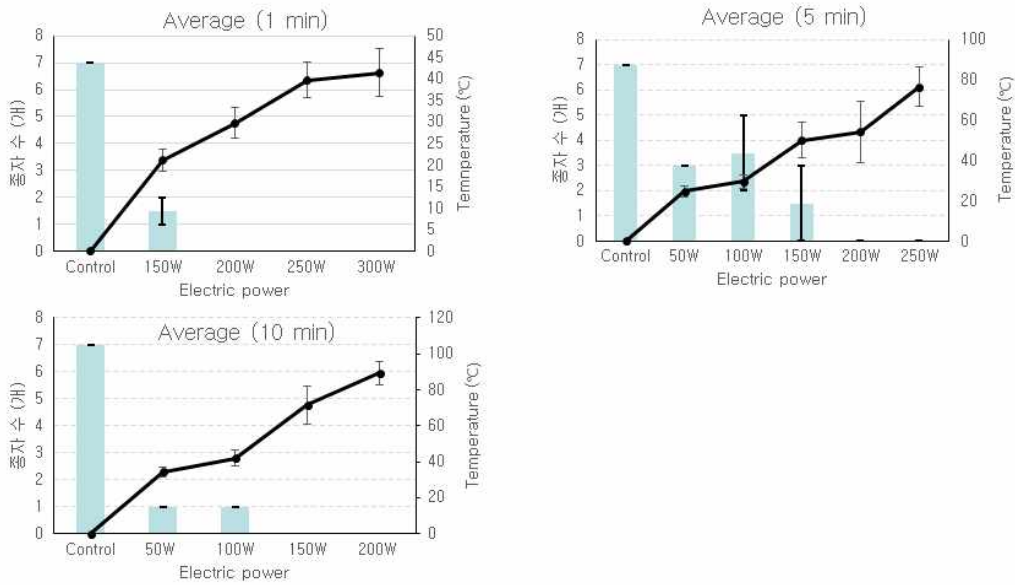


그림 67. 플라즈마를 이용한 종자 소독 적정 처리 조건 검정

(3) 저온 플라즈마 처리 후 수박종자 내부 온도 변화 및 발아율 측정

플라즈마 처리에 따라서 종자 내부의 온도 변화가 일어날 것으로 예상하고 처리 시 종자 내부의 온도를 측정하여 처리 후, 발아력, 종자내부의 변화를 확인 결과, 초기 종자 내부의 온도는 18°C 이며, 1분 30, 50W 처리 시 종자 내부온도는 큰 차이를 보이지 않았으며, 80W에서 처리 시 20.2°C까지 올라가는 것을 확인 하였다. 3분 처리에서는 30W 19.2°C, 50W 20.0°C, 80W 22.5°C로 내부 온도가 높아지는 것을 확인 하였다(표 31). 이는 전력을 높이고 시간이 길어짐에 따라서 종자내부로 전달된 에너지가 종자 내 수분과 진동을 일으키면서 열에너지로 나타나는 것으로 생각되어진다. 그리고 처리 후 종자를 절단하여 내부를 확인 한 결과 20°C 이상의 온도에서 종자의 배우 부분이 수분이 없어지면서 수축된 경향을 확인 할 수 있었다(그림 68). 발아력에서는 3분/80W의 경우 발아력이 30%대로 상당히 낮은 것을 확인 하였으며, 20°C 이하에서는 70~90%의 발아력을 확인 할 수 있었다(그림 69).

표 31. 플라즈마 처리 후, 수박 종자 온도 변화(초기 온도: 18°C)

조건	1 min			3 min			5 min
	30 W	50 W	80 W	30 W	50 W	80 W	30 W
온도 (°C)	18.2	18.7	20.2	19.2	20.0	22.5	19.7

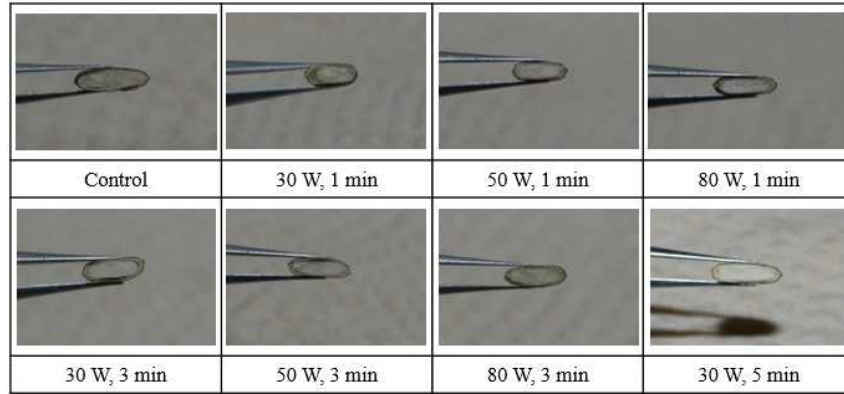


그림 68. 플라즈마 처리 후, 수박 단면도

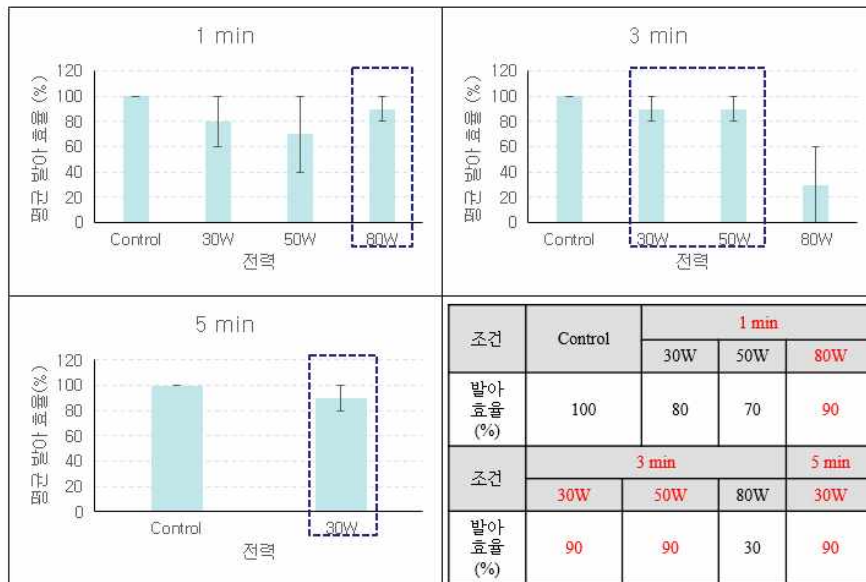


그림 69. 플라즈마 처리후 발아율 검정

(4) 무처리군 종자 내부 세균 감염 확인

종자 습식 감염 처리로 인해 제작된 감염 종자는 농도가 짙을수록 보유하는 세균의 양이 증가함을 알 수 있었음. 또한 세균의 접촉 시간을 증가시킬수록 세균 감염도가 높은 것으로 확인. 이러한 결과를 통하여 각 샘플 내·외부의 세균 잔존 여부를 확인하였으며, 이를 토대로 플라즈마 처리를 진행하여 세균 사멸 효과 확인 실험 계획(그림 70~74).

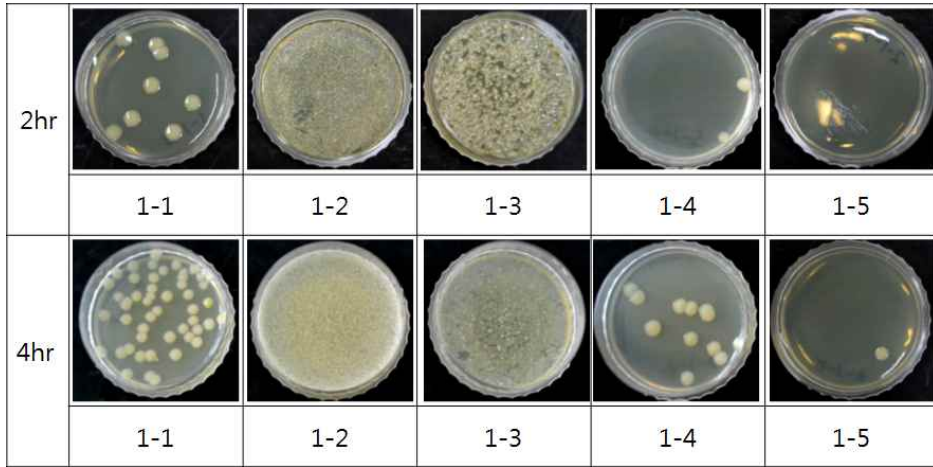


그림 70. 무처리된 건전 종자의 표면 및 내부 세균 검정.
1~3: 종자 표면, 4~5 : 분쇄한 종자

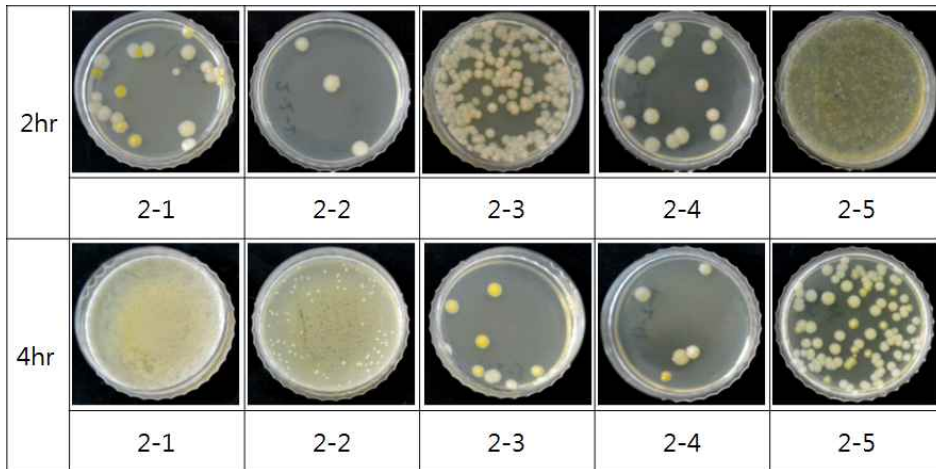


그림 71. BFB 세균 감염 종자 (1×10^8 개의 세균으로 20분 동안 감압습식 감염).
1~3: 종자 표면, 4~5 : 분쇄한 종자

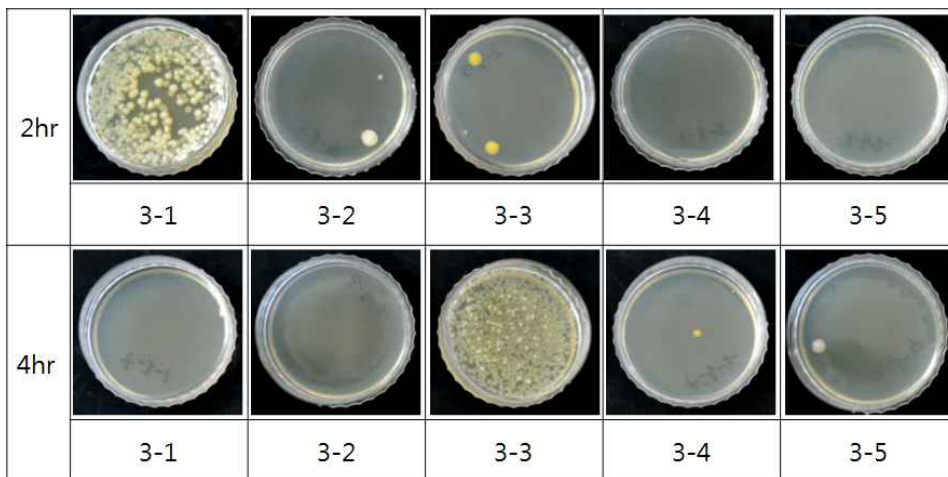


그림 72. BFB 세균 감염 종자 (1×10^8 의 세균으로 30분 동안 감압습식 감염).
1~3: 종자 표면, 4~5 : 분쇄한 종자

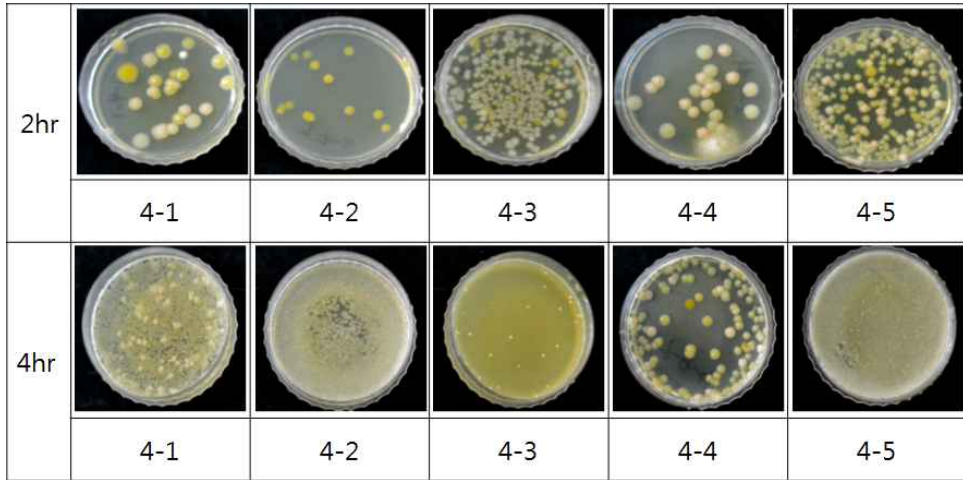


그림 73. BFB 세균 감염 종자 (1×10^9 개의 세균으로 20분 동안 감압습식 감염).
1~3: 종자 표면, 4~5 : 분쇄한 종자

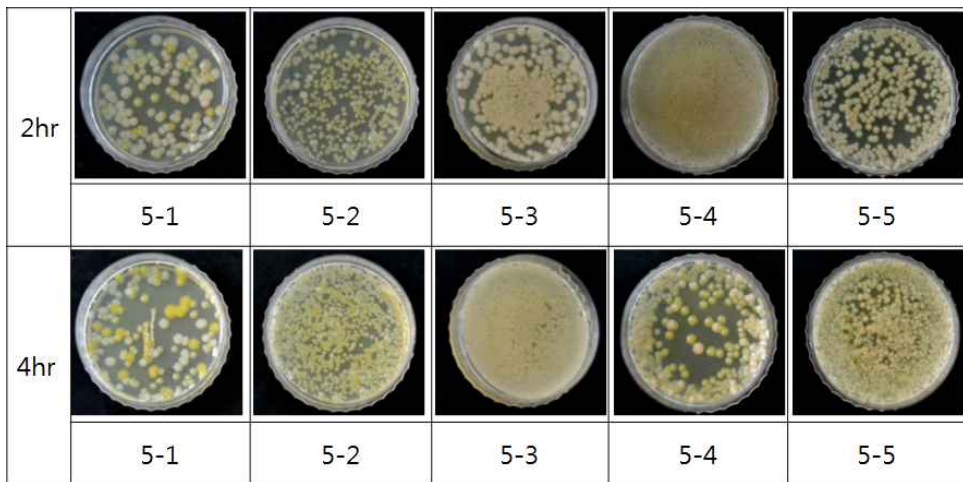


그림 74. BFB 세균 감염 종자 (1×10^9 개의 세균으로 30분 동안 감압습식 감염).
1~3: 종자 표면, 4~5 : 분쇄한 종자

(5) RF 플라즈마의 수박 종자 내·외부의 세균 사멸 효과 확인

플라즈마 처리 후 Control에 비하여 비교적 사멸 효과를 확인 하였으며, 내부 세균 잔여 여부를 확인 결과 플라즈마에 의한 종자 내부 세균 사멸 효과는 미비한 것으로 판단되며 표면에 존재하는 세균만 사멸효과가 뚜렷이 나타남 전력 조건을 향상 시켜 내부 온도 상승에 따른 세균 사멸 효과를 확인하는 실험이 필요할 것으로 사료 되며 추후 계속 실험을 진행 계획임(그림 75~77, 표 32).

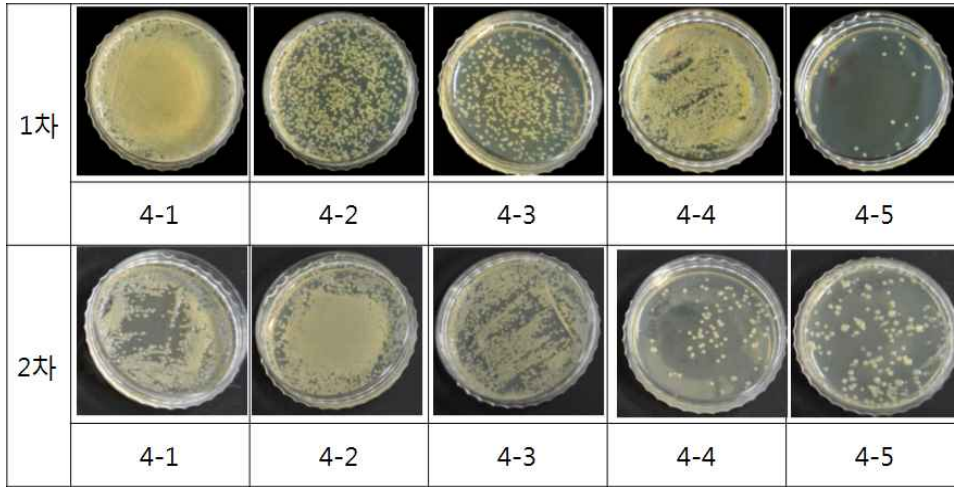


그림 75. 플라즈마 처리하지 않은 감염 종자(10^9 , 20min) 종자 내·외부의 균수
1~3: 종자 표면, 4~5 : 분쇄한 종자

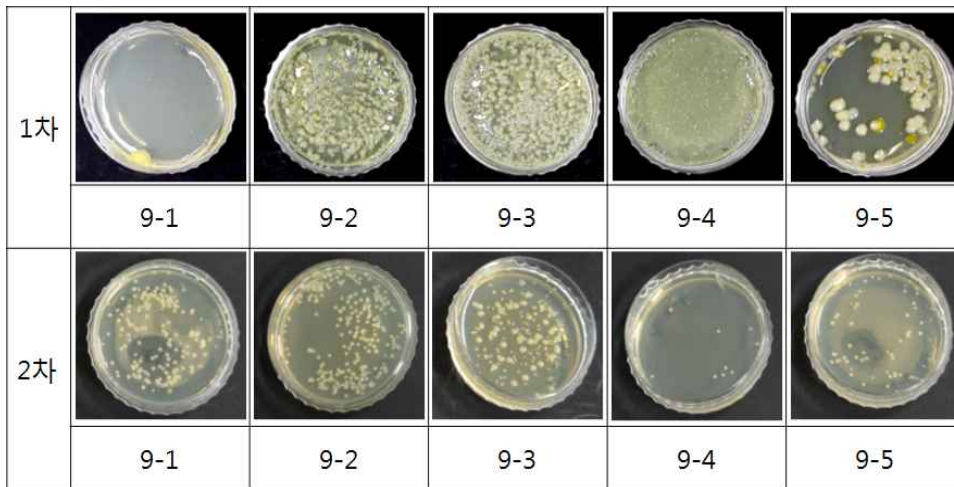


그림 76. 플라즈마 30W/5min 조건 처리 후, 종자 내·외부의 균수
1~3: 종자 표면, 4~5 : 분쇄한 종자

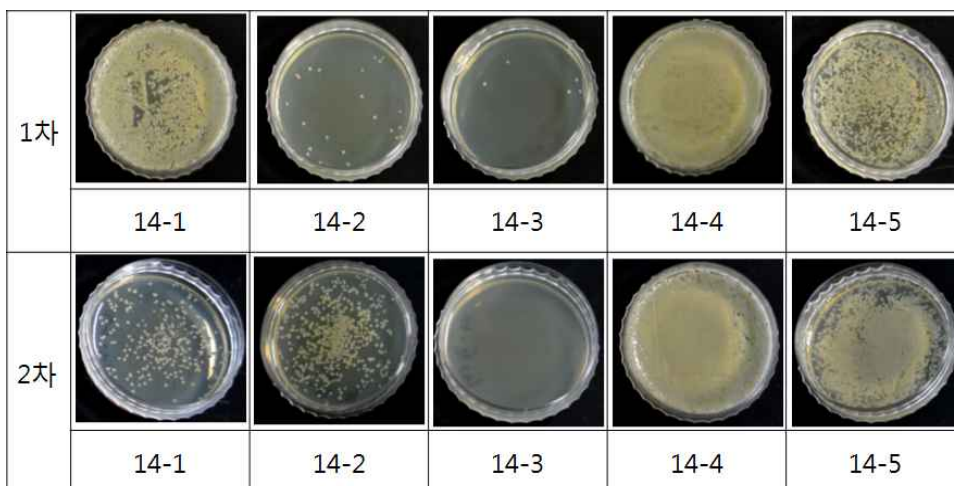


그림 77. 플라즈마 50W/3min 조건 처리 후, 종자 내·외부의 균수
1~3: 종자 표면, 4~5: 분쇄한 종자

표 32. 플라즈마 처리 조건별 콜로니 수 측정

Control	2h	4h	30W/5min	2h	4h	50W/3min	2h	4h
4-1	-	+++	9-1	+	++	14-1	+++	++
4-2	+++	+++	9-2	-	++	14-2	+	++
4-3	++	+++	9-3	++	++	14-3	-	-
4-4	+++	+	9-4	+++	+	14-4	+++	+++
4-5	-	+	9-5	+	+	14-5	+++	+++

1~3: 종자 표면, 4~5 : 분쇄한 종자

(6) 전력 변화에 따른 세균 사멸 효과 확인

전력의 증가에 따른 세균 사멸 효과는 크게 향상되지 않음. 처리 시간을 증가시킴으로써 세균 사멸 효과가 조금 향상이 되었지만, 50% 미만의 향상 효과를 보임으로써 큰 영향력이 없는 것이라 판단됨. 전력 및 시간의 조건 변화에 따른 사멸 효과 향상에 차이가 없어 가스를 Air에서 아르곤으로 변경하여 플라즈마 안정화 및 산소 라디칼 다량 생성의 초점을 두고 재 실험 계획. 종자의 세균감염농도가 너무 높은 것으로 판단됨. 농도가 낮은 감염종자를 이용하여 멸균실험을 재실시가 필요함. 발아 실험에서는 발아실험 결과, 1~5의 발아율이 종자에 30W, 5분의 플라즈마 처리한 6~10보다 발아가 더 잘되거나 비슷한 것을 확인하였고 50W, 3분 플라즈마 처리한 11~15는 발아율이 적은 것을 확인하였다. 결과적으로 50W의 높은 전력으로 플라즈마 처리를 하게 되었을 때 발아율이 떨어지는 것을 확인하였고, 플라즈마 처리를 하였을 때 발아율에는 큰 영향을 미치지 않는다는 것을 확인하였다(그림 78~86).

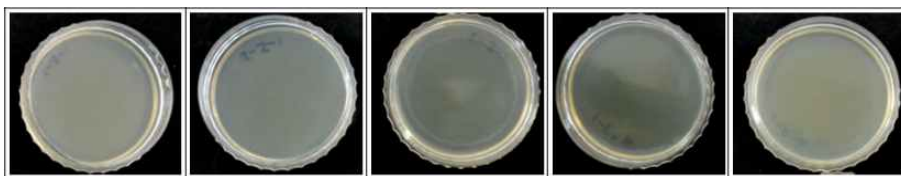


그림 78. 진진 종자 처리

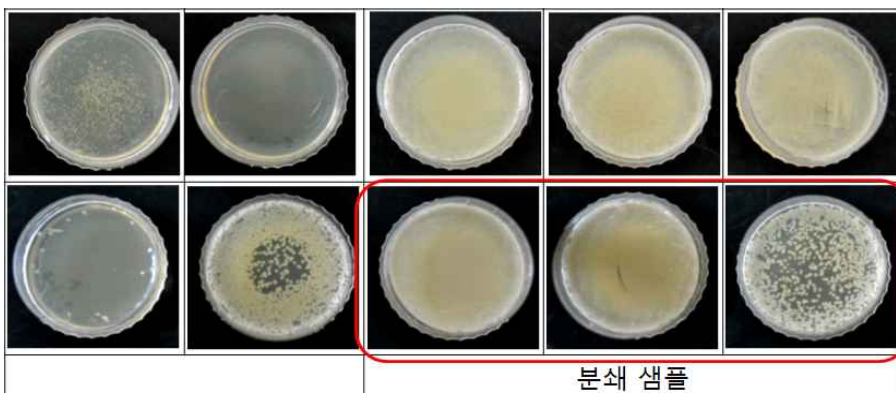


그림 79. 플라즈마 30W/5min 조건 처리 후 감염 종자(10^9 , 30min) 처리

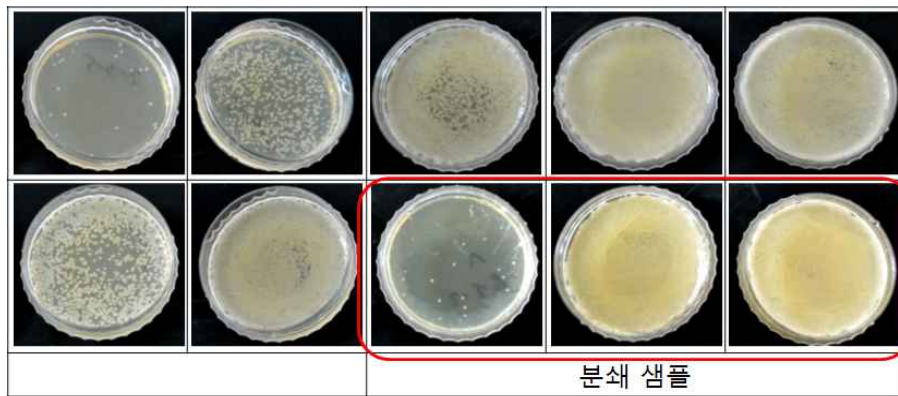


그림 80. 플라즈마 30W/7min 조건 처리 후 감염 종자(10^9 , 30min) 처리

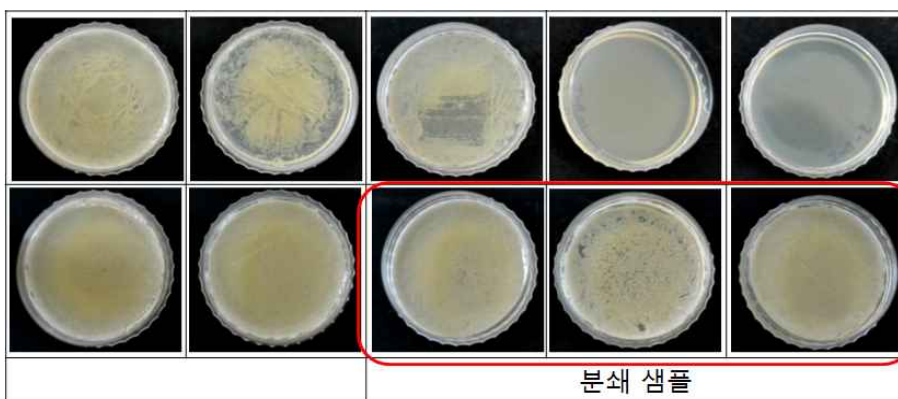


그림 81. 플라즈마 30W/10min 조건 처리 후 감염 종자(10^9 , 30min) 처리

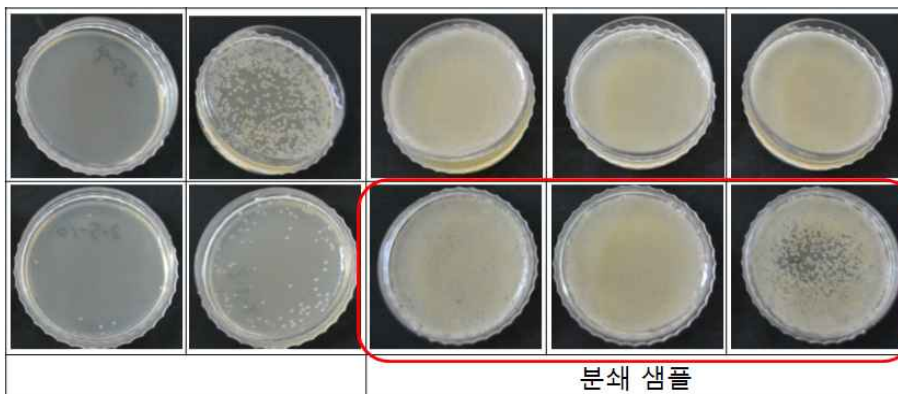


그림 82. 플라즈마 50W/3min 조건 처리 후 감염 종자(10^9 , 30min) 처리

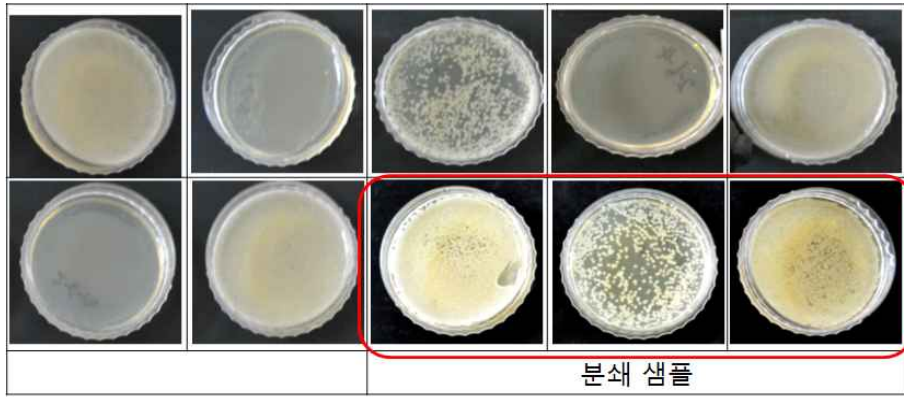


그림 83. 플라즈마 50W/5min 조건 처리 후 감염 종자(10^9 , 30min) 처리

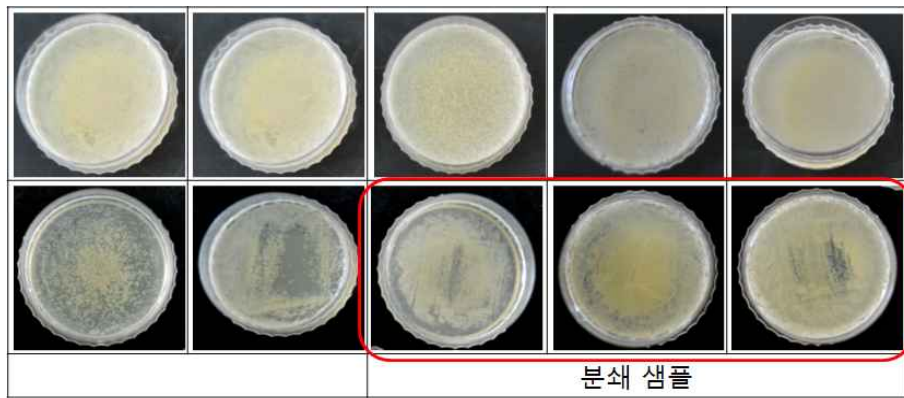


그림 84. 플라즈마 80W/1min 조건 처리 후 감염 종자(10^9 , 30min) 처리

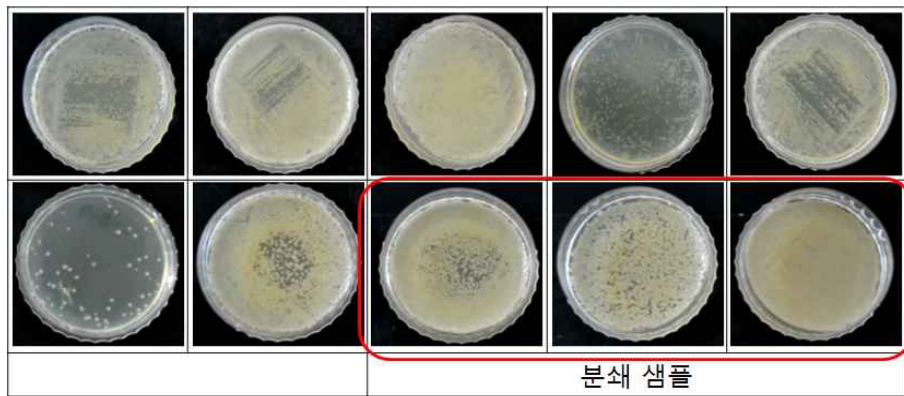


그림 85. 플라즈마 80W/2min 조건 처리 후 감염 종자(10^9 , 30min) 처리

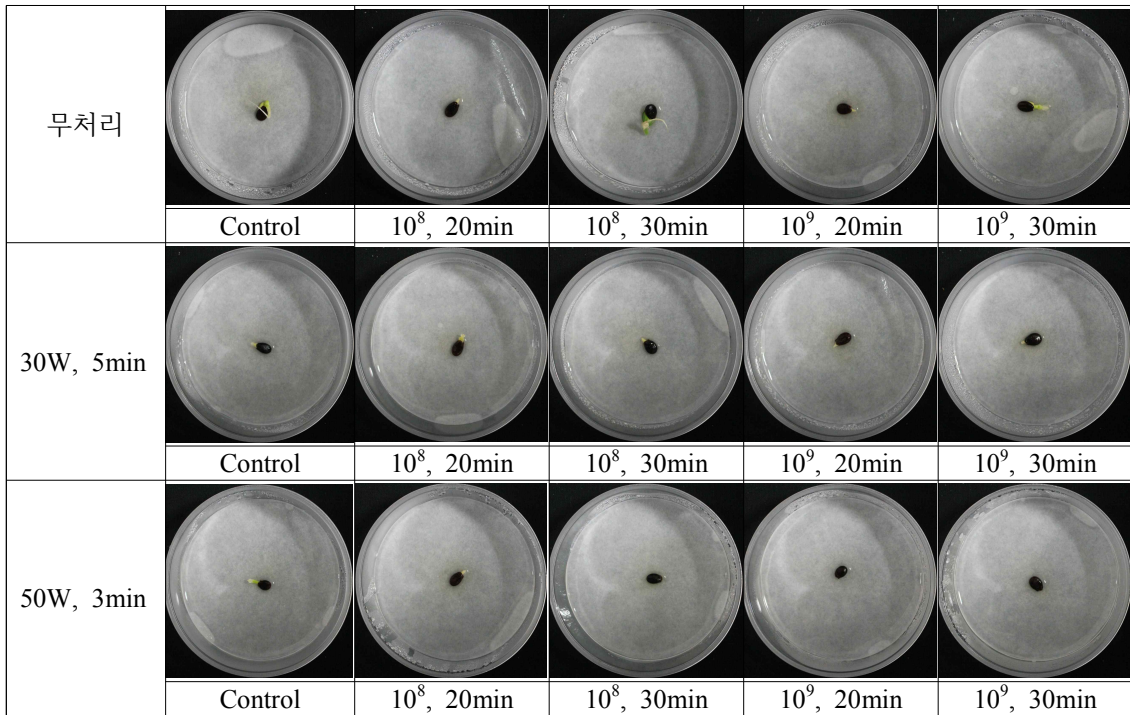


그림 86. 감염종자의 플라즈마 처리별 발아 테스트

(7) 주입 가스 변경을 통한 종자 내 플라즈마 처리 실험

아르곤 : 산소(9:1)혼합 기체를 주입함으로써 플라즈마 방전의 안정화. 10⁹ 감염종자에서 10⁷ 감염종자를 사용하여 플라즈마 처리 시, 대부분의 샘플 내 세균 사멸 효과를 확인 하였다. 이는 고농도의 감염종자를 사용하여 사멸 효과에 한계 농도(10⁹)를 찾고, 사멸한계 농도보다 낮은 농도에서 플라즈마 처리 시, 사멸효과가 있음을 확인함. 자연 상태에서 세균의 감염농도를 고려하였을 때, 10⁷가염종자 역시 충분히 고농도이며, 플라즈마 처리 조건에서 모두 100% 사멸도를 보임을 확인하였다. 또한, 비활성 기체인 아르곤의 자유 전자가 다량 방출되어 활성산소를 대량 발생하여 세균 성장 억제 및 사멸 효과를 보이는 것으로 확인하였으며, Air 방전의 경우 비교적 안정한 질소 기체가 존재하고 있으나 산소가 20%이상의 함량을 차지함으로써 플라즈마에 의해 질소가 분해될 때 산소가 그 에너지를 얻어 질소 산화물로 변화되기 때문에 플라즈마 방전이 불안정하게 만드는 요소 중 하나로 확인되었다(그림 87, 88). 안정한 아르곤 가스는 플라즈마에 의해 전자를 잃었음에도 산소와의 반응성이 없어 활성산소를 다량 생성하게 되고 이는 세균의 세포막 파괴를 일으켜 사멸 효과를 일으킨다는 것을 본 실험을 통해서 확인하였으며, 이는 아르곤, 산소 혼합 기체를 활용하여 지속적인 실험을 통해 세균 사멸 효과 재확인 실험 요구

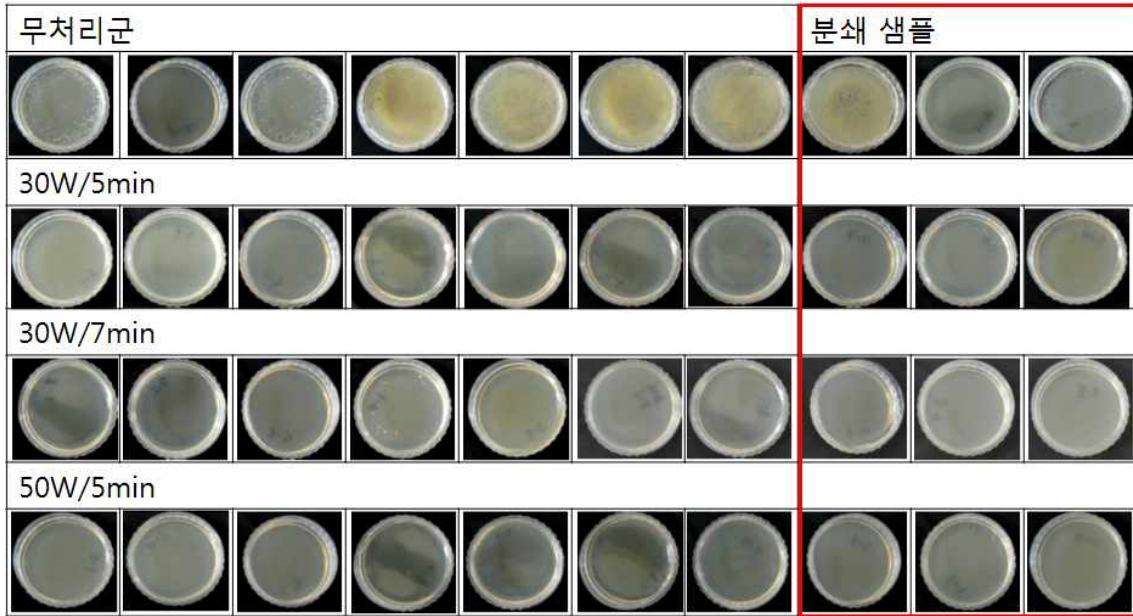


그림 87. 플라즈마 발생장치 주입 기체를 공기(air)를 이용하였을 때 감염종자(10^7 , 20min) 처리

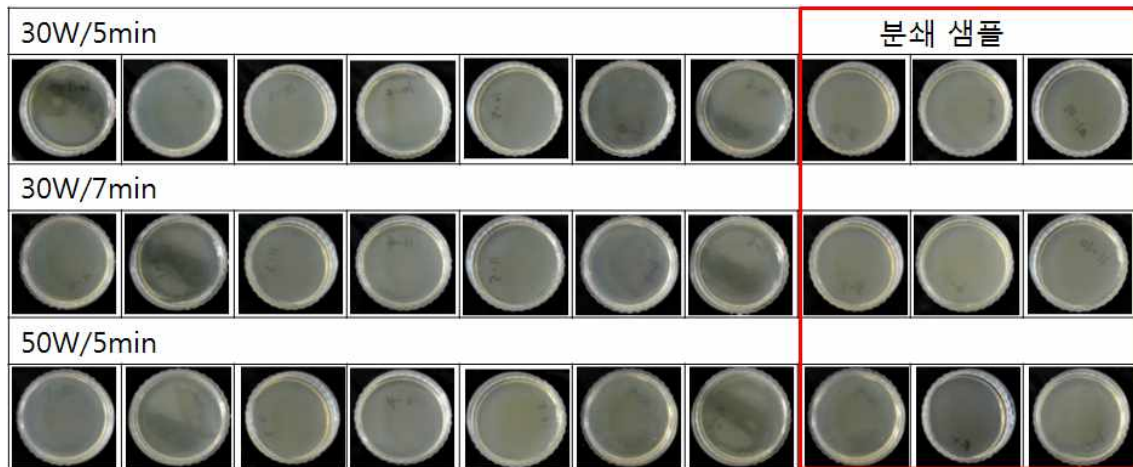


그림 88. 플라즈마 발생장치 주입 기체를 아르곤 : 산소(9 : 1)를 이용하였을 때 감염종자(10^7 , 20min) 처리

(8) 플라즈마 처리된 수박종자 감염세균 살균효과 및 수박종자 발아율 검정

1) 건전 및 감염 종자 세균 사멸 효과 확인

플라즈마 처리하지 않은 무처리 종자의 현탁액을 도말한 배지에서는 BFB 세균 콜로니가 되었다. 반면에, 플라즈마 처리한 종자의 현탁액을 도말한 배지에서는 BFB 세균이 모두 사멸됨을 확인하였음(그림 89, 90).

