

(뒷면)

(앞면)

발간등록번호

11-1543000-001634-01

5cm



무 품종 육성을 위한 내병성 검정
기술 개발
(Development of *in vivo* screening
system for resistant radish plants)

한국화학연구원



9cm

농 립 축 산 식 품 부 · 해양수산부 ·
농 촌 진 흥 청 · 산 립 청

4cm

무 품종
육성을
위한
내병성
검정
기술
개발

농 립 축 산 식 품 부
해양수산부
농 촌 진 흥 청
산 립 청

3cm

주 의
(편집순서 8)

(15 포인트 고딕체열)

6cm

		↓
--	--	---

제 출 문

농림축산식품부장관 . 해양수산부장관 . 농촌진흥청장 . 산림청장 귀하

이 보고서를 “무 품종 육성을 위한 내병성 검정 기술 개발” 프로젝트의 보고서로 제출합니다.

2017년 2월 14일

프로젝트 연구기관명 : 한국화학연구원

프로젝트 책임자 : 최 경자

세부프로젝트 연구기관명 : 한국화학연구원

세부프로젝트 책임자 : 최 경자

요 약 문

I. 제 목

무 품종 육성을 위한 내병성 검정 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

새로운 내병성 무 품종 육종을 위하여 내병성을 검정하는 병리검정은 내병성 작물 육종을 위한 과정 중 가장 우선적으로 필요한 단계이다. 병리검정은 그 방법이 신속, 간편하고 효율적이어야 하며 실험 결과가 정확해야 하는데, 이를 위하여 무에 발생하는 주요 병해에 대한 병원균을 표준화하고 대량검정 기술을 개발하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 무의 주요 병원균에 대한 다양한 균주 수집 : 시들음병균, 뿌리혹병균
2. 무의 주요 병원균에 대한 저항성 특성 평가 : 뿌리혹병균
3. 국내외 수집 균주들의 in vivo 및 in vitro 표준 보존 기술 개발 : 뿌리혹병균
4. 국내외에서 수집한 식물병원균에 대한 분자생물학적 진단 방법 개발 : 시들음병균, 검은무늬병균, 뿌리혹병균
5. 무의 주요 병원균에 대한 다양한 균주에 대한 저항성 특성 평가 : 뿌리혹병균
6. 무의 주요 병해에 대한 효율적인 대량 검정 기술 개발 : 시들음병, 검은무늬병, 무름병
7. 무 주요 병해에 대한 중소형 민간 육종회사 및 개인 육종가를 위한 비용절감형 현장용 저항성 검정법 개발 : 시들음병, 뿌리혹병, 무름병

IV. 연구개발결과

1. 무의 주요 병원균에 대한 다양한 균주 수집 : 무 시들음병균(*Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*) 19균주와 뿌리혹병균(*Plasmodiophora brassicae*) 20균주를 확보하였음.
2. 무의 주요 병원균에 대한 다양한 균주에 대한 저항성 특성 평가 : 확보한 뿌리혹병균 12균주를 이용하여 이들에 대한 22개 무 품종들의 저항성 반응을 조사한 결과, 무에 대한 뿌리혹병균의 레이스 분화는 없었으며 무의 뿌리혹병 저항성은 질적 저항성이 아니라 양적 저항성임을 알 수 있었음.
3. 국내외 수집 균주들의 in vivo 및 in vitro 표준 보존 기술 개발 : 다양한 온도에서 뿌리혹병균(*Plasmodiophora brassicae*)을 저장하고 생존능력을 조사하여 단기 및 장기적으로 효율적인 저장 방법을 개발하였음.
4. 국내외에서 수집한 식물병원균에 대한 분자생물학적 진단 방법 개발 : 무 시들음병균(*Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*), 무 검은무늬병균(*Alternaria brassicicola*), 뿌리혹병균(*Plasmodiophora brassicae*)균을 특이적으로 진단하는 분자마커를 개발하고 이의 효용성을 확인하였음.
5. 무의 주요 병해에 대한 효율적인 대량 검정 기술 개발

기주	식물병	병원균
무	시들음병	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>
무	검은무늬병	<i>Alternaria brassicicola</i>
무	무름병	<i>Pectobacterium carotovorum</i>

6. 무 주요 병해에 대한 중소형 민간 육종회사 및 개인 육종가를 위한 비용절감형 현장용 저항성 검정법 개발

기주	식물병	병원균
무	시들음병	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>
무	뿌리혹병	<i>Plasmodiophora brassicae</i>
무	무름병	<i>Pectobacterium carotovorum</i>

V. 연구성과 및 성과활용 계획

확립한 병리검정 기술은 GSP 골든 시드 프로젝트 2단계에서 육종가들에게 지속적으로 내병성 품종개발을 위한 병리검정 서비스에 활용할 것이며 또한 확립한 다양한 기술은 논문으로 출간하여 종자회사에서 이용할 수 있도록 할 예정이다. 이것은 내병성 품종 개발을 촉진하여 우리나라 종자기업의 국가 경쟁력 강화 및 수출 확대에 기여할 것이다.

SUMMARY

I. Title

Development of *in vivo* screening system for resistant radish plants

II. Objectives and Importance of the Research

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

The objects of this research, therefore, were to establish an efficient screening system.

III. Contents and Scope of the Research

1. Collection of pathogens causing major diseases on radish
 - A. *Plasmodiophora brassicae*
 - B. *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*
2. Assessment of disease resistance of radish cultivars to various isolates
 - A. Radish clubroot (*Plasmodiophora brassicae*)
3. Development of *in vivo* and *in vitro* standard preservation technology
 - A. *Plasmodiophora brassicae*
4. Development of molecular diagnostic methods of plant pathogens
 - A. Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*)
 - B. Clubroot (*Plasmodiophora brassicae*)
 - C. Black leaf spot (*Alternaria brassicicola*)
5. Development of efficient mass-screening technology for the major diseases on radish
 - A. Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*)
 - B. Black leaf spot (*Alternaria brassicicola*)
 - C. Soft rot (*Pectobacterium carotovorum*)

6. Development of cost-effective methods for the resistance of radish to the major pathogens
 - A. Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*)
 - B. Clubroot (*Plasmodiophora brassicae*)
 - C. Soft rot (*Pectobacterium carotovorum*)

IV. Results

1. Collection of pathogens causing major diseases on radish: 19 isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* and 20 isolates of *Plasmodiophora brassicae*.
2. Assessment of disease resistance of various radish cultivars: 22 radish cultivars were investigated for their disease resistance to 12 *P. brassicae* isolates, which showed that there is no race differentiation among *P. brassicae* isolates, and the resistance of radish to *P. brassicae* was controlled by quantitative traits rather than qualitative traits.
3. Development of *in vivo* and *in vitro* standard preservation technology for the pathogens that were collected from domestic and foreign area: an efficient short- and long-term storage method has been developed on the basis of pathogens' viability at various temperatures.
4. Development of molecular diagnostic methods of plant pathogens that were collected from domestic and foreign area: molecular markers that are species-specific for *F. oxysporum* f. sp. *raphani*, *Alternaria brassicicola*, and *P. brassicae*, have been developed and confirmed their utility.
5. Development of efficient mass-verification technology for the major diseases on radish
6. Development of cost-effective and rapid assay methods for the resistance of radish to the major pathogens, which is useful for small-sized private breeding companies and individual breeders

CONTENTS

Chapter I.	Brief Summary of the Project -----	11
Section	1. Object of the Research -----	11
Section	2. Importance of Research -----	11
Section	3. Scope of Research -----	14
Chapter II.	International and Domestic Status of This Technology Development -----	15
Section	1. International status of this technology development	15
Section	2. Domestic status of this technology development --	15
Chapter III.	Scope and Results of Research -----	17
Section	1. Collection of pathogens causing major diseases on radish -----	17
Section	2. Assessment of disease resistance of radish cultivars to various isolates -----	24
Section	3. Development of in vivo and in vitro standard preservation technology -----	30
Section	4. Development of molecular diagnostic methods of plant pathogens -----	35
Section	5. Development of efficient mass-screening technology for the major diseases on radish ----	56
Section	6. Development of cost-effective and rapid assay methods -----	92
Chapter IV.	Accomplishment and Contribution -----	109
Section	1. Accomplishment -----	109
Section	2. Contribution -----	115

Chapter V.	Application of the Results -----	117
Chapter VI.	Foreign Science Technology Information Collected During Research -----	121
Chapter VII.	References -----	123

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 -----	11
제 1 절	연구개발의 목적 -----	11
제 2 절	연구개발의 필요성 -----	11
제 3 절	연구개발의 범위 -----	14
제 2 장	국내외 기술개발 현황 -----	15
제 1 절	국외 기술개발 현황 -----	15
제 2 절	국내 기술개발 현황 -----	15
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 -----	17
제 1 절	무의 주요 병원균에 대한 다양한 균주 수집 -----	17
제 2 절	무의 주요 병원균에 대한 저항성 특성 평가 -----	24
제 3 절	수집 균주들의 표준 보존 기술 개발 -----	30
제 4 절	수집한 식물병원균에 대한 진단 방법 개발 -----	35
제 5 절	무의 주요 병해에 대한 효율적인 대량 검정 기술 개발 --	56
제 6 절	비용절감형 현장용 저항성 검정법 개발 -----	92
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	111
제 1 절	목표달성도 -----	111
제 2 절	관련분야에의 기여도 -----	117
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	119

제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	123
제 7 장	참고문헌 -----	125

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 목적

무의 내병성 품종 육종을 위하여 무에 발생하는 주요 병해에 대한 병원균을 표준화하고 대량검정 기술을 개발하고 무 유전자원의 내병성 검정 및 평가를 통한 내병성 육성 계통 발굴을 지원하고자 한다.

제 2절 연구개발의 필요성

- 세계 종자시장 규모는 약 780억 달러(2011년 기준)이며 2001년 이후 연평균 10% 이상의 고성장 중이다. 이 중 농작물 종자시장은 53%인 450억 달러인데, 이는 300억 달러 반도체(DRAM) 시장보다 규모가 월등히 큰 시장이다. 농작물 종자 시장은 곡물 종자가 79%, 채소 및 화훼 종자가 17% 그리고 사료 및 목초 종자가 14%를 차지하고 있다.
- 세계 종자 시장 중 상위 5개국(미국, 중국, 프랑스, 브라질, 인도)의 종자 시장 규모는 2008년에는 57%인 180억 달러였으나 2011년에는 65%인 292억 달러로 확대되었다. 주요 선진국은 일찍부터 종자산업의 중요성을 인식하여 유전자원 확보와 첨단생명공학을 이용한 신 품종 개발에 역점을 두고 있고, 종자산업 선·후발국 간에 유전자원의 확보 및 이용을 위한 경쟁이 심화되고 신품종보호권이 국가 간 쟁점으로 대두되고 있다.
- 세계 종자산업은 몬산토, 듀퐁, 신젠타, 바이엘크롭사이언스 등 10대 다국적 기업의 시장 점유율이 70%를 넘는 독과점 상태이다. 이들은 자본력을 바탕으로 막대한 예산을 R&D에 투자하고 있는데, 1위 기업인 몬산토는 매출액의 12% 수준인 10억 달러 이상을 연구 개발에 투자하고 있다. 2000년대 이후 분자유전학 등의 발달에 따라 이들은 전통육종과 분자유종을 접목하여 품종 개발 경쟁력을 강화하고 있다. 특히 GM 작물개발, 내재해성 유전자 확보, 고부가가치 기능성 품종 개발에 중점 투자하고 있다.
- 종자산업은 기술·자본 집약적인 고부가가치 산업으로, 경지면적이 좁은 반면에 우수한 인적 자원과 기술력을 지니는 우리나라에 적합한 산업으로 인식되어 오늘날 종자산업에 대한 관심이 크게 증가하고 있다. 농림축산식품부에서는 **종자산업을 농업의 신성장동력산업**으로 간주하고 이를 위하여 2009년에 ‘종합적인 종자산업 육성대책’을 수립한 바 있다.
- 우리나라는 그동안 국가에서는 주곡 작물의 육종을 그리고 채소 작물은 ‘완전민간주도형’으로 육종을 담당해 왔다. 그런데 1997년 외환위기 당시에 64%의 시장 점유율을 차지하던 국내 4대 종자기업인 흥농종묘, 서울종묘, 중앙종묘, 청원종묘가 신젠타, 세미니스, 사카타 등의 다국적기업에 인수되어 우리나라 종자기업의 육종 기반이 취약해 졌다. 이후 우수한 육종기술을 보유한 많은 육종가들이 줄지어 창업함으로써 중·소규모 종자회사 및 개인육종가의 수가 크게 증가하여 총 800여개의 종자기업 중 **10인 이하의 소규모업체가 97%**인 실정이다.
- 우리나라는 2002년에 UPOV에 가입함에 따라 2001년 5억5천만 원, 2005년에는 183억 6천만 원 그리고 2011년에는 226억 원의 로열티를 지급하였다. 그런데 2012년도부터는 모든 작물이 신품종 보호 대상 작물로 확대되어 앞으로 **로열티 지급 규모가 크게 증가**하리라 예상되고 있다. 따라서 수입을 대체할 수 있는 우수한 품종의 종자 개발이 시급히 요구되고 있다.

- 우리나라 종자시장 규모는 세계 시장의 1.6%에 불과하고, 2011년 우리나라 종자 수출은 3,900만 달러이며 수입은 9,900만 달러로 수입이 더 많은 상태이다. 수출 종자의 90%는 채소가 차지하고 있다. 국내 종자 시장은 국내 다국적 기업을 포함한 (주)농우바이오, 몬산토, 신젠타, 다끼이, (주)동부팜한농의 5대 종자기업이 80%를 차지하고 있다. 외국계 종자기업의 점유율은 외환위기 이전에는 14% 수준이었으나, 현재는 50% 수준으로 확대되었다.
- 2011년 현재 우리나라의 채소종자 시장 규모는 2,337억 원이고, 이 중 내수는 약 85%인 1,977억 원이고 수출은 360억 원에 불과하다. 우리나라는 무에 관해서는 세계적인 경쟁력을 지니고 있으나, 다국적 기업이 우리나라 종묘회사를 인수한 후에 획득한 자원 및 기술을 이용하여 시장을 확장하고 있어 위협을 받고 있다. 따라서 무 품종의 경쟁력을 유지하기 위해서는 재배 지역에 적합한 **내병성 품종의 개발**이 절실히 요구되고 있다.
- **오늘날 채소 품종 육성의 핵심 기술은 내병성**이다. 식물 병을 방제하지 않고 작물을 재배하면 작물에 따라 10~70%의 수확량 감소가 있는데, 원예 작물의 경우에는 타 작물에 비하여 특히 피해가 크다. 또한 병이 발생한 작물에는 병원균이 생산한 aflatoxin, trichothecene 등의 독소(mycotoxin)가 존재하는데, 이를 섭취한 인·축에 간암, 내장 출혈, 생식기 이상 등을 일으킨 역사적 사건들이 보고된 바 있다. 따라서 식물 병은 반드시 방제해야 하는데, 삶의 질이 높아짐에 따라 환경에 대한 관심이 증가하고 있고 안전한 먹거리에 대한 소비자 요구도 증가하고 있다. 따라서 합성 농약을 사용하지 않고 재배하는 유기농법에 사용 가능한 내병성 품종에 대한 요구가 커지고 있다.
- 내병성 육종을 위해서는 내병성 유전자원 확보가 무엇보다 중요하지만 **내병성 채소 품종을 개발하는데 있어 가장 많은 시간과 경비가 소요되는 단계는 교배한 다양한 개체 중에서 우수한 저항성 개체를 선발하는 병리검정 과정**이다. 이 병리검정은 전문 시설, 기술 및 인력이 요구되는 전문분야인데, 90년대 외환위기 이후에 우리나라 종자 산업체 대부분이 자본금 규모가 영세한 중소기업 혹은 개인육종가로 육종에 관해서는 우수한 기술을 보유하고 있으나 **병리검정을 자체적으로 추진하기에는 한계가 있는 실정**이다.
- 이에 농림축산식품부에서는 2009년부터 **채소병리검정지원사업단**(주관기관: 한국화학연구원)을 지원하여 다음과 같은 병리검정 기술이 확립되었다.
 - 채소 작물의 유묘를 이용하여 병 저항성을 검정하는 *in vivo* 병리검정은 균류 및 유사균류 병해 20종, 선충 3종, 세균병 5종 그리고 바이러스병 9종에 대한 검정 기술을 확립한 바 있다.
 - 이들 중 **본 연구팀은 현재 26종 식물병에 대한 *in vivo* 병리검정 기술을 확립한 바 있다**(표 1).
- 내병성 품종은 수년에서 수십 년의 오랜 기간 동안 육종을 통하여 개발되는 것이므로 초기 병리검정에 오류가 발생하면 육종가는 막대한 피해를 입게 된다. 이를 위해서는 신속하면서도 정확한 병리검정 결과가 육종가에게 제공되어야 하는데, 이를 위해서는 **효율적이고 정확도가 우수한 대량 검정 용 병리검정 체계 확립이 필요하다**. 본 연구팀은 **효율적인 병리검정 체계를 구축하여 육종가를 만족시키는 병리검정 결과를 제공하고 있다고 평가받고 있다**.

표 1. 본 연구팀이 구축한 바 있는 채소의 주요병에 대한 *in vivo* 병리검정 기술

종류	기주	식물병	병원균
균류병	고추/파프리카	역병	<i>Phytophthora capsici</i>
	토마토	잎마름역병	<i>Phytophthora infestans</i>
	토마토	시들음병	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
	토마토	잎곰팡이병	<i>Fulvia fulva</i>
	배추/양배추/무/브로콜리	뿌리혹병	<i>Plasmodiophora brassicae</i>
	양배추/브로콜리	시들음병	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i>
	무	시들음병	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>
	수박	덩굴썩김병	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>
	멜론	덩굴썩김병	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>
	오이	덩굴썩김병	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>
	오이/멜론/호박	흰가루병	<i>Podosphaera xanthii</i>
	오이/수박	탄저병	<i>Colletotrichum orbiculare</i>
	선충	토마토/오이	뿌리혹선충
세균병	양배추	검은썩음병	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>

- 본 연구팀이 GSP 채소종자사업단의 무 품종 육종 과제에 참여하는 육종가를 대상으로 설문 조사를 실시한 결과, 무의 내병성 품종 육성을 위해 병리검정 지원을 필요로 하는 *in vivo* 병리검정 종류는 다음과 같았다(표 2). 따라서 본 과제에서는 **이들 병해에 대한 내병성 평가용 대량 검정 기술(*in vivo* 병리검정 기술)을 확립**하고자 하였다.
- 무 유전자원 및 계통들의 내병성을 신속하고 정확하게 평가하기 위한 대량 병리검정 기술 개발을 위해서는 효율적인 접종 기술뿐만 아니라 무의 주요 병원균인 시들음병균(위황병균), 뿌리혹병균, 세균점무늬병균 등을 국내외에서 다양하게 수집하여 특성을 평가하고 이를 시스템에 반영하여 병리검정의 정확도를 증진하고, 주요 병원균들의 분자생물학적 혹은 혈정학적 진단법을 개발하고, 수집한 병원균을 장기 보존할 수 있는 방법의 개발이 필요하다.
- 우리나라 종자회사는 중소기업들이 대부분을 차지하고 있는데, 병리검정 체계를 확립하여 병리검정을 지원하는 것도 필요하지만 이들이 자체적으로 용이하게 병리검정을 할 수 있도록 무의 주요 병해인 시들음병(위황병), 뿌리혹병, 무름병(연부병), 바이러스(TuMV) 병 등 대해서는 비용 절감형 현장용 저항성 판별법을 개발하여 이들 중소기업에 제공하는 것도 필요하다.

표 2. 병리검정 지원이 필요한 무(*Raphanus sativus* L.)의 식물병(요구 빈도순)

식물병	이명	이명	병원균
시들음병	Fusarium wilt	위황병	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>
검은무늬병	Alternaria spot, Black spot	흑반병	<i>Alternaria</i> spp. (<i>A. brassicae</i> , <i>A. brassicicola</i> , <i>A. japonica</i>)
뿌리혹병	Clubroot	무사마귀병	<i>Plasmodiophora brassicae</i>
노균병	Downy mildew		<i>Hyaloperonospora parasitica</i> (syn. <i>Peronospora parasitica</i>)
세균점무늬병	Bacterial leaf spot	세균흑반병	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>
무름병	Soft rot	연부병	<i>Pectobacterium carotovorum</i>
모자이크병	Mosaic	바이러스병	<i>Turnip mosaic virus</i>

제 3절 연구개발 범위

- 본 기술개발은 GSP 채소종자사업단의 수출용 무 내병성 품종을 개발하기 위한 병리검정 기술 개발과제로, 무에 발생하는 주요 식물병에 대한 병리검정 기술을 확립하여 GSP 채소종자사업단 과제에 참여하는 종자회사의 내병성 무 품종 개발을 촉진하고자 한다.
- 무의 주요 병해로는 시들음병(위황병), 뿌리혹병(무사마귀병), 무름병(연부병), 세균점무늬병(점무늬세균병, 세균흑반병), 검은무늬병(흑반병), 바이러스병(*Turnip mosaic virus*) 등이 알려져 있다. 내병성 육종을 위해서는 대량의 시료에 대하여 병 저항성을 검정할 수 있는 효율적인 *in vivo* 병리검정 체계를 구축하는 것이 필요하다.
- 무의 주요 병해에 대한 대량 검정 체계를 구축하기 위해서는 기본적으로 접종원 준비, 접종, 발병 및 병조사 방법 등을 확립할 것이다. 그리고 병리검정의 정확도를 증진시키고 안정적인 병리검정을 위해서 주요 병원균에 대한 다양한 균주를 수집하고 특성을 평가하고, 수집 병원균 균주들의 장기 보존 기술을 개발하고, 주요 병원균의 분자생물학적 및 혈청학적 진단 기술의 개발 이 필요하다. 또한 우리나라 종자회사의 대부분을 차지하는 중소종자회사를 위한 비용 절감형 현장용 저항성 검정 방법을 개발하는 것도 필요하다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절. 국외 현황

- 무 생산과 무 종자 시장은 아시아 지역이 대부분을 차지하고 있으며, 아시아 지역의 재배면적 중 80%를 중국이 차지하고 있다. 2010년 기준 약 888억 원 규모인 무 종자 시장에서 중국은 약 367억 원 규모의 시장을 형성하고 있다. 중국, 한국, 일본의 시장을 합치면 전체 시장의 85%를 차지한다(한국종자협회, Golden Seed 프로젝트 상세기획 보고서).
- 중국 종자시장은 전반적으로 고정종에서 교배종(F1 품종)으로의 전환에 따라 빠른 속도로 성장하고 있어 2021년에 약 2억 달러 규모가 될 것으로 전망되고 있다. 중국은 내추대성 백수계, 청수계 무 품종을 선호하고 있다. 봄 무 종자 시장은 외국계 회사 점유율이 높는데 특히 백수계 품종의 경우 한국업체인 대일의 ‘한백옥’, ‘초복’ 품종이 시장을 선도하고 있고 농우바이오 현지법인인 세농도 상당한 점유율을 가지고 있다. 청수계 품종에서는 일본 업체인 Tohoku사가 주도하고 있다.
- 일본의 무 종자 시장 규모는 약 152억 원으로 종자 소요량은 약 100톤 정도로 추산된다. 일본에서는 근피, 근형 등 무에 대한 원예적 특성 요구도가 높으며, 만추대성과 시들음병(위황병) 내병성이 요구된다. 최근 일본에서는 웅성불임을 이용한 품종 육성이 널리 사용되고 있으며, 주요 선도업체는 Mikado, Kyowa, 몬산토 등이다.
- 인도와 동남아 무 종자시장 규모는 78억 원으로 추정된다. 이 지역의 무 종자 시장은 대부분 고정종인 남방계와 미농조생계 무를 재배하고 있으나 점차 F1 품종과 만추대성 등 고품질 품종의 요구가 확대되고 있다. 일본 다끼이, 대만, (주)농우바이오에서 동남아용 무 종자를 수출하고 있다.
- 유럽 시장의 경우에는 주로 샐러드용인 20일 무로 F1과 고정종 모두 유럽계 회사와 일본 회사에서 개발한 품종이 재배하고 있다.

제 2절. 국내 현황

- 채소 종자의 수출은 고추, 무, 양배추, 배추가 대부분을 차지하고 있다. 무는 1990년대 초반부터 400~800만 달러 상당을 주로 일본 봄 무 시장에 수출하고 있다(한국채소종자산업발달사, 2008).
- 일반적으로 무 품종 육성은 일본이 우리보다 앞선다고 생각하고 있으나, 실제로는 만추대성, 내병성, 품질, 균일성 등이 극히 우수한 단교잡 무 품종을 육성해 우리가 일본 무 종자 시장을 크게 석권하고 있다(한국채소종자산업발달사, 2008).
- 2003년까지 무의 종자 수출액은 채소 종자 중 1위였으나 그 후 무는 종자 수출액이 다소 감소하는 정체가이고, 고추 종자는 2000년대부터 수출액이 급격히 증가하면서 2004년부터는 무 종자 수출액이 2위로 물러난 상태이다.
- 국내 무 생산량은 2005년 1,277천 톤에서 2010년에는 1,039천 톤으로 감소하였으며, 재배 면적도 크게 감소하였다. 현재 3~4개의 소규모 종자회사들이 일본 등 해외에서 수출할 무

품종을 육성 중이나, 인력과 경제력 등에서 어려움에 직면해 있는 실정이다.

○ 내병성 무 품종 개발

응성불임성과 자가불화합성을 이용한 우리나라의 무의 육종 기술은 세계 최고 수준이다. 무에 발생하는 주요 병해는 뿌리혹병, 시들음병(위황병), 무름병(연부병), 노균병, 검은무늬병(흑반병), 세균검은점무늬병(세균흑반병) 및 TuMV 등이 있는데, 다국적 기업들과 (주)농우바이오에서는 이들 병해에 대한 저항성 무 품종이 개발되어 판매되고 있다. 하지만 대부분의 종자회사에서는 이들 병해에 대한 내병성 품종을 개발하기를 희망하나 내병성 육종을 위한 병리검정 장비, 시설 및 기술이 부족하여 어려움을 겪고 있다. 따라서 이들 식물병에 대한 저항성 품종을 개발하기 위한 효율적이고 체계적인 병리검정 기술을 개발하여 지원한다면 글로벌 경쟁력이 충분히 있을 것이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절. 무의 주요 병원균에 대한 다양한 균주 수집

1. 다양한 뿌리혹병균(*Plasmodiophora brassicae*) 수집

가. 확보한 뿌리혹병균(*Plasmodiophora brassicae*) 균주

- *Plasmodiophora brassicae* 균주를 수집하기 위하여 재배포장 12곳(대전시, 충청남도 서산시와 금산군, 충청북도 괴산시, 경기도 연천군, 전라남도 해남군 그리고 강원도 강릉시, 횡성군, 정선군, 평창군 등)에서 전형적인 뿌리혹병을 나타내는 뿌리를 채집하였음(Table 1).
- 여러 기관으로부터 GMH, TH, WNSB, P2, P3, HB, 단포자1 및 단포자2 균주를 분양받았음(Table 1).
- *Plasmodiophora brassicae* 20종의 뿌리혹병 균주를 확보하였음(Table 1).
- 뿌리혹병균의 순도를 높이기 위하여 채집한 뿌리혹병 균주를 증식하여 실험에 사용하였다. 4×8 연결포트(150mL/pot, 범농사)에 원예용상토 5호(부농사)를 넣고 포트 당 ‘노랑김장배추(몬산토코리아)’를 1립씩 파종하여 온실에서 30일 재배한 후 배추 유묘 100주를 준비하였고, 각 뿌리혹병균 균주의 이병조직 1g으로부터 휴면포자를 수확하여 유묘에 5mL씩 관주 접종하였다. 접종한 유묘는 20℃ 항온향습실에서 1주일 동안 배양한 후 큰 포트에 이식하여 온실(25 ± 5℃)에서 재배하거나, 한국화학연구원 발포장에 정식하여 60일 동안 재배하여 뿌리를 수확하였다(Fig. 1). 수확한 균주는 -80℃ 초저온냉동고에 보관하였음.



Fig. 1. 뿌리혹병균 균주의 증식 모습

Table 1. 채집 및 분양을 통해 확보한 뿌리혹병균 균주 리스트

번호	균주명	채집지역	병원성
1	강릉	강원도 강릉시	+
2	강릉2	강원도 강릉시	+
3	정선	강원도 정선군	+
4	괴산	충청북도 괴산군	+
5	횡성	강원도 횡성군	+
6	연천	경기도 연천군	+
7	평창	강원도 평창군	+
8	해남1	전라남도 해남군	+
9	대전	대전광역시	+
10	금산	충청남도 금산군	+
11	서산	충청남도 서산시	+
12	해남2	전라남도 해남군	+
13	TH	분양	+
14	GMH	분양	+
15	WNSB	분양	+
16	P2	분양	+
17	P3	분양	+
18	단포자1	분양	+
19	단포자2	분양	+
20	HB	분양	+

나. 채집한 뿌리혹병균 12균주의 Williams 레이스 검정

- 수집한 뿌리혹병균 균주들의 레이스를 규명하기 위하여 Williams 판별기주, 양배추 2종 품종 ('Jersey Queen'과 'Badger Shipper')과 rutabaga 2종 품종 ('Laurentian'과 'Wilhelmsburger')을 이용하여 실험하였다.
- 5 × 8 연결포트(80mL/pot, 범농사)에 원예용상토 5호(부농사)를 넣고 Williams 판별기주 4종을 포트 당 1립씩 파종하여 온실에서 14일간 재배하였다.
- 뿌리혹병균의 접종을 위하여, -80℃ 초저온냉동고에 보관 중인 이병조직을 꺼내어 증류수로 수 차례 세척하여 이물질을 깨끗이 제거한 후 멸균수를 첨가하여 Warning blender로 마쇄하였다. 그리고 식물조직을 제거하기 위하여 4겹의 가제로 여과하여 포자현탁액을 준비하였다.
- 현탁액의 휴면포자 농도를 조정하기 위하여 멸균수로 희석하여 1.6×10^8 spore·mL⁻¹이 되도록 하였고, 광학현미경 하(300배)에서 hemocytometer를 이용하여 휴면포자의 수를 측정하였다. 식물에 포자현탁액을 포트 당 5mL씩 관주하여 접종하였으며 접종한 유묘는 20℃ 항온항습실에서 3일간 저면 관수하고 하루에 14간씩 광을 조사하면서 재배하였다.
- 접종 6주 후 뿌리를 수확하여 뿌리혹 발생정도에 따라 병을 조사하였다. 0 = 뿌리혹병 발생이 없음, 1 = 측근에 뿌리혹이 착생되어 혹의 크기가 적고 서로 독립하여 존재, 2 = 측근에

뿌리혹이 착생되며, 혹의 크기가 비교적 큼, 3 = 주근에 뿌리혹이 착생되며 서로 접합되고 혹의 크기가 매우 큼, 4 = 주근에 뿌리혹이 착생되며 서로 접합되고 혹의 크기가 매우 큼 등 5단계로 하였다.

- 평균 발병도가 1.0 이하일 때 저항성으로, 그리고 1.0 초과이면 감수성으로 판단하였고 각 균주의 4개 기주에서의 반응을 조사하여 Williams 레이스 판별기준표에 따라 레이스를 동정하였다. 모든 실험은 10반복으로 2회 수행하였다.
- Williams의 레이스 판별기주를 이용하여 포장에서 채집한 뿌리혹병균의 레이스를 동정한 결과, 뿌리혹병균들은 레이스 2, 4, 5 및 9로 확인되었다.
- 황성과 연천 균주들은 4종 기주 중 'Wilhelmsburger'에만 저항성을 나타내고 나머지 세 품종에서는 뿌리혹병이 많이 발생하여 레이스 2로 동정되었으며, 강릉, 정선, 평창 및 괴산 균주들은 양배추 두 품종에서는 저항성 반응을, rutabaga 두 품종에서는 감수성 반응을 나타내어 레이스 9로 확인되었다. 대전, 금산 및 서산 균주들은 모든 기주에 저항성을 보여 레이스 5였으며, 해남 지역에서 채집한 두 균주는 모든 기주에 병원성을 나타내는 레이스 4로 동정되었다. 우리나라에서는 레이스 2와 4가 가장 우점하는 레이스로 보고되었고, 레이스 9 또한 배추에서 많이 발견되는 레이스 중 하나로 알려져 있다. 반면에 레이스 5는 우점 레이스는 아니지만 배추, 양배추 및 순무에서 보고된 바 있다.

다. 채집한 뿌리혹병균 12균주의 배추 대조품종 반응

- 수집한 뿌리혹병균 균주들의 배추 대조 품종 4종에 대한 저항성 반응을 조사하였음
- 뿌리혹병에 대한 저항성 품종인 'CR청록'(문산토코리아), '항근중병대백채'(상홍종업) 및 '천하장군'(사카타코리아)와 일반 품종, '노랑김장배추'(문산토코리아)의 종자를 구입하였다. 5 × 8 연결포트(80mL/pot, 범농사)에 원예용상토 5호(부농사)를 넣고 포트 당 1립씩 파종하여 온실에서 10일간 재배하였다. 접종하기 직전에 -80℃ 초저온냉동고에서 균주를 꺼내어 증류수로 수 차례 세척하여 이물질을 깨끗이 제거하였음
- 멸균수를 첨가하여 Warning blender로 마쇄한 후 식물조직을 제거하기 위하여 4겹의 가제로 여과하였다. 준비한 포자현탁액은 광학현미경 하(300배)에서 hemocytometer를 이용하여 휴면포자의 수를 측정하였으며, 멸균수로 희석하여 8.0×10^7 spore·mL⁻¹이 되도록 조정하였음
- 배추 유묘에 포자현탁액을 포트 당 5mL씩 관주하여 접종하였고, 접종한 유묘는 20℃ 항온습실에서 3일간 저면 관수하고 하루에 14간씩 광을 조사하면서 7일 동안 배양한 후에 온실로 이동하여 재배하였음
- 접종 5주 후 뿌리를 수확하여 뿌리혹 발생정도에 따라 병을 조사하였음. 조사기준은 0 = 뿌리혹병 발생이 없음, 1 = 측근에 뿌리혹이 착생되어 혹의 크기가 적고 서로 독립하여 존재, 2 = 측근에 뿌리혹이 착생되며, 혹의 크기가 비교적 큼, 3 = 주근에 뿌리혹이 착생되며 서로 접합되고 혹의 크기가 매우 큼, 4 = 주근에 뿌리혹이 착생되며 서로 접합되고 혹의 크기가 매우 큼 등 5단계로 하였음
- 평균 발병도가 1.0 이하일 경우에는 저항성, 1.1 이상에서 2.0 이하는 중도저항성 그리고 2.1 이상은 감수성으로 판정하였다. 모든 실험은 10반복으로 2회 수행하였음
- 여러 지역에서 수집한 뿌리혹병균에 대한 배추 대조 품종의 저항성 정도를 조사한 결과, 실험한 뿌리혹병균들은 배추 저항성(CR) 품종에서의 반응에 따라 wild type, mutant type 1, mutant type 2 및 mutant type 3 등 네 그룹으로 나눌 수 있었음(Table 2).

Table 2. 배추 대조 품종에서의 뿌리혹병 저항성 반응에 따른 *P. brassicae* 그룹

배추 품종	Wild type	Mutant type 1	Mutant type 2	Mutant type 3
노랑김장	S ^a	S	S	S
CR청록	R	R	S	S
항근종병대백채	R	S	R	S
천하장군	R	R	R	S

- o Wild type에 속하는 강릉, 강릉2, 정선, 괴산 및 황성 균주를 배추 대조 품종에 접종한 경우에는 ‘노랑김장배추’를 제외한 나머지 저항성 세 품종에는 뿌리혹병이 발생하지 않았고, 대전과 금산 균주는 ‘노랑김장배추’와 ‘항근종병대백채’에는 감수성을, ‘CR청록’과 ‘천하장군’에는 저항성 반응을 나타내어 mutant type 1로 구분하였음.
- o Mutant type 2에 속하는 해남1, 평창 및 연천 균주는 ‘노랑김장배추’와 ‘CR청록’에는 발병도 3.9 이상의 높은 병 발생을 보이나, 그 외 두 품종의 발병도는 1.0 미만으로 저항성을 나타냈음.
- o 해남2와 서산 균주에 의해서는 모든 배추 대조 품종이 3.5 이상의 높은 발병도를 보였으며 이들을 mutant type 3으로 나누었음.
- o 이상의 결과를 요약하면 채집 및 분양을 통하여 20개 균주를 확보하였으며, 이들 균주의 특성은 Table 3과 같음.

Table 3. 확보한 뿌리혹병균 균주의 특성

번호	균주명	채집지역	Williams 레이스	배추 대조 품종에서의 저항성 반응 ^a	병원성
1	강릉	강원도 강릉시	9	S/R/R/R	+
2	강릉2	강원도 강릉시	1	S/R/R/R	+
3	정선	강원도 정선군	9	S/R/R/R	+
4	괴산	충청북도 괴산군	9	S/R/R/R	+
5	횡성	강원도 횡성군	2	S/R/R/R	+
6	연천	경기도 연천군	2	S/S/R/R	+
7	평창	강원도 평창군	9	S/S/R/R	+
8	해남1	전라남도 해남군	4	S/S/R/R	+
9	대전	대전광역시	5	S/R/S/R	+
10	금산	충청남도 금산군	5	S/R/S/R	+
11	서산	충청남도 서산시	5	S/S/S/S	+
12	해남2	전라남도 해남군	4	S/S/S/S	+
13	TH	분양			+
14	GMH	분양			+
15	WNSB	분양			+
16	P2	분양			+
17	P3	분양			+
18	단포자1	분양			+
19	단포자2	분양			+
20	HB	분양			+

^aS: 감수성, R: 저항성; 앞에서부터 ‘노랑김장배추’(몬산토코리아), ‘CR청록’(몬산토코리아), ‘항근종병대백채’(상흥중업), ‘천하장군’(사카타코리아)에서의 저항성 반응 결과.

2. 다양한 무 시들음병균(*Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*) 수집

- 무 시들음병 병징을 보이는 조직으로부터 병원균을 분리하고 형태적 및 분자생물학적으로 동정하여 13균주를 확보하였다. 그리고 농우바이오, 강릉원주대 등으로부터 6균주를 분양받아 총 19균주를 확보하였다.
- 수집한 19균주를 사용하여 무 유묘에 대한 병원성을 조사한 결과, 19균주 중 8균주는 무에 대한 병원성이 없었으며 11균주는 무에 대하여 높은 병원력을 나타냈다(Table 4).

● 식물 재배

- ① 8×16 플러그 포트(범농사, 포트 당 15ml)에 원예용상토 5호(부농사)를 넣고 청수궁중무 품종을 1립씩 파종하였다.
- ② 파종한 무는 온실로 옮겨 충분한 물을 공급하고 실험할 때까지 온실에서 통상적인 방법으

로 14일 동안 재배하였다.

- 접종원 준비

- ① 확보한 *F. oxysporum* f. sp. *raphani* 19균주를 PDA에 접종하여 25°C incubator에서 7일 동안 배양하였다.
- ② PDA에 배양한 병원균의 균총으로부터 균사조각 6개를 malt extract broth (100ml, 250ml 삼각플라스크)에 접종한 후 25°C shaking incubator(25°C, 150rpm)에서 7일 동안 배양하였다.
- ③ 배양한 시들음병원균을 4겹 가제로 걸러 균사체를 제거하고 원심분리(Rotor: JA-14, 250 ml, 95320 g, 10 min)한 후 상등액을 제거하고 침전물(포자)에 멸균수를 첨가하고 흔들어 포자현탁액을 준비하였다.
- ④ 수확한 후 광학현미경 하에서 포자현탁액의 포자 농도를 조사하고 멸균수로 희석하여 1×10^7 conidia/ml의 농도로 조정하였다.

- 접종

- ① 14일 간 재배한 식물체를 플러그 포트에 물을 흠뻑 적신 후 뿌리를 뽑은 후 물로 뿌리의 흙을 제거해 주었다.
- ② 50ml 용 비커에 식물체 뿌리를 10주 썩 놓고 뿌리가 잠기도록 포자현탁액을 40 ml 정도 넣고 30분간 침지하였다.
- ③ 30분간 침지할 동안 5×8 플러그 포트(범농사, 40-1)에 원예용상토(부농사)의 양을 일정하게 담고 접종한 브로콜리의 이식을 쉽게 하기 위하여 물을 흠뻑 토양에 적셔주었다
- ④ 침지한 유묘의 뿌리가 꺾이지 않도록 주의하여 심어주고, 높이를 일정하게 맞춰 토양을 덮어준 후 온실용 스프레이 호스를 이용하여 충분히 물을 적셔주었다.

- 접종 후 관리

- ① 이식한 유묘는 일정한 토양온도를 맞추기 위하여 dew chamber(25°C)에 24시간 동안 습실 처리하였다.
- ② 접종 1일 후에 dew chamber(25°C)로부터 식물체를 꺼내어 1일전부터 맞춰진 25°C 항온항 습실(12h:12h)에서 재배하였다.
- ③ dew chamber에서 꺼낸 당일은 식물이 적응 할 수 있도록 항온항습실의 전등을 모두 꺼주고 충분히 물을 주었다.

- 병조사

- ① 접종 3주 후에 병조사를 실시하였다.

0=건진,

1=지하부는 갈변되나 지상부는 병징이 없는 것,

2=지하부는 갈변되고 지상부는 약간 생육이 억제되는 것,

3=지하부는 갈변되고 지상부는 생육이 억제되며 약간 황화된 것,

4=지하부는 갈변되고 지하부와 지상부 모두 생육이 억제되며 심하게 황화된 것,

5=고사

평균 발병도가 1.5 이상이면 병원성(+)으로 그리고 1.5 미만이면 감수성(-)으로 판정하였다.

Table 4. 확보한 무 시들음병균 리스트

번호	균주명	병원성	비고
1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i> 57	+	한국화학연구원
2	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i> 58	+	한국화학연구원
3	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i> 59	+	한국화학연구원
4	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i> 60	+	한국화학연구원
5	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i> 61	-	한국화학연구원
6	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i> 147	+	한국화학연구원
7	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i> 151	+	한국화학연구원
8	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i> 216	-	한국화학연구원
9	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i> 217	-	한국화학연구원
10	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i> 218	-	한국화학연구원
11	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i> 219	-	한국화학연구원
12	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i> 220①	-	한국화학연구원
13	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i> KR1	+	한국화학연구원
14	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i> 220②	-	강릉원주대 분양
15	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i> 220③	-	강릉원주대 분양
16	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i> DN-2	+	강릉원주대 분양
17	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i> NW1	+	농우바이오 분양
18	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i> HN	+	충남대 분양
19	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i> JHW	+	충남대 분양

제 2절. 무의 주요 병원균에 대한 저항성 특성 평가

1. 다양한 뿌리혹병균(*Plasmodiophora brassicae*)의 특성 평가

가. 서론

무(*Raphanus sativus* L.)는 배추과 작물에 속하며, 고추 및 배추와 함께 우리나라의 3대 채소로 식생활에 중요한 채소이다. 2014년 기준 국내 채소종자의 시장규모는 약 2,500억 원이며, 그 중 무 시장규모는 약 430억 원(17%)으로 고추 440억 원(17%)에 이어 두 번째로 높은 규모로 시장이 형성되어 있다. 그러나 농업에서 중요한 위치를 차지하는 작물임에도 불구하고 다른 배추과 작물인 배추, 양배추, 유채 등에 비해 유전학적, 분자생물학적인 연구 등이 부족한 편이다.

전 세계적으로 많은 무 병이 알려져 있으며, 무름병, 모자이크병, 시들음병, 잘록병 및 뿌리혹병 등이 있다. 특히 *Plasmodiophora brassicae* Woron.에 의한 뿌리혹병은 무뿐만 아니라 양배추, 브로콜리, 배추 등의 작물의 생산량에 영향을 미쳐 경제적으로 심각한 손실을 일으킨다.

이 병원균은 휴면포자로 토양에 존재하며, 환경이 적합하면 수 년 동안 생존이 가능하여 한번 뿌리혹병이 발생한 재배포장에서는 병원균이 오랫동안 남아 있으므로 배추과 작물을 재배하기에 적합하지 않다. 기주가 뿌리혹병균 균주에 감염되면 한낮의 무더운 시간에는 시들음 증상을 보이다가 밤에는 회복되기를 반복한다. 또한 무의 생육 초기에는 뿌리가 기형으로 되고 지상부의 생육도 좋지 못하며, 생육 중기 이후에는 흑 모양의 이상 비대 증상이 나타나며 흑 부위의 표면에는 거친 돌기 모양이 많이 형성되거나 균열이 생기기도 한다. 그리고 생육 후기에는 균열 부위로 다른 병원균이 침입하여 뿌리가 썩기도 한다.

뿌리혹병을 방제하기 위하여 이병 식물의 제거, 배추과 작물 이외의 작물과의 윤작 및 저항성 품종 재배 등의 경종적 방제 방법, 화학 살균제를 이용한 화학적 방제 및 길항미생물 등을 이용한 생물학적 방제 등의 연구가 이루어졌다.

최근에는 친환경 농업에 대한 높은 관심으로 화학 농약을 사용하지 않고, 뿌리혹병을 방제할 수 있는 저항성 품종 등에 큰 기대를 모으고 있다. 정부에서도 Golden Seed Project를 통하여 생명공학기술개발, 우수한 품종 육성 및 종자 생산 등에 많은 지원을 하고 있으며, 배추, 양배추 및 무 등의 뿌리혹병 저항성(Clubroot resistance, CR) 품종을 개발하기 위한 연구도 활발히 진행되고 있다.

*P. brassicae*는 배추과 작물에서 다양한 생리적 분화를 보여서, 일본에서는 배추 저항성 품종 육성을 활발히 진행하였으나 병원균의 분화로 대부분의 병 저항성 품종에서 저항성이 무너지는 일이 발생하였다. 따라서 뿌리혹병에 대한 새로운 저항성 유전자원 선발 및 저항성 품종의 육성이 요구되고 있다.

본 연구에서는 우리나라 배추과 작물 재배 포장에서 채집한 다양한 뿌리혹병균을 사용하여, 이 균주들에 대한 시판 중인 무 품종 22종의 뿌리혹병 저항성을 조사하였다.

나. 재료 및 방법

1) 뿌리혹병균(*Plasmodiophora brassicae*) 균주

P. brassicae 균주를 수집하기 위하여 2009년부터 2014년까지 대전시, 충청남도 서산시와 금산군, 충청북도 괴산시, 전라남도 해남군, 경기도 연천군 그리고 강원도 강릉시, 횡성군, 정선

군, 평창군 등에서 전형적인 뿌리혹병을 나타내는 뿌리를 채집하였고(Table 1), 이들 중 대전, 강릉, 정선, 횡성, 연천, 평창, 해남 및 서산 지역 균주들은 증식하여 사용하였다.

4 × 8 연결포트(150mL/pot, 범농사)에 원예용상토 5호(부농사)를 넣고 일반 배추 품종 ‘노랑김장(문산토코리아)’을 포트 당 1립씩 파종하여 온실에서 30일간 재배한 후 배추 유묘 100주를 준비하였고, 각 뿌리혹병균 균주의 이병조직 1g으로부터 휴면포자를 수확하여 유묘에 5mL씩 관주하여 접종하였다. 접종한 유묘는 20℃ 항온항습실에서 1주일 동안 배양한 후 큰 포트에 이식하여 온실(25 ± 5℃)에서 60일 동안 재배하였고, 수확한 뿌리는 -80℃ 초저온냉동고에 보관하였다. 확보한 뿌리혹병균 12개 균주는 무 시판 품종들의 뿌리혹병 저항성 반응 실험에 사용하였다.

Table 1. 본 연구에 사용된 뿌리혹병균 12종

번호	균주명	채집 지역
1	대전	대전광역시
2	강릉1	강원도 강릉시
3	강릉2	강원도 강릉시
4	괴산	충청북도 괴산군
5	해남1	전라남도 해남군
6	해남2	전라남도 해남군
7	횡성	강원도 횡성군
8	정선	강원도 정선군
9	금산	충청남도 금산군
10	평창	강원도 평창군
11	서산	충청남도 서산시
12	연천	경기도 연천군

2) 무 재배

시판 중인 무 품종 22개(‘금봉’, ‘슈퍼모델’, ‘강추’, ‘동하’, ‘아우리월동’, ‘관동여름’, ‘강성’, ‘탐스런’, ‘장형봄’, ‘초롱’, ‘여름춘향이열무’, ‘새롬’, ‘백옥’, ‘슈퍼길조’, ‘명산’, ‘태청’, ‘청운플러스’, ‘빛고은열무’, ‘하우스청옥’, ‘전무후무’, ‘비바리월동’, ‘길조’)를 구입하여 실험에 사용하였다. 그리고 뿌리혹병 발생 정도를 확인하기 위한 대조 품종으로 배추인 ‘노랑김장’을 함께 실험하였다.

