

633.491

L293 6

19

최      중  
연구보고서

GOVP1200201683

야생근연종과 재배종의 교배, 융합잡종을 이용한  
감자의 무름병, 풋마름병의 저항성 품종 개발과  
DNA분석에 의한 저항성 표지유전자 추적에 관한  
연구

Studies on developing bacterial resistant potatos and  
resistant related DNA markers with the cross hybrids  
and cell fusion hybrids between wild species and  
cultivars

연구기관

동국대학교

농 립 부



## 최 종 보 고 서

2001년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 야생근연종과 재배종의 교배, 융합 잡종을 이용한 감자의 무름병, 풋마름병의 저항성 품종 개발과 DNA분석에 의한 저항성 표지유전자 추적에 관한 연구에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

- 첨부 : 1. 최종보고서 10부  
2. 최종보고서 디스켓 1매

2001년 11 월 30 일

주관연구기관 : 동 국 대 학 교

총괄연구책임자 : 김 혜 영 (인)

주관연구기관장 :

직 인

농 립 부 장 관 귀 하

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “야생근연종과 재배종의 교배, 융합 잡종을 이용한 감자의 무름병, 풋마름병의 저항성 품종 개발과 DNA분석에 의한 저항성 표지유전자 추적에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2001 년 11 월 30 일

주관연구기관명 : 동 국 대 학 교

총괄연구책임자 : 김 해 영

연 구 원 : 이 태 호

연 구 원 : 남 상 욱

협동연구기관명 : 고령지농업시험장

협동연구책임자 : 조 현 목

연 구 원 : 조 광 수

연 구 원 : 박 영 은

연 구 원 : 이 정 윤

연 구 원 : 조 지 흥

# 요 약 문

## I. 제목

야생근연종과 재배종의 교배, 융합잡종을 이용한 감자의 세균병 저항성 품종개발과 DNA 분석에 의한 저항성 표지인자 추적에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

꽃마름병은 토양성 세균병으로 *Ralstonia solanacearum*에 의해 유발되며 한국에서는 몇 년전부터 중남부 이남에 발생하기 시작하여 해마다 그 피해가 늘고있다. 감자의 무름병(연부병, soft rot)은 감자의 상처를 통해 *Erwinia carotovora* subsp. *caratovora*에 의해 유발되는 병으로 현재 한국의 모든 감자 재배지역에 많은 피해를 주고 있다. 아직까지 무름병에 저항성인 품종이 육종되지 못했다. 감자의 야생근연종 중에 유용한 유전자를 갖고 있으나, 재배품종과 교배가 안되는 것이 많다. 이들은 재배종의 반수체와의 교잡이나 세포융합을 하여 유전자를 도입할 수 있다. 저항성 야생종과 재배종간의 잡종은 저항성유전자의 도입뿐 아니라 최대한의 잡종강세를 유도할 수 있다는 점에서 영양번식 작물인 감자에서는 매우 효율적인 육종 효과를 얻을 수 있다.

야생종을 이용한 저항성 육종에는 무엇보다도 먼저 저항성 야생종 clone을 선발하는 것이 중요하다. 그동안 선발되어온 꽃마름병에 저항성으로 알려진 야생종 *S. commersonii*계통에서 선발된 저항성 clone과 재배종 반수체와의 세포융합체와 이들의 1대 자손을 보유하고 있었다. 본 연구는 저항성인 세포융합체, 1대 자손과 2대 자손을 이용하여 꽃마름병 저항성 clone을 선발하고, 저항성 유전자의 DNA marker를 찾아낼 수 있다면 앞으로 분자유전학적인 방법을 이용하여 이들 유전자를 cloning 하여 다른 재배종으로의 형질전환에 의한 육종에 유용하게 이용할 수 있게 하는데 목적

이 있다. 무름병에 대한 저항성은 야생종 중에도 매우 드문 것으로 알려져 있어 본 연구에서는 그동안 도입하여 사용을 허락받은 무름병 저항성의 가능성이 있는 세포 융합체와 이들의 후대자손과 국제감자연구소와 미국 농무성에서 종자로 도입된 양생종을 검사하여 무름병 저항성 clone을 선발하여 육종의 재료로 사용될수 있도록 하는데 그 목적이 있다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

저항성 clone을 선발하기 위하여 우선 무름병과 풋마름병에 각각 저항성인 야생종 계통을 종자 혹은 clone으로 수집하였다. 풋마름병은 육종 재료로 사용할 수 있는 저항성 야생종 clone과의 융합잡종이 본 연구실에서 개발되어 있어 이들을 주로 이용하였다. 왜냐하면 다른 수집된 야생종 보다 이들의 저항성이 더 뚜렷하였다. 무름병에 대한 저항성은 야생종 계통 중에 저항성을 선발하였고, 융합잡종과 1대 자손은 미국 위스콘신 대학 식물병리학과에서 분양받아 검정 선발하였다. 풋마름병과 무름병은 포장에서는 점종실험을 할 수 없고, 다수의 clone을 검정하여야 하므로, 기내식물과 화분재배식물을 이용하였다. 종자로 도입된 계통을 기내 과종하여 기내에서 증식 보존된 식물 혹은 화분식물을 검정 재료로 사용하였고, clone으로 유지되어오든 야생종도 동일한 조건으로 선발하기 위하여 기내 증식하여 검정재료로 이용하였다.

풋마름병 저항성 선발과정에서는 저항성이며 임성이 좋은 융합잡종의 1대 자손을 재배종과 교배하여 2대 자손에서 저항성 clone을 선발하였다. 무름병에서는 육종재료로 사용할 야생종 clone이 필요하므로 다수의 야생종 계통과, 재배종 반수체, 반수체와 야생종간의 잡종 1세대에 대하여 저항성을 검정하여 선발하였다.

풋마름병 저항성에 대하여서는 양친계통, 융합잡종, 1대 및 2대 잡종까지 저항성, 감수성 clone들이 있어 이들의 DNA marker 추적을 할 수 있었다. 1대, 2대 잡종 중에는 저항성과 더불어 괴경 및 식물의 형태가 우수한 clone이 있어 이들에 대한 식용

가능성 여부를 확인할 필요가 있어 이들에 대한 glycoalkaloid의 함량을 검사하여 식 용으로도 가능하다는 판단을 할 수 있었다.

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 1. 야생종 수집 및 검사대상 식물 과 증식

종자로 수집된 계통은 발아하여 각 clone을 기내에서 증식 유지하였고 피경으로 유지 되어온 clone도 조직배양으로 기내에서 증식하여 접종실험에 이용하였다. 무름병 저항성 검정을 위하여 실험 한 개체들은 새로 수집한 야생종 과 잡종들이며 일부는 동국대학교 연구실과 고령지 시험장에 보존되어오든 clone이며 다음과 같다. 야생종 으로 *S. brevidens*과 *S. cardiophyllum*을 포함하여 12종 20 계통의 44 clone을 검사하였고, *S. tuberosum*과 *S. brevidens*의 융합잡종3 clone과 이들의 교배잡종후대 1세대는 3계통의 27clones, 2세대는 2계통의 8 clones와 3 세대 2clones과 재배종 반수체와 *S. commersonii* 의 융합잡종 2과 이들의 1대 교배잡종 12 clone이었다. 그 외에 재배종에서 유도된 반수체(dihaploid)12 clones과 반수체 x 야생종의 교배잡종 13계통의 28 clone에 대하여 무름병 저항성을 기내에서 검사하였고, 포장에서의 저항성 검정은 반수체 x 야생종의 잡종 21clone과 재배종에 대하여만 수행하였다.

꽃마름병 저항성에 대하여 고령지 시험장의 4배체 수집자원 70계통에 대하여 온실 재배식물에 접종 실험하였으나 저항성인 것이 하나도 없었다. 본 실험실에서의 예비실험결과 그동안 선발과정을 거쳐 유지되어온 *S. commersonii*계통의 clone이 다른 야생종보다 우수하다는 결론을 내렸기 때문에 이들 계통과 교배 후대를 중심으로 검정 선발하였다. *S. commersonii* P.I. 320226의 4 clones과 이중 LZ3.2와 재배품종 반수체(PT56) 의 융합잡종중 선발되어 교배친으로 사용된 3개의 clone과 이들의 교배 1대잡종 9계통의 38clone과 선발된 1대잡종과 교배하여 얻은 제 2세대 50 clone 총 95clone과 재배종에 대하여 검정 선발하였다.

## 2. 저항성 검정방법규명

유식물체를 이용한 몇 가지 접종방법을 시도하면서 발전시켰다. 첫 번 시도는 *Ralstonia solanaceum* race 1과 race 2를 포함한 세 종류의 균주를 섞어은 세균현탁액( $1 \times 10^8$  cell/ml)을 가위에 묻혀 유식물체의 잎을 자르는 방법으로 접종하였다. 풋마름성 세균의 race를 섞어 접종하면 일반적인 저항성 clone을 선발하는데는 효과가 있을지 모르나, race에 따른 저항성의 차이가 있을 경우 저항성 선발에 오류가 발생할 가능성이 있어 한번에 한 종류씩 접종하기로 하였다. 두 번째는 race 1만을 이용하여  $1 \times 10^8$  cell/ml 농도의 세균현탁액 1ml를 유식물체가 이식된 연결 pot에 관주하여 접종하였다. 세 번째 실험에서는 race 3를 이용하여 식물의 뿌리를 세균현탁액에 30분간 침지하여 다시 화분에 옮겨심는 방법을 이용하였다. 관주한 경우에 병징이 7일부터 미미하게 나타나기 시작하여 22일까지 관찰하여야 저항성정도의 기록을 할 수 있었으나, 침지한 경우에는 접종 7일에 병징이 나타나 15일에는 기록을 완전히 끝낼 수 있었고 저항성 정도의 구별이 더 뚜렷하였다. 시간적 차이는 있었으나 세가지 방법으로 저항성 정도의 검사를 충분히 할 수 있었고 결과도 유사하였다.

무름병균 E.c.c와 E.c.a. 저항성의 검정은 기내의 잎, 식물체의잎을 이용하여 1차 접종하여 screen 하였고 식물체의 줄기를 잘라 E.c.a를 접종하여 흑각병의 저항성 검증을 하였고 잎을 이용한 것과 줄기를 잘라한 결과에 차이가 있었으며 줄기에 접종하는 방법을 선택하기로 하였다. E.c.c.에 의한 무름병은 피경에 pipette tip으로 구멍을 낸 뒤  $50 \mu\text{l}$ 씩 현탁액을 주입하여 접종하였다.

## 3. 풋마름병저항성 clone의 선발

70종류의 감자수집유전자원에 대하여 접종한 결과 저항성인 개체가 하나도 없었다. 그 동안 저항성으로 선발된 *S. commersonii*와 재배품종 수미 반수체간의 융합잡종중 저항성인 것과 재배품종간의 교배잡종 1세대, 2세대를 이용하여 저항성 clone들을 선발할 수 있었다. 융합잡종중 HA06-1과 HA06-9가 race 1과 race2의 복합 감염에서

강한 저항성을 보였으며 융합잡종의 1대 교배자손 중에는 CT08-3,과 CT08-4 와 CT02-4가 복합감염에 강하였으나 이들의 양친인 융합잡종 HA06-4는 부분 감수성을 나타냈었다. 1대 잡종중 CT10b-4는 복합 감염에도, 각각 감염시켰을 경우에도 강한 저항성이었고, 이의 양친 HA06-9도 강한 저항성이었다. 2대 잡종에서는 CT10b-4를 교배양친으로한 CT206-6과 CT206-9, CT206-10과 CT206-14가 두 race에 다 저항성이었고 특히 CT206-10은 강한 저항성을 보였고 식물체의 형태도 양호하였다. CT08-4의 교배자손중에 CT204-3과 CT204-10도 두 race에 저항성을 보였고 식물의 형태도 양호하였다. 이들은 포장검정을 거쳐 괴경의 수량 등을 감안하여 품종으로의 선발의 가능성을 갖고 좀더 검사할 필요가 있다고 판단된다.

#### 4. 무름병 저항성 clone의 선발

재배품종 반수체와 야생종간의 교배잡종 21조합의 115 clone에 대한 무름병 검사를 포장에서 실시 한 결과 F28조합의 한 clone과 F13조합의 한 clone이 저항성인 것으로 판정되었다. 이에 집중한 실험에서 고도의 민감성을 보인 clone은 제외하고 다른 나머지 clone으로 줄기에 E.c.a.를 접종하여 흑각병 저항성을 살펴본 결과 *S. tuberosum* 재배품종은 물론 수집계통도 모두 고도의 민감한 반응을 보였다. 야생종 중에는 *S. brevidens* clone ps6A와 *S. cardiophyllum* clone cph-A-1, cph-C-1과 *S. sparsipilum* spl-5 4 clone 만이 저항성을 보였다. 융합잡종과 이들의 1대, 2대 교배자손 에서는 ps6A와 *S. tuberosum* R4#2의 융합잡종 A249와 A937이 저항성이었고, A937과 재배품종 Katahdin의 1대 자손중 WE-9와 WE-15 두 clone이 고도의 저항성을 보였다. 그 동안 흑각병 저항성의 육종 재료가 별로 없었던 것을 감안 하면 여러 종류는 아닐지라도 이들 clone이 좋은 육종재료로 사용될 수 있으리라 생각된다.