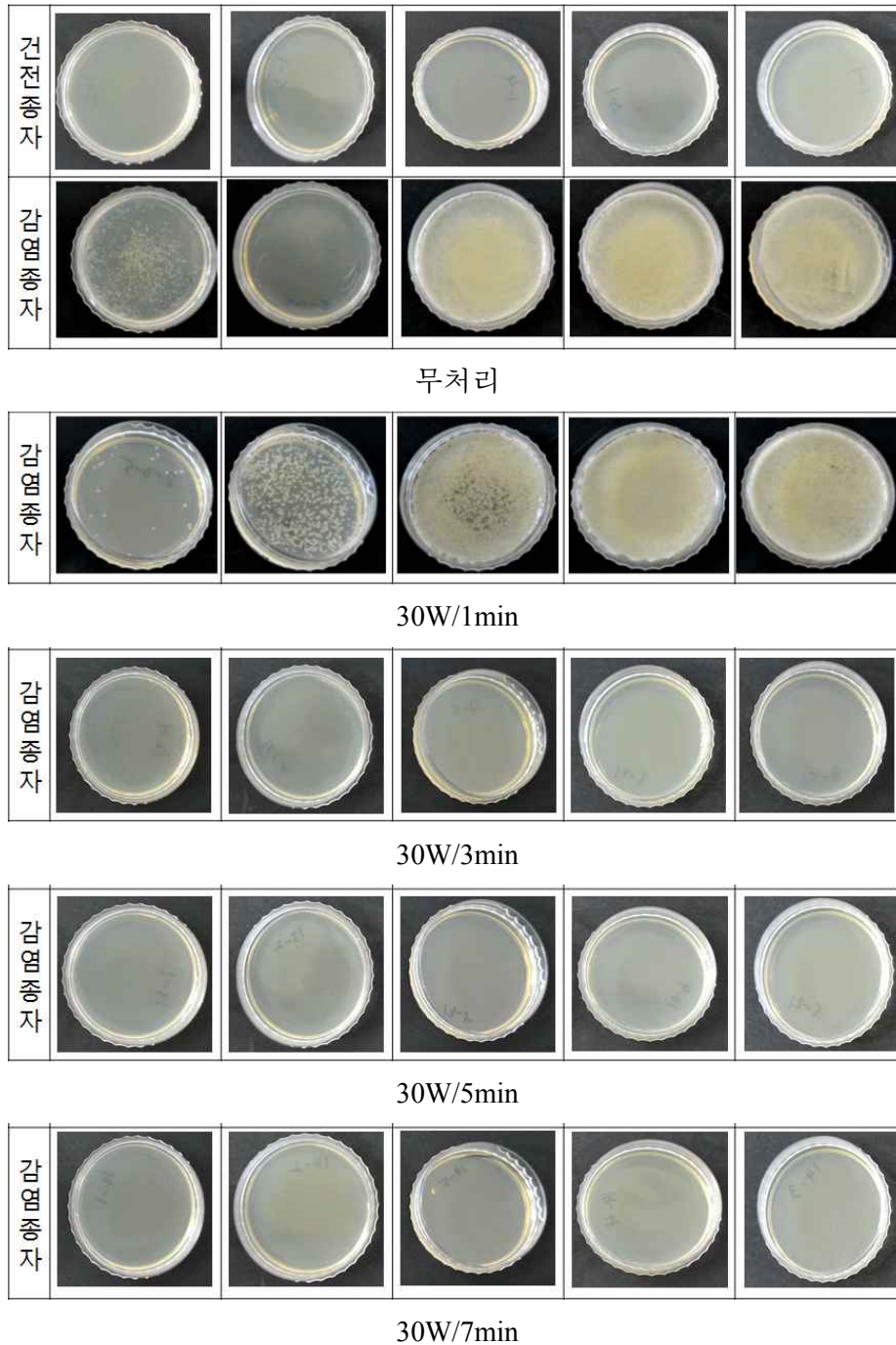
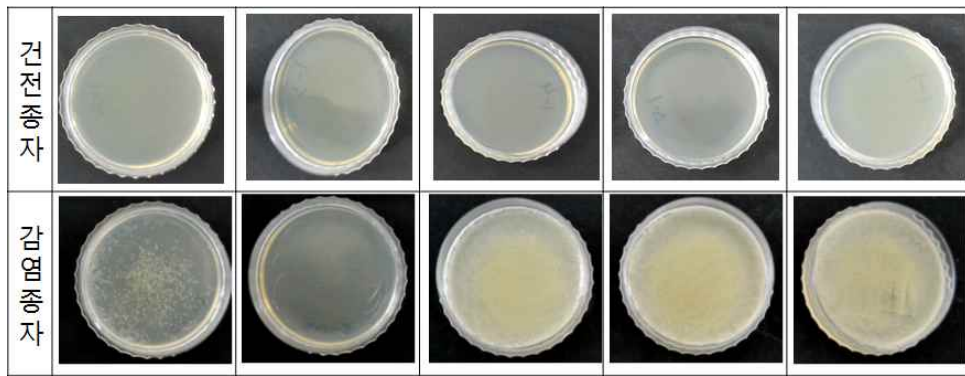
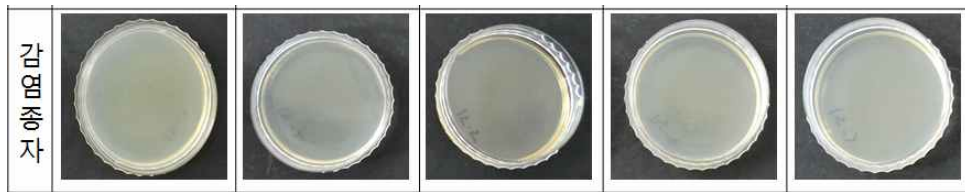


그림 89. 건전종자 및 감염종자의 플라즈마 처리별(30W) 사멸 효과 검정



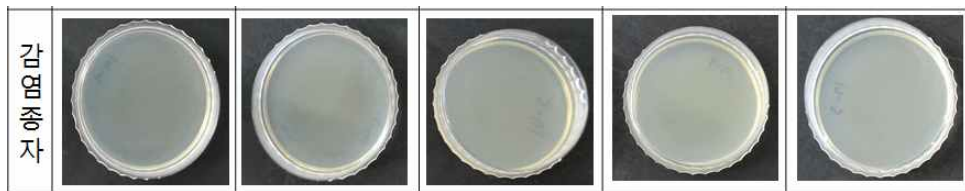
무처리



50W/1min



50W/3min



50W/5min



80W/1min

그림 90. 건전종자 및 감염종자의 플라즈마 처리별(50, 80W) 사멸 효과 검정

2) 플라즈마 처리 발아율 측정 실험 결과

무처리 종자 발아율은 5일째 기준으로 60% 였고, 30W에서 5분 플라즈마 처리한 종자의 발아율이 무처리 종자 발아율과 같은 결과를 얻었다. 따라서, 30W에서 5분 플라즈마 처리조건에서, 무처리군 과 비교하였을 때, 발아율에 영향은 미치지 않으면서 BFB 세균의 멸균력은 우수함을 확인됨. 이외 다른 플라즈마처리 조건에서는 발아율이 현저히 떨어짐을 확인함(그림 91).

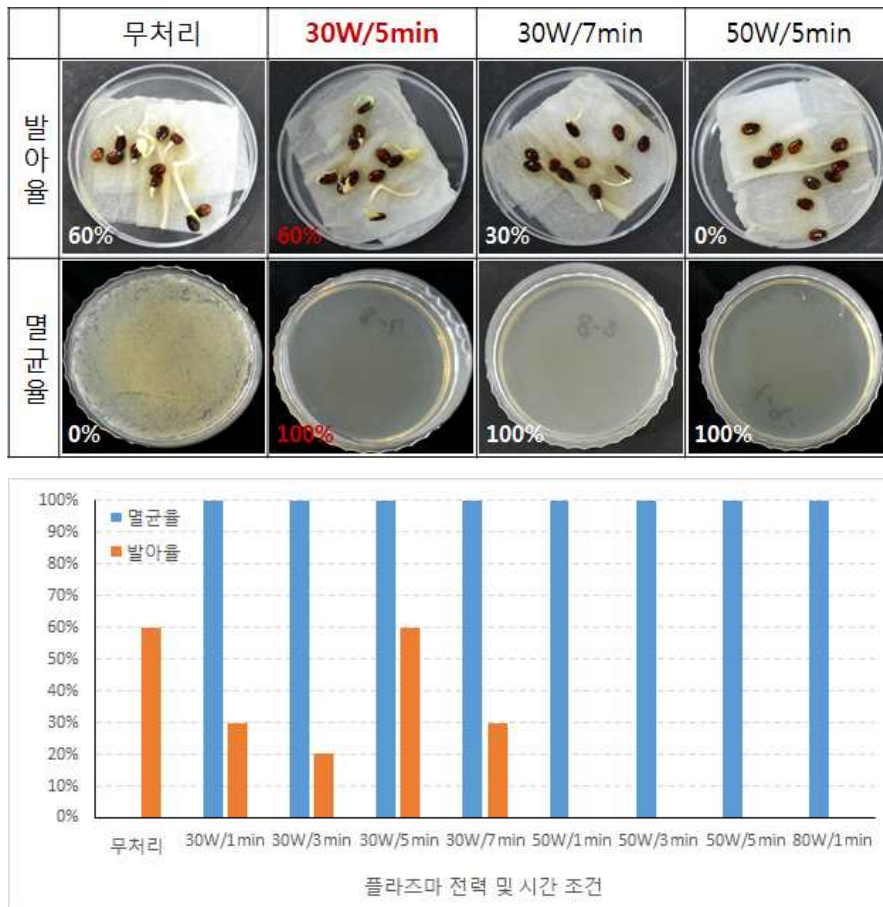


그림 91. 플라즈마 처리별 발아율 및 멸균율 조사

8. 저온플라즈마를 이용한 대용량 종자소독법 최적화 조건 구축

가. 연구 방법

(1) 대용량 종자 처리를 위한 저온플라즈마 시스템 최적화

상용화를 위한 기존 소량(10~20립)의 종자 살균 테스트를 진행하였고, 발아율에 영향을 주지 않으면서 멸균력이 우수한 조건을 잡았다. 이를 토대로 하여, 상용화를 위한 대용량 종자 처리 테스트를 진행하기로 하였다. 이를 위해, 종자를 늘려(50립) 최적 조건으로 플라즈마 처리를 하였으나, 같은 조건으로는 멸균력이 떨어지는 것을 확인하였고, 종자 처리의 양에 따라 최적화

된 플라즈마 처리 조건을 구축하고 처리량별 매뉴얼화하기 위해, 공정 조건을 다시 조절하여 실험을 진행하였다. 처리 종자의 양 증가에 따른 공정 조건을 다양하게 조절하기 위해 플라즈마 시스템의 공정 조절 범위(챔버 회전수, power)를 넓혀야했으며, 이를 위해 플라즈마 시스템을 개조하였다. 이를 통해, 개조된 종자멸균용 플라즈마 시스템의 power 범위에 따른 플라즈마 방전 안정성과 내부 챔버 회전에 따른 플라즈마 방전 균일성, 그리고 power 및 처리 시간에 따른 조건별 온도 변화를 테스트하였다.

(2) 대용량 종자 처리를 위한 저온플라즈마 시스템 공정의 최적화

대용량 종자 처리를 위한 저온플라즈마 시스템의 종자 처리의 최적화 공정을 구축하기 위해, BFB 감염 종자를 이용하여 플라즈마 방전 power와 처리 시간에 따른 멸균률과 발아율을 측정하기로 하였다. 종자는 포미나(농협 종묘) 100과 200닐을 각각 전력 30, 50, 80, 100, 120, 150W 과 전력 30, 50, 80W에서 각각 3, 5분과 7, 10, 15, 20분 처리하기로 하였고, 실험방법은 플라즈마 챔버내 처리 종자를 각각 100과 200닐씩 넣고 각각 플라즈마 방전 power 및 처리 시간으로 종자 처리하고, 처리 종자 10닐을 TBA 배지에서 세균 배양 실험 및 발아율 테스트를 진행하였다. 세균 배양 실험은 종자 하나씩 TBA 배지에 찍어 자라는 세균을 세었다.

나. 연구 결과

(1) 대용량 종자 처리를 위한 저온플라즈마 시스템 최적화 조건 구축

플라즈마 처리 종자의 양에 따른 공정 조건을 다양하게 조절하기 위해 플라즈마 시스템을 개조(그림 92)하여 개조된 장비의 성능을 테스트한 결과, 플라즈마가 안정되게 방전이 이루어짐을 기존의 공정 조건[플라즈마 방전 소스 혼합비- 아르곤(9):산소(1)]으로 3분간 플라즈마를 방전시켜 플라즈마 방전상태로 확인하였다(그림 93).



그림 92. 플라즈마 시스템의 컨트롤 부분 개조 전(왼쪽)과 개조 후(오른쪽)



그림 93. 100W에서 아르곤:산소(9:1)의 비율로 공정 진행한 플라즈마 방전 상태

power 단계별 플라즈마 처리시, 균일한 플라즈마 방전에 의한 온도변화를 보이는데 테스트하기 위해 수박 종자 200냥을 처리하여 비접촉식 온도계로 플라즈마가 확인한 결과, 플라즈마 방전이 안정되고 균일하게 이루어짐을 확인하였다(그림 94, 표 33).

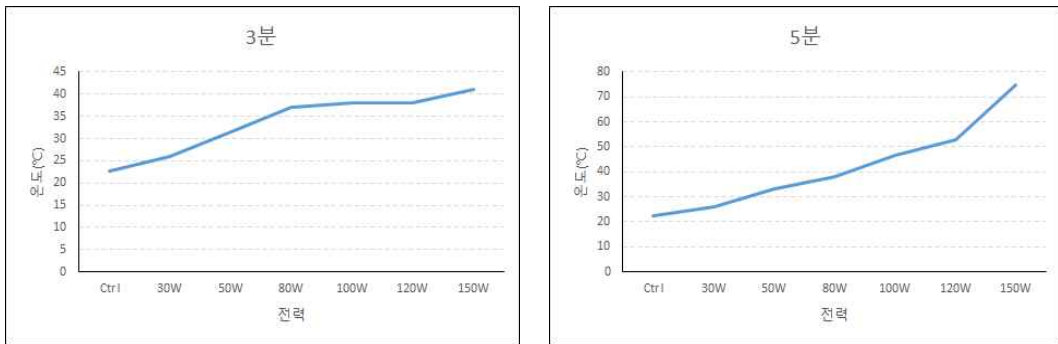


그림 94. 플라즈마 처리 조건별 종자 내부 온도 변화

표 33. 플라즈마 처리 종자 내부 온도 변화 측정을 위한 플라즈마 처리 조건

전력(W)	Control	30	50	80	100	120	150
3분	22.6	26	31.4	37	38	38	41.2
5분	22.6	26.2	33.4	38	46.5	53	75

포미나 수박 종자 200냥을 플라즈마 시스템의 내부 챔버에 넣은 후 플라즈마 처리를 각 조건별로 공정 진행하였고, power를 증가할수록 온도가 균일하게 상승함을 확인하였다. 이는 power가 높아질수록 플라즈마를 발생시키는 마이크로웨이브에 의한 진동에너지와 아르곤가스의 이온화 에너지가 상승하여 열에너지로 발산되는 현상으로, 플라즈마 처리된 종자의 내부 온도도 영향을 받아 power 조건에 비례하기 온도가 상승함을 확인하였다.

(2) 대용량 종자 처리를 위한 저온플라즈마 시스템 공정의 최적화

대용량 종자 처리를 위한 저온플라즈마 시스템의 종자 처리의 최적화 공정을 구축하기 위해, BFB 감염 종자를 이용하여 플라즈마 방전 power와 처리 시간에 따른 멸균률과 발아율을 측정 한 결과, 200냥 처리의 경우, 일관된 데이터를 얻을 수 없었다. 기존 처리 종자의 양이 적었을 때는 종자에 받는 플라즈마의 에너지가 컸다면, 상대적으로 같은 조건에서 처리 종자량이 늘었

을 때 받는 플라즈마의 에너지는 분산되므로 종자 각각에 받는 에너지는 적게 되므로, 200년 처리량에 비해 플라즈마 처리 시간이 부족했던 것으로 판단했고, 처리 power 범위를 줄이고, 처리 시간을 늘림과 동시에 처리 종자수를 줄여 100년으로 하고, 플라즈마를 처리한 결과는 전 조건(30, 50, 80W에서 각각 7, 10, 15, 20분 처리)에서 멸균률 90% 이상을 확인하였다(그림 95). 그러나 감압처리에 의한 BFB 감염 종자의 자체 감염율은 50%으로 확인되었으며, 이를 기준으로 하여 플라즈마 처리한 멸균률을 측정하여 제시하였다(표 34).

표 34. 플라즈마 처리 조건별 BFB세균 멸균률(%)

처리조건	무처리 (세균 배양률)	7분	10분	15분	20분
30W	50	100	100	100	100
50W		90	100	90	100
80W		100	90	100	100

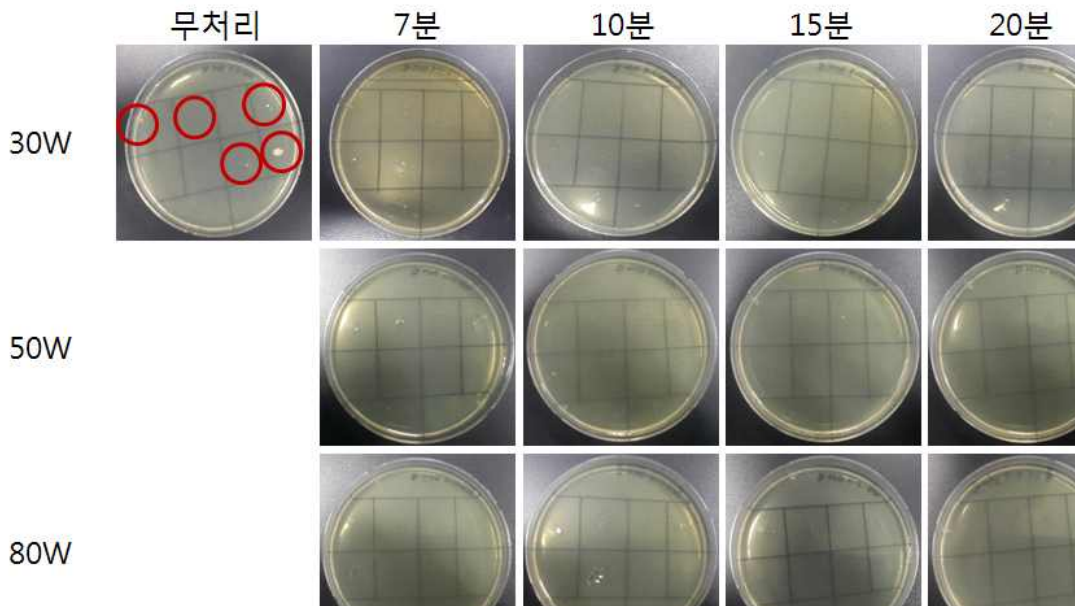


그림 95. 감염종자의 플라즈마 처리 조건별 멸균 효과 검정

발아율 측정을 위해 종자를 28°C 배양기에서 3일동안 발아를 관찰한 결과, 80W에서 20분 처리 조건에서 90%를 보였다. 그러나 감압하여 감염시킨 종자의 수분 정도나 상태가 실제 건전 종자의 상태에서 처리할 것을 고려하여, 건전종자에 같은 조건으로 처리하였고, 그 결과, 30W에서 15분과 80W에서 10분 처리하였을 때 발아율이 70~80%로 높았다(표 35).

표 35. 플라즈마 처리 조건별 종자 발아율(%)

조건	무처리	30W				50W				80W			
		7분	10분	15분	20분	7분	10분	15분	20분	7분	10분	15분	20분
감염종자	100	60	0	50	60	60	20	30	50	30	50	40	90
건전종자	80	30	0	80	0	40	10	50	10	70	70	40	50

9. 유용미생물 활용 생물적 방제

가. 연구 방법

토양에서 분리한 30종의 세균(표 36)을 이용하여 BFB세균 48종을 대상으로 항균활성 실험을 실시하였다. 각각 30종의 토양 세균은 TSB배지(MBcell, Korea)에 액체 배양하여 multi-paper disc 법을 이용하여 길항력을 확인 하였다. 각각의 BFB세균은 TSB배지에 30°C/ 150rpm/ 48h 배양하여 1×10^8 cfu/ml 농도로 균수를 조정하여 TSA배지에 도말하고 paper disc (Ø:8mm, Advantech, Japan)를 배지위에 올려놓고, 각각 25ul씩 토양에서 분리한 30종의 세균을 접종하여 28°C/ 72h 배양하여 형성된 clean-zone의 길이를 측정 하였다. 실험은 3반복 실시하여 평균값을 조사하였다.

표 36. 토양에서 분리한 30종의 세균 리스트

Isolation code	Name of bacteria	Collected site
SN-2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Rockwool
SN-9	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Rockwool
SN-12	<i>Bacillus cereus</i>	Rockwool
SN-15	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Rockwool
SN-17	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Rockwool
SN-18	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Rockwool
SN-21	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Rockwool
SN-22	<i>Paenibacillus</i> sp.	Rockwool
SN-23	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Rockwool
NSB1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Crop field soil
NSB4	<i>Bacillus</i> sp.	Crop field soil
NSB10	<i>Bacillus</i> sp.	Crop field soil
NSB12	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Crop field soil
NSB17	<i>Bacillus cereus</i>	Crop field soil
NSB18	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	Crop field soil
NSB27	<i>Sinomonas</i> sp.	Crop field soil
NSB36	<i>Terrabacter</i> sp.	Crop field soil
NSB37	<i>Bacterium</i> sp.	Crop field soil
NSB40	<i>Rhodococcus</i> sp.	Crop field soil
NSB41	<i>Bacillus</i> sp.	Crop field soil
NSB43	<i>Microbacterium oxydans</i>	Crop field soil
KFB09	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	green house soil
KFB24	<i>Alcaligenes faecalis</i>	green house soil
KFB25	<i>Bacillus pumilus</i>	green house soil
KFB59	<i>Bacillus megaterium</i>	green house soil
KSB01	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	green house soil
KBM	<i>Staphylococcus aureus</i>	Pepper field
KBM1	<i>Achromobacter</i> sp.	Pepper field
KBM2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Pepper field
KBM3	<i>Bacillus subtilis</i>	Pepper field
Total	30	

나. 연구 결과

작물이 재배되고 있는 토양에서 분리한 30종의 유용미생물을 활용하여 2011~2014년 수집된 48종의 BFB균의 길항능력을 확인하기 위하여 실시하였다. 실험 결과 30종의 유용미생물 중에서 넓은 범위의 길항능력을 보여주는 세균은 SN-21, 22, NSB-27이 가장 넓은 범위와 높은 길항력을 가지고 있음을 확인 하였으며, 다른 균들에서는 특정 BFB세균에 대하여 낮은 길항력을 확인 하였다. 대부분의 세균에서 길항력은 확인 할 수 없었다(표 37, 38, 그림 96). 그리고 효과가 있는 BFB균은 대부분 *A. citrulli* 임을 확인 할 수 있었다. 현재 길항 효과가 있는 길항 세균 탐색을 계속 하고 있으며, 높은 길항력을 나타내는 유용 균주를 탐색할 예정이다.

표 37. BFB균의 길항 미생물 효과 검정

Antagonistic bacterial isolates	BFB strains																							
	Strain	Strain	Strain	Strain	Strain	Strain	Strain	Strain	Strain	Strain	Strain	Strain	Strain	Strain	Strain	Strain	Strain	Strain	Strain	Strain	Strain	Strain	Strain	Strain
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
SN-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SN-9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+
SN-12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SN-15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SN-17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SN-18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SN-21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	+++	+	++	++	++	++	+++	++	++	+	++	++
SN-22	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+++	++++	+	++++	+++	+	+	+	+	+	++	++++	+	+	+
SN-23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NSB-1	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NSB-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NSB-10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NSB-12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NSB-17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NSB-18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NSB-27	+	+++	+	+++	+++	+	+	+++	++++	++	++++	+	+++	+	+	+	+	++	++	+++	+	++	++	
NSB-36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NSB-37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NSB-40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NSB-41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NSB-43	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB09	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	++	+	+	+	+	+
KFB25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KSB01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+
KBM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KBM1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KBM2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KBM3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

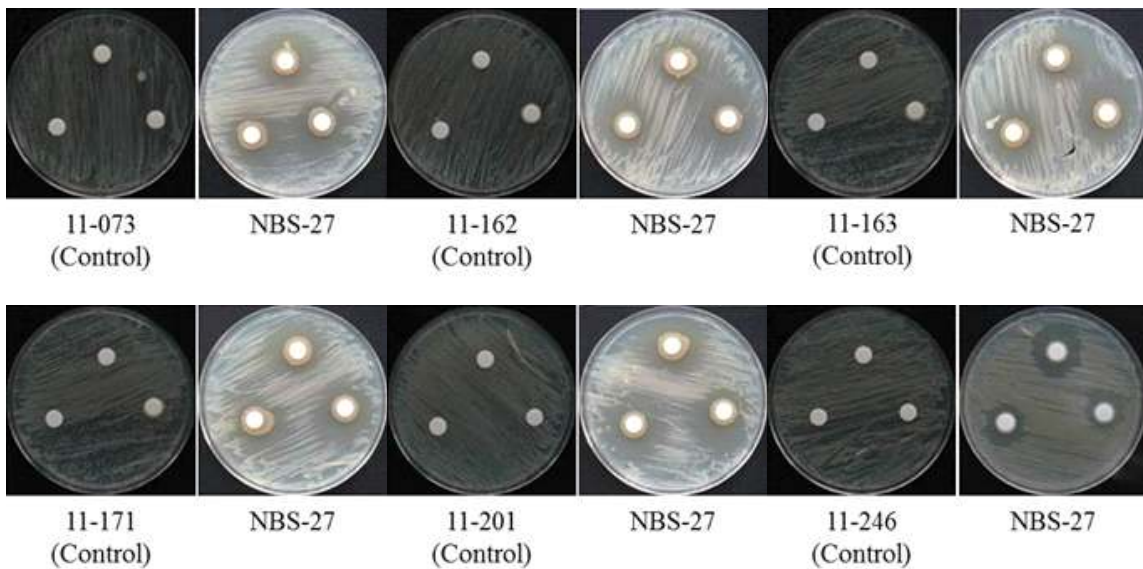
Zone of inhibition in dual culture assay: +, 0-2 mm; ++, 2-5 mm; +++, 5-7 mm; +++++, 7-9 and +++++; >9 mm.

(표 계속)

표 38. BFB균의 갈항 미생물 효과 검정

Antagonistic bacterial isolates	BFB strains																							
	Strain 25	Strain 26	Strain 27	Strain 28	Strain 29	Strain 30	Strain 31	Strain 32	Strain 33	Strain 34	Strain 35	Strain 36	Strain 37	Strain 38	Strain 39	Strain 40	Strain 41	Strain 42	Strain 43	Strain 44	Strain 45	Strain 46	Strain 47	Strain 48
	SN-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	++	+	+	+	++	+
SN-9	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+++	+	++	+	+	+	+	+	+
SN-12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	++	+	++	+	+	+	+	+	+
SN-15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+
SN-17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SN-18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+
SN-21	++	++	++	++	+	+++	++	+	++	++	+	+	+	++	+	+++	+++	+++	+++	+	+	++	+	+
SN-22	++	+	++	++	++	++++	++++	++	++	+	+	+	+	++	+	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	+	+
SN-23	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	++	+	+	+	+	++	+	+
NSB-1	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NSB-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NSB-10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NSB-12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NSB-17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NSB-18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NSB-27	++	+	++	++	++	+++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+++	+
NSB-36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NSB-37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NSB-40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NSB-41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NSB-43	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB09	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB24	++	++	++	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KSB01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KBM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KBM1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KBM2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KBM3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Zone of inhibition in dual culture assay: +, 0-2 mm; ++, 2-5 mm; +++, 5-7 mm; +++++, 7-9 and +++++; >9 mm.



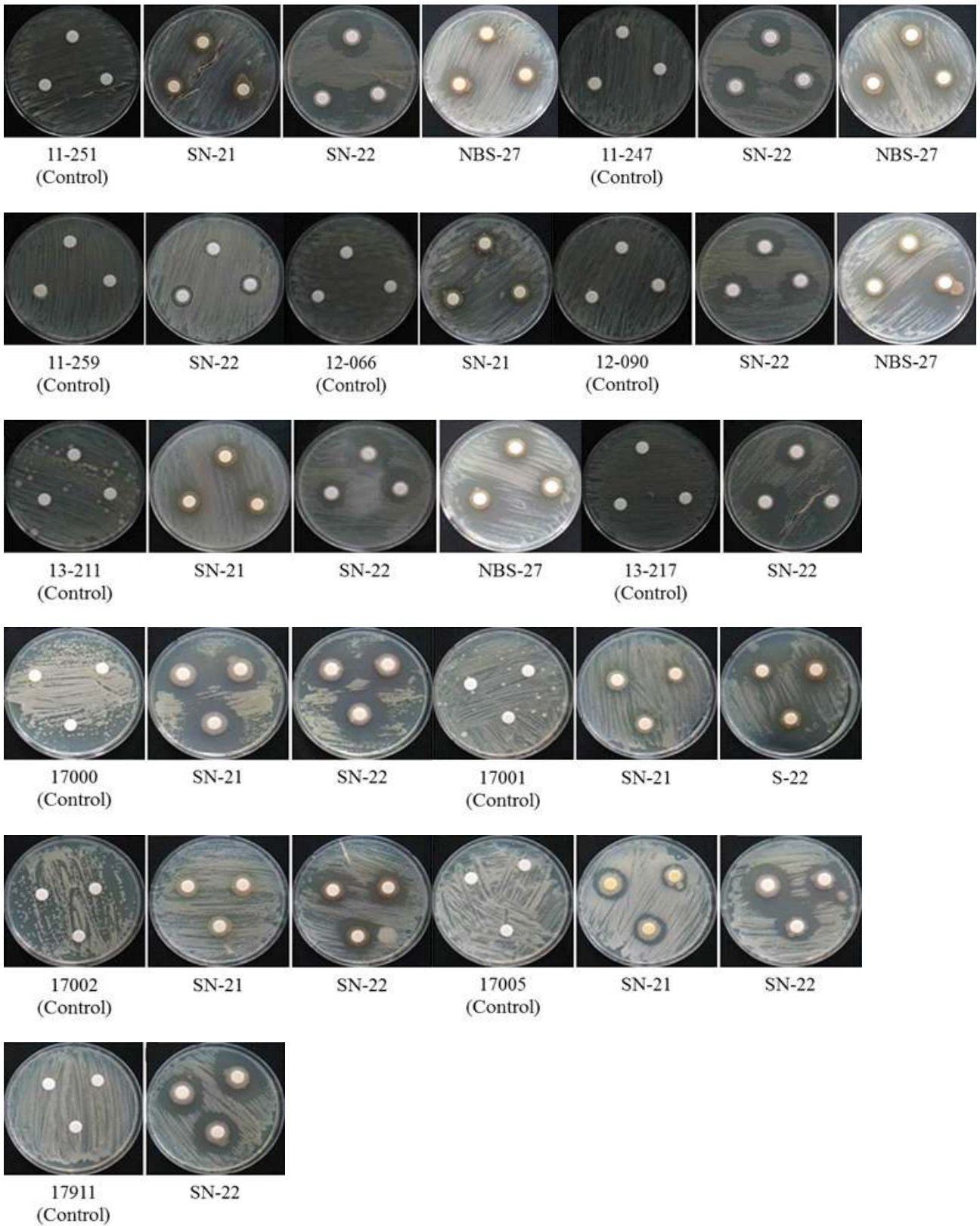


그림 96. 토양 분리 세균의 길항력 검정

10. 화학약제 활용 방제

가. 연구 방법

9가지 시판 살균제의 항균활성 실험을 위하여 BFB세균 31종을 대상으로 항균활성 실험을 실시하였다. 각각의 9가지 살균제를 농약사용 지침법의 희석 농도로 TSA배지(MBcell, Korea)에 첨가하여 사용하였다(표 39). BFB세균은 TSB배지(MBcell, Korea)에 30°C/ 150rpm/ 48h 배양하여 1×10⁵ cfu/ml 농도로 희석하여 사용하였다. 살균제가 첨가된 TSA배지에 30 µl씩 도말 접종하여 30°C에서 48h 동안 배양하여 colony를 카운팅 하였다. 실험은 10 plates, 도말 접종하여 평균값을 조사하였다.