5 × 8 연결포트(80mL/pot, 범농사)에 원예용상토 5호(부농사)를 넣고 각 품종의 종자를 포트 당 1립씩 파종하여 온실(25 ± 5℃)에서 10일간 재배한 후 실험에 이용하였다.

3) 접종원 준비

뿌리혹병균 접종원을 준비하기 위해서 -80°C 초저온냉동고에 보관 중인 뿌리혹병균 균주를 꺼내어 증류수로 깨끗하게 씻어서 뿌리 표면에 붙은 이물질을 제거하였다. 이를 Waring blender에 넣고 멸균수를 첨가하여 마쇄하고, 4겹의 가제로 여과하여 식물 조직을 제거한 포자 현탁액을 만들었다. 광학현미경 하(300배)에서 hemocytometer를 이용하여 휴면포자의 농도를 $2.8 \times 10^8 - 1.2 \times 10^9$ spore/pot으로 조정하였다.

4) 접종 및 병조사

온실에서 재배한 무 유묘에 준비한 포자현탁액을 포트 당 5mL씩 토양 관주하여 접종하였다. 뿌리혹병 발생을 위하여 접종한 유묘를 20°C 항온항습실로 옮긴 후 하루에 14시간씩 광을 조사하면서 7일 동안 배양한 후에 온실로 이동하여 재배하였다.

접종 7주 후 무에 뿌리혹병이 충분히 발생하면 식물체의 뿌리를 뽑아서 흙을 털어내어 수돗물로 깨끗이 씻은 뒤 발병 정도를 조사하였다. 뿌리혹병 발생 정도를 조사하기 위한 대조구인 배추 유묘도 동일한 방법으로 접종하고 관리하였다.

병 조사기준은 0 = 뿌리혹병 발생이 없음, 1 = 주근에 뿌리혹이 착생되었으며 혹은 비대 정도가 적고 서로 독립하여 존재, 2 = 비대 정도가 큰 뿌리혹이 주근에 착생, 3 = 주근이 가늘고 주근과 세근에 작은 혹이 착생, 4 = 주근이 심하게 가늘고 주근과 세근에 큰 혹이 존재 등의 5단계로 하였다. 평균 발병도가 평균 발병도가 1.0 이하일 경우에는 저항성, 1.1 이상에서 2.0 이하는 중도저항성 그리고 2.1 이상은 감수성으로 판정하였다.

다. 결과 및 고찰

국내 여러 지역에서 수집한 뿌리혹병균 12종에 대한 무 시판 품종 14종의 뿌리혹병 저항성 정도를 조사한 결과, 일반 품종인 ‘금봉’과 ‘초롱’은 실험한 모든 균주에 대하여 감수성 반응을 보였는데, 특히 ‘금봉’은 높은 뿌리혹병 발생을 보여서 감수성 대조로 선발하였다. 반면, 무 CR 품종으로 시중에 판매되는 8품종 ‘슈퍼길조’, ‘명산’, ‘태청’, ‘청운플러스’, ‘빛고은열무’, ‘전무후무’, ‘비바리월동’ 및 ‘길조’는 12균주에 대하여 고도의 저항성 반응을 보였고, 마찬가지로 ‘백옥’과 ‘하우스청옥’은 종자회사에서 뿌리혹병 저항성 품종으로 공시하지 않았으나 모든 균주에 대하여 저항성 반응을 나타내었다.

이와 달리 ‘새롬’과 ‘여름춘향이열무’는 뿌리혹병균 균주 간 저항성 차이를 보였는데, ‘새롬’은 해남1, 연천, 서산, 해남2, 강릉1, 강릉2 및 대전 균주에는 저항성 반응을 보인 반면, 정선, 평창, 괴산, 금산 및 횡성 균주에는 감수성을 나타내었다. 해남1, 연천, 서산 및 해남2 균주를 ‘여름춘향이열무’에 접종한 경우에는 발병도 1.0 이하이었으므로 이들 균주에는 저항성임을 알 수 있었고, 그 외 8균주에 대해서는 저항성이 무너지는 것을 알 수 있었다.

뿌리혹병균 12종은 ‘새롬’과 ‘여름춘향이열무’의 저항성 반응에 따라 3개 그룹, 즉 ‘새롬’과 ‘여름춘향이열무’에 저항성인 그룹 1(해남1, 연천, 서산, 해남2), ‘새롬’에만 저항성을 나타내는 그룹 2(강릉1, 강릉2, 대전), 두 품종 모두 감수성을 보이는 그룹 3(정선, 평창, 괴산, 금산, 횡성)으로 나눌 수 있었다(Table 2).

따라서 단인자 우성 유전을 하는 것으로 알려진 배추 CR 품종과는 달리, 무 CR 품종의 경우에는 장기간 재배했음에도 불구하고 저항성이 무너지지 않고, 병원균 변이가 발생하지 않아서 양적저항성(QTL)인 것으로 생각되었다.

다른 무 품종들에서도 유사한 반응이 나타나는지 확인하기 위하여 무 품종 8종을 추가로 실험하였다. 뿌리혹병 발생 정도를 확인하기 위한 배추 대조 품종인 ‘노랑김장’과 무 뿌리혹병 감수성 대조로 선발한 ‘금봉’은 모든 군주에 대해 감수성이었으나, 종자회사에서 CR 품종으로 판매하는 ‘아우리월동’의 경우에는 앞서 실험한 다른 CR 품종과 달리 7개 군주(연천, 강릉1, 대전, 정선, 평창, 괴산, 횡성)에서는 저항성을, 4개 군주(해남1, 해남2, 강릉2, 금산)에서는 중도저항성을, 서산 군주에서는 감수성 반응을 나타내었다. 또한 추가 실험한 무 9개 품종들에서는 일정한 저항성 반응 패턴이 나타나지 않아서 그룹으로 나눌 수 없었다(Table 3). 군주 및 품종별 평균 발병도를 정리해보았으나 일관된 결과를 확인하기 어려워 QTL로 보기도 어려웠다.

따라서 본 연구의 결과를 종합해보면 무 CR 품종 육종에는 다양한 유전자원이 도입되어 사용되고 있는 것 같았다.

Table 2. 뿌리혹병균 12종에 따른 무의 저항성

품종	특성	해남1	연천	서산	해남2	강릉1	강릉2	대전	정선	평창	괴산	금산	횡성
금봉		4.0 ^z	4.0	3.9	2.7	4.0	3.6	4.0	3.9	3.4	4.0	4.0	3.3
초롱		4.0	4.0	3.6	2.5	3.0	3.6	2.3	2.7	2.7	3.7	3.9	3.3
여름춘향이열무		0.2	0.0	1.0	0.4	4.0	3.9	2.3	3.8	4.0	4.0	4.0	3.4
새롬		0.3	1.7	1.3	1.2	2.0	1.9	0.8	2.2	2.7	4.0	3.1	3.4
백옥		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
슈퍼길조	R ^y	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0
명산	R	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
태청	R	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
청운플러스	R	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
빛고은열무	R	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
하우스청옥		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
전무후무	R	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
비바리월동	R	0.6	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0
길조	R	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0

^z발병도.

^y종자회사에서 공시한 CR 품종.

Table 3. 뿌리혹병균 12종에 따른 무의 저항성

품종	특성	연천	강릉1	해남1	서산	강릉2	금산	괴산	평창	해남2	정선	대전	횡성	평균 발병도
금봉		4.0 ^z	4.0	4.0	3.9	3.7	3.9	3.9	2.6	3.7	3.6	4.0	3.4	3.73
슈퍼모델		2.4	3.5	1.4	1.6	2.7	2.9	2.8	1.9	1.2	2.0	0.3	1.8	2.04
강추		2.5	1.8	2.2	1.2	1.2	0.4	0.7	1.1	0.8	0.1	0.1	0.0	1.01
동하		2.1	1.5	1.6	2.4	0.8	1.6	0.4	0.8	0.2	0.0	0.2	0.1	0.98
아우리월동	R ^y	1.7	0.5	1.5	2.2	0.6	1.9	0.8	0.8	0.3	0.3	1.2	0.0	0.98
관동여름		2.6	1.2	2.2	1.5	1.2	0.1	0.7	0.9	0.5	0.2	0.0	0.0	0.93
강성		2.6	1.8	1.8	0.4	1.1	0.8	0.6	0.8	0.6	0.3	0.4	0.0	0.93
탐스런		1.5	2.0	2.1	1.1	1.7	0.3	0.8	0.6	0.2	0.5	0.1	0.0	0.91
장형봄		2.2	2.3	0.3	0.6	0.9	1.6	0.4	1.3	0.1	0.0	0.0	0.0	0.81
평균발병도		2.40	2.07	1.90	1.66	1.54	1.50	1.23	1.20	0.84	0.78	0.70	0.59	1.37
노랑김장		3.9	3.9	3.8	3.9	3.9	3.8	3.6	3.7	3.9	3.7	3.8	3.3	3.77

^z발병도.

^y종자회사에서 공시한 CR 품종.

제 3절. 수집균주들의 표준 보존 기술 개발

3. 균주 보존 기술 개발: 뿌리혹병균(*P. brassicae*)의 보존 기술 개발

가. 서론

배추과 작물인 무, 양배추, 배추, 브로콜리 등의 뿌리혹병은 뿌리혹병균(*Plasmodiophora brassicae* Woron.)에 의해 발생하는 토양전염병이다. 과거에는 *P. brassicae*는 곰팡이로 분류되었으나, 분자생물학 및 생리생화학 등의 기술이 발달하면서 *P. brassicae*가 곰팡이와 유연관계가 적다는 것이 밝혀졌고, 현재는 Plasmodiophoraceae 과, Plasmodiophoromycetes 강, Plasmodiophoromycota 문, Protozoa 계에 속하는 유사균류(Pseudo fungi)로 재분류하게 되었다.

*P. brassicae*는 휴면포자로 토양에 존재하고 환경이 적합하면 수 년 동안 생존이 가능하다. 그래서 뿌리혹병이 발생한 재배포장에서는 병원균이 오랫동안 남아 있으므로 배추과 작물을 재배하기에 적합하지 않다. 이 병원균에 감염된 식물체를 뽑아서 뿌리를 살펴보면 잔뿌리가 없어지고 주근에 혹이 생성되어 수분과 양분의 흡수가 억제되어 생육이 저해되며 시드는 증상이 반복되다가 고사한다. 뿌리혹병을 방제하기 위하여 토양의 pH 조절 및 배추과 작물 이외 작물과의 윤작 등의 경종적 방제, 합성 살균제를 이용한 화학적 방제, 길항미생물을 이용한 생물학적 방제 및 친환경 농업에서도 사용 가능한 뿌리혹병 저항성 품종 개발 등의 다양한 연구가 있었다.

이러한 연구를 지속적으로 하기 위해서는 필요할 때 균주를 쉽게 사용할 수 있는 균주의 보존 기술이 중요하다. 하지만 *P. brassicae*는 절대기생균(obligate parasite)으로 인공 배양을 할 수 없고, 이러한 균주를 보존하고자 하면 어떤 방법으로 해야 하는지에 대한 정보를 구하기가 쉽지 않다.

일반적으로 미생물을 보존할 때 균주 내 수분을 조절하여 이들이 관여하는 생체대사를 조절하기 위한 환경을 만들어 주는데, 균주가 장기간 생존이 가능해야 하고 보존 중에는 변이나 사멸 등이 없어야 한다. 그리고 곰팡이 보존은 세균과 달리 까다롭고, 분류군에 따른 보존 방법이 다르며, 같은 종 내에서도 균주 간에 보존 방법이 서로 다를 수 있다고 알려져 있다. 이러한 균류를 보존하는 방법에는 계대배양보존법, 물보존법, 광유보존법, 저온냉동고보존법, 동결건조보존법, 액체질소보존법 등이 있다. 이 중 계대배양보존법, 물보존법, 광유보존법, 저온냉동고보존법 등은 복잡한 시설이나 특수 장비를 필요로 하지 않기 때문에 대학, 연구소 등의 실험실에서 적은 경비로 간편하게 활용할 수 있는 보존법이다.

본 연구에서는 다양한 온도에서 뿌리혹병균의 생존 여부를 확인하기 위해서 각 온도에서 1개월에서 11개월 동안 보존한 뿌리혹병균 균주를 일반 배추 품종, ‘노랑김장배추’에 접종하여 각 균주들의 병원성을 조사하였다. 12개월 이상 기간의 균주 보존성 확인은 차년도에 실시할 예정이다.

나. 재료 및 방법

가) 뿌리혹병균 균주

강원도 강릉시 배추 포장에서 전형적인 뿌리혹병을 나타내는 뿌리를 채집하였고, 이를 증식하여 실험에 사용하였다.

‘노랑김장’(몬산토코리아)을 4 × 8 연결포트(150mL/pot, 범농사)에 원예용상토 5호(부농사)를 넣고 포트 당 1립씩 파종하여 온실에서 30일간 재배한 후 배추 유묘 100주를 준비하였고, 뿌리혹병균 균주의 이병조직 1g으로부터 휴면포자를 수확하여 유묘에 5mL씩 관주하여 접종하였다. 접종한 유묘는 20℃ 항온항습실에서 1주일 동안 배양한 후 온실(25 ± 5℃)로 이동하

었다. 온실에서 7일간 재배 후, 한국화학연구원 포장에 이식하여 70일 동안 재배하였다.

수확한 뿌리 중 흑이 일정한 크기로 발생한 뿌리혹을 택하여 비닐봉지에 나누어 담고 겉면에 각각의 보존 온도와 보존 개월 등의 정보를 기입한 후, 4℃, -20℃(냉장고의 냉동실과 -20℃ 냉동고) 및 -80℃ 초저온냉동고에 보관하였다. 4℃와 -20℃에 보관한 뿌리혹병균 균주들은 각 온도에서 보존 후 1개월부터 11개월까지 매 달 같은 날짜에 균주를 한 봉지씩 꺼내어 -80℃ 초저온냉동고에 보관하여 균주의 대사를 정지시켰다. 11개월 동안 4℃와 -20℃에 보존하여 준비한 뿌리혹병균 균주들은 뿌리혹병 병원성 반응 실험에 사용하였다. 뿌리혹병 발생 정도를 확인하기 위한 대조 균주로 -80℃에서 11개월 동안 보존한 균주를 함께 실험하였다.

나) 뿌리혹병균 병원성 검정

뿌리혹병균 병원성 검정을 하기 위해서 배추 품종 ‘노랑김장’을 구입하여 사용하였다. 5 × 8 연결포트(80mL/pot, 범농사)에 원예용상토 5호(부농사)를 넣고 종자를 포트 당 1립씩 파종하여 온실(25 ± 5℃)에서 10일간 재배한 후 실험에 이용하였다.

뿌리혹병균 접종원을 준비하기 위해서 -80℃ 초저온냉동고에 보관 중인 뿌리혹병균 균주를 꺼내어 증류수로 깨끗하게 씻어서 뿌리 표면에 붙은 이물질을 제거하였다. 뿌리혹병균 균주는 포트 당 0.125g씩 준비하였고, 이를 Waring blender에 넣고 멸균수를 첨가하여 마쇄하고, 4 겹의 가제로 여과하여 식물 조직을 제거한 후에 광학현미경 하(300배)에서 hemocytometer를 이용하여 휴면포자의 수를 조사하였다.

온실에서 재배한 배추 유묘에 준비한 포자현탁액을 포트 당 5mL씩 토양 관주하여 접종하였다. 뿌리혹병 발생을 위하여 접종한 유묘를 20℃ 항온항습실로 옮긴 후 하루에 14시간씩 광을 조사하면서 7일 동안 배양한 후에 온실로 이동하여 재배하였다. 접종 5주 후 배추에 뿌리혹병이 충분히 발생하면 식물체의 뿌리를 뽑아서 흙을 털어내어 수돗물로 깨끗이 씻은 뒤 발병 정도를 조사하였다.

병 조사 기준은 0 = 뿌리혹병 발생이 없음, 1 = 주근에 뿌리혹이 착생되었으며 흑은 비대정도가 적고 서로 독립하여 존재, 2 = 비대정도가 큰 뿌리혹이 주근에 착생, 3 = 주근이 가늘고 주근과 세근에 작은 흑이 착생, 4 = 주근이 심하게 가늘고 주근과 세근에 큰 흑이 존재 등의 5단계로 하였다.

다. 결과 및 고찰

4℃, -20±3℃(냉장고 냉동실), -20℃에서 저장 기간에 따른 뿌리혹병균의 생존 여부를 조사하기 위해서 1개월에서 11개월 동안 저장한 뿌리혹의 뿌리혹병균 포자수와 수확한 뿌리혹병균을 배추에 접종하여 뿌리혹병 발생 정도를 비교하였다.

4℃, -20±3℃(냉장고 냉동실), -20℃에서 저장한 뿌리혹 0.125g 당 뿌리혹병균 포자의 수는 Table 1과 같았으며, 모든 저장 조건에서 큰 차이 없이 $8.8 \times 10^7 \sim 1.5 \times 10^9$ 개, 평균 1.6×10^8 개의 뿌리혹병균 포자를 얻을 수 있었다. 대조구인 -80℃ 초저온냉동고에서 11개월 동안 저장한 처리구는 0.125g 당 뿌리혹병균 1.1×10^8 개를 수확하였다. 따라서 실험한 모든 조건에서 차이가 뿌리혹병균 포자를 수확할 수 있다고 생각되었다. 하지만 4℃에서 보존 3개월 후부터 혹은 주변에 부생균들이 생기기 시작하고, 11개월 후에는 손으로 만지면 쉽게 부서질 정도로 혹은 조직이 연해지고, 악취가 심하였다.

Table 1. 저장 온도 및 기간에 따른 뿌리혹병균 포자 수확량

보존 기간 (개월)	포자 수 (spores/0.125g)			
	4℃	-20±3℃ (냉장고냉동실)	-20℃	-80℃
1	1.6×10^8	1.2×10^8	1.3×10^8	
2	1.7×10^8	1.3×10^8	1.2×10^8	
3	2.2×10^8	1.5×10^8	1.1×10^8	
4	1.3×10^8	1.7×10^8	1.0×10^8	
5	1.5×10^8	1.5×10^8	1.1×10^8	
6	2.7×10^8	1.7×10^8	1.3×10^8	
7	5.1×10^8	1.5×10^8	1.0×10^8	
8	1.5×10^9	1.7×10^8	1.4×10^8	
9	1.9×10^8	1.6×10^8	1.5×10^8	
10	2.0×10^8	1.5×10^8	8.8×10^7	
11	3.1×10^8	1.8×10^8	1.9×10^8	
12	1.5×10^8	1.6×10^8	1.1×10^8	1.1×10^8
13			2.7×10^8	
14			2.5×10^8	
15			2.5×10^8	
16			2.2×10^8	
17			1.5×10^8	
18			2.3×10^8	
19			1.8×10^8	
20			1.7×10^8	
21			1.9×10^8	2.2×10^8

4℃, -20±3℃(냉장고 냉동실), -20℃에서 저장 기간에 따른 뿌리혹병균 생존 유무를 조사하기 위하여 무보다 감수성이 뛰어난 배추를 사용하여 뿌리혹병 발생을 조사한 결과, 4℃에서 뿌리혹병균을 저장하였을 때에는 1개월에서 12개월의 저장 기간에 상관없이 3.4 이상의 높은 발병도를 보였다(Fig. 4, Table 2). 그리고 -20℃는 냉장고 냉동실 조건(-20±3℃)과 -20℃ 냉동고를 사용하여 실험하였다. 실험에 사용된 냉장고의 냉동실의 온도는 -20℃로 설정되어 있으나 문을 여닫는 빈도가 잦아서 실제 설정 온도보다 온도 변화 폭이 큰 것이 일반적이다. 하지만 두 조건 모두 높은 뿌리혹병 발생을 보여서 12개월까지는 모두 3.5 이상의 높은 발병도를 보여 두 조건에서는 큰 차이 없이 균주의 병원성이 잘 유지되고 있는 것으로 생각되었다(Table 2). 그리고 -20℃에서는 4℃에서 뿌리혹병균을 저장하였을 때와 달리 다른 부생균들의 오염 없이 깨끗하게 보존되었다. 한편 냉장고 냉동실에서 21개월까지 저장하고 보존력을 조사한 결과, 3.6 이상의 높은 발병도를 보여 냉장고 냉동실에서도 21개월까지 저장이 가능함을 알 수 있었다. 대조구인 -80℃ deep freezer 21개월 저장한 균주는 평균 발병도 4.0을 보였다.

Table 2. 온도 별 저장 기간에 따른 뿌리혹병균의 뿌리혹병 발생

보존 기간 (개월)	저장 온도		
	4℃	-20±3℃ (냉장고 냉동실)	-20℃
1	4.0 ± 0.0 ^a	4.0 ± 0.0	3.8 ± 0.3
2	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0
3	4.0 ± 0.0	3.7 ± 0.4	4.0 ± 0.0
4	3.8 ± 0.3	4.0 ± 0.1	4.0 ± 0.0
5	4.0 ± 0.0	3.5 ± 0.7	4.0 ± 0.0
6	4.0 ± 0.0	3.8 ± 0.3	4.0 ± 0.0
7	4.0 ± 0.0	3.7 ± 0.4	4.0 ± 0.0
8	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0
9	3.4 ± 0.7	3.8 ± 0.3	4.0 ± 0.0
10	4.0 ± 0.0	3.9 ± 0.1	4.0 ± 0.1
11	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	3.9 ± 0.1
12	3.8 ± 0.3	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.1
13		4.0 ± 0.0	
14		4.0 ± 0.0	
15		3.6 ± 0.5	
16		3.9 ± 0.1	
17		4.0 ± 0.0	
18		4.0 ± 0.0	
19		4.0 ± 0.0	
20		4.0 ± 0.0	
21		4.0 ± 0.0	

^a발병도



Fig. 4. 보존 기간에 따른 뿌리혹병균 균주의 배추 뿌리혹병 발생. 1-11: 4℃에서 1-11개월 보존한 뿌리혹병균 균주. control: -80℃에서 11개월 보존한 뿌리혹병균 균주.

제 4절. 수집한 식물병원균에 대한 진단 방법 개발

1. 시들음병균(*Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*)의 분자생물학적 진단 방법 확립

가. 서론

Fusarium 속 균은 전 세계적으로 많은 종의 식물에 심각한 병을 일으키는 병원균으로, 병을 일으키는 기주에 따라 120개 이상의 f. sp.로 구성되어 있다(Agrios, 2005). 무 시들음병은 토양 전염성 병해이며, 시들음병을 일으키는 병원균은 *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*로 토양 내에서 후막포자를 형성하여 기주식물 없이도 수년간 휴면상태로 존재하는 것이 가능하다. 이 후, 환경이 좋아지면 후막포자는 발아하여 기주 식물의 뿌리를 침입하여 시들음병을 일으킨다(Van Peeret et al., 1988).

무에 발생하는 주요 병해인 시들음병에 감염되면 식물의 하위 잎이 황갈색으로 되며 식물체가 시들고, 뿌리의 도관부는 흑갈색으로 변하여 심하면 식물 전체가 고사하게 된다(Kendric and Snyder, 1936; Peterson and Pound, 1960). 무 시들음병은 1934년 미국 캘리포니아 San Benito에 있는 White Chinese Winter Radish 채종포에서 처음 보고되었으며, 1946년 위스콘신 Waukesha의 무 포장에서 시들음병의 발생이 보고된 후 현재는 미국 각지에서 발생하고 있다(Pound, 1959; Pound and Fowler, 1953). 우리나라에서는 1981년 청원군 미농 재배단지에서 처음 발견되었으며, 계속된 연작으로 인하여 시들음병 발생이 점차 증가하고 있다(Moon et al., 2001; Nam, 1994).

무 시들음병의 신속한 방제를 위해서는 무 시들음병을 일으키는 병원균을 신속 정밀하게 진단하는 기술을 개발하여 효과적인 병 방제 대책 수립을 위한 병 발생 예찰에 이용하는 것이 중요하다. 식물 내에는 비병원성 *F. oxysporum*이 공생하고 있는 것이 많은 연구자에 의해 보고되었다. 따라서 비병원성 *F. oxysporum* 균주가 아닌 무에 병원성이 있는 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*를 특이적으로 진단하는 것이 필요하다.

최근 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SCAR (sequence characterized amplified region) marker, IGS (intergenic spacer of the nuclear ribosomal DNA), ITS (internal spacer of the nuclear ribosomal DNA) 그리고 특정 유전자 등의 다양한 특성을 갖는 DNA 염기서열들의 분석으로부터 얻어진 종 특이적 molecular marker와 이를 이용한 PCR (polymerase chain reaction) 분석기법이 *Fusarium* 속 병원균들의 종 동정 및 병 진단에 있어서 매우 광범위하게 활용되어지고 있다(Baayen et al., 1997; Kawabe et al., 2005; Li et al., 1994; Migheli et al., 1998; Waalwijk et al., 1996). 하지만 무 시들음병병원균인 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*를 특이적으로 진단하는 프라이머(primer)는 보고된 바 없다.

본 연구에서는 무 시들음병 진단 및 병원균 동정에 활용하기 위해 *F. oxysporum* f. sp. *raphani* 종 특이적 molecular marker를 개발하고자 연구하였다. *F. oxysporum* f. sp. *raphani*와 유전적으로 매우 유사한 *Fusarium*속내 다른 종들과의 genome 유전자 내부의 염기서열을 비교 분석하여 *F. oxysporum* f. sp. *raphani* 종 특이적 primer를 개발하였고 이를 PCR 기법을 이용하여 특이성을 확인하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 사용 균주 및 genomic DNA 분리

무를 포함한 다양한 기주 식물에서 분리한 *F. oxysporum* 균주들을 본 연구에 사용하였

다(Table 1). *F. oxysporum* f. sp. *melonis* 균주는 15개, *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* 균주는 3개, *F. oxysporum* f. sp. *niveum* 균주는 4개, *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* 균주는 1개, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 균주는 1개 그리고 *F. oxysporum* f. sp. *raphani* 균주는 16개로 총 40개 *F. oxysporum* 균주를 실험에 사용하였다.

이들 40개 균주들의 genomic DNA를 분리하기 위하여, 각 균주를 PDA 배지에 접종하고 25°C에서 7일간 배양한 균사체를 멸균된 물(20 ml)과 함께 균사를 긁어내어 effendorf 튜브에 넣고 -70°C에서 동결시켰다. 동결된 균사체를 glass bead를 이용해 마쇄한 다음 400 μ l의 extraction buffer[200 mM Tris-HCl(pH 8.0), 200 mM NaCl, 30 mM EDTA, 0.5% SDS]와 proteinase K(50 μ g)를 첨가하여 37°C에서 1시간 처리하였다. 다음은 400 μ l의 2 \times CTAB solution[2% CTAB(w/v), 100 mM Tris HCl(pH8.0), 20 mM EDTA(pH 8.0), 1.4 M NaCl, 1% PVP(polyvinylpyrrolidone)]을 첨가하여 잘 섞어 준 후 600 μ l의 chloroform: isoamylalcohol (24 : 1)로 추출하고 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 1.5 ml tube에 넣었다. 상등액에 0.7 배량의 isopropanol을 첨가하고 실온에서 10분간 방치한 후 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 하였다. 침강된 DNA는 70% ethanol을 이용해 같은 방법으로 세척하였다. 튜브 내의 ethanol을 제거, 건조시킨 후 DNA를 50 μ l의 TE buffer에 녹인 다음 2 μ l(10 mg/ml)의 RNase를 첨가하여 RNA를 제거 한 후 agarose gel에 전기영동하여 DNA를 확인 및 정량하였다.

(2) *F. oxysporum* f. sp. *raphani* 특이적 primer 선발

GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 공개된 *F. oxysporum* f. sp. *raphani* 및 다양한 *F. oxysporum* 속들의 genome 염기서열들을 Fusarium Comparative Database (<http://www.broadinstitute.org>) 프로그램을 이용해 비교 분석하여 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*의 specific primer set와 *F. oxysporum*을 공통적으로 증폭할 수 있는 universal primer set를 설계하였다.

GenBank에 공개된 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*의 genome 염기서열 정보는 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *radicis-lycopersici*, *cubense*, *pisi*, *vasinfectum*, *melonis*, *conglutinans*의 genome 염기서열과 함께 BROAD INSTITUTE의 Fusarium Comparative Database에서 염기서열 Blast 분석 프로그램을 이용해 비교분석 하였으며, Oligonucleotide Properties Calculator(<http://www.basic.northwestern.edu>)를 이용하여 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*의 specific primer set(Raphani F/Raphani R)와 *F. oxysporum*을 공통적으로 증폭할 수 있는 universal primer set(FO F/FO R)를 각각 설계하였다.

Table 1. *Fusarium oxysporum* isolates used in this study

No.	Isolates	<i>Fusarium oxysporum</i> formae specialis	Host plants
1	Fom-0	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	melon
2	Fom-1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	melon
3	Fom-1(62)	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	melon
4	Fom-2	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	melon
5	K-43205	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	melon
6	K-43206	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	melon
7	K-43207	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	melon
8	GR	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	melon
9	GR65	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	melon
10	BY-C1	<i>F. oxysporum</i>	melon
11	BY-C2	<i>F. oxysporum</i>	melon
12	BY-G1	<i>F. oxysporum</i>	melon
13	BY-W2	<i>F. oxysporum</i>	melon
14	BY-W6	<i>F. oxysporum</i>	melon
15	BY-W7	<i>F. oxysporum</i>	melon
16	N-5117	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	cucumber
17	CJ	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	cucumber
18	KR5	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	cucumber
19	HA	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	watermelon
20	K-40902	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	watermelon
21	NW1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	watermelon
22	NW2	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	watermelon
23	CO	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i>	cabbage
24	LY	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	tomato
25	KR1	<i>F. oxysporum</i>	radish
26	57	<i>F. oxysporum</i>	radish
27	58	<i>F. oxysporum</i>	radish
28	59	<i>F. oxysporum</i>	radish
29	60	<i>F. oxysporum</i>	radish
30	61	<i>F. oxysporum</i>	radish
31	147	<i>F. oxysporum</i>	radish
32	151	<i>F. oxysporum</i>	radish
33	216	<i>F. oxysporum</i>	radish
34	217	<i>F. oxysporum</i>	radish
35	218	<i>F. oxysporum</i>	radish
36	219	<i>F. oxysporum</i>	radish
37	220	<i>F. oxysporum</i>	radish
38	GWNU2	<i>F. oxysporum</i>	radish
39	GWNU3	<i>F. oxysporum</i>	radish
40	DN-2	<i>F. oxysporum</i>	radish

(3) *F. oxysporum* 및 *F. oxysporum* f. sp *raphani* 특정 유전자의 PCR 증폭

F. oxysporum f. sp *raphani*의 specific primer set(Raphani F/Raphani R)와 *F. oxysporum*을 공통적으로 증폭할 수 있는 universal primer set(FO F/FO R)를 이용하여 *F. oxysporum* f. sp *raphani*를 포함한 여러 *F. oxysporum* formae speciales들(다른 기주 식물에서 분리한 *F. oxysporum* f. sp. *melonis* 15균주, *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* 3균주, *F. oxysporum* f. sp. *niveum* 4균주, *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* 1균주, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 1균주, *F. oxysporum* f. sp. *raphani* 16균주)에 대해서 PCR 증폭을 실시하였다.

증폭을 위한 반응 mixture는 total volume을 20 μ l로 하고 template DNA 2-10 ng, 각 primer set 10 pmole, 2.5 mM dNTPs, 10 \times PCR buffer 2 μ l, 10 mM MgCl₂, Taq DNA Polymerase 2 unit (Intron Biotechnology Inc.)을 첨가하여 PCR을 수행하였다. 유전자의 증폭은 initial denaturation을 94°C에서 5분간 실시한 후 denaturation 94°C/20초, annealing 57°C/19초, extension 72°C/ 30초로 35 cycles을 실시하고 final extension을 72°C/5분 실시하였다. BioRad사의 iCycler을 이용하여 PCR 증폭을 하였으며 증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 100 V에 30분간 전기영동하여 ethidium bromide로 염색한 후 관찰하였다.

(5) 무로부터 분리한 *F. oxysporum* 16개 균주의 무에 대한 병원성 검정

무로부터 분리한 *F. oxysporum* 16개 균주를 PDA 배지에 접종하여 25°C에서 2일간 배양하였다. PDA 배지에 형성된 병원균의 균총으로 부터 균사 조각 6개를 떼어 100 ml MEB 액체배지에 접종한 후 25°C에서 7일간 150 rpm으로 진탕배양 하였다. 그리고 배양된 배양액을 4겹의 miracloth에 걸러 균사체를 제거하고 원심분리를 통해 배양여액을 제거하고 포자를 수확하였다. 수확한 포자는 멸균수로 현탁하여 포자현탁액을 만들고, 포자현탁액의 포자 농도는 멸균수로 희석하여 1 \times 10⁷ conidia/ml의 농도로 조정하여 접종원을 준비하였다.

무 종자를 파종하고 온실에서 12일 동안 재배한 기주 식물체('청수궁중무', 무 시들음병 감수성 품종) 뿌리의 흙을 제거하고, 준비한 포자현탁액 40 ml에 30분 동안 침지하여 접종하였다. 침지한 유묘를 5 \times 8 플러그 포트에 옮겨 심고 25°C에서 24시간 습실처리 하였다. 이후 25°C 항온습실에서 하루에 12시간 동안 광을 조사하면서 재배하였으며 접종 21-27일 후에 시들음병 발생을 조사하였다.

병조사는 다음과 같은 발병도(disease index)로 조사하였으며, 발병정도는 0 = 건전, 1 = 지하부는 갈변되나 지상부는 병징이 없는 것, 2 = 지하부는 갈변되고 지상부는 약간 생육이 억제되는 것, 3 = 지하부는 갈변되고 지상부는 생육이 억제되며 약간 황화된 것, 4 = 지하부는 갈변되고 지하부와 지상부 모두 생육이 억제되며 심하게 황화된 것, 5 = 고사 등 6단계로 하였다. 평균 발병도가 1.0 이하인 경우에는 비병원성, 2.0 초과는 병원성 균주로 판정하였으며 병원성 실험은 10반복으로 2회 실시하였다.

다. 결과

(1) 무로부터 분리한 *Fusarium oxysporum* 16개 균주의 무에 대한 병원성

다양한 지역의 병든 무로부터 분리한 *F. oxysporum* 16개 균주가 무 시들음병의 병원균인 *F. oxysporum* f. sp *raphani*인지를 확인하기 위하여 이들 균주를 무('청수궁중무', 무 시들음병 감수성 품종)에 접종하고 병원성을 조사하였다. 실험한 16개 균주 중 8개 *F. oxysporum* 균주(KR1, 57, 58, 59, 60, 147, 151, DN-2)는 접종 25일 후에 식물체의 지하부는 갈변되고, 지

상부 잎의 생육억제 및 황화되는 전형적인 무 시들음병병징이 관찰되었으며 6개 *F. oxysporum* 균주(KR1, 57, 58, 147, 151, DN-2) 3.5 이상의 높은 발병도를 나타냈으며, 2개 균주(59, 60,)는 각각 2.9와 2.6의 다소 낮은 발병도를 보였다(Table 2). 따라서 이들 8개 균주는 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*로 동정되었다. 그 외 나머지 균주들은 접종 무 유묘에서 0.8 이하의 발병도를 나타내어 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*가 아니고 비병원성 *F. oxysporum* 균주임을 알 수 있었다(Table 2).

Table 2. Pathogenicity of 16 strains of *Fusarium oxysporum* isolated from radish plants on radish seedlings

Isolate	Disease index	Pathogenicity	Isolate	Disease index	Pathogenicity
KR1	4.0 ± 0.7	+	216	0.8 ± 0.4	-
57	4.8 ± 0.4	+	217	0.0 ± 0.0	-
58	4.7 ± 0.5	+	218	0.5 ± 0.4	-
59	2.9 ± 1.2	+	219	0.1 ± 0.2	-
60	2.6 ± 0.9	+	220	0.6 ± 0.5	-
61	0.5 ± 0.4	-	GWNU2	0.3 ± 0.5	-
147	4.4 ± 0.2	+	GWNU3	0.3 ± 0.5	-
151	3.5 ± 1.1	+	DN-2	4.3 ± 1.5	+

(2) *F. oxysporum* f. sp. *raphani* 특이적 primer의 특이성

F. oxysporum f. sp. *raphani*와 유전적으로 유사한 *F. oxysporum* formae speciales 사이의 genome에 대한 염기서열 비교 분석을 통해서 450 bp의 PCR 증폭산물을 생성하는 *F. oxysporum* f. sp. *raphani* 특이적 primer set(Raphani F/Raphani R)를 설계하였다.

F. oxysporum f. sp. *raphani* 특이적 primer로 제작된 primer의 특이성을 조사하기 위해 국내의 다양한 시들음병 기주 식물인 멜론, 오이, 수박, 토마토, 양배추, 무로부터 분리한 다양한 formae speciales의 *F. oxysporum* 균주 40개에 대해서 Raphani F/Raphani R primer set를 이용해 PCR 반응을 실시한 결과, 무에 대한 병원성을 가지는 *F. oxysporum* f. sp. *raphani* 균주들에서만 특이적인 450 bp의 단일 증폭산물을 확인 할 수 있었다(Table 7; Fig. 1). *F. oxysporum* 특이적인 primer set(Fo F/Fo R)에 의해서는 실험한 모든 *F. oxysporum* 균주들이 밴드를 나타내었다(Fig. 1). 따라서 본 연구에서 개발한 *F. oxysporum* f. sp. *raphani* 특이적인 primer set(Raphani F/Raphani R)는 *F. oxysporum* f. sp. *raphani* 균주를 선택적으로 진단할 수 있는 우수한 분자마커로 판단되었다(Table 3).

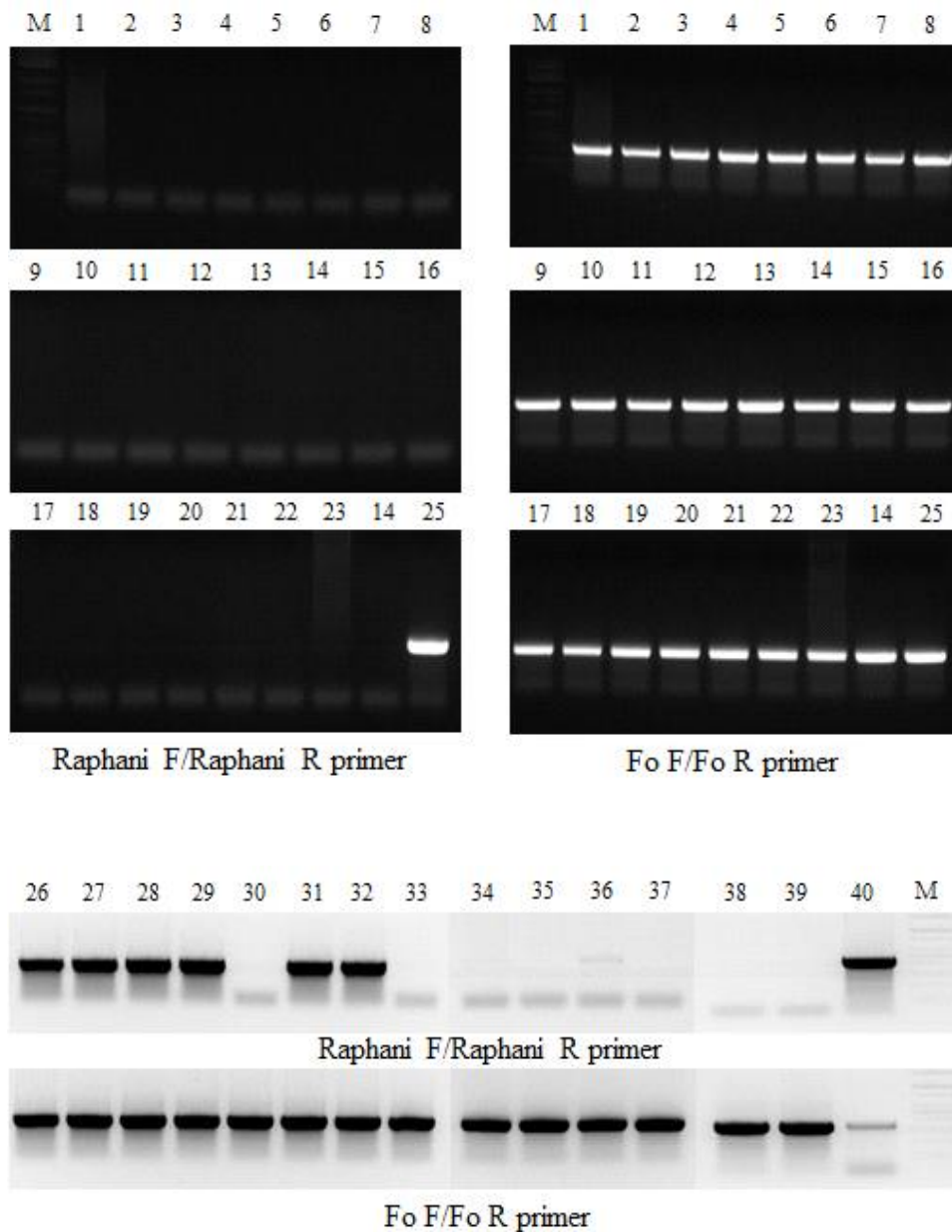


Fig. 1. PCR-amplified products of *Fusarium oxysporum* isolates using *F. oxysporum* f. sp. *raphani* specific primer set (Raphani F/Raphani R) and *F. oxysporum* universal primer set (Fo F/Fo R). Genomic DNAs of *F. oxysporum* formae speciales isolates (lanes 1-40: Fom-0, Fom-1, Fom-1(62), Fom-2, K-43205, K-43206, K-43207, GR, GR65, BY-C1, BY-C2, BY-G1, BY-W2, BY-W6, BY-W7, N-5117, CJ, KR5, HA, K-40902, NW1, NW2, CO, LY, KR1, 57, 58A, 59, 60, 61, 147, 151, 216, 217, 218, 219, 220 GWN2, GWN3, DN-2) (Table 1) were used for PCR analysis. M, molecular marker 1-kb DNA ladder plus.

Table 3. PCR detection using *F. oxysporum* f. sp *raphani* specific primer set (Raphani F/Raphani R) and *F. oxysporum* universal primer set (Fo F/Fo R)

No.	Isolates	<i>Fusarium. oxysporum</i> formae speciales	Host plants	PCR test ^a (RaF /RaR)	PCR test ^a (FoF /FoR)	Patho- genicity
1	Fom-0	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	melon	-	+	+
2	Fom-1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	melon	-	+	+
3	Fom-1(62)	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	melon	-	+	+
4	Fom-2	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	melon	-	+	+
5	K-43205	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	melon	-	+	+
6	K-43206	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	melon	-	+	+
7	K-43207	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	melon	-	+	+
8	GR	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	melon	-	+	+
9	GR65	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	melon	-	+	+
10	BY-C1	<i>F. oxysporum</i>	melon	-	+	-
11	BY-C2	<i>F. oxysporum</i>	melon	-	+	-
12	BY-G1	<i>F. oxysporum</i>	melon	-	+	-
13	BY-W2	<i>F. oxysporum</i>	melon	-	+	-
14	BY-W6	<i>F. oxysporum</i>	melon	-	+	-
15	BY-W7	<i>F. oxysporum</i>	melon	-	+	-
16	N-5117	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	cucumber	-	+	+
17	CJ	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	cucumber	-	+	+
18	KR5	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	cucumber	-	+	+
19	HA	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	watermelon	-	+	+
20	K-40902	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	watermelon	-	+	+
21	NW1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	watermelon	-	+	+
22	NW2	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	watermelon	-	+	+
23	CO	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i>	cabbage	-	+	+
24	LY	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	tomato	-	+	+
25	KR1	<i>F. oxysporum</i>	radish	+	+	+
26	57	<i>F. oxysporum</i>	radish	+	+	+
27	58	<i>F. oxysporum</i>	radish	+	+	+
28	59	<i>F. oxysporum</i>	radish	+	+	+
29	60	<i>F. oxysporum</i>	radish	+	+	+
30	61	<i>F. oxysporum</i>	radish	-	+	-
31	147	<i>F. oxysporum</i>	radish	+	+	+
32	151	<i>F. oxysporum</i>	radish	+	+	+
33	216	<i>F. oxysporum</i>	radish	-	+	-
34	217	<i>F. oxysporum</i>	radish	-	+	-
35	218	<i>F. oxysporum</i>	radish	-	+	-
36	219	<i>F. oxysporum</i>	radish	-	+	-
37	220	<i>F. oxysporum</i>	radish	-	+	-
38	GWNU2	<i>F. oxysporum</i>	radish	-	+	-
39	GWNU3	<i>F. oxysporum</i>	radish	-	+	-
40	DN-2	<i>F. oxysporum</i>	radish	+	+	+

^a*F. oxysporum* f. sp *raphani* specific primer set (RaF, Raphani F/RaR, Raphani R).

^b*F. oxysporum* universal primer set (Fo F/Fo R).

^{a,b}. The symbol “+” means the PCR product of the expected size obtained, “-” means no PCR product of the expected size obtained.

^c*F. oxysporum* f. sp *raphani* isolates were tested for their pathogenicity using the root dip assay on their respective hosts, and the symbol “+” means positive for pathogenicity; “-” means no disease.

2. 뿌리혹병균(*Plasmodiophora brassicae*)의 분자생물학적 진단법 확립

가. 서론

*Plasmodiophora brassicae*에 의한 뿌리혹병은 전 세계적으로 발생하여 큰 피해를 주고 있는 주요 토양전염병으로 Protozoa 계에 속하는 유사균류(Pseudo fungi)로 분류된다. *P. brassicae*는 활물기생균으로 배추(*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*) 외에도 양배추(*Brassica oleracea*), 무(*Raphanus sativus*) 등의 십자화과 작물에 뿌리혹병을 발생 시킨다(Kim *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2005). 혹이 발생한 뿌리조직에 무수히 많은 휴면포자가 형성되며, 유주자, 변형체 등의 형태로 뿌리가 부패함에 따라 뿌리 밖으로 방출되어 토양에서 15년 이상 생존하면서 다음해에 뿌리혹병을 일으키는 것으로 알려져 있다(Arie *et al.*, 1998, Mattush, 1977). 배추의 뿌리혹병은 구소련의 Woronin에 의해 처음 보고된 이후 전 세계적으로 발견되고 있는데(Karling, 1968), 한국에서의 배추 뿌리혹병은 1920년대에 서울과 수원 지역의 배추 재배지역에서 처음 보고되었으나(Nakata and Takimoto, 1928), 1990년대부터는 배추 뿌리혹병 발생면적이 급격히 증가하였고(Cho *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2000a, 2000b, 2003), 현재는 전국에 걸쳐 배추, 양배추, 무 등의 십자화과 작물에 뿌리혹병이 발생하고 있다.

뿌리혹병을 방제하기 위하여 생석회 처리를 통한 토양의 pH 조절과 십자화과 작물 이외의 작물과 윤작하는 방법 등의 경종적 방제, 유용 미생물을 이용한 생물학적 방제(Cheah and Page, 1995; Cheah *et al.*, 2000), 그리고 fluazinam, flusulfamide 및 ethaboxam 등의(Komyoji *et al.*, 1995; Mitani *et al.*, 2003; Shimotori *et al.*, 1996) 살균제를 이용하는 화학적 방제 등에 관한 연구가 활발히 진행되어져 왔다. 하지만 경종적 방제는 뿌리혹병에 대한 방제효과가 낮고, 살균제를 이용한 화학적 방제는 일시적으로 병원균의 밀도를 저하시켜 단기간 내에 방제 효과를 볼 수 있으나 약효가 떨어지면 다시 병원균의 밀도가 높아져 뿌리혹병이 재발하게 된다(Yoshigawa, 1983). 또한 농약의 과다사용으로 인한 경제적 부담과 환경오염 유발 등의 문제점을 야기하고 있다.