E.c.c에 의한 무름병 저항성을 검정한 결과 야생종 중에 *S. cardiophyllum*-에서 cph-3, cphA-1 과 반수체 x *S. phureja*와의 잡종 F27-3과 반수체 HIC-20 만이 고도의 저항성을 보였다. *S. brevidens* 의 융합잡종 2007과 A206와 이들의 1대 교배자

손 중 C1-31, C1-75, WD-7, WD-8, WE-13과 2대 자손 C31-5와 C31-16 이 저항성을 보였다. *S. brevidens*는 괴경을 형성하지 않는 종이나 이의 자손중에서 저항성이 나타났다는 것은 흥미 있는 결과이고 이들이 앞으로 무름병 저항성의 육종을 위한 양친으로 사용될 수 있다고 판단된다.

## 5. 야생종과의 잡종 후대의 glycoalkaloid 함량 검사

풋마름병 저항성 선발을 위하여 개발 선발된 *S. commersonii*의 융합잡종과 그 후대 자손에 대하여 괴경의 동결 건조한 시료를 이용하여 glycoalkaloid, chaconine과 solanine 의 함량을 HPLC로 분별 정량하였다. 융합잡종으로 사용한 *S. commersonii* LZ3.2는 TGA 30.8mg/g이고 반수체는 5.8mg/g이었다. 이들의 융합잡종은 clone 간에 차이가 있어 4.1 - 35.2mg/g이었으나, 교배잡종 1세대에서는 TGA의 함량이 상당히 낮아졌고 2세대에서 저항성인 clone들만 검사 한 결과 6.1mg/g 이하로 일부 재배종 보다 더 낮아 식용으로도 가능한 것으로 나타났다.

## 6. 무름병과 풋마름병에 대한 저항성 DNA 표지인자 검사

풋마름병에 대한표지인자를 찾기 위하여 UBC 와 Operon의 200종류의 random decamer primer를 사용하여 RAPD 분석을 한 결과 13종류가 polymorphic band를 부여했으나, 이중 OPA 1의 1,692bp와 UBC #407의 662bp만이 저항성 양친과 race 1에 저항성인 1대, 2대 교배잡종에 나타났다. 그러므로 이에 대한 정밀한 검사가 필요하다.

무름병에 대한표지인자를 찾기 위하여 UBC 와 Operon의 random decamer primer로 융합잡종과, 융합잡종 양친, 융합잡종의 1대, 2대 교배자손과 교배양친의 polymorphic band와 저항성과 관련된 band를 찾고자 하였다. 32 band중에 OPA2의 1,030 bpband, OPA 19의 3,262 bp band 와UBC#472의 463 bp band가 감수성인 융합양친CR4#2, 교배양친 katahdin에는 없고, 저항성인 융합양친 ps6A와 저항성인 융합잡

종에만 나타났으나, 교배 1대 잡종에는 나타나지 않았다. 그러나 OPA2의 2,645bp band는 저항성 융합잡종의 양친, 저항성인 융합잡종과 저항성인 1대 자손에만 나타나고 다른 감수성 양친과 자손에는 나타나지 않았다. 그러므로 앞으로 이를 더 추적할 필요가 있다고 판단된다.

decamer의 primer 보다는 20mer의 primer가 좀더 안정성이 높아 농촌진흥청에서 개발한 20mer 의URP primer 12종류를 이용하여 검사하였으나 저항성인 clone에만 나타나고 감수성에는 나타나지 않은 band를 찾을 수 없었다. AFLP분석에서도 다형화 band는 있었으나 저항성 clone에만 존재하는 band를 찾을 수 없었다.

## V. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의.

꽃마름병과 무름병은 포장에서 접종실험을 할 수 없고, 다수의 clone을 검정하여야 하므로, 기내식물과 화분재배식물을 이용하여 직접 선발 대상이 될 수 있는 혹은 육종 재료로 사용 할 수 있는 clone 들을 선발하였다.

1. 꽃마름병 저항성 선발과정에서는 저항성이며 임성이 좋은 융합잡종의 1대 자손과 재배품종 대지와 교배한 자손중 5 clone CT204-3, CT204-10, CT206-9, CT206-10, CT206-14를 선발하였다. 이들은 생장이 양호하고 형태적으로도 안정되었고, glyclalkaloid의 함량도 낮아 포장검사를 거쳐 품종으로의 선발육종에 활용할 계획이다.

2. 무름병에서는 육종재료로 사용할 야생종 clone이 필요하므로 다수의 야생종 계통과, 재배종 반수체, 반수체와 야생종간의 잡종 1세대에 대하여 저항성을 검정하여 선발하였다. 야생종 중에서 *S. cardiophyllum*에서 두 clone cph-A-1과 cph-C-1이 선발되었고, 반수체와 야생종간 잡종중에서는 F27-3가 저항성으로 선발되었다. S,

*brevidens*의 세포융합잡종과 그 교배잡종후대의 검정에서는 2대잡종 C31-5가 무름병에 저항성으로 판정되어 선발 되었다. 무름병에 대한 저항성 육종 재료가 거의 없는 상태에서 이들 clone은 육종 모본으로 활용될 예정이다.

3. DNA 표지인자의 추적에서는 정확하게 저항성 표지 인자라고 확인은 아직 못하였으나 몇 개의 가능성있는 인자를 찾았으므로 이들을 좀더 연구하여야 한다.

4. 활용에 대한 건의: 선발된 clone들에 대하여 포장검사, 생산력 검정등을 하여 계속 선발을 할 필요가 있으므로 이에 대하여 여력과 관심이 있는 연구자가 있으면 재료를 분양할 의사가 있다.

# Summary

Bacterial wilt is soil born disease infected by *Ralstonia solanacerum* seriously affecting potato field in warmer climate area. It started to appear in the southern part of Korean peninsular since several years ago. Soft rot is bacterial disease infected by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *E. carotovora* subsp. *atroceptica* on tuber and stem affecting all the potato farmers. The purpose of this study is to introduce resistant characters from wild relatives to the cultivated varieties and search for the DNA markers related with resistance.

## 1. Collection of clones and multiplication

Collections introduced as seeds from CIP or USDA Potato Introduction Center were planted and subcultured in *in vitro* condition. Tuber collections were also subcultured in *in vitro* condition for disease infection experiment. Plant materials include twelve wild species including *S. brevisens* and *S. cardiphylum* of 44 clones, 27 clones of fusion hybrids(*S. brevidnes* + *S. tuberosum*), and the sexual progenies of the fusion hybrids for the soft rot, and another fusion hybrids(*S. commersonii* + *S. tuberosum* haploid) and 88 their 1st and 2nd sexual progenies for the bacterial wilt. Most of these were evaluated in *in vitro* culture condition or as potted plants in growth chamber, or green house. Seventy tetraploid genetic collections of Alpine Experiment Stations were evaluated for the bacterial wilt, however non of them were resistant. For the bacterial wilt non of the wild relative collection were resistant as Fusion hybrids of *S. commersonii* and the progenies. Therefore only this fusion hybrids and the progenies were intensively studied.

## **2. Search for the infection methods**

Since we wanted to screen as many collections as possible *in vitro* infection methods were applied at first. Leaf infection first and shoot infection next and tuber infection were performed for the soft rot(E.c.c.) and black leg(E.c.a). For the bacterial wilt scissors dipped into the mixed bacterial suspension culture of the race 1 and race 3 were used to cut the leaves of the *in vitro* cultured plants for the general screen for the first experiment. Transplanted plantlets were dipped into the bacterial culture or bacterial culture solutions were applied into the soil separated race 1 or race 2.

## **3. Selection of resistant clones for the bacterial wilt**

Seventy tetraploid genetic collections of Alpine Experiment Stations were evaluated for the bacterial wilt, however none of them were resistant. Fusion hybrids of *S. commersonii* clone LZ3.2 and haploid of cultivar superior clone PT56, and their 1st and 2nd sexual progenies were tested for the resistance. Fusion hybrids HA06-1 and HA06-9 were highly resistant for both race 1 and race 3. One of the first progenies of HA06-9, CT10b-4 were also highly resistant for both races. Among 33 progenies of the CT10b-4 4 clones (CT206-6, CT206-9, CT206-10, CT206-14) were resistant for both races. Two progenies (CT204-3, CT204-10) out of eleven of CT08-4 were resistant for both races, however the fusion hybrid parent of CT08-4 were not resistant. It is a question whether the resistance were not expressed in the fusion hybrid and expressed again in the next generation.

#### 4. Selection of resistant clones for the soft rot

One in F28 cross line and one in F13 cross line were the only resistant clones among 115 clones of 21 hybrid combinations of haploid and wild relatives in the field trial. Genetic collections of *S. tuberosum* were all sensitive for the infection of E.c.a. *S. brevidens* clone ps6A and *S. cardiophyllum* clone cph-A-1 and cph-C-1 and *S. sparsipilum* spl-5 were the only resistant clone among 44 wild relatives. The fusion hybrids(ps6A + *S. tuberosum*), A249, A,937, and first progenies of A937, WE-9 and WE-15 were resistant for E.c.a. With the tuber infection, cph-3, cph-A-1, F27-3(haploid x *S. phurja*) and haploid HIC-20 were resistant to E.c.c. However, resistant clones could be selected among fusion hybrids of *S. brevidens* ps6A and the progenies such as fusion hybrids, 2007, A206, first progenies C1-31, C1-75, WD-7, WD-8, WE-13 and 2nd progenies C31-5, and C31-6. It is interesting the progenies of the non tuber bearing *S. brevidens* were resistant for the tuber soft rot.

#### 5. Glycoalkaloid content of fusion hybrids and the progenies

Content of glycoalkaloids of fusion hybrids and the progenies were analysed with HPLC. Total glycoalkaloid(TGA) of wild parent *S. commersonii* LZ3.2 were 30.8mg/g and haploid parent PT56 were 5.8mg/g and cross parent cultivar Dejima were 5.2mg/g. The TGA contents of the fusion hybrids vary from 4.1mg/g to 35.2mg/g, however the TGA contents of all of the first and second progenies crossed with cultivars were lower than 9.2mg/g. All the second generation progenies selected for the bacterial wilt resistant had less than 6.1mg/g TGA.

## **6. Search of DNA markers for the resistance**

200 random decamer primers of UBC and Operon and were used for the RAPD analysis with DNA of fusion hybrids(LZ3.2 + PT56) and the progenies to study bacterial wilt resistant markers. 13 primers had good polymorphic band and 1,692 bp band of OPA1 and 662 bp band of UBC #407 appeared only on the resistant parent, and first and 2nd generation clones resistant for race 1. For the soft rot marker search, 1,030 bp, OPA2, 3,262 of OPA 19 and 463 bp band of UBC # 472 were on resistant parent but not on the first generation. However 2,645 bp band of OPA 2 appeared on resistant fusion parent and resistant progenies but not on the sensitive parent and progenies. Twelve 20mer primers of URP did not gave any specific resistnat band. AFLP also had only polymorphism without specific band for the resistance.