표 39. BFB균 항균 활성 검정에 사용한 9가지 시판 농약

제 품 명	제 형	제 조 사	유 효 성 분
아이템	액상수화제	(주)인바이오믹스	Difenoconazole
귀품	액상수화제	동부정밀화학	Kresoxim-methyl, Flusilazole
히노산	유제	동부하이텍	Edifenphos
벨리스	입상수화제	바스프	Pyraclostrobin, Boscalid
비반도	액상수화제	바스프	Metrafenone
프린트	액상수화제	바이엘크롭사이언스	Trifloxystrobin
동부훼나리	유제	(주)동부한농화학	Fenarimol
명성	액상수화제	(주)영일케미컬	Fenoxanil, Fthalide
타이브랙	액상수화제	경농	Fenhexamid, Tebuconazole

나. 연구 결과

본 실험은 현재 시판되고 있는 살균제를 대상으로 종자처리를 위하여 효과가 있는 약제를 선별하기 위하여 실시하였다. 현재 *A. citrulli*를 제어할 수 있는 약제는 없는 것으로 보고되고 있으나 실험을 통하여 약제를 선별하고자 한다. 9종의 농약으로 혼합배지를 만들어서 31가지 BFB 병원세균에 대하여 살균력을 검정한 결과, 히노산이 가장 높은 살균효과와 여러 균주에서 많은 효과를 보여주었다. 다른 농약도 높은 살균력을 보여주었다. 특히 히노산은 11-162, 11-164, 11-165, 11-246, 11-251, 12-089, 12-090, 13-034, 13-211에 대하여 99% 이상의 살균효과를 보여주었다. 그 중 12-090, 13-211 균에 대하여 99.93%, 99.77%의 가장 높은 살균효과를 확인하였다. 이 외에 나머지 균들에 대해서도 90%이 이상의 높은 살균효과를 나타내었다. 아이TEM은 11-073 외 2가지 균주에 대하여 93.18% 이상의 효과를 보였으나 그 외 다른 균들에 대해서는 큰 효과를 나타내진 않았다. 귀품은 99.37%의 항균 작용을 보였으며. 그 외에 6가지 균주에 대해서 90%의 항균 작용 효과를 보여주었다. 비반도는 5가지 균주에 대하여, 동부훼나리는 2가지 균주에 대하여, 명성은 2가지 균주에 대하여 93.13%, 95.79%, 95.18%의 높은 항균 효과를 확인하였다. 이 외에도 낮은 항균 활성을 나타내는 화학약제들을 확인할 수 있었다(표 40, 그림 97).

표 40. 살균제를 이용한 BFB균 항균활성 검정

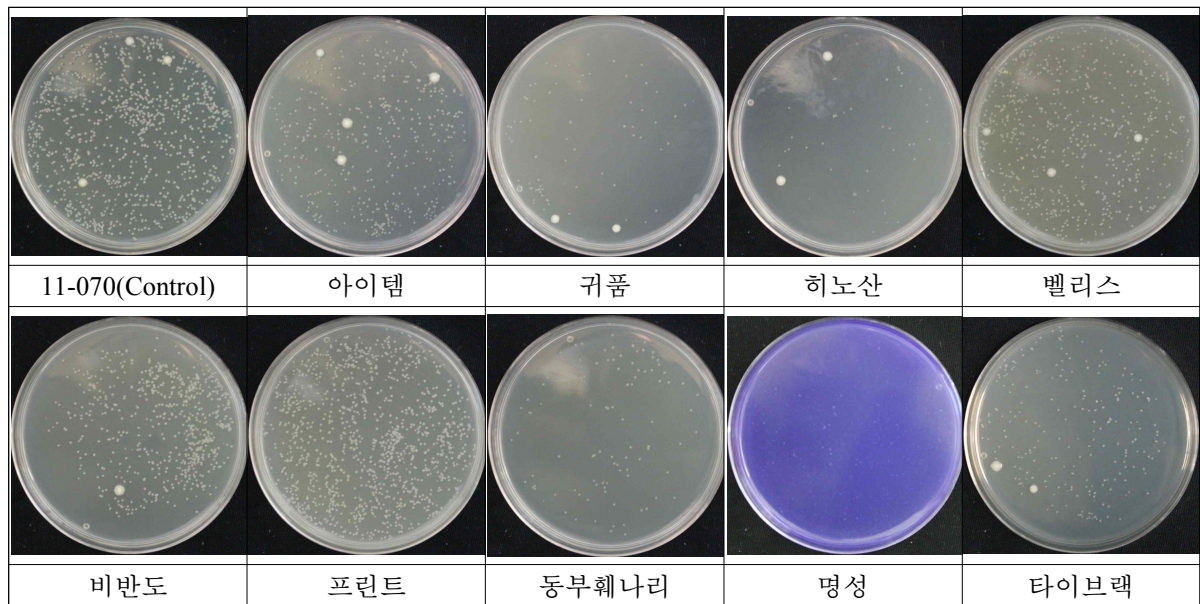
Chemical fungicide	BFB strain					
	11-070	11-073	11-147	11-162	11-163	11-164
아이템	396.00	125.00	248.00	389.33	380.00	216.67
귀퉁	63.20	470.67	22.00	58.00	202.33	10.20
히노산	47.00	20.80	5.00	1.80	7.40	5.20
벨리스	806.00	1,314.67	469.33	1,392.00	1,272.00	845.33
비반도	322.67	314.00	228.00	1,026.67	544.00	137.33
프린트	909.33	1,864.00	421.33	1,136.00	1,144.00	1,189.33
동부훼나리	94.67	345.33	69.67	157.67	222.67	813.33
명성	42.33	645.33	104.00	242.67	1,226.67	880.00
타이브랙	242.67	356.67	374.67	797.33	981.33	1,490.67
Control	832.00	1,493.33	356.67	1,472.00	925.33	1,618.67

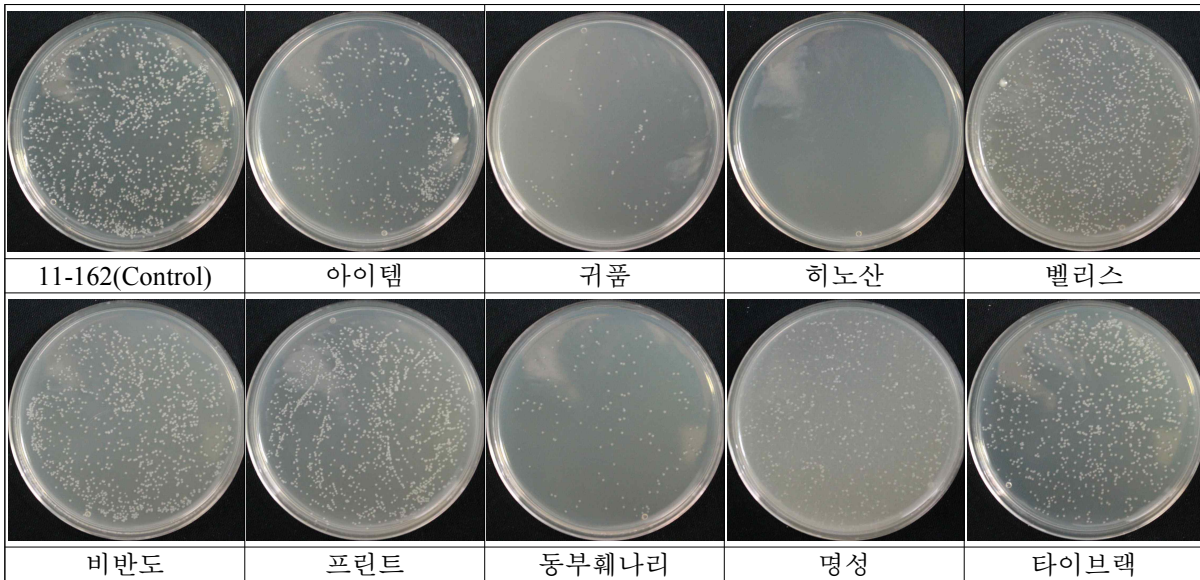
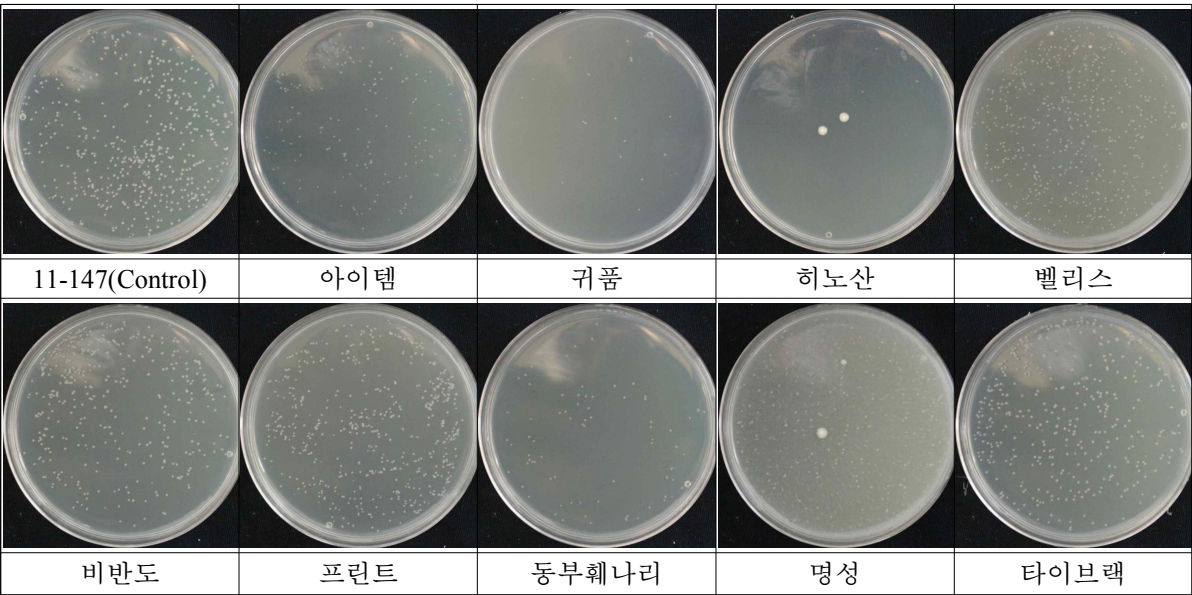
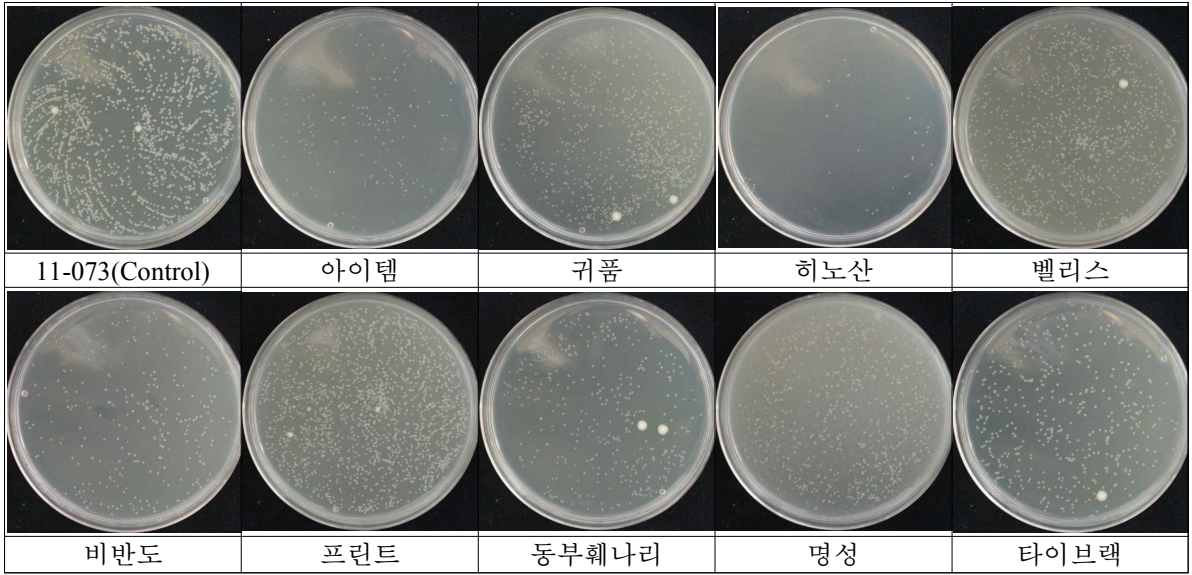
Chemical fungicide	BFB strain					
	11-165	11-171	11-201	11-246	11-247	11-248
아이템	589.33	1,197.33	216.67	592.00	1,200.00	936.00
귀퉁	437.33	1,002.67	277.33	424.00	170.25	45.67
히노산	6.80	22.20	12.20	5.80	27.60	46.20
벨리스	1,330.67	2,408.00	368.00	1,109.33	1,450.67	1,506.67
비반도	367.33	661.33	55.33	626.67	501.33	1,778.00
프린트	1,165.33	3,349.33	690.67	681.33	1,320.00	1,901.33
동부훼나리	426.67	1,773.33	40.33	1,085.33	240.50	1,024.00
명성	696.00	2,128.00	142.00	784.00	760.00	1,293.33
타이브랙	1,173.33	3,464.00	514.67	2,109.33	1,120.00	2,112.00
Control	1,272.00	1,821.33	616.33	1,786.67	1,114.00	1,522.67

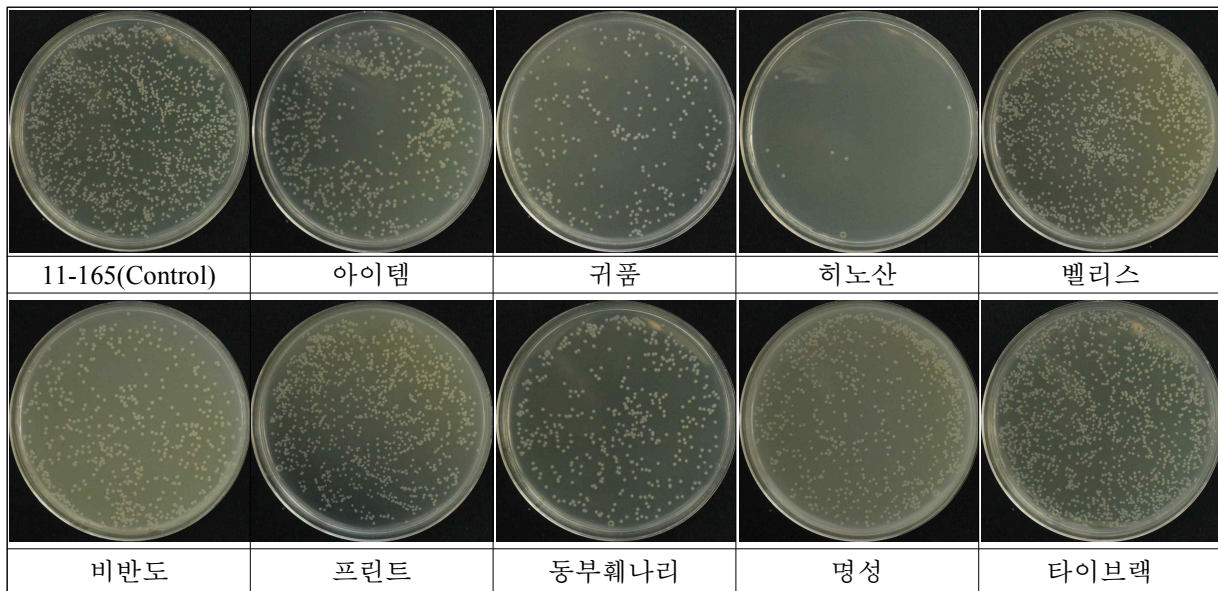
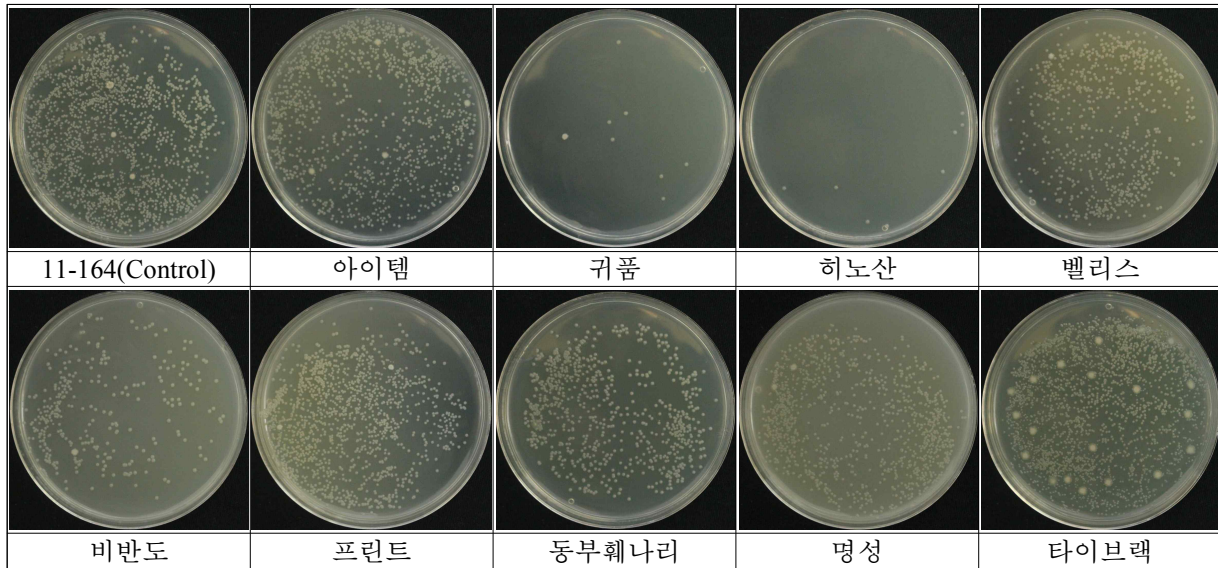
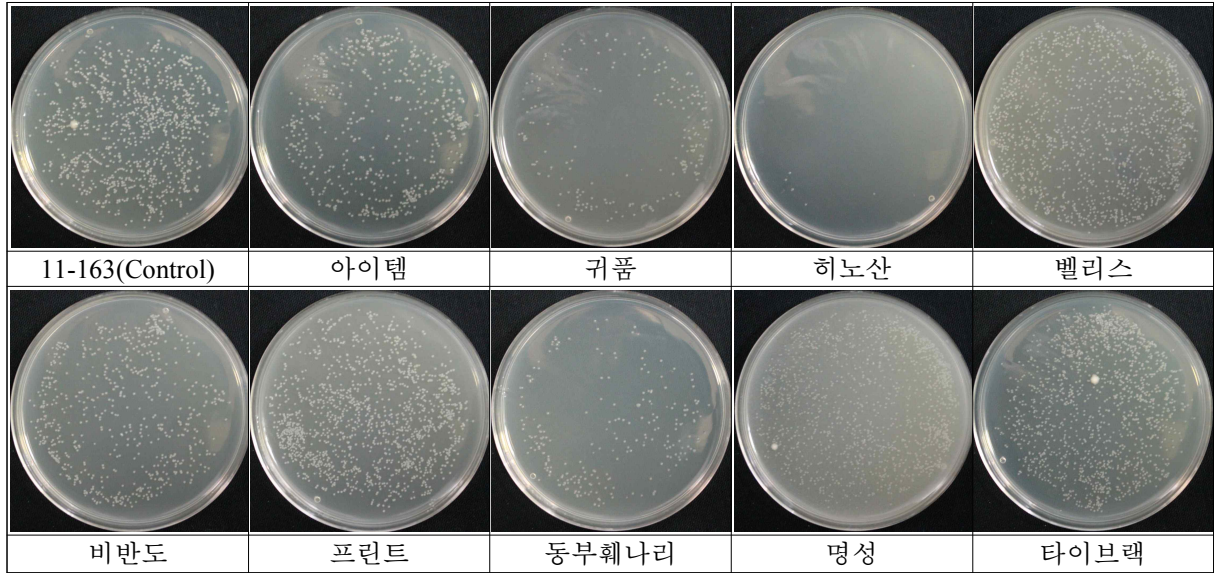
Chemical fungicide	BFB strain					
	11-251	11-259	12-033	12-063	12-089	12-090
아이템	398.00	388.00	705.33	148.67	445.33	126.67
귀퉁	261.33	258.67	498.67	61.20	439.33	28.33
히노산	7.80	7.80	31.80	7.40	4.00	0.20
벨리스	984.00	885.33	373.33	222.67	1,024.00	501.00
비반도	388.67	432.00	690.67	129.00	184.67	140.00
프린트	710.67	808.00	1,133.33	38.20	1,149.33	462.67
동부훼나리	422.67	470.40	221.33	39.33	555.67	49.33
명성	646.67	597.33	600.00	57.80	512.00	90.67
타이브랙	1,024.00	1,086.40	468.00	77.33a	874.67	385.33
Control	809.60	781.33	981.33	296.25	978.67	292.67

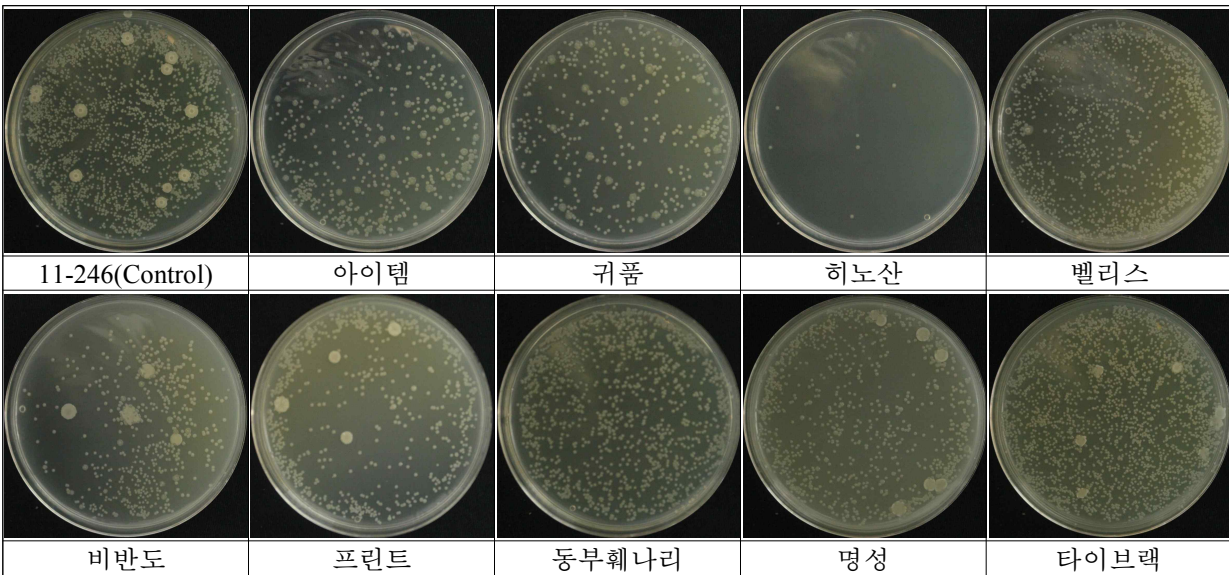
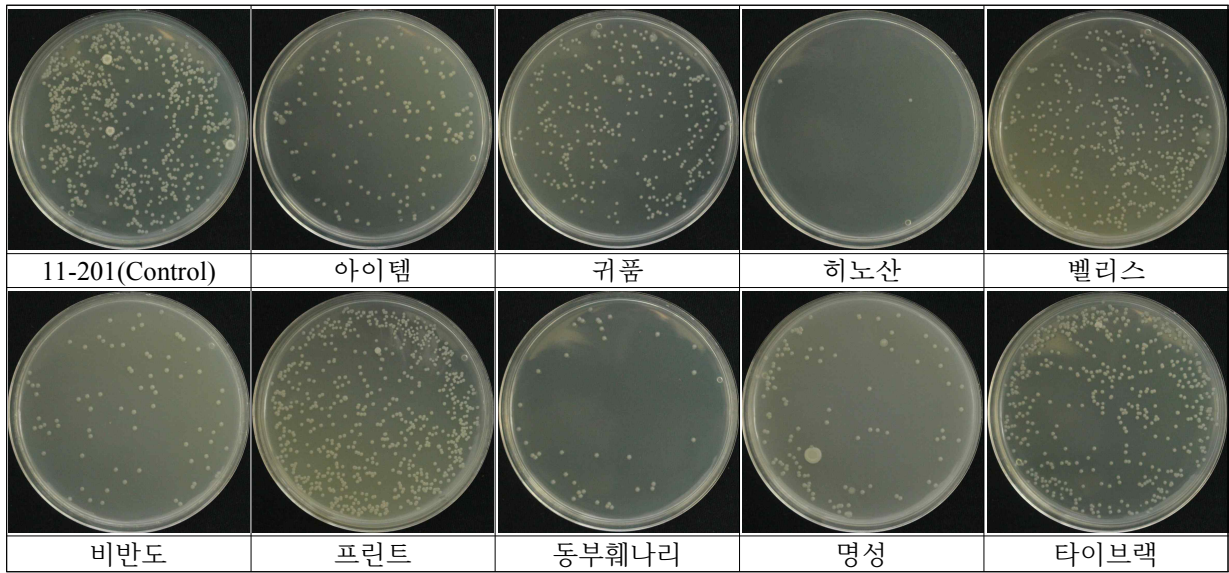
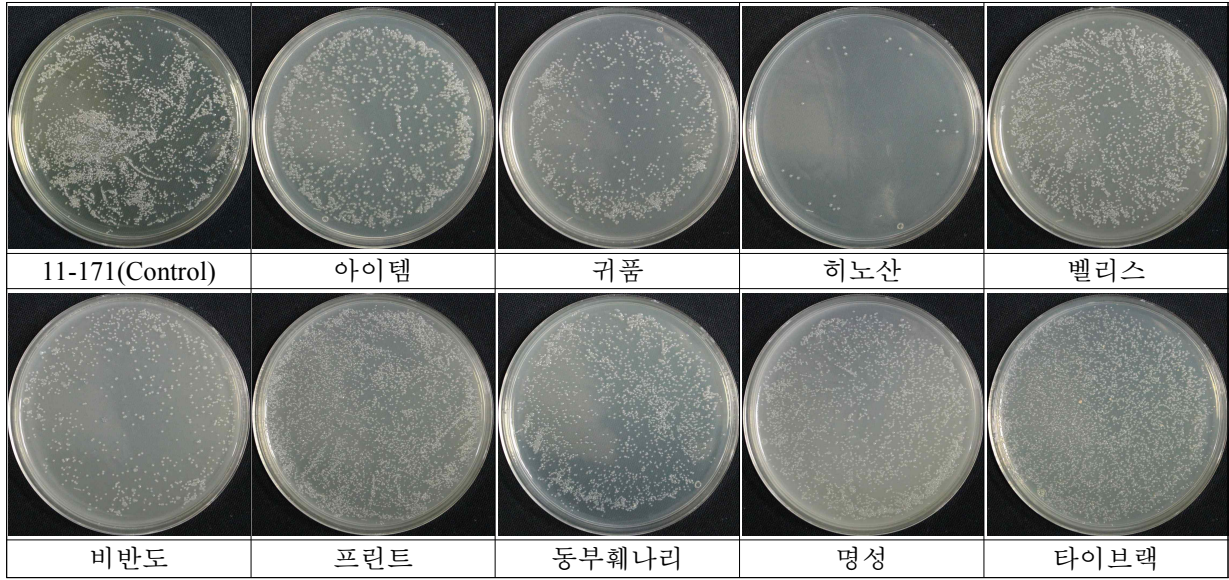
Chemical fungicide	BFB strain						
	12-158	12-170	12-316	13-034	13-211	14-044	14-194
아이템	512.00	1,056.00	1,756.67	286.67	653.33	920.00	2713.60
귀퉁	365.33	225.67	1,024.00	95.00	127.00	770.67	2,437.33
히노산	3.20	43.00	34.60	0.60	3.00	498.67	44.60
벨리스	626.67	1,226.67	3,010.67	882.67	1,301.33	806.40	669.80
비반도	33.00	760.00	3,472.00	904.00	930.67	765.33	1350.00
프린트	601.60	1,640.00	4,100.00	1,765.00	1,580.80	710.67	2,024.00
동부훼나리	664.00	616.00	1,242.67	116.67	54.00	674.67	1,044.00
명성	345.50	431.67	1,203.00	458.47	423.33	676.80	1,098.67
타이브랙	365.33	1,036.00	3,498.67	714.67	1,122.67	701.33	808.00
Control	480.00	2,088.00	2,668.00	973.33	1,282.67	1,080.00	1,193.67

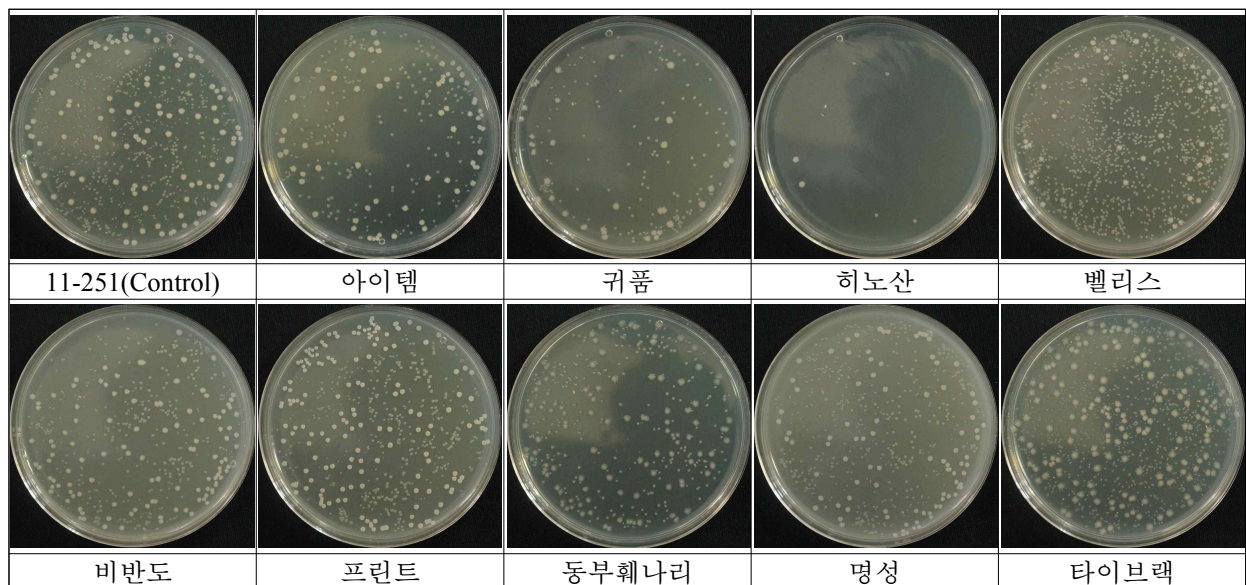
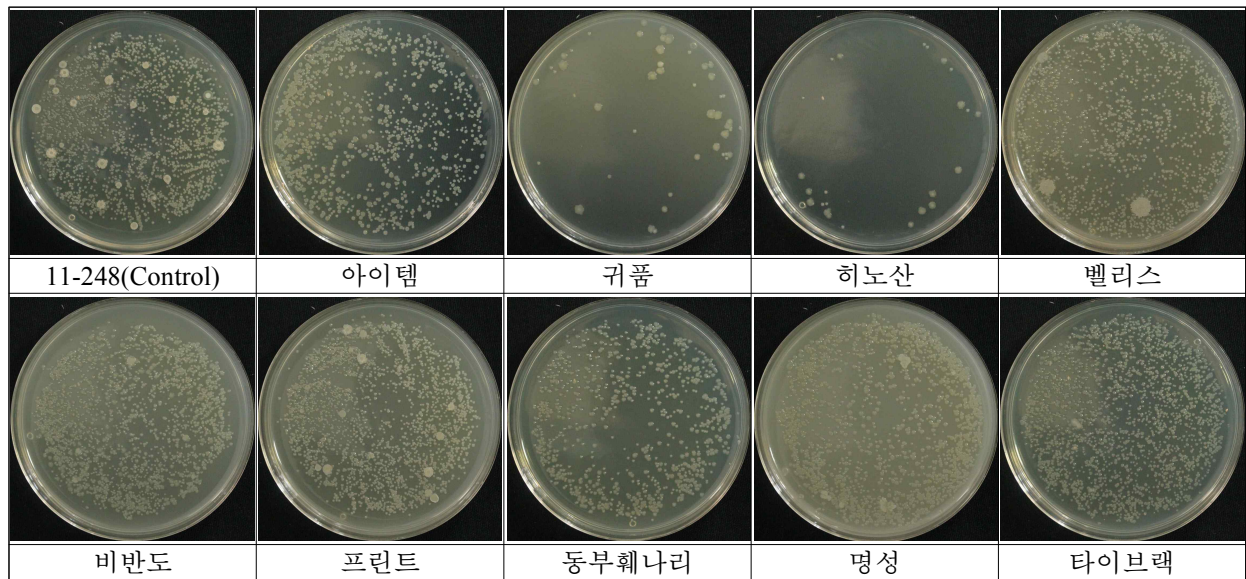
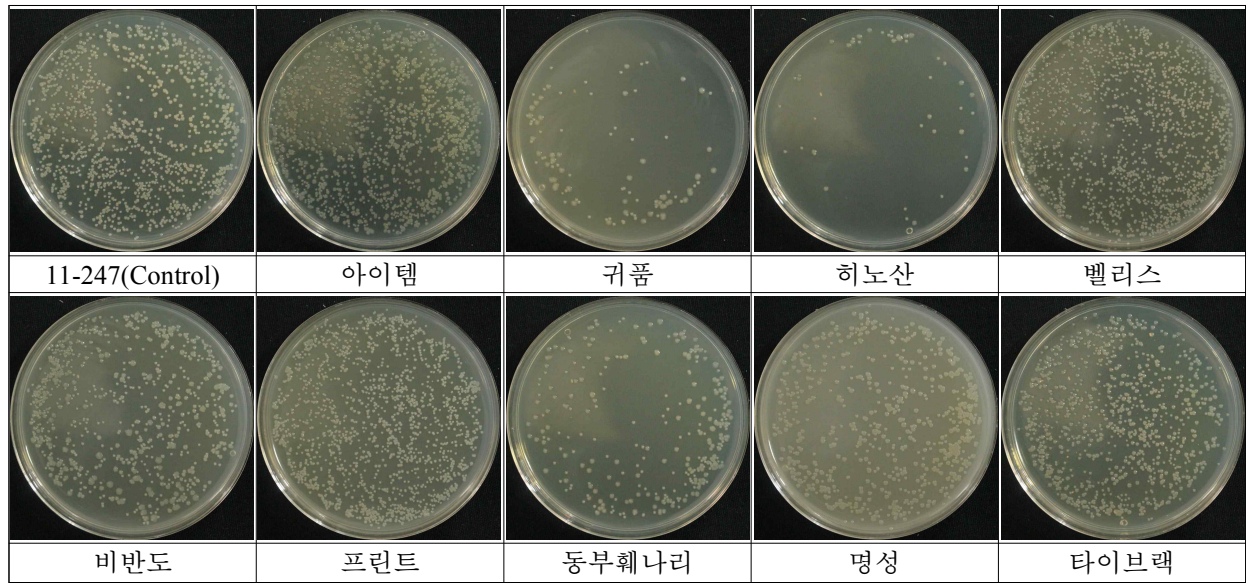
Chemical fungicide	BFB strain					
	17000	17001	17002	17005	17909	17912
아이템	130.67	1,590.33	648.00	1,384.00	1,410.67	309.33
귀퉁	698.67	1,268.67	632.00	834.00	269.33	360.80
히노산	44.40	281.33	52.00	644.80	31.40	144.00
벨리스	1,098.67	1,512.67	452.00	837.33	592.00	1074.20
비반도	171.00	1,840.67	33.00	1,142.40	82.00	379.40
프린트	1,597.33	955.33	242.67	1,130.67	1,250.67	424.00
동부훼나리	251.33	309.67	336.00	685.33	664.00	309.67
명성	92.33	1,213.67	152.00	885.33	994.67	324.00
타이브랙	1,024.00	1,585.33	101.00	1,079.80	1,162.67	346.67
Control	1,917.33	1,198.67	161.00	1,600.00	1,018.67	449.00