따라서 뿌리혹병균의 방제에 소요되는 비용과 농가의 경제적 피해를 줄이기 위해 병원균의 조기 진단을 통하여 신속한 방제 및 예방을 할 수 있는 기술의 개발이 필요하며, 효과적인 뿌리혹병 방제 대책 수립을 위한 병 발생 예찰에 뿌리혹병원균을 신속 정밀하게 진단할 수 있는 기술을 이용하는 것이 중요하다.

뿌리혹병균의 검출은 이병토와 기주 식물체를 이용한 생물학적 검정(bioassay), 형광현미경을 이용한 형태관찰법, 특히 단백질의 항원/항체를 이용한 면역반응법(antiserum), 항원/항체 반응에서 효소와 기질의 반응 결과로 나타나는 물질의 변색정도를 이용한 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 등이 이용되고 있으나 검출에 필요한 공간의 제약과 많은 시간의 소요와 고가의 장비가 요구되고 낮은 민감도 및 정확성을 보이는 단점이 있다(Faggian and Strelkov, 2009; Lange *et al.*, 1989; Toxopeus and Janssen, 1975; Wakeham *et al.*, 1996; Wallenhammer, 1996; White and Wakeham, 1995).

최근 분자 기법으로 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA), SCAR(sequence characterized amplified region) marker, IGS (intergenic spacer of the nuclear ribosomal DNA), ITS (internal spacer of the nuclear ribosomal DNA) 그리고 특정 유전자 등의 다양한 특성을 갖는 DNA 염기서열들의 분석으로부터 얻어진 종 특이적 molecular marker와 이를 이용한 PCR (polymerase chain reaction) 분석기법이 식물 병원균들의 종 동정 및 병 진단에 있어서 매우 광범위하게 활용되어지고 있다(Kawabe *et al.*, 2005; Li *et al.*, 1994; Migheli *et al.*, 1998; Waalwijk *et al.*, 1996).

PCR 분석기법에 기초하여 특이적 primer를 이용한 특정 DNA 염기서열의 증폭을 통해

서 뿌리혹병균을 진단할 수 있는 방법들이 연구 되어져 왔으며(Cao *et al.*, 2007; Faggian *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 1999; Wallenhammar *et al.*, 2012; Wallenhammar and Arwidsson, 2001) 국내에서는 ITS(internal transcribed spacer)와 bata-tubulin 염기서열의 특이 primer를 이용한 PCR 유전자 증폭을 통해 뿌리혹병균을 진단 할 수 있는 방법이 보고되어 있다(Choi *et al.*, 2014; Soh *et al.*, 2013)

본 연구에서는 십자화과 작물에서 뿌리혹병 병원균(*Plasmodiophora brassicae*)의 감염여부를 조기에 진단하기 위한 기술을 개발하기 위해 기존의 ITS 와 bata-tubulin 염기서열 등과 다른 새로운 *P. brassicae* genome 내의 특이 유전자 부분의 단편 염기서열을 비교 분석하여 뿌리혹병균(*P. brassicae*)에 특이적인 분자마커(PbAll 1F/1R)를 선별하였고 conventional PCR 기법을 이용하여 뿌리혹병 병원균에 있어서 분자마커로서의 특이성을 조사하였다.

나. 재료 및 방법

(1) Genomic DNA 분리

지역별로 포장 수집된 배추 뿌리혹병 12개 균주(GN1, GN2, JS, GS, HS, YC, PC, HN1, DJ, KS, SS, HN2) (Fig. 2)와 곰팡이 병원균인 고추 역병균(*Phytophthora capsici*), 박과작물 흰가루병균(*Podosphaera xanthii*), 토마토 역병균(*Phytophthora infestans*), 벼 도열병원균(*Magnaporthe oryzae*), 고추 탄저병원균(*Colletotrichum coccodes*), 모잘록병원균(*Pythium ultimum*), 맥류 붉은곰팡이병원균(*Fusarium graminearum*), 옥수수 줄기썩음병(*Fusarium verticillioides*) (Table 4)과 세균성 병원균인 고추 꽃마름병원균(*Ralstonia solanacearum*) 그리고 뿌리 근권세균인 *Paenibacillus kribbensis* T9, *Lysinibacillus sphaericus* TC1, *Bacillus velezensis* G341, *Bacillus amyloliquefaciens*, (Table 5), 그리고 배추, 무, 토마토, 고추 뿌리의 적정량(100 mg)을 effendorf 튜브에 넣고 -70°C에서 동결시켰다. 동결된 샘플을 glass bead 를 이용해 마쇄한 다음 400 μ l의 extraction buffer[200 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl, 30 mM EDTA, 0.5% SDS]와 proteinase K(50 μ g)를 첨가하여 37°C에서 1시간 처리하였다. 다음은 400 μ l의 2×CTAB solution[2% CTAB (w/v), 100 mM Tris-HCl(pH8.0), 20 mM EDTA(pH 8.0), 1.4 M NaCl, 1% PVP (polyvinylpyrrolidone)]을 첨가하여 잘 섞어 준 후 600 μ l의 chloroform : isoamylalcohol(24 : 1)로 추출하고 12,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 상등액을 1.5 ml tube에 넣었다. 상등액에 0.7 배량의 isopropanol을 첨가하고 실온에서 10분간 방치한 후 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 하였다. 침강된 DNA는 70% ethanol을 이용해 같은 방법으로 세척하였다. 튜브내의 ethanol을 제거, 건조시킨 후 DNA를 50 μ l의 TE buffer 에 녹인 다음 2 μ l(10 mg/ml)의 RNase를 첨가하여 RNA를 제거 한 후 agarose gel에 전기 영동하여 DNA를 확인 및 정량하였다.



Fig. 2. Clubroot development of Chinese cabbage inoculated with YC isolate of *Plasmodiophora brassicae*.

Table 4. Field isolates of *Plasmodiophora brassicae* used in the study

No.	Isolate	Host	Area
1	GN1	Chinese cabbage	Gangneung
2	GN2	Chinese cabbage	Gangneung
3	JS	Chinese cabbage	Jeongseon
4	GS	Cabbage	Goesan
5	HS	Chinese cabbage	Hoengseong
6	YC	Chinese cabbage	Yeoncheon
7	PC	Chinese cabbage	Pyeongchang
8	HN1	Chinese cabbage	Haenam
9	DJ	Chinese cabbage	Daejeon
10	KS	Chinese cabbage	Keumsan
11	SS	Chinese cabbage	Seosan
12	HN2	Chinese cabbage	Haenam

Table 5. Fungal and bacterial isolates used in this study

No.	Species	Host
1	<i>Phytophthora capsici</i>	Pepper
2	<i>Phytophthora infestans</i>	Potato
3	<i>Podosphaera xanthii</i>	Cucumber
4	<i>Magnaporthe oryzae</i>	Rice
5	<i>Colletotrichum coccodes</i>	Pepper
6	<i>Pythium ultimum</i>	Cucumber
7	<i>Fusarium graminearum</i>	Wheat
8	<i>Fusarium verticillioides</i>	Maize
9	<i>Paenibacillus kribbensis</i> T9	Soil
10	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> TC1	Soil
11	<i>Bacillus velezensis</i> G341	Ginseng
12	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Soil
13	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Tobacco

(2) *Plasmodiophora brassicae* 특이적 primer 선발

특이적 primer의 선발을 위해 GenBank에 공개된 *P. brassicae*의 genome 내의 유전자 염기서열 정보는 다양한 식물 병원균의 genome 염기서열과 함께 National Center for Biotechnology Information의 GeneBank 염기서열 Blast 분석 프로그램을 이용해 비교분석 하였으며, Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu>)를 이용하여 *P. brassicae* 특이적 primer인 PbAll 1F: 5'-ATCAATATGAGGGTCTTTGCTGGAGTC-3' 와 PbAll 1R: 5'-GGGTACTTAGGGTGGTGGACTTATATC-3'를 설계하였다.

(3) *Plasmodiophora brassicae* 특정 유전자의 PCR 증폭

*P. brassicae*의 PCR 증폭에 있어서 *P. brassicae*의 genome 염기서열 정보를 National Center for Biotechnology Information의 GeneBank 염기서열 Blast 분석 프로그램을 통해서 분석하여 기존의 ITS 및 beta-tubulin 부분을 이용한 primer sets와 다른 특정 유전자를 이용한 *P. brassicae* 특이적 primer(PbAll 1F/PbAll 1 R)를 설계하였다. 이를 뿌리혹병 12개 균주로부터 추출한 Genomic DNA를 template로 이용하여 PCR 증폭을 실시하였다. 증폭을 위한 반응 mixture는 total volume을 20 μ l로 하고 template DNA 2~10 ng, 각 primer set 10 pmole, 2.5 mM dNTPs, 10 \times PCR buffer 2 μ l, 10 mM MgCl₂, Taq DNA Polymerase 2 unit (Intron Biotechnology Inc.)을 첨가하여 PCR을 수행하였다. 유전자의 증폭은 initial denaturation을 95°C에서 7분간 실시한 후 denaturation 95°C/30초, annealing 60°C/30초, extension 72°C/ 30초로 30 cycles을 실시하고 final extension을 72°C/10분 실시하였다. BioRad사의 iCycler을 이용하여 PCR 증폭을 하였으며 증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 100 V에 30분간 전기영동하여 ethidium bromide로 염색한 후 관찰하였다.

(4) *Plasmodiophora brassicae*에 특이적인 primer의 특이성

설계된 primer의 *P. brassicae*에 대한 특이성을 조사하고자 포장 수집 배추 뿌리혹병 12개 균주와 다양한 기주 식물로부터 분리한 곰팡이 병원균 8개 균주 및 세균성 균주 5개 균주, 그리고 배추, 무, 토마토, 고추 뿌리들에서 분리한 genomic DNA에 대해서 PbAll 1F/PbAll 1R primer set를 이용하여 PCR 증폭을 실시하였다. PCR 조건은 initial denaturation을 95°C에서 7분간 실시한 후 denaturation 95°C/30초, annealing 60°C/30초, extension 72°C/ 30초로 30 cycles을 실시하고 final extension을 72°C/10분 실시하였다. BioRad사의 iCycler을 이용하여 PCR 증폭을 하였으며 증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 100 V에 30분간 전기영동하여 ethidium bromide로 염색한 후 관찰하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) 특이적 primer를 이용한 *Plasmodiophora brassicae* 12개 균주의 PCR 증폭

*P. brassicae*의 genome 염기서열 정보를 National Center for Biotechnology Information의 GeneBank 염기서열 Blast 분석 프로그램을 통해서 분석하여 genome 염기서열 내에 특정 단일 유전자를 이용한 *P. brassicae* 특이적 primer(PbAll 1F/PbAll 1R)를 설계하였다. 제작된 특이적 primer의 *P. brassicae*에 대한 PCR 증폭반응 산물의 크기는 480 bp로 예상되었다. 뿌리혹병이 발생한 국내의 다양한 지역에서 포장 수집된 배추 뿌리혹병 균주(GN1, GN2, JS, GS, HS, YC, PC, HN1, DJ, KS, SS, HN2)와 *Fusarium oxysporum* 종의 균주(*F. oxysporum* f. sp. *melonis*, *cucumerinum*, *niveum*) 그리고 배추, 무, 토마토, 고추 뿌리로부터 분리한 genomic DNA들에 대해서 PbAll 1F/PbAll 1R primer set를 이용해 PCR 증폭반응 수행하였고, 그 결과 뿌리혹병이 발생한 곳에서 포장 수집된 배추 뿌리혹병 12개 균주들에서만 특이적인 480 bp의 단일 DNA 증폭산물을 확인 할 수 있었고 *F. oxysporum* 종 및 다양한 작물의 뿌리에서는 어떤 DNA 증폭산물도 검출되지 않았다(Table 6, Fig. 3).

Table 6. PCR amplification of genomic DNA of *Plasmodiophora brassicae* field isolates with specific primer set

No.	Isolate	PCR detection
		Primer set (PbAll 1F/1R) ^a
1	<i>Plasmodiophora brassicae</i> GN1	+
2	<i>Plasmodiophora brassicae</i> GN2	+
3	<i>Plasmodiophora brassicae</i> JS	+
4	<i>Plasmodiophora brassicae</i> GS	+
5	<i>Plasmodiophora brassicae</i> HS	+
6	<i>Plasmodiophora brassicae</i> YC	+
7	<i>Plasmodiophora brassicae</i> PC	+
8	<i>Plasmodiophora brassicae</i> HN1	+
9	<i>Plasmodiophora brassicae</i> DJ	+
10	<i>Plasmodiophora brassicae</i> KS	+
11	<i>Plasmodiophora brassicae</i> SS	+
12	<i>Plasmodiophora brassicae</i> HN2	+

^a*Plasmodiophora brassicae*-specific primer set, PbAll 1F/PbAll 1R. The symbol “+” means the PCR product of the expected size, “-” means no PCR product of the expected size.

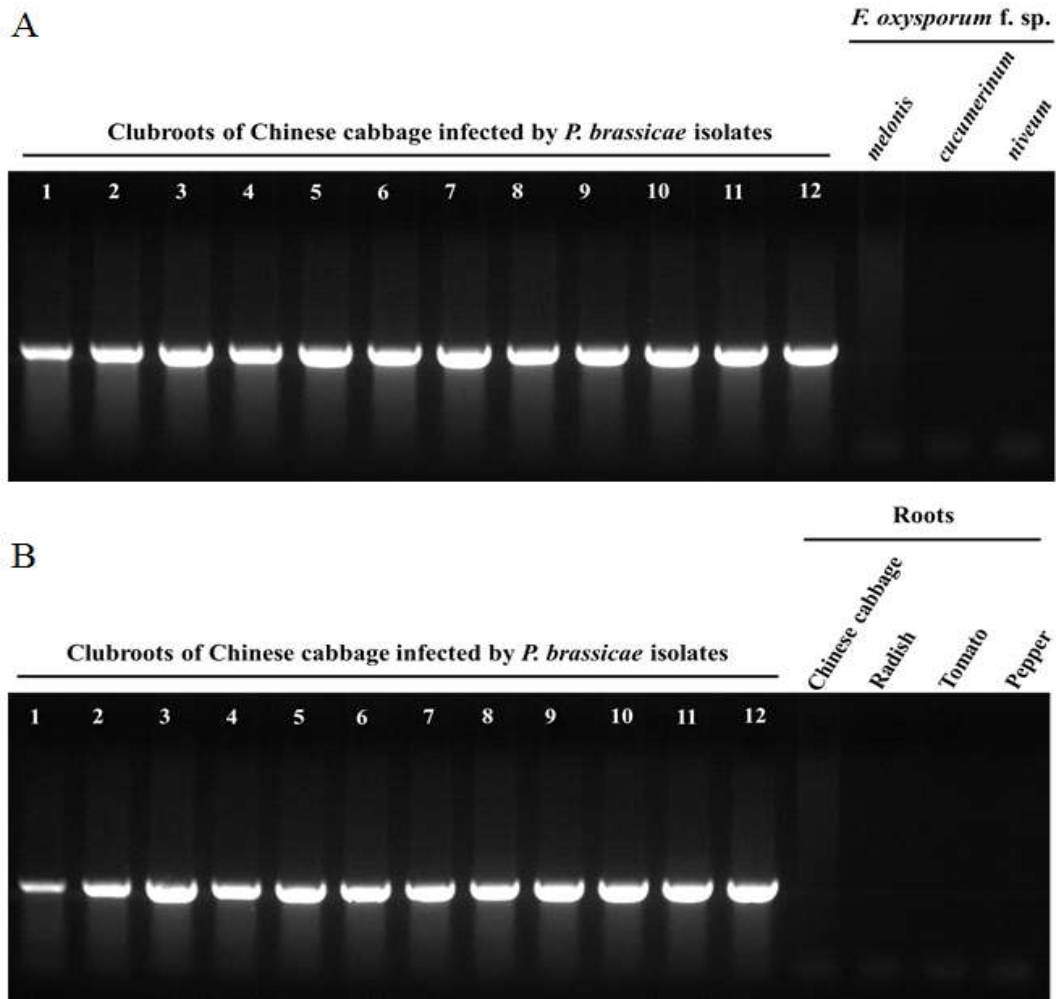


Fig. 3. Detection of *Plasmodiophora brassicae* using specific primer set (AbAll 1F/AbAll 1R) in conventional PCR. (A) Genomic DNA of clubroots of Chinese cabbage infected by *P. brassicae* isolates (lanes 1-12: GN1, GN2, JS, GS, HS, YC, PC, HN1, DJ, KS, SS, HN2) and *Fusarium oxysporum* formae speciales isolates (lanes 13-15: *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, *F. oxysporum* f. sp. *niveum*) were used for PCR analyses. (B) Genomic DNA of clubroots of Chinese cabbage infected by *P. brassicae* isolates (lanes 1-12: GN1, GN2, JS, GS, HS, YC, PC, HN1, DJ, KS, SS, HN2) and roots of plants (lanes 13-16: Chinese cabbage, radish, tomato, pepper) were used for PCR analyses.

(2) *Plasmodiophora brassicae*에 특이적인 PCR primer의 특이성

P. brassicae 검출용 primer의 특이성을 확인하기 위하여 주요 곰팡이 병원균(*P. capsici*, *P. infestans*, *P. xanthii*, *M.oryzae*, *C. coccodes*, *P.ultimum*, *F. graminearum*, *F. verticillioides*)과 세균 병원균(*R. solanacearum*) 그리고 근권세균(*P. kribbensis* T9, *L. sphaericus* TC1, *B. velezensis* G341, *B. amyloliquefaciens*)의 추출된 genomic DNA를 이용하여 PCR 증폭반응을 수행하였다. PCR 증폭반응 결과, *P. brassicae* DJ 균주의 genomic DNA로부터 480 bp 크기의 단일 DNA 증폭산물을 확인할 수 있었으나, DJ 균주 이외 식물의 곰팡이 및 세균에 대해서는 어떤 DNA 증폭산물도 확인할 수 없었다(Table 7, Fig. 4).

따라서 본 연구에서 제작된 *P. brassicae* 검출용 특이적 primer를 이용한 conventional PCR 방법은 신속하고 정확하게 뿌리혹병 병원균(*P. brassicae*)을 검출하는데 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

Table 7. PCR amplification of fungal and bacterial isolates with *Plasmodiophora brassicae*-specific primer set

No.	Species	PCR detection
		Primer set (PbAll 1F/1R) ^a
1	<i>Phytophthora capsici</i>	—
2	<i>Phytophthora infestans</i>	—
3	<i>Podosphaera xanthii</i>	—
4	<i>Magnaporthe oryzae</i>	—
5	<i>Colletotrichum coccodes</i>	—
6	<i>Pythium ultimum</i>	—
7	<i>Fusarium graminearum</i>	—
8	<i>Fusarium verticillioides</i>	—
9	<i>Paenibacillus kribbensis</i> (T9)	—
10	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> (TC1)	—
11	<i>Bacillus velezensis</i> (G341)	—
12	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	—
13	<i>Ralstonia solanacearum</i>	—

^a*Plasmodiophora brassicae*-specific primer set, PbAll 1F/PbAll 1R. The symbol “+” means the PCR product of the expected sized, “—” means no PCR product of the expected size.

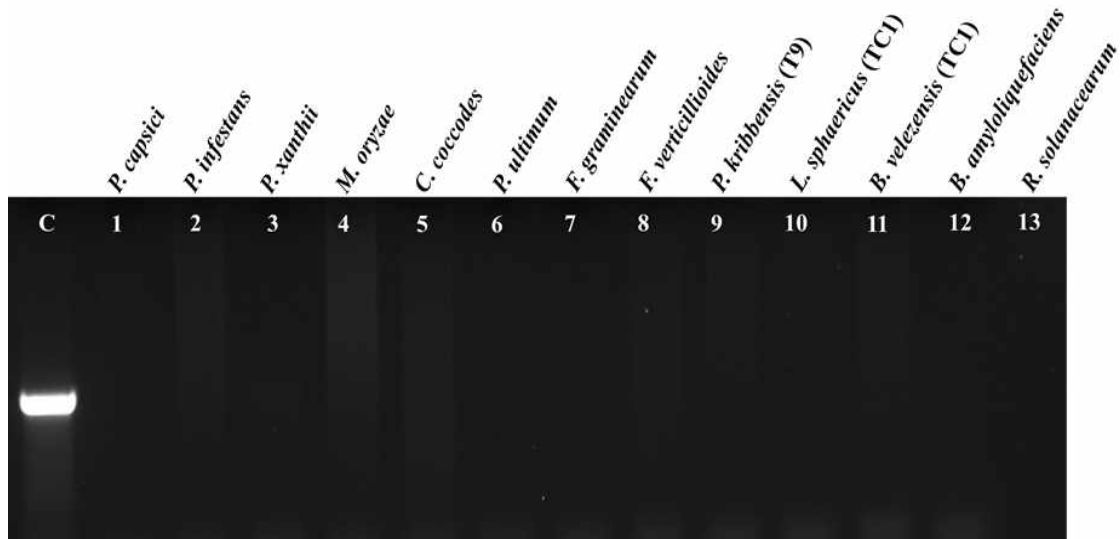


Fig. 4. Specificity of primer set (AbAll 1F/AbAll 1R) for *Plasmodiophora brassicae* by conventional PCR using genomic DNA purified from fungal and bacterial species. Genomic DNA of fungal and bacterial species (lane 1 : C, *P. brassicae* DJ isolates, lanes 2-14: *Phytophthora capsici*, *Phytophthora infestans*, *Podosphaera xanthii*, *Magnaporthe oryzae*, *Colletotrichum coccodes*, *Pythium ultimum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, *Paenibacillus kribbensis* T9, *Lysinibacillus sphaericus* TC1, *Bacillus velezensis* G341, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Ralstonia solanacearum*) were used for PCR analysis.

3. 무 검은무늬병 병원균(*Alternaria brassicicola*) 진단법 개발

가. 실험에 사용한 균주

Table 8. *Alternaria* spp. isolates used in this study

No.	<i>Alternaria</i> spp.	Host plants	Culture media, TM (°C)
1	<i>A. acalyphae</i> 43236	<i>Acalypha australis</i>	PDA, 25°C
2	<i>A. alternata</i> 42131	<i>Pyrus serotina</i>	V8, 25°C
3	<i>A. arborescens</i> 43784	Creosote treated wood tie	MEA, 20°C
4	<i>A. brassicae</i> 46634	<i>Armoracia rusticana</i>	PDA, 25°C
5	<i>A. brassicicola</i> 40036	<i>Raphanus sativus</i>	PDA, 25°C
6	<i>A. calendulae</i> 43237	<i>Calendula arvensis</i>	PDA, 25°C
7	<i>A. carthami</i> 44416	leaf of <i>Carthamus tinctorius</i>	V8, 25°C
8	<i>A. cassiae</i> 43238	<i>Cassia tora</i>	PDA, 25°C
9	<i>A. citri</i> 42128	<i>Citrus unshiu</i>	V8, 25°C
10	<i>A. creassa</i> 43227	<i>Datura stramonium</i>	PDA, 25°C
11	<i>A. dauci</i> 42997	<i>Daucus carota</i>	V8, 25°C
12	<i>A. dianthi</i> 43240	<i>Dianthus superbus</i> var.	PDA, 25°C

		<i>longicalycinus</i>	
13	<i>A. gaisen</i> 42124	<i>Pyrus serotina</i>	V8, 25°C
14	<i>A. gossypina</i> 42129	<i>Gossypium indicum</i>	V8, 25°C
15	<i>A. helianthi</i> 42469	<i>Helianthus annuus</i>	V8, 25°C
16	<i>A. iridicola</i> 43241	<i>Belamcanda chinensis</i>	PDA, 25°C
17	<i>A. japonica</i> 43244	<i>Raphanus sativus</i>	PDA, 25°C
18	<i>A. kikuchiana</i> 40630	<i>Pyrus serotina</i>	PDA, 25(UV)°C
19	<i>A. longipes</i> 42127	<i>Nicotiana tabacum</i>	V8, 25°C
20	<i>A. longissima</i> 44350	seed of <i>Oryza sativa</i>	V8, 25°C
21	<i>A. macrospora</i> 43245	<i>Gossypium indicum</i>	PDA, 25°C
22	<i>A. mali</i> 40841	<i>Malus pumila</i> var. <i>dulcissima</i>	CMA, 25°C
23	<i>A. padwickii</i> 43247	<i>Oryza sativa</i>	PDA, 25°C
24	<i>A. panax</i> 42461	<i>Panax ginseng</i>	V8, 25°C
25	<i>A. porri</i> 40568	<i>Allium fistulosum</i>	MEA, 25°C
26	<i>A. radicina</i> 43249	<i>Daucus carota</i>	PDA, 25°C
27	<i>A. ricini</i> 43251	<i>Ricinus communis</i>	PDA, 25°C
28	<i>A. sesami</i> 43254	<i>Sesamum indicum</i>	PDA, 25°C
29	<i>A. tagetica</i> 42471	<i>Tagetes erecta</i>	V8, 25°C
30	<i>A. tenuissima</i> 40968	<i>Vicia faba</i>	PDA, 30°C
31	<i>A. tomatophila</i> 44357	<i>Lycopersicon esculentum</i>	V8, 25°C
32	<i>A. zinniae</i> 44882	leaf of <i>Zinnia elegans</i>	PDA, 25°C

Table 9. *Alternaria brassicicola* and *A. japonica* isolates used in this study

No.	<i>Alternaria</i> spp.	Host plants	Culture media, TM (°C)
1	<i>A. brassicicola</i> 40034	<i>Raphanus sativus</i>	PDA, 25°C
2	<i>A. brassicicola</i> 40857	soil of <i>Chinese cabbage</i>	PDA, 25°C
3	<i>A. brassicicola</i> 43923	<i>Armoracia rusticana</i>	PDA, 25°C
4	<i>A. brassicicola</i> 44415	<i>Raphanus sativus</i>	V8, 25°C
5	<i>A. brassicicola</i> 44877	leaf of <i>B. campestris</i> ssp. <i>perkinensis</i>	PDA, 25°C
6	<i>A. brassicicola</i> 44878	leaf of <i>B. oleracea</i> var. <i>gongylodes</i>	PDA, 25°C
7	<i>A. japonica</i> 43243	<i>B. campestris</i> napus var. <i>nippo-oleifera</i>	PDA, 25°C

Table 8. Various fungal isolates used in this study

No.	Fungal species	Source
1	<i>Phytophthora capsici</i>	Pepper
2	<i>Phytophthora infestans</i>	Tomato
3	<i>Podosphaera xanthii</i>	Cucurbits
4	<i>Magnaporthe oryzae</i>	Rice
5	<i>Colletotrichum coccodes</i>	Pepper
6	<i>Pythium ultimum</i>	Soil
7	<i>Fusarium graminearum</i>	Wheat
8	<i>Fusarium verticillioides</i>	Maize

Table 9. Various bacterial isolates used in this study

No.	Bacterial species	Source
1	<i>Paenibacillus kribbensis</i> (T9)	Soil
2	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> (TC1)	Soil
3	<i>Bacillus velezensis</i> (G341)	Ginseng
4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Soil
5	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Tomato

나. Genomic DNA 분리

- 다양한 기주 식물로부터 분리된 39개 검은무늬병 균주를 농업유전자원센터로부터 분양받아 potato dextrose agar (PDA), malt extract agar (MEA), V8 juice agar (V8), 혹은 corn meal agar (CMA) 배지에 접종하고 25°C에서 (예외; *A. arborescens* 20°C, *A. tenuissima* 30°C) 7일 동안 암상태 (예외; *A. kikuchiana* light)에서 배양하였다.

- 배양된 각 *Alternaria* spp. 균주는 멸균수(20 ml)를 이용하여 균사체를 수확하였다. 균사체의 적정량(100 mg)을 effendorf 튜브에 넣고 -70°C에서 동결시켰다. 동결된 샘플을 glass bead를 이용해 마쇄한 다음 400 µl의 extraction buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl, 30 mM EDTA, 0.5% SDS]와 proteinase K (50 µg)를 첨가하여 37°C에서 1시간 처리하였다. 다음은 400 µl의 2×CTAB solution [2% CTAB (w/v), 100 mM TrisHCl (pH8.0), 20 mM EDTA (pH 8.0), 1.4 M NaCl, 1% PVP (polyvinylpyrrolidone)]을 첨가하여 잘 섞어 준 후 600 µl의 chloroform: isoamylalcohol (24 : 1)로 추출하고 12,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 상등액을 1.5 ml tube에 넣었다. 상등액에 0.7 배량의 isopropanol을 첨가하고 실온에서 10분간 방치한 후 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 하였다. 침강된 DNA는 70% ethanol을 이용해 같은 방법으로 세척하였다. 튜브내의 ethanol을 제거, 건조시킨 후 DNA를 50 µl의 TE buffer에 녹인 다음 2 µl (10 mg/ml)의 RNase를 첨가하여 RNA를 제거 한 후 agarose gel에 전기영동하여 DNA를 확인 및 정량하였다.

다. *Alternaria* spp. (*A. brassicae*, *A. brassicicola*, *A. japonica*)의 특이적 primer 선발
- GenBank에 공개된 *Alternaria* spp. (*A. brassicae*, *A. brassicicola*, *A. japonica*)의 genome 유전자 염기서열 정보를 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 염기서열 Blast 분석 프로그램을 이용해 비교분석하여 특이적 염기서열 단편 부분을 확인하였으며, 이러한 특이적 염기서열은 Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu>)를 이용하여 *A. brassicae*의 specific primer set (Abrae 1F/Abrae 1R), *A. brassicicola*의 specific primer set (Abcola 1F/Abcola 1R), *A. japonica*의 specific primer set (Aljap 1F/Aljap 1R)를 각각 설계하였다.

라. *Alternaria* spp. (*A. brassicae*, *A. brassicicola*, *A. japonica*)의 특정 유전자 서열 부분의 특이적 primer를 이용한 PCR 증폭 및 각 primer 세트의 PCR 증폭을 통한 특이성 확인

- 다양한 기주 식물로부터 분리된 32개 *Alternaria* spp.와 6개의 다른 *A. brassicicola* 균주, 1개의 다른 *A. japonica* 균주, 7개 곰팡이 병원균 균주(*Pytophthora capsici*, *Phytophthora infestans*, *Podosphaera xanthii*, *Magnaporthe oryzae*, *Colletotrichum cocodes*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*), 5개 세균성 병원균 균주(*Paenibacillus kribbensis* (T9), *Lysinibacillus sphaericus* (TC1), *Bacillus velezensis* (G341), *Bacillus amyloliquefaciens*, *Ralstonia solanacearum*)로부터 추출한 Genomic DNA를 template로 이용하여 PCR 증폭을 실시하였다.

- 증폭을 위한 반응 mixture는 total volume을 20 μ l로 하고 template DNA 10 ng, 각 primer set 10 pmole, 2.5 mM dNTPs, 10 \times PCR buffer 2 μ l, 10 mM MgCl₂, Taq DNA Polymerase 2 unit (Intron Biotechnology Inc.)을 첨가하여 PCR을 수행하였다. 유전자의 증폭은 initial denaturation을 95°C에서 7분간 실시한 후 denaturation 95°C/45초, annealing 65°C/30초, extension 72°C/ 30초로 30 cycles을 실시하고 final extension을 72°C/10분 실시하였다. BioRad사의 iCycler을 이용하여 PCR 증폭을 하였으며 증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 100 V에 30분간 전기 영동하여 ethidium bromide로 염색한 후 관찰하였다.

1) *Alternaria brassicae* : 발굴한 프라이머 세트가 *Alternaria brassicae*에 특이적인 프라이머임을 확인하였다.

Alternaria acalyphae
Alternaria alternata
Alternaria arborescens
***Alternaria brassicae* KACC 46634**
Alternaria brassicicola
Alternaria calendulae
Alternaria carthami
Alternaria cassiae
Alternaria citri
Alternaria crassa
Alternaria dauci
Alternaria dianthi
Alternaria gaisen
Alternaria gossypina
Alternaria helianthi
Alternaria iridicola
Alternaria japonica
Alternaria kikuchiana
Alternaria longipes
Alternaria longissima
Alternaria macrospora
Alternaria mali
Alternaria padwickii
Alternaria panax
Alternaria porri



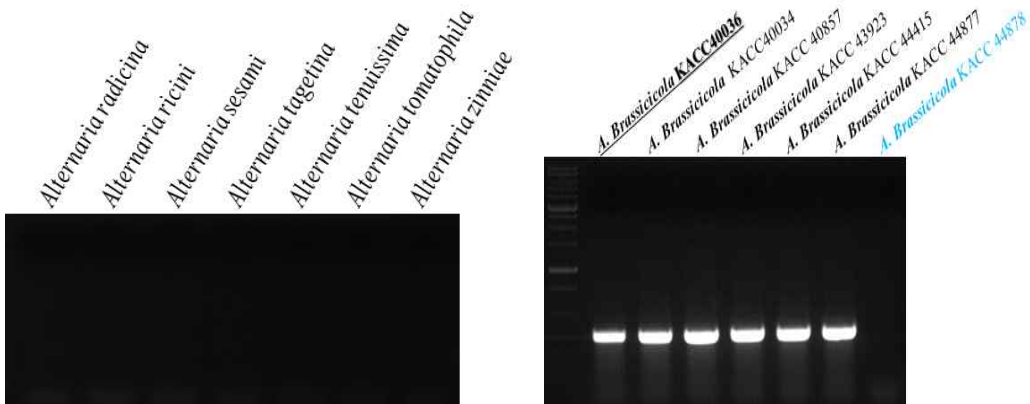
Alternaria radicina
Alternaria ricini
Alternaria sesami
Alternaria tagetina
Alternaria tenuissima
Alternaria tomatophila
Alternaria zinniae



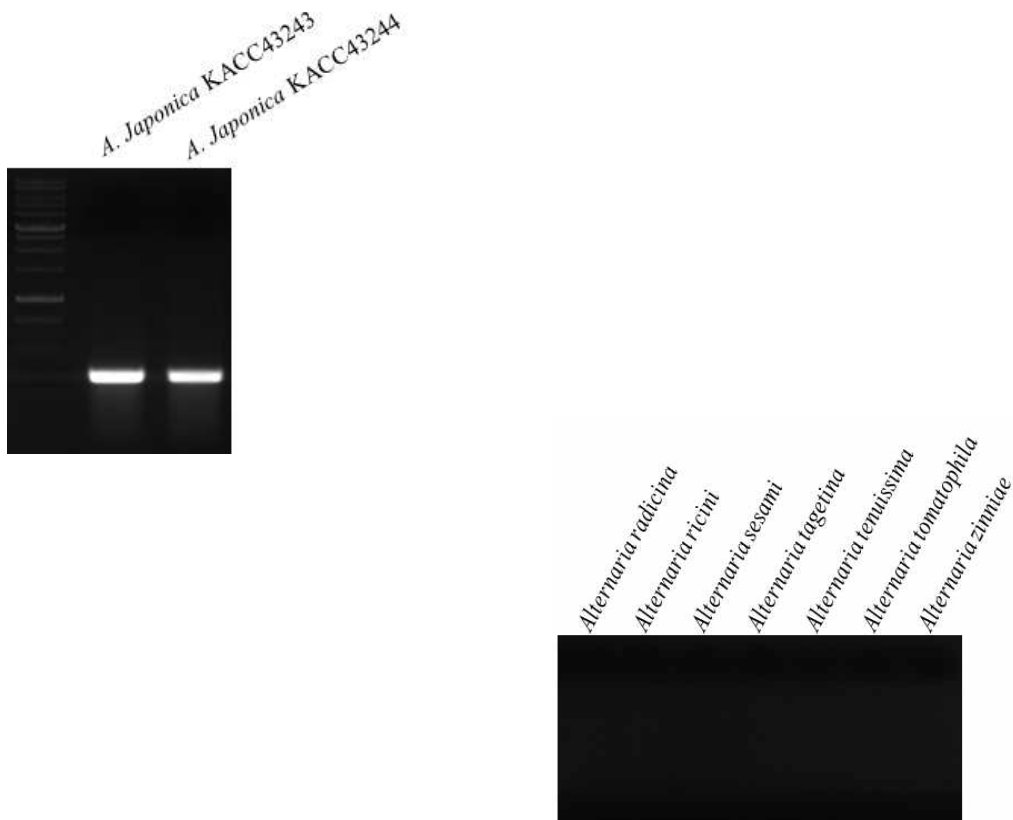
***Alternaria brassicae* KACC 46634**
Pytophthora capsici
Pytophthora infestans
Podosphaera xanthii
Magnaporthe oryzae
Colletotrichum cocodes
Fusarium graminearum
Fusarium verticillioides
Paenibacillus kribbensis (T9)
Bacillus sphaericus (TC1)
Bacillus velezensis (G341)
Ralstonia solanacearum



2) *Alternaria brassicicola* : 발굴한 프라이머 세트가 *Alternaria brassicicola*에 특이적인 프라이머임을 확인하였다.



3) *Alternaria japonica* : 발굴한 프라이머 세트가 *Alternaria japonica*에 특이적인 프라이머임을 확인하였다.



Alternaria acalyphae
Alternaria alternata
Alternaria arborescens
Alternaria brassicae
Alternaria brassicicola
Alternaria calendulae
Alternaria carthami
Alternaria casviae
Alternaria citri
Alternaria crassa
Alternaria dauci
Alternaria dianthi
Alternaria gaisen
Alternaria gossypina
Alternaria helianthi
Alternaria iridicola
***Alternaria japonica* KACC 4324**
Alternaria kikuchiana
Alternaria longipes
Alternaria longissima
Alternaria macrospora
Alternaria mali
Alternaria padwickii
Alternaria panax
Alternaria porri



***Alternaria japonica* KACC 4324**
Pytophthora capsici
Phytophthora infestans
Podosphaera xanthii
Magnaporthe oryzae
Colletotrichum oryzae
Fusarium cocodes
Fusarium graminearum
Paenibacillus verticillioides
Lysinibacillus kribbensis (T9)
Bacillus sphaericus (TC1)
Bacillus velezensis (G341)
Ralstonia solanacearum



제 5절. 무의 주요 병해에 대한 효율적인 대량 검정 기술 개발

1. 무 시들음병 저항성 검정법 개발(업그레이드)

- 무의 시들음병은 1934년 미국 캘리포니아 San Benito에 있는 White Chinese Winter Radish 채종포에서 처음 보고된 이후 1946년 위스콘신 Waukesha의 무 포장에서 발생하는 발생되며 현재에는 미국 각지에서 발생하고 있음(Pound, 1959; Pound and Fowler, 1953). 우리나라에서는 1981년 청원군 미농 재배단지에서 처음 발견되었으며, 계속된 연작으로 인해 시들음병 발생은 점차 증가되고 있는 추세임(Moon 등, 2001; Nam, 1994).
- 배추과 작물에 시들음병을 일으키는 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*는 예전에는 각 작물에 대한 균주의 병원성에 따라 5그룹으로 구분하였으나(Armstrong과 Armstrong, 1952; 1966; 1981; Ramirez-Villupadua 등, 1985), 이후 기타 작물과 무에 대한 병원성 차이가 커서 무를 침입하는 병원균은 *F. oxysporum* f. sp. *raphani* 그리고 기타 작물에 병원성을 보이는 것은 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*로 분류되었음(Brayford, 1992).
- 현재 무 시들음병에 저항성인 무 품종을 여러 회사에서 판매하고 있으나, 무 시들음병 저항성 유전자 규명과 저항성 유전양식 그리고 분자마커 개발에 관한 보고가 부족함(Baik 등, 2011).
- 이들 연구를 위해서는 효율적이고 신뢰할 수 있는 병 저항성 검정법의 연구가 필수적임에 따라 효율적인 무 시들음병에 대한 저항성 검정법을 확립하여 저항성 검정을 수행하고 있었음.
- 기존 연구를 통해 확립된 방법을 이용하여 병 저항성을 검정하던 중 문제점을 발견하였다. 선행연구에서 무 41품종 중 저항성을 보이는 상위 10품종에 대한 무 시들음병 저항성 검정을 수행한 결과, 명산과 같은 높은 저항성을 보이던 품종에서도 4.3의 높은 발병도를 보이는 것처럼 모든 선발된 품종에서 2.1이상의 높은 발병도를 나타냄(Fig. 1).
- 따라서 보다 정확하고 안정적인 무 시들음병 병리검정을 위하여 접종 농도, 접종하는 무의 생육 시기, 광조건 등의 다양한 요소에 따른 무의 시들음병 발생을 조사하여 무 시들음병에 대한 저항성 검정 방법을 확립하는 것이 필요함.

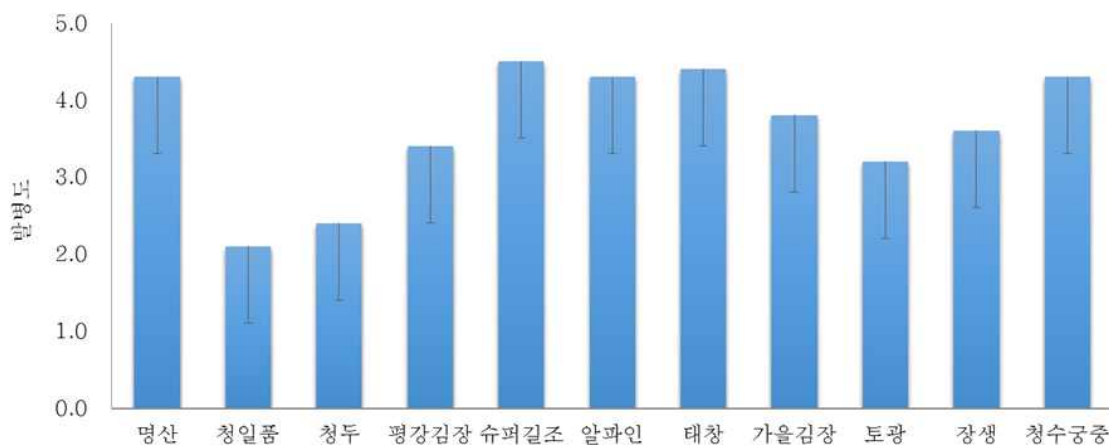


Fig. 1. 기존 방법을 이용한 시판 중인 무 41품종 중 저항성을 보인 상위 10품종의 무 시들음병 저항성.

가. 저항성 검정법 개선을 위한 다양한 발병 조건에 따른 무 시들음병 저항성 정도

- o Baik 등(2010)에 의해 수행된 무 시들음병 저항성 스크리닝을 위해 농도별 접종을 수행한 결과에서 접종 농도가 증가함에 따라 시들음병의 발생이 증가하였음.
- o 따라서 무 시들음병에 저항성 검정에 중요한 요소인 접종 농도별 무 시들음병의 발생 정도를 재확인하고자 무 시들음병 대조 품종인 저항성 품종 ‘명산’, 감수성 품종 ‘청수궁중’에 대한 무 시들음병의 접종을 수행하였음.
- o 기존 접종 농도인 1.0×10^7 conidia/ml로 접종 시 감수성 품종 ‘청수궁중’에서는 4.2의 발병도를 보이며 효과적인 병 발생을 보이지만 저항성 품종 ‘명산’에서 1.3의 발병도를 보이며 저항성을 효과적으로 나타내지 못하고 있으며, 가장 저농도로 설정된 1.2×10^5 conidia/ml에서도 저항성 품종 ‘명산’의 발병도는 1.1로 그다지 효과적이지 못하나 감수성 품종 ‘청수궁중’의 병 발생이 3.4로 낮아짐에 따라 낮은 농도의 접종도 효과적이지 못함(Table 1).
- o 접종 농도에 따른 변화가 효과적이지 못한 것으로 판단됨에 따라 다른 요소에 의한 무시들음병 저항성 검정 업그레이드에 대한 접근이 필요할 것으로 보임.

Table 1. 접종원 농도에 따른 무 시들음병의 발생

품종	특성	접종원 농도 (conidia/ml)				
		1.2×10^5	3.6×10^5	1.1×10^6	3.3×10^6	1.0×10^7
명산	R	1.1 ± 0.6	1.2 ± 0.4	1.2 ± 0.6	1.3 ± 0.7	1.3 ± 0.5
청수궁중	S	3.4 ± 1.6	2.8 ± 1.8	2.9 ± 2.2	3.3 ± 1.7	4.2 ± 1.3

- o 접종 농도를 조절하여도 저항성 무 품종의 저항성이 잘 발현되지 않아 새로운 조건 변화가 필요하였음. 기존 방법에서는 무 유묘를 접종하고 dew chamber에서 꺼낸 직후 이식한 식물이 적응할 수 있도록 1일간 암상태로 관리하는 것을 바로 광을 조사하는 것으로 변경하고, 기존에 14일 동안 재배한 무 유묘를 실험에 사용하였으나 이를 파종 후 11일 동안 재배하여 기존 정립된 조건보다 작은 생장 단계에 병원균을 접종하여 병 저항성을 조사하였음.
- o 생장 단계와 광조건 변화하여 저항성 상위 10품종에 대한 무 시들음병 저항성을 조사한 결과, 저항성 품종 ‘명산’에서 1.0의 발병도를 보였으며 나머지 9품종도 모두 2.1이하의 발병도를 나타내 무 품종들의 저항성이 잘 발현되었음을 알 수 있음(Fig. 2).
- o Dew chamber에서 꺼낸 후 식물이 적응할 수 있도록 1일간 암상태로 관리하는 단계의 제거가 가능성이 확인되었으며, 발병 조건 중 생장 단계가 효과적인 저항성 발현에 중요한 요소로 판단됨.

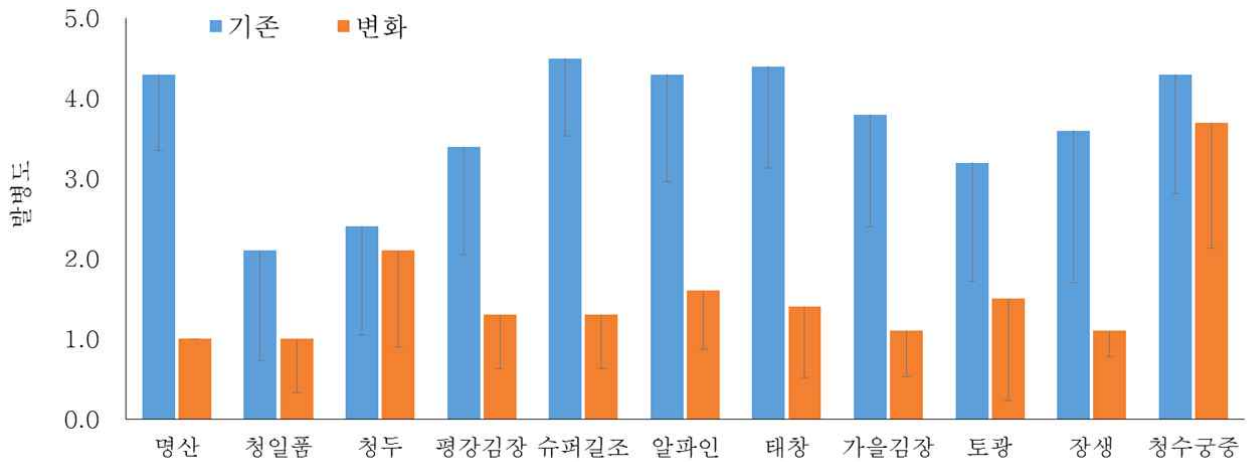


Fig. 2. 성장 단계와 광조건 변화에 의한 10개 저항성 품종의 무 시들음병에 대한 저항성 변화.

나. 무 유묘의 성장 단계 표준화

- 앞의 실험에서 무 유묘의 생육 시기가 무 품종의 저항성 발현에 중요한 요인임을 알 수 있었음. 하지만 무의 생육은 재배시기에 따라 상당히 다르므로 무 유묘의 성장 단계에 대한 기준이 필요하다고 생각되었음.
- 무 유묘 성장 단계의 표준화를 통하여 재배시기와 관계없이 일정한 생육 시기의 무 유묘를 실험에 사용할 수 있으리라 예상되었음.
- 다음과 같이 무의 성장 단계를 표준화함(Fig. 3).
 - A, 1엽 미전개, 1엽 떡잎보다 작거나 비슷함;
 - B, 1엽 거의 전개, 2엽 1엽의 1/3;
 - C, 1엽 완전 전개, 2엽 1엽의 1/2;
 - D, 1엽 완전 전개, 2엽 1엽의 2/3;
 - E, 2엽 완전 전개, 3엽 2엽의 1/2).