# CONTENTS

Chapter 1. General introduction . . . . .	23
Section 1. Purpose of research development and scope . . . . .	24
Section 2. Strategy and method . . . . .	26
Section 3. System of research developemt . . . . .	27
Section 4. Expectation . . . . .	28
Section 5. Practical application . . . . .	28
Section 6. Next step after achievement of research . . . . .	29
Chapter 2. Selection of bacterial wilt resistance using plantlets of fusion hybrid progenies and search of RAPD DNA markers related with resistance . . . . .	30
Section 1. introduction . . . . .	30
Section 2. Materials and Method . . . . .	31
1. Experiment materials . . . . .	31
a. Plant clones . . . . .	31
b. Bacterial isolates used . . . . .	34
2. Research Method . . . . .	34
a. Maintenance of plant materials . . . . .	34
b. Infection and selection for bacterial wilt . . . . .	35
1) Isolation and increase of virulant bacteria . . . . .	35
2) Infection method . . . . .	35
c. Morphological characters of fusion hybrids and BC1 and BC2 progenies . . . . .	38

d. DNA extraction, Polymerase Chain Reaction(PCR) and electrophoresis . . . . .	39
Section 3. Results and Discussion . . . . .	39
1. Test and selection for bacterial wilt resistance . . . . .	39
a. fusion hybrids and parents . . . . .	39
b. Back cross 1 progenies . . . . .	40
c. Back cross 2 progenies . . . . .	46
2. Morphological characters of fusion hybrids and BC1 and BC2 progenies . . . . .	53
3. Search for resistant marker of RAPD . . . . .	59
References . . . . .	61
 Chapter 3. Glycoalkaloid contents of fusion hybrids and the progenies . . . . .	64
Section 1. Introduction . . . . .	64
Section 2. Materials and Methods . . . . .	66
1. Extraction of glycoalkaloid . . . . .	66
2. Analysis of glycoalkaloid . . . . .	67
Section 3. Results and Discussion . . . . .	69
References . . . . .	70
 Chapter 4. Selection of soft rot resistance and search of RAPD DNA markers related with resistance . . . . .	71
Section 1. Introduction . . . . .	71
Section 2. Materials and Methods . . . . .	73
1. Experiment materials . . . . .	73

a. plant clones	73
b. bacterial isolates	80
2. Experiment methods	80
a. isolation of virulant bacteria	80
b. infection of bacteria on plant leaves	80
c. infection of bacteria on shoots of transplanted plant	81
d. infection of bacteria on tubers	81
e. DNA extraction, Polymerase Chain Reaction(PCR) and electrophoresis	82
Section 3. Results and Discussion	83
1. infection concentration	83
2. result of infection on leaves	83
3. result of infection on shoots of transplanted plants	84
4. result of infection on tubers	85
5. RAPD analysis	86
References	98
Chapter 5. Field resistance for bacterial wilts and agronomic characters of genetic collections	105
Section 1. Introduction	105
Section 2. Materials and Methods	106
1. experiment materials	106
2. experiment methods	106
Section 3. Results and Discussion	107
1. Agronomic plant character and resistance of the fusion hybrid progenies	107

a. agronomic characters . . . . .	107
b. resistance for bacterial disease . . . . .	111
2. agronomic characters of hybrids of haploids and wild species . . . . .	113
3. bacterial wilt resistance of tetraploid genetic collections . . . . .	115
4. bacterial wilt resistance of cultivars . . . . .	117
Reference . . . . .	119
Chapter 6. DNA marker development of bacterial disease resistance . . . . .	123
Section 1. Introduction . . . . .	123
Section 2. Materials and Methods . . . . .	123
1. Preparation of DNA . . . . .	123
2. RAPD analysis . . . . .	125
a. RAPD analysis with URP primers on bacterial wilt resistance . . . . .	125
b. RAPD analysis with SSR targeted primer, and random primers for bacterial wilt and soft rot resistance . . . . .	126
Section Results and Discussion . . . . .	128
1. RAPD results using URP primer for bacterial wilt resistance . . . . .	128
2. Characteristics of plant clones analysed for the DNA markers . . . . .	132
3. polymorphism of DNA marker in analysed plant materials . . . . .	134
4. summary of the results . . . . .	137
Reference . . . . .	138

# 목 차

제 1 장 총 론 . . . . .	23
제 1 절 연구개발의 목적과 범위 . . . . .	24
제 2 절 추진전략 및 방법 . . . . .	26
제 3 절 연구개발 추진체제 . . . . .	27
제 4 절 기대효과 . . . . .	28
제 5 절 활용방안 . . . . .	28
제 6 절 연구개발 성공 시 다음단계 조치사항 . . . . .	29
제 2 장 융합체 자손의 유식물체를 이용한 풋마름병 저항성 선발과 RAPD에 의한 표지 인자 검사 . . . . .	30
제 1 절 서 론 . . . . .	30
제 2 절 재료 및 방법 . . . . .	31
1. 실험재료 . . . . .	31
가. 공시식물 . . . . .	31
나. 세균성 풋마름병 검정시 사용된 균주 . . . . .	34
2. 실험방법 . . . . .	34
가. 식물체의 유지 . . . . .	34
나. 세균성 풋마름병 검정 및 접종 . . . . .	35
1) 병원성 균의 분리와 대량증식 . . . . .	35
2) 접종방법과 균주의 사용 . . . . .	35
다. 식물체들의 형태적 특징 조사 . . . . .	38
라. DNA 추출 및 Polymerase Chain Reaction(PCR), Electrophoresis . . . . .	39
제 3 절 결과 및 고찰 . . . . .	39
1. 세균성 풋마름병에 대한 저항성 검정 . . . . .	39

가. 융합잡종 및 양친 . . . . .	39
나. Back Cross 1 자손 (CT) . . . . .	40
다. Back Cross 2 자손(CT20) . . . . .	46
2. 식물체들의 형태적 특징 . . . . .	53
3. RAPD에 의한 표지 인자 검사 . . . . .	59
참 고 문 헌 . . . . .	61
제 3 장 야생종과 융합체 후대의 glycoalkaloid 함량검사 . . . . .	64
제 1 절 서 론 . . . . .	64
제 2 절 재료 및 방법 . . . . .	66
1. glycoalkaloid 추출 . . . . .	66
2. glycoalkaloid 분별정량 . . . . .	67
제 3 절 결과 및 고찰 . . . . .	69
참 고 문 헌 . . . . .	70
제 4 장 기내 및 재배식물체를 이용한 무름병 저항성 검사와 RAPD에 의한 표지인자 검사 . . . . .	71
제 1 절 서 론 . . . . .	71
제 2 절 재료 및 방법 . . . . .	73
1. 실험 재료 . . . . .	73
가. 공시 식물 . . . . .	73
나. 공시 균주 . . . . .	80
2. 실험 방법 . . . . .	80
가. 세균성 무름병균의 병원성 검정 및 분리 . . . . .	80
나. 식물체 잎을 이용한 세균성 무름병 접종 . . . . .	80
다. 이식된 식물체 shoot의 세균성 무름병 접종 . . . . .	81
라. 피경의 세균성 무름병 접종 . . . . .	81

마. DNA 추출 및 Polymerase Chain Reaction(PCR), Electrophoresis . . . . .	82
제 3 절 결과 및 고찰 . . . . .	83
1. 접종 농도 규명 결과 . . . . .	83
2. 잎의 접종에 의한저항성 검정 결과 . . . . .	83
3. 이식된 식물체 shoot의 저항성 검정 결과 . . . . .	84
4. 괴경에 대한 세균성 저항성 검정 결과 . . . . .	85
5. RAPD 분석 . . . . .	86
참 고 문 헌 . . . . .	98
제 5 장 감자 세균병의 포장저항성 검정 및 농업형질 특성검정 . . . . .	105
제 1 절 서 론 . . . . .	105
제 2 절 재료 및 방법 . . . . .	106
1. 실험재료 . . . . .	106
2. 실험방법 . . . . .	106
제 3 절 결과 및 고찰 . . . . .	107
1. 체세포 중간잡종 후대 식물체의 특성 검정 및 세균병 저항성 검정 . . . . .	107
가. 주요 형질특성 검정 . . . . .	107
나. 세균병 저항성 검정 . . . . .	111
2. 감자 반수체와 야생종의 중간교잡 후대잡종 식물체의 특성검정 . . . . .	113
3. 주요 4배체 유전자원의 세균병(꽃마름병) 저항성 검정 . . . . .	115
4. 주요 장려품종의 세균병 저항성 . . . . .	117
제 4 절 요약 . . . . .	119
참 고 문 헌 . . . . .	121
제 6 장 세균병 저항성 계통의 DNA 표지인자 개발 및 유전분석 . . . . .	123
제 1 절 서 론 . . . . .	123
제 2 절 재료 및 방법 . . . . .	123
1. DNA의 준비 . . . . .	123
2. RAPD 분석 . . . . .	125
가. 꽃마름병 저항성 유전자원의 URP primer를 이용한 RAPD 방법 . . . . .	125
나. 꽃마름병 및 무름병 저항성 유전자원의 다양한 random primer와 SSR targeted primer를 이용한 RAPD 방법 . . . . .	126

제 3 절 결과 및 고찰 . . . . .	128
1. 풋마름병 저항성 유전자원의 URP primer를 이용한 RAPD 결과 . . . . .	128
2. 풋마름병 및 무름병 저항성 유전자 표지인자 개발용 재료와 주요 특징 . . . . .	132
3. 저항성표지탐색용 재료들의 DNA 다형화 탐색 및 계통간 유전적 다양성 분석 . . . . .	134
4. 연구결과 요약 . . . . .	137
가. 세균병 저항성 계통의 DNA표지인자 개발 및 유전분석 . . . . .	137
참 고 문 헌 . . . . .	138

## 제 1 장 서 론

꽃마름병은 세계적으로 감자에 심각한 피해를 주는 토양서 질병으로 *Pseudomonas ralstonia(solanacaerum)*에 의해 유발된다. 한국에서는 최근몇년전부터 중부 이남에 발생하기 시작하여 점점 넓은 지역으로 퍼져나가고 있어 이에 대한 방제가 필요하다.

감자의 무름병(연부병, soft rot)은 감자의 상처를 통해 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*에 의해 유발되는 병으로 현재 한국의 모든 감자 재배지역에 많은 피해를 주고있는 병으로, 재배지가 습할 경우 재배초기에 발병해 수량에 막대한 영향을 줄뿐만 아니라, 감자수확 후 저장 및 수송 중에 많이 발병하여 감자의 상품성을 없애준다. 감자를 일시에 출하하지 않고 저장하여 농민의 수익을 올릴 수 있으나 저장 중 무름병이 발생하는 경우 큰 피해를 입는 경우가 많이 있고, 감자 가공업계에서는 수확된 감자를 저장하며 가공해야하므로 이에 의한 피해도 매우 심한 상태이다. 무름병은 약재처리로 방제 가 어려우므로 이에 대한 저항성 품종이 요구되는 바이다.

저항성을 갖인 야생종을 교배, 혹은 세포융합을 통하여 재배종에 이전시키는 것은 재배종 간의 교배로는 이루어질 수 없는 작물육종에 매우 중요한 역할을 할 수 있다. 야생종을 이용한 저항성 육종에는 먼저 저항성 야생종 clone을 선발하는 것이 중요하다. 또 감자의 야생근연종 중에 유용한 유전자를 갖고 있으나, 재배종인 *S. tuberosum* 과 교배가 어려운 것들이 많으나(Hanneman 1994), 이들은 재배종의 반수체와의 교잡이나 세포융합을 하여 유전자를 도입할 수 있다. 세균성 저항성 야생종 clone 과 재배종과의 교배 혹은 세포융합에 의한 잡종은 저항성유전자의 도입뿐 아니라 최대한의 잡종강세를 유도할 수 있다는 점에서 영양번식 작물인 감자에서는 매우 효율적인 육종 효과를 얻을 수 있다.

아직까지 무름병에 저항성인 품종이 육종되지 못했고 야생종 중에서도 이에 대한 저항성 clone이 보고된 바 없으며 한국에서는 필요함에도 불구하고 이에 대한 저항성

육종이 시도 된 바도 없다. 과거 몇 년간의 연구로 풋마름병에 저항성인 야생종 clone과 재배종 반수체와의 세포융합체와 이들의 1대 교배자손이 획득 되었으며, 이 중 일부 clone은 풋마름병 저항성인 것으로 추정되었으나, 무름병에 대한 실험은 되어 있지 않아 이에 대한 판명도 요구되고 있다.

## 제 1 절 연구개발의 목적과 범위

감자의 근연 야생종에 존재하는 세균병 저항성 특성을 재배종에 도입하기 위한 기반을 확립하기 위하여 본 연구를 수행하였다. 이러한 목적을 이루기 위하여 야생종 중에서 풋마름병과 무름병에 저항성인 clone을 각각 선발하여, 선발된 clone과 재배종간의 잡종을 만드는 것이 우선하여야 하며 다음과같이 이의 목적과 범위를 열거할 수 있다.

### 1. 개발의 목표와 내용

- 가. 감자 무름병과 풋마름병은 세균성으로 약재방제가 어려운 상태이므로 이들의 저항성 품종을 육성하는 것이 궁극의 목표이다.
- 나. 감자 근연야생종들 중에서 풋마름병과 무름병에 각각 저항성인 clone을 선발한다.
- 다. 저항성 유전자를 야생종으로부터 도입한다. : 선발된 야생종 clone과 재배종간의 잡종과 후대자손 중에서 선발하여 수행한다. 품종의 선발도 함께 시도한다.
- 라. 저항성 연관 DNA marker를 찾아내 육종 후대에서는 내병성의 검정 대신 marker인자를 추적하여 선발된 후대 clone만 내병성 검정을 실시하여 포장검사의 간소화를 가져올 수 있다.
- 마. 우수 clone이 선발될 경우 glycoalkaloid 함량을 측정하여 식용으로의 안전성을 확인한다.