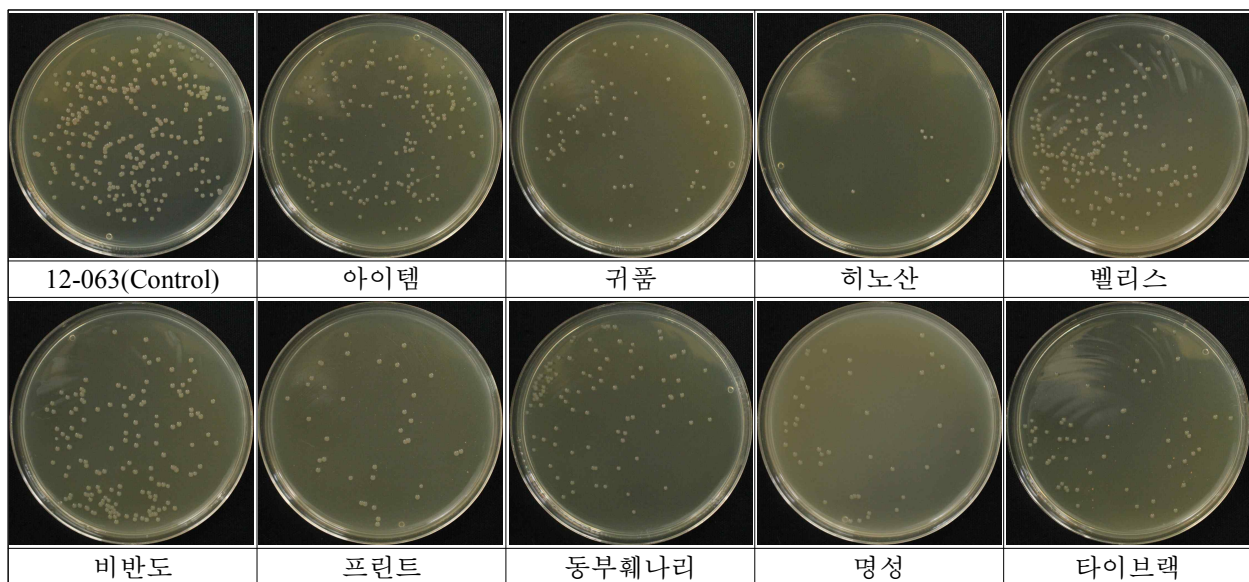
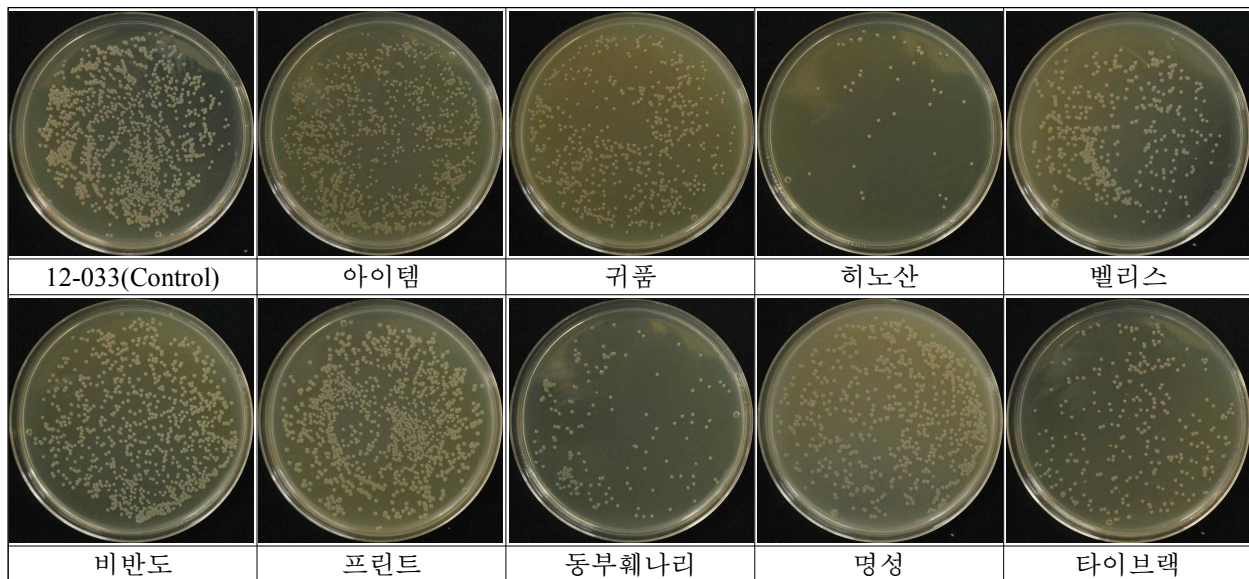
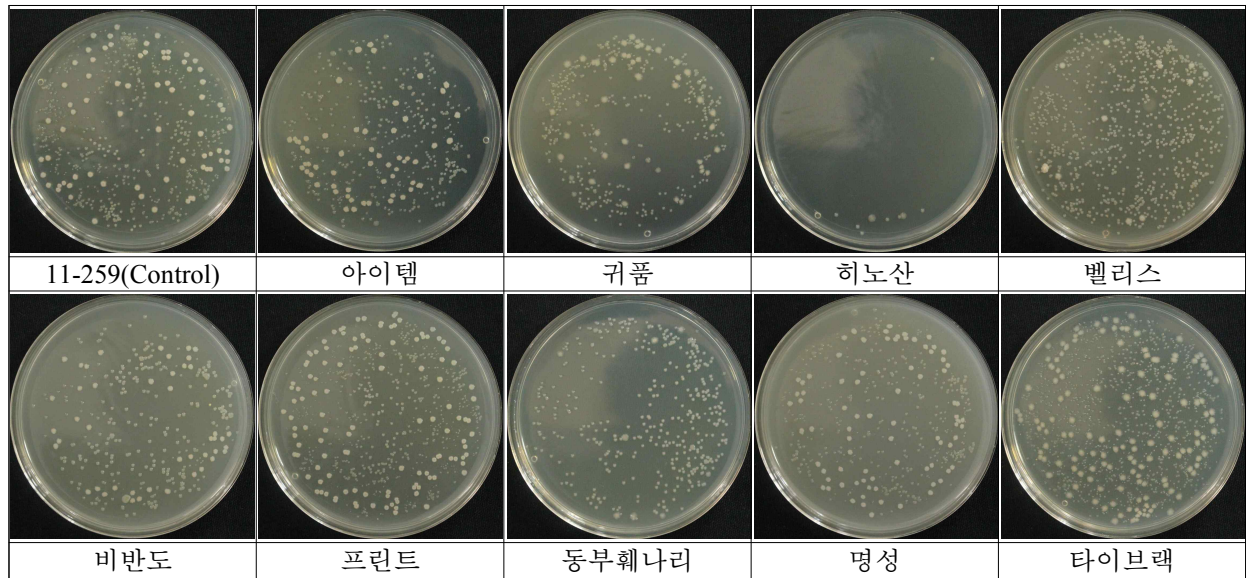


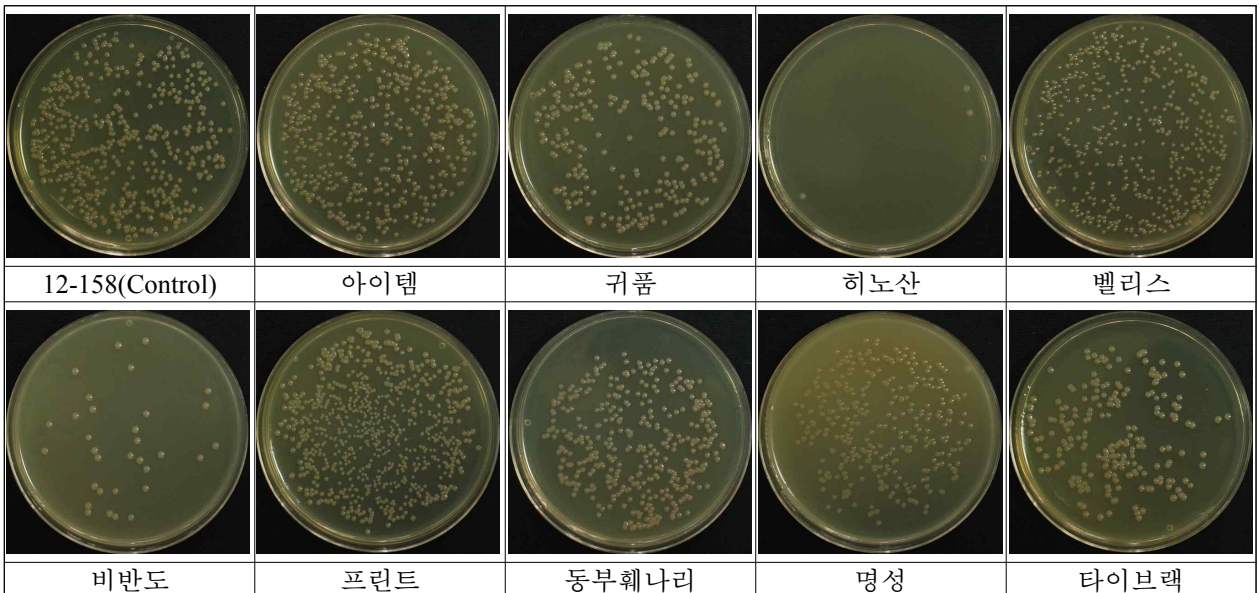
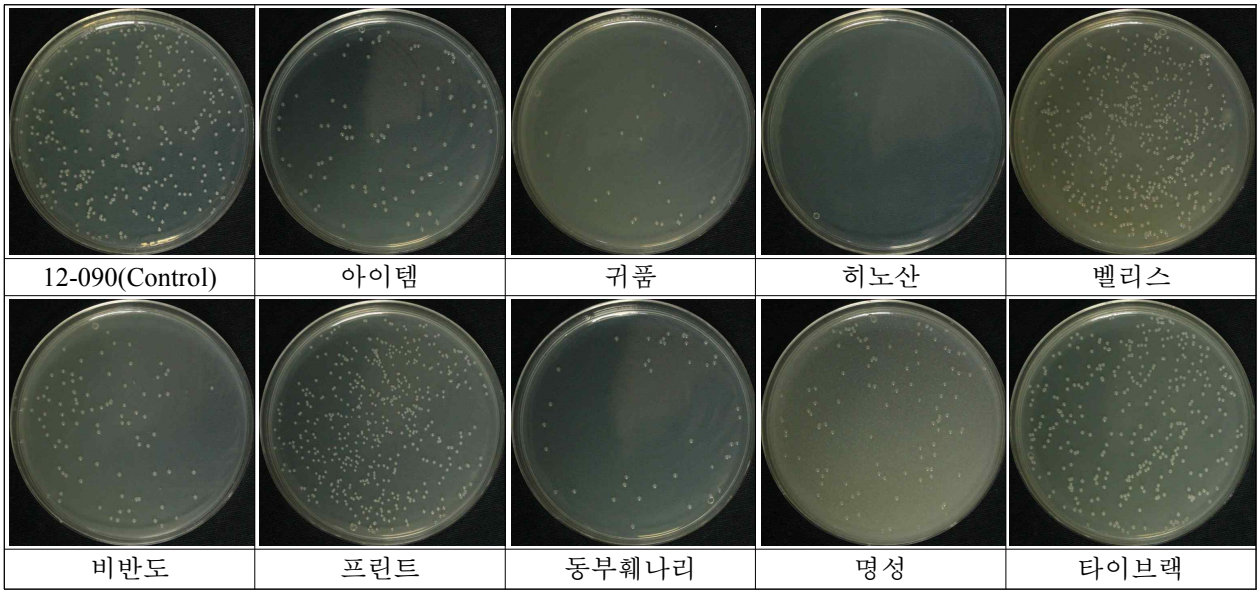
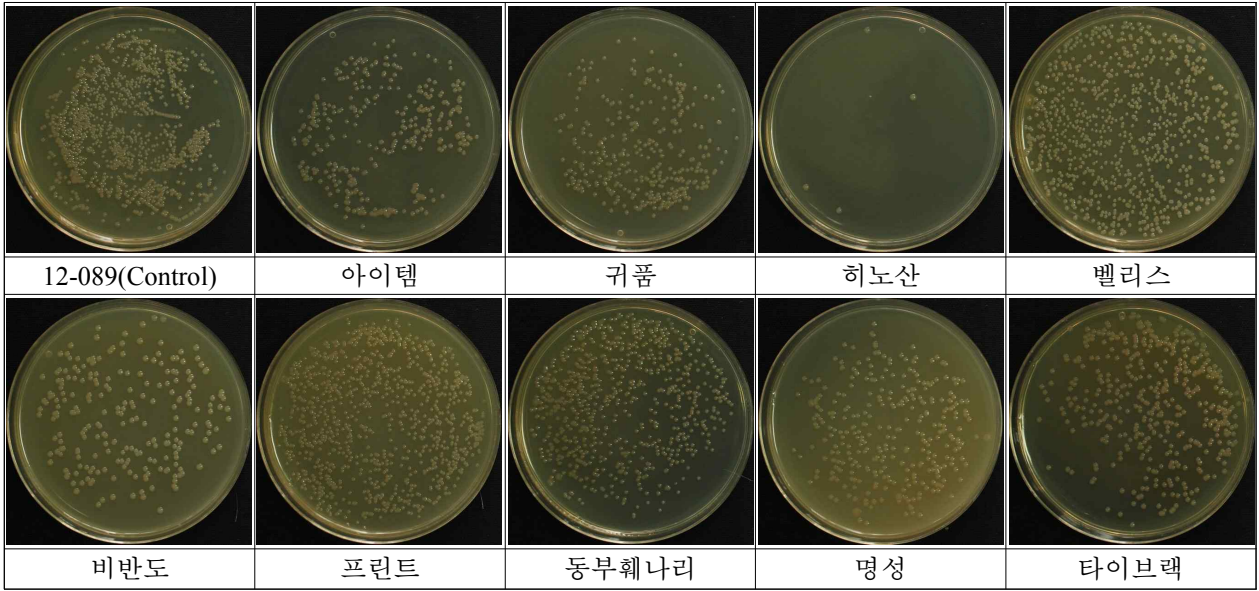


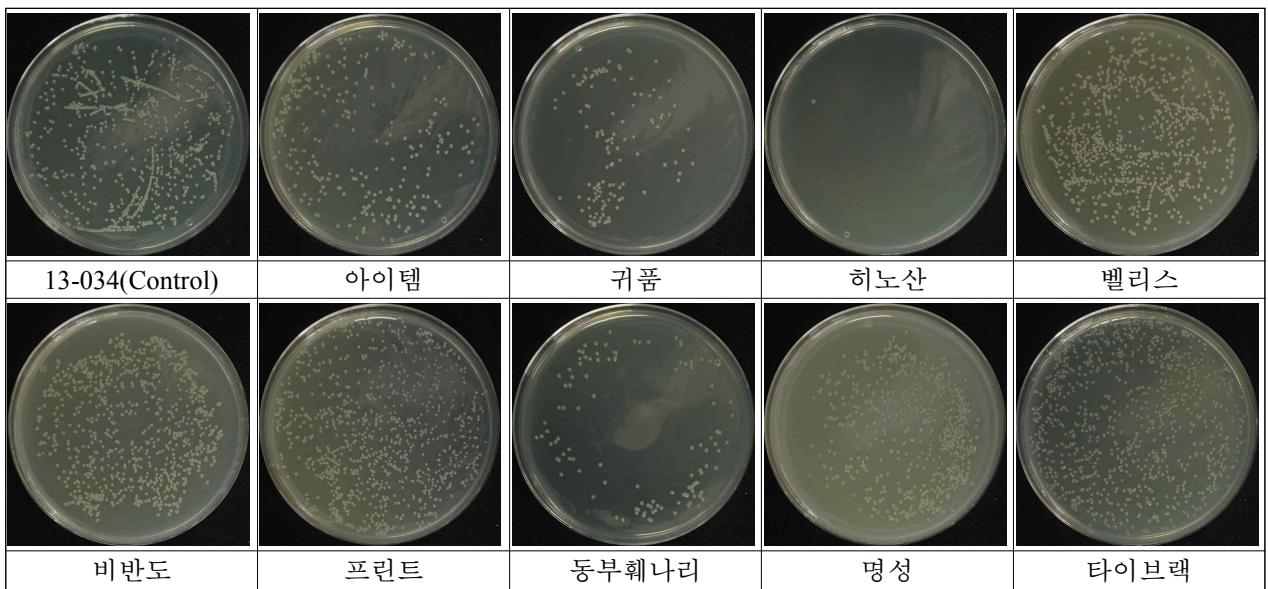
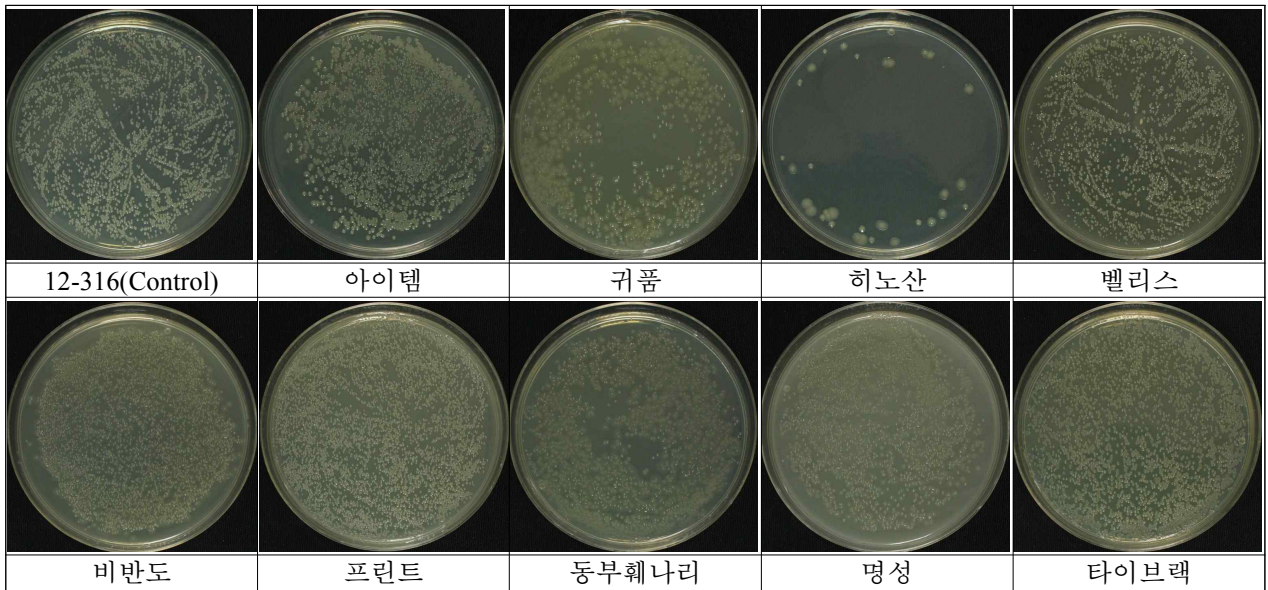
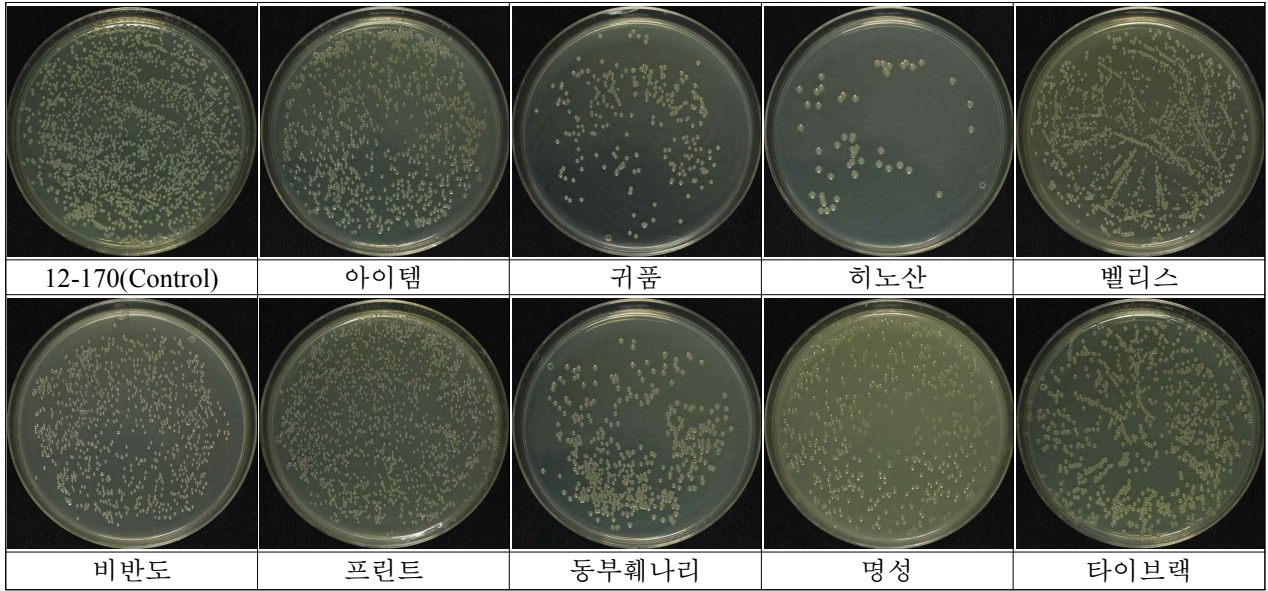


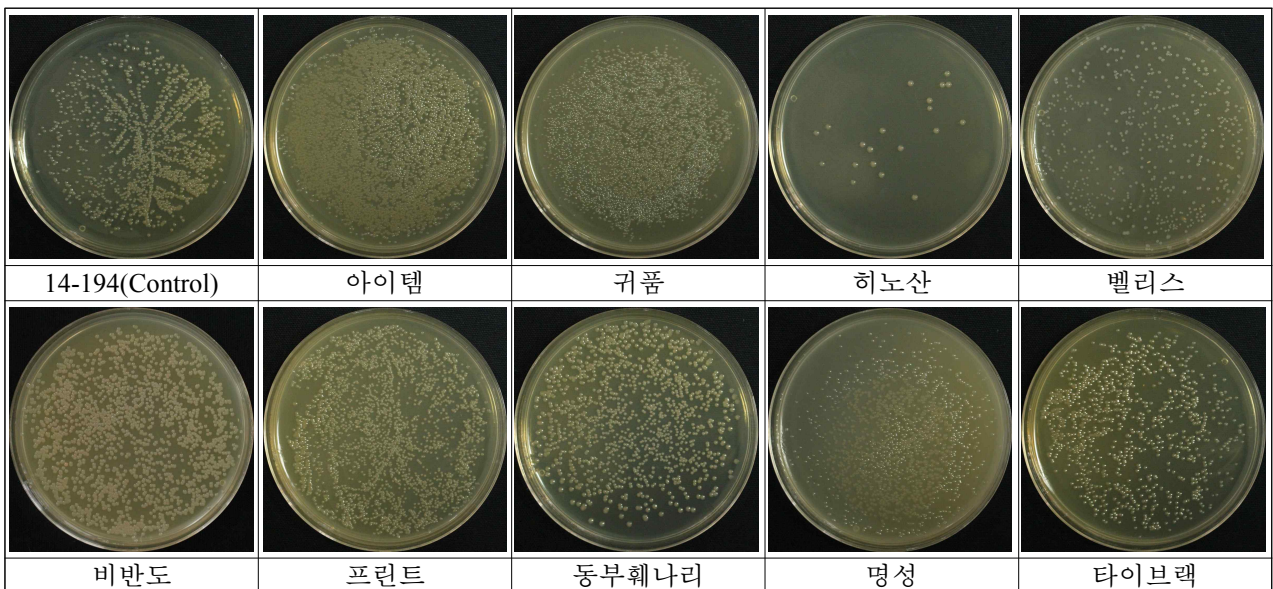
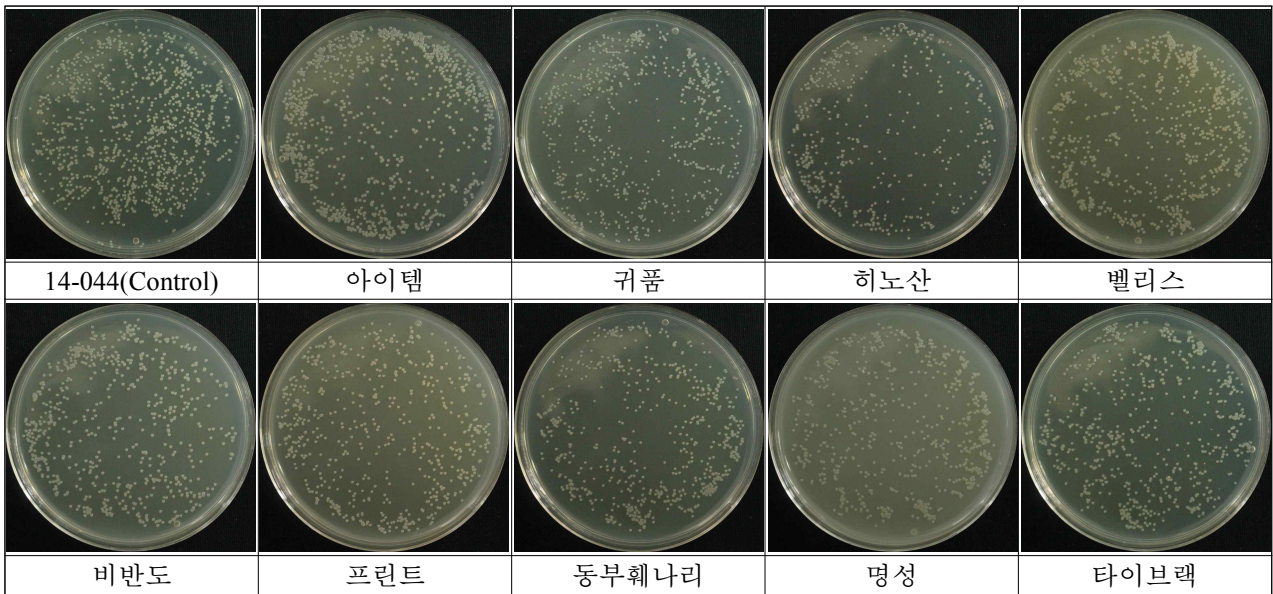
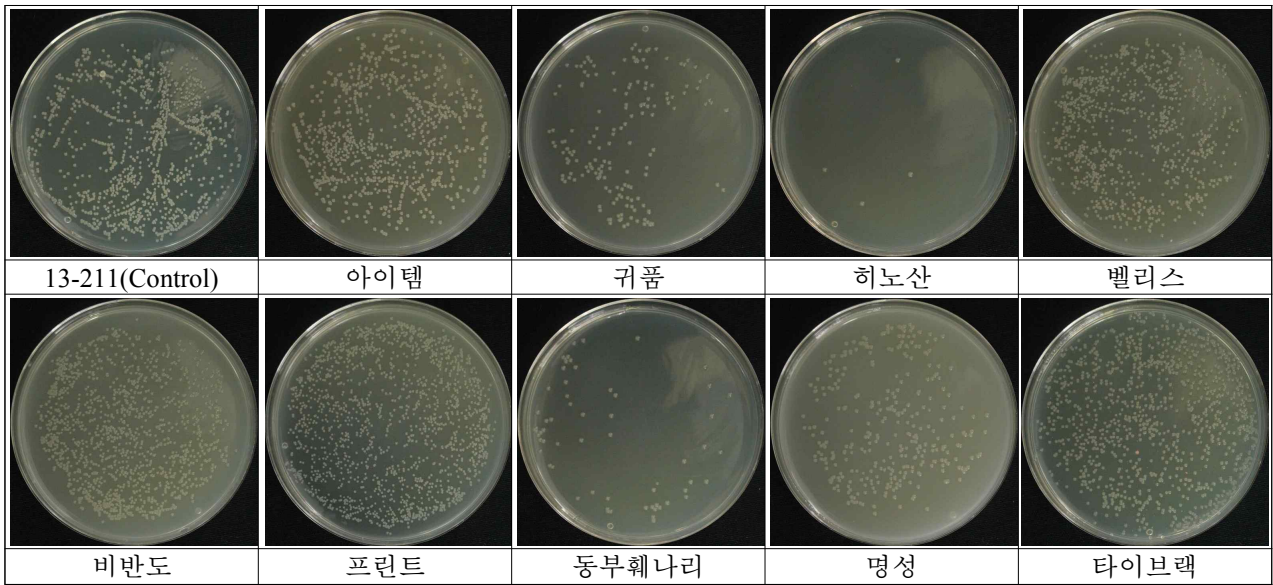


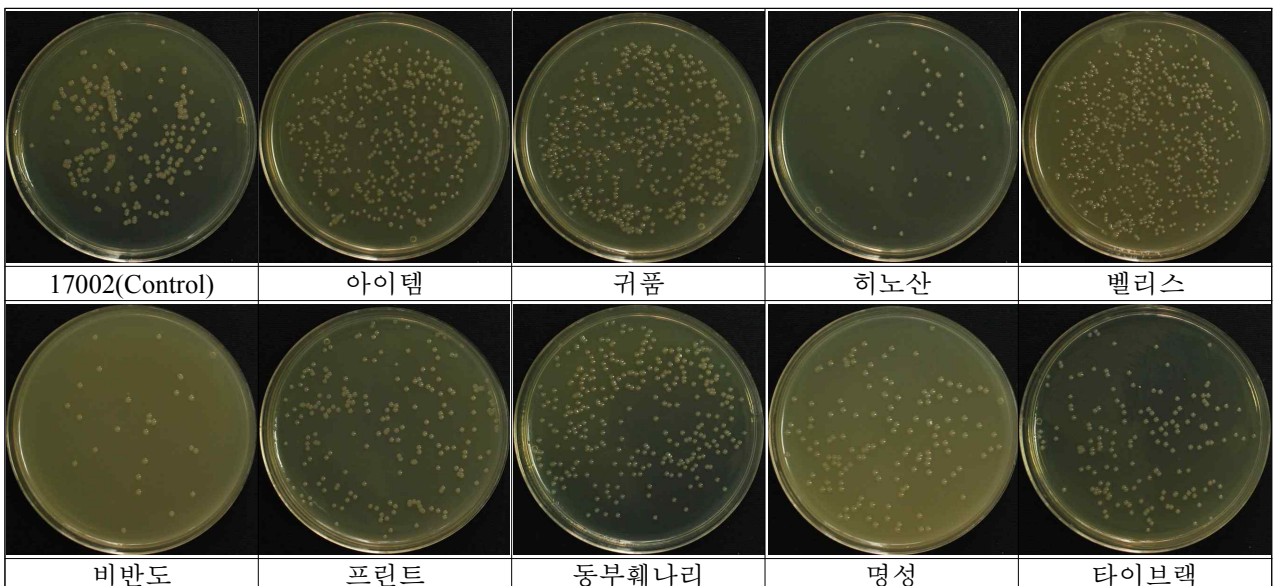
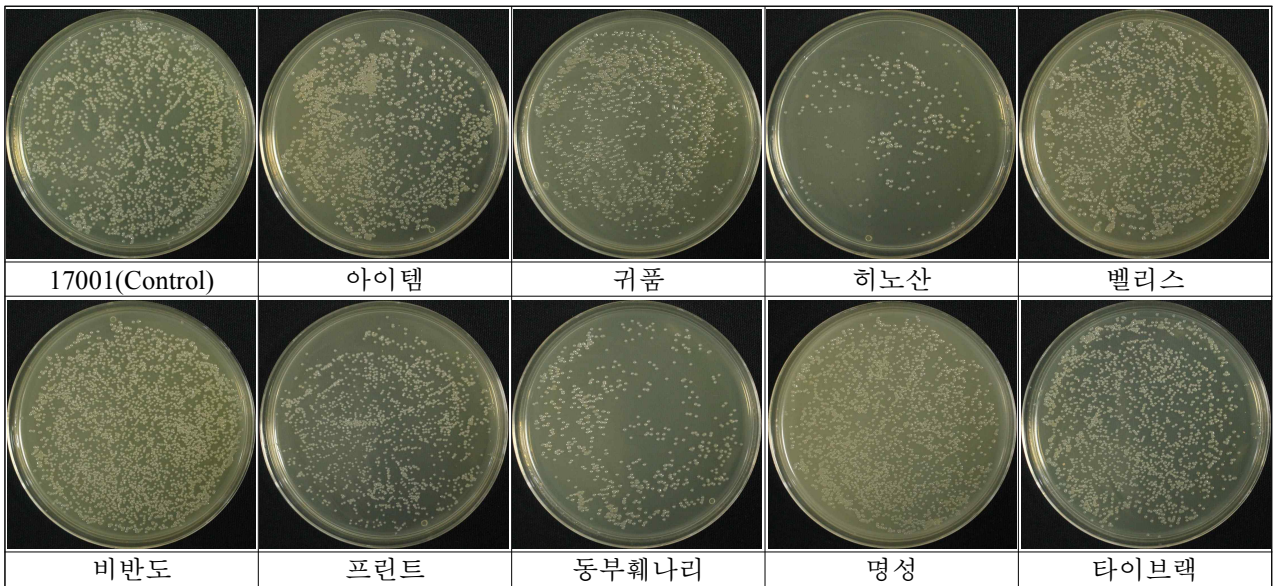
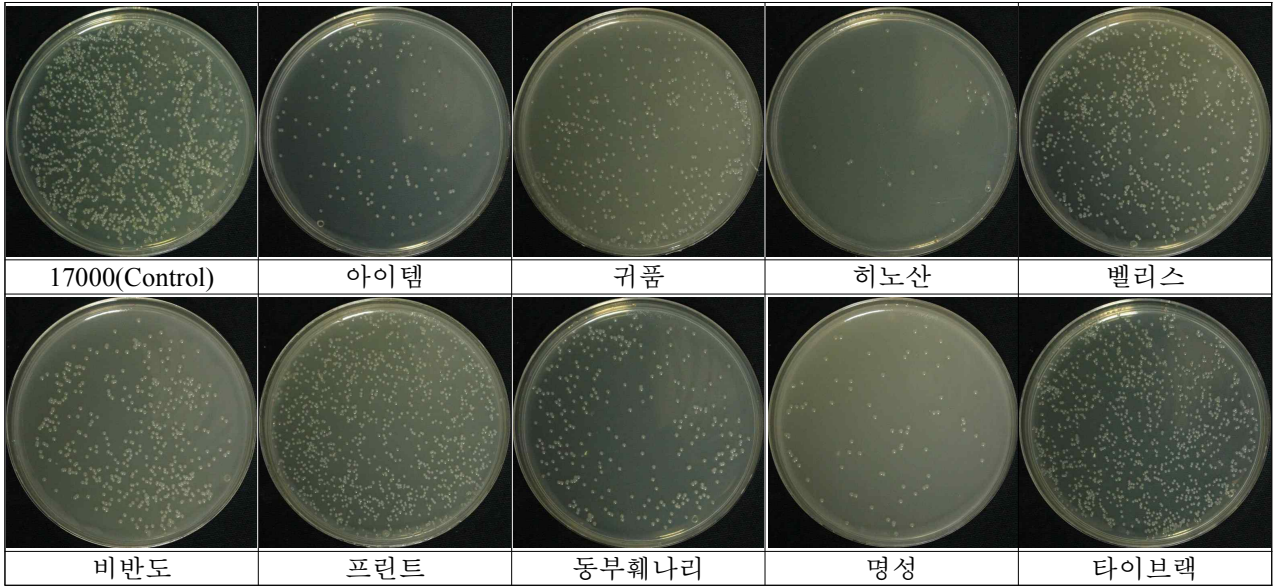