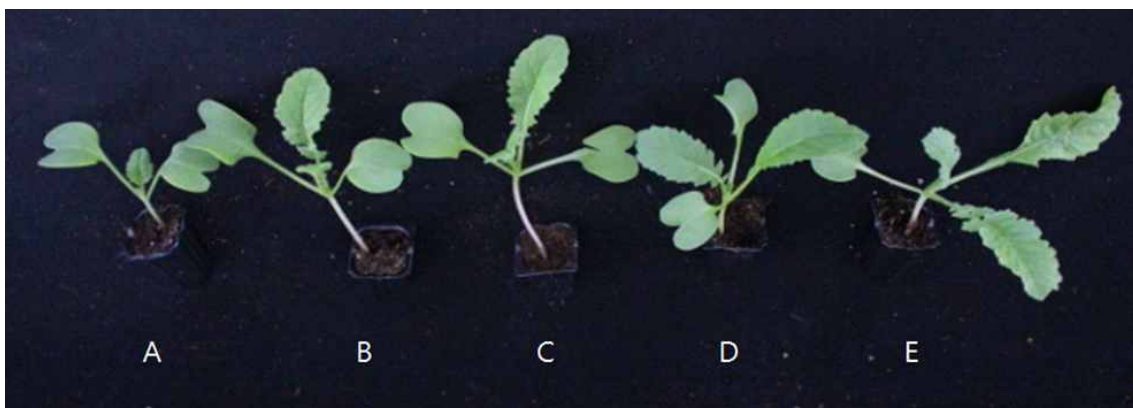


Fig. 3. 무 유묘의 성장 단계 표준화. A, 1엽 미전개, 1엽 떡잎보다 작거나 비슷함; B, 1엽 거의 전개, 2엽 1엽의 1/3; C, 1엽 완전 전개, 2엽 1엽의 1/2; D, 1엽 완전 전개, 2엽 1엽의 2/3; E, 2엽 완전 전개, 3엽 2엽의 1/2.

다. 무의 생장 단계에 따른 무 시들음병 저항성 정도

- 저항성 검정에 최적의 생장 단계를 확인하고자 표준화한 생장 단계에 따라 준비된 저항성 품종 ‘명산’, 중도저항성 품종 ‘장생’, 그리고 감수성 품종 ‘청수궁중’에 대한 무 시들음병 저항성을 조사하였음.
- 저항성 품종인 ‘명산’의 경우 8, 10, 12, 14, 16일 동안 재배하여 준비한 Fig. 3의 A-D 생장 단계의 무 유묘에 시들음병균을 1.0×10^7 conidia/ml 포자 농도로 접종하였을 때 각각 1.0, 1.0, 1.3, 1.3, 1.7의 발병도를 보였으며, 생장 단계가 올라갈수록(재배 기간이 길어질수록) 저항성이 낮아지는 경향을 나타냈음.
- 감수성 품종인 ‘청수궁중’은 A-C 생장 단계에서는 3.3 이상의 발병도를 보였으나, D와 E로 재배 기간이 길어질수록 3.0과 2.7의 발병도를 보여 재배 기간이 길어지면 감수성 품종의 특성을 잘 나타내지 못하고 있음(Table 2).
- 감수성 품종 ‘청수궁중’은 A-C의 생장 단계에서 높은 감수성을 보이며, 저항성 품종 ‘명산’이 A-B 시기에 1.0 이하의 발병도를 보이며 저항성 특성을 잘 나타냄.
- 따라서 저항성 품종과 감수성 품종의 특성이 각각 잘 나타나는 생장 단계인 A와 B 시기의 식물체, 특히 품종 간의 발병도 차이가 가장 큰 생장 단계 A의 무 유묘를 사용하여 접종하면 가장 효과적인 저항성 검정이 가능 할 것임.

Table 2. 생장 단계에 따른 무 시들음병의 발생

품종	특성	생장 단계(재배 기간) ^a				
		A(8일)	B(10일)	C(12일)	D(14일)	E(16일)
명산	R	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.0	1.3 ± 0.9	1.3 ± 1.0	1.7 ± 1.1
장생	MR	1.3 ± 0.8	1.3 ± 0.7	1.4 ± 0.7	1.5 ± 1.3	1.1 ± 0.7
청수궁중	S	3.5 ± 1.6	3.3 ± 1.8	3.9 ± 1.8	3.0 ± 1.9	2.7 ± 2.0

^aA, 1엽 미전개, 1엽 떡잎보다 작거나 비슷함; B, 1엽 거의 전개, 2엽 1엽의 1/3; C, 1엽 완전 전개, 2엽 1엽의 1/2; D, 1엽 완전 전개, 2엽 1엽의 2/3; E, 2엽 완전 전개, 3엽 2엽의 1/2.

라. 접종 농도에 따른 무 시들음병 저항성 정도

- 생장 단계에 따른 무 시들음병 저항성 정도를 확인한 결과에 따라 적정 생장 단계로 선정된 A 단계(1엽 미전개, 1엽 떡잎보다 작거나 비슷함)와 B 단계(1엽 거의 전개, 2엽 1엽의 1/3)의 무 유묘를 사용하여 접종 농도에 따른 무 품종의 저항성 정도를 조사하였음.
- 생장 단계 A와 B의 식물체의 무 저항성 정도를 *F. oxysporum* f. sp. *raphani* 세 가지 포자 농도(1.1×10^6 , 3.3×10^6 , 1.0×10^7 conidia/ml)로 접종하여 조사한 결과, 생장 단계 A는 모든 농도에서 저항성 품종인 ‘명산’은 발병도에 큰 차이를 보이지 않으나, 생장 단계 B의 ‘명산’ 품종은 A보다 낮은 저항성을 나타냈음(Table 10).
- 감수성 품종인 ‘청수궁중’은 생장 단계 B시기의 경우에는 감수성 특성은 잘 나타내고 있으나, 생장 단계 A에서는 접종 농도가 낮아짐에 따라 감수성 품종인 ‘청수궁중’의 발병도는 낮아졌음(Table 3).
- 따라서 저항성 및 감수성 품종 각각의 특성을 가장 잘 나타내는 1.0×10^7 conidia/ml농도의 접종원을 이용하여 접종하는 방법이 가장 효과적일 것으로 판단됨(Table 3).

Table 3. 접종 농도에 따른 무 시들음병의 발생

생장 단계 ^a (재배 기간)	접종 농도 (conidia/ml)	품종		
		명산	장생	청수궁중
A (11일)	1.1×10^6	0.9 ± 0.9	3.4 ± 1.4	3.9 ± 1.3
	3.3×10^6	1.1 ± 0.3	2.2 ± 1.1	4.5 ± 0.8
	1.0×10^7	0.9 ± 0.3	2.7 ± 1.3	4.9 ± 0.3
B (13일)	1.1×10^6	1.6 ± 1.0	2.5 ± 1.2	4.6 ± 0.7
	3.3×10^6	1.9 ± 1.4	3.4 ± 1.4	3.8 ± 1.8
	1.0×10^7	1.2 ± 0.8	2.9 ± 1.0	4.3 ± 1.5

^aA, 1엽 미전개, 1엽 떡잎보다 작거나 비슷함; B, 1엽 거의 전개, 2엽 1엽의 1/3.

2. 무 검은무늬병에 대한 효율적인 병리검정 체계 확립

가. 서론

Alternaria에 의한 식물병은 전세계적으로 다양한 기주에서 발생하고 있으며, Alternaria병에 의한 경제적인 손실은 어떤 식물병원균에 의한 것보다 높은 비율을 차지하고 있다(Agrios, 2005). 또한, 각종 작물의 잎, 줄기뿐만 아니라 농산물을 감염하거나 종자를 오염시켜 피해를 주고 있으므로 농업환경 내에서 발생 분포가 매우 넓다고 하겠다(Lee and Yu, 1995). 세계적으로 배추과 작물(Brassicaceae)에 병을 일으키는 Alternaria로는 *A. brassicae*, *A. brassicicola*, *A. japonica* 그리고 *A. alternata*가 보고되었다(Nowicki et al., 2012). 이 중 무(*Raphanus sativus* L.)에 발생하는 검은무늬병은 *A. brassicicola*, *A. brassicae* 그리고 *A. japonica* (= *A. raphani*)에 의해 발생한다(Yu et al., 1991; KSPP, 2009).

무에 Alternaria 검은무늬병균이 감염되면 초기 잎에 진한 갈색-검정색의 점무늬를 나타내다가 점차 둥근형 또는 타원형으로 병반이 확대되면서 연한 갈색-회갈색의 윤문을 형성하고 병반 가장자리에 검은색의 둥근 테두리가 형성되거나 주위에 황색-녹황색의 무리가 생기기도 한다. 결국 심하게 병든 잎은 여러 개의 병반이 합쳐지며 병반 주위가 회갈색-회황색으로 변하고 잎이 말라 죽게 된다(Yu et al., 1991).

배추과 작물의 검은무늬병은 기주 범위와 포자의 비산 범위가 넓어 방제가 어려운 균이다(King, 1994). 이 병을 방제하는 가장 일반적인 방법으로 합성 살균제가 사용되고 있지만(Mora and Earle, 2001; Iacomi-Vasilescu et al., 2004), 인체와 동물 그리고 환경에 대한 독성 화학 농약 사용에 대한 우려가 증가하고 있다(Muto et al., 2005). 그러므로 이 병을 방제하기 위한 가장 친환경적이고 경제적인 방법은 저항성 품종의 재배일 것이다(Iacomi-Vasilescu et al., 2004).

King(1994)에 의해 *A. brassicicola*에 저항성인 *Brassica napus*와 *B. oleracea*의 유전자형이 보고되었다. 그리고 배추과 작물인 *Camelina sativa*와 *Capsella bursapastoris*가 Alternaria 병원균에 대하여 높은 저항성을 나타내는 것으로 알려졌다(Conn et al., 1988; King, 1994). 그러나 Tewari and Mithen(1999)는 거의 모든 상업적인 Brassica들은 *A. brassicicola*와

*A. brassicae*에 감수성이고, *B. rapa*와 *B. juncea*는 *A. brassicae*균주에 대해 *B. napus*와 *B. carinata*보다 더 감수성이라고 보고하였다. 이와 같이 검은무늬병에 대한 저항성이 보고된 배추과 작물이 있음에도 불구하고 상업적으로 저항성을 나타내는 품종이 판매되지 못하고 있는 실정이다(Iacomi-Vasilescu et al., 2004; Muto et al., 2005).

따라서 검은무늬병에 대한 저항성 품종을 개발하기 위해서는 신규 저항성 유전자원 발굴, 저항성 유전자의 규명, 저항성 유전 양식 및 저항성 품종 육성을 위한 분자 표지 개발 등에 대한 연구가 시급하다. 이들 연구를 위해서는 효율적이고 신뢰할 수 있는 무 검은무늬병 저항성 검정 방법의 확립이 필요하다. *B. napus*, *B. juncea* 또는 *B. rapa*에서는 식물 성장단계, 습도 기간, 접종 농도, 접종 방법, 재배 온도 등의 주요 요인과 *A. brassicicola*와 *A. brassicae*에 의한 검은무늬병 발생에 관한 연구가 수행되었다(Mridha and Wheeler, 1993; King, 1994; Hong and Fitt, 1995; Hong et al., 1996; Doullah et al., 2006). 하지만, 우리나라의 5대 채소 중 하나인 무에 큰 피해를 주고 있는 무 검은무늬병에 대해서는 거의 연구가 이루어지지 못하였다.

본 연구에서는 효율적인 무 검은무늬병 저항성 검정법을 확립하고자, 광 조사기간에 따른 *A. brassicicola* 균주들의 포자 형성량과 병원성을 조사하여 저항성 검정에 사용할 균주를 선발하고, 이 검은무늬병균에 대한 시판 중인 무 61개 품종의 저항성 정도를 조사하고, 저항성 정도가 다른 4개의 무 품종을 선발하여 생육 정도, 접종원 농도 및 재배 온도 등의 발병 조건에 따른 이들 품종의 *A. brassicicola*에 의한 검은무늬병 발생을 조사하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 광처리 시간에 따른 *A. brassicicola* 7균주의 포자 형성량 조사

농촌진흥청 농업유전자원센터(KACC)로부터 무 검은무늬병균 *A. brassicicola* 7균주(KACC 40034, 40036, 40857, 43923, 44415, 44877, 44878)를 분양받아 실험에 사용하였다.

A. brassicicola 7개 균주들의 광처리 기간에 따른 포자 형성량을 조사하고자 각각의 균주를 potato dextrose agar(PDA; Becton, Dickinson and Co.) 배지에 접종하고 25°C에서 7일간 전배양하여 형성된 균총으로부터 균사조각을 떼어내 직경 8.5cm Petri dish의 V-8 juice agar[V8 agar; V-8 Juice(V8 Campbell Soup Co.) 200mL, CaCO₃ 3g (Samchun Chem. Co., Ltd.), Agar (Junsei Chemical Co., Ltd.) 18g, distilled water 800mL] 배지 중앙에 1조각씩 올려놓고 알루미늄 호일로 싸서 암상태가 되도록 한 후에 25°C에서 7일 동안 배양 하였다. 배양한 검은무늬병균 plate의 뚜껑을 열고 25°C 항온항습실(상대습도 80%)에서 하루에 12시간씩 광(55 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)을 처리하면서 1일 또는 2일간 배양한 후에 배지에 멸균수 20 mL를 넣고 멸균한 붓으로 긁어 포자를 수확하였다. 그리고 4겹의 거즈로 걸러서 균사체를 제거하고 광학현미경 하에서 hemocytometer를 이용하여 mL 당 포자의 수를 조사하고 이를 각 배지 plate에 형성된 포자의 수로 환산하였다. 실험은 처리 당 3개의 plate를 사용하였으며, 각 실험은 2회 반복하여 실시하였다.

(2) 식물 재배

시판중인 무 품종 61개(‘금봉’, ‘백춘’, ‘가을김장’, ‘새름’, ‘전무후무’, ‘하우스청옥’, ‘백동’, ‘명산’, ‘장생’, ‘보석알타리’, ‘태창’, ‘청풍명월’, ‘한농알타리’, ‘강성’, ‘알파인’, ‘극동’, ‘빛고은열무’, ‘명가가을1호’, ‘제일슈퍼시래기’, ‘아우리월동’, ‘슈퍼길조’, ‘우정알타리’, ‘평강김장’, ‘백옥’, ‘초롱’, ‘YR참피온열무’, ‘비바리월동’, ‘태광’, ‘백자’, ‘산나리열무’, ‘백세1호’, ‘청운플러스’, ‘참조아열무’, ‘슈퍼모델’, ‘제일건강시래기1호’, ‘송백’, ‘제일보라’, ‘미농조생’, ‘선봉알타리’, ‘초비’, ‘길조’, ‘시래

기, ‘만사형통’, ‘동하’, ‘박자’, ‘대박’, ‘청일품’, ‘아시아가을저장’, ‘관동여름’, ‘토광’, ‘여름춘향이열무’, ‘대들보’, ‘칭두’, ‘칭수궁중’, ‘태청’, ‘칭운’, ‘대동’, ‘탐스런’, ‘강추’, ‘장형봄’, ‘대평여름’)의 종자를 시중에서 구입하여 실험에 사용하였다.

A. brassicicola 7개 균주들의 무에 대한 병원성 실험은 ‘한농알타리’(동부팜한농)와 ‘미농조생’(아시아종묘)을 그리고 발병 조건에 따른 무 품종 등의 검은무늬병 발생 실험은 ‘금봉’(권농종묘), ‘새롬’(신젠타), ‘토광’(동부팜한농), ‘대평여름’(신젠타) 네 품종을 사용하였다.

무의 생육 정도에 따른 검은무늬병 발생 실험을 제외한 모든 실험에서는 무 종자를 5 × 8 육묘용 연결 포트(70 mL/pot, 범농사)에 원예용상토 5호(부농사)를 넣고 포트 당 2립씩 파종하고 온실(25 ± 5°C)에서 재배하였다. 종자가 발아한 후 생장이 고른 개체로 포트 당 1주씩 남기고 슈아 주었다. 파종 후 13-16일 동안 재배한 유묘를 실험에 사용하였다. 그리고 무의 생장 정도에 따른 검은무늬병 발생 실험은 앞에서와 동일한 방법으로 파종하고 온실(25 ± 5°C)에서 10, 13, 16, 19일 동안 재배한 유묘를 실험에 사용하였다.

(3) 접종원 준비

A. brassicicola 7개 균주들의 무에 대한 병원성 실험을 위해서는 ‘*A. brassicicola* 7균주의 광처리 시간에 따른 포자 형성량 조사’ 실험에서 수확한 포자를 사용하여 포자 농도가 5.0×10^5 spores·mL⁻¹인 포자현탁액을 준비하였다. 그리고 *A. brassicicola* KACC 40036을 다양한 포자 농도로 접종하여 병원성을 조사하는 실험을 위해서는 포자현탁액의 포자 농도가 각각 3.7×10^3 , 1.1×10^4 , 3.3×10^4 , 1.0×10^5 , 3.0×10^5 spores·mL⁻¹이 되도록 조정하였다.

A. brassicicola 균주들의 병원성 실험을 제외한 나머지 실험은 *A. brassicicola* KACC 40036 균주를 PDA 배지에 접종하고 25°C에서 7일간 배양한 균총으로부터 균사조각을 떼어내어 직경 8.5cm Petri dish의 V-8 juice agar 배지에 3조각씩 올려놓고 25°C에서 7일 동안 배양하였다. 그리고 이 Petri dish의 뚜껑을 열고 25°C 항온항습실(상대습도 80%)에서 하루에 12시간씩 광($55 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)을 조사하면서 1일간 배양한 후에 ‘광처리 시간에 따른 *A. brassicicola* 7균주의 포자 형성량 조사’ 실험과 동일한 방법으로 포자를 수확하고 포자 농도를 측정하였다.

A. brassicicola 균주들의 병원성 실험과 접종원 농도에 따른 4개 품종들의 저항성 정도 실험을 제외한 모든 실험은 포자현탁액의 포자 농도를 2.0×10^5 spores·mL⁻¹로 조정하여 사용하였고, 접종원 농도에 따른 검은무늬병 발생 실험을 위해서는 포자현탁액의 포자 농도가 각각 2.5×10^4 , 5.0×10^4 , 1.0×10^5 , 2.0×10^5 spores·mL⁻¹가 되도록 준비하였다.

(4) 접종 및 병조사

A. brassicicola 7개 균주의 병원성과 재배 온도에 따른 무 검은무늬병 발생 실험을 제외한 모든 실험은 *A. brassicicola* KACC 40036의 포자현탁액을 무 유묘가 충분히 젖도록 분무 접종한 후에 25°C 습실상에서 암상태로 24시간 동안 배양하였다. 습실처리한 유묘는 항온항습실(25°C, 상대습도 80%)로 이동하여 하루에 12시간씩 광($55 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)을 처리하며 재배하여 병 발생을 유도하였고, 접종 2일 후에 잎에 발생한 검은무늬병의 병반면적율(%)을 달관조사 하였다.

A. brassicicola 7개 균주의 병원성 실험은 앞에서 같이 동일한 방법으로 접종하고 25°C 습실상에서 48시간 배양한 후에 항온항습실(25°C, 상대습도 80%)에서 1일 동안 재배한 후에 병조사 하였다. 그리고 재배온도에 따른 무 검은무늬병 발생 실험은 *A. brassicicola* KACC

40036을 앞에서와 같은 방법으로 접종하고 각각 20, 25, 30°C 습실상에 넣고 48시간 동안 배양한 후에 검은무늬병 발생 정도를 조사하였다.

시판 중인 무 61개 품종의 *A. brassicicola*에 대한 저항성 정도 실험은 10반복씩 2회 수행하였으며, 나머지 모든 무 검은무늬병 발생 실험은 5반복으로 2회 수행하였다. 그리고 SAS(SAS 9.1, SAS Institute Inc., USA) 프로그램을 이용하여 ANOVA 분석을 하였으며, 처리 평균간 비교를 위하여 Duncan's multiple range test($P = 0.05$)를 실시하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) *A. brassicicola* 7균주의 광처리 시간에 따른 포자 생산량 및 병원성

광($55 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)을 조사한 기간에 따른 *A. brassicicola* 7개 균주(KACC 40034, 40036, 40857, 43923, 44415, 44877, 44878)의 포자 형성량을 실험한 결과, 7균주 모두 암상태에서 7일 동안 배양하였을 때에는 hemocytometer로 포자 형성량을 조사하기 어려울 정도로 적은 양의 포자가 형성되었으나(결과 미제시), 광을 처리하였을 때에는 실험한 균주 모두 포자 형성량이 크게 증가하여 6.0×10^6 개부터 1.4×10^8 개의 많은 포자가 형성되었다(Table 4). 하지만 광을 하루에 12시간씩 1일 또는 2일 처리에 의한 포자 형성량은 통계적으로 유의성 있는 차이를 보이지 않았다. 따라서 *A. brassicicola*의 포자 형성을 위한 광($55 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 조사는 1일이면 충분하다고 생각되었다.

실험한 균주 중 KACC 40036과 KACC 43923은 가장 많은 포자를 형성하였는데 1일 광처리후에 각각 plate 당 1.1×10^8 , 1.4×10^8 개의 포자를 형성하였다(Table 4). 그리고 KACC 44878은 포자 형성이 가장 적었으며 1일 광처리에 의해 plate 당 6.0×10^6 개를 생산할 뿐이었다.

A. brassicicola 7개 균주들의 무에 대한 병원성 검정을 검정하고자 2개 무 품종(한농알타리, 미농조생)에 병원균을 분무 접종하고 검은무늬병 발생을 실험한 결과, 실험한 균주 모두는 무 유묘에 분무접종하고 3일 후에 유묘 전체가 고사하였다(Table 4). 따라서 7균주의 병원성 실험에서 접종한 유묘가 모두 고사한 것은 다른 실험들이 24시간 습실처리한 것과 달리 48시간 동안 습실처리하여 검은무늬병이 심하게 발생한 것으로 생각되었다. 그리고 KACC 40036 균주의 포자현탁액을 5가지 농도로 하여 두 품종의 무 유묘에 접종하고 24시간 습실처리하고 2일 후에 발병 정도를 조사한 결과, 두 품종 모두 접종한 포자 농도 의존적으로 검은무늬병이 발생하였다. 비병원성 균주는 습실처리 시간을 길게 하여도 병이 발생하지 않으므로, 실험한 *A. brassicicola* 균주는 모두 무에 대하여 강한 병원성이 있다는 것을 알 수 있었다.

많은 연구자들은 *A. brassicicola*의 포자 형성을 위해 암상태에서(Otani et al., 1998; Iacomi-Vasilescu et al., 2004; Doullah et al., 2006) 혹은 연속적인 광처리에서(Pedras et al., 2009) 혹은 하루에 12시간 광처리(Babadoost and Gabrielson, 1979; Muto et al., 2005; Köhl et al., 2010)를 하는 등 다양한 방법으로 *A. brassicicola*를 배양하였다. 하지만 대량시료의 무 검은무늬병 저항성 검정을 위해서는 효율적으로 *A. brassicicola*의 포자를 생산하는 것이 중요하다. 이를 위해서는 기존의 포자 형성 방법들을 비교하여 가장 효율적으로 *A. brassicicola*의 포자를 대량생산할 수 있는 방법을 선별하는 것이 필요하다. 기존 연구자들의 포자 형성 방법을 실험을 통해 비교한 결과, *A. brassicicola*를 암상태에서만 배양하였을 때에는 거의 포자가 형성되지 않았고, 대량의 포자를 생산하기 위해 병원균을 접종한 많은 plate를 펼쳐서 연속적으로 광상태에서 배양하는 것은 공간적으로 많은 제약이 따랐다. 이와 달리 plate를 쌓아서 공간을 적게 사용하면서 암상태에서 7일 동안 배양한 후에 이들을 펼쳐서

하루에 12시간씩 1일 혹은 2일 광을 처리하였을 때에는 용이하게 많은 양의 포자가 형성되었다.

따라서 무 검은무늬병 저항성 검정을 위한 *A. brassicicola*의 포자 형성을 효과적으로 유도하는 방법으로 V-8 juice agar 배지에 접종하고 7일 동안 배양한 후에 하루에 12시간씩 1일 동안 광($55 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)을 처리를 하는 방법을 확립하였다. 한편, *A. brassicicola*의 race 분화는 아직 보고된 바 없으므로 실험한 균주 중 *A. brassicicola* KACC 40036가 포자의 형태가 균일하고 다른 균주보다 많은 포자를 형성하였으므로, 이 균주를 무 검은무늬병 저항성 검정법을 확립을 위해 선발하였다. 그리고 향후 보다 정확한 무 검은무늬병 저항성 검정을 위해 다양한 저항성 유전자원을 확보한 후에 *A. brassicicola*의 race 분화에 관한 연구를 수행할 예정이다.

Table 4. Spore production of *Alternaria brassicicola* isolates by light treatment and pathogenicity of the fungus on two radish cultivars

KACC NO.	Photoperiod for spore production ^z		Cultivar ^y	
	1 day	2 days	Hannongaltari	Minongjosaeng
KACC 40034	80 ^{xcd^w}	88 bcd	100 ± 0.0 ^v	100 ± 0.0
KACC 40036	110 abc	82 cd	100 ± 0.0	100 ± 0.0
KACC 40857	92 bcd	91 bcd	100 ± 0.0	100 ± 0.0
KACC 43923	140 a	120 ab	100 ± 0.0	100 ± 0.0
KACC 44415	93 bcd	60 d	100 ± 0.0	100 ± 0.0
KACC 44877	67 d	71 d	100 ± 0.0	100 ± 0.0
KACC 44878	6 e	7 e	100 ± 0.0	100 ± 0.0

^zEach isolate inoculated on V-8 juice agar plate was incubated in dark condition at 25°C for 7 days, and then the plates were cultured under the fluorescent lamp ($55 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 12 hr/day) in a growth chamber (25°C, RH 80%).

^ySeedlings at three-leaf stage were inoculated by spraying spore suspension of the fungus at a concentration of 5.0×10^5 spores·mL⁻¹. The infected plants were incubated in a humidity chamber at 25°C for 48 hr and then transferred to a growth chamber at 25°C and 80% RH with 12-hour light a day. Percent diseased leaf area was scored 3 days after inoculation.

^xEach value represents the mean number ($\times 10^6$) of spores per plate of two runs with three replicates each.

^wValues labeled with the same letter are not significantly different based on Duncan's multiple range test at $p = 0.05$.

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

(2) 시판 무 61품종의 저항성

시판 중인 61개 무 품종의 *A. brassicicola* KACC 40036에 대한 저항성 정도를 조사하기 위하여 실험한 결과, 실험한 품종 중 높은 저항성을 나타내는 품종은 없었다. 하지만 ‘대평여름’ 등이 95% 이상의 병반면적율을 보이는 반면에 ‘금봉’, ‘백춘’, ‘새롬’ 등은 54-66%의 병반면적율을 보여 이들이 *A. brassicicola*에 대해 약간의 저항성을 나타낸다고 생각되었다(Table 5).

이들 품종 중 종자회사에서 검은무늬병에 대한 저항성으로 공시한 품종은 없었고 우리의 저항성 검정 결과에서도 강한 저항성 품종은 없었으므로, 무 검은무늬병 저항성 검정 체계확립을 위한 발병조건에 따른 무 검은무늬병 발생 실험을 위해 실험한 품종 중 높은 감수성을 보인 ‘토광’과 ‘대평여름’ 그리고 약한 저항성을 보인 ‘금봉’과 ‘새롬’을 선발하였다.

(3) 무 유묘의 생장 정도에 따른 검은무늬병 발생

무 4품종의 파종 시기를 다르게 하여 10, 13, 16, 19일 동안 재배한 유묘에 병원균 접종하고 무 유묘의 생육 시기에 따른 검은무늬병의 발생을 조사한 결과, 16일 재배한 유묘의 경우에는 ‘금봉’, ‘새롬’, ‘토광’, ‘대평여름’ 각각 82, 82, 95, 98%의 평균 병반면적율을 보였다(Fig. 4). 하지만 10일 또는 13일 재배한 유묘는 실험한 품종 모두에서 91% 이상의 높은 병반면적율을 보였으며, 19일 재배한 유묘는 감수성 품종인 ‘토광’과 ‘대평여름’이 각각 86%와 75%의 다소 낮은 병반면적율을 나타냈다(Fig. 4).

Doullah et al.(2006)은 *A. brassicicola*에 대한 저항성 *B. rapa* 품종은 30일 재배한 유묘의 잎에서는 강한 저항성을 나타내었지만 40일 재배한 식물의 잎에서는 경계선 상의 저항성을 나타냈으며, 감수성 품종도 생장 단계에 따라 서로 다른 병 발생 정도를 보이며 나이든 잎이 어린 잎에 비해 더 감수성을 나타낸다고 보고하였다. 하지만 본 실험에서는 10, 13, 16, 19일 동안 재배한 무 유묘의 검은무늬병 발생을 실험한 결과, 무 4품종의 평균 발병도는 각각 99, 96, 89, 74%로 무가 성장할수록 검은무늬병 발생은 감소하였다(Fig. 3). 이는 실험에 사용한 무 식물의 생장 정도가 서로 다르기 때문인 것으로 생각되었다. 본 실험은 저항성 품종 육성을 위한 대량검정법 개발을 목표로 실험하였기 때문에 유묘를 사용하였고, Doullah et al.(2006)은 30-40일 재배한 성숙한 식물을 사용하여 실험한 결과이다.

저항성 정도가 다른 그룹으로 나누어 살펴보면 비교적 약한 저항성을 보인 ‘금봉’과 ‘새롬’ 두 품종에 대한 10, 13, 16, 19일 재배한 유묘의 평균 병반면적율은 각각 98, 93, 82, 67%을, 그리고 감수성 품종 ‘토광’과 ‘대평여름’ 두 품종은 각각 100, 99, 97, 81%의 병반면적율을 보였다(Fig. 4). 따라서 품종의 저항성 정도와 관계없이 무가 성장할수록 검은무늬병 발생이 감소하는 것을 알 수 있었으며, 실험한 4가지 생육 시기 중 16일 재배한 유묘는 품종간 검은무늬병에 대한 저항성 차이가 가장 뚜렷하여 검은무늬병 저항성 검정에 적합한 무의 생육 시기로 생각되었다.

Table 5. Resistance degree of 61 commercial radish cultivars to *Alternaria brassicicola* causing black spot^z.

Cultivar	Diseased leaf area (%)	Cultivar	Diseased leaf area (%)
Geumbong	54 ± 38 ^y	Cheongunplus	88 ± 17
Baekchun	61 ± 19	Chamjoayeolmu	89 ± 9.5
Gaeulgimjang	62 ± 27	Jeilgeongangsireagilho	89 ± 15
Saerom	66 ± 16	Supermodel	89 ± 13
Jeonmuhumu	67 ± 38	Jeilbora	90 ± 12
Housechungok	69 ± 44	Minongjosaeng	90 ± 11
Baekdong	70 ± 12	Seonbongaltari	90 ± 14
Myoungsan	70 ± 17	Songbaek	90 ± 15
Jangsaeng	71 ± 40	Chobi	91 ± 13
Boseokaltari	72 ± 11	Giljo	91 ± 6.0
Taechang	73 ± 2.8	Sireagi	91 ± 8.8
Cheongpungmyeongwol	74 ± 27	Mansahyeongtong	92 ± 12
Hannongaltari	74 ± 2.8	Bakja	93 ± 5.7
Kangseong	75 ± 29	Daebak	93 ± 5.3
Alphain	76 ± 22	Dongha	93 ± 6.4
Geukdong	77 ± 25	Yeoreumchunhyangyiyeolmu	94 ± 3.2
Myeonggagaeullho	78 ± 5.7	Asiagaeulgimjang	94 ± 8.8
Bitgoeunyeolmu	78 ± 26	Chungilpum	94 ± 7.8
Jailsupersireagi	79 ± 14	Gwandongyeoreum	94 ± 8.1
Auriwoldong	80 ± 27	Tokwang	94 ± 5.3
Supergiljo	81 ± 20	Chungdu	95 ± 6.7
Ujeongaltari	82 ± 13	Chungsukungjung	95 ± 6.7
Pyeonggimjang	82 ± 19	Daedeulbo	95 ± 5.3
Baekok	83 ± 18	Cheongun	96 ± 5.7
Chorong	83 ± 17	Taechung	96 ± 5.3
Bibariwoldong	84 ± 19	Tamseurun	96 ± 4.9
YR-championyeolmu	84 ± 15	Deadong	96 ± 5.7
Taegwang	85 ± 13	Kangchu	97 ± 4.2
Baekja	86 ± 11	Janghyeingbom	98 ± 3.5
Sannariyeolmu	87 ± 12	Daepyeongyeoreum	99 ± 1.4
Baekselho	88 ± 7.8		

^zThirteen-day-old seedlings of radish cultivars were inoculated with spore suspension (2.0×10^5 spores·mL⁻¹) of *A. brassicicola* KACC 40036 by spray method. The plants were incubated in a humidity chamber at 25°C for 24 hr and then transferred to a growth chamber at 25°C and 80% RH with 12-hour light a day. Two days after inoculation, percent diseased leaf area of each plant was scored.

^yMean ± standard deviation of two runs with ten replicates each.

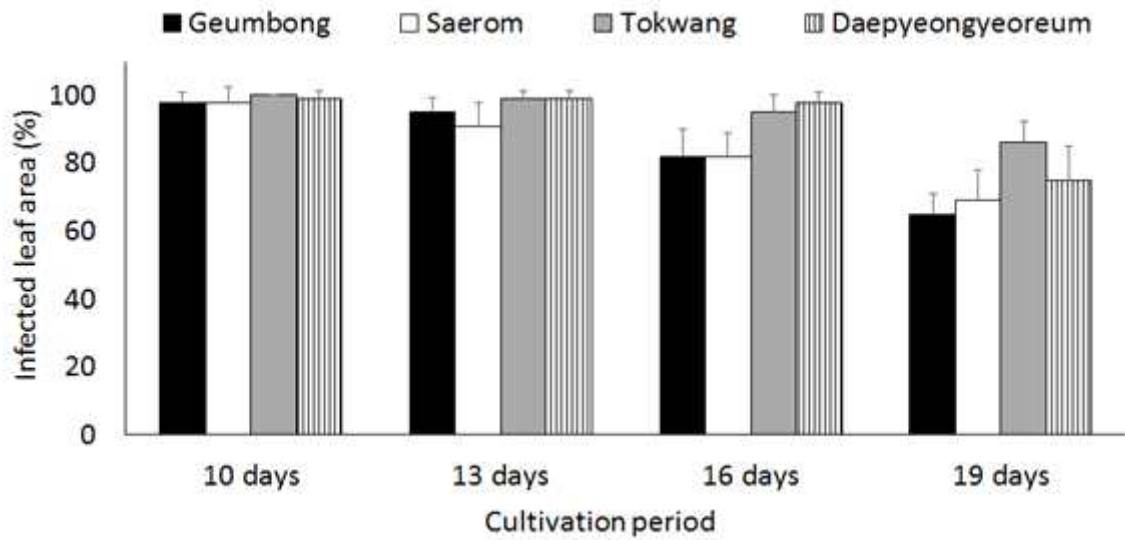


Fig. 4. Development of black spot on four radish cultivars depending on growth stage of plant. Spore suspension (2.0×10^5 spores·mL⁻¹) of *Alternaria brassicicola* KACC 40036 were inoculated onto 10-, 13-, 16-, and 19-day-old seedlings of four radish cultivars were inoculated with by spray method. The inoculated plants were incubated in a humidity chamber at 25°C for 24 hr and then transferred to a growth chamber at 25°C and 80% RH with 12-hour light a day. Disease severity was measured two days after inoculation, representing as percentage of infected leaf area. The data were obtained from five replicates with two repetitions.

(4) 접종원 농도에 따른 검은무늬병 발생

접종원 농도(2.5×10^4 , 5.0×10^4 , 1.0×10^5 , 2.0×10^5 spores·mL⁻¹)에 따른 4개 무 품종의 검은무늬병 발생을 실험한 결과, 실험한 모든 품종들은 모두 접종 농도가 증가할수록 검은무늬병 발생이 증가하였다(Fig. 4). 감수성 품종인 ‘토광’과 ‘대평여름’은 1.0×10^5 spores·mL⁻¹이하에서는 71% 이하의 다소 낮은 병반면적율을 보였으나, 2.0×10^5 spores·mL⁻¹에서는 88% 이상의 높은 병반면적율을 보였다(Fig. 5).

King(1994)은 양배추(*Brassica oleracea* var. *capitata*)와 유채(*B. napus*)에 *A. brassicicola* 균주를 2.3×10^4 , 3.7×10^4 , 그리고 5×10^4 conidia·mL⁻¹ 농도로 접종하고 검은무늬병 발생을 조사한 결과, 처리 간의 발병도 차이를 확인할 수 없었다고 보고하였다. 하지만 본 실험에서 무 4품종에서 접종원 농도에 따른 검은무늬병 발생을 조사한 결과에서는 2.5×10^4 , 5.0×10^4 , 1.0×10^5 , 2.0×10^5 spores·mL⁻¹ 농도로 접종하였을 때 각각 16, 30, 48, 74%의 평균 발병도를 나타내며, 접종한 포자 농도가 높아질수록 실험한 무 품종들의 검은무늬병의 발생은 증가하였다(Fig. 5). 이와 같은 경향은 모든 품종에서 확인되었는데, 이것은 무 검은무늬병에서 뿐만 아니라 대부분 균류병에서의 감수성 품종과 고추 역병, 무 시들음병 및 수박 덩굴쪼김병 등에서 고도의 질적저항성 품종이 아닌 중도저항성 품종에서는 일반적으로 발생하는 것으로(Baik et al., 2011; Jo et al., 2014; Jo et al., 2015) 본 실험에 사용한 무 품종들 중에 고도의 저항성 품종이 포함되지 않았기 때문으로 생각되었다. 본 결과로부터 *A. brassicicola*에

의한 무의 검은무늬병 저항성 검정을 위해서는 2.0×10^5 spores·mL⁻¹ 농도로 접종하여 실험하는 것이 효과적이라 생각되었다.

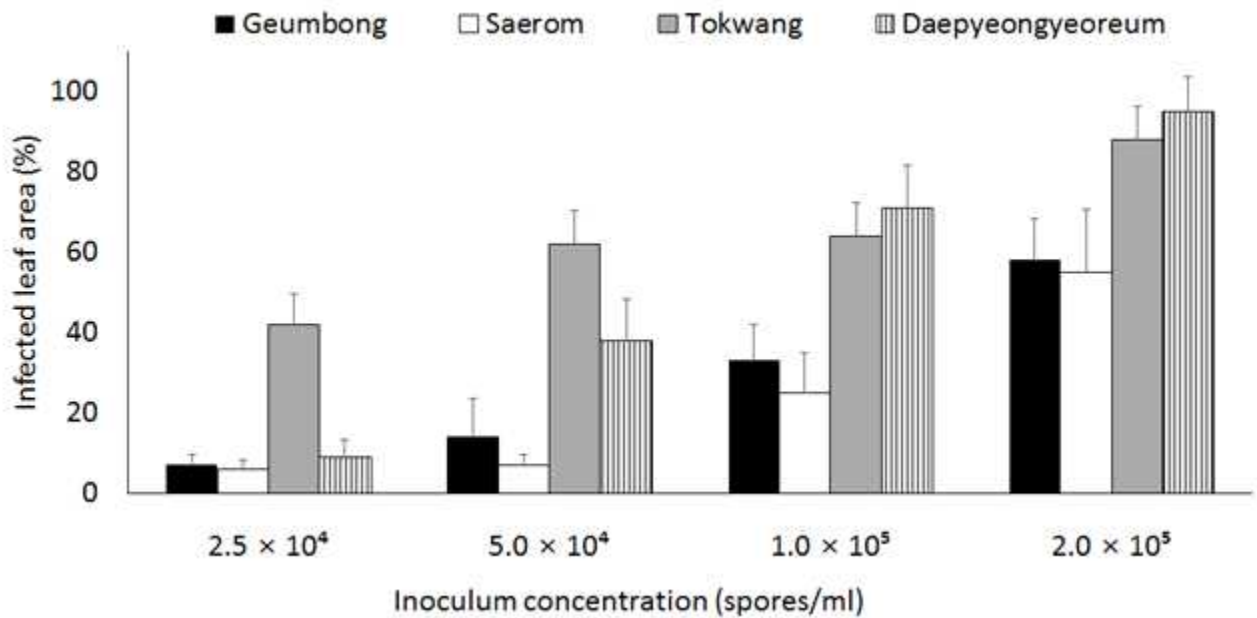


Fig. 5. Effects of inoculum concentration on occurrence of black spot on four radish cultivars. Sixteen-day-old seedlings were inoculated with various concentration (2.5×10^4 , 5.0×10^4 , 1.0×10^5 and 2.0×10^5 spores·mL⁻¹) of *Alternaria brassicicola* KACC 40036 spore suspension by spray method. The inoculated plants were incubated in a humidity chamber at 25°C for 24 hr and then transferred to a growth chamber at 25°C and 80% RH with 12-hour light a day. Disease severity was measured two days after inoculation, representing as percentage of infected leaf area. The data were obtained from two runs with five replicates each.

(5) 재배 온도에 따른 검은무늬병 발생

접종 후 재배온도(20, 25, 30°C)에 따른 네 가지 무 품종들의 검은무늬병 발생을 실험한 결과, 25°C의 경우에는 ‘금봉’, ‘새롬’, ‘토광’, ‘대평여름’에서 각각 74, 75, 89, 89%의 병반면적율을 보였다(Fig. 6). 즉, 감수성 품종들에서는 검은무늬병이 심하게 발생하였고, 감수성 및 약한 저항성 품종 간의 발병 정도 차이 또한 효과적으로 나타났다. 하지만 20°C와 30°C에서는 감수성 품종을 비롯한 모든 품종에서 58% 이하의 낮은 병반면적율을 보였을 뿐만 아니라, 감수성 및 약한 저항성 품종간의 차이도 거의 없었다(Fig. 6).

그리고 유묘에 병원균을 접종하고 20, 25, 30°C에서 재배하였을 때 무 4품종의 평균 발병도는 각각 27, 82, 47%를 나타내 25°C에서 검은무늬병이 가장 효과적으로 발생하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 6). *A. brassicicola*를 접종한 식물은 25°C에서 검은무늬병이 가장 빠르게 병징을 나타내지만, 병원균이 이미 감염되어 있는 종자로부터 재배된 유묘는 30°C에서 더 빠르게 병징을 나타낸다고 하였다(Bassey and Gabrielson, 1983; Kumar et al., 2014). 본 연구는 건전 종자로부터 재배한 유묘에 병원균을 접종한 경우이므로 검은무늬병 발생

최적온도가 25°C라는 점에서 유사한 결과이다.

이상의 결과로부터 무 검은무늬병의 저항성 검정을 위한 효과적인 방법으로 종자를 파종하고 온실(25 ± 5°C)에서 16일 동안 재배한 무 유묘의 잎에 *A. brassicicola*의 포자현탁액(2.0×10^5 spores·mL⁻¹)을 충분히 분무하여 접종하고, 25°C 습실상에서 24시간 동안 습실처리한 후에 25°C의 항온항습실(상대습도 80%)로 이동하여 하루 12시간씩 광을 조사하면서 재배하고, 접종 2일 후에 잎에 발생한 검은무늬병의 병반면적율(%)을 달관조사하는 것을 제안하고자 한다.

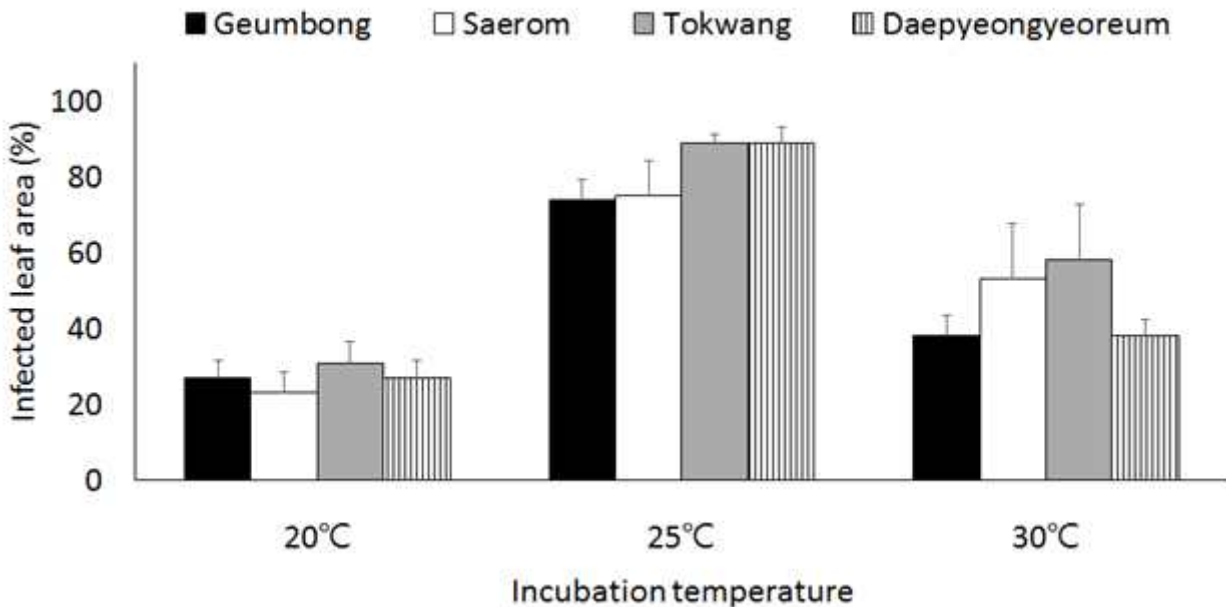


Fig. 6. Effects of incubation temperature on the development of black spot on four radish cultivars. Sixteen-day-old seedlings were inoculated with spore suspension (2.0×10^5 spores·mL⁻¹) of *Alternaria brassicicola* KACC 40036 by spray method. The inoculated plants were incubated at 20°C, 25°C, and 30°C controlled in humidity chambers. Disease severity of the plant was measured two days after inoculation, representing as percentage of infected leaf area. The data were obtained from five replicates with two repetitions.

3. 무 무름병에 대한 효율적인 병리검정 체계 확립

무는 작형의 세분화로 인해 연중 재배가 가능하게 된 작물 중 하나로, 이로 인해 연작 재배지가 증가하는 추세이다. 이러한 재배 환경에 따른 각종 생리 장애와 병해는 점차 증가하게 되는데 현재까지 무에 발생하는 병해에는 무름병을 포함한 19종이 보고되어 있다(KSPP, 2009). 무 무름병을 야기하는 식물병원세균은 *Pectobacterium chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* 이렇게 3종이 알려져 있다(KSPP, 2009). 무 재배지에서 이 3종에 대한 병원균의 밀도에 대한 보고는 아직 없었지만, 무와 동일한 배추과 작물인 배추 무름병의 경우 2014년 8월말 배추 무름병이 발생한 포장에서의 세균 검출 정도는 *Pectobacterium carotovorum* 계통의 세균이 73.1%로 우점종으로 나타났었다(이 등, 2015). 이 중 특히 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*은

그람음성 세균으로 포자를 형성하지 않는 통성 혐기성균으로, pectin 및 cellulose 분해 효소를 가지고 있어 거의 모든 식물의 조직을 분해시켜 무름병을 야기한다. 생육적온은 28-30°C로 고온활동성 세균이다(Péombelon과 Kelman, 1980; Whitehead 등, 2002). 따라서 온도와 습도가 높은 환경에서 발병이 심하며, 무를 비롯한 대부분의 작물에 침입하여 병을 야기하고, 이병 잔재물과 토양 속에서 월동을 하다가 다음 해에 1차 전염원이 된다. 또한 파리목 곤충의 번데기 속에서 독립적으로 월동을 한 뒤, 일반적으로 식물체의 상처나 곤충의 유충이 식물체를 섭식하게 될 때 병원균의 침입이 일어난다.