## 2. 연차별 연구개발 목표와 내용

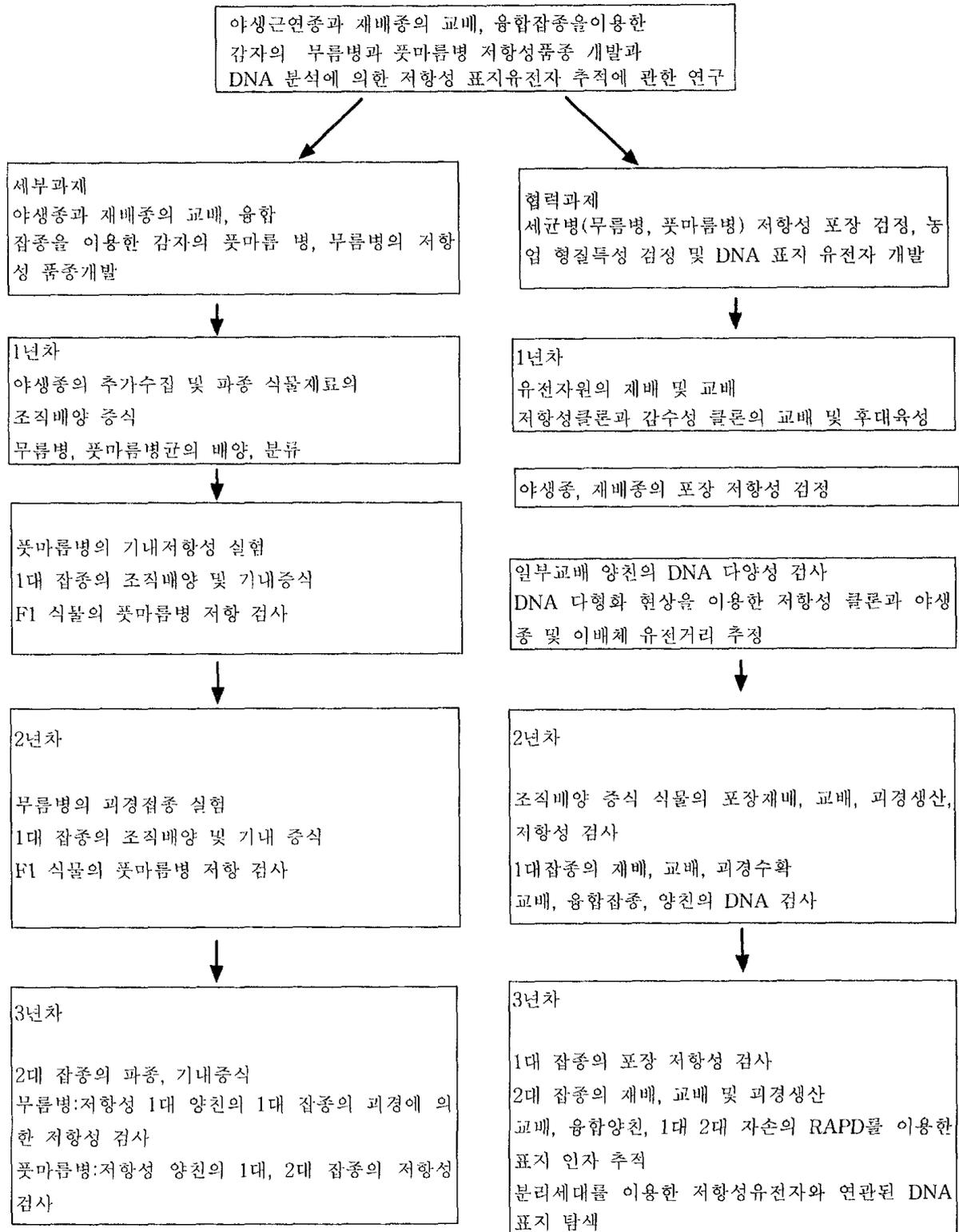
구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (1999)	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 감자 유전자원의 세균병 (무름병, 풋마름병) 저항성 야생종 clone과 야생종·재배종간의 잡종형성과 저항성 선발</li> <li>· polymorph DNA표지 유전자검사</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 유전자원(야생종, 야생종-재배종의 융합체)의 파종 및 기내증식</li> <li>- 무름병 병원균의 기내식물 접종 방법 규명</li> <li>- 무름병의 기내접종결과와 피경실험 결과의 비교</li> <li>- 수집된 야생종, 반수체의 풋마름병 저항성 1차 선발</li> <li>- 수집된 야생종, 반수체의 무름병 저항성 1차선발</li> <li>- 야생종의 추가 수집 및 선발</li> <li>- 융합잡종의 특성검사 및 교배</li> <li>- 저항성 선발된 clone의 기타형질검사</li> <li>- 기내접종에 의한 풋마름병 저항성 clones 선발</li> <li>- 풋마름병저항성 교배양친의 DNA polymorphism, primer 탐색.</li> <li>- 무름병, 풋마름병 병징발현을 위한 온·습도 조절을 할 수 있는 각각의 실험환경의 공간설치 및 검증</li> <li>- Glycoalkaloid 함량검사방법 규명 및 일부 clone의 TGA 검사</li> </ul>
2차 년도 (2000)	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 기내선발된 야생종과 융합체의 내병성 포장검사 및 교배, DNA표지 유전자 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 온·습도 조절실험 환경의 공간에서의 내병성 검정의 신뢰도검사</li> <li>- 선발된 야생종 clone과 재배종, 반수체와의 교배.</li> <li>- 1차 선발된 야생종의 포장 및 온실재배 피경생산</li> <li>- 야생종의 재배종 및 반수체와의 잡종 내병성 검사 및 선발.</li> <li>- 야생종의 피경에 의한 무름병검정</li> <li>- 융합잡종의 1대자손의 저항성 및 형태학적 특성 검정</li> <li>- 1대 자손의 재배종과의 교배.</li> <li>- 선발야생종의 재배종 및 재배종반수체와의 교배.</li> <li>- Glycoalkaloid 함량 검사방법 규명</li> <li>- 교배양친들(무름병 저항성 야생종과 재배종)의 RAPD에 의한 DNA Polymorphic band의 검사</li> <li>- 교배종자의 기내파종과 기내번식</li> <li>- Polymorphic band를 갖는 primer를 이용한 교배종자의 검사 (무름병과 풋마름병)</li> </ul>
3차 년도 (2001)	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 교배잡종의 저항성 안정성 검정 및 교배와 저항성 연관 DNA 추적, Glycoalkaloid 검사</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 교배잡종의 기내 식물 저항성 검정</li> <li>- 교배잡종의 온실재배, 피경형성 유도</li> <li>- 교배잡종의 생육검사, 임성검사에 의한 선발</li> <li>- 교배잡종 피경의 무름병 저항성 검사</li> <li>- 선발된 잡종의 재배종과의 교배에 의한 2대 교배잡종 생산</li> <li>- 2대 교배잡종의 기내파종, 및 clone의 기내번식</li> <li>- 2대 잡종 clone의 기내저항성 실험</li> <li>- 1대 2대 교배잡종과 양친의 RAPD 검사에 의한 저항성 연관 DNA 추적</li> <li>- 같은 계통의 야생종과 융합잡종 및 1대 자손의 저항성 clone들과 가수성 clone들로 bulk segregation analysis를 하여 저항성 관련 유전자 탐색.</li> <li>- 야생종의 재배종 및 반수체와의 잡종의 내병성 및 형태적 특성 검사 및 선발.</li> <li>- 선발 clone의 glycoalkaloid 검사</li> </ul>

## 제 2 절 추진 전략 및 방법

- 본 실험실에 수집된 야생근연종 10종 80 clone들의 무름병 저항성 연구
- 일부 야생종 clone은 풋마름병 저항성 선발이 되었음.
- 새로운 야생종 clone은 USDA Potato Introduction Station에서 종자로분양 받아 사용
- 풋마름병원균, *Pseudomonas ralstonia (solanacearum)*과 무름병원균, *Erwinia caratovora*는 보관중인 것을 사용하며 필요시 추가로 수집할 수도 있다.
- 무름병원균은 국내세균성 전문가와 무름병 저항성 연구로 성과를 보고있는 Wisconsin 대학의 Prof. J.P. Helgeson의 자문과 협력을 받고, 풋마름병에 대해서는 국제감자연구소 의 Dr. E. French의 자문과 협력을 받을 수 있다.

(총괄책임 연구자는 1991년 1년간 미국 Wisconsin 대학 식물병리과에 있으며 풋마름병과 무름병 저항성연구에 대하여 배웠고, 1977년에 국제감자연구소의 Dr. French 의 실험실에서 풋마름병 실험방법에 대하여 추가로 기술을 연마하였다.)

### 제 3절 연구개발 추진체계



## 제 4 절 기대효과

### 1. 기술적 측면

- 가. 유전자원의 이용: 야생종의 유용유전자를 재배종으로 도입하는 발판이 될 수 있다.
- 나. 잡종강세에 의한 직접적인 품종개발의 가능성이 있다.
- 다. 저항성의 DNA 표식인자가 규명되면 저항성 clone 의 선발이 용이해진다.

### 2. 경제 산업적 측면

- 가. 무름병 저항성 유전자가 도입되면 감자의 재배 생산농가가 일시 출하하지 않고 저장하며 수익성이 좋을 때 출하할 수 있어 농가수익을 올릴 수 있다.
- 나. 가공감자는 장기 저장을 하며 이용하므로 저장기간동안의 무름병으로 인한 손실을 줄일 수 있다.

## 제 5 절 활용방안

- 1. 저항성 clone과 표식인자를 이용하여 타품종의 육성에 사용할 수 있다.
- 2. 표식인자는 앞으로 gene cloning을 하여 형질전환 기법으로 이용될 수 있다.
- 3. 앞으로 생물특허를 받을 가능성도 있다.
- 4. 저항성 clone이 규명되고 이의 유용유전자를 재배종에 도입할 수 있다.
- 5. 저항성 유전자의 DNA marker를 찾아낼 수 있다면 앞으로 형질전환방법으로 타 재배종으로의 육종도 가능하다.
- 6. Gene cloning이 된다면 이에 대한 특허도 가능할 수 있다.

## 제 6 절 연구개발사업성공시 다음단계 조치사항

1. 저항성 clone을 다른 재배종과 교배하여 DNA표지인자를 이용하여 저항성 선발을 한다.
2. Gene cloning을 하여 형질전환 재료로 이용하기 위한 연구를 계속한다.

## 제 2 장

### 융합체 자손의 유식물체를 이용한 풋마름병 저항성 선발

### 과 RAPD에 의한 표지인자 검사

#### 제 1 절 서 론

*Ralstonia solanacearum*에 의해 생기는 세균성 풋마름병은 감자를 포함하여 광범위한 기주 범위를 가지는 토양병의 일종으로 열대, 아열대 지방과 온난한 기후 지역에 걸쳐 나타나는 세균병으로 피해가 심각한 것으로 알려져 있다(Hideyoshi Toyoda *et al.*, 1989 ; Kelman, 1953). 발병 초기에는 윗쪽 부분에서 발생하고 차츰 확산되어 발병 후기에는 죽게 된다. 갈색으로 변한 줄기 유관속의 잘단 부위를 관찰 해 보면 희갈색의 점액이 흐르고 이 점액이 점차로 확대되어 괴정부, 눈, 줄기에서도 세균의 누출액이 관찰된다. 지금까지의 방제는 윤작을 통한 방제가 주로 이루어졌으나 병원균의 race가 다양해지므로 방제가 어려운 상태이다. 병은 주로 씨감자로 전파되고 수매 및 뿌리 접촉에 의해서도 전염된다.

재배 감자는 유전 배경이 좁아 내병성, 내충성 등 유용한 유전자를 야생종에서 도입하는 것이 바람직한데 감자의 근연야생종은 감자 품종개량에 유용한 내병성, 내충성의 특성을 가졌으나 *S. tuberosum*과 교배가 어려운 종이 많다(Hegelson *et al.*, 1980).

야생종 *S. commersonii*는 세균성 풋마름병에 저항성을 가지고 있으나 재배종 *S. tuberosum* line과 ecdosperm balance number(EBN)가 달라서 교배가 불가능하다. (Hanneman *et al.*, 1986). 따라서 유용한 유전자를 가진 야생종과 재배종과의 세포융합을 시도하여 내병성, 내충성에 강한 우수개체를 선발하여 유전적 배경이 좁은 재배

종 감자와의 교배를 통해 유용한 형질을 도입하여 잡종강세 육종으로 수확 증대 및 경비 절감 등의 경제적인 기여를 할 수 있다.

본 실험에서는 유용한 형질이 있으나 *S. tuberosum*과 Endosperm balance number(EBN)가 달라 교배가 불가능한 야생근연종 중 *S. commersonii*(P.I. 320266)이 세균성 풋마름병에 강한 계통으로 판별되었으나, 그 중에 저항성인 clone과 감수성인 clone이 함께 존재하고 있다. 그러므로 그 계통에서 저항성인 clone을 선발하여 육종 재료로 이용하는 것이 중요하다. 선발된 저항성 clone과 *S. tuberosum*의 재배 품종 수미 반수체와의 세포 융합체(Kim *et al.*, 1993) 중에서 저항성이 있다고 보여지는 clone(Kim & Chea, 1994)을 재배 품종, 대지, 녹색을 교배시켜 Back Cross1을 얻었고, 이에 다시 재배 품종인 녹색(Nooksac), 대지(Dejima), 남작(Irish cobbler) 등을 교배하여 얻어낸 Back Cross2에 대해 세균성 풋마름병에 대한 저항성을 조사하였다.