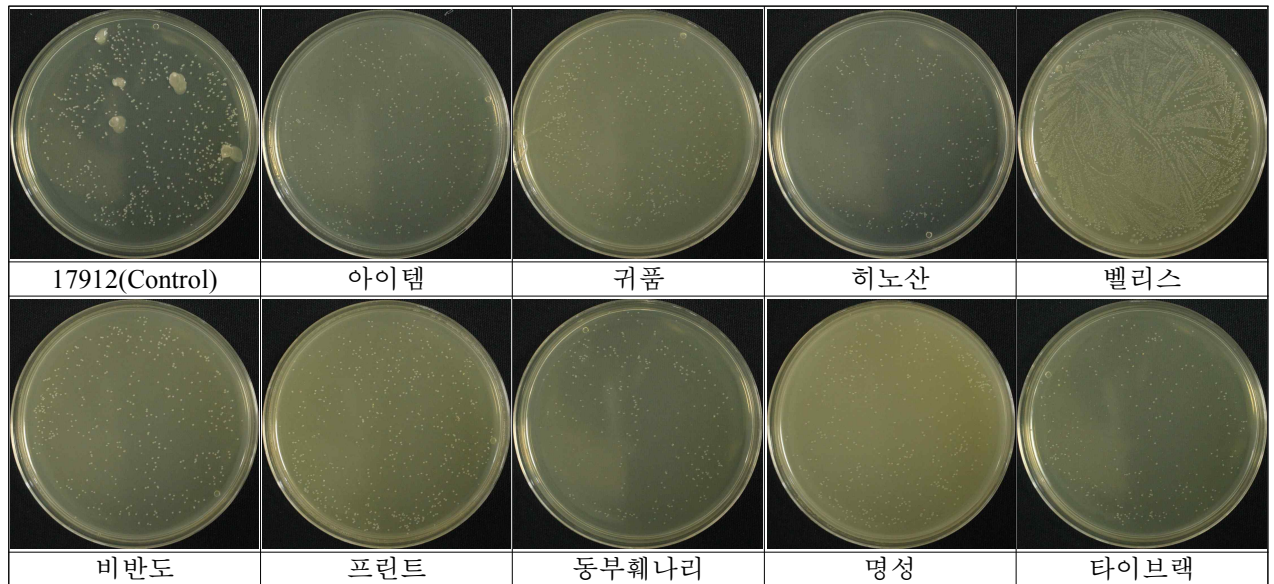
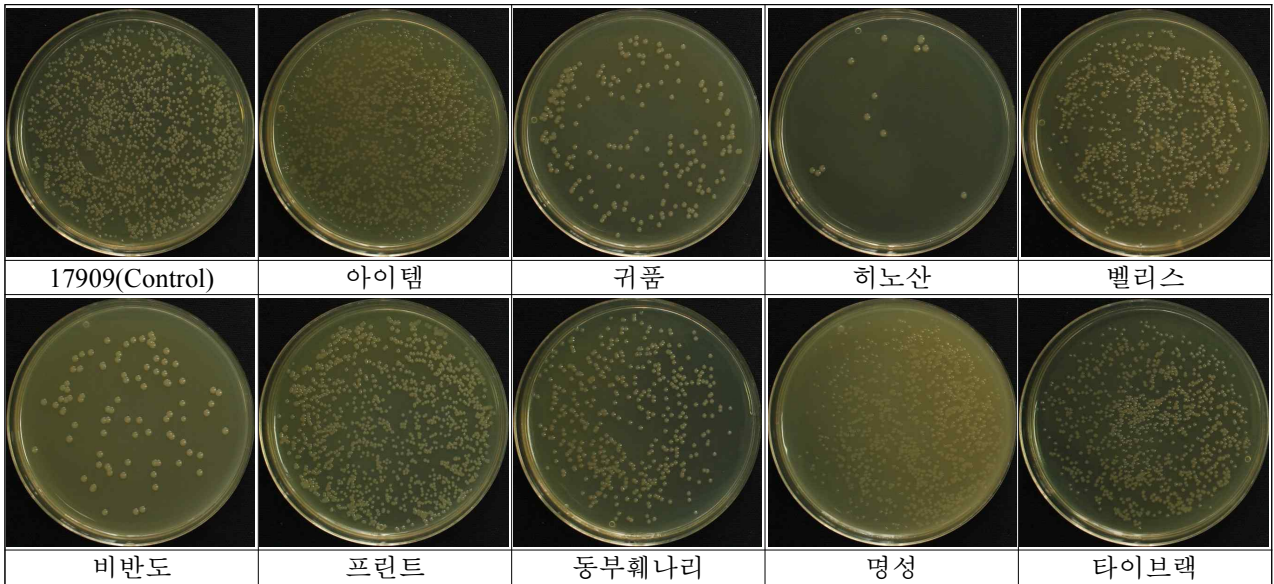
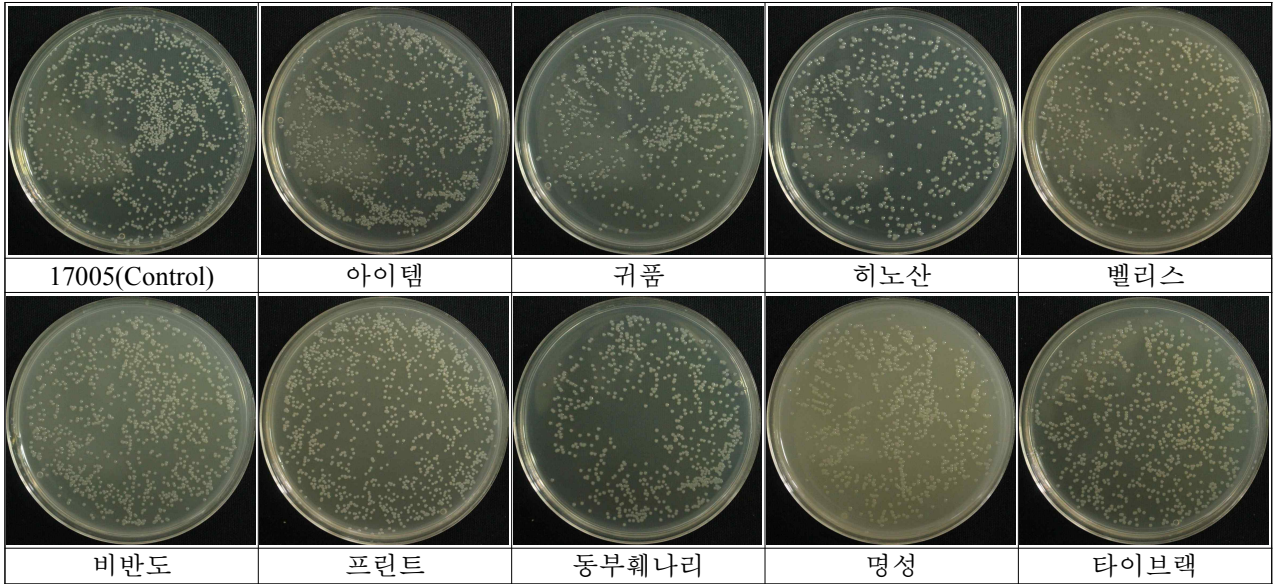












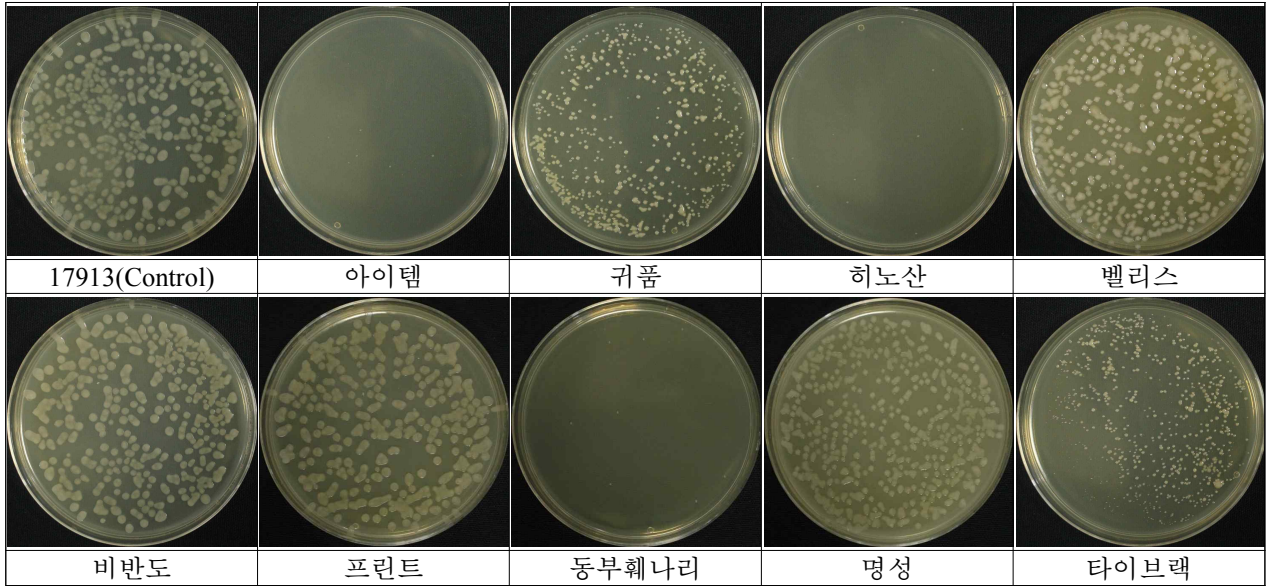


그림 97. 각 분리 균주별 화학약제 처리 살균효과 검정

11. 나노화합물을 활용한 BFB균 항균활성 검정

가. 연구 방법

나노기술을 활용한 23가지 나노 화합물의 항균활성 실험을 위하여 BFB세균 48종을 대상으로 항균활성 실험을 실시하였다. 각각의 23가지 나노화합물은 250 ml 기준 1%가 되도록 TSA 배지(MBcell, USA)에 첨가하여 사용하였다. BFB세균은 TSB배지(MBcell, UAS)에 30°C/ 150rpm/ 48h 배양하여 1×10^5 cfu/ml 농도로 희석하여 사용하였다. 나노화합물이 첨가된 TSA배지에 30 μ l 씩 도말 접종하여 30°C에서 48h 동안 배양하여 colony를 카운팅 하였다. 실험은 10 plates, 도말 접종하여 평균값을 조사하였다.

나. 연구 결과

현재 확보된 48종의 BFB균을 대상으로 나노기술을 활용한 나노화합물의 항균활성을 검정하기 위하여 실험을 실시하였으며, 건열 및 습열 처리 전, 전처리로 종피 수준의 BFB균을 방제하고자 실험을 실시하였다. 여러 가지 나노화합물은 Plasma 기술, 화학적 제조공정 및 감마선을 이용한 나노 기술 등을 활용하여 제작 되어졌다. 실험 결과를 석회의 경우 16개 모두의 균들에 대하여 효과 가있는 것으로 확인 되었으며, Brass/CaCO-3,000ppm의 경우 석회와 비슷하게 높은 항균력을 확인 하였다. 두 가지 나노 물질의 경우에는 위에서 실시한 유전 분석결과 3개의 그룹에 상관없이 대부분 높은 효과를 보여주고 있으며, 은/소금-300ppm, 구리/소금 1,000ppm의 경우에는 특이하게 KCC2그룹에서는 효과가 없었으나 KCC1그룹에 속해있는 균주들에는 효과가 있는 것으로 나타났다. 현재는 16개 균주에 대해서 실험을 진행하였으며, 나머지 균들도 진행 중에 있으며, KCC1그룹의 특성을 조사하여 어떤 기작에 의하여 항균력을 보이는지 연구를 진행 할 예정이다(표 41, 42, 그림 98~103).

표 41. 나노 화합물을 활용한 BFB균 항균활성검정

BFB	나노 화합물					
	Control	은/포도당 1,000ppm	은/포도당 3,000ppm	은/소금 300ppm	구리/소금 1,000ppm	석회
11-147	UN*	UN	UN	UN	UN	0
11-162	UN	UN	UN	UN	UN	0
11-163	UN	UN	UN	UN	UN	0
11-164	UN	UN	UN	UN	UN	0
11-165	UN	UN	UN	UN	UN	0
11-171	UN	UN	UN	UN	UN	0
11-201	UN	UN	UN	UN	UN	0
11-246	1301.6	480.8	720.4	3.4	10.8	0
11-247	454.6	144.0	261.0	0.2	0.4	0
14-201	UN	516.8	812.0	314.2	394.8	0
16997	437.2	28.6	302.0	0	0	0
17000	524.4	121.0	575.2	61.2	13.6	0
17001	UN	156.0	UN	157.8	21.0	0
17005	291.4	49.0	252.8	12.2	0	0
17910	379.0	30.8	425.6	42.2	0	0
17911	379.0	122.4	303.0	27.60	0.6	0

UN* (Uncountable) : Plate 전체에 모두 자라 카운팅 할 수 없음

(표 계속)

표 42. 나노 화합물을 활용한 BFB균 항균활성검정

BFB	나노 화합물						
	Control	Fe/AC 100ppm	Brass/AC 100ppm	Ag/AC 100ppm	Cu/AC 100ppm	Ag/CaCO ₃ 3,000ppm	Brass/CaCO ₃ 3,000ppm
11-147	27.60	26.80	28.40	37.60	25.00	16.00	0
11-162	293.60	414.80	287.60	302.20	208.60	211.60	0
11-163	241.20	203.60	115.60	150.00	123.40	65.40	0
11-164	198.20	832.00	740.80	747.20	849.60	430.40	0
11-165	372.80	1942.40	UN	1419.20	884.80	UN	0
11-171	UN*	UN	UN	UN	UN	UN	0
11-201	UN	UN	UN	UN	UN	UN	0
11-246	1301.60	UN	UN	UN	UN	UN	53.60
11-247	454.60	543.60	1353.60	517.60	540.80	465.60	1.00
14-201	UN	UN	UN	UN	UN	UN	484.60
16997	437.20	663.20	854.40	0.20	744.80	0	0
17000	524.40	726.40	744.00	1024.00	916.00	434.40	40.40
17001	UN	UN	UN	369.60	UN	UN	UN
17005	291.40	806.40	612.80	220.80	825.60	90.20	0
17910	379.00	636.80	564.80	219.20	750.40	62.80	1.40
17911	379.00	497.60	764.00	110.00	592.80	36.20	8.00

UN* (Uncountable) : Plate 전체에 모두 자라 카운팅 할 수 없음

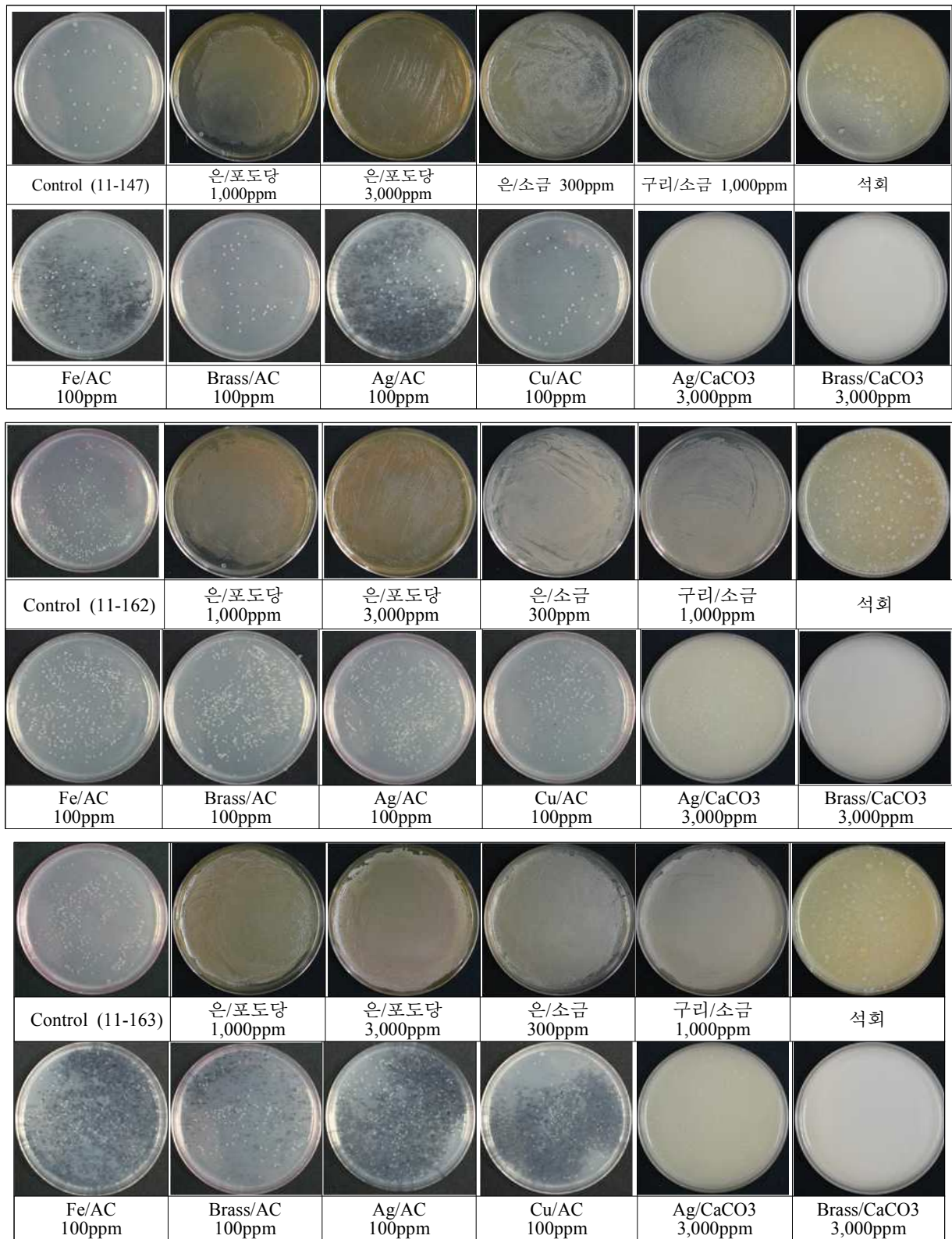


그림 98. 나노 화합물을 활용한 BFB균 항균활성 검정

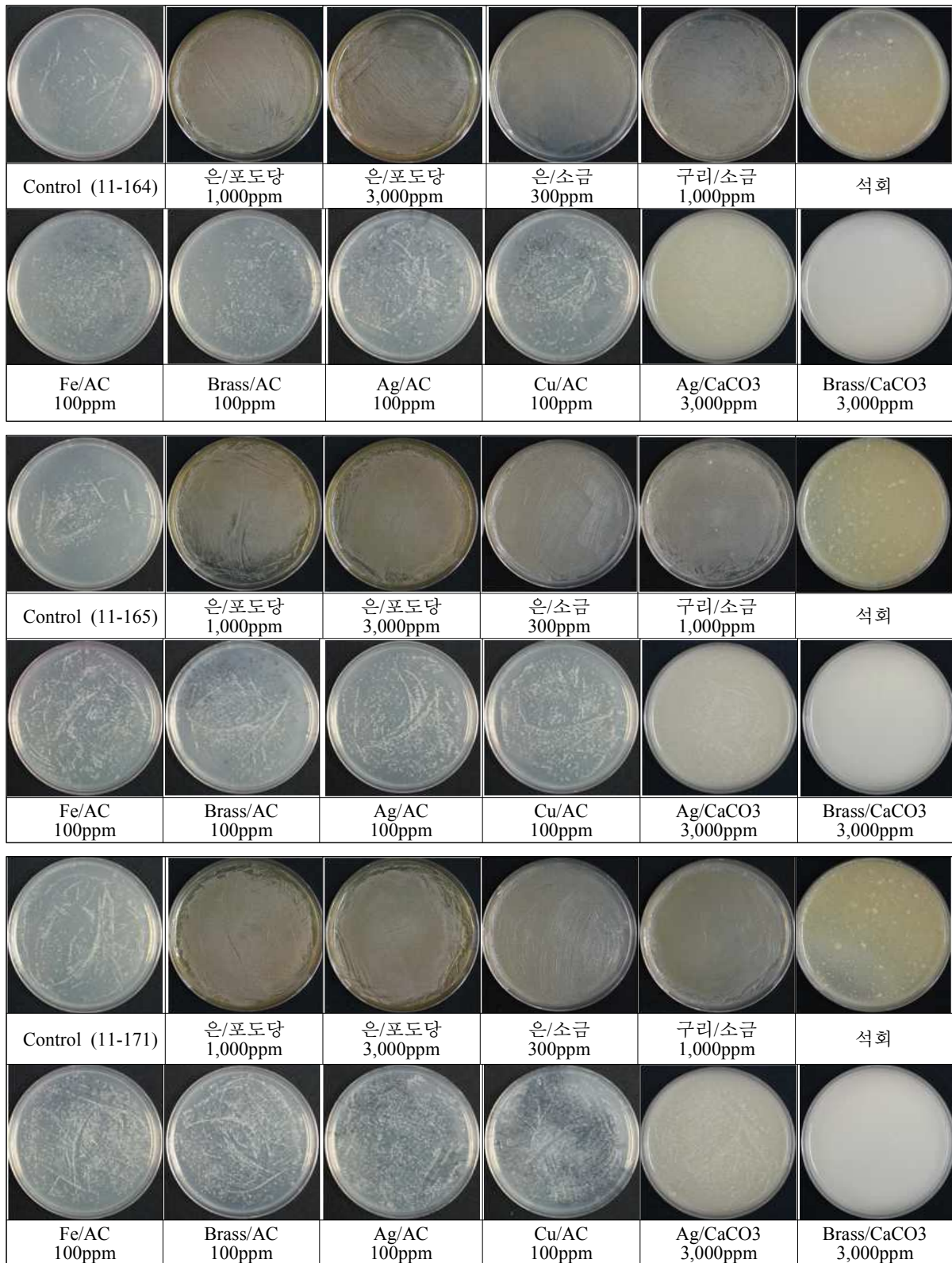


그림 99. 나노 화합물을 활용한 BFB균 항균활성 검정

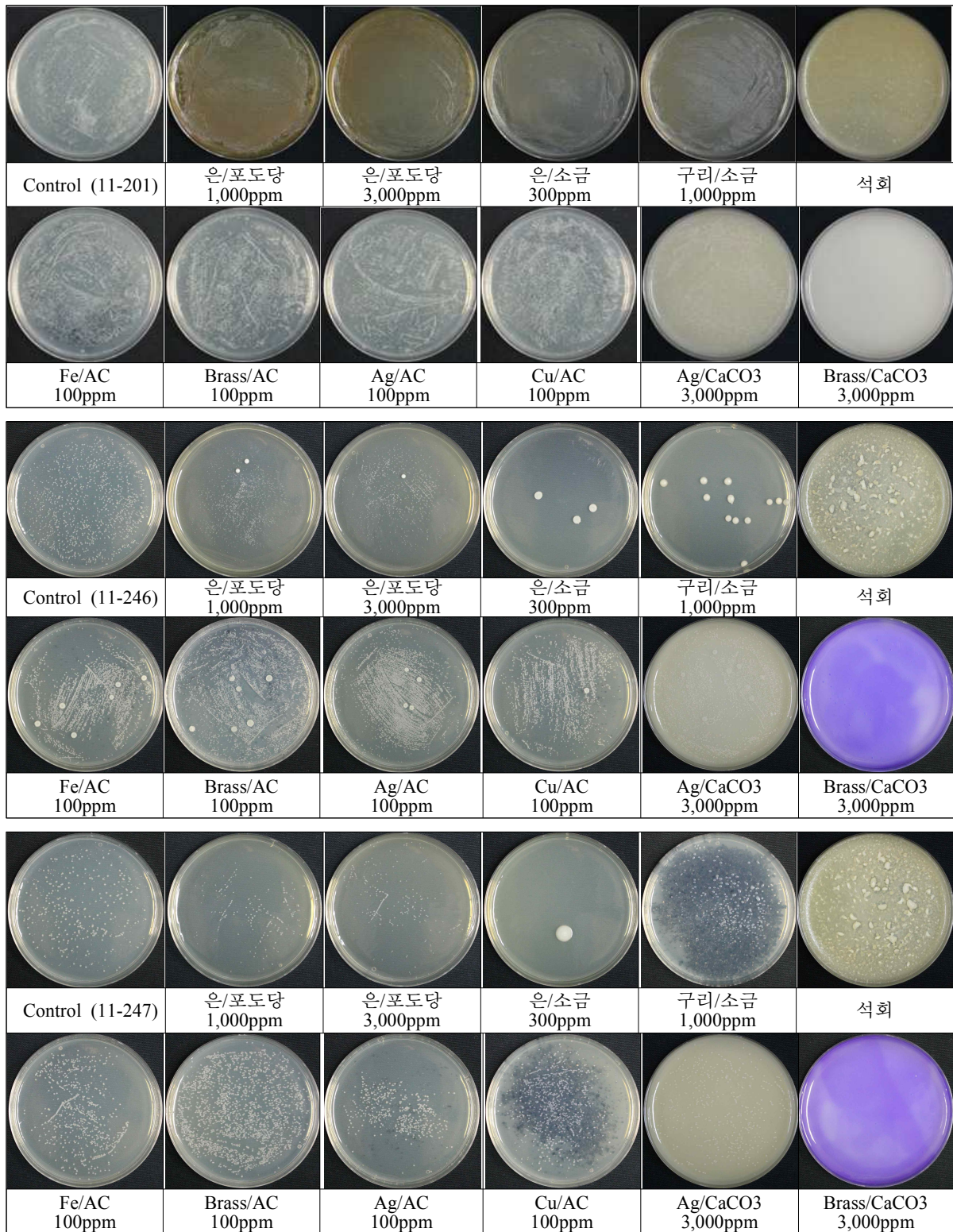


그림 100. 나노 화합물을 활용한 BFB균 항균활성 검정

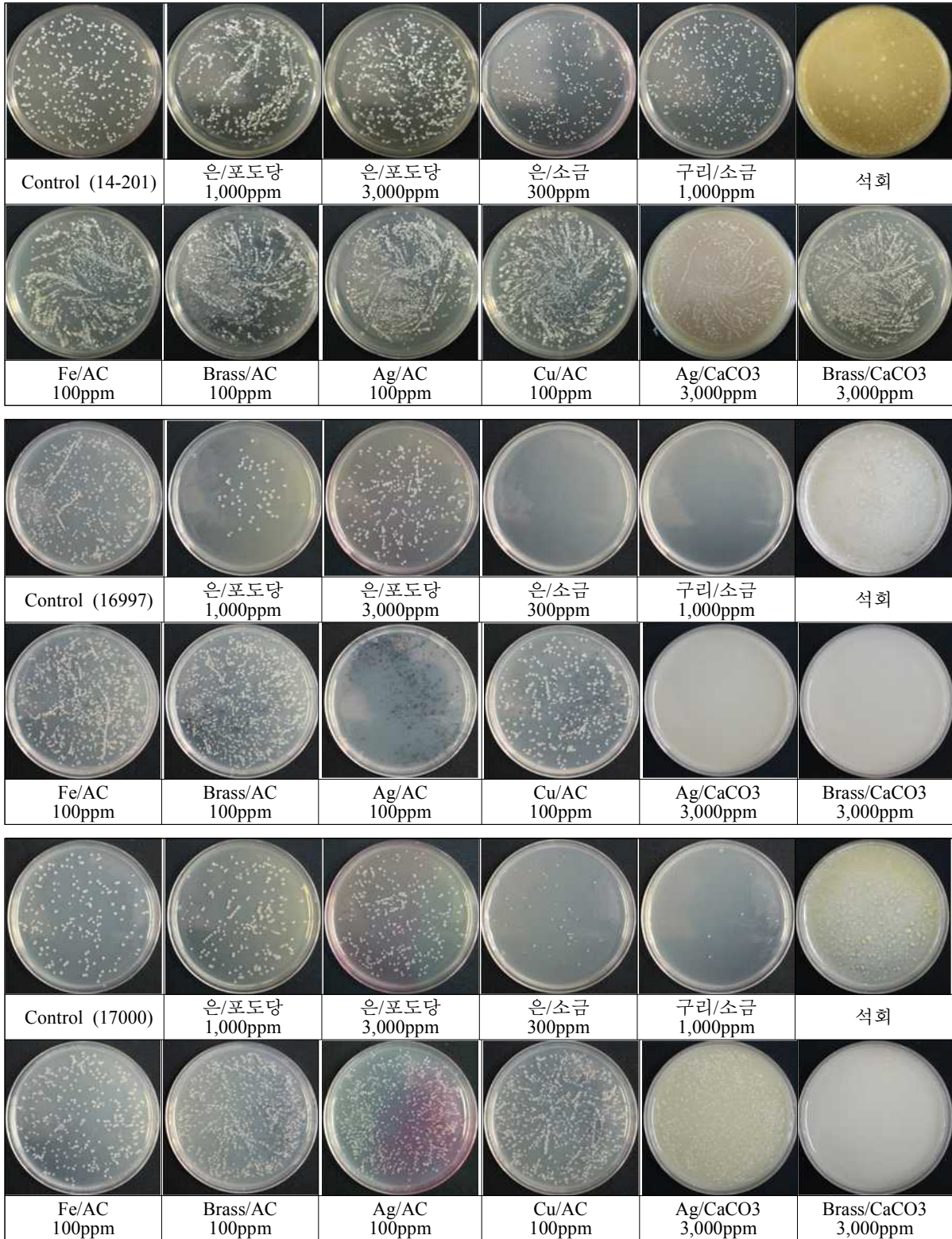


그림 101. 나노 화합물을 활용한 BFB균 항균활성 검증

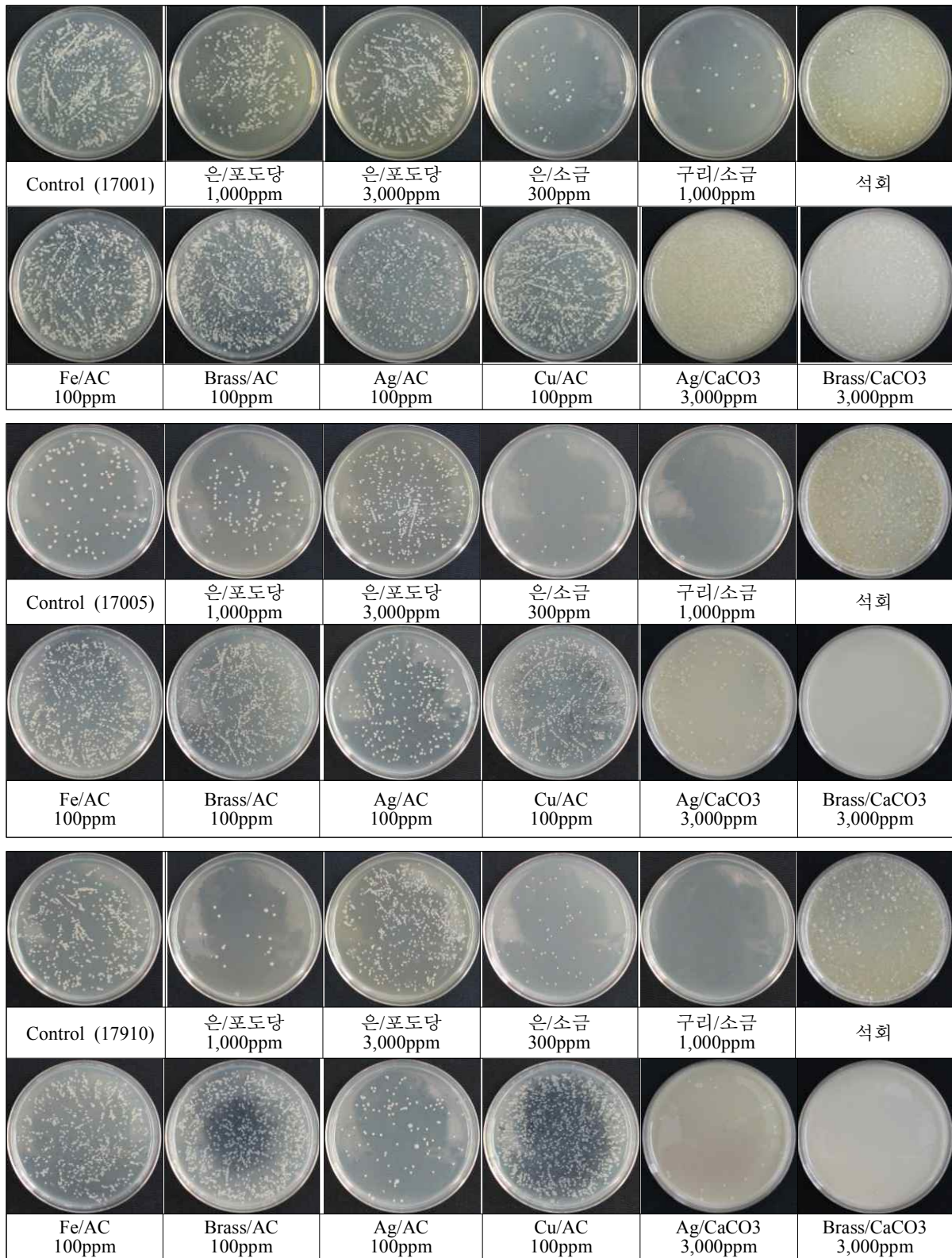


그림 102. 나노 화합물을 활용한 BFB균 항균활성 검정

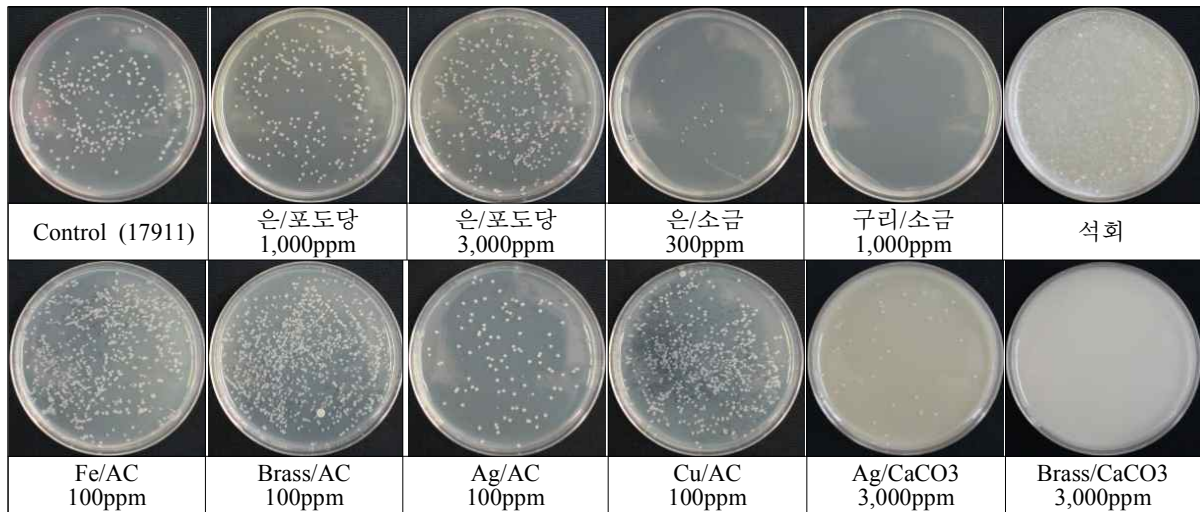


그림 103. 나노 화합물을 활용한 BFB균 항균활성 검정

그리고 제조 공정이 다른 12개의 나노 화합물에서는 유전분석의 3개 그룹과는 상관없이 Graphite-Ni, Ni에서 효과가 나타났으며, 항균활성이 매우 높은 것으로 확인 되었다. 하지만 Graphite-Ni의 경우 Ni에 의하여 효과가 있는 것으로 생각되어지며, 결론적으로는 Ni에 의한 항균력으로 판단된다. 현재 8개의 균주만을 확인 한 결과이며, 이들 균주는 유전분석 결과에서 KCC2 그룹에 속하는 균주들로 다른 그룹에 속하는 균주들도 실험을 진행하고 있다. 실험을 진행하면서 유전분석과의 연계를 염두하고 실험을 진행할 예정이다(표 43, 그림 104, 105).