일반적으로 무름병을 방제하기 위해 콩과 작물 같은 비기주 작물과 함께 윤작을 하고, 배수와 통풍이 잘 되도록 관리하여 준다. 또한 무에 상처가 나지 않도록 관리하며 전염 매개충인 파리목 곤충을 방제하기도 한다. 이렇게 경종적인 방제를 하더라도 앞서 언급한 바와 같이 토양 내에서 비교적 장기간 병원균이 생존하기 때문에 화학적으로 병을 방제하는 것은 현실적으로 효과가 대체로 낮아 새로운 방제 방법 개발을 요구하고 있는 실정이다. 따라서 병원균에 대한 방제법보다 내병성 품종 개발에 대한 필요성이 점차 증가하는 추세이다. 그러나 이러한 무 무름병 저항성 품종을 육성하기 위해 저항성 유전자원을 탐색하고, 선발하여 안정적이고 실용적인 저항성 검정법이 필요하지만 확립되어 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 효율적인 무 무름병 저항성 검정법을 확립하기 위해 시판중인 66개의 무 품종들의 저항성 정도를 평가 후, 저항성 정도가 다른 6품종을 선발하여, 접종 후 재배 온도, 접종원의 농도, 기주 식물의 생육 시기에 따른 무 무름병 발생을 조사하였다.

가. 무 무름병 병리 검정 조건 확립을 위한 품종 선발

(1) 재료 및 방법

- 식물체 준비
 - 5×8 플러그 포트에 원예용상토 2호(부농사)를 담은 뒤 시판되고 있는 무 66품종을 각각 2립씩 파종한 뒤 온실에서 재배하였다. 파종 5-6일 후에 포트 당 1개의 식물체가 되도록 무를 솟아주거나 이식해주었고, 파종 20일 후 3-4엽이 완전 전개된 유묘를 실험에 사용하였다.
- 병원균 준비 및 접종원
 - NA(nutrient agar, Difco) 배지에 streaking하여 1일간 전배양한 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* KACC 10421 균주에 NB(nutrient broth, Difco)를 5ml 넣고 세균을 고르게 수확하고 이 세균 현탁액을 2 ml을 취하여 새로운 NB 배지 200 ml에 접종한 뒤 30°C, 200rpm으로 24-36시간 진탕배양 후 상온에서 8,000rpm, 10분간 원심분리하여 세균 pellet을 수확하였다. 수확한 세균 pellet을 멸균수에 현탁한 뒤, UV spectrophotometer로 OD₆₀₀ 값을 측정하여 OD₆₀₀=0.2(1×10⁸ CFU/ml)로 조정된 세균현탁액을 만들었다. 이 세균현탁액을 100배 희석하여 1×10⁶ CFU/ml의 세균 현탁액을 되도록 조정된 뒤 접종원으로 사용하였다.
- 병원균 접종
 - 1×10⁶ CFU/ml이 되도록 조정된 세균현탁액(접종원)과 멸균한 glycerol을 4:1 비율로 균질하게 혼합하여 식물체 기부에 5 ml씩 접종하였다.
- 접종 후 환경
 - 병원균을 접종한 식물체는 25°C dew chamber에 48시간 습실처리 한 후, 25°C(RH 80%) 항온습실에 두고 하루에 12시간씩 광을 조사하면서 병 진전 정도를 관찰하였다.
- 병조사
 - 접종 3, 4, 5일 후 발병정도에 따라 각 개체의 발병도를 아래와 같은 기준으로 조사하였다 (Table 6).

Table 6. Disease index of radish bacterial soft rot

Disease index	Symptom
0	Chlorosis or rot ; 0%, healthy plant
1	Chlorosis or rot ; 0-25%
2	Chlorosis or rot ; 25-50%
3	Chlorosis or rot ; 50-75%
4	Chlorosis or rot ; 75-100%, plant were dead

(2) 결과 및 고찰

무 무름병 저항성 병리검정 조건을 확립하기 위한 저항성 품종과 감수성 품종을 선발하고자 시판되고 있는 무 66품종에 대하여 2회에 걸쳐 실험을 수행하였고, 병원균 접종 후 3일 후부터 5일 후까지의 발병도를 구한 뒤, 병발생진전하곡선면적(AUDPC)와 상대병발생진전하곡선면적(rAUDPC)을 구하였다.

무 무름병 저항성 품종으로 공시된 7품종 ‘아우리월동’, ‘태청’, ‘만사형통’, ‘강성’, ‘비바리월동’, ‘극동’, ‘탐스런’ 중 ‘아우리월동’이 유일하게 실험에 사용한 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* KACC 10421균주에 대하여 저항성 반응을 나타내었다(Fig. 7). 병 접종 3일 후부터 5일까지 발병정도를 구하고, Fig. 7과 같이 상대병발생진전하곡선면적(rAUDPC) 값을 구한 뒤, 저항성 품종으로 ‘아우리월동(4.7)’과 ‘YR챔피언(5.2)’, 중도저항성 품종으로 ‘전무후무(28.9)’와 ‘빛고은열무(32.1)’ 그리고 감수성 품종으로 ‘선봉알타리(71.9)’와 ‘하우스청옥(84.6)’을 선발하여 무 무름병 저항성 병리검정 조건을 확립하기 위한 실험에 사용하고자 하였다.

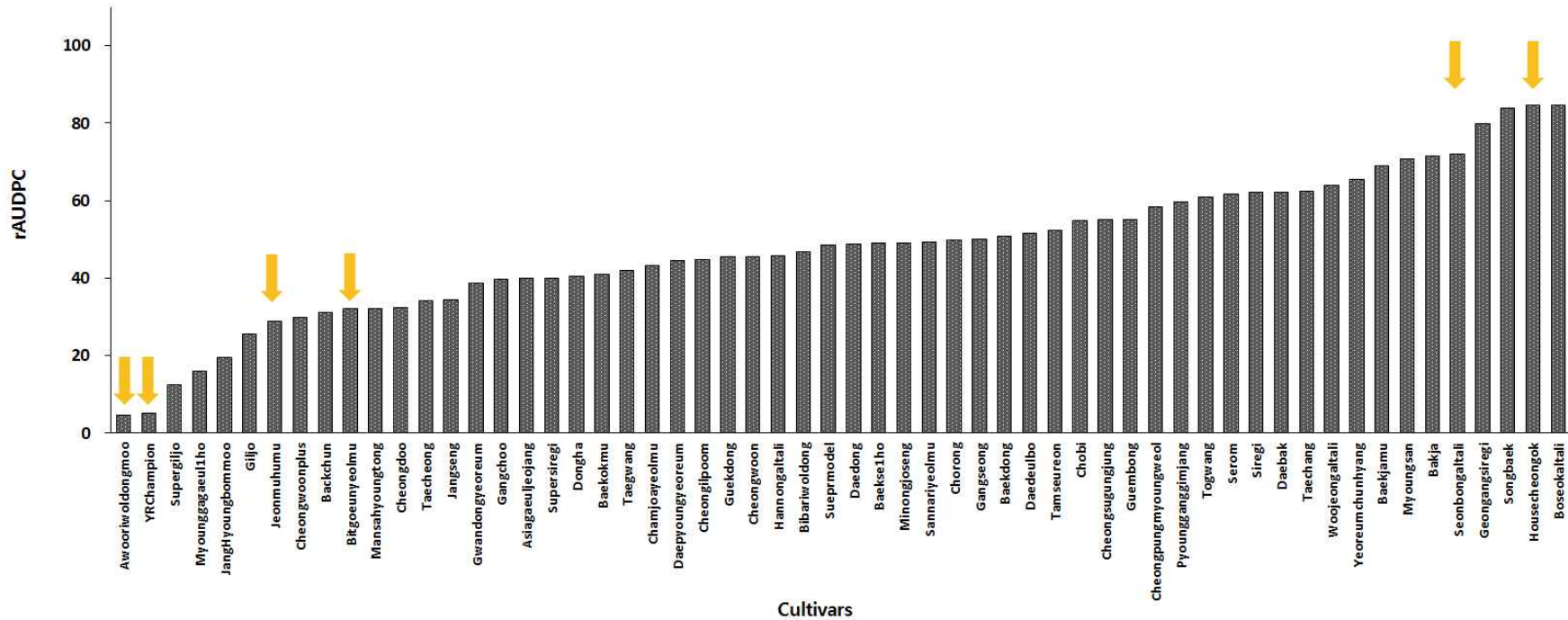


Fig. 7. rAUDPC of 66 commercial radish cultivars to *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* KACC 10421. Twenty-day-old seedlings of each cultivar were inoculated with KACC 10421 by drenching the proximal in 1×10^6 CFU/ml. The inoculated plants were incubated in a dew chamber at 25°C for 24 hours and transferred to a growth room at 25°C (RH 80%) with 12 hrs light a day for 4 days.

나. 병리검정 조건 확립

(1) 온도별 조건에 따른 무 무름병 발생

(가) 재료 및 방법

- 식물체 준비

- 5×8 플러그 포트에 원예용상토 2호(부농사)를 담은 뒤 앞서 무 무름병 병리검정 조건 확립을 위해 선발한 저항성 품종 ‘아우리월동’과 ‘YR챔피언’, 중도저항성품종 ‘전무후무’와 ‘빛고은열무’ 그리고 감수성 품종으로 선발한 ‘선봉알타리’와 ‘하우스청옥’을 각각 2립씩 파종한 뒤 온실에서 재배하였다. 파종 5-6일 후에 포트 당 1개의 식물체가 되도록 무를 솟아주거나 이식해주었고, 파종 20일 후 3-4엽이 완전 전개된 유묘를 실험에 사용하였다.

- 병원균 준비 및 접종원

- NA(nutrient agar, Difco) 배지에 streaking하여 1일간 전배양한 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* KACC 10421 균주에 NB(nutrient broth, Difco)를 5ml 넣고 세균을 고르게 수확하고 이 세균 현탁액을 2ml을 취하여 새로운 NB 배지 200ml에 접종한 뒤 30℃, 200rpm으로 24-36시간 진탕배양 후 상온에서 8,000rpm, 10분간 원심분리하여 세균 pellet을 수확하였다. 수확한 세균 pellet을 멸균수에 현탁한 뒤, UV spectrophotometer로 OD₆₀₀값을 측정하여 OD₆₀₀=0.2(1×10⁸ CFU/ml)로 조정된 세균 현탁액을 만들었다. 이 세균현탁액을 100배 희석하여 1×10⁶ CFU/ml의 세균 현탁액을 되도록 조정된 뒤 접종원으로 사용하였다.

- 병원균 접종

- 1×10⁶ CFU/ml이 되도록 조정된 세균현탁액(접종원)과 멸균한 glycerol을 4:1비율로 균질하게 혼합하여 식물체 기부에 5 ml 접종하였다.

- 접종 후 환경

- 병원균을 접종한 식물체는 25℃ dew chamber에 24시간 습실처리 한 후, 25℃(RH 80%)항온항습실에 두고 하루에 12시간씩 광을 조사하면서 병 진전 정도를 관찰하였다.

(나) 결과 및 고찰

병원균 접종한 식물체를 24시간 25℃에서 습실처리 한 후, 하루에 12시간씩 광을 조사하면서 각각 20℃, 25℃(RH 80%), 30℃에 두고 병진전 정도를 관찰하였다. 접종 3일 후부터 무에서 무르거나 황화증상이 나타나기 시작하였고, 접종 5일까지 발병정도를 조사한 뒤 상대병발생진전하곡선면적(rAUDPC)을 구한 결과, 저항성, 중도저항성, 감수성으로 선발한 6품종 ‘아우리월동’, ‘YR챔피언’, ‘전무후무’, ‘빛고은열무’, ‘선봉알타리’와 ‘하우스청옥’은 3가지의 온도조건에서 크게, 저항성 정도가 3그룹으로 차이는 났지만, 기존에 저항성 평가와는 다르게 20℃에서는 저항성 품종으로 선발한 ‘아우리월동’이 중도저항성으로 선발한 ‘전무후무’보다 더 많이 발병되었고, 감수성 품종의 병 발생이 크지 않아 육안으로 쉽게 저항성을 평가할 수 없었기 때문에 20℃에서 무 무름병 저항성 평가를 하는 것은 어렵다고 판단되었다(Fig. 8).

30℃에서 식물체를 두고 병진전 정도를 살펴보았을 때에는 저항성 품종으로 선발한 ‘아우리월동’과 ‘YR챔피언’이 중도저항성 품종으로 선발한 ‘전무후무’와 ‘빛고은열무’와 상대병발생진전하곡선면적의 차이가 크게 나지 않았고, 식물체를 25℃에 두고 병진전 정도를 살펴보았을 때보다 발병이 많이 되어 저항성으로 평가될 수 없었다(Fig. 8). 따라서 병원균 접종한 식물체를 24시간 25℃에서 습실처리 한 후, 하루에 12시간씩 광을 조사하면서 25℃(RH 80%)에 두고 병진전 정도를 관찰하는 것이 무 무름병 저항성 검정을 하기에 적절한 온도조건이라고 생각하였다.

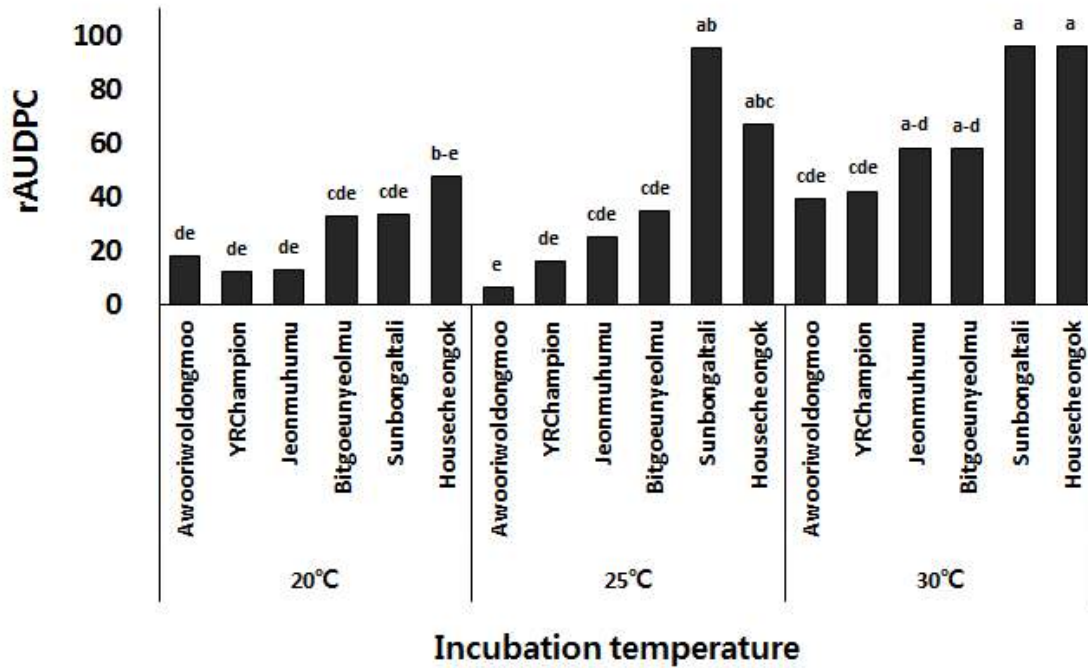


Fig. 8. Development of bacterial soft rot on 6 radish cultivars according to incubation temperature. Twenty-day-old seedlings of each cultivar were inoculated with KACC 10421 by drenching the proximal in 1×10^6 CFU/ml. The inoculated plants were incubated in a dew chamber at 25°C for 24 hrs and transferred to a growth room at 20, 25 (RH80%) and 30°C with 12 hrs light a day for 4 days. Values labeled with the same letter are not significantly different based on Duncan's multiple range test at $p = 0.05$.

(2) 무 생육시기별 조건에 따른 무 무름병 발생

(가) 재료 및 방법

- 식물체 준비
 - 생육단계가 다른 무의 발병정도를 통해 무 무름병 검정에 적절한 생육단계를 확인하고자 하였다.
 - 5×8 플러그 포트에 원예용상토 2호(부농사)를 담은 뒤 ‘아우리월동’, ‘YR챔피언’, ‘전무후무’ ‘빛고은열무’, ‘선봉알타리’, ‘하우스청옥’ 품종을 각각 2립씩 파종한 뒤 온실에서 재배하였다. 파종 5-6일 후에 포트 당 1개의 식물체가 되도록 무를 솟아주거나 이식해주었고, 파종 후 약 13일이 경과되어 2엽이 완전 전개된 유묘, 파종 20일 후 3-4엽이 완전 전개된 유묘, 파종 후 약 27일이 경과되어 4-5엽이 완전 전개된 유묘, 약 34일이 경과되어 본엽이 5-6엽까지 완전 전개한 유묘 총 4종류의 생육단계가 다른 유묘를 실험에 사용하였다.
- 병원균 준비 및 접종원
 - NA(nutrient agar, Difco) 배지에 streaking하여 1일간 전배양한 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* KACC 10421 균주에 NB(nutrient broth, Difco)를 5ml 넣고 세균을 고르게 수확하고 이 세균 현탁액을 2ml를 취하여 새로운 NB 배지 200ml에 접종한 뒤 30°C, 200rpm으로 24-36시간 진탕배양 후 상온에서 8,000rpm, 10분간 원심분리하여 세균 pellet을 수확하였다. 수확한 세균 pellet을 멸균수에 현탁한 뒤, UV spectrophotometer로 OD₆₀₀값을 측정하여 OD₆₀₀=0.2(1×10^8 CFU/ml)로 조정된 세균 현탁액을 만들었다. 이 세균현탁액을 100배 희석하

여 1×10^6 CFU/ml의 세균 현탁액을 되도록 조정 한 뒤 접종원으로 사용하였다.

- 병원균 접종
 - 1×10^6 CFU/ml이 되도록 조정 한 세균현탁액(접종원)과 멸균한 glycerol을 4:1비율로 균질하게 혼합하여 식물체 기부에 5 ml 접종하였다.
- 접종 후 환경
 - 병원균을 접종한 식물체는 25°C dew chamber에 24시간 습실처리 한 후, 25°C(RH 80%)향온 항습실에 두고 하루에 12시간씩 광을 조사하면서 병 진전 정도를 관찰하였다.

(나) 결과 및 고찰

파종 후 약 13일이 경과되어 2엽이 완전 전개된 유묘, 파종 20일 후 3-4엽이 완전 전개된 유묘, 파종 후 약 27일이 경과되어 4-5엽이 완전 전개된 유묘, 약 34일이 경과되어 본엽이 5-6엽까지 완전 전개한 유묘 총 4종류의 생육단계가 다른 유묘를 실험에 사용하였다. 2엽이 완전 전개한 유묘의 경우 저항성 감수성 품종에서만 발병이 심하였으며, 중도저항성과 저항성 품종으로 선발한 나머지 4품종의 발병정도 차이는 크게 나지 않아, 저항성, 중도저항성, 감수성 3 그룹으로 저항성 평가를 할 수 없었다.

3-4엽이 완전 전개된 유묘에 병원균을 접종한 경우에는 저항성 품종으로 선발한 ‘아우리월동’, 중도저항성 품종으로 선발한 ‘전무후무’그리고 감수성 품종으로 선발한 ‘선봉알타리’의 상대병발생진전하곡선면적의 값으로 발병정도를 비교하였을 때도 명확하게 병 저항성 정도를 확인할 수 있었으며, 파종 후 27일이 경과된 4-5엽이 완전 전개된 유묘와 파종 후 약 34일이 경과되어 5-6엽이 완전 전개된 유묘의 경우 선발한 저항성, 중도저항성, 감수성 품종의 특징이 나타나지 않았다(Fig. 9).

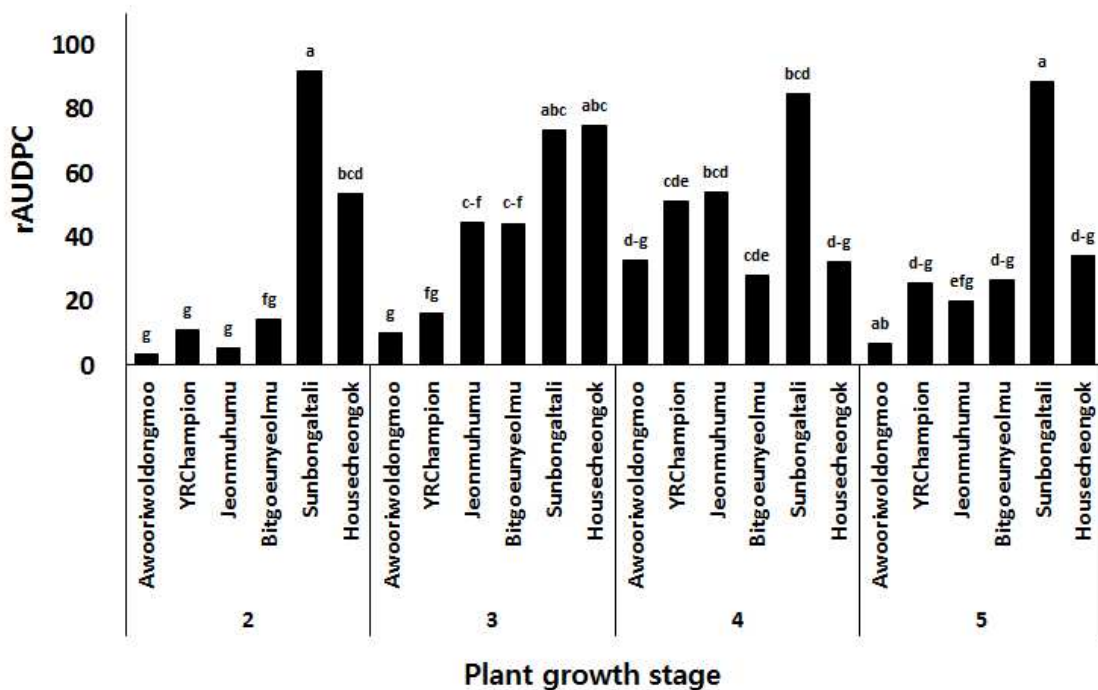


Fig. 9. Development of bacterial soft rot on 6 radish cultivars according to plant growth stage. thirteen-day-old, twenty-day-old twentyseven-day-old and thirtyfour-day-old radish seedling of each cultivar were inoculated with KACC 10421 by drenching the proximal in 1×10^6 CFU/ml. The inoculated plants were incubated in a dew chamber at 2

5°C for 24 hours and transferred to a growth room at 25°C(RH80%) with 12 hours light a day for 4 days. Values labeled with the same letter are not significantly different based on Duncan's multiple range test at $p = 0.05$. Values labeled with the same letter are not significantly different based on Duncan's multiple range test at $p = 0.05$.

(3) 접종원 농도에 따른 무 무름병 발생

(가) 실험 방법

- 식물체 준비

- 5×8 플러그 포트에 원예용상토 2호(부농사)를 담은 뒤 ‘아우리월동’, ‘YR챔피언’, ‘전무후무’ ‘빛고은열무’, ‘선봉알타리’, ‘하우스청옥’ 품종을 각각 2립씩 파종한 뒤 온실에서 재배하였다. 파종 5-6일 후에 포트 당 1개의 식물체가 되도록 무를 솟아주거나 이식해주었고, 파종 20일 후 3-4엽이 완전 전개된 유묘를 실험에 사용하였다.

- 병원균 준비 및 접종원

- NA 배지에 streaking하여 1일간 전배양한 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* KACC 10421 균주에 NB(nutrient broth)를 5ml 넣고 세균을 고르게 수확하고 이 세균 현탁액을 2ml을 취하여 새로운 NB(nutrient broth) 배지 200ml에 접종한 뒤 30°C, 200rpm으로 24-36 시간 진탕배양 후 상온에서 8,000rpm, 10분간 원심분리하여 세균 pellet을 수확하였다. 수확한 세균 pellet을 멸균수에 현탁한 뒤, UV spectrophotometer로 OD₆₀₀값을 측정하여 OD₆₀₀=0.2(1×10^8 CFU/ml)로 조정된 세균 현탁액을 만들었다. 이 세균현탁액을 100배 희석하여 1×10^6 CFU/ml의 세균 현탁액을 되도록 조정된 뒤 접종원으로 사용하였다.

- 병원균 접종

- 1×10^6 CFU/ml이 되도록 조정된 세균현탁액(접종원)과 멸균한 glycerol을 4:1 비율로 균질하게 혼합하여 식물체 기부에 5 ml 접종하였다.

- 접종 후 환경

- 병원균을 접종한 식물체는 25°C dew chamber에 24시간 습실처리 한 후, 25°C(RH:80%)향온 항습실에 두고 하루에 12시간씩 광을 조사하면서 병 진전 정도를 관찰하였다.

(나) 결과 및 고찰

병원균의 밀도를 1×10^7 CFU/ml 과 1×10^5 CFU/ml 두 농도로 접종하였을 때 감수성, 중도저항성, 저항성 정도를 명확하게 구분할 수 없었지만, 1×10^6 CFU/ml로 접종한 경우 각 품종별 병원균에 대한 저항성 정도의 반응이 저항성, 중도저항성, 감수성 3 그룹으로 나타났었다 (Fig. 10). 병원균의 농도는 1×10^6 CFU/ml 로 조정하여 식물체당 5 ml씩 접종하는 것이 저항성 검정하기 위해 알맞은 농도로 생각된다.

위 결과들을 종합해 보면, 무 무름병 저항성 검정을 위해, 파종 20일 후 3-4엽이 완전 전개된 무 유묘에 1×10^6 CFU/ml로 조정된 뒤, glycerol과 4:1비율로 혼합하여 식물체 당 5 ml씩 접종하고, 병원균을 접종한 식물체를 24시간 25°C에서 습실처리 한 뒤, 하루에 12시간씩 광을 조사하면서 25°C(RH 80%)에 두고 병 진전 정도를 관찰하여 접종 3일 후부터 접종 5일 후까지 발병도를 조사하여 저항성 평가를 하는 것이 안정적이라고 생각된다.

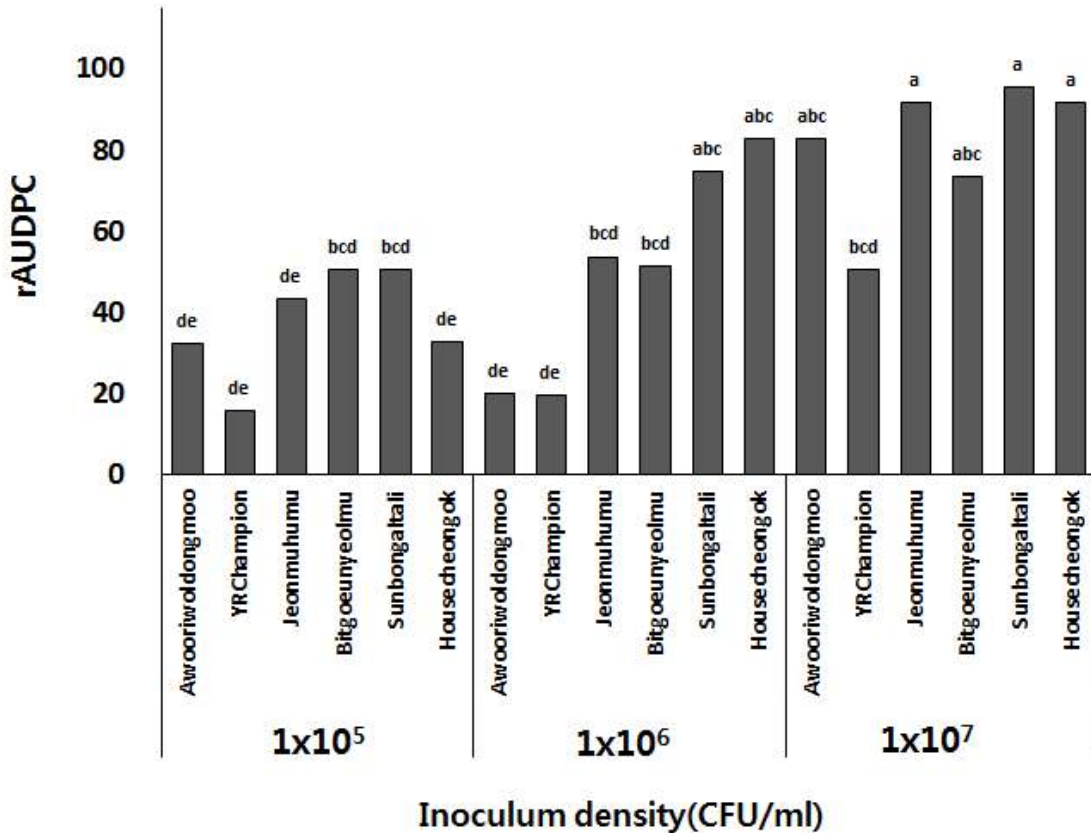


Fig. 10. Development of bacterial soft rot on 6 radish cultivars according to inoculum density. Twenty-day-old seedlings of each cultivar were inoculated with KACC 10421 by drenching the proximal in 1×10^5 , 1×10^6 and 1×10^7 CFU/ml. The inoculated plants were incubated in a dew chamber at 25°C for 24 hrs and transferred to a growth room at 20, 25 (RH 80%) and 30°C with 12 hrs light a day for 4 days. Values labeled with the same letter are not significantly different based on Duncan's multiple range test at $p = 0.05$.

4. 바이러스병 저항성 검정법 개발(위탁: 충남대)

가. 무 바이러스 전국조사 및 진단

- 2014년 9월부터 11월 까지 총 4개월간, 2015년도에는 11월 2일부터 24일까지 약 1개월간 섬을 제외한 전국에서 순무와 열무를 대상으로 모자이크(mosaic), 위축(dwarf), 괴사(necrosis), 얼룩(mottle), 황화(yellowing)등의 바이러스에 감염된 것으로 의심되는 샘플을 2014년도에 108개, 2015년도에 152개 샘플을 채집하였다(Fig. 11, 12). 채집할 포장에서는 3개 이하로만 채집을 실시하여 한 지역에 편중되지 않게 하였고, 이를 통해서 전국적으로 다양한 바이러스 strain들을 확보하고자 하였다. 충청남·북도, 전라남·북도, 강원도에서 바이러스로 의심되는 무가 많이 분포하고 있었다.
- 채집한 무 샘플들은 Trizol을 이용하여 Total RNA를 분리한 후 BLAST 검색을 통해 제작한 specific primers(Table 1)를 사용하여 One-step RT PCR kit(Genetbio)을 이용한 방법과 TOYOBO ReverTra Ace α -를 이용하여 cDNA를 합성한 후 specific primers를 사용하여 PCR하는 방법 등 2가지 방법으로 바이러스를 진단하였다(Fig. 13, Table 8).

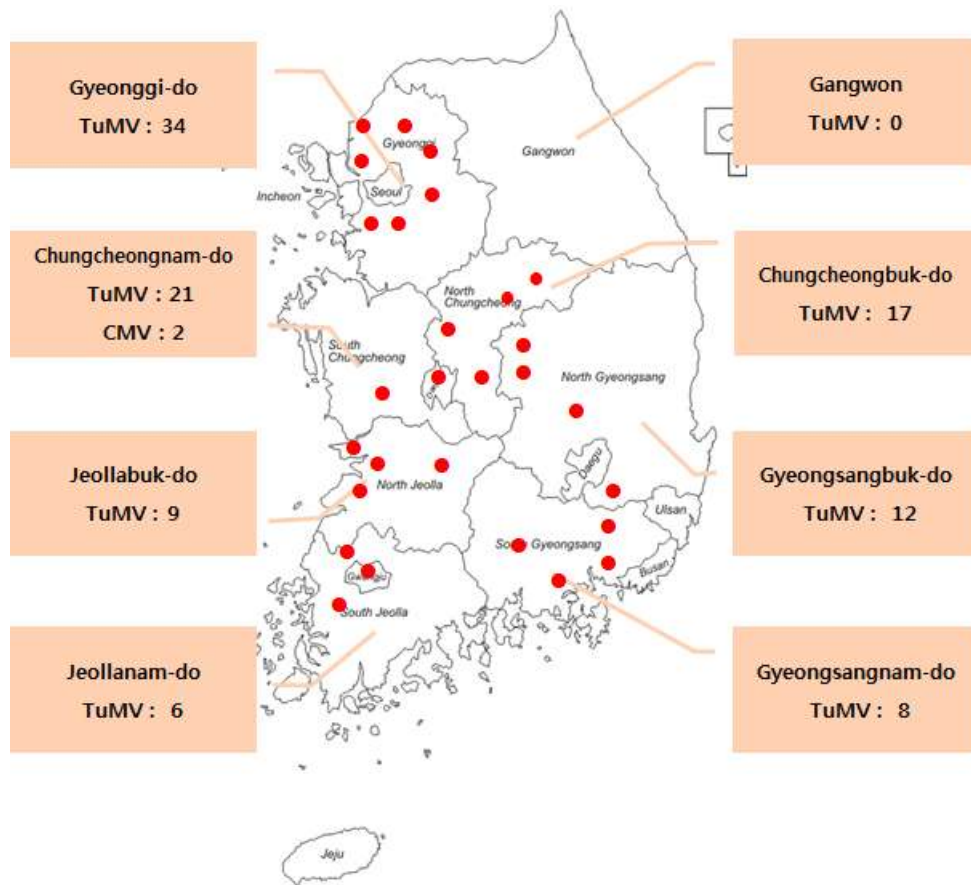


Fig. 12. 2015년도 무 바이러스 채집지역 및 진단결과

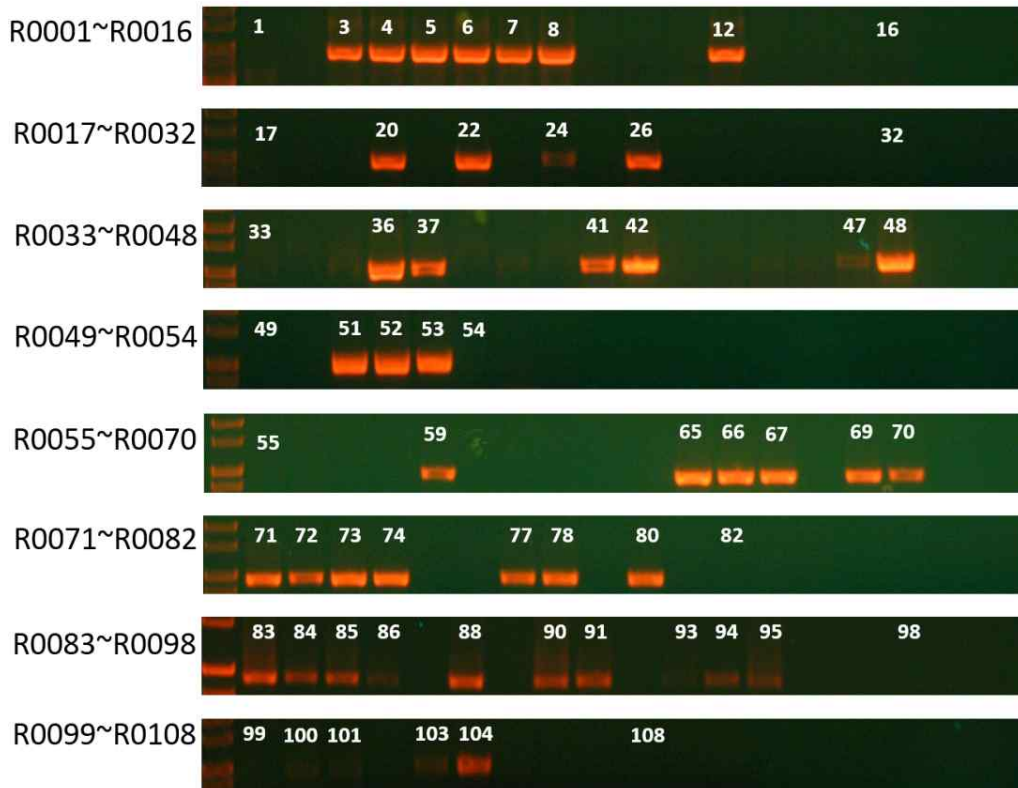


Fig. 13. 2014년도 무 바이러스 진단 결과

- 2014년도 채집샘플 진단 결과, 108샘플 중 57개가 바이러스에 감염되었음을 one-step RT PCR로 확인 할 수 있었으며, Turnip mosaic virus(TuMV) 47샘플, Radish mosaic virus(RaMV) 3샘플, Cucumber mosaic virus(CMV) 2샘플에서 바이러스 감염을 확인하였고, TuMV와 CMV가 복합 감염된 무도 2샘플에서 확인 할 수 있었다(그림 3). 발생분포도 전국적으로 널리 분포 되어 있는 것을 확인하였다. 그리고 그 외 국내발생 바이러스 및 국내 미보고 바이러스는 진단되지 않았다.
- 2015년도 채집샘플 총 152개의 샘플 진단 결과, TuMV가 107개로 70%의 감염률을 나타내었으며 충청남도에서 채집된 샘플에서 TuMV와 CMV 중복감염 샘플(2점)이 확인되었다 (Table 8).

Table 8. 2015년도 바이러스 채집 및 진단 결과

Province	No. of samples	TuMV	RaMV	CMV	CMV +TuMV	Unknown
Gyeonggi-do	42	34	0	0	0	0
Gangwon-do	0	0	0	0	0	0
Chungcheongbuk-do	31	17	0	0	0	14
Chungcheongnam-do	26	21	0	2	2	3
Jeollabuk-do	15	9	0	0	0	0
Jeollanam-do	12	6	0	0	0	0
Gyeongsangbuk-do	18	12	0	0	0	1
Gyeongsangnam-do	8	8	0	0	0	0
Total(%)	152	107 (70.4%)	0 (0%)	2 (1.3%)	2 (1.3%)	45 (29.6%)

- 바이러스로 인한 모자이크(mosaic), 위축(dwarf), 얼룩(mottle), 황화(yellowing)등의 병징은 Fig. 14와 같이 나타나며, 진단을 통하여 주요 무 바이러스 감염 사실을 확인하였다.

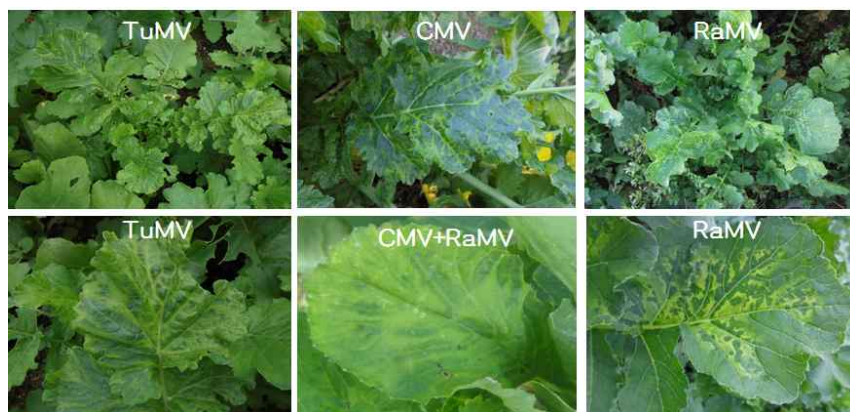


Fig. 14. 주요 무 바이러스 감염 병징 사진

나. 모델 식물을 이용한 바이러스 strain 조사 및 strain별 기능단백질 분석

- Turnip mosaic virus(TuMV)의 strain별 특성을 파악하고자 모델식물 담배(*Nicotiana benthamiana*)을 통한 strain조사와 염기서열 분석을 시행하였다. 채집한 모든 샘플을 담배에 즙액접종을 시행하였고, 담배에 나타나는 병징을 통하여 약독 바이러스와 강독바이러스 strain을 1차적으로 구별할 수가 있었다.
- 이러한 병징 차이의 원인을 파악하기 위하여 바이러스를 구성하는 기능단백질의 염기서열 정보를 비교하였으며, 이를 통해 strain간의 변이를 amino acid 서열로도 확인할 수 있었다(Fig. 15).
- 또한 병원성 차이를 규명하고자 TuMV strain 각각의 구성단백질(ORF)을 pGD, pGDG vector에 cloning하여 병원성 또는 movement와 관련 있는 단백질 기능을 분석하였다(Table 9). 이러한 실험들을 바탕으로 향후 바이러스 strain간의 전체 염기서열을 확보하고 다양한 정보들을 바탕으로 제작할 infectious clone들의 대상 및 순위를 정하고자 하였다.

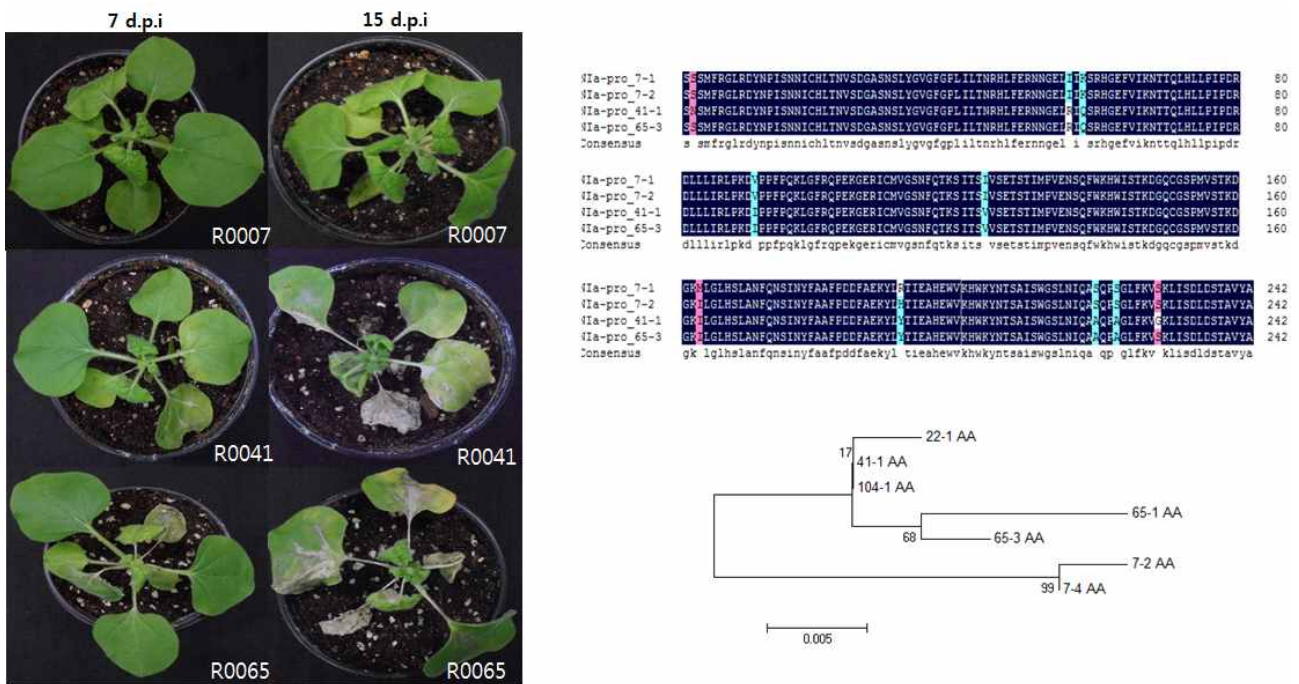


Fig. 15. TuMV strain에 따른 병징 및 amino acid 서열분석

Table 9. 선발된 TuMV strain R007, R041, R065 ORF 기능분석

	Length (nt)	Length (aa)	Nucleotide identity(%)				Amino acid identity(%)			
			7-41-65	7-41	7-65	41-65	7-41-65	7-41	7-65	41-65
5' UTR	129	-	97.67	94.02	93.57	98.45	-	-	-	-
P1	1086	362	95.55	87.11	87.38	98.80	95.90	88.95	89.78	97.24
HC-Pro	1374	458	95.54	87.26	87.26	99.13	99.42	98.47	98.47	99.56
P3	1065	355	95.65	87.42	87.14	99.34	97.84	94.08	93.52	99.44
6K1	156	52	96.76	91.03	91.67	98.03	100	100	100	100
CI	1932	644	96.69	90.68	90.42	99.17	99.33	98.45	98.45	99.07
6K2	159	53	94.55	84.91	83.65	98.74	98.11	94.34	94.34	100
NIa-VPg	576	192	94.91	85.94	85.24	98.78	94.40	93.23	92.19	98.96
NIa-Pro	729	243	94.24	83.40	83.54	98.49	98.63	95.88	96.71	99.18
NIb	1554	518	95.08	86.01	86.01	98.45	98.39	95.74	96.13	99.03
CP	864	288	96.73	90.66	90.66	99.08	98.61	97.22	95.83	98.61
3' UTR	209	-	98.41	95.22	95.22	100	-	-	-	-
Full length	9833	3164	95.77	87.96	87.85	98.93	98.35	96.02	95.92	98.96

다. 무 바이러스 Infectious clone의 제작

- 발생분포와 바이러스 strain조사를 통하여 TuMV와 RaMV를 우선적으로 infectious clone을 제작하고자 하였으며, 기존에 보고가 되어있는 TuMV와 RaMV의 경우에는 무에 접종 효율(in vivo) 이 낮아 이를 보완하기 위하여 infectious clone에 T7 promoter와 35S promoter를 동시에 삽입하고자 하였다. 2종류의 promoter를 이용함으로써 in vitro transcription 및 in vivo inoculation을 가능하게 하여 접종 효율을 높이고자 하였다(Fig. 16).

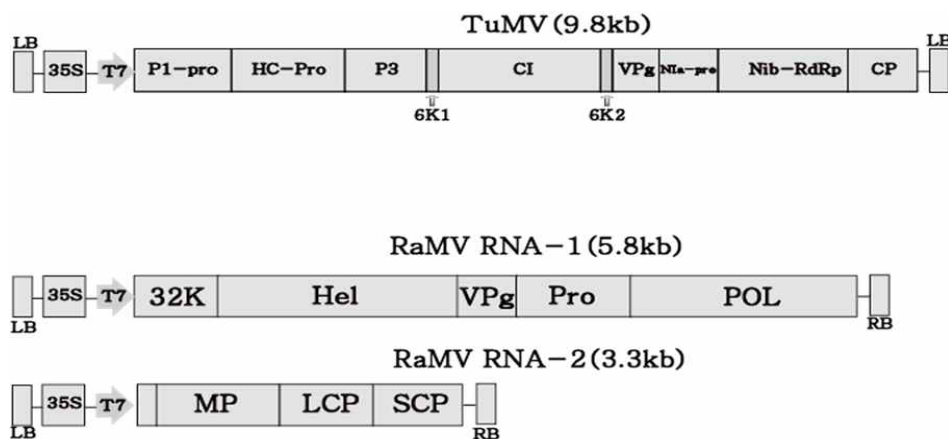


Fig. 16. TuMV, RaMV Infectious clone 제작 모식도

- 2014년도 연구결과를 통해 선정된 TuMV isolate(R007, R041, R065)를 각각 pGDHDV vector에 cloning 하여 infectious clone을 제작하였다(Fig. 17).
- TuMV genome 앞부분에 T7 promoter와 CaMV 35S promoter를 동시에 삽입하여 in vitro transcription 및 in vivo inoculation을 가능하게 하였다.

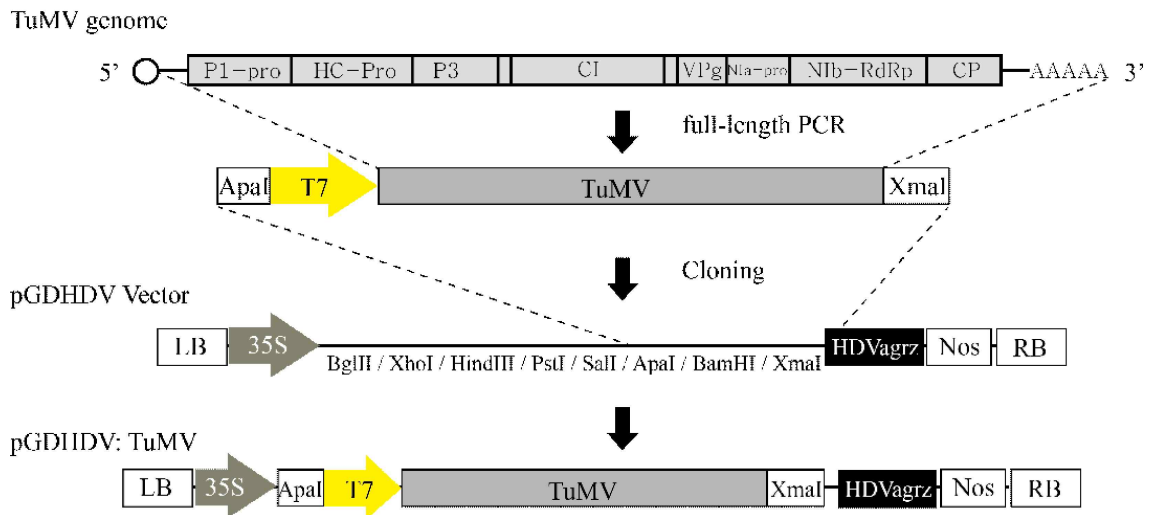


Fig. 17. TuMV infectious clone 제작 순서 및 방법

- 제작된 TuMV R007, R041, R065 isolate의 infectious clone은 모델식물(*Nicotiana benthamiana*)에 접종하여 육안으로 잎말림, 모자이크 병징이 나타남을 확인하고 RT-PCR을 통해 TuMV 진단을 완료하였다(Fig. 18).