그 결과에 따라 앞에서 포장 상태에서의 생육형태를 조사하고 선발된 BC1와 재배 품종들과의 교배를 통해 후대 잡종을 얻어 육종을 계속 시행하는데 쓰일 우수한 개체를 선발하는 데 본 실험의 목적이 있다.

## 제 2 절 실험 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

#### 가. 공시 식물

야생종 *S. commersonii*(P.I. 320266)clone중 세균성 풋마름병에 100% 저항성인 LZ 3.2와 *S. tuberosum* 재배품종 수미의 반수체 clone PT 56사이에서 세포 융합을 하여 얻은 callus로부터 분화된 식물체 체세포 잡종 중 풋마름에 저항성이 있는 것으로 판별된 clone HA 06-1, HA06-4, HA06-9(Hong, 1996)과 재배 품종인 대지와 녹색(Dejima, Nooksac)를 교배하여 나온 BC1 자손을 50여 clone을 얻었다. 그중 저항성이 있는 것으로 판별된 CT02-4, CT08-4, CT10b-4 clone 과 이들과 재배품종인 대지, 녹색, 남작, 수미 등과의 교배에서 얻은 약 50개체의 BC2 자손을 얻을 수 있었다.

본 실험에서 사용된 융합 양친과 체세포 융합체, 체세포 융합체와 재배종을 교배하여 얻은 BC1, BC1과 재배종을 교배하여 얻은 BC2 자손은 Table 1, 2과 같다.

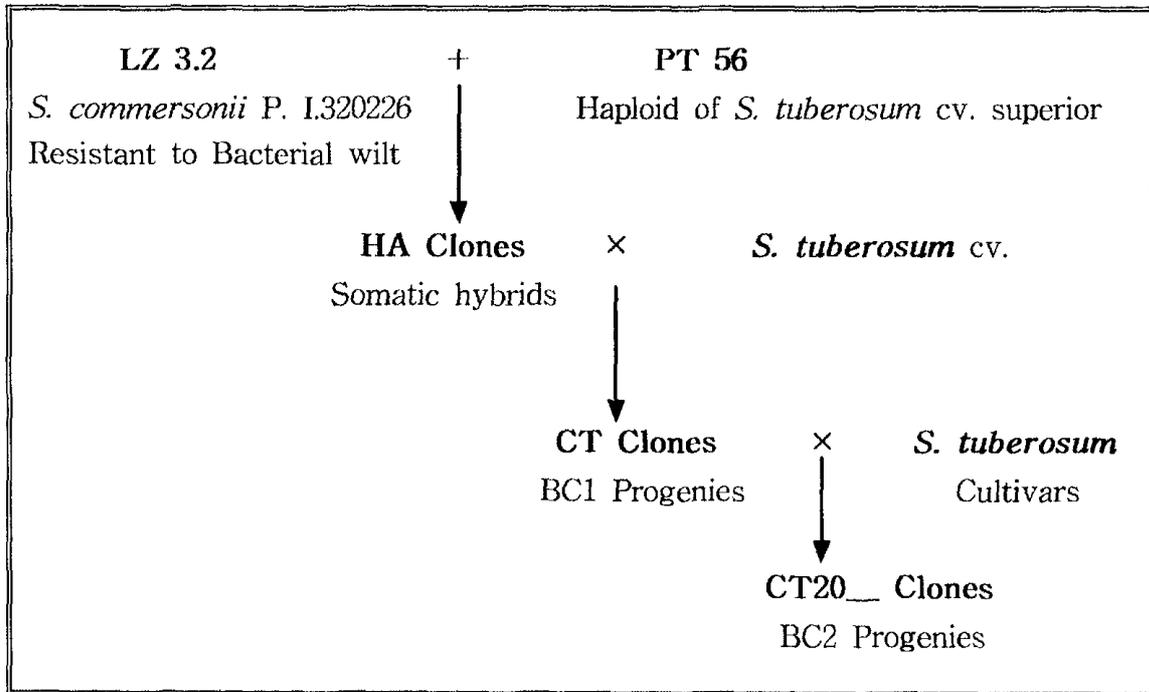


Fig.1 The clone parentage of the fusion parents, the somatic hybrids, the Back Cross 1 progenies and the Back Cross 2 progenies.

**Table 1. List of the parentage and the progenies of the crosses between somatic hybrids and *S.tubersum* cultivars.**

fusion parents		somatic hybrids	fusion parents		somatic hybrids
LZ3.2	PT56	HA06-1	LZ3.2	PT56	HA06-9
LZ3.2	PT56	IHA06-4			
cross parents		Back Cross	cross parents		Back Cross
Female	Male	1 progenies	Female	Male	1 progenies
HA06-1	Dejima	CT01	HA06-2	P85001	CT06
HA06-1	Nooksak	CT02	HA06-2	L83011	CT07
HA06-1	L830	CT03a	HA06-4	L830	CT08
HA06-1	P85017	CT04	HA06-9	L830	CT09a
HA06-2	L830	CT05	HA06-9	Dejima	CT10b

**Table 2. List of the parentage and the progenies of the crosses between resistant Back Cross 1 progenies and *S.tubersum* cultivar.**

cross parents		back cross	cross parents		back cross
Female	Male	1 progenies	Female	Male	1 progenies
HA06-1	nooksak	CT02-4	IHA06-4	L830	CT08-4
IHA06-9	Dejima	CT10b-4			
cross parents		back cross	cross parents		back cross
Female	Male	2 progenies	Female	Male	2 progenies
CT02-4	Irish cobbler	CT201	CT08-4	Dejima	CT204
CT08-4	Nooksak	CT202	CT08-4	Superior	CT205
CT08-4	Irish cobbler	CT203	CT10b-4	Dejima	CT206

## 나. 세균성 풋마름병 검정시 사용된 균주

세균성 풋마름병을 일으키는 *Rlstonia solanacearum*의 병원성 균주 3가지 strain UW8(race1. Costa Rica), UW81(race3. Costa Rica), UW276(race3. Mexico)을 위스콘신 대학교 식물 병리학과 Caitilyn Allen교수께 분양받아 사용하였으며, 한국에서 발생한 R1(1870), R3(2029)을 한국 농업과학 기술원 작물보호부 식물병리과에서 분양 받아 사용하였다.

## 2. 실험 방법

### 가. 식물체의 유지

열매에서 분리해 낸 후 냉장보관 중이던 대상 종자를 열매 당 종자 수를 조사하고 휴면타파를 위해 1,500ppm GA<sub>3</sub>에 1시간 동안 침적한 후 70% 에탄올에 30초간 처리하고 멸균된 증류수로 3회 세척하였다. 이를 시중에서 구입한 락스(시중의 락스액은 4% 이상의 NaOCl로 5%가 되지 않는다) 50% 희석액에 5~7분간 처리 후 멸균된 증류수로 3회 세척한 후 호르몬이 첨가되지 않은 기본 MS 배지(plate)에 종자 10개씩 치상하여 24±2℃, 암상태의 조건에서 발아를 유도하였다. 종자에서 어린 뿌리가 나오면서부터 16시간의 4,000-5,000lux의 광과 8시간의 암 상태의 조건으로 생장을 유도하였다.

발아된 2~3cm의 식물체를 불안정한 세포가 많은 배축과 정단 분열부를 제외하고, 액아를 포함한 건전한 부위만을 절편으로 선택하여 호르몬을 첨가하지 않은 MS 기본 배지(tube)로 계대배양 후 24±2℃, 16시간의 4,000-5,000lux의 광과 8시간의 암 상태 배양 조건하에 기내에서 유지하였다.

접종실험을 위해 기내에서 계대배양 후 약 10일이 지나 뿌리가 3~4cm 정도 자라면 4.5cm×4.5cm×5cm크기의 화분에 이식하였다.

흙은 질석과 상토(상표: 바로커)를 1 : 1 정도의 비율로 조성을 해 주었다.

## 나. 세균성 풋마름병 검정 및 접종

### 1) 병원성 균의 분리와 대량증식

*R. solanacearum*의 2가지 strain race1, race3으로부터 각각의 균을 순수 분리하기 위해 각 stock을 CPG 배지에 도말하여 대량 증식시킨 후, TZC 배지 (멸균된 CPG 배지를 55℃ 정도로 식힌 후 멸균된 2, 3, 5 - triphenyltetrazolium chloride 1% 용액을 4~5ml/L 정도 첨가하여 제조한 배지) (Kelm, 1954)에 도말하여 28 ± 1℃에서 24~36시간 정도 암 배양한 후 colony의 모양과 색으로 병원성 균주를 선별하였다. 병원성 야생형은 불규칙한 모양으로 유동성 또는 점액성이고 중간 부위가 핑크빛을 가진 흰 colony인 반면 일반적인 돌연변이 colony는 둥글고 짙은 붉은색이고 작다(Fig. 2).

병원성 야생형 colony를 CPG 액체 배지에 접종하여 28℃에서 120rpm으로 24~36시간 동안 진탕 배양한 후 spectrophotometer를 사용하여 600nm의 흡광도에서  $1 \times 10^8$  cells/ml이 되도록 현탁액을 제조하였다(Pham X. Tung., 1992).

### 2) 접종방법과 균주의 사용

체세포잡종과 재배종과의 교배로 얻은 BC1 자손의 접종은 미국 위스콘신 대학교 식물 병리학과에서 분양 받아 증식한 UW8(race1. Costa Rica), UW81(race3. Costa Rica), UW276(race3. Mexico)  $1 \times 10^8$  cells/ml의 현탁액을 각각 15ml씩 가위로 기내에서 유지되고있는 식물체들의 잎을 잘라 접종하였다(1999).

BC2 자손은 2000년, 2001년에 국내에서 풋마름병이 발생한 포장(1998, 제주도)에서 분리한 균을 농업과학기술원 식물병리과에서 분양 받아 검정에 사용하였다.

먼저 2000년에 race 1(1870)을 이용하여 기내에서 이식한 후 약 10일에서 12일이 지난 후  $1 \times 10^8$  cells/ml 농도의 균 현탁액을 화분 당 1ml씩 토양에 관주하였다. (L.T.Laferriere, J. P. Helgeson, C. Allen, Theor Appl Genet (1999) 98:1272~1278).

2001년에는 race 3(2029)를 이용하여 race 1과 동일한 상태의 식물체에  $1 \times 10^8$  cells/ml로 희석한 균 현탁액에 식물의 뿌리를 30분간 침지 시킨 후 화분에 옮겨 심었다.

접종 후  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  온도하에서 16시간의 4000~5000 Lux의 광과 8시간 암 상태 주기 조건과 습도는 85%로 유지한 후 15~22일이 경과한 다음 시들음 현상을 관찰하였다.

시들음의 증상을 0부터 4까지 5등급을 정하여 저항성 clones과 감수성 clones를 선발하였다. clone당 5개체씩 3회 접종하였다. UW 균주를 사용한 BC 1자손은 시들음 정도를 %로 조사하였고, 국내발생 균주를 이용한 BC 2자손의 검정에서는 시들음 정도(%)를 단계로 나누고, 각 처리구 단계의 평균을 구하여 저항성과 감수성을 선발하였다. 시들음 정도는 0단계: 잎이 전혀 시들지 않은 것, 1단계: 25% 시든 것, 2단계: 26%~50% 시든 것, 3단계: 51%~75% 시든 것, 4단계: 76%~100% 시든 것의 5단계로 나누고, 저항성과 감수성을 선발은 1) HR: 0~0.5 wilting degree, 2) R:0.6~1.0 wilting degree, 3) I: 1.1~1.5 wilting degree, 4) S: 1.6~2.0 wilting degree, 5) HS: 2.1~ wilting degree의 5단계로 하였다.

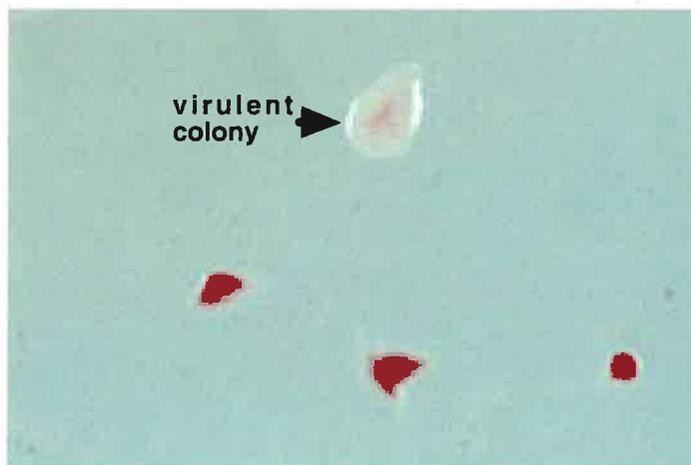
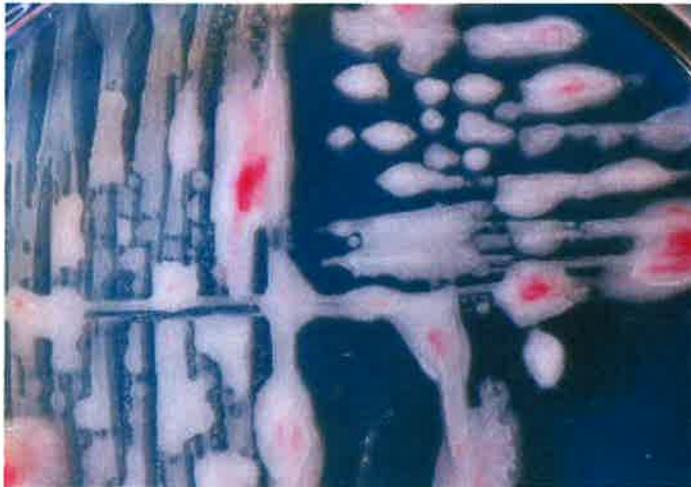


Fig.2 Selection of virulent colony in TZC plate media with *Ralstonia solanacearum*.