표 43. 나노 화합물을 활용한 BFB균 항균활성검정

BFB	영가철(Fe)							Graphite			은나노(감마선 조사)		
	Control	mFe	nFe	MgO/mFe	MgO/mFe-A 습식	MgO/nFe 습식	MgO/nFe-A 습식	Graphite	Graphite-Ni	Ni	WA-PR-WB-13R	WA-AT-WB-13R	WA-CV-WA-13B
11-070	UN*	UN	UN	UN	UN	UN	UN	UN	0	0	UN	UN	UN
11-073	UN	UN	UN	UN	UN	UN	UN	UN	0	0	UN	UN	UN
11-147	UN	UN	UN	UN	UN	UN	UN	UN	0	0	UN	UN	UN
11-162	UN	UN	UN	UN	UN	UN	UN	UN	0	0	UN	UN	UN
11-163	UN	UN	UN	UN	UN	UN	UN	UN	0	0	UN	UN	UN
11-164	UN	UN	UN	UN	UN	UN	UN	UN	0	0	UN	UN	UN
11-165	257.6	281.6	UN	UN	UN	UN	UN	372.8	0	0	305.6	318.4	462.4
11-171	1,534.6	UN	UN	UN	UN	UN	UN	UN	0	0	1,528	1,560	351.6

UN* (Uncountable) : Plate 전체에 모두 자라 카운팅 할 수 없음

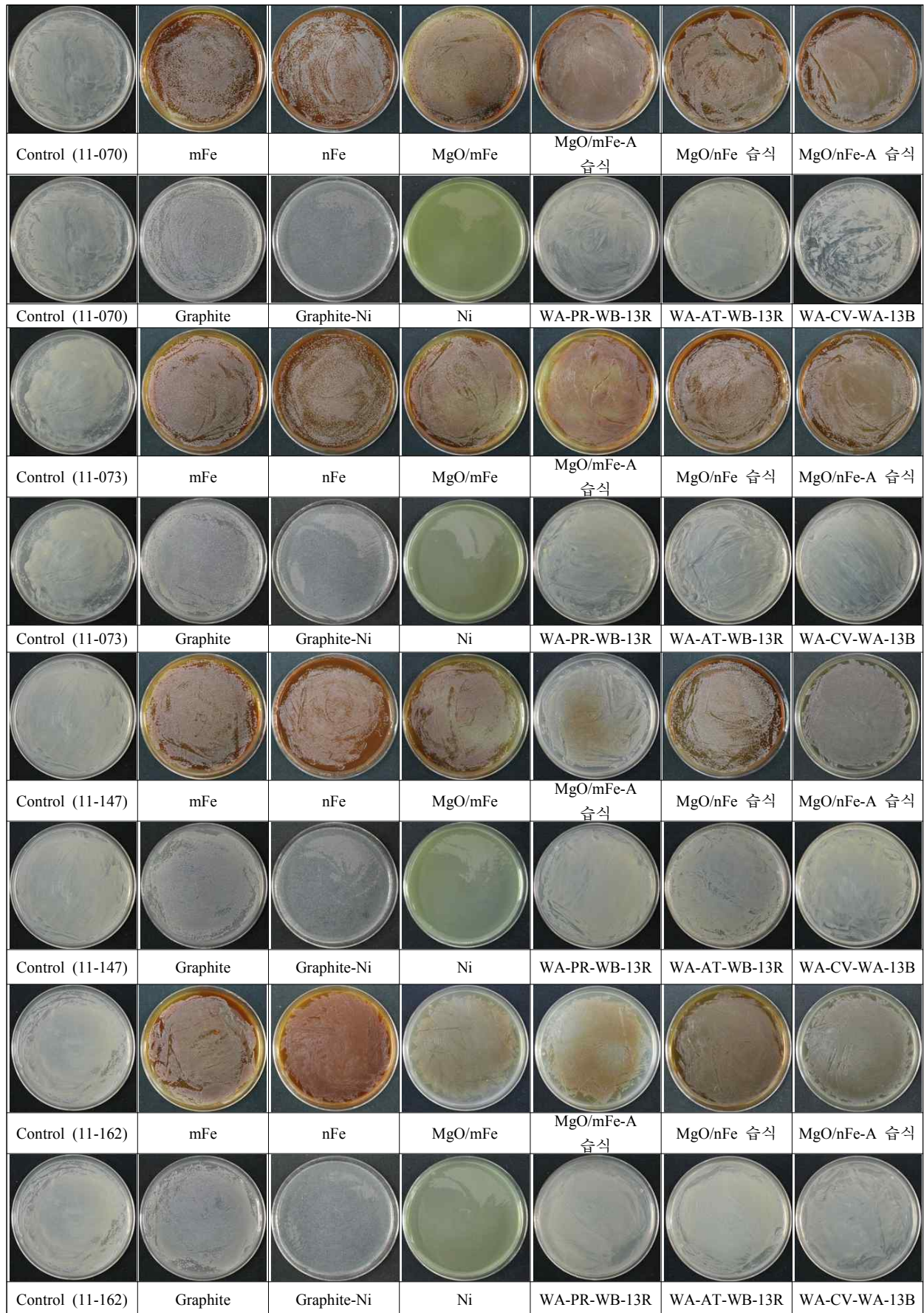


그림 104. 나노 화합물을 활용한 BFB균 항균활성 검정



그림 105. 나노 화합물을 활용한 BFB균 항균활성 검정

12. 차아염소산수를 이용한 BFB균 살균효과 검증

가. 차아염소산수를 이용한 BFB균 살균효과 1차 검증

(1) 연구 방법

세균 및 곰팡이에 항균력이 있다고 보고된 차아염소산수(25ppm)가 BFB세균(48종) 대하여 항균활성이 있는지 알아보기 위하여 실험을 실시하였다. 실험 방법은 차아염소산수를 1ppm, 5ppm, 10ppm 농도로 희석하여 TSA배지(MBcell, Korea)에 첨가하여 사용하였다. BFB세균은 TSB배지(MBcell, Korea)에 30°C/ 150rpm/ 48h 배양하여 1×10^5 cfu/ml 농도로 희석하여 사용하였다. 차아염소산수가 첨가된 TSA배지에 30 μ l씩 도말 접종하여 30°C에서 48h 동안 배양하여 colony를 카운팅 하였다. 실험은 10 plates, 도말 접종하여 평균값을 조사하였다.

(2) 연구 결과

차아염소산수 역시 건열 및 습열처리 전에 종피의 BFB균을 방제하기 위하여 실험을 실시하였으며, 차아염소산수는 항균력이 높은 것으로 보고되고 있다. 하지만 BFB균에 대하여 항균력을 보여주지 못하였다. 각각의 농도별로 처리한 결과 무처리구와 큰 차이를 보이지 못하였으며, 항균 능력은 없는 것으로 확인 되었다. 하지만 차아염소산수는 유기물과 접촉하는 즉시 분해되어 버리는 성질이 있다고 보고되고 있다. 그리하여 현재 논문 등을 참고 하여 다른 실험 방법을 탐색하고 있다. 본 실험은 수집된 48개 균주에 대하여 전체 스크리닝을 진행하였으며, 실험방법을 달리하여 실험을 진행할 계획이다(표 44, 45, 그림 106~117).

표 44. 차아염소산수를 이용한 BFB균의 항균활성 검정

Tretment	BFB bacteria										
	11-070	11-073	11-147	11-162	11-163	11-164	11-165	11-171	11-201	11-246	11-247
차아염소산수 1ppm	2,657.6	3,376.0	2,576.0	2,643.2	UN*	181.2	2,794.7	6,252.8	UN*	2,089.6	UN
차아염소산수 5ppm	526.2	2,848.0	2,924.8	2,348.8	UN	326.0	2,154.7	6,371.2	UN	2,044.8	UN
차아염소산수 10ppm	1,082.4	2,651.2	5,475.2	2,486.4	UN	167.2	4,220.8	8,281.6	UN	4,432.0	UN
Control	1,714.4	2,667.2	2,012.8	2,012.8	UN	113.0	2,430.4	4,400.0	UN	2,379.2	UN

Tretment	BFB bacteria											
	11-248	11-251	11-259	12-027	12-033	12-034	12-063	12-066	12-034	12-063	12-066	12-089
차아염소산수 1ppm	UN	151.0	186.4	1,019.2	139.6	145.4	105.8	16.2	145.4	105.8	16.2	301.8
차아염소산수 5ppm	UN	189.2	176.8	745.6	176.2	267.2	113.6	25.0	267.2	113.6	25.0	1,110.4
차아염소산수 10ppm	UN	UN	472.0	1,168.0	132.8	323.0	98.2	15.6	323.0	98.2	15.6	1,012.6
Control	UN	105.8	120.2	849.6	136.6	197.2	99.60	39.6	197.2	99.60	39.6	727.2

Tretment	BFB bacteria										
	12-090	12-091	12-158	12-170	12-316	12-317	12-318	13-024	13-034	13-211	13-217
차아염소산수 1ppm	3,364.8	630.4	483.6	2,044.8	71.0	218.8	594.8	594.8	445.6	UN*	UN
차아염소산수 5ppm	3,155.2	490.4	205.2	1,444.8	209.8	711.2	1,117.6	1,117.6	658.4	UN	UN
차아염소산수 10ppm	3,953.6	622.4	140.0	3,027.2	118.2	130.8	3,090.0	3,014.4	1,993.6	UN	UN
Control	2,032.0	323.6	194.4	1,288.0	56.2	264.8	222.2	537.6	537.6	UN	UN

UN* (Uncountable) : Plate 전체에 모두 자라 카운팅 할 수 없음

(표 계속)

표 45. 차아염소산수를 이용한 BFB균의 항균활성 검정

Tretment	BFB bacteria								
	13-255	14-044	14-194	14-201	14-202	13278	16997	16998	17000
차아염소산수 1ppm	UN*	107.4	1,061.6	UN	1,068.8	166.6	286.8	296.0	2,921.6
차아염소산수 5ppm	UN	139.2	1,121.6	UN	1,833.6	188.6	350.8	358.8	2,715.2
차아염소산수 10ppm	UN	219.4	2,108.6	UN	536.0	162.6	361.6	323.2	2,958.4
Control	UN	103.8	1,493.8	UN	1,803.2	139.0	224.4	262.4	2,196.8

Tretment	BFB bacteria								
	17001	17002	17005	17909	17910	17911	17912	17913	
차아염소산수 1ppm	1,488.0	413.6	1,508.8	17.4	451.2	1,225.6	2,536.0	589.6	
차아염소산수 5ppm	2,870.4	580.8	1,742.4	17.6	465.6	2,468.8	UN*	1,172.0	
차아염소산수 10ppm	3,224.0	383.2	1,764.8	15.4	492.8	2,204.8	UN	444.0	
Control	814.8	387.2	1,329.6	32.4	416.0	1,100.8	2,996.4	771.2	