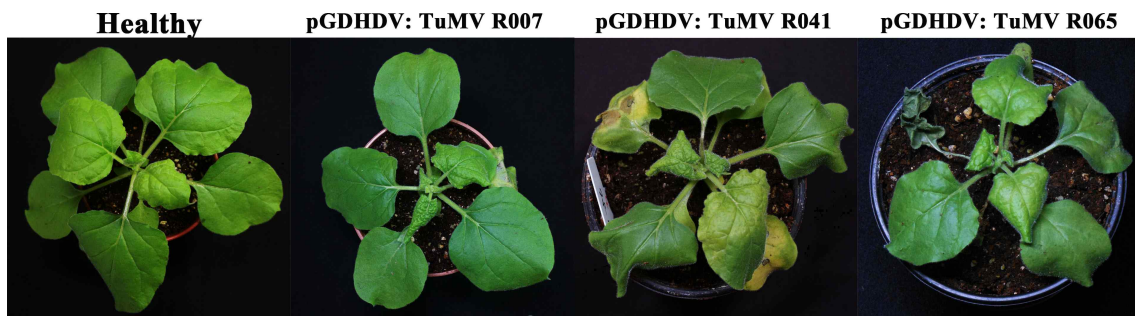


Fig. 18. TuMV infectious clone이 접종된 담배

- 또한, 제작된 TuMV R007 isolate의 infectious clone은 모델식물(*Arabidopsis thaliana*)에 접종하여 병징 확인 및 진단을 완료하였다(Fig. 19).

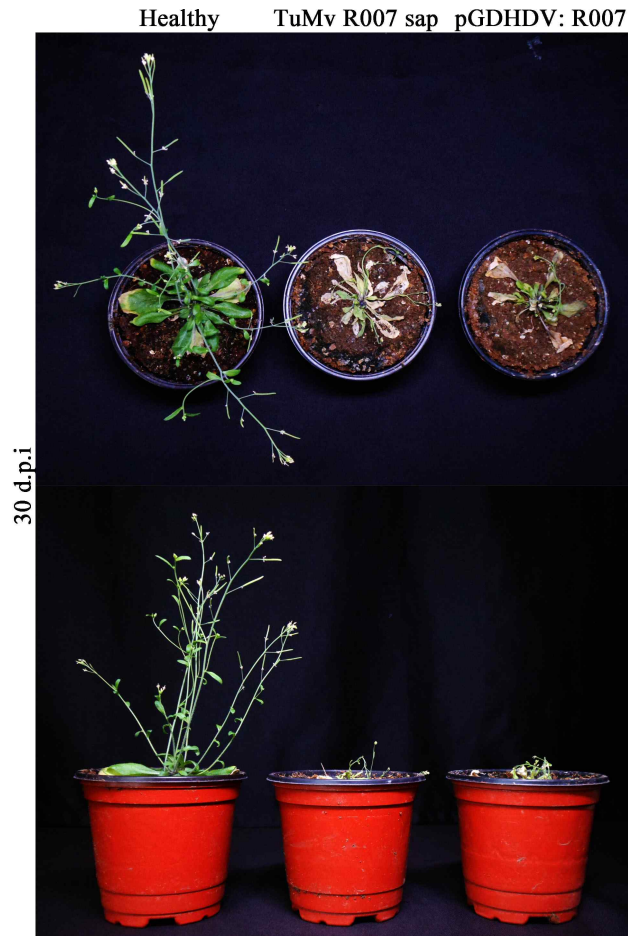


Fig. 19. R007 infectious clone에 접종된 애기장대

라. 무 바이러스 TuMV Infectious clone의 hybrid construct 제작

- TuMV R007, R041, R065 isolate 간의 병징의 차이가 어떠한 영역에서 기인하는지 알아보고자 hybrid construct를 제작하였다.
- 표 3의 ORF 간의 차이 및 기능 분석 내용을 바탕으로 TuMV의 어떤 Protein이 HR, 병징에 차이를 일으키는지 알아보기 위해서 병징이 약한 R007과 병징이 강한 R065를 이용해서 Hybrid construct을 제작하였다 (Fig. 20).
- 제작 완료된 hybrid construct를 이용하여 바이러스 병징을 확인하고, 그 차이에 대한 분석을 진행할 예정이다.

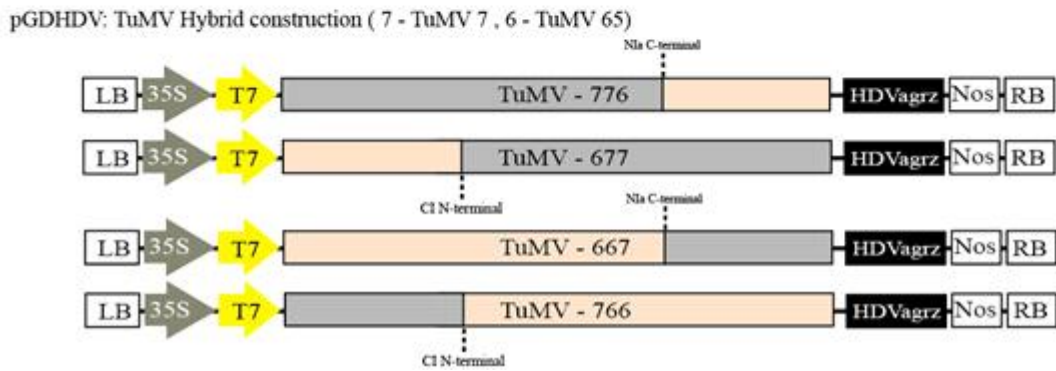
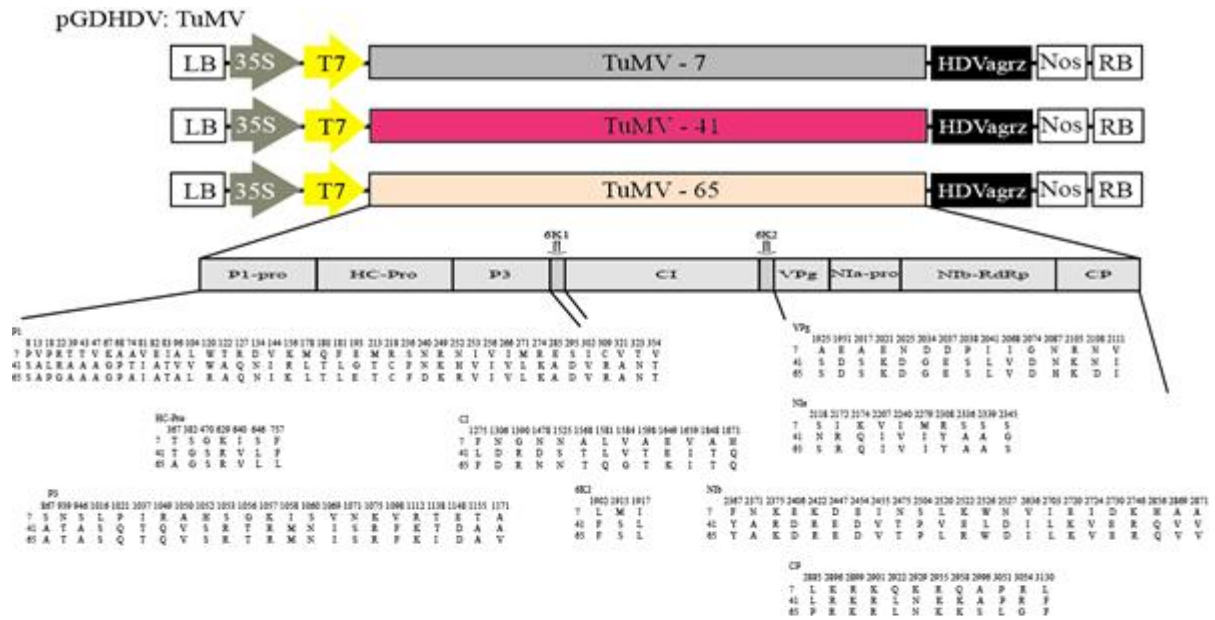


Fig. 20. Turnip mosaic virus ORF 기능 분석을 통한 hybrid construct 제작

마. TuMV strain 별 병원성 검정

(1) 배추 품종에 따른 TuMV 병원성 검정

- 2014년도 무 바이러스 채집 및 병원성 검정을 통해 선정된 TuMV 3가지 isolate(R007, R041, R065) 중, 2개의 isolate(R007, R065)를 160개의 배추 품종에 즙액 접종하여 품종에 따른 바이러스의 병원성 차이를 확인하였다.
- 배추 품종에 따라 TuMV 병징이 Fig. 21과 같이 다양하게 나타났으며, TuMV isolate에 따라 병징 발생에 차이가 있음을 확인하였다(Fig. 21, 22)

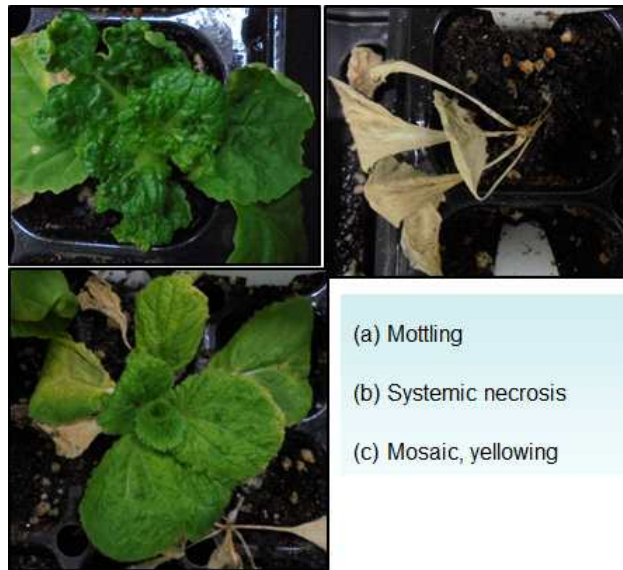


Fig. 21. TuMV 감염시 배추 품종 별 나타나는 병징의 차이

		R065		
		Symptom	HR	None
R007	Symptom	17	10	9
	HR	7	4	9
	None	3	12	38

Fig. 22. R007, R065 접종 시 나타나는 배추 품종 별 반응 분류

(2) 무에서의 TuMV 병원성 검정

- 2014년도 무 바이러스 채집을 통해 선정된 TuMV 3가지 isolate(R007, R041, R065)를 무(달고나, 권농종묘사)에 접종하여 병원성을 검정하였다.
- 검정 결과, 3개의 isolate 모두 황화, 모틀링, 모자이크 증상이 나타났으며 isolate 별 병징의 차이는 나타나지 않았다(Fig. 23).

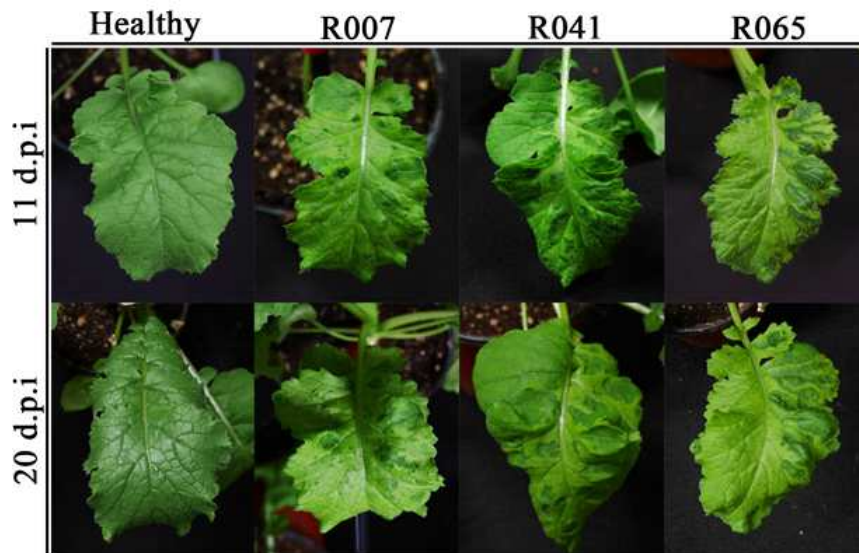


Fig. 23. 무 잎에 나타나는 TuMV isolate 별 병징

(3) 순무에서의 TuMV 병원성 검정

- 2014년도 무 바이러스 채집을 통해 선정된 TuMV 3가지 isolate(R007, R041, R065)를 순무(개량 강화, 제일종묘농산사)에 접종하여 병원성을 검정하였다.
- 검정 결과 R007은 주로 잎말림과 약한 황화 증상과 함께 황백화 반점(chlorotic spot)이 일부 나타났으며, R041, R065는 잎말림은 없지만 강한 황화 증상과 모자이크, 황백화 반점이 나타났다 (Fig. 24).

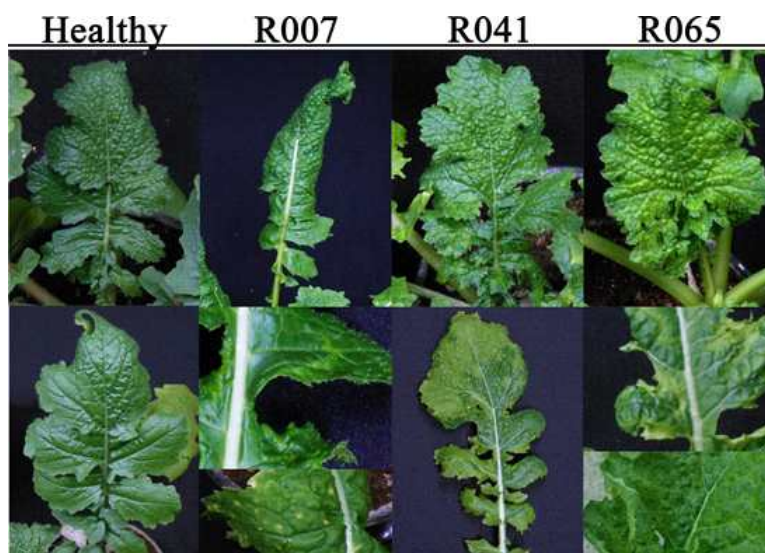


그림 14. 순무에 나타나는 TuMV isolate 별 병징

(4) 애기장대에서 TuMV 병원성 검정

- 2014년도 무 바이러스 채집을 통해 선정된 TuMV 3가지 isolate(R007, R041, R065)를 모델식물인 애기장대(Col-0)에 접종하여 병원성을 검정하였다.
- 검정 결과 성장저하 및 괴사 병징이 나타났으며 isolate따른 차이점은 나타나지 않았다(Fig. 25).

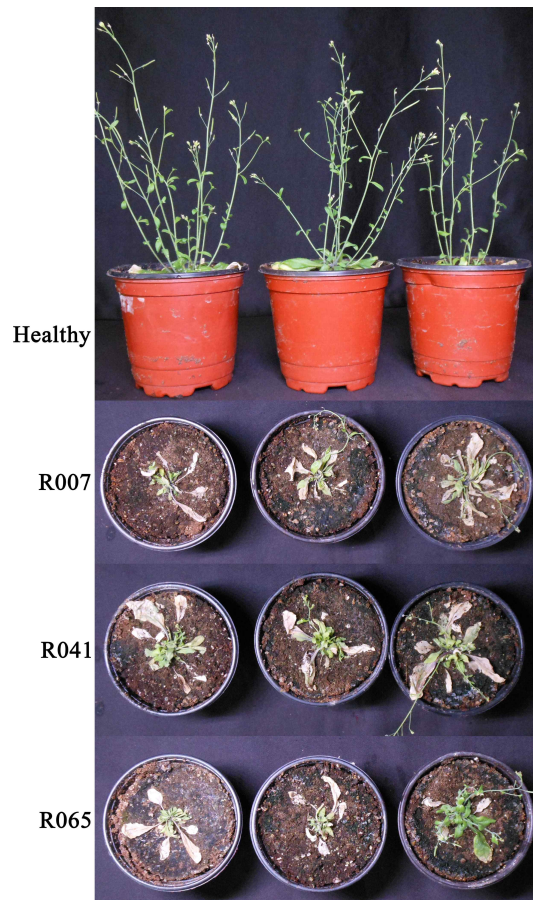


Fig. 25. 애기장대에 나타나는 TuMV isolate 별 병징

바. 무 (*Raphanus sativus*) 60 line별 TuMV infectious clone 접종 및 저항성 품종 선발

- 무에 TuMV를 효과적으로 접종하고자, 모델식물인 *Nicotiana benthamiana*에 각각의 TuMV infectious clone 3가지를 Agroinoculation의 방법을 통하여 접종하여 TuMV 병징을 나타내는 *N. benthamiana*로부터 많은 양의 바이러스 감염 즙액샘플을 확보하였다(Fig. 26).
- 각각의 TuMV strain에 감염된 *N. benthamiana*의 즙액을 어린 무 유묘의 잎에 바르는 방법으로 60여 무 품종에 TuMV를 접종하였다(Fig. 27).

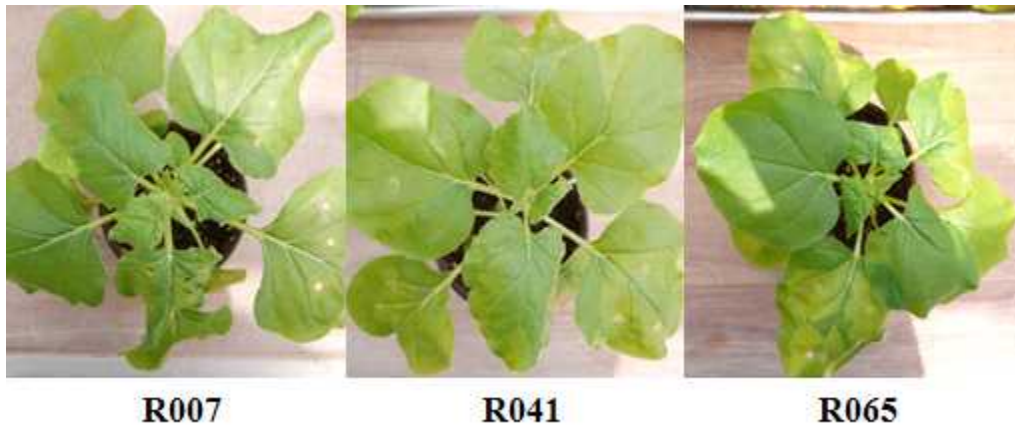


Fig. 26. 즙액접종을 위해 각각의 TuMV infectious clone이 접종된 담배



Fig. 27. TuMV에 감염된 담배의 즙액을 이용한 무 TuMV 접종

- 60여 무 품종에 TuMV strain R007, R041, R065를 각각 즙액접종하여 접종 21일차 까지 바이러스 병징의 발달을 육안으로 관찰 후(Fig. 28), 정확한 진단을 위해 RT-PCR을 통해 TuMV의 감염을 확인하였다(Table 10).



접종 후



접종 7일 후



접종 14일 후



접종 21일 후

Fig. 28. 무 TuMV 즙액접종 후, 시간에 따른 병징 발현

Table 10. *R. sativus* 60 line별 TuMV strain 즙액접종 후, RT-PCR 진단 결과

No.\반복수	R007		R041		R065		No.\반복수	R007		R041		R065		No.\반복수	R007		R041		R065	
	1	2	1	2	1	2		1	2	1	2	1	2		1	2	1	2	1	2
1	0	0	0	0	0	0	22	0	0	0	0	0	0	43	0	0	X	X	0	0
2	0	0	0	0	0	0	23	0	0	0	0	0	0	44	0	0	X	X	0	0
3	0	0	X	X	0	0	24	0	0	0	0	0	0	45	0	0	X	X	0	0
4	0	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0	46	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	26	0	0	0	0	0	0	47	0	0	0	0	X	X
6	0	0	0	0	0	0	27	0	0	0	0	0	0	48	0	0	0	0	X	X
7	0	0	0	0	0	0	28	0	0	0	0	0	0	49	0	X	0	0	X	X
8	0	0	0	0	0	0	29	0	0	0	0	0	0	50	0	0	0	0	X	X
9	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	0	0	51	0	0	X	X	0	0
10	0	0	0	0	0	0	31	X	X	0	0	0	0	52	X	X	X	X	0	0
11	0	0	X	X	X	X	32	X	X	X	X	X	X	53	0	0	0	0	0	0
12	0	0	X	X	X	X	33	0	0	0	0	0	0	54	X	X	X	X	X	X
13	0	0	0	0	X	X	34	0	0	0	0	0	0	55	0	0	0	0	0	0
14	0	0	X	X	0	0	35	0	X	0	0	0	0	56	0	0	0	0	0	0
15	X	X	X	X	0	0	36	0	0	0	0	0	0	57	0	0	0	0	X	X
16	0	0	0	0	0	0	37	X	X	0	0	X	X	58	0	0	0	0	X	X
17	0	0	0	0	0	0	38	0	0	0	0	0	0	59	X	X	X	X	X	X
18	0	0	0	0	0	0	39	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	40	0	0	0	0	0	0	61	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	41	0	0	X	X	0	0	62	X	X	X	X	X	X

- RT-PCR 진단을 통하여, 3개의 TuMV strain에 대한 저항성/감수성 무 품종을 판별하여 19개의 TuMV 저항성 무 품종을 선발하였다(Table 11)

Table 11. *R. sativus* line별 TuMV R007, R041, R065 접종 결과 및 저항성 품종 판별

	R007	R041	R065		R007	R041	R065
No. 3	O	X	O	No. 44	O	X	O
No. 11	O	X	X	No. 45	O	X	O
No. 12	O	X	X	No. 47	O	O	X
No. 13	O	O	X	No. 48	O	O	X
No. 14	O	X	O	No. 50	O	O	X
No. 15	X	X	O	No. 51	O	X	O
No. 31	X	O	O	No. 52	X	X	O
No. 37	X	O	X	No. 57	O	O	X
No. 41	O	X	O	No. 58	O	O	X
No. 43	O	X	O				

제 6절. 비용절감형 현장용 저항성 검정법 개발

1. 현장형 무 뿌리혹병 병리검정법 개발

가. 서론

무(*Raphanus sativus*)는 배추 및 고추와 함께 우리나라의 3대 채소로 식생활에 중요한 채소이다. 배추과 작물인 무는 아시아 또는 지중해 연안이 원산지인 한해살이 또는 두해살이풀로 알려져 있다.

현재 전 세계적으로 무에 발생하는 병이 많이 알려져 있으며 대표적인 것으로는 무름병, 모자이크병, 시들음병, 잘록병 및 뿌리혹병 등이 있다. 특히 *Plasmodiophora brassicae* Woron.에 의한 뿌리혹병은 무뿐만 아니라 양배추, 브로콜리, 배추 등의 작물의 생산량에 상당한 영향을 미쳐 경제적으로 심각한 손실을 일으키며, 우리나라에서는 강원도, 경기도 및 전라북도 등의 무 재배지에서 뿌리혹병 발생이 보고되고 있다. 이 병원균은 휴면포자로 토양에 존재하며, 환경이 적합하면 수 년 동안 생존이 가능하여 한번 뿌리혹병이 발생한 재배포장에서는 병원균이 오랫동안 남아 있으므로 배추과 작물을 재배하기에 적합하지 않다. 기주가 뿌리혹병균 균주에 감염되면 한낮의 무더운 시간에는 시들음 증상을 보이다가 밤에는 회복되기를 반복한다. 또한 무의 생육 초기에는 뿌리가 기형으로 되고 지상부의 생육도 좋지 못하며, 생육 중기 이후에는 혹 모양의 이상 비대 증상이 나타나며 혹 부위의 표면에는 거친 돌기 모양이 많이 형성되거나 균열이 생기기도 한다. 그리고 생육 후기에는 균열 부위로 다른 병원균이 침입하여 뿌리가 썩기도 한다.

뿌리혹병을 방제하기 위하여 이병 식물의 제거, 배추과 작물 이외의 작물과의 윤작 및 저항성 품종 재배 등의 경종적 방제 방법, fluazinam, flusulfamide 및 cyazofamid 등의 살균제를 이용한 화학적 방제 및 *Trichoderma* spp. 및 *Streptomyces* spp. 등을 이용한 생물학적 방제 연구가 이루어졌다. 일본에서는 배추 및 무 뿌리혹병 저항성 품종 육성을 활발히 진행하였으나 병원균의 분화로 대부분의 병 저항성 품종에서 저항성이 무너지는 일이 발생하였다. 따라서 뿌리혹병에 대한 새로운 저항성 유전자원 선별 및 저항성 품종의 육성이 요구되며 효율적이고 재현성이 우수한 뿌리혹병 저항성 검정법이 필수적이다. 뿌리혹병균 접종 방법으로는 이병포장이식, slurry 방법, 포자현탁액 침지법 및 토양 혼합법 등이 있는데, 이들은 노동력이 많이 요구되고, 한 개체에 접종되는 포자의 양이 균일하지 않아서 재현성이 부족한 문제가 있었다. 반면 토양관주 접종법은 병원균의 포자현탁액을 토양에 관주 처리하여 편리하게 접종할 수 있다.

국내의 많은 중·소규모 종자회사에서는 병리검정 전문 기술, 장비 및 시설 등이 부족한 실정이다. 따라서 기반시설이 부족한 중·소 종자회사에서 쉽고 간편하게 무의 뿌리혹병에 대한 저항성을 검정할 수 있는 병리검정 방법을 개발이 필요한 실정이다. 본 연구팀의 다양한 경험과 업계 현황 조사를 통해 다음과 같은 현장형 병리검정 방법을 개발하였으며(Table 1), 한국화학연구원에서 구축한 일반형 무 뿌리혹병 병리검정법과 현장형 무 뿌리혹병 병리검정법을 비교 실험하여 그 효용성을 확인하였다.

Table 1. 현장형 무 뿌리혹병 병리검정법 비교

	일반 회사	일반형(화학연)	현장형	현장형 장점
파종	다양한 방법	5 × 8 연결포트, 1립/포트	5 × 8 연결포트, 3립/포트	소면적 사용
접종원 준비	현미경 이용 포자 농도 측정	현미경 이용 포자 농도 측정 (1.0-2.0 × 10 ⁹ spores/포트)	이병조직 0.5 g/포트	현미경 등 기기 필요없음
접종 방법	유묘 뿌리를 뽑아 포자현탁액에 침지한 후 새로운 포트에 이식, 이병토에 이식	토양관주 접종법 (5 ml/포트)	토양관주 접종법 (5 ml/포트)	노동력 절감, 대량검정 가능
재배 온도	-	접종 후 20℃에서 7일 재배, 20-25℃에서 7주 동안 재배	접종 후 20℃에서 3일 재배, 이후 무 재배 가능 조건에서 7주 동안 재배	안정적인 뿌리혹병 발생
접종 후 수분 관리	일반적인 발상태 작물관리	3일 동안 증류수로 저면관수, 이후 일반적인 발 상태로 관리	3일 동안 정수기 물로 저면관수, 이후 일반적인 발 상태로 관리함	증류 장치 필요 없음, 점면관수로 접종 효율 강화

나. 재료 및 방법

(1) 뿌리혹병균 균주

2009년에 강원도 강릉시의 배추 포장에서 뿌리혹병의 전형적인 병징을 나타내는 뿌리를 채집하였다. 온실에서 재배한 본엽 2엽기 배추 100주에 채집한 이병조직 1g을 취해 수확한 휴면포자현탁액을 각 배추 유묘에 5ml씩 접종하여 20℃ 항온항습실에서 1주일 동안 배양하였다. 이를 뿌리혹병이 발생한 적이 없는 한국화학연구원 발포장에 정식하여 60일 동안 재배하여 강릉 균주를 증식하였다. 그리고 2009년에 경기도 연천군에서 채집한 배추뿌리 이병조직을 강릉 균주와 동일한 방법으로 증식하여 실험에 사용하였, 증식한 강릉 균주와 연천 균주는 각각 -80℃ 초저온냉동고에 보관하여 실험에 사용하였다.

(2) 무 재배

‘슈퍼길조(농우바이오)’, ‘백옥(농우바이오)’, ‘초롱(동부팜한농)’, ‘새롬(신젠타종묘)’ 및 ‘여름춘향이열무(문산토코리아)’를 구입하여 실험에 사용하였다. 5 × 8 연결포트(80mL/pot, 범농사)에 원예용상토 5호(부농사)를 넣고 종자를 포트 당 3립씩 파종하여 온실에서 10일간 재배하였다. 그리고 대조 실험(일반형)에서는 포트 당 종자를 1립씩 파종하여 동일한 방법으로 재배

하여 실험에 사용하였다.

(3) 접종원 준비 및 접종

무 유묘에 뿌리혹병균을 접종하기 위해 -80°C 초저온냉동고에 보관 중인 강릉 균주와 연천 균주를 각각 꺼내어 실험에 필요한 이병 조직의 양(0.5g/포트)를 쟀 후 증류수로 수 회 세척하여 이물질을 깨끗이 제거하고 멸균수를 첨가하여 Warning blender로 마쇄하였다. 그리고 식물조직을 제거하기 위하여 4겹의 가제로 여과하여 포자현탁액을 준비하였고, 무 유묘에 포자현탁액을 포트 당 5mL씩 관주하여 접종하였다. 대조실험인 일반형 실험에서는 광학현미경 하(300배)에서 hemocytometer를 이용하여 현탁액의 휴면포자의 농도를 $2.0\text{--}4.0 \times 10^8$ spore·mL⁻¹이 되도록 조정하여 사용하였다.

(4) 발병 및 병조사

접종한 무 유묘는 20°C 항온항습실에서 정수기 물을 사용하여 3일간 저면 관수하였고 하루에 14간씩 광을 조사하면서 3일 동안 배양한 후에 온실로 이동하여 재배하였다. 접종 7주 후에 뿌리의 흙을 제거하고 물로 씻은 후에 뿌리혹 발생정도에 따라 병을 조사하였다. 대조 실험에서는 접종한 유묘를 20°C 항온항습실에서 증류수 물을 3일간 저면 관수하였고 하루에 14간씩 광을 조사하면서 7일 동안 배양한 후에 온실로 이동하여 재배하였다.

접종 7주 후에는 뿌리의 흙을 제거하고 물로 씻은 후에 뿌리혹 발생정도에 따라 병을 조사하였다. 조사기준은 0 = 뿌리혹병 발생이 없음, 1 = 주근에 뿌리혹이 착생되었으며 혹은 비대정도가 적고 서로 독립하여 존재, 2 = 비대정도가 큰 뿌리혹이 주근에 착생, 3 = 주근이 가늘고 주근과 세근에 작은 혹이 착생, 4 = 주근이 심하게 가늘고 주근과 세근에 큰 혹이 존재 등의 5단계로 하였다. 평균 발병도가 평균 발병도가 1.0 미만일 경우에는 저항성, 1.0 이상에서 2.0 이하는 중도저항성 그리고 2.0 초과는 감수성으로 판정하였다. 모든 실험은 10반복으로 2회 수행하였다.

다. 결과 및 고찰

현장형 무 뿌리혹병 검정법으로 5종의 무 유묘에 강릉과 연천 균주를 각각 접종하여 실험 결과, ‘초롱’에서는 두 균주 모두 높은 뿌리혹병 발생을 나타냈고, ‘백옥무’와 ‘슈퍼길조’에서는 두 균주 모두 병이 발생하지 않았다(Table 2). 반면에 ‘새롬’과 ‘여름춘향이열무’에서는 두 균주에 대해 서로 다른 반응을 보였는데, 강릉 균주를 ‘새롬’과 ‘여름춘향이열무’에 접종하였을 때에는 각각 저항성과 감수성을, 연천 균주를 접종한 경우에는 각각 중도저항성과 저항성 반응을 나타내었다(Fig. 1, Fig. 2, Table 2). 대조로 실험한 한국화학연구원에서 확립한 일반형 병리검정 방법에 의한 이들 품종의 저항성 결과가 거의 동일하였다(Table 2). 따라서 본 연구팀에서 확립한 현장형 무 뿌리혹병 병리검정법은 충분히 효용성이 있다고 생각되었다.

병리검정 전문기술이나 시설 등이 부족한 종자회사에서 간편하게 실험할 수 있는 무 뿌리혹병 저항성 검정법과 이들의 장점을 요약하면 다음과 같다(Table 1). 첫째, 5×8 연결포트에 포트 당 종자 3립씩을 파종한다. 이는 포트 당 1립씩 파종하는 것보다 동일 면적에 더 많은 개체의 병리검정이 가능하여 소면적 활용이 가능하다. 둘째, 뿌리혹병균 접종원을 준비할 때 이병 조직의 무게(0.5g/포트)를 재어 간편하게 포자현탁액을 만들 수 있다. 현미경과 같은 기기가 없는 곳에서도 충분히 실험이 가능하다. 셋째, 포트 당 토양에 5mL씩 관주하여 접종한다. 일반회사에서 주로 사용하는 뿌리 침지법과 이병토 접종법에 비해 노동력이 많이 소요되지 않아 대량 검정도 가능하다. 넷째, 접종 후에는 20°C 에서 3일 동안 배양한 후 무 재배가 가능한

조건에서 7주 동안 재배하면 안정적으로 뿌리혹병 발생이 가능하게 된다. 다섯째, 수분 관리는 접종 후 3일 동안 별도의 증류 장치가 필요 없이 정수기 물로 저면 관수하고 이후에는 일반적인 밭 상태로 관리해준다. 뿌리혹병균은 휴면포자가 발아하여 편모(flagella)가 달린 유주자의 상태로 물에서 수영하여 이동하여 뿌리털(root hair)에 도착하고 여기를 침입하여 발병하게 된다. 따라서 접종 초기의 충분한 수분 공급은 아주 중요한데 이를 위해 토양에 뿌리혹병균을 접종하고 3일 동안에 저면관수 함으로써 안정적인 뿌리혹병균 침입을 유도할 수 있다.

Table 2. 강릉과 연천 뿌리혹병 균주에 대한 무 품종의 저항성 반응

품종	강릉 균주				품종	연천 균주			
	일반형 (화학연)		현장형			일반형 (화학연)		현장형	
	발병도	반응	발병도	반응		발병도	반응	발병도	반응
백옥	0.0	R ^a	0.0	R	백옥	0.0	R	0.0	R
슈퍼길조	0.0	R	0.0	R	슈퍼길조	0.0	R	0.0	R
새롬	4.0	S	3.0	S	새롬	1.4	MR	1.7	MR
초롱	3.9	S	3.5	S	초롱	3.9	S	3.2	S
여름춘향이 열무	4.0	S	3.8	S	여름춘향이 열무	0.0	R	0.0	R

^a저항성 조사 기준. 평균 발병도가 1.0 미만인 경우에는 저항성(R), 1.0 이상에서 2.0 이하는 중도저항성(MR), 2.0 초과는 감수성(S)으로 판정함.



Fig. 1. 강릉 균주에 대한 무 뿌리혹병 증상. A: 일반형(화학연), B: 현장형.



Fig. 2. 연천 균주에 대한 무 뿌리혹병 증상. A: 일반형(화학연), B: 현장형.

2. 무 시들음병에 대한 현장형 병리검정법 개발

가. 서론

배추과 채소인 무(*Raphanus sativus* L.)는 우리나라 대표 채소 중 하나로, 국내 생산 과채류 중 배추와 더불어 총 생산량의 60% 이상을 차지하고 있는 매우 중요한 작물이다(Jung 등, 2004). 최근에 무 연작 재배지에서 각종 병해와 생리적 장애 발생이 증가하여 무 재배에 어려움을 겪고 있다. 현재까지 무에 발생하는 병해로 국내에서는 시들음병(*Fusarium* wilt), 뿌리혹병(cluroot), 검은썩음병(black rot), 노균병(downy mildew), 검은무늬병(black spot), 세균검은무늬병(bacterial leaf spot) 등 19종이 보고되었다(KSPP, 2009).

*Fusarium oxysporum*에 의해 발생하는 시들음병은 예전에 위황병(yellows)로 불렸던 토양전염성 병으로, 수백 종의 작물에 발생하여 세계적으로 큰 피해를 일으키고 있다(Armstrong and Armstrong, 1981; Booth, 1971; Kistler, 1997). *F. oxysporum*은 침입하는 기주에 따라 분화형(forma specilais, f. sp.)으로 나누고, 기주의 품종에 대한 병원성 차이로 race를 구별한다. 배추과 작물에 시들음병을 일으키는 병원균은 다섯 주요 병원성 그룹 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* race 1-5가 분류되었다(Armstrong and Armstrong, 1952; 1966; 1981; Ramirez-Villupadua 등, 1985). 후에 이들 다섯 race는 재분류 되었는데 race 1은 f. sp. *conglutinans* race 1로 그리고 race 5는 f. sp. *conglutinans* race 2로, race 3과 race 4는 각각 f. sp. *matthioli* race 1과 race 2로, 그리고 race 2는 주로 무를 감염하는 f. sp. *raphani*로 재정립되었다(Brayford, 1992).

무 시들음병은 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*에 의해 발생하며, 전 세계적으로 발생하여 막대한 피해를 일으키고 있는 무의 주요 병해이다. 무 시들음병은 1934년 미국 캘리포니아 San Benito에 있는 White Chinese Winter Radish 채종포에서 처음 보고된 이 후 1946년 위스콘신 Waukesha의 무 포장에서 그리고 현재에는 미국 각지에서 발생하고 있다(Pound, 1959; Pound and Fowler, 1953). 국내에서도 오래 전부터 발생되었을 것으로 생각되나 1981년 청원군 미농 재배단지에서 처음 보고되었고 계속된 연작으로 인해 시들음병 발생이 점차

증가하고 있는 추세이다(Moon 등, 2001).

현재 시들음병에 저항성인 무 품종을 여러 회사에서 판매하고 있으나, 무 시들음병 저항성 유전자 규명과 저항성 유전자식 그리고 분자마커 개발에 관한 보고는 매우 부족한 것이 현실이다(Baik 등, 2011). 이들 연구를 위해서는 안정적이고 효율적인 저항성 검정법이 필요하다. 무의 시들음병 발생 정도를 명확하게 구별할 수 있는 방법으로 뿌리 침지법을 이용한 검정법이 보고된 바 있다(Baik 등, 2010; 2011). 하지만 뿌리를 뽑아 물로 세척하여 흙을 제거한 후에 이를 포자현탁액에 침지하고 다시 새로운 포트에 이식하여 재배한 후에 병조사하는 뿌리침지법을 이용한 검정 방법은 대량의 시료에 대하여 시들음병 저항성 검정을 할 경우 시간과 노동력이 많이 필요하다. 따라서 뿌리 침지 접종 방법보다 대량의 무 유묘에 대한 시들음병 저항성을 효율적으로 조사하기 위한 간편하고 효율적인 접종 방법을 이용한 검정법의 개발이 필요하다.

본 연구는 뿌리 침지 접종 방법보다 더 간단하고 편리한 scalpel 접종 방법을 이용한 무 시들음병에 대한 유묘 검정법을 확립하고자, 저항성 정도가 다른 4종의 무 품종을 사용하여 scalpel 접종 방법(상처의 지체부와의 거리, 각도, 깊이 조절), 접종원 농도(3.7×10^5 , 1.1×10^6 , 3.3×10^6 , 1.0×10^7 conidia/ml), 접종하는 기주의 생육 시기(8, 10, 12, 14, 16일 재배한 유묘)에 따른 시들음병 발생을 조사하였다. 그리고 이들 결과로부터 확립한 간편 대량 검정법의 효용성을 확인하고자 일반적으로 사용 중인 뿌리 침지 접종 방법과 본 연구에서 확립한 접종 방법에 의한 무 품종들의 시들음병에 대한 저항성 차이를 비교하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 공시 무 품종과 재배

저항성 품종인 ‘명산’(Syngenta Korea, Seoul, Korea), 중도저항성 품종인 ‘청일품’(Monsanto Korea, Seoul, Korea), 감수성 품종인 ‘미농조생’(Asia Seed Co., Ltd, Seoul, Korea)과 ‘백춘’(Asia Seed Co., Ltd)을 시중에서 구입하여 실험에 사용하였다.

무 품종의 종자를 5×8 연결 포트(포트 당 토양 70 ml, Bumnong Co., Ltd, Jeong-eup, Korea)에 원예용상토 5호(Punong, Gyeongju, Korea)를 넣고 품종 당 10포트씩 그리고 포트 당 2립씩 파종하고 온실($25 \pm 5^\circ\text{C}$)에서 재배하였다. 종자가 발아한 후 유묘의 생장이 고르게 되도록 포트 당 1주씩 남기고 솟아 주었으며, 파종 후 14일 동안 재배한 유묘를 실험에 사용하였다. 접종하는 유묘의 생육 시기에 따른 시들음병 발생 실험에서는 위와 동일한 방법으로 종자를 파종하고 8, 10, 12, 14, 16일 동안 재배한 유묘를 사용하여 실험을 수행하였다.

(2) 접종원 준비

F. oxysporum f. sp. *raphani* KR1 균주를(Baik 등, 2010; 2011) potato dextrose agar (PDA; Becton, Dickinson and Co., Sparks, MD, USA) 배지에 접종하고 25°C 에서 7일 동안 배양한 균총으로부터 균사조각을 떼어 malt extract broth(MEB; Becton, Dickinson and Co.) 배지에 접종하고 이를 25°C 암상태에서 7일 동안 150 rpm으로 진탕배양 하였다. 배양한 KR1 균주를 4겹 거즈로 걸러 균사를 제거하고 8,000 rpm에서 10분간 원심분리($4,300 \times g$, 10분, 4°C , Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA)를 한 후에 상등액을 제거하고 침전물에 멸균수를 넣고 잘 흔들어 포자현탁액을 준비하였다. 포자현탁액의 포자 농도는 광학현미경(Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA) 하에서 hemocytometer(Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Konigshofen, Germany)를 사용하여 측정하였으며, 접종 농도에 따른 무 시들음병

발생 실험을 제외한 모든 실험의 포자 농도는 멸균수로 희석하여 1.0×10^7 conidia/ml로 조정하였다.

그리고 접종원 농도에 따른 무 시들음병 발생 실험을 위해서는 앞에서와 같은 방법으로 희석하여 3.7×10^5 , 1.1×10^6 , 3.3×10^6 , 1.0×10^7 conidia/ml 농도의 포자현탁액을 준비하였다.

(3) 시들음병균 접종

Scalpel을 사용하여 상처를 내는 방법에 따른 무 시들음병 발생 실험을 제외한 모든 실험은 무 유묘에 scalpel을 이용하여 지제부에서 0.5 cm 떨어진 곳에서 90°각도, 2 cm 깊이로 찢어서 뿌리에 상처를 주고 준비한 포자현탁액을 10 ml씩 관주하여 접종하였다.

Scalpel로 상처내는 방법에 따른 무 시들음병 발생 실험은 scalpel을 이용하여

- (1) 지제부에서 1 cm 떨어진 곳에서 45°각도, 2 cm 깊이로 찢어서 뿌리에 상처를 내는 방법,
 - (2) 지제부에서 1 cm 떨어진 곳에서 90°각도, 2 cm 깊이로 찢어서 뿌리에 상처를 내는 방법,
 - (3) 지제부에서 0.5 cm 떨어진 곳에서 90°각도, 2 cm 깊이로 찢어서 뿌리에 상처를 내는 방법,
 - (4) 지제부에서 0.5 cm 떨어진 곳에서 90°각도, 3 cm 깊이로 찢어서 뿌리에 상처를 내는 방법
- 등 네 가지 방법으로 유묘의 뿌리에 상처를 주고 준비한 포자현탁액을 10 ml씩 관주하여 접종하였다.

(4) 뿌리 침지 접종법과 확립된 scalpel 접종법에 의한 시들음병 발생 비교.

확립한 scalpel 접종법의 효용성을 검정하기 위하여 뿌리침지 접종법과 동시에 접종하여 무 품종들의 시들음병 발생을 비교하였다. 뿌리 침지 접종법은 8×16 연결 포트(포트 당 토양 21 ml, Bumong Co., Ltd)에 4가지 품종의 무 종자를 파종하고 온실($25 \pm 5^\circ\text{C}$)에서 9일 동안 재배된 유묘의 뿌리를 물로 세척하여 흙을 제거한 후에 앞에서와 같은 방법으로 준비한 포자현탁액(3.0×10^6 conidia/ml)에 30분 동안 침지하여 접종하였다. 그리고 5×8 연결 포트에 원예용상토 5호(Punong)를 넣고 접종한 유묘를 이식하였다.

Scalpel 접종을 이용한 간편검정법은 5×8 연결 포트에 무 종자를 파종하고 온실($25 \pm 5^\circ\text{C}$)에서 14일 동안 재배한 유묘를 scalpel을 이용하여 지제부에서 0.5 cm 떨어진 곳에서 90°각도, 2 cm 깊이로 찢어서 뿌리에 상처를 주고 준비한 포자현탁액(1.0×10^7 conidia/ml)을 포트 당 10 ml씩 관주하여 접종하였다.

(5) 발병 및 병조사

Scalpel 접종법으로 *F. oxysporum* f. sp. *raphani* KR1 균주를 접종한 유묘는 25°C 습실상에서 1일 동안 배양한 후에 25°C 항온실에서 하루 12시간씩 광을 조사하면서 4주 동안 재배한 후에 그리고 침지접종법으로 접종한 유묘는 3주 동안 재배한 후에 시들음병 발생을 조사하였다.

병조사는 각 식물체의 시들음병 발병 정도(disease severity)를 조사하였으며, 발병 정도는 다음과 같은 발병도(disease index)로 조사하였다. 0 = 건전, 1 = 지하부는 갈변되나 지상부는 시들지 않고 병징이 없는 것, 2 = 지하부는 갈변되고 지상부는 시드는 것, 3 = 지하부는 갈변되고 지상부는 시들며 황화하는 것, 4 = 지하부는 갈변되고 지상부는 심하게 황변하여 시들고 낙엽된 것, 5 = 고사 등 6단계로 하였으며(Fig. 1), 평균 발병도가 1.0 이하인 경우에는 저항성, 1.1 - 2.5는 중도저항성, 2.5 초과는 감수성으로 판정하였다.

모든 실험은 10반복으로 2회 실시하였다. 그리고 SAS(SAS Institute, Inc., 1989, Cary, NC, USA) 프로그램을 이용하여 ANOVA 분석을 하였으며, 처리 평균간 비교를 위하여

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

다. 결과 및 고찰

(1) Scalpel 상처 방법에 따른 무 시들음병 발생

다양한 상처 각도와 깊이의 조합 네 가지 방법 모두 접종조건에 따른 유의성은 인정되지 않았으며, '명산'은 저항성을 그리고 '미농조생'과 '백춘'은 감수성을 보였다(Table 3). 하지만 실험한 방법들 중 저항성 및 감수성 품종 간에 가장 뚜렷한 저항성 차이를 보이는 방법은 지제부에서 0.5cm 떨어진 곳에서 scalpel로 90°각도, 2cm 깊이로 찢어서 뿌리에 상처를 주고 접종하였을 때 실험한 '명산', '미농조생', '백춘' 품종은 각각 0.8, 3.3, 3.4의 평균 발병도를 나타냈다(Table 3).

Song 등(1996)은 양배추 시들음병 발생을 위하여 병원균을 접종하였을 때 토양 관주법보다 침지 접종법에서 병 발생이 다소 높았다고 보고하였다. 하지만 Baik 등(2010)은 무 시들음병에 대한 저항성 검정법을 확립하기 위한 연구에서 무 유묘에 시들음병균의 포자현탁액을 상처없이 관주하는 방법으로 접종하였을 때에는 시들음병이 전혀 발생하지 않으므로 관주 접종법은 무 시들음병 저항성 검정에 적합하지 않은 방법이라고 보고하였다. 따라서 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*의 무 유묘 뿌리로 효과적인 침입을 위해서는 반드시 상처가 필요하다고 생각되었다.

Park 등(2013)은 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*에 의한 토마토 시들음병의 간편 대량 저항성 검정법으로 scalpel을 이용한 접종 방법을 제안하였는데, 지제부에서 1cm 떨어진 곳에서 45°각도, 2cm 깊이로 scalpel을 찢어서 뿌리에 상처를 주는 방법이 효과적이라고 하였다. 그리고 *F. oxysporum* f. sp. *melonis*에 의한 멜론 덩굴쪓김병의 대량 검정법 개발에서도 동일한 scalpel 방법이 효율적이었다(Lee et al., 2015).