## 다. 식물체들의 형태적 특징 조사

1999년에 융합잡종, BC1 자손과 2000년에는 BC2 자손을 기내에서 유지되고 있는 상태에서 2주 동안 순화처리 시킨 후 9 inch 화분에 정식하여 온실 재배를 하고 Descriptors for the Cultivated Potato (Huaman , I. *et al.*, 1977)를 참고하여 조사할 특성의 항목들을 선정한 다음 일정 시기별로 생장 습성 및 잎의 특성, 줄기의 특성과 꽃의 특성들을 조사하였다.

생장습성은 초장 초형을 조사하였고 정식 후 30일과 40일, 60일 80일 4회에 걸쳐 초장은 화분의 바닥에서 잎의 끝 부분까지, 초형은 정식 후 40일에 직립 한 것, 비스듬히 직립 한 것, 가는 줄기로 끝은 위를 향한 것, 포복성의 기는줄기, 잎의 반정도가 줄기의 밑 부분에 둘러나 있는 것, 거의 대부분의 잎들이 줄기의 밑 부분에 둘러난 것으로 나뉘 차례로 일련번호를 주어 분류하였다.

잎의 특성으로는 엽형을 조사하였고 정식 후 40일에 잎의 분화된 등급에 따라 종엽과 1차 측엽이 분화되지 않은 것부터 2차 간엽을 포함하여 매우 심하게 분화되어 있는 것으로 7개의 등급을 매겨 조사하였다.

줄기의 색깔은 정식 후 60일에 줄기에 녹색과 보라색의 분포에 따라 4등급으로 나누어 조사하였다.

꽃의 특성은 정식 후 50일경부터 시작하여 개화시기에 따라 화색, 화색 중 2차 색의 분포, 화관의 형태, 개화도, 화총당 개화수 등을 조사하였으며 이중 화관의 형태는 둥근형부터 5각형을 한 것, 별 모양을 한 것을 기준으로 하여 5개의 등급으로 나누어 분류하였고 개화도는 반개 시에 bud가 없는 것, bud가 탈락되는 것, 드물게 개화하는 것, 중간정도의 개화를 보이는 것, 많이 개화하는 것의 5가지 등급으로 나누어 분류하였으며 화총당 개화 수는 1개, 2~5개, 20개미만, 20개 이상의 4등급으로 나누어 분류

하였다.

## 라. DNA 추출 및 Polymerase Chain Reaction(PCR), Electrophoresis

본 실험에서는 Isabel 등(1993)의 방법을 변형하여 사용하여 DNA를 추출하였다 (Mejjed et al., 1994, James et al., 1992).

UNO II Thermocycler(Biometra, Germany)를 이용하여 Yang 등(1997)의 방법을 사용하였다.

수평 전기이동 장치(Owl's standard, OWL Scientific)를 이용하여 Hosaka 등(1994)의 방법으로 전기영동 하였다.

DNA marker로는 pGEM<sup>®</sup>DNA(Promega, USA)를 사용하였고, UV illuminator(Vilber Loumat, France)로 band를 확인하고, Polaroid camera(Film 667)을 이용하여 촬영하였다.

## 제 3 절 결과 및 고찰

### 1. 세균성 풋마름병에 대한 저항성 검정

융합 양친과 체세포 잡종(HA), 재배종 대지와 녹색, 그리고 BC1자손(CT), BC2 총 100여 clone을 대상으로 한 세균성 풋마름병 저항성 검정을 수행하였으며 결과는 Table 3, Table 5에 나타난 바와 같다.

#### 가. 융합 양친 및 자손

융합 양친 중 야생종인 LZ 3.2는 평균 14.15%의 시들음(wilting) 증상을 보여 높

은 저항성을 나타냈으며, 재배 품종 수미의 반수체인 PT 56은 평균 86.7%의 시들음 증상을 보여 큰 감수성이 있는 것으로 조사되었다.

야생종중 LZ 3.1 과 LZ 3.5는 LZ 3.2와 같은 계통의 *S. commersonii*(P.I. 320266)이지만 각각 평균 63.5%와 64.2%의 시들음 증상을 보여 감수성이 있는 것으로 나타난 반면, *S. commersonii* (P.I. 320266) LZ 3.4는 평균 15.9%의 증상을 나타내 높은 저항성이 있음을 나타내었다(Fig.3).

체세포 융합잡종 HA계통 중 HA06-1과 HA06-9는 각각 평균 16.7%와 12.2%의 시들음 증상이 나타나 높은 저항성을 나타내었는데, 이중 HA06-9는 융합양친인 LZ 3.2보다도 높은 저항성을 나타내었다. 또한 HA06-2는 평균 25.7%의 시들음 증상을 나타내 저항성을 갖는 것으로 조사되었고, HA06-4는 49.2%의 부분적 저항성(=부분적 감수성)을 보였다.

체세포 잡종과의 교배에 이용된 재배종 대지는 평균 97.5%의 시들음 증상을 보여 큰 감수성을 나타냈으며, 녹색은 평균 72.5%의 시들음 증상을 나타내 감수성이 있는 것으로 조사되었다(Fig. 3).

#### 나. Back Cross1 자손 (CT)

UW8, UW81, UW276의 혼합액으로 BC 1자손에 접종하였다.(1999) 접종한 결과는 Table 3과 같으며 특이할 것은 CT08-4, CT02-4, CT08-3, CT10b-4 네 clone은 각각 평균 10.0%, 12.5%, 16.7%, 18.7%의 시들음 증상이 나타나 높은 저항성이 있는 것으로 조사된 반면, CT02-2는 80.9%의 시들음 증상을 나타내 높은 감수성이 있는 것으로 조사되었다.

HA06-1을 자방친으로한 CT01, CT02, CT03 계통에서는 감수성부터 저항성까지 자손들간에 차이가 있었고, 특히 CT02-4가 저항성이 강했다(Fig.4)..

저항성 융합잡종HA06-1을 화분친으로한 자손 CT04 계통의 시들음이 43.8%~70.9%로 부분감수성 내지 감수성이었고 저항성자손은 없었다.

HA06-2를 자방친으로 대지 line L830을 화분친으로 교배하여 얻은 CT05 계통에서는 약간의 저항성이 있는 것으로 조사되었으나, HA06-2를 화분친으로 교배하여 얻은 CT06과 CT07 계통에서는 한 clone만이 약간의 저항성이었고 나머지 4 clone은 모두 감수성이었다.

HA06-4을 자방친으로한 CT08 계통에서는 4 clone이 모두 저항성 내지 고도의 저항성을 나타내었다.

HA06-9를 자방친으로 대지 line L830 과 대지를 화분친으로 교배하여 얻은 CT09 계통과 CT10 계통에서도 높은 저항성 내지 감수성으로 자손의 저항성이 다양하였으며, 특히 CT10b-4는 고도의 저항성을 보였다.(Fig. 5)

높은 저항성을 가진 clone과 큰 감수성을 가진 clone 모두가 나타난 CT02계통과 가장 높은 저항성을 보인 CT08 계통과 CT10계통의 한 clone씩을 재배종과 교배하여 BC2 세대를 얻었다.

저항성인 융합체(HA06-1, HA06-2)의 자손임에도 불구하고 주로 부분 내지 큰 감수성인 교배조합(CT03, CT07)이 있는 반면, 융합체는 부분감수성(HA06-4)이었으나 그 자손은 주로 저항성(CT08)인 교배 조합도 있었다. 이는 야생종의 유전자와 재배종 유전자간의 상호작용에 의해 유전자의 표현이 차폐되었기 때문으로 추정할 수도 있으나 저항성 자손을 선발하기 위해서는 1대, 2대 자손까지 교배하여 선발할 필요가 있다고 본다.

고도의 저항성을 보인 BC1 자손들은 저항성 유전자가 전이된 것이라고 보여지며 감수성을 보인 BC1 자손은 세포 분열시 저항성 유전자가 위치한 일부 염색체의 탈락으로 저항성이 표현되지 못하였거나, 부분적인 감수성이 나타났을 수도 있다.

BC1 자손 CT clone들을 교배양친별로 구분하여 보면(Table 4), CT08 계통이 평균 23.3%의 시들음 증상을 나타내 가장 저항성이 높았다. 저항성이 있다고 판단된 HA clone을 자방친으로 교배하였을 때가 재배종을 자방친으로 하고 HAclone을 화분친으로

로 교배했을 때 보다 저항성이 더 큰 것으로 나타나 저항성 인자를 가진 식물체가 자방친으로 작용할 때가 저항성 형질 발현에 더 우세하게 나타난다고 생각되어진다. 자손들의 다양한 저항성은 그들 부모에 의하여 좌우되고 조합 능력(combining ability)이 저항성 표현에 원인이 된다고 생각되어진다.

Watanabe 등 (1992)은 저항성 계통과 감수성 계통간의 상호 교배를 했을 때 각기 다양한 저항성이 보여지는데 이는 화분친의 인자형에 대한 자방친의 상호작용과 조합 능력의 차이에 따른 것이라고 보고하였다. Tung (1992)은 4배체 감자간의 교배에서 나온 BC1자손의 풋마름병 저항성에 대해 상당한 유전적 다양성이 존재하며 감자의 세균성 풋마름병 저항성은 부분적으로 우성 형질이기 때문에 유전자간의 상호 작용이 매우 중요하다고 보고하였으며, Schmiediche 등 (1983)은 *S. phureja*를 세균성 풋마름병 저항성이 보이지 않는 재배종과 교배하여 세균성 풋마름병을 감소시켰다고 보고하였다.

BC1 자손들의 다양한 저항성 또는 감수성이 나타나는 것으로 볼 때 이는 유전자의 표현은 여러 유전자가 관련되어 표현되는 복잡한 기작을 가졌을 것이라 생각되며 이들을 재배종과의 교배에 이용하여 육종을 계속 수행하면 우수한 개체를 선발할 수 있을 것으로 생각된다.

**Table 3. Percent of wilted plants of Fusion parents Somatic hybrids, Cultivar (Dejima, Nooksak) and BC1 progenies 15 days after inoculation with *R. solanacearum* mixed UW8, UW81, UW276 *in vitro* conditions**

Clone	% of wilting	DR*	Clone	% of wilting	DR*
LZ 3.1	63.5±5.0	S	CT04-4	43.8±8.8	I
LZ 3.2	14.2±1.2	HR	CT05-1	22.1±7.6	R
LZ 3.4	15.9±1.2	HR	CT05-2	38.4±2.3	R
LZ 3.5	64.2±1.2	S	CT05-3	48.8±1.8	I
PT 56	86.7±4.7	HS	CT05-4	55.0±7.1	I
HA06-1	16.7±4.7	HR	CT05-5	27.5±10.6	R
HA06-2	25.7±6.1	R	CT06-1	34.2±13.0	R
HA06-4	49.2±8.3	I	CT07-1	50.5±24.1	I
HA06-9	12.2±3.5	HR	CT07-2	60.4±10.0	S
Dejima	97.5±3.5	HS	CT07-3	60.9±20.0	S
Nooksak	72.5±10.6	S	CT07-4	66.3±8.8	S
CT01-1	36.7±4.7	R	CT08-1	37.9±7.6	R
CT01-2	24.6±17.1	R	CT08-2	28.8±1.8	R
CT01-3	47.5±17.7	I	CT08-3	16.7±9.4	HR
CT01-4	38.4±16.5	R	CT08-4	10.0±0.0	HR
CT02-1	25.4±17.1	R	CT09a-1	38.8±1.8	R
CT02-2	80.9±5.9	HS	CT09a-2	30.9±5.9	R
CT02-3	56.7±18.9	I	CT09a-3	45.9±1.2	I
CT02-4	12.5±3.5	HR	CT09a-4	39.2±20.1	R
CT03a-1	50.0±14.1	I	CT09b-1	20.9±2.3	R
CT03a-2	49.6±4.1	I	CT09b-2	39.6±10.0	R
CT03a-3	40.9±5.9	I	CT09b-4	26.7±9.5	R
CT03b-1	49.2±22.4	I	CT10a-1	66.5±9.4	S
CT03b-2	37.1±0.6	R	CT10b-1	44.2±12.9	I
CT03b-3	65.4±5.3	S	CT10b-2	57.5±10.6	I
CT04-1	63.8±5.3	S	CT10b-4	18.7±3.2	HR
CT04-2	57.1±14.7	I	CT10c-3	40.0±14.1	R
CT04-3	70.9±5.9	S			