UN* (Uncountable) : Plate 전체에 모두 자라 카운팅 할 수 없음

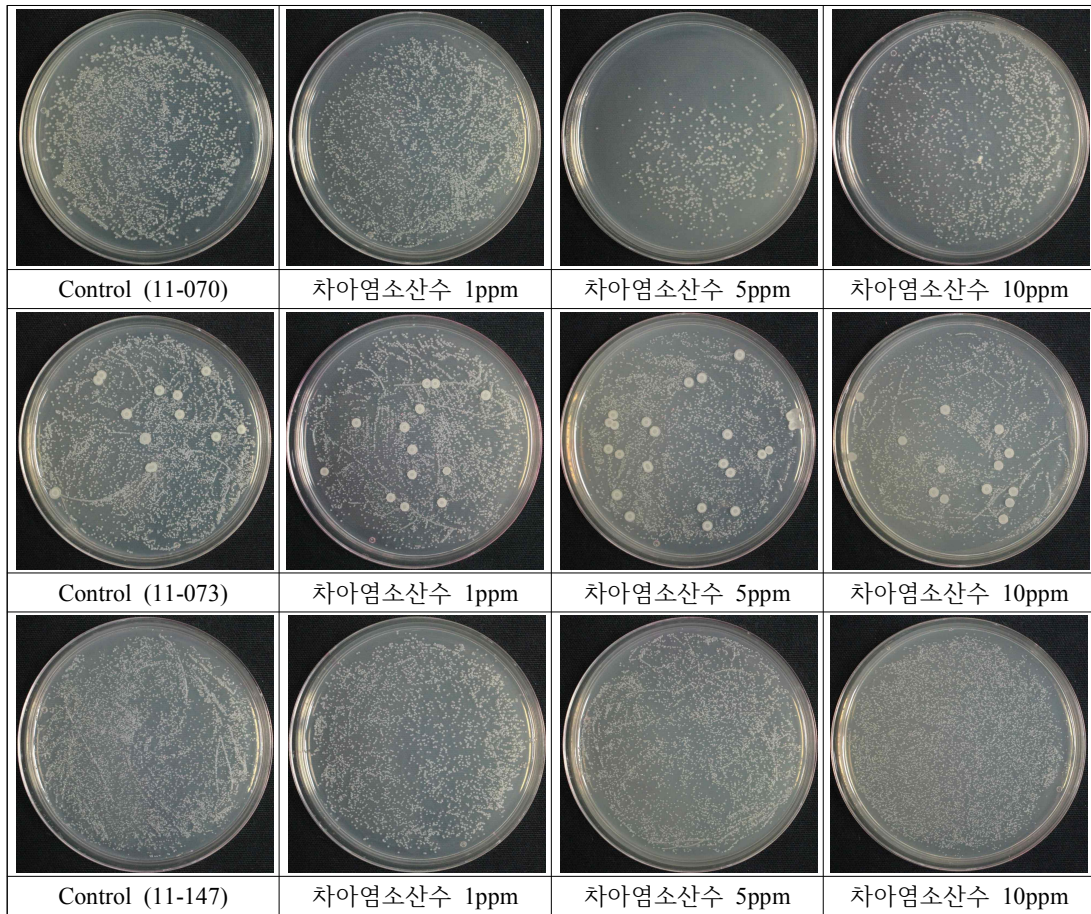


그림 106. 나노 화합물을 활용한 BFB균 항균활성 검정

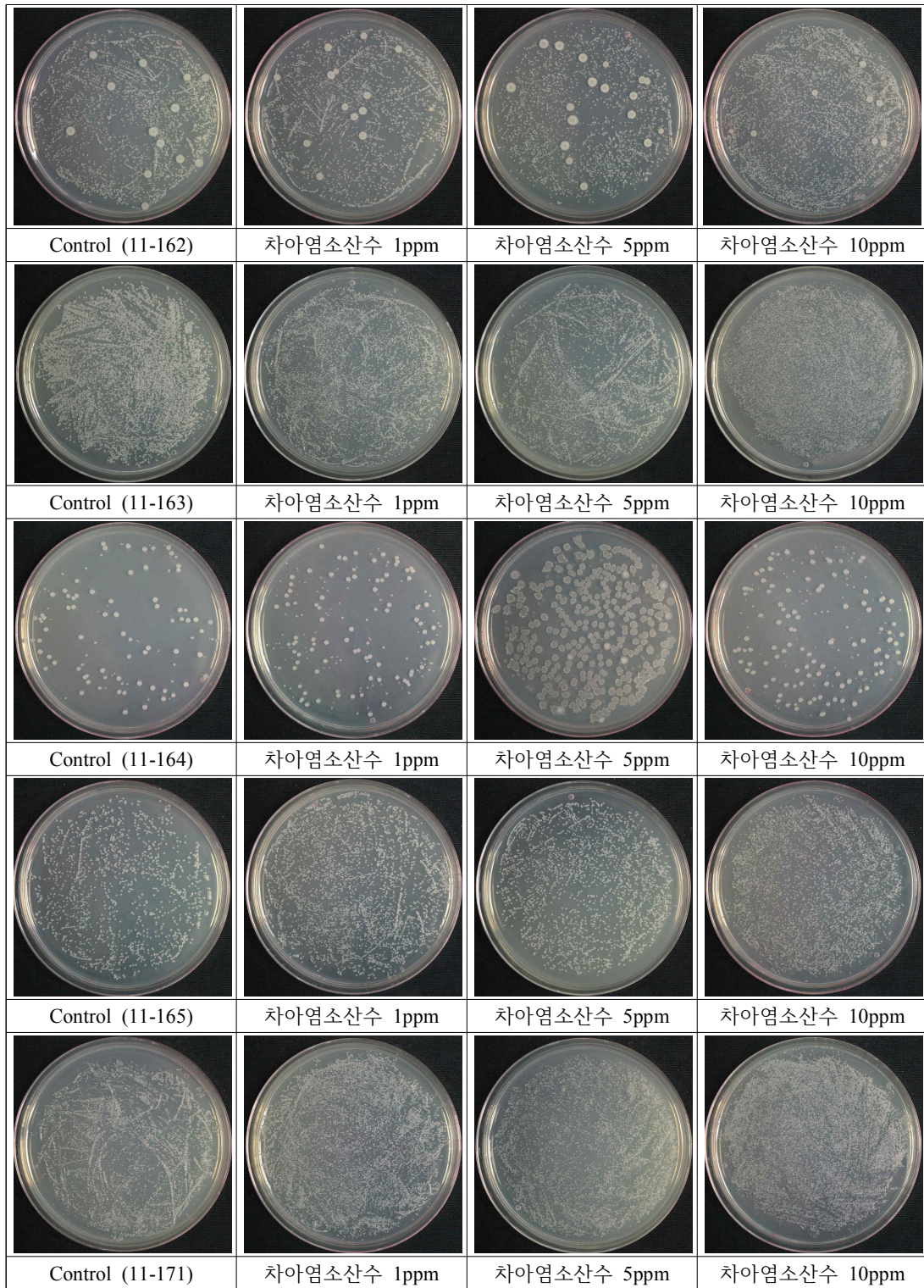


그림 107. 나노 화합물을 활용한 BFB균 항균활성 검정

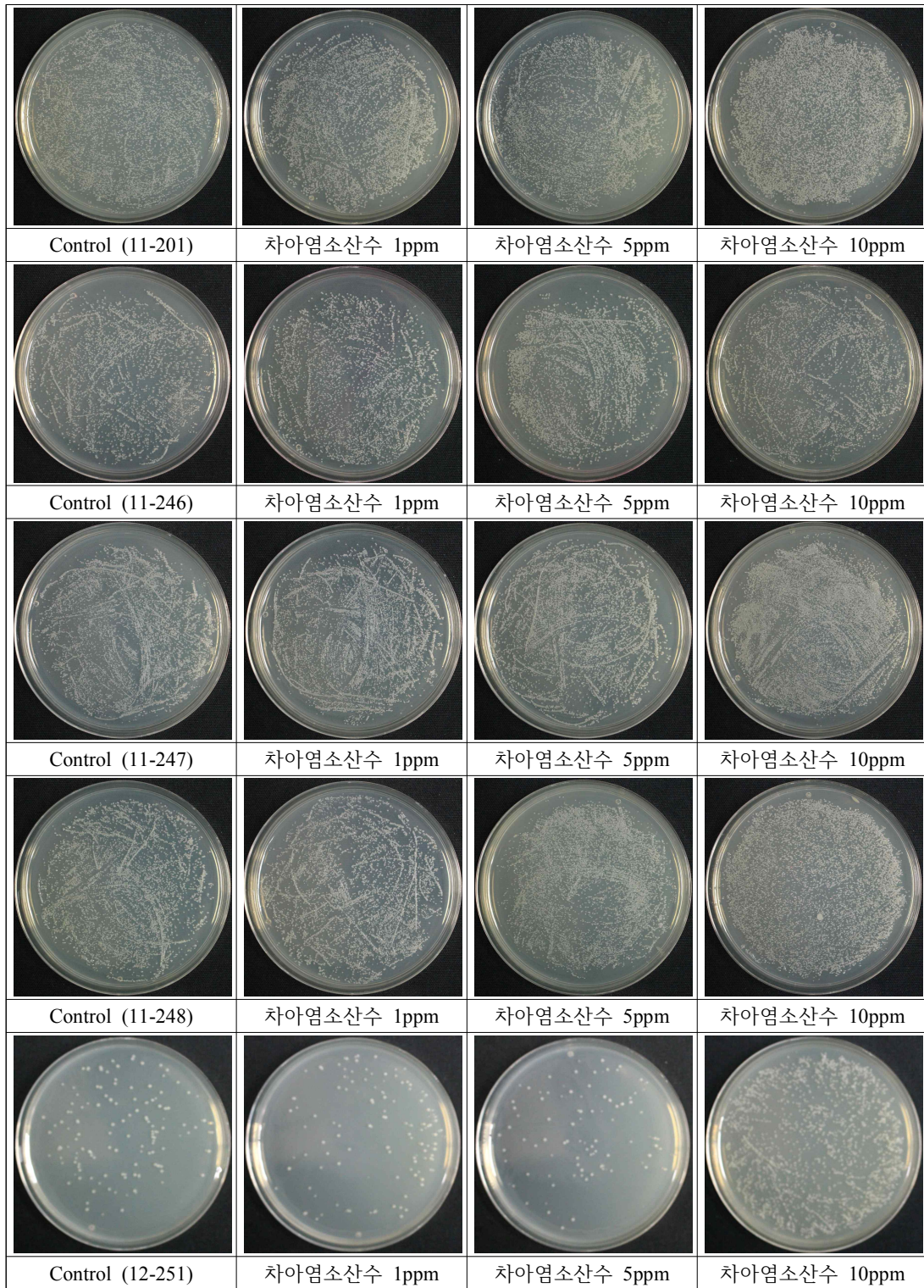


그림 108. 나노 화합물을 활용한 BFB균 항균활성 검정

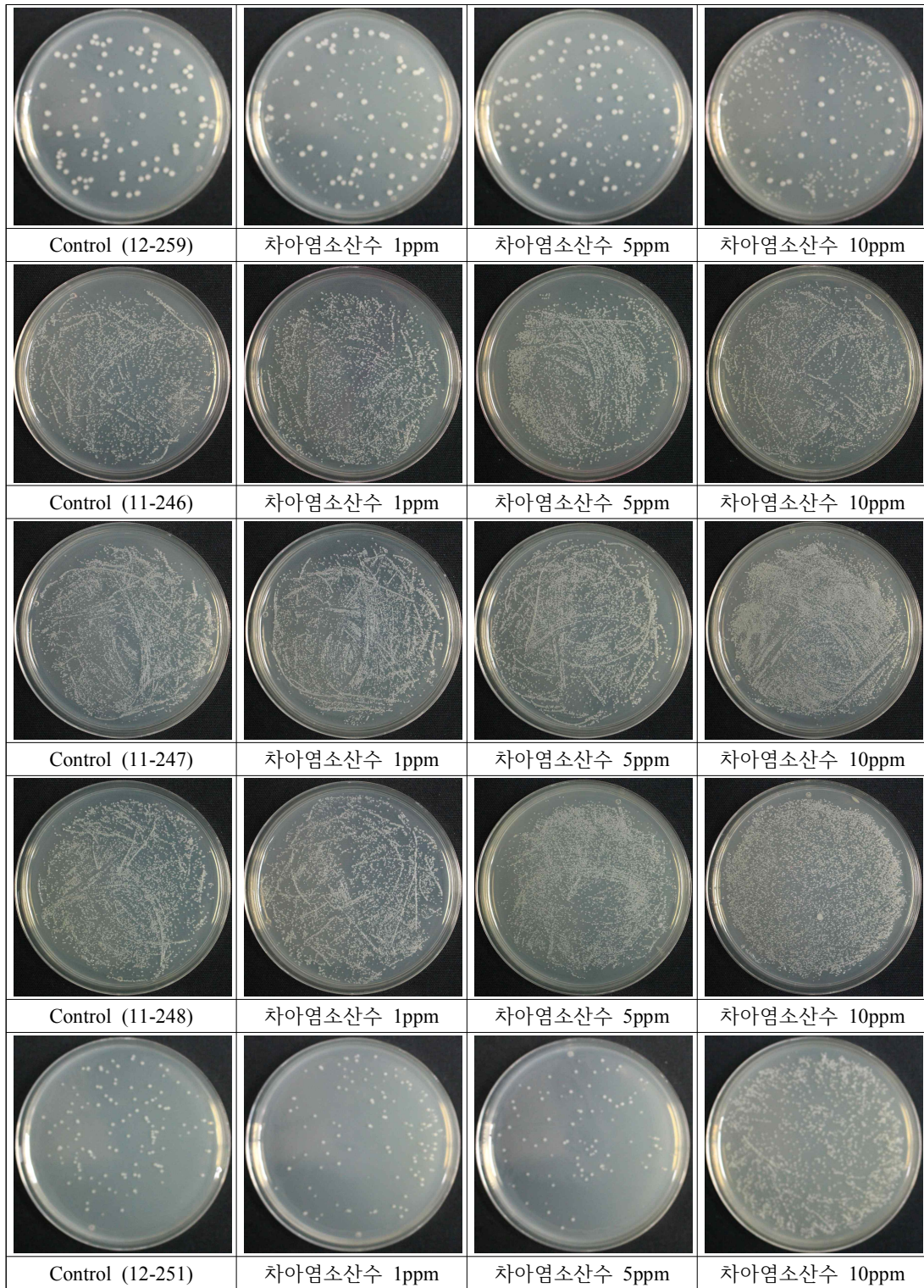


그림 109. 나노 화합물을 활용한 BFB균 항균활성 검정

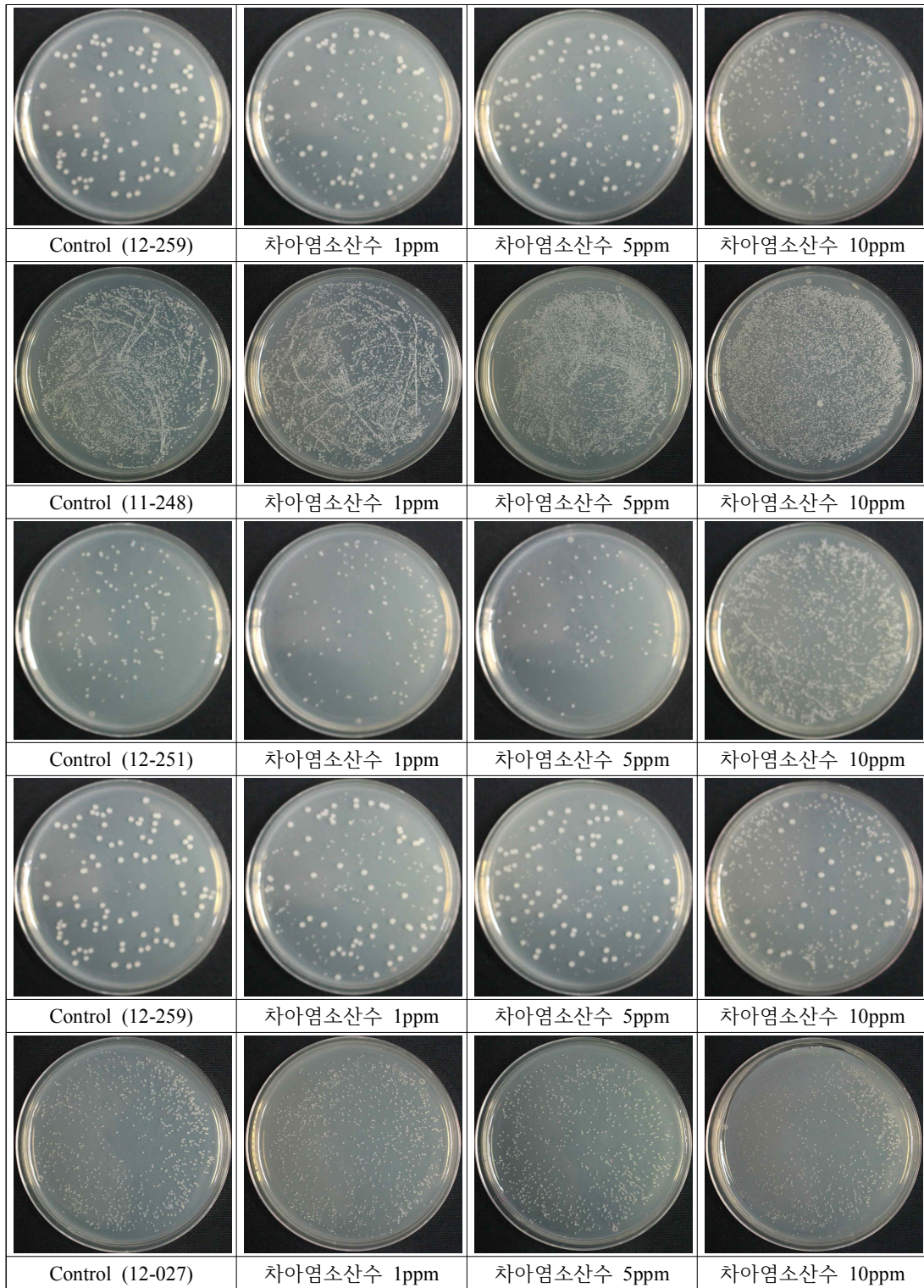


그림 110. 나노 화합물을 활용한 BFB균 항균활성 검정

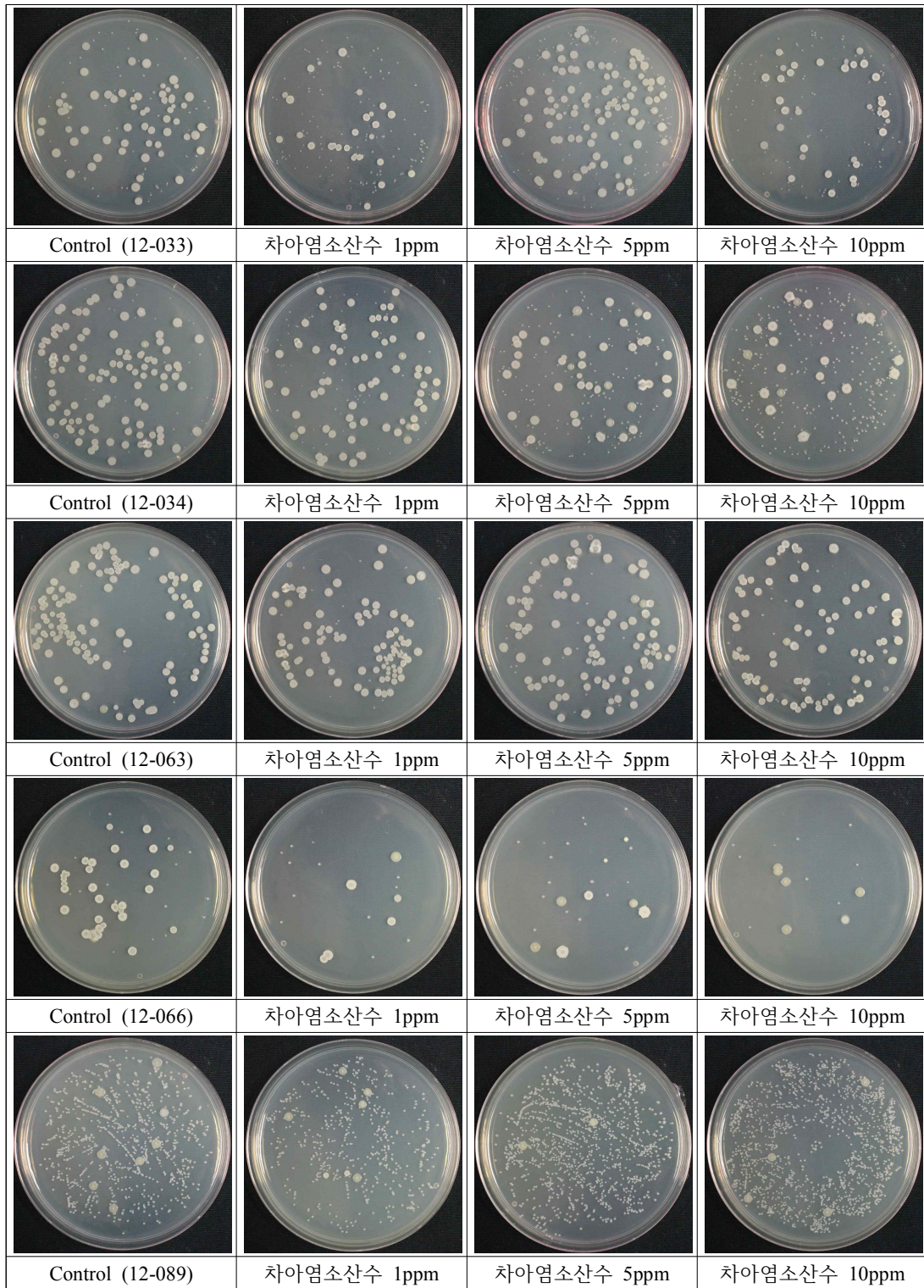


그림 111. 나노 화합물을 활용한 BFB균 항균활성 검정

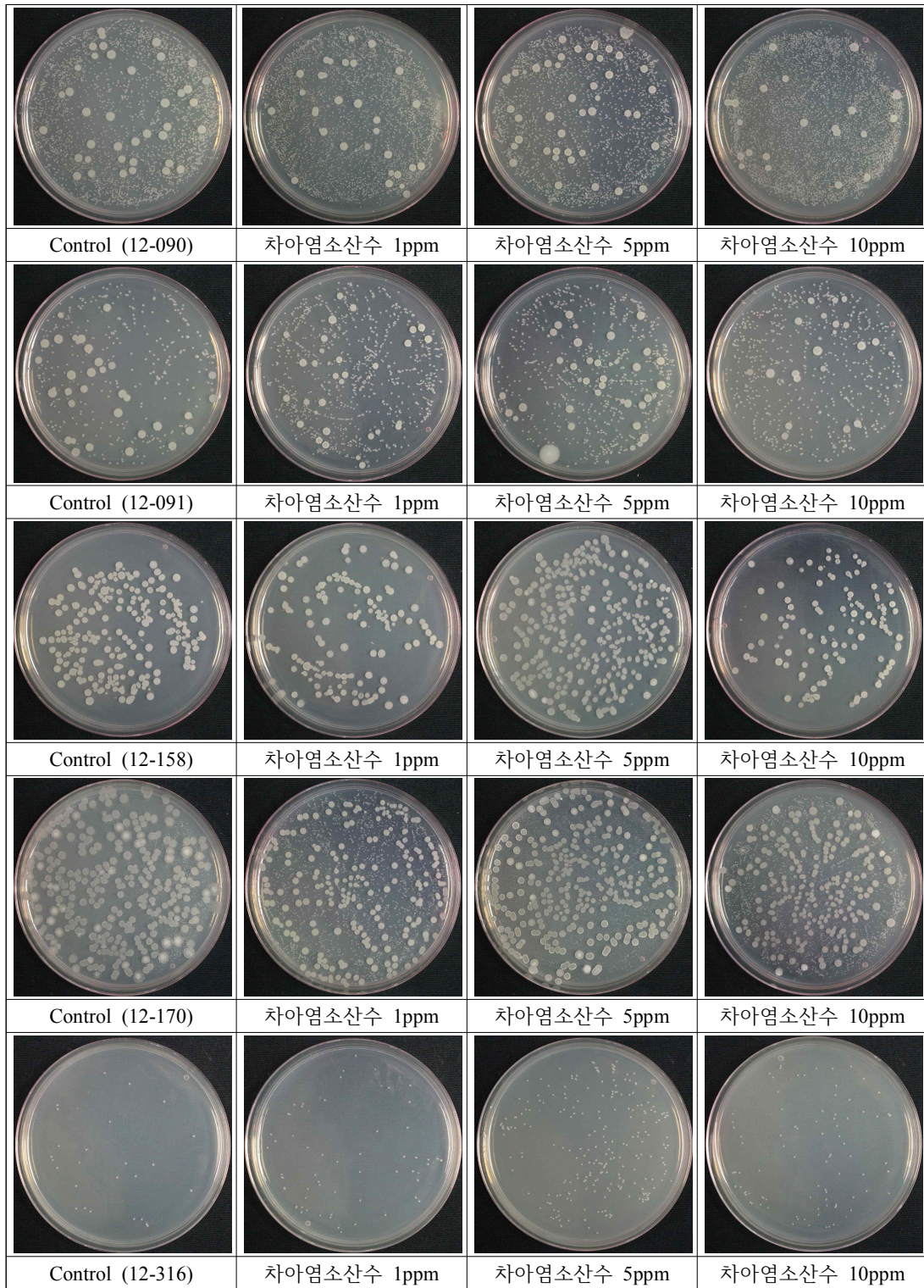


그림 112. 나노 화합물을 활용한 BFB균 항균활성 검정

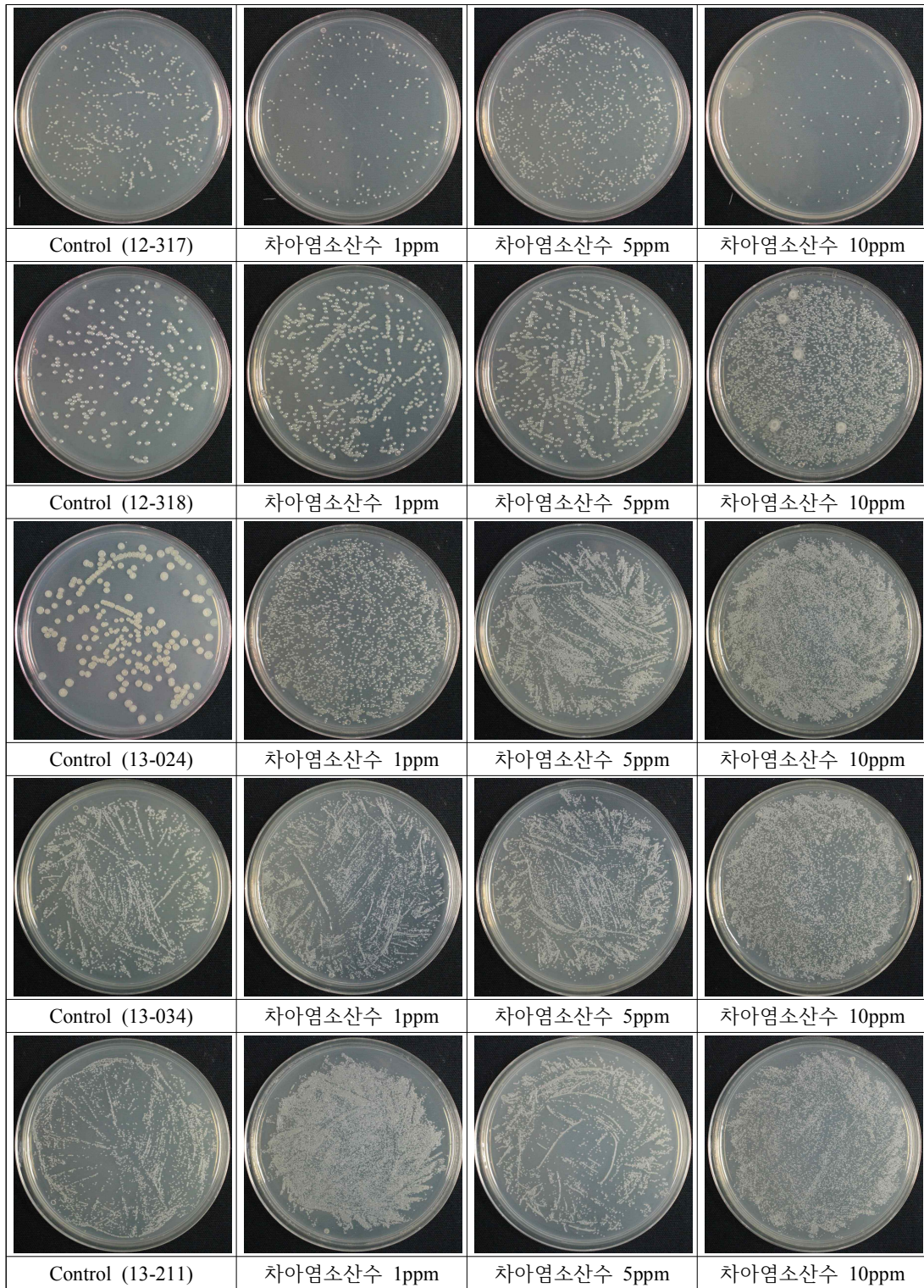


그림 113. 나노 화합물을 활용한 BFB균 항균활성 검정

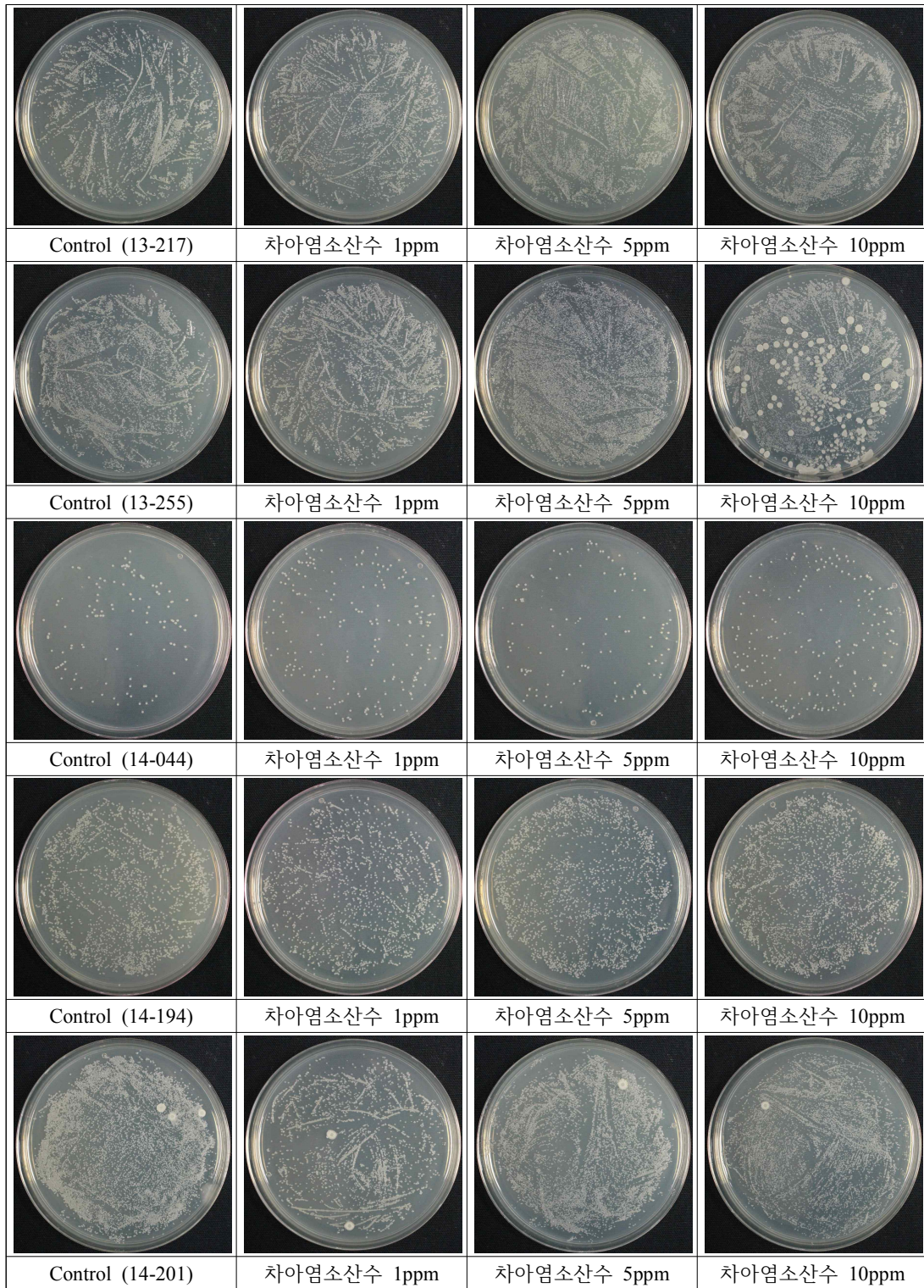


그림 114. 나노 화합물을 활용한 BFB균 항균활성 검정

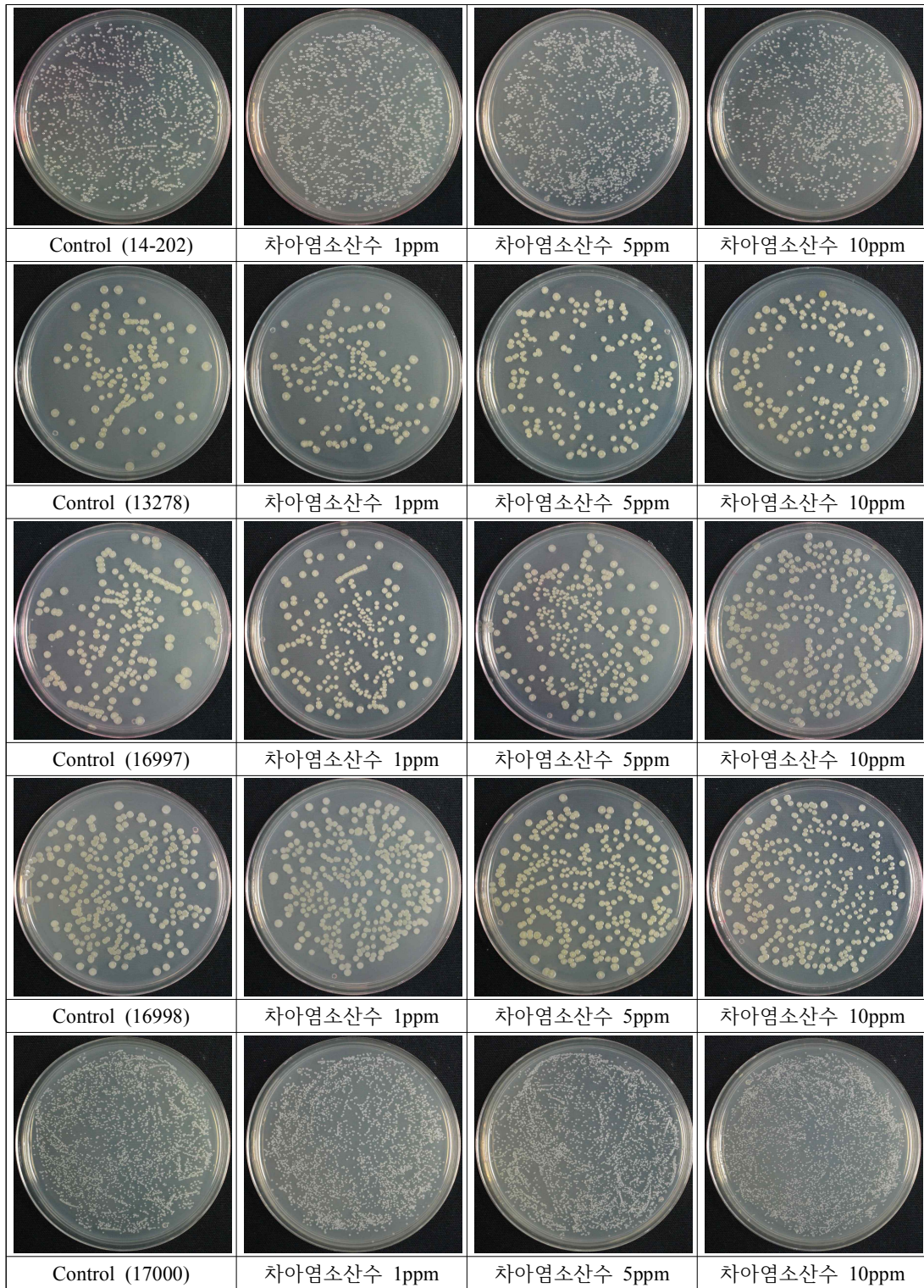


그림 115. 나노 화합물을 활용한 BFB균 항균활성 검정

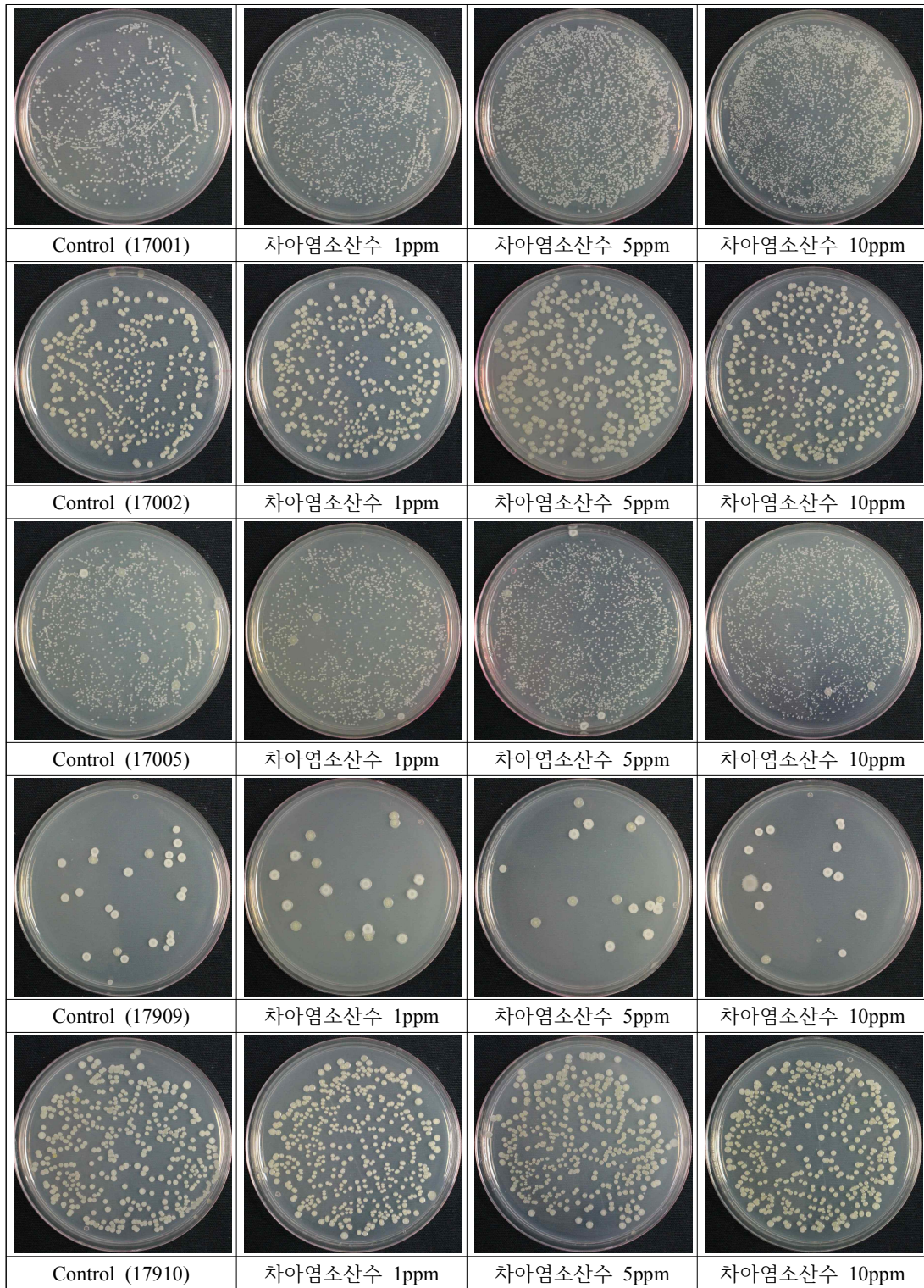


그림 116. 나노 화합물을 활용한 BFB균 항균활성 검정

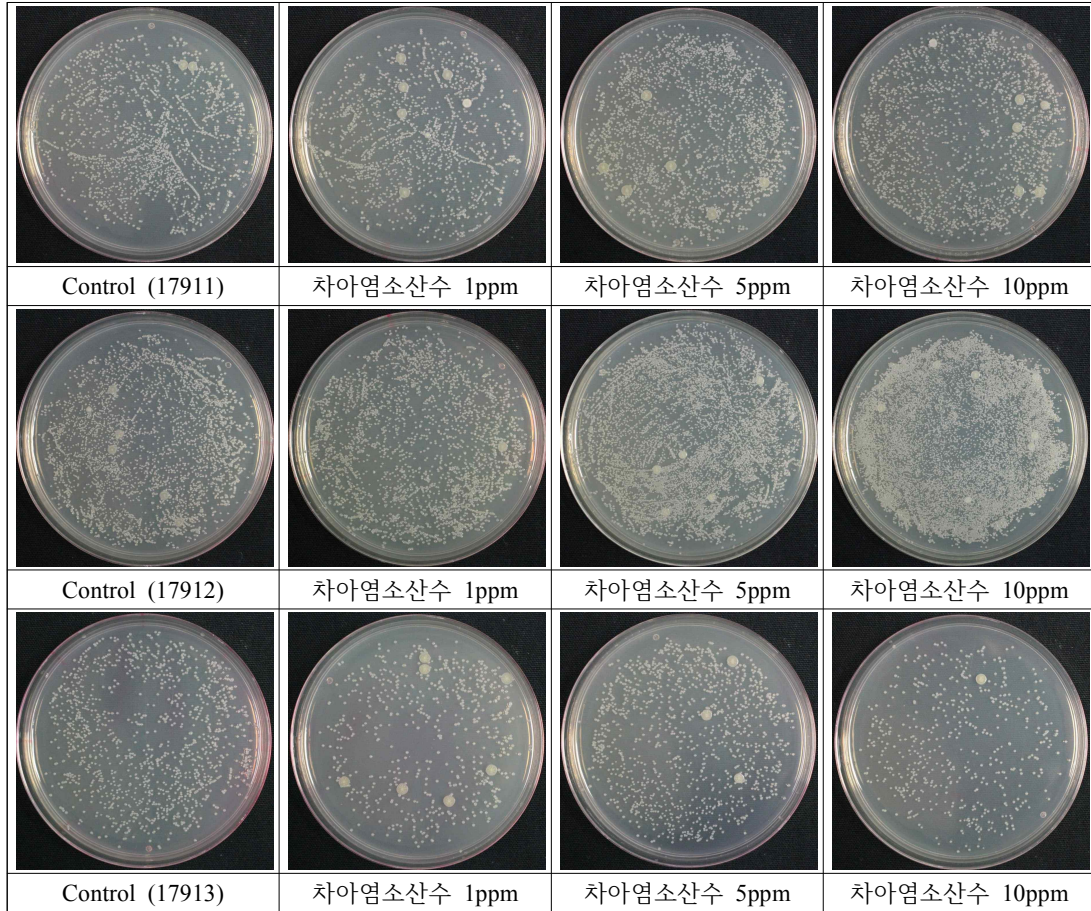


그림 117. 나노 화합물을 활용한 BFB균 항균활성 검정

나. 차아염소산수를 이용한 BFB균 살균효과 2차 검정

(1) 연구 방법 및 결과

연구에서 사용되어진 미산성 차아염소산수는 2~6%의 희석된 염산만을 무 격막 전해조(코스믹라운드(주), KCR1200)에서 전기분해하여 만들어진 전해수가 유효염소 농도는 10-30 mg/L (HOCl 성분 함량 97%)와 pH 5.0-6.5인 것을 활용하였다. 식물병원균들에 대한 살균효과를 조사하기 위해 *Acidovorax citrulli* (수박열매썩음병), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (세균성점무늬병), *Pseudomonas tolaasii* (버섯세균성갈반병), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (고추썩음병), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (세균성구멍병), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (세균성무름병), *Ralstonia solanacearum* (토마토청고병) 등을 25-30℃ 조건으로 NA배지에 생육시킨 후 세포현탁액을 조제했다. 세포현탁액 100-500 μl를 9 ml의 미산성 차아염소산수에 현탁하였다. 이후 즉시 NA배지에 평판 도말한 후 각기 25-35℃의 성장상에서 2-4일간 균총 발생율을 관찰한 결과 식물병원세균들은 모두 100% 살균효과가 나타남을 확인 할 수 있었다. 또한 미산성 차아염소산수에 대해 최소 살균 희석 농도를 알아보기 위해 증류수에 1, 5, 10, 20, 30, 50, 100%의 농도로 희석한 후 배지상 균 억제 정도를 조사한 결과 5% 이상의 농도가 존재하면 *Acidovorax citrulli* (수박열매썩음병)의 균 총 생성을 100% 억제 시킬 수 있음을

확인 할 수 있었다. 강산성 및 미산성 차아염소산수는 세균, 곰팡이, 바이러스 등을 순식간에 살균할 수 있는 성능이 있어 주로 식품산업의 위생관리를 위한 소독제로 사용되어왔지만 농업 분야의 작물병해를 일으키는 병원성 미생물의 제어에도 이용되고 있다. 특히, 이들 전해수들은 인체에 거의 무해하고, 잔류성이 없기 때문에 국내 식품첨가물로도 공인되었으며, 활용대상 범위가 다양한 채소, 과일, 화훼 등 농업분야에 있어서 농약 사용량의 감소 및 친환경적인 작물 재배를 위해 개발된 다양한 적용방법들이 보고되어 있다.

하지만 본 연구에서 사용되어진 미산성 차아염소산수는 현재까지 주로 식품류의 유해균 제거에 활용되어왔는데 단지 희석된 염산만을 무 격막 전해조에서 전기분해하여 수소가스 이외의 전해물을 원수에 혼합해 만들어진 차아염소산을 주성분으로 하며 투입 원수 전액을 식물 병 방제에 활용 가능한 미산성의 수용액이다(그림 118, 119). 이의 유효염소 농도는 10-30 mg/L (HOCl 성분 함량 97%)와 pH는 5.0-6.5로 염소가스를 거의 발생치 않는 무취, 무색의 용액으로 식품에 맛과 향의 변화를 주지 않으며 색과 조직을 상하게 하지 않게 하는 것으로 알려져 있다. 또한 미산성 차아염소산수는 식물병 방제 시 농약 살포 시와는 달리 작업자의 약해 위험 없이 야외 작물 재배포장 및 비닐하우스 등의 밀폐된 실내에서도 대량으로 살포할 수 있으며, 종자 발아 및 유묘생육과 작물의 생육 및 품질에 거의 영향을 주지 않고 소량의 유기물 혼입으로 쉽게 분해되어 염소잔류 피해가 없으므로 농업환경에 영향을 거의 주지 않는다.

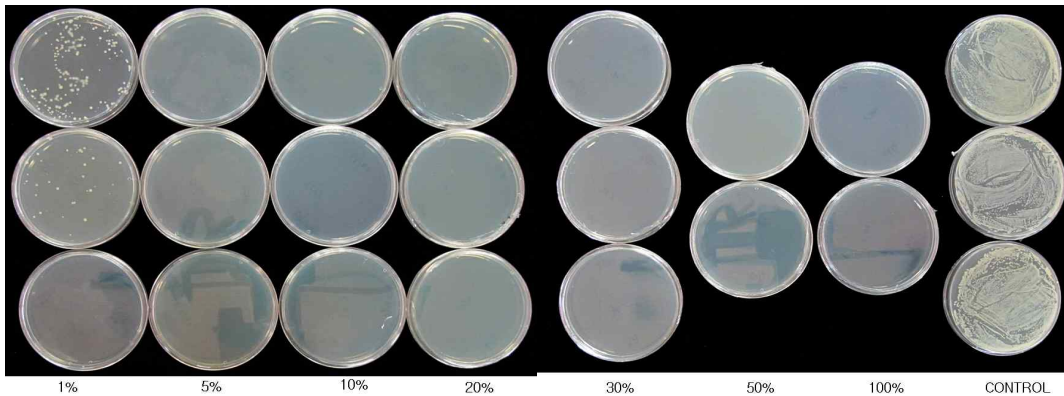


그림 118. Bactericidal activity of Slightly acidic electrolyzed water (SAEW).

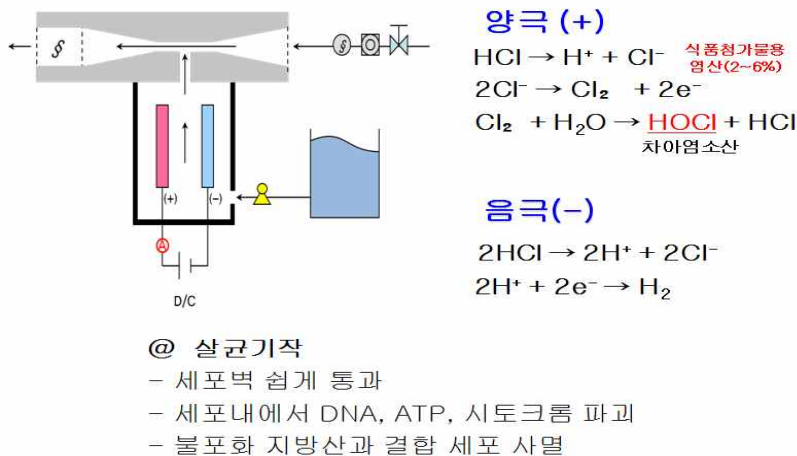


그림 119. Sterilization mechanisms of Slightly acidic electrolyzed water (SAEW).

다. 지하수 와 차아염소산수 혼용처리에 의한 BFB균 살균효과 검정

(1) 연구 내용 및 결과

지하수 및 양액 내 존재하는 *A. citrulli*에 대한 살균효과를 조사하기 위해 위와 같은 방법으로 미산성 차아염소산수를 각각 10, 20, 50%의 비율로 혼합하여 배양 후 배지 상에 형성된 균 총 수를 조사하였다. 이들 모두 처리구별로 미산성 차아염소산수 희석 시에 바로 강력한 살균 효과가 나타났고 처리 1시간 후에는 모두 95% 이상 멸균됐다(표 46). 작물재배 현장에 있어서 발생하는 많은 식물 병들이 주변에서 사용되는 농업용수를 매개로 상당수 발생하는 것으로 알려져 있는데 특히 수매전반을 통해 병을 전파시키는 세균들은 농업용수 및 양액을 통해 병을 전파시키며 매우 큰 피해를 준다. 이와 관련 오염된 농업용수 및 수경 재배 시 사용되는 양액의 병 방제에 사용되는 기존 농약은 그 적용대상이 매우 한정되어지는데 광범위한 병원균들을 대상으로 살균효과가 나타나는 미산성 차아염소산수의 새로운 병 억제 특성 규명은 친환경적 살균제로써 활용 가치를 매우 높여줄 것이다.

표 46. Effects of slightly acidic electrolyzed water (SAEW) against *Acidovorax citrulli* in ground-water and nutrient water

Treatment	Inhibition rate for colony forming (%)
Groundwater only	0
+SAEW(50%)	100
+SAEW(20%)	100
+SAEW(10%)	98
Nutrientwater only	0
+SAEW(50%)	100
+SAEW(20%)	91
+SAEW(10%)	71
SAEW only	100

13. 플라즈마 무처리 감염종자의 PCR 검정을 통한 마커 개발 예비실험

가. 연구 내용 및 결과

플라즈마를 처리한 후, BFB균을 특이적으로 확인할 수 있는 universal primer를 제작하여 무처리 감염종자의 현탁액을 도말하여 배지에서 자라난 BFB 균의 확인을 위해 PCR로 검정하고 하였다(표 47). PCR 검정 결과, BFB 유전자가 검정되었고, 이를 통해, 무처리 배지에서 자라난 세균 콜로니가 선택적으로 BFB 균만 자람을 확인하였음(그림 120). 실험 결과 플라즈마 처리 결과 멸균율은 100%를 보이며 가스 교체로 인한 세균 사멸 효율 향상을 확인하였음. 하지만 플라즈마 처리 이후 30W/5min 조건을 제외하고 고 전력 인가 및 시간의 증가로 인한 발아율 감소를 보임.

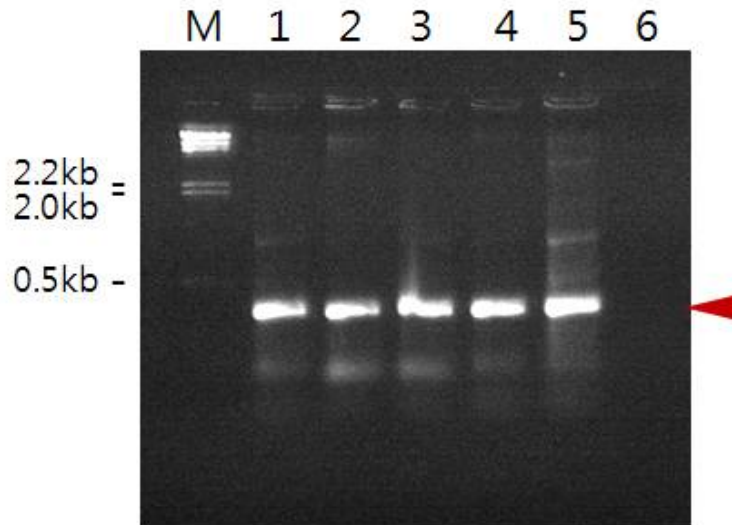


그림 120. M: Lambda HindIII marker, 1~5: 플라즈마 무처리 감염중자의 현탁액을 도달한 배지에서 자란 BFB, 6: PCR mixture only

표 47. BFB 세균 검정용 특이 primer 염기서열

primer 이름	염기서열
<i>A. citrulli</i> -F	5'-GACCAGCCACACTGGGAC-3'
<i>A. citrulli</i> -R	5'-CTGCCGTACTCCAGCGAT-3'

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연차별 목표 달성도

[제1세부과제]

구분 (연도)	세부프로젝트명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차년도 (2013)	수출용 고품질 수박종자 채종체계 및 처리방법 확립	개화일수와 후숙일수의 상호요인에 의한 발아율과 종자활력 구명	95	○ 개화수분 후 30일, 40일, 50일 및 60일간 성숙된 과실을 수확하여 후숙처리가 발아력에 미치는 영향 조사 ○ 30일 성숙종자에서 0일, 10일, 20일 및 30일간 후숙, 40일 성숙종자는 0일, 10일, 20일간 후숙, 50일간 성숙종자는 0일, 10일 후숙, 60일 성숙종자는 후숙없이 탈종한 종자의 발아력 조사
		착과절위에 따른 과실중량, 종자생산량, 종자충실도, 발아성 검정	95	○ 3화방(16-18절), 4화방(21-23절), 5화방(26-28절), 6화방(31-33절)에 착과 후 40일간 성숙종자 발아력 조사
		Priming 처리조건 구명	100	○ 수박 종자의 발아촉진을 위한 priming 조건 확립
		필름코팅 피복물질 및 첨가농도에 따른 발아율 검정	95	○ Talc 등 필름 코팅 피복 물질 7종의 첨가 정도에 따른 발아력 조사
		초분광 Vis/NIR 영상기술을 이용한 수박종자 발아력 비파괴 측정기술 개발	90	○ 초분광 SWIR 영상기술을 이용한 수박 종자 발아력 비파괴 측정기술 개발
2차년도 (2014)	수출용 고품질 수박종자 채종체계 및 처리방법 확립	대과중, 중과중 적정 과수설정	90	○ 대과중, 중과중 적정 과실에 따른 발아율 검정
		착과부위에 따른 과실중량, 종자생산량, 종자 충실도 및 발아율 검정	100	○ 착과절위에 따른 과실의 중량, 종자의 생산량, 종자의 충실도 및 발아율 검정
		SMP 처리조건 구명	95	○ 고품질물질의 첨가정도에 따른 발아력 조사
		초분광 SWIR 영상기술을 이용한 수박종자 발아력 비파괴 측정기술 개발	90	○ 초분광 SWIR 영상기술을 이용한 수박 종자 발아력 비파괴 측정기술 개발

[제2세부과제]

구분 (연도)	세부프로젝트명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차년도 (2013)	세균성 과실썩음병 (BFB) 방제기술 및 무균종자 처리기술 개발	BFB 발생 실태 파악 및 문제점개선	90	○ 위탁기관 국립원예과학특작원에서 수박 육묘장의 병해실태파악 ○ 중국 및 기타지역에서의 발생 상태 최악 ○ BFB의 문제점의 적극적 대처방안의 일환으로 “BFB-free 국가”로 인정받고 있는 일본의 Kubota 박사를 초청하여 세미나개최
		다양한 BFB 무균처리조건 개발	90	○ DHT(건열처리장치) - 대형 및 소형기기를 이용 하여 수박의 품종간의 처리온도 및 기간에 대한 성장반응성 세밀 평가 (TGT 및 사각밀폐용기 이용) ○ Water Bath (습열 처리장치)-다양한 과정에 따른 처리 종자의 발아 및 활력변화와 BFB 증상발현 평가
		다양한 BFB 진단방법의 개발	90	○ BFB 증상발현의 최적화를 위한 다면 비교평가 ○ TGT (다운도 발아상)-Blue paper, Petri-dish 이용 ○ BOD Incubator(항온기)-사각밀폐용기이용
		시판종자의 수거 및 분석	90	○ 공시재료확보 - 실험용 수박 및 박과채소류 과실 및 종자 - 농우바이오, 신젠타, 원농종묘, 국립원예과학특작원 ○ 3배체 수박 종자의 대량 매입 ○ BFB 10 ⁶ , 10 ⁸ cfu/ml로 감염 접종한 종자확보
2차년도 (2014)	세균성 과실썩음병 (BFB) 방제기술 및 무균종자 처리기술 개발	BFB의 균 분리·수집 및 병원성검정 및 우점종 확인	100	○오이, 메론, 수박 등에서 발생하는 과일썩음병균 BFB균 수집 ○다양한 작물에서 분리한 과일 썩음병균 균주의 우점종 확인
		BFB균 발병 형태 및 토양내 생리 생태	100	○포장 및 온실에서의 분리 균들의 발병 형태 조사
		BFB균 유전 분석	100	○수집된 BFB균의 DNA염기서열 분석
		BFB균 감압처리 조건에 따른 이병 수박종자 제작법 구축	100	○감압처리 조건(접종농도, 접종시간)에 따른 이병 수박종자 제작법 구축
		수박 및 수박대목 품종을 대상으로 한 각종 BFB균의 병원성 검정	100	○온실에서의 수박종자 육묘 및 BFB균 처리에 의한 병원성 검정
		감염종자 멸균처리 기술개발/무균종자 생산 및 종자처리 기술 개발	100	○건열처리 기술 활용
		유용미생물 활용 생물적 방제	100	○길항미생물을 이용한 BFB균의 항균활성 검정
		화학약제 활용 방제	410	○시판 화학약제를 이용한 BFB균에 효과 있는 약제 선발
		Plasma 기술, 유용 신물질, 천연물 등을 활용한 방제	95	○각종 나노 화합물을 이용한 BFB균의 항균활성 검정
기타방제(전해수, 이온수 등)	95	○차아염소산수를 이용한 BFB균의 항균활성 검정		

구분 (연도)	세부프로젝트명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차년도 (2015)	세균성 과실썩음병 (BFB) 방제기술 및 무균종자 처리기술 개발	BFB의 균 분리·수집 및 병원성검정 및 우점종 확인	100	○과실썩음병균 BFB균 2종 수집 ○유연관계분석을 통하여 BFB균 확인 및 수침상 의 전형적인 BFB균의 병원성 검정
		BFB균 발병 형태 및 토양내 생리 생태	100	○재배 농가를 대상으로 병발생 조사, 향후 육묘장 을 중심으로 병 발생 형태 조사
		BFB균 유전 분석	100	○수집된 BFB균의 DNA염기서열 분석
		BFB균 감압처리 조건에 따른 이병 수박종자 제작법 구축	100	○감압처리 조건(접종농도, 접종시간)에 따른 이병 수박종자 제작법 구축
		수박 및 수박대목 품종을 대상으로 한 각종 BFB균의 병원성 검정	100	○온실에서서의 수박종자 육묘 및 BFB균 처리에 의한 병원성 검정
		감염종자 멸균처리 기술개발/무균종자 생산 및 종자처리 기술 개발	100	○건열처리 기술 활용
		유용미생물 활용 생물적 방제	100	○길항미생물을 이용한 BFB균의 항균활성 검정
		화학약제 활용 방제	100	○시판 화학약제를 이용한 BFB균에 효과 있는 약제 선발
		Plasma 기술, 유용 신물질, 천연물 등을 활용한 방제	100	○저온플라즈마 장치를 이용한 감염 종자의 무균 종자 처리 기술 검정
기타방제(전해수, 이온수 등)	100	○차아염소산수를 이용한 BFB균의 항균활성 검정		
4차년도 (2016)	세균성 과실썩음병 (BFB) 방제기술 및 무균종자 처리기술 개발	BFB의 균 분리·수집 및 병원성검정 및 우점종 확인	100	○과실썩음병균 BFB균 2종 수집 ○유연관계분석을 통하여 BFB균 확인 및 수침상 의 전형적인 BFB균의 병원성 검정
		BFB균 발병 형태 및 토양내 생리 생태	100	○재배 농가를 대상으로 병발생 조사, 향후 육묘장 을 중심으로 병 발생 형태 조사
		BFB균 유전 분석	100	○수집된 BFB균의 DNA염기서열 분석
		BFB균 감압처리 조건에 따른 이병 수박종자 제작법 구축	100	○감압처리 조건(접종농도, 접종시간)에 따른 이병 수박종자 제작법 구축
		수박 및 수박대목 품종을 대상으로 한 각종 BFB균의 병원성 검정	100	○온실에서서의 수박종자 육묘 및 BFB균 처리에 의한 병원성 검정
		감염종자 멸균처리 기술개발/무균종자 생산 및 종자처리 기술 개발	100	○건열처리 기술 활용
		유용미생물 활용 생물적 방제	100	○길항미생물을 이용한 BFB균의 항균활성 검정
		화학약제 활용 방제	100	○시판 화학약제를 이용한 BFB균에 효과 있는 약제 선발
		Plasma 기술, 유용 신물질, 천연물 등을 활용한 방제	100	○저온플라즈마 장치를 이용한 감염 종자의 무균 종자 처리 기술 검정
기타방제(전해수, 이온수 등)	100	○차아염소산수를 이용한 BFB균의 항균활성 검정		

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 본 과제 수행을 통해 확보된 길항미생물의 활용가능성을 추가 연구를 통해 확인하고 실용화 할 방안을 모색하고자 함
2. 개발된 마커를 특허 출원에 활용 예정
3. 수박종자의 저온플라즈마 처리 기술을 다른 작물의 종자처리에 활용 하고자 함
4. 무균 종자를 생산하기 위한 연구에 이용할 수 있는 감염종자 제작 기술을 활용하고자 함
5. 본 과제의 수행을 통해 얻어진 BFB균의 유전체 정보를 활용해 추가로 병 발생과 관련된 병원성 유전자 연구를 다른 프로젝트를 만들어 추가로 진행 하고자 함
6. 본 연구를 통해 확보된 플라즈마 기술을 활용한 BFB균의 살균 기술을 특허 출원하며, 산업체에 기술이전을 추진 하고자 함

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 해당사항 없음

제 7 장 참고문헌

- Baxter, L. and Waters Jr. L. 1986. Effect of a hydrophilic polymer seed coating on the field performance of sweet corn and cowpea. *Journal of the American Society for Horticultural Science*.
- Berry, J. and Bjorkman, O. 1980. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Ann Rev Plant Physiol* 31: 491-543.
- Bewley, J. D. and Black, M. 1984. *Seeds physiology of development and germination*. Plenum Press New York 201-283.
- Boyhan, G. E., Granberry, D. M. and Kelly, W. T. 1999. Commercial watermelon production. Bulletin 996 Cooperattive extension service University of Georgia. <http://www.ces.uga.edu/pubcdB996-Whtm>
- Brinen, G. H., Locascio, S. J. and Eimstron, G. W. 1979. Plant and row spacing, mulch and fertilizer rate effects on watermelon production. *J Amer Soc Hort Sci* 104.
- Buttrose, M. S. and Sedgley, M. 1978. Some effects of light intensity, daylength and temperature on growth of fruiting and nonfruiting watermelon(*Citrullus lanatus*). *Ann Bot* 42: 599-608.
- Cho, S. M., Oh, S. A., Choi, Y. S. and Park, S. B. 2014. Effect of plant growth regulators on regeneration from the cotyledon explants in watermelon(*Citrullus lanatus*(thunb) Matsum & Nakai). *Kor J Plant Res* 27: 51-59.
- Choi, H. G., Moon, B. Y., Kwon, J. K., Park, K. S., Kang, D. H., Jeong, H. J., Cho, M. W. and Kang, N. J. 2014. Effect of bed position and planting densities of watermelon grown on two-story high bed on fruit quality. *J Agri & Life Sci* 48: 13-20.
- Colla, G., Roupahel, Y., Cardarelli, M. and Rea, E. 2006. Effect of salinity on yield, fruit quality, leaf gas exchange, and mineral composition of grafted watermelon plants. *HortScience* 41: 622-627.
- Compton, M. E., Gary, D. J. and Gaba, V. P. 2004. Use of trssue culture and biotechnology for the genetic improvement of watermelon. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 77: 231-243.
- Coolbear, P., Francis, A. and Grierson, D. 1984. The effect of low temperature pre-sowing treatment on the germination performance and membrane integrity of artificially aged tomato seeds. *J Exp Bot* 35: 1609-1617.
- Delouche, J. C. 1958. Germination of kentuck bluegrass harvested at different stages of maturity.