하지만 무의 경우에는 토마토와 멜론에서와 동일하게 지제부 옆 1cm 떨어진 곳에서 45°각도로 뿌리에 상처를 가했을 때에는 경우에 따라 주근이 잘려 저항성 품종에서 덩굴쪓김병 발생이 크게 증가하는 경우도 있었다(결과 미제시). 그리고 지제부에서 0.5cm 떨어진 곳에서 90° 각도 3cm 깊이로 찢은 경우에는 감수성 품종들에서 시들음병 발생이 가장 높았으나, 저항성 품종인 '명산'에서도 1.0의 발병도를 보여 실험한 방법 중 가장 높은 병 발생을 보였다. 따라서 무 시들음병 저항성 검정을 위한 scalpel을 이용한 효과적인 상처 방법은 지제부에서 0.5cm 떨어진 위치에 90° 각도로 2cm 깊이로 뿌리에 상처를 주는 것이라 생각되었다.

Table 3. Development of *Fusarium* wilt on radish cultivars according to scalpel inoculation method^a

Cultivar	Trait	Scalpel-wounding method (Distance from stem, angle, depth)			
		1 cm, 45°, 2 cm	1 cm, 90°, 2 cm	0.5 cm, 90°, 2 cm	0.5 cm, 90°, 3 cm
Myoungsan	R	0.5 ^b z ^c d	0.6 bz	0.8 bz	1.0 bz
Minongjosaeng	S	3.1 az	2.7 az	3.3 az	3.4 az
Baekchun	S	3.0 az	3.8 az	3.4 az	3.7 az

^aFourteen-day-old seedlings of each cultivar were inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* KR1 by cutting the roots with a scalpel and then pouring a 10 ml-aliquot of spore suspension on soil at a concentration of 1.0×10^7 conidia/ml. The inoculated plants were incubated a dew chamber at 25°C and then cultivated in a growth room at 25°C with 12-hr light a day. Four weeks after inoculation, disease severity of the plant was investigated on a scale of 0-5.

^bEach value represents the mean disease severity of two runs with ten replicates each.

^cValues in the labeled with the same letter in each column are not significantly different in Duncan's multiple range test at $P = 0.05$.

^dValues in the labeled with the same letter in each row are not significantly different in Duncan's multiple range test at $P = 0.05$.

(2) 접종원 양에 따른 무 시들음병 발생

접종원 양에 따른 무 시들음병 발생을 조사하고자, 네 가지 무 품종 유묘에 3.7×10^5 , 1.1×10^6 , 3.3×10^6 , 1.0×10^7 conidia/ml의 포자현탁액을 사용해 접종하고 시들음병 발생을 조사한 결과, 저항성 품종인 '명산'을 제외한 나머지 3가지 품종은 접종원 농도가 증가함에 따라 시들음병 발생이 증가하였으나 통계적으로 유의성 있는 차이는 없었다(Table 4).

'명산'은 실험한 네 접종원 농도 모두에서 저항성을 그리고 감수성 품종인 '미농조생'과 '백춘'은 모두 감수성을 나타냈다. 그리고 중도저항성 품종인 '장생'은 1.0×10^7 conidia/ml에서만 발병도 1.4로 중도저항성을 보였으며 나머지 농도에서는 1.0 이하의 발병도 즉, 저항성을 보였다. 그러므로 실험한 접종원 농도 중 1.0×10^7 conidia/ml 농도에서만 '명산', '장생', '미농조생', '백춘'이 각각 발병도 0.8, 1.4, 3.9, 4.4의 발병도를 보여 각 품종들의 저항성 특성을 잘 나타낸다는 것을 알 수 있었다(Table 4).

Baik(2011) 등은 뿌리침지 접종법으로 3.0×10^6 - 3.0×10^7 conidia/ml 농도의 포자현탁액을 접종하여 무 품종들에서의 시들음병 발생을 조사한 결과, 감수성 품종인 '한농여름'은 접종원 농도가 증가함에 따라 병 발생이 크게 증가하였는데 이는 본 연구의 '미농조생'과 유사한 결과이며, 또 '장생'도 낮은 농도에서는 저항성을 그리고 높은 농도에서는 중도저항성을 보여 본 연구에서와 같은 경향을 보였으며, 본 연구에서와 마찬가지로 '명산'은 실험한 접종 농도에 관계없이 저항성을 보였다고 하였다. 따라서 접종원 양에 따른 무 품종들의 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*에 대한 저항성 반응은 침지 접종법과 scalpel

접종법에서 유사하다는 것을 알 수 있다. 그리고 scalpel 접종 방법을 이용한 무 시들음병 간편검정법을 위한 접종원 양은 1.0×10^7 conidia/ml 농도의 포자현탁액을 포트 당 10 ml씩 접종하는 것이 바람직하리라 생각되었다.

Table 4. Development of Fusarium wilt on radish cultivars according to inoculum concentration^a

Cultivar	Trait	Inoculum concentration (conidia/ml)			
		3.7×10^5	1.1×10^6	3.3×10^6	1.0×10^7
Myoungsan	R	0.8 ^b c ^z d	0.7 bz	0.9 bz	0.8 bz
Jangsaeng	MR	0.6 bz	1.0 bz	0.8 bz	1.4 bz
Minongjosaeng	S	2.6 abz	3.6 az	3.4 az	3.9 az
Baekchun	S	3.7 az	4.0 az	4.8 az	4.4 az

^aFourteen-day-old seedlings of each cultivar were inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* KR1 by cutting the roots with a scalpel and then pouring a 10 ml-aliquot of spore suspension on soil. The inoculated plants were incubated a dew chamber at 25°C and then cultivated in a growth room at 25°C with 12-hr light a day. Four weeks after inoculation, disease severity of the plant was investigated on a scale of 0–5.

^bEach value represents the mean disease severity of two runs with ten replicates each.

^cValues in the labeled with the same letter in each column are not significantly different in Duncan's multiple range test at $P = 0.05$.

^dValues in the labeled with the same letter in each row are not significantly different in Duncan's multiple range test at $P = 0.05$.

(3) 생육시기에 따른 무 시들음병 발생

종자를 파종하고 온실(25 ± 5°C)에서 8일, 10일, 12일, 14일, 16일 동안 재배한 유묘에 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*를 접종하고 무 시들음병의 발생을 조사한 결과, 실험 무의 생육 시기 중 14일 유묘는 '명산', '장생', '미농조생', '백춘'이 각각 0.8, 1.1, 3.3, 4.0의 발병도를 보이며 저항성, 중도저항성, 감수성 반응을 나타냈다(Table 5). 하지만 8일, 10일, 12일 재배한 유묘는 '백춘'과 '명산'에서는 감수성과 저항성을 잘 나타냈으나, 감수성 품종인 '미농조생'은 중도저항성을 그리고 중도저항성 품종인 '장생'은 저항성을 나타냈다.

그리고 16일 재배한 유묘는 저항성 품종 '명산'에서는 저항성이 감소하여 중도저항성을 나타냈다. 재배 기간이 증가할수록 뿌리가 많이 자라게 되고 여기에 scalpel로 상처를 내면 다른 생육 시기에 비하여 상처가 더 컸으리라 생각되며 이 때문에 저항성 품종인 '명산'이 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*에 대한 저항성을 나타내게 하는 것이 어려웠을 것으로 생각되었다.

이상의 결과로부터 대량의 무 시료에 대하여 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*에 대한 저항성을 간편하게 검정하기 위해서는 원예용 상토에 무 종자를 파종하고 온실(25 ± 5°C)에서 14일 동안 재배한 유묘에, scalpel을 사용하여 지제부에서 0.5 cm 떨어진 곳에서 90°각도 2 cm

깊이로 찢어서 뿌리에 상처를 주고, 1.0×10^7 conidia/ml 농도의 포자현탁액을 포트당 10ml씩 관주하여 접종하고, 25°C에서 재배하는 것이 효율적이라고 생각되었다.

Table 5. Development of Fusarium wilt on radish cultivars according to growth stages^a

Cultivar	Trait	Plant growth stage (days after sowing)				
		8	10	12	14	16
Myoungsan	R	0.5 ^b c ^z d	0.7 bz	0.6 bz	0.8 bz	1.2 bz
Jangsaeng	MR	0.6 bz	0.6 bz	0.8 bz	1.1 bz	1.2 bz
Minongjosaeng	S	1.7 bz	2.1 abz	2.2 abz	3.3 az	2.5 abz
Baekchun	S	4.1 az	4.0 az	4.2 az	4.0 az	3.6 az

^aEight-, ten-, twelve-, fourteen-, sixteen-day-old seedlings of each cultivar were inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* KR1 by cutting the roots with a scalpel and then pouring a 10 ml-aliquot of spore suspension on soil at a concentration of 1.0×10^7 conidia/ml. The inoculated plants were incubated a dew chamber at 25°C and then cultivated in a growth room at 25°C with 12-hr light a day. Four weeks after inoculation, disease severity of the plant was investigated on a scale of 0-5.

^bEach value represents the mean disease severity of two runs with ten replicates each.

^cValues in the labeled with the same letter in each column are not significantly different in Duncan's multiple range test at $P = 0.05$.

^dValues in the labeled with the same letter in each row are not significantly different in Duncan's multiple range test at $P = 0.05$.

(4) 확립한 간편검정법의 효용성

본 연구에서 확립한 scalpel 접종법을 이용한 간편검정법의 효용성을 확인하고자 기존에 널리 사용하고 있는 뿌리침지 접종 방법과 동시에 실험하여 무 품종들의 시들음병 발생 및 저항성 반응을 비교한 결과, 뿌리침지 방법을 사용하면 '명산', '장생', '미농조생', '백춘'에서 각각 1.0, 1.6, 3.9, 4.7의 발병도를 즉, 각각 저항성, 중도저항성, 감수성, 감수성을 나타냈다. 그리고 간편검정법으로 실험하였을 때에는 '명산', '장생', '미농조생', '백춘'에서 각각 0.6, 1.1, 2.7, 3.2의 발병도를 보여 뿌리침지방문과 마찬가지로 각 품종은 저항성, 중도저항성, 감수성, 감수성 반응을 잘 나타냈다(Table 6). 또한 본 연구에서 확립한 검정법은 저항성 품종인 '명산'에서 기존 방법에 비하여 더 높은 저항성 반응을 나타내므로 대량의 무 시료로부터 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*에 대한 저항성 개체를 효과적으로 선발할 수 있으리라 생각되었다.

이상의 결과로부터 본 연구에서 확립한 scalpel 접종 방법을 이용한 무 시들음병 저항성 간편검정법은 기존 방법의 단점인 시간과 노동력이 많이 소요되는 것을 개선하고 무 품종들의 저항성 반응도 잘 나타내므로 적은 시간과 노동력으로 간단하고 용이하게 무 시들음병의 감수성과 저항성을 검정할 수 있는 효율적인 방법이라고 생각되었다.

Table 6. Comparison of resistance degree between root dipping and scalpel inoculation methods to Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*

Cultivar	Trait	Inoculation method	
		root dipping ^a	scalpel ^b
Myoungsan	R	1.0 ^c b ^d z ^e	0.6 cz
Jangsaeng	MR	1.6 bz	1.1 bcz
Minongjosaeng	S	3.9 az	2.7 abz
Baekchun	S	4.7 az	3.2 az

^aNine-day-old seedlings of radish cultivars were uprooted and the roots were washed gently in water. And then the plants were inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *raphani* by dipping the roots in inoculum suspensions at a concentration of 3.0×10^6 conidia/ml for 30 minutes and were transplanted into 40-cell plastic trays. The plants were incubated a dew chamber at 25°C and then cultivated in a growth room at 25°C with 12-hr light a day. Three weeks after inoculation, disease severity of the plant was investigated on a scale of 0-5.

^bFourteen-day-old seedlings of each cultivar were inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *raphani* KR1 by cutting the roots with a scalpel and then pouring a 10 ml-aliquot of spore suspension on soil at a concentration of 1.0×10^7 conidia/ml. The inoculated plants were incubated a dew chamber at 25°C and then cultivated in a growth room at 25°C with 12-hr light a day. Four weeks after inoculation, disease severity of the plant was investigated on a scale of 0-5.

^cEach value represents the mean disease severity of two runs with ten replicates each.

^dValues in the labeled with the same letter in each column are not significantly different in Duncan's multiple range test at $P = 0.05$.

^eValues in the labeled with the same letter in each row are not significantly different in Duncan's multiple range test at $P = 0.05$.

3. 무 무름병에 대한 현장형 병리검정법 개발

가. 서론

무(*Raphanus sativus* L.)는 배추과 작물로, 삼국시대부터 우리나라에 도입된 대표적인 채소 중 하나이다. 무는 작형의 세분화로 인해 연중 재배가 가능하게 되었고, 이로 인해 연작 재배지가 증가하는 추세이다. 이러한 재배 환경에 따른 각종 생리 장애와 병해는 점차 증가하게 되는데 현재까지 무에 발생하는 병해에는 무름병을 포함한 19종이 보고되어 있다. 무 무름병을 야기하는 식물병원세균은 *Pectobacterium chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* 이렇게 3종이 알려져 있다 (KSPP, 2009). 무 재배지에서 이 3종에 대한 병원균의 밀도에 대한 보고는 아직 없었지만, 무와 동일한 십자화과 작물인 배추 무름병의 경우 2014년 8월말 배추 무름병이 발생한 포장에서의 세균 검출 정도는 *Pectobacterium carotovorum* 계통의 세균이 73.1%로 우점종으로 나타났다(이 등, 2015). 이렇게 포장에 우점하고 있는 병원균에 대한 저항성 품종을 육성하기 위해서는 다양한 유전자원을 수집하고 이에 대한 병 저항성 검정을 통해 저항성 자원을 선발한다. 이를 위해 각 품종의 병 저항성 정도를 판별하기 위한 간편한 병리검정 방법이 필요하다.

과거부터 병 저항성 검정 연구는 이미 보고된 바 있는데, 포도 껌빛곰팡이병, 벼 키다리병, 토마토 시들음병, 백합 구근부패병 등 다양한 병 저항성 검정방법이 확립되었다. 그러나 검정방법이 확립되어도 병 저항성 판별을 현장에서 사용하기에 어려움이 있는 경우가 있는데, 대표적으로 백합 구근부패병의 경우 병원균을 배양하여 토양에 섞은 후 백합 인편을 심고, 8주 후(Loffler et al, 1995; Straathof et al., 1993) 혹은 12주 후 (Prados-Logero et al., 2008) 수확하여 정상토양에 옮겨 심은 뒤 병 진전 양상을 확인하여 저항성 지수를 6단계로 제시하고, 실험에 사용된 백합 16품종에 대하여 저항성 정도를 판별하기도 하였지만 이렇게 포장에서 실험하는 경우 병 저항성 검정에 소요되는 경제적, 노동적 비용이 많이 요구되어 효율적이지 못하였다. 또한 칼라 무름병의 경우 잎 절편을 병원균 현탁액에 침지하여 병 저항성 정도를 평가하는 잎 절편법을 개발하였으나(Suijder and van Tuyl, 2002) 이렇게 잎 절편을 이용할 경우 병 저항성 정도를 평가하기까지 10일 정도의 시간이 소요되면서 잎 절편의 황화현상과 부생세균에 의한 무름 증상이 동반되어 저항성 평가가 어려운 단점이 있었다. 이렇게 현실적으로 병 저항성 검정이 필요한 현장에서는 병 저항성 평가에 문제가 있거나, 병리 검정에 필요한 경제적, 시간적 비용의 문제가 수반되어 새로운 저항성 자원을 발굴했음에도 정확한 병 저항성 평가가 이루어지지 못하게 되어 현장에서 간편하고 신속한 병리검정법 확립이 필요한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 무 무름병을 야기하는 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*에 대한 병 저항성 평가가 필요한 현장에서 무 무름병을 대량으로 집중하기 위한 간단하고 신속한 방법을 모색하고자 하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 무 무름병 현장형 병리검정법 개발

- 식물체 준비
 - 5×8 플러그 포트에 원예용상토 2호(부농사)를 담은 뒤 ‘아우리월동’, ‘YR챔피언’, ‘전무후무’ ‘빛고은열무’, ‘선봉알타리’, ‘하우스청옥’ 품종을 각 각 2립씩 파종한 뒤 온실에서 재배하였다. 파종 5-6일 후에 포트 당 1개의 식물체가 되도록 무를 솟아주거나 이식해주었고, 파종 20일 후 3-4엽이 완전 전개된 무 유묘를 실험에 사용하였다.
- 병원균 및 집중원 준비
 - NA(nutrient agar, Difco)배지에 무 무름병균 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* KACC

10421을 도달한 뒤 30°C에서 30시간 배양하였다. 배양한 무 무름병균의 단콜로니를 취하여 새로운 NA배지에 무 무름병균을 3단 도달법으로 최대한 많이 배양되도록 촘촘히 도달하여 30°C에서 40시간 배양하였다(Fig. 4). 세균현탁액을 만들기 위하여 세균이 배양된 배지 위에 멸균수를 10 ml 부어 spreader로 세균을 고르게 풀어준 뒤, 이 세균 현탁액 5 ml을 멸균수 50 ml, 55 ml, 60 ml에 각각 혼합한 뒤 OD₆₀₀ 값을 측정하였다.

(2) 기존방법과 현장형 병리검정 결과 비교

세균 현탁액을 만든 뒤 분광광도계(DU-800, BECKMAN COULTER®)를 이용하여 OD₆₀₀ 값을 측정한 뒤, 세균 현탁액을 무 무름병 저항성 검정에 적절한 농도인 OD₆₀₀= 0.2를 100배 희석하여 무 무름병 저항성 검정을 수행하는 기존의 방법과 위에서 개발한 현장형 병리검정법을 비교하기 위해 시판되고 있는 6개의 무 품종에 대하여 두 가지 방법으로 접종한 후 두 방법간의 무 무름병 발병정도를 비교하여 개발한 현장형 병리검정법의 현장적용 가능성 여부를 알아보 고자 하였다.

- 식물체 준비

- 5×8 플리그 포트에 원예용상토 2호(부농사)를 담은 뒤 ‘아우리월동’, ‘YR챔피언’, ‘전무후무’ ‘빛고은열무’, ‘선봉알타리’, ‘하우스청옥’ 품종을 각 각 2립씩 파종한 뒤 온실에서 재배하였다. 파종 5-6일 후에 포트 당 1개의 식물체가 되도록 무를 솟아주거나 이식해주었고, 파종 20일 후 3-4엽이 완전 전개된 유묘를 실험에 사용하였다.

- 병원균 및 접종원 준비

- 기존방법인 NA배지에 streaking하여 1일간 전배양한 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (PCC) KACC 10421균주에 NB(nutrient broth, Difco)를 5ml 넣고, 멸균한 spreader로 세균을 고르게 수확하여 세균 현탁액을 만든다. 이 세균 현탁액을 2 ml 취하여 새로운 NB배지 200 ml에 접종한 뒤 30°C, 200 rpm으로 24-36시간 진탕배양 후 상온에서 8,000rpm, 10분간 원심분리하여 세균 pellet을 멸균수에 현탁하여 OD₆₀₀= 0.2(1×10⁸ CFU/ml)로 조정 한 뒤, 이를 100배 희석하여 1×10⁶ CFU/ml가 되도록 조정 한 세균현탁액을 접종원으로 사용하였고, 현장형 방법 NA배지에 streaking하여 40시간 전배양한 PCC KACC 10421균주의 배지 위에 멸균수를 10 ml 부어 spreader로 세균을 풀어 세균현탁액을 만들고, 멸균수 60 ml에 세균 현탁액 5 ml을 혼합한 세균 현탁액을 만든 뒤 이를 100배 희석하여 접종원으로 사용하였다.

- 병원균 접종

- 1×10⁶ CFU/ml이 되도록 조정 한 세균현탁액과 멸균한 glycerol을 4:1비율로 균질하게 혼합하여 식물체 기부에 5 ml 접종하였다.

- 접종 후 환경

- 병원균을 접종한 식물체는 25°C dew chamber에 48시간 습실처리 한 후, 25°C(RH:80%)향온향습실에 두고 하루에 12시간씩 광을 조사하면서 병 진전 정도를 관찰하였다.

- 병조사

- 접종 3, 4, 5일 후 발병정도에 따라 각 개체 별 발병지수를 조사하였다.

Table 1. Disease index of radish bacterial soft rot

Disease index	Symptom
0	Healthy plant
1	Chlorosis or rot ; 0-25%
2	Chlorosis or rot ; 26-50%
3	Chlorosis or rot ; 51-75%
4	Chlorosis or rot ; 76-100%, dead plant

- 또한 발병도와 병진전곡선하면적을 구하였다.

- 발병도(disease severity, %)

= $\{ \sum(\text{disease index} \times \text{the number of diseased plants}) / (\text{the highest disease index} \times \text{the number of plants rated}) \} \times 100$

- 병진전곡선하면적(area under the disease progress curve; AUDPC)

= $\{ (\text{disease severity of 3DAI} + \text{disease severity of 4DAI}) / 2 \} + \{ (\text{disease severity of 4DAI} + \text{disease severity of 5DAI}) / 2 \}$

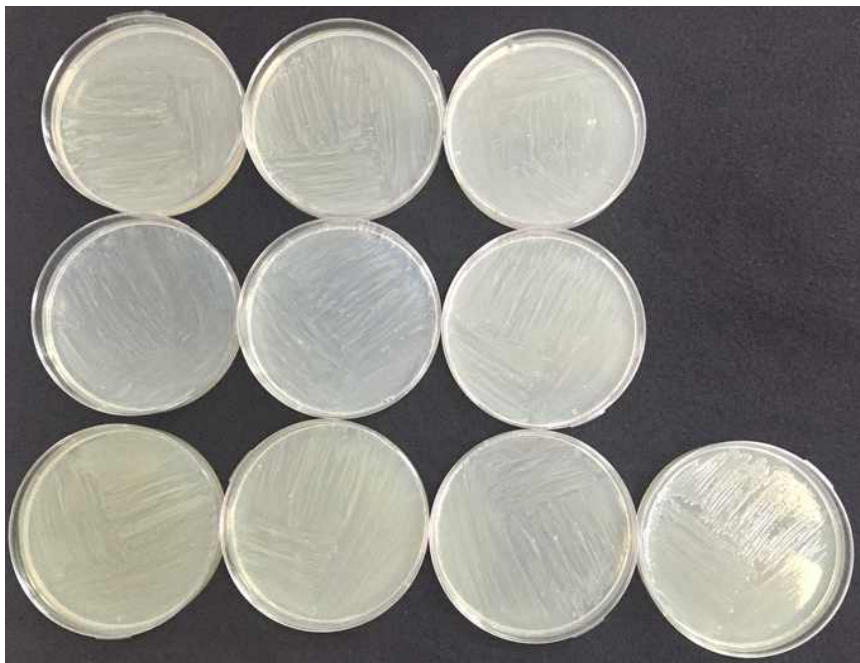


Fig. 4. Cultivation of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* KACC 10421 was carried out at 30°C for 40 hr in nutrient agar.

다. 결과 및 고찰

(1) 무 무름병 현장형 병리검정법 개발

- 세균이 배양된 배지 위에 멸균수를 10 ml을 넣고, spreader로 세균을 풀어 세균현탁액을 만든 뒤 멸균수 50, 55, 60 ml에 각각 세균 현탁액 5 ml씩 혼합하였을 때, 평균 OD₆₀₀ 값은 0.3525, 0.2723, 0.208이었다. 따라서 세균이 배양된 배지 위에 멸균수를 10 ml을 넣고 spreader로 세균을 풀어 세균현탁액을 만든 뒤, 멸균수 60 ml에 세균 현탁액 5 ml을 혼합한 비율이 현장형 병리검정 방법에 적절하다고 생각하였다.

Table 2. Dilution of bacterial suspension for convenience method.

Plate No.	A ^z	B ^y	C ^x
1	0.3520 ± 0.0001	0.2714 ± 0.0001	0.2169 ± 0.0001
2	0.3544 ± 0.0001	0.2720 ± 0.0001	0.2061 ± 0.0000
3	0.3542 ± 0.0001	0.2746 ± 0.0001	0.2050 ± 0.0001
4	0.3522 ± 0.0001	0.2744 ± 0.0001	0.1913 ± 0.0001
5	0.3528 ± 0.0001	0.2722 ± 0.0001	0.2158 ± 0.0001
6	0.3519 ± 0.0001	0.2728 ± 0.000	0.2061 ± 0.0001
7	0.3533 ± 0.0001	0.2826 ± 0.0001	0.2050 ± 0.0000
8	0.3510 ± 0.0001	0.2644 ± 0.0000	0.1988 ± 0.0000
9	0.3503 ± 0.0006	0.2652 ± 0.0001	0.2143 ± 0.0001
10	0.3526 ± 0.0001	0.2733 ± 0.0001	0.2222 ± 0.0001
Average OD ₆₀₀	0.3525	0.2723	0.2081

^{z,y,x}Bacterial suspension were prepared by sterilized spreader in 10ml sterilized water and then it taken 5 ml of bacterial suspension and each 50^z, 55^y, 60^x ml sterilized water were mixed.

(2) 기존방법과 현장형 병리검정 방법 비교

- 세균 현탁액을 만든 흡광도를 측정하여 무 무름병 저항성 검정에 적절한 농도인 OD₆₀₀= 0.2 를 100배 희석하는 기존의 방법과 세균이 배양된 배지 위에 멸균수를 10 ml을 넣고 spreader로 세균을 풀어 세균현탁액을 만든 뒤, 멸균수 60 ml에 세균 현탁액 5ml을 혼합한 세균현탁액을 100배 희석하여 무에 접종하는 현장형 병리검정법을 비교하였을 때, 두 방법으로 접종한 결과 실험에 사용한 6품종의 발병양상이 동일하였다. 이를 병진전곡선하면적(area under the disease progress curve; AUDPC)을 구하였을 때, 기존에 무 무름병 저항성 품종으로 선발한 ‘아우리월동무’의 기존방법은 ‘29.1’은 현장형 병리검정법은 ‘28.4’로, 중도저항성을 나타낸 ‘전무후무’의 경우 기존방법은 ‘130.3’, 현장형 병리검정법은 ‘144.1’, 감수성으로 선발한 ‘선봉알타리’의 경우 기존방법은 ‘212.2’, 현장형 병리검정법은 ‘208.4’로 나타나 현장형 병리검정으로 접종하였을 경우 기존 방법과 동일하게 병 저항성 평가가 동일하게 나타났다. 따라서 위에서 개발한 현장형 병리검정법은 기존에 세균을 배양하여 흡광도를 측정하고 세균현탁액을 만들어야 하는 시간적, 노동적 비용을 감소시킬 수 있으며, 동시에 무 무름병 병 저항성 평가를 안정적으로 진행할 수 있다고 생각한다.

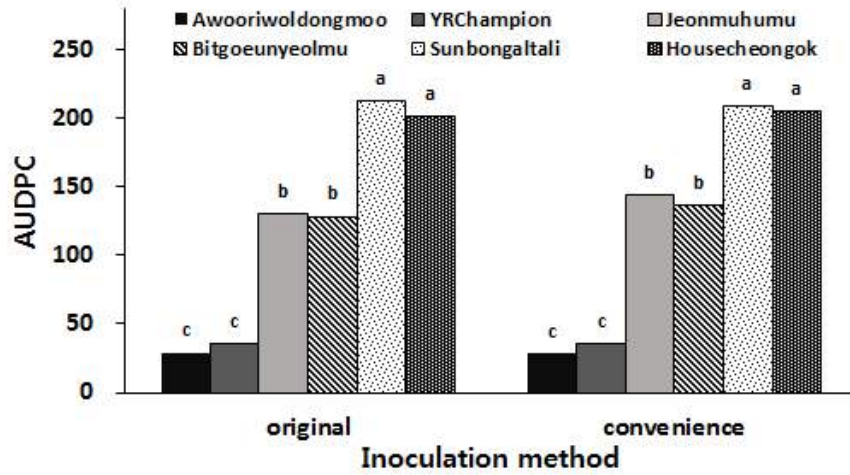


Fig. 2. Comparison of two inoculation methods for estimating resistance of 6 radish cultivars to *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* KACC 10421. Value labeled with the same letter are not significantly different based on Duncan's multiple range test at $p = 0.05$.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절. 목표달성도

연차	연구계획서상의 연구목표	연구 결과	달성도 (%)
1년차 (2014)	- 다양한 뿌리혹병균 (<i>Plasmodiophora brassicae</i>) 수집	<ul style="list-style-type: none"> o 재배포장 12곳(대전시, 충청남도 서산시와 금산군, 충청북도 괴산시, 경기도 연천군, 전라남도 해남군 그리고 강원도 강릉시, 횡성군, 정선군, 평창군 등)으로부터 뿌리혹병균 12군주 채집 o 각 기관으로부터 뿌리혹병균 (<i>Plasmodiophora brassicae</i>) 8군주를 분양받아 확보하였음 o 차년도 군주 특성 실험을 위하여, 채집한 각 군주의 뿌리혹 약 10 g씩을 떼어내 포자를 수확하여 배추 100주에 접종하고 재배하여 군주 당 약 3kg의 뿌리혹을 수확하여 -80C deep freezer에 보관하였음 	100
	- 시들음병균(<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>)의 분자생물학적 진단법 확립	<ul style="list-style-type: none"> o 공개된 genome 정보와 BLAST 검색을 통하여 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i> 특이적인 프라이머를 개발하였음: 이는 무 시들음병균 진단 프라이머로 최초의 결과임 o 이 프라이머를 이용한 PCR 후에 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>에서만 특이적인 DNA 산물을 확인할 수 있었으며, f. sp. <i>niveum</i> 등 기타 <i>F. oxysporum</i> 24개 군주는 이 DNA 산물이 없었음 o 무로부터 분리한 <i>F. oxysporum</i> 15개 군주에 대하여 이 프라이머를 사용하여 PCR 한 결과 15개 중 7개에서 특이적인 DNA 산물을 확인할 수 있었으며 이는 무 유묘를 이용한 군주의 병원성 결과와 일치하였음 	100
	- 효율적인 병리검정 체계 확립 : 기확립 무 시들음병에 대한 병리검정 기술 업그레이드	<ul style="list-style-type: none"> o 선행연구에서 무 시들음병에 대한 병리검정법을 확립한 바있으나 이 방법에 따라 병리검정을 수행하던 중 저항성 품종들의 저항성이 무너지는 일이 발생하였음. 따라서 보다 정확한 무 시들음병 저항성 검정법을 확립하고자 실험하였음 o 가장 중요한 요인은 병원균 접종할 때의 무 유묘의 생육 시기였음. o 무의 생장이 온실 조건에 따라 달라지므로 연중 일정하게 하기 위해서는 과종 후 재배기간이 아닌 무 유묘의 생육단계를 A-E로 표준화하고 이를 기준으로 저항성 검정하는 것이 중요하다는 것을 확인하였음. o 생육 단계를 실험한 결과 무는 A단계(본엽 1엽 미전개, 떡잎과 유사한 크기)과 B단계 	100

		<p>(본엽 1엽 거의 전개, 2엽은 1엽의 1/3 이하)가 가장 저항성 검정에 적합하였음.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 생육 단계 A와 B 유묘를 사용하여 3가지 접종 농도에 따른 품종들의 반응을 조사한 결과, 생육 단계 A의 유묘를 사용하여 1×10^7 spores/ml로 접종하는 것이 저항성 감수성 차이가 가장 현저하였음 	
<p>- 현장형 병리검정법 개발 : 무 뿌리혹병</p>		<ul style="list-style-type: none"> ○ 기반시설이 부족한 중소기업에서도 무 뿌리혹병 병리검정을 수행할 수 있는 병리검정 방법인 현장형 병리검정법을 개발하였음. ○ 파종 : 소면적 사용으로 많은 시료에 실험할 수 있도록 5×8 연결포트에 포트 당 3주씩 파종 ○ 접종원 준비 : 일반적으로는 광학현미경을 사용하여 포자 농도를 조사하고 일정 농도의 포자현탁액을 준비하나 포트 당 이병조직 0.5g 접종으로 개선하여 광학현미경 없이도 실험 가능하도록 하였음 ○ 접종 방법 : 많은 회사에서는 무 유묘를 파종하고 재배하여 준비한 무 유묘를 뿌리혹병 병원균 포자현탁액에 침지하여 접종하고 이를 새 포트에 이식하는데 이는 노동력이 많이 소요되는 방법이므로 포자현탁액을 포트 당 5ml 씩 관주 접종하는 것으로 개선 ○ 접종 후 수분관리 : 뿌리혹병균은 무 뿌리를 침입할 때 수분이 필수적이거나 많은 회사에서는 병원균 접종 후에 발상 상태로 관리하여 뿌리혹병 발생 정도가 큰 차이를 나타냄. 안정적인 병원균 침입을 위하여 3일 동안 관수 상자를 반혀놓아 저면관수 함 ○ 현장형 무 뿌리혹병 검정법 효용성 확인 : 뿌리혹병 저항성 정도가 다른 5개 무 품종과 뿌리혹병 균주 2종(강릉, 연천 균주)를 사용하여 위와 같이 확립한 현장형 무 뿌리혹병 검정법의 품종 저항성을 일반형 검정법(화학연)의 저항성 결과와 비교한 결과, 5개 품종 모두 거의 동일한 저항성 및 감수성 결과를 보였음. 따라서 확립한 현장형 검정법은 유용하다는 것을 확인하였음 	100
<p>- 바이러스 병리검정 체계 확립: 다양한 무 바이러스 발생 조사 및 채집(위탁과제)</p>		<ul style="list-style-type: none"> ○ 무 바이러스 전국 조사: 2014년 9월부터 11월까지 순무와 열무 위주로 전국(섬 지역 제외)에서 바이러스 감염으로 의심되는 무 샘플을 채집하였음 ○ 무 바이러스의 진단 및 분석: 무 관련 국내 보고 및 국내 미보고 바이러스 등의 조사와 함께 조사된 바이러스들의 진단을 위하여 specific primer를 BLAST 검색을 통하여 제작 후 RT-PCR을 수행함 	100

		o Infectious clones 제작 바이러스 순위 결정: 전국 조사를 통해 얻어진 바이러스의 종류를 바탕으로 infectious clones의 제작 순서를 정함	
2차년도 (2015)	- 다양한 뿌리혹병균 (<i>Plasmodiophora brassicae</i>) 특성 조사	o 다양한 지역으로부터 채집한 뿌리혹병균 12 균주를 시판중인 무 품종 22종에 접종하여 뿌리혹병균의 레이스 분화를 조사하였음.	100
	- 병원균 진단법 확립 : 뿌리혹병균(<i>Plasmodiophora brassicae</i>)의 분자생물학적 진단법 확립	o 공개된 genome 정보와 BLAST 검색을 통하여 <i>Plasmodiophora brassicae</i> 특이적인 프라이머를 개발하였음. o 이 프라이머를 이용한 PCR 후에 <i>Plasmodiophora brassicae</i> 균주에서만 특이적인 DNA 산물을 확인할 수 있었으며, 곰팡이, 유사균류, 그람 음성 세균, 그람 양성 세균 등 다른 미생물 16개 균주에서는 이 DNA 산물이 없었음. o 이 프라이머를 이용하여 뿌리혹병균을 접종하지 않은 무, 배추, 고추, 토마토를 사용하여 DNA를 분리하고 이 프라이머를 사용하여 PCR 한 결과 뿌리혹병균을 접종하지 않은 시료에서는 특이적인 DNA 산물을 확인할 수 없었음.	100
	- 뿌리혹병균 (<i>Plasmodiophora brassicae</i>) 저장법 개발	o 무 뿌리혹병균을 -4, -20(냉장고), -20℃에 저장하면서 1개월 간격으로 시료를 채취하여 11개월까지의 뿌리혹병균 생존여부를 조사하였음.	
	o 효율적인 병리검정 체계 확립 : 무 검은무늬병	o 검은무늬병균 8균주를 확보하고 이들의 포자 형성량 조사 및 병원성 검정을 통하여 <i>Alternaria brassicicola</i> KACC 40036 균주를 선발하였음. o 시판 중인 무 품종 61개에 <i>Alternaria brassicicola</i> 를 접종하여 검은무늬병 발생을 조사한 결과, 실험한 품종 중 ‘금봉’과 ‘새롬’은 다른 품종들에 비하여 감수성이 낮았음. 이들 품종과 감수성 2품종 총 4개 품종을 선발하여 접종원 농도, 무의 생육 시기, 접종 후 재배 온도, 습실처리 시간 등에 따른 검은무늬병 발생을 조사하여 효율적인 병리검정 조건을 확립하였음.	100
	- 현장형 병리검정법 개발 : 무 시들음병	o 기반 시설이 부족한 중소규모 종자회사에서 적용하기 쉬운 무 시들음병(<i>Fusarium wilt</i>)에 대한 현장형 병리검정 방법을 개발하였음.	100
	- 바이러스 병리검정 체계 확립(위탁과제)	o 무 바이러스 전국 조사: 국내 보고된 바이러스 분포 조사 후 확보된 바이러스 염기서열을 통해 다양한 strain 조사	100

		<ul style="list-style-type: none"> o Infectious clone 제작 - Infectious clone 제작 순위에 따른 infectious clone 제작 - Infectious clone 제작시 T7 promoter와 35S promoter를 동시 삽입하여 <i>in vitro</i> transcription과 <i>in vivo</i> inoculation을 가능하게 제작 o 모델식물을 이용한 바이러스 신속 검정기술 개발 - 모델 식물인 담배(<i>Nicotiana benthamiana</i>)에 Turnip mosaic virus(TuMV) 및 Radish mosaic virus(RaMV) 접종 후 분광값 산출 - 모델 바이러스를 이용한 분광값 차이 규명 → 바이러스에 따른 분광값 차이가 유의하지 않음 	
3차년도 (2016)	- 다양한 균주 수집	o 다양한 지역으로부터 무 시들음병균 (<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>) 19균주를 확보하고 병원성을 확인한 결과, 이들 중 11균주가 병원성 균주였음	100
	- 병원균 진단법 확립 : 검은무늬병균의 진단법 확립	o 특이적인 프라이머를 이용한 검은무늬병균 (<i>Alternaria brassicicola</i>) 분자생물학적 진단법을 확립하였음	100
	- 균주 보존 기술 개발 : 뿌리혹병균(<i>P. brassicae</i>)의 보존 기술 개발	o -80C, -20C, 4C 등의 저장온도별 저장 기간에 따른 뿌리혹병균의 병원성 유지 기간 조사하고 단기 저장법과 장기저장법을 개발하였음	100
	- 효율적인 병리검정 체계 확립 : 무름병(soft rot)	o 표준균주 확보 o 접종원 종류 결정 및 접종원의 대량 증식 방법 확립 o 감수성 및 저항성 대조 품종 선정 o 접종 방법, 접종원 농도, 발병 환경에 따른 저항성 및 감수성 품종의 저항성 반응을 조사하여 효율적인 <i>in vivo</i> 병리검정 체계 확립	100
	- 현장형 병리검정법 개발 : 무 무름병	o 무 무름병(연부병)에 대한 중소규모 종자회사에서 적용하기 쉬운 현장형 병리검정 방법 개발하였음	100
	- 바이러스 병리검정 체계 확립(위탁과제)	o 국내 보고된 바이러스 분포 조사 후 확보된 바이러스 염기서열을 통해 다양한 strain 조사하였음 o Infectious clone 제작(5개 isolate 이상): 전국조사를 통해 확보한 TuMV isolate의 infectious clone 제작하였음 o 다양한 무 품종에 대한 TuMV isolate의 병원성 테스트: 60여 무 품종에 대하여 2차년도 제작된 TuMV infectious clone (TuMV isolate) 저항성/감수성 무 품종 판별하였음	100

<p>최종 목표</p>	<p>① 대량검정법 확립: 무 무름병, 무 검은무늬병, 무 시들음병</p>	<p>○ 무 무름병, 무 검은무늬병, 무 시들음병에 대한 대량시료 검정을 위한 병리검정 체계를 확립하였음: 다음과 같은 항목에 대하여 실험하고 병리검정 기술을 확립하였음</p> <ul style="list-style-type: none"> * 병원균 표준균주 확보 * 접종원 종류 결정 및 접종원의 대량 증식 방법 확립 * 감수성 및 저항성 대조 품종 선정 * 접종 방법, 접종원 농도, 발병 환경에 따른 저항성 및 감수성 품종의 저항성 반응을 조사하여 효율적인 in vivo 병리검정 체계 확립 	<p>100</p>
	<p>② 다양한 균주 확보 : 뿌리혹병균, 시들음병균</p>	<p>○ 다양한 지역으로부터 뿌리혹병균(<i>Plasmodiophora brassicae</i>) 12균주를 채집하였고 각 기관으로부터 8균주를 분양받아 총 20균주를 확보하였음</p> <p>○ 다양한 지역으로부터 무 시들음병균(<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>) 19균주를 확보하고 병원성을 확인하였음</p>	
	<p>③ 균주 특성 조사 : 무 뿌리혹병</p>	<p>○ 재배포장 12곳(대전시, 충청남도 서산시와 금산군, 충청북도 괴산시, 경기도 연천군, 전라남도 해남군 그리고 강원도 강릉시, 횡성군, 정선군, 평창군 등)으로부터 채집한 뿌리혹병균을 감수성 배추(‘노랑김장’)에 접종하여 증식한 12균주를 사용하여 무 품종들에 대한 레이스 분화 여부를 조사하였음.</p> <p>○ 실험한 무 22종 품종 중 10개 품종은 12개 균주 모두에 평균 발병도 0~0.1의 고도저항성을 나타냈으며, 2개 품종(‘금봉’, ‘초롱’)은 모든 균주에 대하여 감수성을 보였음. 나머지 10개 품종은 12균주 평균 발병도가 0.8~2.0을 보여 앞의 10개 품종보다 낮은 저항성을 보였으며 뿌리혹병 균주에 따라 약간 차이가 나는 뿌리혹병 발생을 보였음.</p> <p>○ 이상의 결과로부터 무 뿌리혹병균의 레이스 분화는 없으며, 무의 뿌리혹병 저항성은 양적저항성(QTL)으로 판단됨.</p>	
	<p>④ 진단법 확립 : 무 시들음병균, 무 검은무늬병, 뿌리혹병균</p>	<p>○ 시들음병균(<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>)의 분자생물학적 진단법 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> - 공개된 genome 정보와 BLAST 검색을 통하여 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i> 특이적인 프라이머를 개발하였음: 이는 무 시들음병균 진단 프라이머로 최초의 결과임 - 이 프라이머를 이용한 PCR 후에 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>에서만 특이적인 DNA 산물을 확인할 수 있었으며, f. sp. 	

		<p><i>niveum</i> 등 기타 <i>F. oxysporum</i> 24개 균주는 이 DNA 산물이 없었음</p> <ul style="list-style-type: none"> - 무료부터 분리한 15개 균주에 대하여 이 프라이머를 사용하여 PCR 한 결과 15개 중 7개에서 특이적인 DNA 산물을 확인할 수 있었으며 이는 무 유묘를 이용한 균주의 병원성 결과와 일치하였음 o 뿌리혹병균(<i>Plasmodiophora brassicae</i>)의 분자생물학적 진단법 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 공개된 genome 정보와 BLAST 검색을 통하여 <i>Plasmodiophora brassicae</i> 특이적인 프라이머를 개발하였음. - 이 프라이머를 이용한 PCR 후에 <i>Plasmodiophora brassicae</i> 균주에서만 특이적인 DNA 산물을 확인할 수 있었으며, 곰팡이, 유사균류, 그람 음성 세균, 그람 양성 세균 등 다른 미생물 16개 균주에서는 이 DNA 산물이 없었음. - 이 프라이머를 이용하여 뿌리혹병균을 접종하지 않은 무, 배추, 고추, 토마토를 사용하여 DNA를 분리하고 이 프라이머를 사용하여 PCR 한 결과 뿌리혹병균을 접종하지 않은 시료에서는 특이적인 DNA 산물을 확인할 수 없었음. o 검은무늬병균(<i>Alternaria brassicicola</i>)의 분자생물학적 진단법 확립 : 앞에서와 유사한 방법으로 검은무늬병균 특이적인 프라이머를 발굴하고 검증하여 진단용 분자마커를 개발하였음 	
④ 보존기술 확립 : 뿌리혹병균		<ul style="list-style-type: none"> o 무 뿌리혹병균을 4, -20(냉장고), -20℃에 저장하면서 1개월 간격으로 시료를 채취하여 뿌리혹병균 생존여부를 조사한 결과, -8 0℃뿐만 아니라 4℃에 1년간 저장하였을 때에도 높은 생존율을 보여 1년간 단기간 저장을 위해서는 4도 충분하였으며, -20℃에서는 2년간 저장도 가능하였음 	
⑤ 현장형 병리검정 기술 확립 : 무 시들음병, 무 뿌리혹병, 무 무름병		<ul style="list-style-type: none"> o 무 뿌리혹병(clubroot), 무 시들음병(<i>Fusarium wilt</i>), 무 무름병(<i>soft rot</i>)에 대한 중소규모 종자회사에서 적용하기 쉬운 현장형 병리검정 방법 개발 	
⑥ 바이러스 병리검정 체계 확립		<ul style="list-style-type: none"> o 무 바이러스 전국 조사: 국내 보고된 바이러스 분포 조사 후 확보된 바이러스 염기서열을 통해 다양한 strain 조사 o TuMV Infectious clone 3종 제작 <ul style="list-style-type: none"> - Infectious clone 제작 순위에 따른 infectious clone 제작 - Infectious clone 제작시 T7 promoter와 35S promoter를 동시 삽입하여 <i>in vitro</i> transcription과 <i>in vivo</i> inoculation을 가능하 	

	<p>계 제작</p> <p>o TuMV Infectious clone 3종에 대한 60여종 무 품종들의 저항성 반응을 조사하고 반응에 따라 strain을 그룹화 하였음</p>	
--	---	--

제 2절. 관련분야에의 기여도

1. 주요 병원균의 다양한 균주 확보 및 특성 분석 : 다양한 뿌리혹병균(*Plasmodiophora brassicae*)과 시들음병균(*Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*) 균주를 확보 하였으며, 이들 균주를 이용하여 시판 뿌리혹병 저항성 및 감수성 품종들의 이들 균주에 대한 저항성 반응을 조사한 결과, 대부분의 품종들은 이들 뿌리혹병 균주들에 대하여 다양한 정도의 저항성 반응을 나타내어 이들 무 품종의 저항성은 양적 저항성이라는 것을 알 수 있었다. 실험한 무 품종들 중 ‘여름춘향이열무’ 품종만이 질적 저항성을 보여 일부 균주는 저항성을 나머지 균주는 감수성을 나타냈다. 따라서 본 연구를 통해 무의 저항성은 균주에 따라 질적으로 다르지 않고 균주의 병원력에 반비례하게 저항성을 나타낸다는 것이 밝혀짐에 따라 무의 뿌리혹병 저항성 품종 개발을 위한 병리검정 전략 수립이 가능하게 되어 보다 효율적으로 내병성 품종을 개발 할 수 있을 것이다.
2. 병원균 진단 기술 개발 : 본 연구를 통해 무 시들음병균(*Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*), 무 뿌리혹병균(*Plasmodiophora brassicae*) 및 무 검은무늬병균(*Alternaria brassicicola*)을 진단할 수 있는 분자마커를 개발하였다. 이들 분자마커는 순수 분리된 병원균의 진단에도 그리고 식물체에 감염되어 있는 시료에서도 이들 병원균을 진단할 수 있는 효용성이 높은 분자마커이다. 특히 무 시들음병균의 경우 기존에 개발된 분자마커로는 *Fusarium oxysporum*이라는 것만 동정이 가능하므로 이들 균주를 무에 접종하여 병원성을 확인하여 병원성이 있을 때에만 *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*로 동정하여 왔다. 하지만 병원성 실험은 1개월 이상의 시간이 소요될 뿐만 아니라 전문가가 아닐 경우 오류도 있곤 한다. 하지만 본 연구에서 개발된 무 시들음병균용 분자마커는 무로부터 분리한 비병원성 *Fusarium oxysporum* 균주에 대해서는 PCR 산물이 만들어지지 않고 병원성이 있는 균주에서만 특이적인 PCR 산물이 만들어지는 효율적인 진단용 분자마커이다. 이 분자마커는 특허를 출원하였으며 등록도 완료되어 많은 사람들이 무 시들음병균 진단에 용이하게 사용할 수 있을 것이다.
3. 뿌리혹병균 보존 기술 개발 : 뿌리혹병균은 통상적으로 병든 조직을 -80C deep freezer에 저장하였을 때 수년간 즉 장기간 보존이 된다고 알려져 왔다. 하지만 종자회사 등 기반 시설이 부족한 경우에도 사용할 수 있는 효율적인 뿌리혹병균 보존 기술이 필요하여 실험한 결과, 가정용 냉장고 냉동실에 저장하였을 때 실험한 21개월까지 병원력이 잘 유지되는 것을 확인하였다. 따라서 뿌리혹병균을 효율적으로 저렴한 비용으로 저장하기 위해서는 가정용 냉장고 냉동실에 뿌리혹병균을 감염시킨 조직을 넣고 약 2년 동안 저장하는 방법을 제안하고자 한다. 종자회사에서 뿌리혹병 저항성 품종의 중요성을 고려할 때 이 기술 개발은 우리나라 종자기업의 국가 경쟁력 강화에 기여하였다고 판단된다.
4. 무 시들음병, 무 검은무늬병 및 무 무름병 내병성 육종을 위한 대량 병리검정 기술 개발은

GSP 골든 시드 프로젝트 2단계에서 육종가들에게 지속적으로 내병성 품종개발을 위한 병리검정 서비스에 활용될 것이며 또한 확립한 다양한 기술은 논문으로 출간하여 종자회사에서 이용할 수 있도록 할 예정이다. 이것은 내병성 품종 개발을 촉진하여 우리나라 종자기업의 국가 경쟁력 강화 및 수출 확대에 기여할 것이다.