\*Note : In a column, values followed by a common letter are not significantly different at P = 0.05 by Duncan's multiple range test

\*DR : Disease Reaction

- 1) HR : Highly Resistant(0~20.0% of wilting)
- 2) R : Resistant (20.1~40.0% of wilting)
- 3) I : Intermediate(40.1~60.0% of wilting)
- 4) S : Susceptible(60.1~80.0% of wilting)
- 5) HS : Highly Susceptible(80.1~100.0% of wilting)

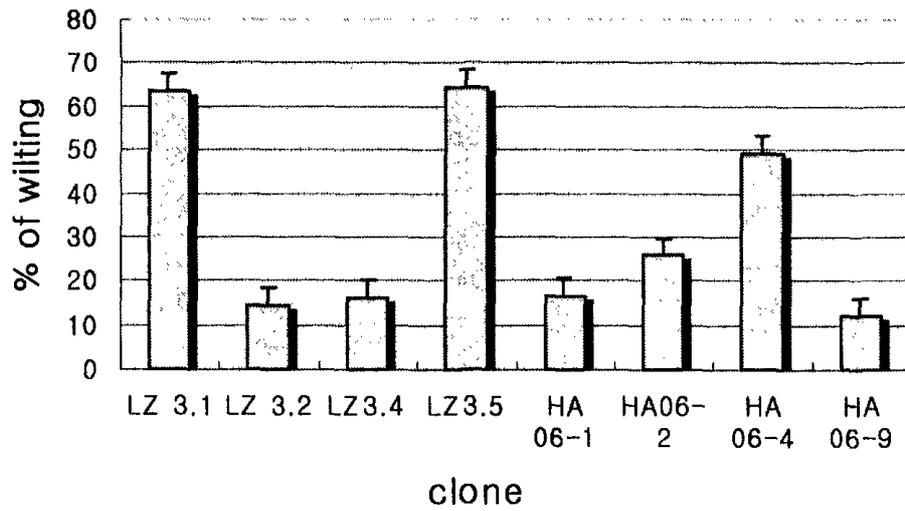


Fig. 3. Percentage of wilting in *S. commersonii*, somatic hybrids 15 days after inoculation with *Ralstonia solanacearum* mixed UW8(race 1), UW81(race 3), UW276(race 3).

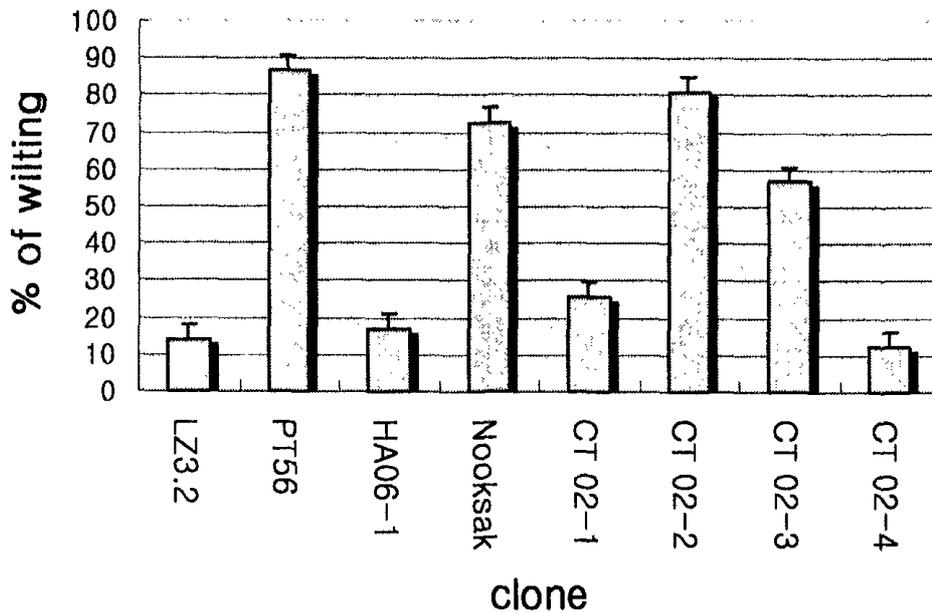


Fig. 4. Percentage of wilting in BC1 progenies CT 02 Clones (HA 06-1 × Nooksak) 15 days after inoculation with *Ralstonia solanacearum* mixed UW8(race 1), UW81(race 3), UW276(race 3).

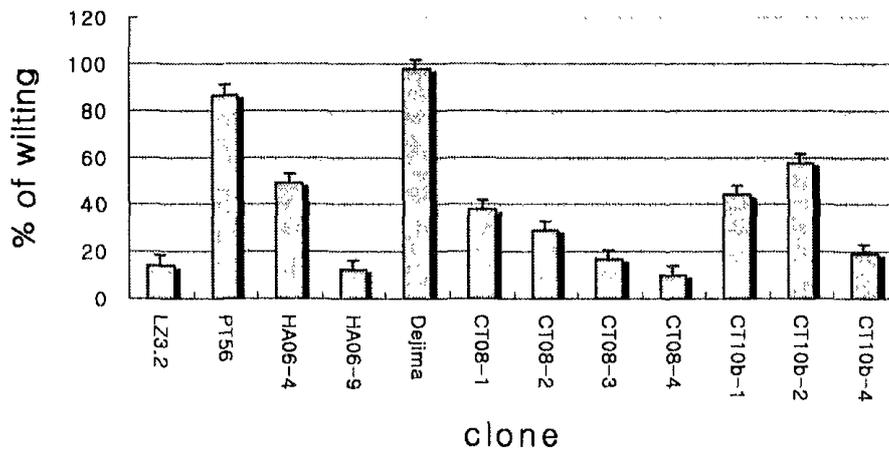


Fig. 5. Percentage of wilting in BC1 progenies CT 08 clones(HA 06-4×L830), CT10b clones(HA06-9×Dejima) 15 days after inoculation with *Ralstonia solanacearum* mixed UW8(race 1), UW81(race 3), UW276 (race 3).

Table 4. Group average for wilting(%) of 7 groups of BC1 progenies, differing in level Bacterial Wilt resistance, after inoculation with of *Ralstonia solanacearum* mixed UW8(race 1), UW81(race 3), UW276 (race 3).

Group	Cross Parents		range of wilting
	Female	Male	
(CT01)	HA06-1	Dejima	24.6% ~ 65.4%
(CT03)	HA06-1	L830	
(CT02)	HA06-1	Nooksak	12.5% ~ 80.9%
(CT04)	P85017	HA06-1	43.8% ~ 70.9%
(CT05)	HA06-2	L830	22.1% ~ 55.0%
(CT07)	L83011	HA06-2	50.5% ~ 66.3%
(CT08)	HA06-4	L830	10.0% ~ 37.9%
(CT09)	HA06-9	L830	18.7% ~ 66.5%
(CT10)	HA06-9	Dejima	

## 다. Back Cross 2 자손

제주도에서 분리한 근주 race 1(1870), race(2029)를 이용하여 race 1은 2000년에 화분에 이식하여 유식물체 상태의 토양에 균 현탁액을 관주하여 검정을 시행하였고, race 3은 2001년에 race 1과 동일한 상태에서 식물체를 균 현탁액에 침지하여 검정하였다.

야생종 *S. commersonii*(P.I. 320266)의 경우 race1/race3에서 LZ3.2는 시들음 정도가 0.4/0.3으로 강한 저항성을 나타내었고, 같은 계통인 LZ 3.1과 LZ 3.5는 감수성으로 나타났다.

한편, BC1을 위해 재배종과의 교배에 쓰인 체세포 잡종들의 경우 HA06-1은 0.7/3.8, HA06-4은 0.6/3.2로 race1에서는 비교적 저항성을 나타냈지만, race3에 대해서는 큰 감수성을 지닌 것으로 나타났다. 그리고 HA06-9는 0.9/0.2로 race1보다는 오히려 race3에 더 강한 저항성을 나타내었다.

BC2자손의 검정 결과는 BC1 세대에서 저항성으로 판별된 clone 중 생육상태가 양호한 CT08-4와 대지, CT10b-4 와 대지의 교배에서 나온 CT 204계열과 CT206계열에 중점을 두어 선별하였다.

CT02-4은 시들음정도가 0.8/1.2로 나왔으나, CT08-4는 둘 다 0.4로 강한 저항성을 보였으며, CT10b-4도 0.5/0.3으로 강한 저항성을 보였고, 교배에 화분친으로 이용된 대지는 2.3/4.0로 감수성이 큰 것으로 나타났다. BC2세대의 양친 이들 중에서 CT08-4 와 CT10b-4는 race3에 대해서도 여전히 강한 저항성을 보였고, 생육 상태도 양호하여 교배에 쓰일 우수한 개체로 선발되었다. 그리고 대지는 race3에 대해 접종 후 하루가 지나자 병징이 관찰되었고, 급격하게 시들음 증상이 진행되었다.

BC2 세대의 경우 대체적으로 race1과 race3에 대해 각 계열마다 저항성 정도의 차이가 있었다. CT204계열의 경우 race1에 대해서 저항성과 감수성의 비율이 비슷했지만 race3에서는 4개의 clone이 저항성을 나타내었다. CT204-3과 CT204-10의

경우 0.7/0.5와 0.7/1.0로 저항성을 나타내었다. 그리고 CT204계열은 대체적으로 생육상태가 양호하였으며, 특히 CT204-3는 race3에서 강한 저항성을 갖는 것으로 보아 우수한 개체로 선발하였다.

BC1 자손 중 CT10b-4와 대지의 교배로 나온 CT206계열은 CT10b-4와 비슷하게 생육상태가 양호하게 나왔다. CT206-9와 CT206-10 은 시들음 정도가 0.8 / 0.4, 0.4/0.1로 강한 저항성을 보여 우수 개체로 선발되었다. 그리고 CT206-6과 CT 206-14도 비교적 저항성인 것으로 보아 육종에 이용하기 위한 좋은 개체로 판단된다. race1은 33 clone중 14clone이 저항성을 보였고, race3는 34 clone중 6 clone만이 저항성을 나타내었다. 대체적으로 race3에 대한 감수성이 높은 것으로 나타났다.

**Table. 5. Wilting Degree of Fusion parents, Somatic hybrids, Cultivar(Dejima,Nooksak) and BC1, BC2 progenies 15~22 days after inoculation with *R. solanacearum* race 1(1870) and race 3(2029) under plantlet conditions.**

Clone	race 1		race 3		Clone	race 1		race 3	
	Wilting Degree	DR*	Wilting Degree	DR*		Wilting Degree	DR*	Wilting Degree	DR*
LZ 3.1	-	-	4.0	HS	CT206-6	1.0	R	1.0	R
LZ 3.2	0.4	HR	0.3	HR	CT206-7	1.1	I	4.0	HS
LZ 3.5	-	-	4.0	HS	CT206-8	1.6	S	4.0	HS
PT 56	2.7	HS	4.0	HS	CT206-9	0.8	R	0.4	HR
HA06-1	0.7	R	3.8	HS	CT206-10	0.4	HR	0.1	HR
HA06-4	0.6	R	3.2	HS	CT206-11	0.8	R	3.6	HS
HA06-9	0.9	R	0.2	HR	CT206-12	0.7	R	4.0	HS
Dejima	2.3	HS	4.0	HS	CT206-13	1.2	I	4.0	HS
Nooksak	2.1	HS	4.0	HS	CT206-14	1.0	R	0.6	R
CT02-4	0.8	R	1.2	I	CT206-15	1.2	I	0.6	R
CT08-4	0.4	HR	0.4	HR	CT206-16	0.9	R	3.7	HS
CT10b-4	0.5	HR	0.3	HR	CT206-17	1.8	S	4.0	HS
CT204-1	0.9	R	4.0	HS	CT206-18	1.3	I	4.0	HS
CT204-2	1.4	I	4.0	HS	CT206-19	1.6	S	4.0	HS
CT204-3	0.7	R	0.5	HR	CT206-20	0.7	R	4.0	HS
CT204-4	1.0	R	2.0	S	CT206-21	1.1	I	3.0	HS
CT204-5	1.0	R	1.0	R	CT206-22	1.7	S	4.0	HS
CT204-6	1.3	I	4.0	HS	CT206-23	1.6	S	4.0	HS
CT204-7	1.8	S	4.0	HS	CT206-24	0.9	R	4.0	HS
CT204-8	0.9	R	1.2	I	CT206-25	0.8	R	3.8	HS
CT204-9	1.2	I	1.0	R	CT206-26	1.5	I	4.0	HS
CT204-10	0.7	R	1.0	R	CT206-28	-	-	4.0	HS
CT204-11	1.2	I	4.0	HS	CT206-29	0.9	R	4.0	HS
CT206-1	1.1	I	4.0	HS	CT206-31	0.9	R	4.0	HS
CT206-2	1.3	I	0.8	R	CT206-32	1.3	I	4.0	HS
CT206-3	1.5	I	4.0	HS	CT206-33	1.1	I	4.0	HS
CT206-4	1.0	R	4.0	HS	CT206-34	1.3	I	4.0	HS
CT206-5	0.6	R	3.5	HS	CT206-36	1.4	I	4.0	HS