Association of official seed analysts 48: 81-84.

Douglas, C. S., Jennifer, D. C. and Jonathan, R. S. 1999. Yield response of watermelon to planting density, planting pattern, and polyethylene mulch. HortScience 34: 1221-1223.

Edelstein, M. and Nerson, H. 2002. Genotype and plant density affect watermelon grown for seed consumption. Hortscience 37: 981-983.

Ellis, R. H., Hong, T. D. and Jackson, M. T. 1993. Seed production environment, time of harvest, and the potential longevity of seeds of three cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). Annals of Botany 11: 583-590.

Farrar, J. F. 1988. Temperature and the partitioning and translocation of carbon In : Long s.p. and Woodward, F.I. (eds) plants and temperature. Company of Biologists Cambridge UK 203-235.

Finkelstein, R. R. and Crouch, M. L. 1984. Precociously germinated repressed embryos retain characteristics of embryogeny. Plants 162: 125-131.

Gaile, Z. 2008. Harvest time effect on yield and quality of maize (*Zea mays* L.) grown for silage. Latvian J Agronomy 10: 104-111.

Gifford, R. M. and Evans, L. T. 1981. Photosynthesis, carbon partitioning and yield. Ann Rev Plant Physiol 32: 485-509.

Grabe, D. F. 1960. Maturity in smooth bromegrass. Agronomy J 48: 253-256.

Gore, S. V., Patil, R. B. and Wankhade, G. R. 1997. Effect of maturity period and harvesting time on seed quality in soybean (*Glycine max* L.) Merrill cultivars. Seed Res 25: 45-49.

Harrington, J. F. 1959. Effect of fruit maturity and harvesting methods on germination of 'Muskmelon' seed. Proc Amer Soc Hort 62: 433-438.

Harrington, J. F. 1972. Seed storage and longevity. Seed biology 3, 145-245.

Helsel, D. G., Helsel, D. R. and Minor, H. C. 1986. Field studies on osmoconditioning soybean. Field Crops Res 14: 291-298.

Holmes, A. D. 1953. Germination of seed removed from mature and immature butternut squashes after seven months of storage. Proc Amer Soc Hort Sci 62: 433-436.

Hwang, Y. H., Cho, K. H., Song, G. W., Shin, W. K. and Jeong, B. R. 1998. Effect of pinching

and fruit setting, and planting density on fruit quality and yield of muskmelon cultured by deep flow technique. *J Bio Fac Env* 7: 219-225.

International rules for Seed Testing Association. 1985. *Seed Sci Tech* 13: 299-355.

Kahn, B. A., Cooksey, J. R. and Motes, J. E. 1997. Within-row spacing effects on traits of importance to mechanical harvest in paprika-type peppers. *Sci Hort* 69: 31-39.

Kingston, C. M. and Van Epenhuijsen, C. W. 1989. Influence of leaf area on fruit development and quality of Italia glasshouse table grapes. *Am J Enol Vitic* 40: 130-134.

Kliwer, W. A. 1971. Effect of crop level and leaf area on growth, composition and coloration of 'Tokay' grapes. *Am J Enol Vitic* 22: 172-177.

Kultur, F., Harrison, H. C. and Staub, J. E. 2001. Spacing and genotype affect fruit sugar concentration, yield, and fruit size of muskmelon. *HortScience* 36: 274-278.

Kwon, S. W., Choi, D. C., Jang, I. K., Ko, B. R. and Choi, Y. G. 2007. Using chemical methods to inhibited axillary buds of lagernaria as rootstock for grafted watermelon(*Citrullus lanatus* thunb.). *Kor J Soc Hort Sci* 19: 36-36.

Lee, C. H., Han, D. H. and Kim, S. B. 1996. Effect of GA₃ and fulmet(KT-30) on fruit set and quality in 'Kyoho grapes'. *Kor J Soc Hort Sci* 19 49: 105-112.

Lee, S. G., Kim, Y. C., Kim, K. Y., Ghung, J. H., Yu, S. O., Bae, J. H. and Lee, Y. B. 1996. Effect of soil moisture control and fruiting number and node order on the quality and yield of small watermelon(*Citrullus vulgaris* S.) under rain-shelter high density staking cultivation. *J Kor Soc Hort Sci* 14: 160-161.

Lee, S. G. and Lee, W. S. 1996. Effects of fruit-set position and number of fruits set per plant on netting, fruit quality and fruit weight in netted melon(*Cucumis melo* L. var. *reticulatus*). *Agric Res Bull Kyungpook Nat Univ* 14: 61-65.

Leskovar, D. I., Stein, L. A. and Dainello, F. J. 2000. Planting systems influence growth dynamics and quality of fresh market spinach. *HortScience* 35: 1238-1240.

Locascio, S. J. and Stall, W. M. 1994. Bell pepper yield as influenced by plant spacing and row arrangement. *J Amer Soc Hort Sci* 119: 899-902.

Marcelis, L. F. M., Heuvelink, E., Baan Hotman-Eijer, L. R., Den Bakker, J. and Xue, L. B. 2004. Flower and fruit abortion in sweet pepper in relation to source and sink strength. *J Exper Botany*

55: 2261-2268.

Maynard, E. T. and Scott, W. D. 1998. Plant spacing affects yield of 'Superstar' muskmelon. HortScience 33: 52-54.

Mohamed, F., El-Hamed, K., Elwan, M. and Hussien, M. A. 2012. Impact of grafting on watermelon growth, fruit yield and quality. Vegetable Crops Res Bulletin 76: 99-118.

Moon, J. Y., Lee, H. J. and Oh, D. G. 2011. Germination rate of grafting-stock varieties of gourd as affected by harvested time. J Kor Soc Hort Sci 2: 113-113.

Motsenbocker, C. E. 1996. In-row plant spacing affects growth and yield of pepperoncini pepper. HortScience 31: 198-200.

Mustafa, P., Cevat, A., Onder Turkne, B. and Musa, S. 2010. Modeling of some physical properties of watermelon (*Citrullus lanatus* (Thumb) Mansf.) seed depending on moisture contents and mineral compositions. Pak J Bot 42: 2755-2783.

Nesmith, D. A. 1993. Plant spacing influences watermelon yield and yield components. HortScience 28: 885-887.

Oh, D. G. and Moon, J. Y. 2012. Germination of grafting-stock varieties of gourd as affected by harvested time and seed collected part of fruits. Kor J Hort Sci Technol 30: 108-108.

Park, D. K., Kwon, J. K., Lee, J. H., Yoo, I. H., Choi, Y. H. and Park, K. S. 2004. Effect of fruiting position and training and padding methods on the yield and quality in Muskmelon creeping cultivation without heating. J Boi-envir cont 11: 149-153.

Park, S. G., Chung, S. J. and Park, H. S. 1997. Effects of cultural methods and planting densities on growth and fruit quality of Mudeungsan watermelon. J Kor Soc Hort Sci 38: 608-613.

Reiners, S. and Riggs, D. I. M. 1999. Plant population affects yield and fruit size of pumpkin. HortScience 34: 1076-1078.

Robinson, R. W. 1954. Seed germination problems in the Umbelliferae. Botan Review 20: 531-550.

RDA. 2012. Information of agricultural statistics Korea.

RDA. 2014. national institute of horticultural & herbal science. <http://www.nihhs.go.kr>

Sanhewe, A. J. and Ellis, R. H. 1996. Seed development and maturation in *Phaseolus vulgaris*. II.

Post-harvest longevity in air-dry storage. *J of Exp Botany* 47: 959-965.

Schultheis, J. R., Walters, S. A., Adams, D. E. and Esters, E. A. 1999. In-row plant spacing and date of harvest of 'Beauregard' sweet potato affect yield and return on investment. *HortScience* 34: 1229-1233.

Son, B. G., Choi, Y. W., Ahn, C. K., Cho, D., Kang, J. S. and Kwon, O. C. 1999. Effect of maturity, storage condition and growth regulators treatment on the seed germination and longevity of *Gentiana scabra* Bunge var. *buegeri* Max. *J Kor Soc Hort Sci* 40: 129-133.

Statistics Korea. 2015. <http://kosis.kr>

Velasco, J. and Stoner, A. K. 1983. ABA levels in tomato seed and fruit as affected by fruit maturation and fermentation. *J Amer Soc Hort Sci* 108: 773-775.

Welbaum, G. E. and Bradford, K. J. 1989. Water relations of seed development and germination in muskmelon (*Cucumis melo* L.). *J of Exp Botany* 86: 406-411.

Welbaum, G. E. and Bradford, K. J. 1991. Water relations of seed development and germination in muskmelon (*Cucumis melo* L.) VI. Influence of priming on germination responses to temperature and water potential during seed development. *J of Exp Botany* 42: 393-399.

Yetisir, H., Sari, N. and Seral, Y. 2003. Rootstock resistance to fusarium wilt and effect on watermelon fruit yeild and quality phytoparasitica. *Agr Sci* 31: 163-169.

Yoo, E. H., Ko, K. D., Lee, J. M. and Om, Y. H. 1999. Effect of fruit setting number in seed growing on germination in gourd(*Lagenaria siceraria* Standl.) seeds. *J Kor Soc Hort Sci* 17: 652-652.

Yoo, E. H., Park, H. G., Lee, J. M. 2001. Effects of seed treatments on germination improvement in the seeds of different maturity in bottle gourd(*Lagenaria siceraria* Standl.) 'Patner' and 'Renshi'. *J Kor Soc Hort Sci* 2: 78-78.

Yoo, K. C., Kim, J. H., Yeong, Y. R. and Lee, S. H. 1995. Studies on the cause and practical breaking of dormancy of gourd(*Lagenaria leucantha* Rusby.) seed. *J Kor Soc Hort Sci* 3: 45-61.

Back, C. G., Park, M. J., You, Y. H., Yi, P. H., Han, K. S., Park, J. H. and Lee, Y. S. 2016. First Report of Bacterial Black Spot Disease in Cucumber Caused by *Acidovorax konjaciin* Korea. *Plant Disease* 100: 1492.

- Bahar, O., Efrat, M., Hadar, E., Dutta, B., Walcott, R. R. and Burdman, S. 2008. New subspecies-specific polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Plant Pathology* 57: 754-763.
- Burdman, S. and Walcott, R. R. 2012. *Acidovorax citrulli*: generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry. *Molecular Plant Pathology* 13: 805-15.
- Dutta, B., Scherm, H., Gitaitis, R. D. and Walcott, R. R. 2012. *Acidovorax citrulliseed* inoculum load affects seedling transmission and spread of bacterial fruit blotch of watermelon under greenhouse conditions. *Plant Disease* 96: 705-11.
- Elnifro, E. M., Ashshi, A. M., Cooper, R. J., and Klapper, P. E. 2000. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clinical microbiology reviews*, 13: 559-570.
- Feng, J., Kim, J., Liu, X., Schaad, N.W. and Li, J. 2008. Differentiation of live and dead cell of bacterial plant pathogen in polymerase chain reaction assays using a DNA binding dye (in Chinese). *Chemical Journal of Chinese Universities* 29: 944-948.
- Feng, J. J., Schuenzel, E. L., Li, J. and Schaad, N. W. 2009. Multilocus sequence typing reveals two evolutionary lineages of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Phytopathology* 99: 913-920.
- Feng, J. J., Li, J. Q., Walcott, R. R., Zhang, G. M., Luo, L. X., Kang, L., Zheng, Y. and Schaad, N. W. 2013. Advances in detection of *Acidovorax citrulli*, the causal agent of bacterial fruit blotch of cucurbits. *Seed Science and Technology* 41: 1-15.
- Gardan, L., Stead, D. E., Dauga, C. and Gillis, M. 2003. *Acidovorax valerianellae* sp. nov., a novel pathogen of lamb's lettuce [*Valerianella locusta* (L.) Laterr.]. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 53:795-800.
- Gitaitis, R. D. 1993. Development of a seed borne assay for watermelon fruit blotch. *Proceedings of the First ISTA Plant Disease Committee Symposium on Seed Health Testing* pp. 9-18.
- Gitaitis, R. and Walcott, R. 2007. The epidemiology and management of seed borne bacterial diseases. *Annual Reviews Phytopathology* 45: 371-397.
- Ha, Y., Fessehaie, A., Ling, K. S., Wechter, W. P., Keinath, A. P. and Walcott, R. R. 2009. Simultaneous detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and *Didymella bryoniaein* cucurbit seed lots using magnetic capture hybridization and real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology* 99: 666-678.
- Han, Y. K., Han, K. S., Lee, S. C., Kim, S. and Lee, J. 2012. First report of bacterial black spot disease in watermelon caused by *Acidovorax valerianellae* in Korea. *Plant Disease* 96:759-759

- Himananto, O., Thummabenjapone, P., Luxananil, P., Kumpoosiri, M., Hongprayoon, R., Kositratana, W. and Gajanandana, O. 2011. Novel and highly specific monoclonal antibody to *Acidovorax citrullii* development of ELISA-based detection in cucurbit leaves and seed. *Plant Disease* 95:1172-1178.
- Hopkins, D. L. and Thompson, C. M. 2002. Evaluation of *Citrullus* sp. germ plasm for resistance to *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Plant Disease* 86: 61-64.
- Hui, W., Zhao, T., Schaad, N.W., Sun, F. and Wang, J. 2007. Establishment of rapid detection method for the pathogen of hami melon fruit blotch (in Chinese). *Scientia Agricultura Sinica* 40: 2495-2501.
- Jones, J. B., Gitaitis, R. and Schaad, N. W. 2001. *Acidovorax* and *Xylophilus*. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria 121-137.
- Kang, I. J., Kang, M. H., Noh, T. H., Shim, H. K., Shin, D. B. and Heu, S. 2016. Simultaneous Detection of Three Bacterial Seed-Borne Diseases in Rice Using Multiplex Polymerase Chain Reaction. *The Plant Pathology Journal* 32:575.
- Myung, I. S., Lee, Y. K., Jeong, I. H., Moon, S. Y., Lee, S. W. and Shim, H. S. 2010. A new disease, bacterial black rot of Korean radish, caused by *Acidovorax konjaci*. *New Disease Reports* 22: 26
- Sano, T., Smith, C.L. and Cantor, C.R. 1992. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science* 258: 120-122.
- Schaad, N.W., Cheong, S.S., Tamaki, S., Hatziloukas, E. and Panopoulos, N.J. 1995. A combined biological amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicolain* bean seed extracts. *Phytopathology* 85: 243-248.
- Schaad, N. W. and Sechler, A. 1999. An improved semi selective agar medium for *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Phytopathology* 89: S68.
- Schaad, N.W., Song, W.Y. and Hatziloukas, E. 2000. PCR primers for detection of plant pathogenic species and subspecies of *Acidovorax*. US Patent no. 6146834.
- Schaad, N. W., Postnikova, E., Sechler, A., Claffin, L. E., Vidaver, A. K., Jones, J. B., Agarkova, I., Ignatov, A., Dickstein, E. and Ramundo, B. A. 2008. Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae*s, *A. avenae* (Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb. nov., *A. citrulli* (Schaad et al., 1978) comb. nov., and proposal of *A. oryzae* sp. nov. *Systematic and applied microbiology* 31: 434-446.

- Seo, S. T., Park, J. H., Lee, J. S., Han, K. S. and Cheong, S. R. 2006. Bacterial fruit blotch of melon caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Research in Plant Disease 12: 185-188.
- Shirakawa, T., Kikuchi, S., Kato, T., Abiko, A. and Kaiwa, A. 2000. Occurrence of watermelon bacterial fruit blotch in Japan. Annals of the Phytopathological Society of Japan 66: 223-231.
- Song, J. Y., Park, S. Y., Seo, M. W., Nam, M. H., Lim, H. S., Lee, S. C., Lee, Y. S and Kim, H. G. 2015. Genetic Characteristics of *Acidovorax citrulli* Population Causing Bacterial Fruit Blotch against Cucurbits in Korea. Research in Plant Disease 21: 82-88.
- Song, W. Y., Kim, H. M., So, I. Y. and Kang, Y. K. 1991. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*: The causal agent of bacterial fruit blotch rot on watermelon. Korean Journal of Plant Pathology 7: 177-182.
- Venette, J. R., Lamppa, R. S., Albaugh, D. A. and Nayes, J. B. 1987. Presumptive procedure(dome test) for detection of seed borne bacterial pathogens in dry beans. Plant Disease 71: 984-989.
- Walcott, R. R. and Gitaitis, R. D. 2000. Detection of *Acidovorax aenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction. Plant Disease 84: 470-474.
- Walcott, R. R., Gitaitis, R. D. and Castro, A. C. 2003. Role of blossoms in watermelon seed infestation by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Phytopathology 93: 528-34.
- Walcott, R. R., Fessehaie, A. and Castro, A. C. 2004. Differences in pathogenicity between two genetically distinct groups of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* on cucurbit hosts. Journal of Phytopathol 152: 277-285.
- Walcott, R. R., Castro, A. C., Fessehaie, A. and Ling, K. 2006. Progress towards a commercial PCR-based seed assay for *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Seed Science and Technology 34:101-116.
- Walcott, R. R. 2008. Integrated pest management of bacterial fruit blotch of cucurbits. Integrated management of diseases caused by fungi, phytoplasma and bacteria pp. 191-209.
- Wenguang, H. and Tingchang, Z. 2007. Establishment of rapid detection method for the pathogen of hami melon fruit blotch. Scientia Agricultura Sinica.
- Wilson, K. H., Blitchington, R. B. and Greene, R. C. 1990. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. Journal of clinical microbiology 28:1942-1946.

Xu., F., Wang, X., Xie, G., Su, T. and Yu, S. 2008. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* from seeds of watermelon by Immuno-capture PCR (in Chinese). Journal of Fruit Science 25: 215-218.

Yan, S., Yang, Y., Wang, T., Zhao, T. and Schaad, N. W. 2013. Genetic diversity analysis of *Acidovorax citrullin* in China. European Journal of Plant Pathology 136:171-181.

Zhao, L., Wang, X., Xie, G., Xu, F. and Xie, G. 2006. Detection of pathogen of bacterial fruit blotch of watermelon by immuno-PCR (in Chinese). Journal of Agricultural Biotechnology 6: 120-125.

Zhao, T., Feng, J., Sechler, A., Randhawa, P., Li, J. and Schaad, N. W. 2009. An improved assay for detection of *Acidovorax citrulli* in watermelon and melon seed. Seed science and Technology 37: 337-349.

Kim, D. M., Kwon, J. Y., Lim, K. B. and Kim, H. H. 2007. Genetic Relationship of 12 Taxa of Genus *Aquilegia* Using URP-RAPD. Flower research 15:58-63.

김혜성. 2016. 수박 세균검은점무늬병균 *Acidovorax valerianellae*의 특성 및 특이적PCR법 개발. 충북대학교 농학석사학위논문.

농림축산식품부(Ministry of agriculture, Food and Rural Affairs). 2014. 시설채소 온실 현황 및 채소류 생산실적2014년. <http://www.magra.go.kr>

장완식 and 이정명. 1997. 건열처리조건에 따른 박과채소의 종자 및 유묘활력 변이. 한국원예학회 학술발표요지15: 508-509.

한국식물병리학회. 2009. 한국식물병명목록 제5판pp. 119

<첨부> 특허, 논문 및 시장분석 보고서

특허, 논문, 제품(시장) 분석보고서

프로젝트명	수출용 고품질 수박 종자처리 및 검정 체계 확립		
프로젝트 책임자	이 윤 수	프로젝트 연구기관	강원대학교

1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
수박종자 채종기술	일본	65	80	95	
밭아 균일 및 활력 증진 종자처리 기술	미국, 일본, 유럽	60	80	97	
종자가공기술 (priming, 필름코팅)	미국, 일본, 스위스	60	85	97	스위스 (신젠타)
비파괴 종자품질 판별법	네덜란드	5	50	90	
비파괴 고품질 종자 선별	일본, 미국	5	70	90	선진국은 종자코팅 및 유사한 선별기계 보유
건열처리기술	일본, 화란	80%	80%	100%	후처리 및 프라이밍 보완 필요
기타 불활성화 기술	부분 시행 및 계속 연구중	50%	50%	100%	한국은 부분적 이용
세균병 검정	미국 및 EU	80%	70%	100%	종자전염 세균병
종자프라이밍기술	미국 및 EU	70%	70%	100%	국내 회사 대비 수취임

2. 특허분석

가. 특허분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr), Aureka DB
검색기간	2007.01.01. ~ 2012.03.09
검색범위	발명의 명칭, 초록, 청구범위

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	수박종자 채종	종자코팅	비파괴 종자품질(발아성) 판별
Keyword	watermelon, seed, gathering	seed coating	종자, 비파괴, 발아, 판별
검색건수	100	407	3
유효특허건수	3	1	2
핵심특허 및 관련성	특허명	Method and system for cultivating fruit	RICE SEED COATED WITH AN AGRICULTURAL CHEMICAL
	보유국	미국	일본
	등록년도	2011	2010
	관련성(%)	40	50
	유사점	종자 채종법	종자 코팅
	차이점	대상 작물의 광범위함	퇴화종자 판별이 아님
			METHOD FOR CLASSIFYING PLANT INDIVIDUAL BY OPTICAL MEANS AND PLANT INDIVIDUAL WHOSE EXPRESSIVE CHARACTER IS CLASSIFIED BY THE OPTICAL MEANS
			비파괴 종자검정
			발아성 검정이 아니고 성분분석

개발기술명	과실썩음병 멸균	종자프라이밍	채소접목
Keyword	Bacterial fruit blotch sterilization Dry heat treatment (DHT)	Seed priming After-DHT conditioning	Vegetable grafting
검색건수	9	115	46
유효특허건수	0	20	0
핵심특허 및 관련성	특허명	-	priming
	보유국	-	various
	등록년도	-	2005-8
	관련성(%)	-	30
	유사점	-	20
	차이점	-	80

3. 논문분석

가. 논문분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽
논문 DB	KISTI(http://ndsl.kr) ISI Wep of Knowledge(http://portal.isiknowledge.com) Science direct(http://www.sciencedirect.com) 포털사이트 구글(http://www.google.co.kr) Aureka DB, pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov) 국회도서관(www.nanet.go.kr) PubMed, Google scholar, www.actahort.org
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	<i>BFB(bacterial fruit blotch)</i>	<i>Seed treatment & germination</i>	<i>Vegetable grafting & resistance of disease</i>	
Keyword	<i>Bacterial fruit blotch</i> <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	Seed treatment, Priming, germination	Vegetable grafting, resistance of disease	
검색건수	6+73	17,300	9150	
유효논문건수		7	7	
핵심논문 및 관련성	논문명	A method to evaluate percentage of cucurbit seeds infested with <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> , pathogen of bacterial fruit blotch	Advances in seed treatments for horticultural crops.	Current status of vegetable grafting: Diffusion, grafting techniques, automation
	학술지명	J. Gen. Plant. Pathol.	Chronica Hort. 44(2):11-20	Scientia Horticulturae 127(2010)93-105
	저자	M. Kubota, N. haglwara, T. Shirakawa	Jung-Myung Lee	Jung-Myung Lee, C. Kubota, S.J. Tsao, Z. Bie, P. Hoyos Echevarria, L. Morra, M. Oda
	게재년도	2011	2004	2010
	관련성(%)	50	50	50
	유사점	50	50	50
	차이점	50	50	50

개발기술명		비파괴 종자품질(발아성) 판별기술	비파괴 고품질(우수발아성) 종자 선별기술
Keyword		nondestructive,, seed, viability, test	nondestructive, seed, classification
검색건수		16	18
유효논문건수		2	1
핵심논문 및 관련성	논문명	Investigation of germination and aging in Moravian Ill barley grain by nuclear magnetic resonance	Identification of rice seed varieties using neural network
	학술지명	Biophys J.	J Zhejiang Univ Sci B.
	저자	C F Ridenour, J Xiong, and G E Maciel	Zhao-yan Liu, Fang Cheng, Yi-bin Ying, and Xiu-qin Rao
	게재년도	1996	2005
	관련성(%)	90	50
	유사점	비파괴 종자 판별	비파괴 종자 선별
	차이점	고가의 NMR기계 이용	발아성 선별이 아니고 종자품질 감정
개발기술명		병원균 감염종자 비파괴 검정	초분광 비파괴 종자검정
Keyword		Seed, Nondestructive, damaged, infested	Seed, Hyperspectral, Nondestructive
검색건수		1543	3821
유효논문건수		52	409
핵심논문 및 관련성	논문명	Identificaion of Wheat Kernels damaged by the Red Flour Beetle usin X-ray Images	Single kernel maize analysis by near-infrared hyperspectral imaging
	학술지명	Biosystems Engineering	Transactions of the ASAE
	저자	D.S. Jayas 외 2명	R. P. Cogdill 외 2명
	게재년도	2004	2004
	관련성(%)	70	80
	유사점	병해충에 의한 종자 내 부결함 판별	초분광을 이용한 분자 품질 판정
	차이점	X-ray를 이용하여 종자 내부병징 확인	옥수수에 적용, 종자 성분 분석

4. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

1) 국내 제품생산 및 시장 현황

- 국내 수박 재배면적은 1995년 정점으로 급격히 감소하여 2000년 이후에는 연평균 감소하는 추세
- 2010년 수박재배 면적은 16,396ha 이며, 노지면적은 줄고 시설수박은 꾸준히 증가
- 국내의 수박시장 규모는 약 120억원이며, 수입액은 1억원 정도로 추정(종자협회, 2011)
- 국내시장 국산품종 점유율은 97% 이상으로 국산화 비율이 높음
- 수박종자의 수입은 적으나 국내시장은 이미 포화상태
 - 해외시장의 진출 필요성 제기

- 고 활력, 고품질, 고기능성, 식품안정성, 고부가가치 품종요구도 증대
 - 해외의 수박 선호도가 고당도로 이동 중이며, 이에 따른 우량종자의 생산이 필요
 - 미국의 경우, 라이코펜 리더(Lycopene Leader)라는 품종으로 수박의 기능성 활용 홍보
 - 전 세계 농민의 수박 품종 요구도 재래종에서 F1으로 약 80% 까지 상승
 - 고가의 F1품종 선호도 증가로 고부가가치 종자개발 필요성 증대
- 한국의 수박종자 산업은 품종개발은 세계적 수준이나 종자처리 및 가공분야는 선진국에 비해 열악
 - 2008년 몬산토의 R&D 투자는 9.8억 달러로 국내 종자시장규모의 2배를 능가
- 현재 우리나라의 종자가공 기술은 이미 상용화 된 분야도 있으나 아직까지 연구 개발단계
- 종자가공 처리 및 비파괴 우량종자 선별분야 기술의 원천기술 확보가 시급
- 이와 같이 연구와 축적된 기술을 바탕으로 수박종자의 가공산업 활성화시킨다면 수출활성화에 기여할 수 있을 것임
- 본 연구에 활용될 수 있는 기본적 멸균장치는 개발되어 있음. 그러나 BFB용으로는 각각의 작물에 대한 사용방법이나 기준이 전혀 개발되지 않고 있음.

2) 국외 제품생산 및 시장 현황

- 수박은 전 세계 채소종자 시장의 주요 품목으로 대표적인 글로벌 작물임
- 수박 재배면적의 지속적 확대
 - 전 세계 수박 재배면적 3,200,257 ha(2004) 대비하여 , 2009년 20% 확대되었으며, 특히 중국에서 급속히 확대되어 2004년 대비하여 32%증가함
- 전 세계 및 아시아 시장에서 수박의 중요성
 - 전 세계 수박 생산량은 '08년 기분으로 95백만 톤으로 매년 꾸준한 증가율을 보이고 있으며 최대 수박생산국은 중국으로서 67백만 톤을 기록하고 있음
- 선진외국 종자가공 분야에 집중적인 연구 이루어짐
- 종자가공 처리의 선도 기업
 - 미국의 INCOTEC, 일본의 스미도모
 - 종자처리와 공정기술은 대외비임
- 외국 기술을 답습하는 모방형 종자처리 기술을 탈피하여 순수 국내기술에 의한 종자가공 기술의 확보가 절실
- 화란을 제외한 기타 국가에서는 한국 제품을 수입-이용하고 있음.

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

- 본 연구팀이 2002년과 2003년에 각각 개발한 바 있는 iPET(당시 ARPC) 연구과제에서 개발된 건열처리기계와 기술은 이제 세계적인 업적으로 인정받고, 특히 건열처리기계는 고가임에도 불구하고 2011년에만도 태국, 중국, 인도네시아 등으로 13대가 수출되는 등의 업적을 보이고 있는데 BFB 불활성화 기술이 개발되면 대단한 차후의 수출이 기대됨.

- 현재 BFB균을 진단하기 위해서는 고가의 장비(RT-PCR)가 필요하거나 5만립을 파종해서 점검해야 하는 생물검정 등이 제시되지만 간편한 검출장치는 개발되지 않고 있음. 하나의 제품이 개발되어 소개되고는 있지만(QuickStix®) 고가일뿐더러 감응도가 너무 낮아서 실용성이 낮다는 견해가 다수임. 따라서 본 연구에서도 전문가들의 협조를 얻어 간이 신속 진단 kit를 개발하는데도 많은 노력을 경주하고자 함.

2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목	산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과		1,000	2,000	2,000	2,000	-	7,000
경제적 파급효과		10,000	20,000	20,000	20,000	-	70,000
부가가치 창출액		5,000	10,000	15,000	15,000	-	45,000
합 계		16,000	32,000	32,000	32,000	-	122,000

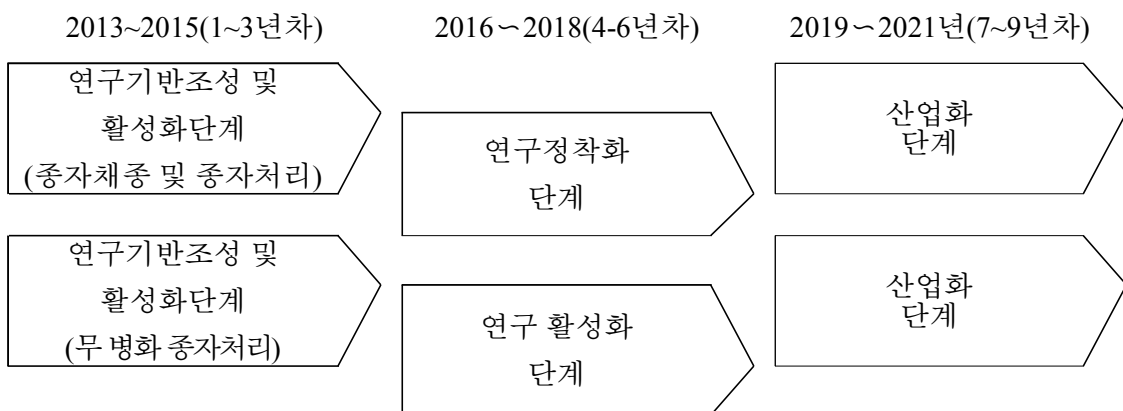
산업화를 통한 국내 기대효과

- ① 육묘장 및 개인 농가의 육묘 중 관리노동력 및 비용 절감 효과, ② 육묘생산단가의 인하에 따른 영농비 절감 효과, ③ 육묘의 균일도 및 활력 강화에 따르는 조기 수확 및 다수확 효과, ④ 육묘기간 단축에 따르는 육묘장의 수입 증대 효과, ⑤ 친환경 작물의 재배에 따르는 생산물 부가가치 상승에 의한 효과, ⑥ 종자수출 및 수입 절차상의 기여도, ⑦ 세계시장의 기술적인 공헌 및 첨단화 공헌도

5. 3P(특허, 논문, 제품)분석을 통한 연구추진계획

가. 분석결과 향후 연구계획(특허, 논문, 제품 측면에서 연구방향 제시)

□ 기술개발로드맵



1) 특허분석 측면

- 기존 특허는 종자 priming 및 코팅특허는 제조방법에 관한 것이며, 대부분의 물질들이 수입에 의존하는 경우가 많았으나, 본 과제에서는 국내부존자원 중에서 코팅 가능성이 높은 물질을 탐색하고, 원천기술을 확보하여 국내 및 국제특허를 출원 할 계획임
- 고품질의 수박종자를 생산하기 위해서는 가격이 저렴하고 친환경적이면서 발아에 장애를 주지 않는 priming 물질을 선방하고자 함. 아울러 유용 미생물을 활용한 종자 처리를 기술을 확보하여 국내 및 국제특허를 출원 할 계획임
- 국제 특허에서 종자의 발아 능을 비파괴적으로 신속히 검정하는 기술은 전무함. 본 연구 과제에서는 비파괴적으로 single seed 단위로 신속하고 경제적인 방법으로 종자의 발아 능을 검정하는 방법을 확립하여 국내 및 국제 특허를 출원할 계획임
- 기존 특허는 단편적인 응용 기술 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 다양한 여러 과정을 통합하여 일관화시키는 방향으로 연구를 추진하여 종합처리 또는 일관처리기술을 개발하여 특허 등을 국내 및 국외에 출원할 계획임.
- 종자발아에 주로 국한되었던 연구나 개발을 고품질종자(발아세, 비정상묘 출현의 억제) 및 고품질 묘의 육성에 연구의 중점을 두고, 특히 친환경적 또는 유기농을 위한 안전 종자 및 유묘 공급체계를 수립하여 운영할 것임.

2) 논문분석 측면

- 수박종자의 채종에 관련된 논문들은 거의 없으나, 수박 이외에 다른 작물에서의 논문수가 많지 않음. 또한 많은 연구들이 발아촉진이 가능한 piming 처리의 생리 연구에 치중되어 있고, 코팅종자의 공정기술과 산업화에 관련된 논문은 없었음. 본 연구과제에서는 필름코팅의 공정기술과 물질 등 탐색 등 산업화를 구명하여 확보된 유용결과들을 국내외 생명과학 관련 학술지 등에 논문을 게재할 계획임.
- 기존 논문은 주로 종자발아연구 및 BFB균의 검정분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 종자의 활력 및 건전성, 친환경성 및 무균종자의 생산을 위한 종자처리 방향으로 연구를 추진하여 얻은 결과를 토대로 나온 논문 등을 국내 및 국제학술지 등에 게재할 계획임.

3) 제품 및 시장분석 측면

- 씨 없는 수박종자의 면적이 증가하면서 발아력이 높은 고품질을 종자가 요구됨
 - 우량종자, 고품질 종자, 불량환경조건에서 발아력이 우수한 고품질 종자의 요구가 증가함
- 확보된 채종기술을 활용하여 우량종자를 생산하고 이와 더불어 활력을 증강시킬 수 있는 발아촉진 처리된 종자는 세계시장의 경쟁력 확보에 핵심 무기화 할 수 있을 것임
- 이뿐만 아니라 고품질의 종자를 비파괴적으로 선별할 수 있는 기술이 개발하면 부가가치가 매우 클 것이며 국내외 종자회사나 연구소 국가기관 및 대학교를 중심으로 수요가 많을 것으로 판단됨
- 국내 및 국외시장 분석결과 세계적으로 활발한 유전자원 및 종자의 교류 및 국제무역에 따라 종자전염성 병이 빠른 속도로 증가되고 있어서 이에 대한 근본적인 대책 수립이

시급한 실정임. 본 연구를 통해서 얻어지는 종합적 및 친환경적 무독화 처리 기술과 장치이용기술은 함께 일련의 과정으로 묶일 수 있어서 현재 빠르게 수출되고 있는 건열처리 기기의 수출에 박차를 가하고 현재 급격하게 증가하고 있는 한국의 채소종자수출산업진흥에 결정적 박차를 가하게 될 것으로 분석됨

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 Gold Seed Project 사업의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 Gold Seed Project 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.