5. 무 뿌리혹병, 무 시들음병, 무 무름병에 대한 현장형 병리검정법 개발 : 원심분리기, 현미경, spectrophotometer 등의 장비가 없는 중소기업에서도 이들 병해에 대한 병리검정을 할 수 있도록 비용절감형 현장용 병리검정 기술을 개발하였다. 이것은 기반시설이 부족한 중소기업에서도 고부가가치 내병성 품종 개발을 가능하게 할 것이다.
6. 무 바이러스 분포조사를 통한 무 바이러스 infectious clone 제작 및 신속한 검정 기술 개발 : 무 바이러스에 대한 전국조사를 통해, 국내 보고된 무 바이러스의 분포를 확인하였으며, 다양한 무 바이러스 strain을 확보하여, 무 바이러스(TuMV)에 대한 무의 감수성/저항성 판별의 기초 연구 데이터가 확보되었음. 또한 전국조사를 통해 확보한 다양한 TuMV strain의 infectious clone을 제작하여 무 바이러스 감수성/저항성을 신속하게 검정할 수 있는 기술을 확보 하였다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1절. 연차별 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분	수출액 (단위: 만불)	국내매출 및 수입대체액 (단위:억원)	신품종 국내외품종 신고 및 판매 건수	특허		유전 자원 등록	논문		인력 양성
				출원	등록		SCI	비SCI	
1차년도 (2014)	목표			0	0		0	1	1
	달성			0	0		0	1	1
2차년도 (2015)	목표			0	0		1	2	0
	달성			1	0		1	2	0
3차년도 (2016)	목표			0	0		1	1	0
	달성			0	1		4	2	0
1단계	목표			0	0		2	4	1
	달성			1	1		5	5	1

제 2절. 논문

SCI 5편

- Eun Ju Jo, Ji Hyun Lee, Yong Ho Choi, Jin-Cheol Kim, and Gyung Ja Choi. 2015.
Development of an efficient method of screening for watermelon plants resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. Korean J. Hort. Sci. Technol. 33(3): 409-419.
- Sung Min Hwang, Kyoung Soo Jang, Yong Ho Choi, and Gyung Ja Choi. 2016.
Development of an efficient screening method for resistance of chili pepper plants to *Meloidogyne incognita*. Korean J. Hort. Sci. Technol. 34(2): 282-293.
- Eun Ju Jo, Kyoung Soo Jang, Yong Ho Choi, Kyoung Gu Ahn, and Gyung Ja Choi. 2016.
Resistance of cabbage plants to isolates of *Plasmodiophora brassicae*. Korean J. Hort. Sci. Technol. 34(3): 430-440.
- Hun Kim, Eun Ju Jo, Yong Ho Choi, Kyoung Soo Jang, and Gyung Ja Choi. 2016.
Pathotype classification of *Plasmodiophora brassicae* isolates using clubroot-resistant cultivar of Chinese cabbage. Plant Pathol. J. 32(5):423-430.
- Jae-Yeong Han, Jinsoo Chung, Jungkyu Kim, Eun-Young Seo, James P. Kilcrease, Gary R. Bauchan, Seungmo Lim, John Hammond and Hyoun-Sub Lim. 2016.
Comparison of helper component-protease RNA silencing suppression activity, subcellular localization, and aggregation of three Korea isolates of *Turnip mosaic virus*. Virus Genes 52:592-596.

비SCI 5편

- 이지현, 조은주, 김진철, 장경수, 최용호, 최경자. 2014. 뿌리혹병 및 시들음병에 대한 저항성

- 양배추와 브로콜리 유전자원 탐색. 식물병연구 20(4): 235-244.
- 정진수, 한재영, 김정규, 주혜경, 공준수, 서은영, John Hammond, 임현섭. 2015. 2014년 전국 무 재배지의 바이러스 병 발생 조사(Survey of viruses present in radish fields in 2014). 식물병연구 21(3): 235-242.
 - 이원정, 장경수, 최용호, 김홍태, 김진철, 최경자. 2015. 덩굴쪄김병 저항성 멜론을 위한 효율적이고 간편한 대량 검정법 개발. Res. Plant Dis. 21(3): 201-207.
 - 이지현, 장경수, 최용호, 김진철, 최경자. 2016. 수박 덩굴마름병에 대한 효율적인 저항성 검정 방법 개발. 식물병연구 22(2): 72-80.
 - 이지현, 장경수, 최용호, 김현, 최경자. 2016. 무 시들음병에 대한 간편한 대량 저항성 검정법 개발. 식물병연구 22(3): 152-157.

제 3절. 학회발표

국내발표 3편

- Sung Min Hwang, Ji Hyun Lee, Hun Kim and Gyung Ja Choi. Development of a polymerase chain reaction assay for rapid detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*. 한국식물병리학회 춘계학술발표회. 2015. 4.23-24(청주, 충북대학교).
- Sung Min Hwang, Kyoung Soo Jang, Thu Thuy Vu and Gyung Ja Choi. Development of a polymerase chain reaction assay for rapid detection of *Plasmodiophora brassicae*. 한국식물병리학회 추계학술발표회. 2015. 10. 21-23(거제도, 대명리조트).
- Soo Min Lee, Yong Ho Choi, Min Yong Kim, and Gyung Ja Choi Standardization of the method for evaluating the disease resistance of radish to bacterial soft rot. 한국식물병리학회 추계학술발표회. 2016.10.19.-21(평창, 서울대)

제 4절. 특허

국내 특허출원 1건, 특허등록 1건

지식재산권[발명특허, 실용신안, 의장, 상표, 규격] 등으로 구분하고, 세부적으로 전부(건별로)기록하며, 국외인 경우 반드시 국명을 기록합니다									
구분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
발명특허	무에 시들음병을 일으키는 푸자리움 옥시스포룸 라파니 검출용 프라이머 세트 및 이를 이용한 푸자리움 옥시스포룸 라파니 검출 방법	대한민국	한국화학연구원	2015.10.02	10-2015-0139072	한국화학연구원	2016.11.25	10-1681645	

출원번호통지서



출원 일자 2015.10.02
 특 기 사 항 심사청구(유)공개신청(무)
 출원 번호 10-2015-0139070 (접수번호 1-1-2015-0956240-73)
 출원인 명칭 한국화학연구원(3-1998-007765-1)
 대리인 성명 이원희(9-1998-000385-9)
 발명자 성명 최경자 조은주 장경수 최용호 김현
 발명의 명칭 배추 뿌리혹병균의 레이스를 판별하는 신규한 방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다문로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 ※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마음-PCT/마드리드
 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
 ※ 미국특허상표청의 선출원률 기준으로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTOSB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.



특허증
CERTIFICATE OF PATENT

특허 제 10-1681645 호
Patent Number

출원번호 제 10-2015-0139072 호
Application Number

출원일 2015년 10월 02일
Filing Date

등록일 2016년 11월 25일
Registration Date

발명의 명칭 Title of the Invention

무에 시들음병을 일으키는 푸자리움 옥시스포름 라파니 검출용 프라이머 세트 및 이를 이용한 푸자리움 옥시스포름 라파니 검출 방법

특허권자 Patentee

한국화학연구원(160171-*****)
대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)

발명자 Inventor

등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.

This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.

2016년 11월 25일



특허청장
COMMISSIONER,
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

최 동 규

제 5절. 추가연구, 타연구에 활용

- o 1단계에서 확립한 병리검정 기술은 GSP 골든 시드 프로젝트 2단계에서 육종가들에게 내병성 품종개발을 위한 병리검정 서비스에 활용할 예정이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1) 검은무늬병 내병성 무 품종 개발

세계적으로 배추과 작물(Brassicaceae)에 병을 일으키는 *Alternaria* spp.로는 *A. brassicae*, *A. brassicicola*, *A. japonica* 그리고 *A. alternata*가 보고되었다(Nowicki et al., 2012). 이 중 무(*Raphanus sativus* L.)에 발생하는 검은무늬병은 *A. brassicicola*, *A. brassicae* 그리고 *A. japonica* (= *A. raphani*)에 의해 발생한다.

배추과 작물의 검은무늬병은 기주 범위와 포자의 비산 범위가 넓어 방제가 어려운 균이다. 이 병을 방제하는 가장 일반적인 방법으로 합성 살균제가 사용되고 있지만, 인체와 동물 그리고 환경에 대한 독성 화학 농약 사용에 대한 우려가 증가하고 있다. 그러므로 이 병을 방제하기 위한 가장 친환경적이고 경제적인 방법은 저항성 품종의 재배일 것이다.

*A. brassicicola*에 저항성인 *Brassica napus*와 *B. oleracea*의 유전자형이 보고되었다. 그리고 배추과 작물인 *Camelina sativa*와 *Capsella bursapastoris*가 *Alternaria* 병원균에 대하여 높은 저항성을 나타내는 것으로 알려졌다. 그러나 거의 모든 상업적인 Brassica들은 *A. brassicicola*와 *A. brassicae*에 감수성이고, *B. rapa*와 *B. juncea*는 *A. brassicae*균주에 대해 *B. napus*와 *B. carinata*보다 더 감수성이라고 보고되었다. 이와 같이 검은무늬병에 대한 저항성이 보고된 배추과 작물이 있음에도 불구하고 상업적으로 저항성을 나타내는 품종이 판매되지 못하고 있는 실정이다.

2) 시들음병 내병성 무 품종 개발

*Fusarium oxysporum*에 의해 발생하는 시들음병은 예전에 위황병(yellows)로 불렸던 토양전염성 병으로, 수백 종의 작물에 발생하여 세계적으로 큰 피해를 일으키고 있다. *F. oxysporum*은 침입하는 기주에 따라 분화형(forma specialis, f. sp.)으로 나누고, 기주의 품종에 대한 병원성 차이로 race를 구별한다. 배추과 작물에 시들음병을 일으키는 병원균은 다섯 주요 병원성 그룹 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* race 1-5가 분류되었다. 후에 이들 다섯 race는 재분류 되었는데 race 1은 f. sp. *conglutinans* race 1로 그리고 race 5는 f. sp. *conglutinans* race 2로, race 3과 race 4는 각각 f. sp. *matthioli* race 1과 race 2로, 그리고 race 2는 주로 무를 감염하는 f. sp. *raphani*로 재정립되었다.

무 시들음병은 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*에 의해 발생하며, 전 세계적으로 발생하여 막대한 피해를 일으키고 있는 무의 주요 병해이다. 무 시들음병은 1934년 미국 캘리포니아 San Benito에 있는 White Chinese Winter Radish 채종포에서 처음 보고된 이후 1946년 위스콘신 Waukesha의 무 포장에서 그리고 현재에는 미국 각지에서 발생하고 있다. 국내에서도 오래 전부터 발생되었을 것으로 생각되나 1981년 청원군 미농 재배단지에서 처음 보고되었고 계속된 연작으로 인해 시들음병 발생이 점차 증가하고 있는 추세이다.

3) 뿌리혹병 내병성 무 품종 개발

Plasmodiophora brassicae Woronin에 의한 뿌리혹병은 전 세계의 배추과 작물에 발생하여 피해를 주고 있는 주요 병해이다. 우리나라에서는 1920년에 뿌리혹병 발생이 처음 기록되었으나(Nakata와 Takimoto, 1928), 90년대 후반부터 전국적으로 대 발생하여 큰 문제를 일으키고 있다. 특히 뿌리혹병균은 휴면포자로 토양에 존재하며 환경이 적합하면 10년 이상 생존이 가능하다. 토양 및 농기구를 통한 뿌리혹병균 전파 양식 때문에 뿌리혹병은 전국으로 확산되었고, 다양한 배추과 작물의 품종 및 라인에서 실험해 보면 뿌리혹병균은 다양한 생리적 분화가

일어났다고 알려져 있다. 뿌리혹병균에 대하여 무는 배추보다 저항성이 높다고 보고되었지만, 우리나라에서도 경기도, 강원도, 전라북도 등의 무 재배지에서 뿌리혹병 발생이 보고되고 있다.

뿌리혹병을 방제하기 위한 방법으로 미생물을 이용한 생물학적 방제, fluazinam, flusulfamide 및 cyazofamid 등의 살균제를 이용한 화학적 방제, 배추과 작물 이외 작물과의 윤작 그리고 단경기 작물 및 저항성 품종 재배 등의 경종적 방제 방법 등이 이용되고 있다. 최근에는 많은 나라들이 농약을 사용하지 않고 재배하는 친환경 농업 정책을 펼치고 있어 저항성 품종을 개발하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 저항성 품종을 재배하면 환경에 영향을 주는 화학 농약의 사용을 줄일 수 있으며, 농작물 손실을 최소화 할 수 있다. 그러나 저항성 품종 육성이 활발히 진행되었던 일본에서는 병원균의 분화로 대부분의 뿌리혹병 저항성 배추 품종들에서 저항성이 무너지고 있다고 보고되고 있다. 하지만 뿌리혹병 저항성 무 품종들에서는 저항성이 무너지는 보고가 없다.

제 7 장 참고문헌

- 김완규, et al. 2009. 한국식물병명목록. p99-103.
- 이승돈. 1999. 한국의 주요 식물세균병 발생 및 특성. 서울대학교 농학박사학위논문 p.28-36.
- 이영기, 이은형, 명인식, 최효원, 이영규, 심홍식 2015. 배추무름병의 발생현황 및 관여 병원세균의 특성. 한국농약과학회 정기총회 및 춘계학술발표회 논문집.
- 정은경, 장현철, 최보라, 이은주, 용영록, 김병섭 2003. 배추 무름병에 대한 저항성 품종 검정. *Research in plant disease*. 9(1):39-41.
- 조용섭, 박창석, 이순구, 이영근, 임춘근, 차재순, 최용철, 최재을, 허성기, 황인규. 1999. 식물세균병학. 서울대학교 p.313-316.
- Agrios, G.N. 2005. Genetics of plant disease, p. 163-164. In: *Plant Pathology*. 5th ed. Elsevier Academic Press, Burlington, USA.
- Agrios, G.N. 2005. Plant diseases caused by fungi. In: *Plant Pathology*. 5th ed. pp. 385-614. Academic Press Ltd., San Diego, CA, USA.
- Aleck, J. R., & Harrison, M. D. 1978. The influence of inoculum density and environment on the development of potato blackleg. *American Journal of Potato Research*, 55(9) : 479-494.
- Anjos, J. R., Jarlfors, U. and Ghabrial, S. A. 1992. *Soybean mosaic potyvirus* enhances the titer of two comoviruses in dually infected soybean plants. *Phytopathology* 82: 1022-1027.
- Arie, T., Kobayashi, Y., Okada, G., Kono, Y. and Yamaguchi, I. 1998. Control of soilborne clubroot disease of cruciferous plants by epoxydon from *Phoma glomerata*. *Plant Pathol.* 47:743-748.
- Armstrong, G.M. and Armstrong, J.K. 1952. Physiological races of the fusaria causing wilts of the Cruciferae. *Phytopathology* 42:255-257.
- Armstrong, G.M. and Armstrong, J.K. 1966. Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* race 4, new race; and a new host for race 1, *Lychnis chalconica*. *Phytopathology* 56:525-530.
- Armstrong, G.M. and Armstrong, J.K. 1981. Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. In: *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*, ed. by P. E. Nelson, T. A. Toussoun and R. J. Cook, pp. 391-399. The Pennsylvania State University Press, University Park, USA.
- Armstrong, G.M. and J.K. Armstrong. 1966. Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* race 4, new race; and a new host for race 1, *Lychnis chalconica*. *Phytopathology* 56: 525-530.
- Armstrong, G.M. and J.K. Armstrong. 1952. Physiological races of the fusaria causing wilts of the Cruciferae. *Phytopathology* 42: 255-257.
- Armstrong, G.M. and J.K., Armstrong. 1981. Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. In: *Fusarium Diseases, Biology and Taxonomy*. eds. by P. E. Nelson, T. A. Toussoun and R. J. Cook. pp. 391-399. The Pennsylvania State University Press, University Park, USA.
- Baayen R.P., van Dreven F., Krijger M.C. and C. Waalwijk. 1997. Genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* and *Fusarium redolens* f. sp. *dianthi*. *Eur. J. Plant*

Pathol. 103:395-408.

- Baik, S.Y., J.-C. Kim, K.S. Jang, Y.H. Choi, and G.J. Choi. 2010. Development of effective screening method and evaluation of radish cultivars for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*. Res. Plant Dis. 16:148-152.
- Baik, S.-Y., K.S. Jang, Y.H. Choi, J.-C. Kim, and G.J. Choi. 2011. Resistance degree of radish cultivars to *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* according to several conditions. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 29:48-52.
- Baik, S.-Y., K.S. Jang, Y.H. Choi, J.-C. Kim, and G.J. Choi. 2011. Resistance degree of radish cultivars to *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* according to several conditions. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 29:48-52.
- Baik, S.Y., Kim, J.-C., Jang, K.S., Choi, Y.H. and Choi, G.J. 2010. Development of effective screening method and evaluation of radish cultivars for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*. Res. Plant Dis. 16:148-152.
- Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 237pp.
- Brayford, D. 1992. *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*. IMI Descr. Fungi Bact. 1114:1-2.
- Cao, T., Tewari, J. and Strelkov, S. E. 2007. Molecular detection of *Plasmodiophora brassicae*, causal agent of clubroot of crucifers, in plant and soil. Plant Dis. 91:80-87.
- Cheah, L. H. and Page, B. B. C. 1995. *Trichoderma* spp. for potential biocontrol of clubroot of vegetable Brassicas. Proc. 50th N. Z. Plant Protection Conf. 150-153.
- Cheah, L. H., Veerakone, S. and Kent, G. 2000. Biological control of clubroot on cauliflower with *Trichoderma* and *Streptomyces* spp. N. Z. Plant Protection 53:18-21.
- Cheng, H. C., Kim, S. M., Lee, K. S., Seo, J. H., Lee, E. J., Oh, J. H. and Shim, I. S. 2012. Change of antioxidant content in young radish (*Raphanus sativus* L.). Korean J. Hort. Sci. Technol. 30: 110-111.
- Cho, W. D., Kim, W. G. and Takahashi, K. 2003. Occurrence of clubroot in cruciferous vegetable crops and races of the pathogen in Korea. Plant Pathology J. 19:64-68.
- Choi, G. S. and Choi, J. K. 1992. Biological properties of two isolates of *Turnip mosaic virus* isolated from chinese cabbage and radish in Korea. Korean J. Plant Pathol. 8: 276-280.
- Choi, J. S., Yang S. G., Song, J. Y. and Kim, H. G. 2014. Development of species-specific primers for *Plasmodiophora brassicae*, clubroot pathogen of kimchi cabbage. Res. Plant Dis. 20:21-24.
- Conn, K.L., Tewari, J.P. and Dahiya, J.S. 1988. Resistance to *Alternaria brassicae* and phytoalexin-elicitation in rapeseed and other crucifers. Plant Sci. 56:21-25.
- Doullah, M.A.U., Meah, M.B. and Okazaki, K. 2006. Development of an effective screening method for partial resistance to *Alternaria brassicicola* (dark leaf spot) in *Brassica rapa*. European J. Pl. Pathol. 116:33-43
- Faggian, R. and Strelkov S. E. 2009. Detection and measurement of *Plasmodiophora brassicae*. J. Plant Growth Regul. 28:282-288.
- Faggian, R., Bulman, S. R., Lawrie, A. C. and Porter, I. J. 1999. Specific polymerase chain reaction primers for the detection of *Plasmodiophora brassicae* in soil and water.

- Phytopathology. 89:392-397.
- Ham, Y. I. 1995. Recent occurrence of TuMV disease on radish and Chinese cabbage in alpine region, Kang-won province. *Plant Dis. Agric.* 1: 45-46.
- Hong, C.X. and Fitt, B.D.L. 1995. Effect of inoculum concentration, leaf age and wetness period on the development of dark leaf and pod spot (*Alternaria brassicae*) on oilseed rape (*Brassica napus*). *Ann. Appl. Biol.* 127:283-295.
- Hong, C.X., Fitt, B.D.L. and Welham, S.J. 1996. Effect of wetness period and temperature on development of dark pod spot (*Alternaria brassicae*) on oilseed rape (*Brassica napus*). *Plant Pathol.* 45:1077-1089.
- Iacomi-Vasilescu, B., Avenot, H., Bataillé-Simoneau, N., Laurent, E., Guénard, M. and Simoneau, P. 2004. In vitro fungicide sensitivity of *Alternaria* species pathogenic to crucifers and identification of *Alternaria brassicicola* field isolates highly resistant to both dicarboximides and phenylpyrroles. *Crop Protect.* 23:481-488.
- Ito, S., Maechara, T., Tanaka, S., Kameya-Iwaki, M., Yano, S. and Kishi, F. 1997. Cloning of single-copy DNA sequence unique to *Plasmodiophora brassicae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 50:289-300.
- Ito, S., Maehara, T., Maruno, E., Tanaka, S., Kameya-Iwaki, M. and Kishi, F. 1999. Development of a PCR-based assay for the detection of *Plasmodiophora brassicae* in soil. *J. Phytopathology.* 147:83-88.
- Karling, J. S. 1968. The Plasmodiophorales: including a complete host index, bibliography, and a description of diseases caused by species of this order, 2nd ed. Hatner, New York. pp. 144.
- Kawabe M., Kobayashi Y., Okada G., Yamaguchi I., Teraoka T. and T. Arie. 2005. Three evolutionary lineages of tomato wilt pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, based on sequences of IGS, *MAT1* and *pg1* are each composed of isolates of a single mating type, and a single or closely related vegetative compatibility groups. *J. Gen. Plant Pathol.* 71:263-272.
- Kawabe, M., Kobayashi, Y., Okada, G., Yamaguchi, I., Teraoka, T. and Arie, T. 2005. Three evolutionary lineages of tomato wilt pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, based on sequences of IGS, *MAT1* and *pg1* are each composed of isolates of a single mating type, and a single or closely related vegetative compatibility groups. *J. Gen. Plant Pathol.* 71:263-272.
- Kendric, J.B. and W.C. Snyder. 1936. A vascular *Fusarium* disease of radish. *Phytopathology.* 26:98
- Kim, C. H., Cho, W. D. and Kim, H. M. 2000a. Distribution of *Plasmodiophora brassicae* causing clubroot disease of Chinese cabbage in soil. *Res. Plant Dis.* 6: 27-33.
- Kim, C. H., Cho, W. D. and Kim, H. M. 2000b. Yield loss of spring Chinese cabbage as affected by infection time of clubroot disease in fields. *Res. Plant Dis.* 6:23-26.
- Kim, C. H., Cho, W. D. and Lee, S. B. 2003. Review of researches on clubroot disease of Chinese cabbage in Korea and future tasks for its management. *Res. Plant Dis.* 9:57-63.

- Kim, J. S., Lee, S. H., Choi, H. S., Kim, M. K., Kwak, H. R., Kim, J. S., Choi, J. D., Choi, I. S. and Choi, H. S. 2012. 2007–2011 Characteristics of plant virus infections on crop samples submitted from agricultural places. *Res. Plant Dis.* 18: 277–289.
- King, S.R. 1994. Screening, selection, and genetics of resistance to *Alternaria* diseases in *Brassica oleracea*. Ph.D. thesis, Cornell University, Ithaca, New York.
- Kistler, H.C. 1997. Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 87:474–477.
- Komatsu, K., Hashimoto, M., Maejima, K., Ozeki, J., Kagiwada, S., Takahashi, S., Yamaji, Y. and Namba, S. 2007. Genome sequence of a Japanese isolate of *Radish mosaic virus*: the first complete nucleotide sequence of a crucifer-infecting comovirus. *Arch Virol.* 152: 1501–1506.
- Komyoji, T., Sugimoto, K., Mitani, S., Matsuo, N. and Suzuki, K. 1995. Biological properties of a new fungicide, fluazinam. *J. Pestic. Sci.* 20:129–135.
- Korean Society of Plant Pathology (KSPP). 2009. Vegetables, In: List of Plant Disease in Korea. 5th ed., ed. by W.-G. Kim and H.M. Koo, pp. 99–103. KSPP, Suwon, Korea.
- Korean Society of Plant Pathology (KSPP). 2009. Vegetables, In: List of Plant Disease in Korea. 5th ed., ed. by W.-G. Kim and H.M. Koo, pp. 99–103. KSPP, Suwon, Korea.
- Ku, K. H., Lee, K. A., Kim, Y. L. and Lee, M. G. 2006. Effects of pretreatment method on the surface microbes of radish (*Raphanus sativus* L.) leaves. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 3: 649–654.
- Kuc, J. 1987. Plant immunization and its applicability for disease control. In: Innovative approaches to plant disease control, ed. by I. Chet, pp. 255–274. John Wiley, New York.
- Kuc, J. 1994. Induced systemic resistance, a non-pesticide technology for disease control in plant. In: Proc. 4th. Nat. Conf. Pesticides, ed. D. L. Weigmann, pp. 511–518. Blacksburg, Virginia.
- Lange, L., Heide, M. and Hobolth, L. 1989. Serological detection of *Plasmodiophora brassicae* by dot immunobinding and visualization of the serological reaction by scanning electron microscopy. *Phytopathology.* 79: 1066–1071.
- Lee, H.B. and Yu, S.H. 1995. Distribution of mycotoxin-producing isolates in the genus *Alternaria*. *Korean J. Plant Pathol.* 11:151–157.
- Lee, H. C., Lee, Y. J. and Yang, D. C. 2009. Genetic characterization of mitochondrial DNA in novel CMS radish line. *Bull. Nat. Sci.* 22: 107–118.
- Lim, H. S., Ko, T. S., Lambert, K. N., Kim, H. G., Korban, S. S., Hartman, G. L. and Domier, L. L. 2005. *Soybean mosaic virus* helper component-protease enhances somatic embryo production and stabilizes transgene expression in soybean. *Plant Physiol. Biochem* 43: 1014–1021.
- Li K.N., Rouse D.I. and T.L. German. 1994. PCR primers that allow intergeneric differentiation of Ascomycetes and their application to *Verticillium* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:4324–4331.
- Li, K. N., Rouse, D. I. and German, T. L. 1994. PCR primers that allow intergeneric differentiation of Ascomycetes and their application to *Verticillium* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:4324–4331.

- Lim, H. S., Jang, C. Y., Bae, H. H., Kim, J. K., Lee, C. H., Hong, J. S., Ju, H. J., Kim, H. G. and Domier, L. L. 2011. *Soybean mosaic virus* infection and helper component–protease enhance accumulation of *Bean pod mottle virus*-specific siRNAs. *Plant Pathol. J.* 27: 315–323.
- Mattush, P. 1977. Epidemiology of clubroot of crucifers caused by *Plasmodiophora brassicae*. In: Woronin 100 International conference on Clubroot, ed. by S.T. Buczacki and P.H. Williams, Univ. of Wisconsin, Madison, WI, USA. pp. 22–28.
- Migheli Q., Briatore E. and A. Garibaldi. 1998. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to identify races 1, 2, 4, and 8 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in Italy. *Eur. J. Plant Pathol.* 104:49–57.
- Migheli, Q., Briatore, E. and Garibaldi, A. 1998. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to identify races 1, 2, 4, and 8 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in Italy. *Eur. J. Plant Pathol.* 104:49–57.
- Moon, Y.G., W.G. Kim, W.D. Cho, and J.M. Sung. 2001. Occurrence of *Fusarium* wilt on cruciferous vegetable crops and pathogenic differentiation of the causal fungus. *Res. Plant Dis.* 7:93–101.
- Mora, A. and Earle, E.D., 2001. Combination of *Trichoderma harzianum* endochitinase and a membrane-affecting fungicide on control of *Alternaria* leaf spot in transgenic broccoli plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55:306–310.
- Mridha, M.A.U. and Wheeler, B.E.J. 1993. *In vitro* effects of temperature and wet periods on infection of oilseed rape by *Alternaria brassicae*. *Plant Pathol.* 42:671–675.
- Muto, M., Takahashi, H., Ishihara, K., Yuasa, H., and Huang, J.W. 2005. Control of black leaf spot (*Alternaria brassicicola*) of crucifers by extracts of black nightshade (*Solanum nigrum*). *Plant Pathol. Bull.* 14:25–34.
- Nakata, K. and Takimoto, K. 1928. List of disease of cultivated plants in Korea. *J. Agric. Exp. Stn., Govern-Gen.* Chosen 15:77–78.
- Nam, S.H. 1994. Inheritance and breeding of *Fusarium* yellow resistance in radish. Ph D. Diss., Chungnam Natl. Univ., Daejeon, Korea.
- Nowicki M., Nowakowska M., Niezgoda A. and Kozik E.U. 2012. *Alternaria* black spot of crucifers: symptoms, importance of disease and perspectives of resistance breeding. *Vegetable Crops Res. Bull.* 76:5–19.
- Park, M.S., Jang, K.S., Choi, Y.H., Kim, J.-C. and Choi, G. J. 2013. Simple mass-screening methods for resistance of tomato to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 31:110–116
- Péombelon, M.C. M. and Salmand, G. P. C. 1995. Bacterial soft rot. In: Pathogenesis and host specificity in plant disease, ed. by I.S. Singh, r. P. Singh and K Kohmoto, pp. 1–20. Elsevier Science.
- Peterson, J.L. and G.S. Pound. 1960. Studies on resistance in radish to *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*. *Phytopathology* 50:807–816.
- Pound, G.S. 1959. Red Prince is new radish. *Wis. Univ. Agric. Exp. Sta. Bull.* 538:93.
- Pound, G.S. and D.L. Fowler. 1953. *Fusarium* wilt of radish in Wisconsin. *Phytopathology* 43:277–280.

- Ramirez-Villupadua, J., R.M., Endo, P. Bosland, and P.H., Williams. 1985. A new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* that attacks cabbage type A resistance. *Plant Dis.* 69:612-613.
- Ramirez-Villupadua, J., R.M., Endo, P. Bosland, and P.H., Williams. 1985. A new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* that attacks cabbage type A resistance. *Plant Dis.* 69:612-613.
- Raybould, A. F., Maskell, L. C., Edwards, M-L., Cooper, J. I. and Gray, A. J. 1999. The prevalence and spatial distribution of viruses in natural populations of *Brassica oleracea*. *New Phytol.* 141: 265- 275.
- Roossinck, M. J. 2001. *Cucumber mosaic virus* a model for RNA virus evolution. *Mol. Plant Pathol.* 2: 59 -63.
- Sánchez, F., Wang, X., Jenner, C. E., Walsh, J. A. and Ponz, F. 2003. Strains of *Turnip mosaic potyvirus* as defined by the molecular analysis of the coat protein gene of the virus. *Virus Res.* 94: 33-43.
- Shim, S.-A. Kim, J.-C. Jang, K.S. Choi, Y.H. Kim, H.T. and Choi, G.J. 2013. Role of a phytotoxin produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* on pathogenesis of and resistance to the fungus. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 31:626-632.
- Shimotori, H., Yanagida, H., Enomoto, Y. Igarashi, K., Yoshinari, M. and Umemoto, M. 1996. Evaluation of benzenesulfonanilide derivatives for the control of crucifers clubroot. *J. Pestic. Sci.* 21:31-35.
- Soh, J. W., Han, K. S., Lee, S. C. and Lee, J. S. 2013. Contamination of Chinese cabbage soil with *Plasmodiophora brassicae*. *Res. Plant Dis.* 19:201-207.
- Song, J.H., Kim, Y.W. and Cho, J.H. 1996. Varietal difference and inheritance of cabbage yellows (*Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* Snyder et Hansen) resistance in cabbage. *Korean J. Breed.* 28:171-177.
- Tewari, J.P. and Mithen, R.F. 1999. Disease. In: *Biology of Brassica coenospecies*. ed. by C. Gómez-Campo, pp. 375-411. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Tochihara, H. 1968. Radish enation mosaic virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 34: 129.
- Toxopeus, H. and Janssen, A. M. P. 1975. Clubroot resistance in turnip. II. The slurry screening method and clubroot races in the Netherlands. *Euphytica.* 24:751-755
- Van Peer, R., T. Xu, H. Rattink, and B. Schippers. 1988. Biological control of carnation wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in hydroponic system. *ISOSC Proc.* 361-373.
- Waalwijk C., Baayen R.P., de Koning J.R.A. and W. Gams. 1996. Ribosomal DNA analyses challenge the status of *Fusarium* sections *Liseola* and *Elegans*. *Sydowia* 48:90-114.
- Waalwijk, C., Baayen, R .P., de Koning, J. R. A. and Gams, W. 1996. Ribosomal DNA analyses challenge the status of *Fusarium* sections *Liseola* and *Elegans*. *Sydowia.* 48:90-114.
- Wallenhammar, A. C. 1996. Prevalence of *Plasmodiophora brassicae* in a spring oilseed rape growing area in central Sweden and factors influencing soil infestation levels. *Plant Pathol.* 45:710-719.
- Wallenhammar, A. C. and Arwidsson, O. 2001. Detection of *Plasmodiophora brassicae* by

- PCR in naturally infested soils. European J. Plant Pathol. 107: 313-321.
- Wallenhammar, A. C., Almquist, C., Söderström, M. and Jonsson, A. 2012. In-field distribution of *Plasmodiophora brassicae* measured using quantitative real-time PCR. Plant Pathol. 61:16-28.
- White, J. G. and Wakeham A. J. 1995. Serological detection of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* in soil. EPPO Bulletin. 25:75-80.
- Whitehead, Neil A., et al. 2002. The regulation of virulence in phytopathogenic Erwinia species: quorum sensing, antibiotics and ecological considerations. Antonie Van Leeuwenhoek 81(1) : 223-231.
- Yoshigawa, H. 1983. Breeding for clubroot resistance of crucifer crop in Japan. Jpn. Agr. Res. Quart. 17: 6-11.
- Yu, H.Y., Yun, H.K., Park, C.H. and Lee, H.B. 1991. Three species of Alternaria associated with alternaria leaf spot of radish in Korea. Korean J. Plant Pathol. 7:188-191.
- Zhang, X. Z., Lee, S. U., Kim, J. S., Yoon, Y. S., Choi, G. S., Kim, H. K. and Kim, B. S. 2005. Control efficacy of flusulfamide GR on Chinese cabbage clubroot caused by *Plasmodiophora brassicae*. Res. Plant Dis. 11:43-47.

특허, 논문, 제품(시장) 분석보고서

프로젝트명	무 품종 육성을 위한 내병성 검정 기술 개발		
프로젝트 책임자	최 경자	프로젝트 연구기관	한국화학연구원

1. 본 연구관련 국내의 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
무의 내병성 육종을 위한 <i>in vivo</i> 병리검정 기술	미국 등의 다국적 기업	60%	60%	100%	

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) 현재 기술수준은 선진국 100% 대비 우리나라 및 신청한 연구팀의 기술수준 표시
- 3) 기술개발 목표수준은 당해과제 완료 후 선진국 100% 대비 목표수준 제시
- 4) 부가설명이 필요한 경우 비고란에 작성

2. 특허분석

가. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 중국, EP)
특허 DB	WIPS ON(www.wipson.com), NDSL
검색기간	최근 10년간
검색범위	제목, 초록, 공개전문

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	<i>In vivo</i> 병리검정 기술
Keyword	<i>in vivo</i> 병리검정, seedling bioassay, disease resistance vegetable, screening
검색건수	645
유효특허건수	37

핵심특허 및 관련성	특허명	덩굴쫄김병 저항성 오이 식물	오이 노균병 저항성 검정 기술
	보유국	네덜란드	미국
	출원년도	2011	2010
	관련성(%)	10%	10%
	유사점	내병성 병리검정 기술	내병성 검정 기술
	차이점	오이 덩굴쫄김병 병리검정 기술은 본 과제의 대상 작물 및 병이 아님	내병성 육종을 위한 분자마커 검정기술

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총 검색건수를, 유효특허건수는 검색한 특허 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 특허를 의미
- 3) 핵심특허는 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 특허를 기준으로 분석

3. 논문분석

가. 논문분석 범위

대상국가	국내, 미국, 유럽, 아시아, 아프리카
논문 DB	NDSL, Google
검색기간	최근 10년간
검색범위	제목, 초록, 논문전문

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		무의 <i>in vivo</i> 병리검정 기술 개발	
Keyword		(radish, <i>Raphanus sativus</i>) and (resistance or resistant) and screening	
검색건수		145건	
유효논문건수		12건	
핵심논문 및 관련성	논문명	Resistance degree of radish cultivars to <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i> according to several conditions	효율적인 무 뿌리혹병 저항성 검정법 확립
	학술지명	Kor. J. Hort. Sci. Technol.	식물병연구
	저 자	백송이, 장경수, 최용호, 김진철, 최경자	조수정, 장경수, 최용호, 김진철, 최경자
	게재년도	2011	2011
	관련성(%)	100%	100%
	유사점	<i>in vivo</i> 병리검정 기술	<i>in vivo</i> 병리검정 기술
	차이점	본 연구팀이 확립한 병리검정 기술에 관한 논문으로 본 연구의 내병성 육종 소재 발굴 지원에 이용 가능	본 연구팀이 확립한 병리검정 기술에 관한 논문으로 본 연구의 내병성 육종 소재 발굴 지원에 이용 가능

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효논문건수는 검색한 논문 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 논문을 의미
- 3) 핵심논문은 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 논문을 기준으로 분석

4. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

1) 국내 제품생산 및 시장 현황

- 채소 종자의 수출은 고추, 무, 양배추, 배추가 대부분을 차지하고 있다. 무는 1990년대 초반부터 400~800만 달러 상당을 주로 일본 봄 무 시장에 수출하고 있다(한국채소종자산업발달사, 2008).
- 일반적으로 무 품종 육성은 일본이 우리보다 앞선다고 생각하고 있으나, 실제로는 만추대성, 내병성, 품질, 균일성 등이 극히 우수한 단교잡 무 품종을 육성해 우리가 일본 무 종자 시장을 크게 석권하고 있다(한국채소종자산업발달사, 2008).
- 2003년까지 무의 종자 수출액은 채소 종자 중 1위였으나 그 후 무는 종자 수출액이 다소 감소하는 정체기이고, 고추 종자는 2000년대부터 수출액이 급격히 증가하면서 2004년부터는 무 종자 수출액이 2위로 물러난 상태이다.
- 국내 무 생산량은 2005년 1,277천 톤에서 2010년에는 1,039천 톤으로 감소하였으며, 재배 면적도 크게 감소하였다. 현재 3~4개의 소규모 종자회사들이 일본 등 해외에서 수출할 무 품종을 육성 중이나, 인력과 경제력 등에서 어려움에 직면해 있는 실정이다.

채소 종자 시장 규모	고추	무	배추	수박	기타	합계 (억 원)
총매출 (억 원, %)	442.9 (18.9)	379.1 (16.2)	195.5 (8.4)	113.3 (4.8)	1,206 (51.7)	2,337
국내 (억 원)	373.4	340.2	159.9	111.8	992	1,977
수출 (억 원)	69.5	38.9	35.6	1.5	214	360

- 2011년 시장규모 출처 : 한국종자협회, Golden Seed 프로젝트 상세기획 보고서

2) 국외 제품생산 및 시장 현황

- 무 생산과 무 종자 시장은 아시아 지역이 대부분을 차지하고 있으며, 아시아 지역의 재배면적 중 80%를 중국이 차지하고 있다. 2010년 기준 약 888억 원 규모인 무 종자 시장에서 중국은 약 367억 원 규모의 시장을 형성하고 있다. 중국, 한국, 일본의 시장을 합치면 전체 시장의 85%를 차지한다(한국종자협회, Golden Seed 프로젝트 상세기획 보고서).
- 중국 종자시장은 전반적으로 고정종에서 교배종(F1 품종)으로의 전환에 따라 빠른 속도로 성장하고 있어 2021년에 약 2억 달러 규모가 될 것으로 전망되고 있다. 중국은 내추대성 백수계, 청수계 무 품종을 선호하고 있다. 봄 무 종자 시장은 외국계 회사 점유율이 높는데 특히 백수계 품종의 경우 한국업체인 대일의 ‘한백옥’, ‘초복’ 품종이 시장을 선도하고 있고 농우바이오 현지법인인 세농도 상당한 점유율을 가지고 있다. 청수계 품종에서는 일본 업체인 Tohoku사가 주도하고 있다.
- 일본의 무 종자 시장 규모는 약 152억 원으로 종자 소요량은 약 100톤 정도로 추산된다. 일본에서는 근피, 근형 등 무에 대한 원예적 특성 요구도가 높으며, 만추대성과 시들음병(위황병) 내병성이 요구된다. 최근 일본에서는 옹성불임을 이용한 품종 육성이 널리 사용되고 있으며, 주요 선도업체는 Mikado, Kyowa, 몬산토 등이다.

- 인도와 동남아 무 종자시장 규모는 78억 원으로 추정된다. 이 지역의 무 종자 시장은 대부분 고정종인 남방계와 미농조생계 무를 재배하고 있으나 점차 F1 품종과 만추대성 등 고품질 품종의 요구가 확대되고 있다. 일본 다끼이, 대만, (주)농우바이오에서 동남아용 무 종자를 수출하고 있다.
- 유럽 시장의 경우에는 주로 샐러드용인 20일 무로 F1과 고정종 모두 유럽계 회사와 일본 회사에서 개발한 품종이 재배하고 있다.

구분	중국	한국	일본	동남아	인도	유럽	북미
무 종자 시장 규모	367억 원	240억 원	152억 원	67억 원	60억 원	24억 원	20억 원

• 2010년 무 시장규모 출처 : Golden Seed 프로젝트 상세기획 보고서

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

○ 내병성 무 품종

용성불임성과 자가불화합성을 이용한 우리나라의 무의 육종 기술은 세계 최고 수준이다. 무에 발생하는 주요 병해는 뿌리혹병, 시들음병(위황병), 무름병(연부병), 노균병, 검은무늬병(흑반병), 세균검은점무늬병(세균흑반병) 및 TuMV 등이 있는데, 다국적 기업들과 (주)농우바이오에서는 이들 병해에 대한 저항성 무 품종이 개발되어 판매되고 있다. 하지만 대부분의 종자회사에서는 이들 병해에 대한 내병성 품종을 개발하기를 희망하나 내병성 육종을 위한 병리검정 장비, 시설 및 기술이 부족하여 어려움을 겪고 있다. 따라서 이들 식물병에 대한 저항성 품종을 개발하기 위한 효율적이고 체계적인 병리검정 기술을 개발하여 지원한다면 글로벌 경쟁력이 충분히 있을 것이다.

2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목	산업화 기준								
	1차 년도	2차 년도	3차 년도	4차 년도	5차 년도	6차 년도	7차 년도	8차 년도	계
직접 경제효과	10	40	100	160	200	400	600	800	2,310
경제적 파급효과	50	200	500	800	1,000	2,000	3,000	4,000	11,550
부가가치 창출액	20	80	200	320	400	800	1,200	1,600	4,620
합 계	80	320	800	1,280	1,600	3,200	4,800	6,400	18,480

- 1) 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- 2) 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- 3) 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

5. 3P(특허, 논문, 제품)분석을 통한 연구추진계획

가. 분석결과 향후 연구계획(특허, 논문, 제품 측면에서 연구방향 제시)

1) 특허분석 측면

기존 특허는 내병성 검정을 위한 분자마커 개발과 병 저항성 유전자를 형질전환하여 저항성 품종을 개발하는 분야에 치중되어 있으나, 본 과제에서 개발하고자 하는 무의 내병성 육종을 위한 **효율적인 *in vivo* 병리검정 방법 개발에 관한 특허는 거의 없었다.** 이는 *in vivo* 병리검정 기술은 각 회사 및 기관에서 노하우로 가지고 있고 공개하지 않고 있기 때문인 것으로 생각된다. 따라서 내병성 분자마커 개발과 형질전환을 통한 저항성 작물 개발에 관한 특허 명세서의 실시예에 기술되어 있는 병리검정 방법을 활용하여 효율적인 병리검정 방법을 구축하고 무의 주요 병원균을 진단하는 분야에 관한 특허를 출원할 계획이다.

2) 논문분석 측면

본 과제는 무의 내병성 육종을 위한 효율적인 *in vivo* 병리검정 기술을 개발하는 것을 목적으로 하는 무 육종 기반과제이다. 따라서 무의 내병성 품종 육종을 위한 대량 검정에서 대량의 교배 시료 중 저항성 개체를 신속 정확하게 선별하는 효율적인 *in vivo* 병리검정 방법이 필요하다. 그런데 기존에 보고된 논문을 분석해 보면 육종 소재 선별 및 품종들의 병 저항성 평가 등에 관한 논문에서 *in vivo* 병리검정 방법이 설명되어 있으나, 유묘 검정이 아니라 포장 검정으로 저항성 식물을 선별하였거나 유묘 검정으로 실험하였다 하더라도 효율적인 병리검정 방법을 확립하여 병 저항성 조사를 한 것이 아니라 다른 논문에서 사용하는 방법을 그대로 따라 실험한 것이 대부분이다. 그러므로 본 과제에서는 기 보고된 논문에서 사용한 방법을 참조하여 효율적인 접종원 대량생산 방법을 확립하고 발병 조건에 따른 감수성 및 저항성 품종의 반응을 조사하여 최적 조건을 확립하는 것이 필요하겠다. 뿐만 아니라 다양한 균주를 확보하여 병 저항성과의 관계 규명, 병원균 진단 기술 및 보존 기술을 개발하는 것이 필요하다. 한편 한국화학연구원(본 연구팀)에서 발표한 논문 중에는 무의 시들음병과 뿌리혹병에 대한 효율적인 *in vivo* 병리검정 방법의 확립을 위한 논문들이 있었다. 이들 병에 대해서는 기 보고된 논문에서 제시한 방법을 이용하여 연구할 계획이다.

3) 제품 및 시장분석 측면

오늘날 채소 신품종 육성의 핵심은 내병성인데, 국내에서 개발된 내병성 무 품종으로 시들음병(위황병), 무름병(연부병), 노균병, 검은무늬병(흑반병), 세균점무늬병(세균흑반병) 및 바이러스병 저항성 품종이 다국적 기업과 (주)농우바이오를 중심으로 개발되어 판매되고 있다. 하지만 대부분의 종자회사에서는 내병성 품종이 아닌 일반 품종을 개발하였을 뿐이다. 따라서 무 종자의 수출을 위해서는 시들음병, 무름병, 노균병, 세균점무늬병, 바이러스병에 대한 내병성이 우수한 무 신품종의 개발이 필요한 실정이다. 따라서 종자 업계의 절실한 니즈에도 불구하고 **국내·외적으로 내병성 무 품종 개발 현황이 미약한 것을 고려할 때 적극적으로 내병성 품종을 개발하기 위하여 효율적인 병리검정 기술을 확립하여 병리검정 기술 제공 및 신속·정확한 병리검정 서비스를 하는 것이 필요하다고 판단된다.**

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부·해양수산부·농촌진흥청·산림청에서 시행한 골든 시드 프로젝트사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부·해양수산부·농촌진흥청·산림청에서 시행한 골든 시드 프로젝트사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.