\*Note : Plant disease was scored using a standard five-point scale (L.T.Laferriere  
J. P. Helgeson, C. allen; 1999)

\* Wilting degree

- 1) 0 : no wilted leaves
- 2) 1 : up to 25% wilted
- 3) 2 : 26 % to 50 % wilted
- 4) 3 : 51 % to 75 % wilted
- 5) 4 : 76% to 100% wilted

\* DR - Disease reaction

- 1) HR : 0 to 0.5 Wilting Degree
- 2) R : 0.6 to 1.0 wilting degree
- 3) I : 1.1 to 1.5 wilting degree
- 4) S : 1.6 to 2.0 wilting degree
- 5) HS : over 2.1 wilting degree

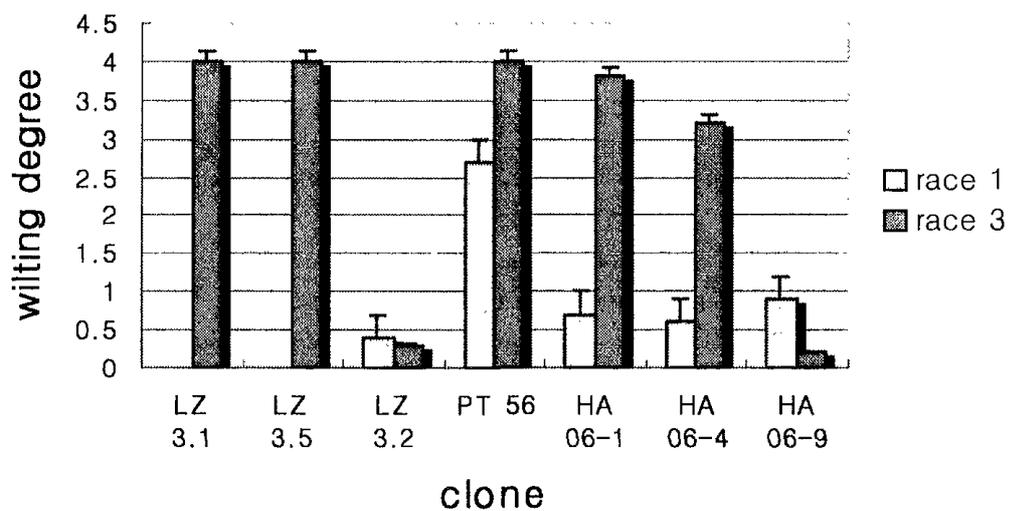


Fig. 6. Wilting degree in *S. commersonii* and fusion parents, somatic hybrids 15 days after inoculation *Ralstonia solanacearum* race 1(1870) and race 3(2029) under plantlet conditions.

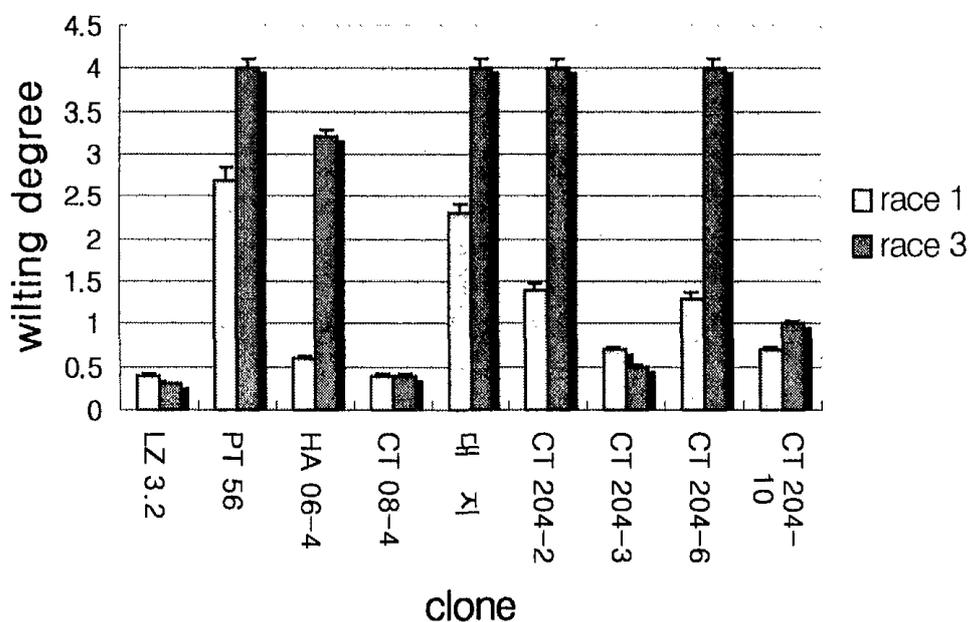


Fig. 7. Wilting degree in BC2 progenies CT204 clones(CT 08-4× Dejima), 15 days after inoculation with *Ralstonia solanacearum* race 1(1870) and race 3(2029) under plantlet conditions.

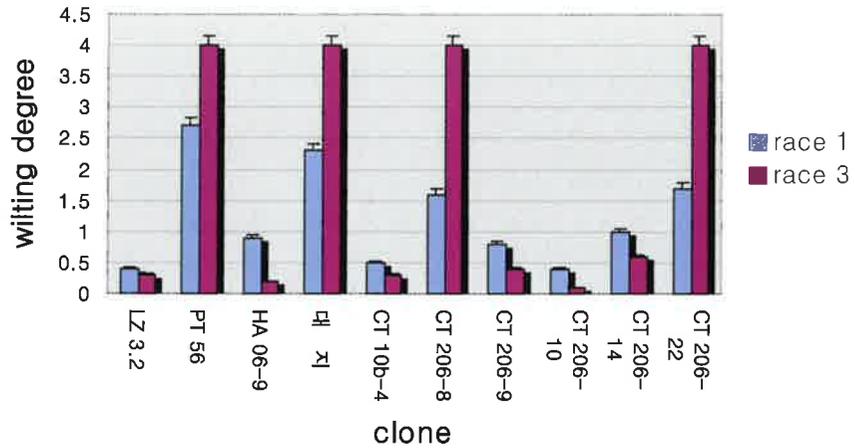


Fig. 8. Wilting degree in BC2 progenies CT206 Clones (CT10b-4 × Dejima) 15 days after inoculation with *Ralstonia solanacearum* race 1(1870) and race 3(2029) under plantlet conditions.



Fig. 9. Wilting degree in cross parents BC2 progenies CT204 clones(CT 08-4×Dejima), 15 days after inoculation with *Ralstonia solanacearum* race 1(1870) and race 3(2029) under plantlet conditions.

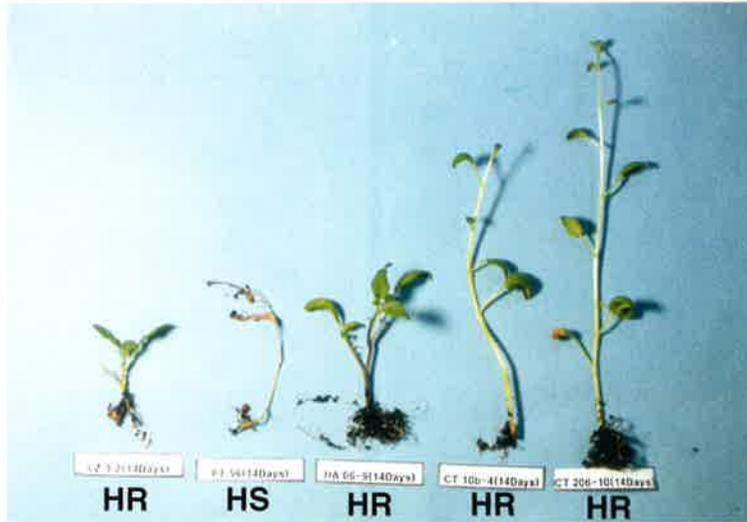


Fig. 10. Wilting degree in cross parents BC2 progenies CT206 clones (CT10b-4×Dejima), 15 days after inoculation with *Ralstonia solanacearum* race 1(1870) and race 3(2029) under plantlet conditions.

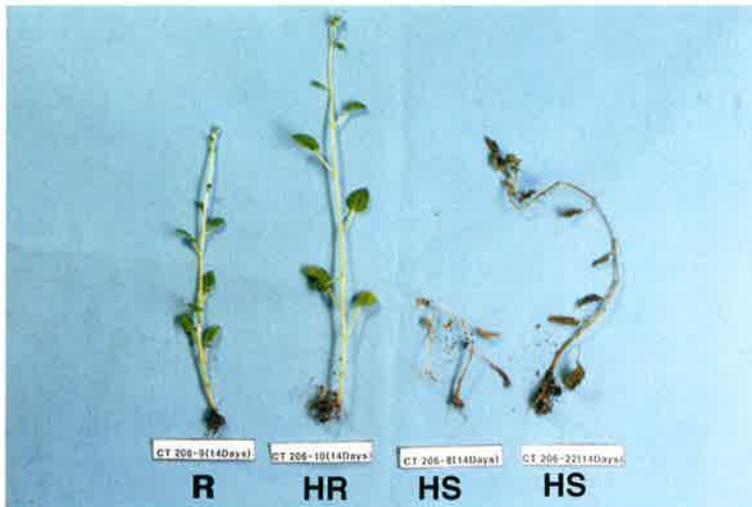


Fig. 10-1. Wilting degree in BC2 progenies CT206 clones (CT10b-4×Dejima), 15 days after inoculation with *Ralstonia solanacearum* race 1(1870) and race 3(2029) under plantlet conditions.

## 2. 식물체들의 형태적 특징

BC1, BC2 progenies 의 형태는 기내에서 화분에 이식하여 온실에서 재배하였으며 1999년, 2000년, 4월~7월 2년에 걸쳐 조사했으며, 생육기간 120일로 장마전에 피경을 수확하였다.

선발된 17개 CT clones들의 생장을 조사한 결과 1대 잡종 대부분이 건강한 상태로 정상적인 성장을 나타내었다. 총 생육일 수 40일에서는 비슷한 생장을 보였으나 총 생육일 수 80일에서는 비정상적인 생장을 나타낸 clones들이 조사되었다.

또한 초형은 직립 하거나, 비스듬히 직립하는 것, 또는 기는줄기로 끝은 위를 향하는 것의 3가지 형태로 나누어졌다.

융합 양친인 LZ 3.2(P.I.320226)는 약간의 방사형으로 배열되는 형태였고, PT 56 기는줄기로 끝은 위를 향하는 것으로 조사되었으며, 체세포 잡종인 HA clones 또한 기는줄기로 끝은 위를 향하는 것으로 조사되었다.

LZ 3.2의 엽형은 종엽과 1차엽으로 분화된 형태(scarcely dissected)로 나타났으며, PT 56의 엽형은 분화되지 않은 형(undissected)으로 조사되었으며 체세포 잡종인 HA06 clones은 LZ 3.2와 비슷하여 종엽과 1차엽으로 분화된 형으로 조사되었다.

BC1 자손 중 선발된 CT clones의 엽형은 종엽과 1차엽으로 분화된 형태(scarcely dissected)와 종엽 및 1차엽과 약간의 2차 간엽을 가진 형태(weakly dissected)로 나타났다.

선발된 17개 CT clones을 총 생육일 수 60일에 줄기의 색깔을 조사한 결과 저항성이 있는 것으로 조사된 clones의 경우는 녹색(Green)이거나 녹색에 약간의 보라색이 있는 것(Green with some purple)으로 조사되었으며 감수성이 있는 것으로 조사된 clones의 경우는 보라색(purple)이거나 보라색에 약간의 녹색이 있는 것(Purple with some green)으로 조사되었다.

야생종 양친과 체세포 잡종에서는 개화를 많이 하였으나 반수체 양친은 개화되지 않았다. 선발된 17개 CT clones 중 개화된 clones의 1차 화색은 흰색이였으며 2차 화색은 각 clone마다 흰색, 옅은 자주색, 자주색을 나타내었다. 융합 양친 야생종 LZ 3.2와 체세포 잡종 또한 1차 화색이 흰색 이였으며, 2차 화색은 옅은 자주색과 자주색을 띄었다.

화관의 형태의 경우 체세포 잡종 HA들은 융합 양친보다 5각형에 가까운 별 모양 이였고 선발된 대부분 CT들은 별 모양 이였으며, CT02-3은 5각형 모양 이였다.

CT07-4는 꽃잎이 두 겹으로 되어 있는 겹꽃(double)으로 바퀴 모양에 가까운 5각형 모양 이였다. 이는 유전적 변이성이 다양한 체세포 잡종과 교배했기 때문에 나타난 결과라 생각되어진다.

체세포 잡종 식물은 그 형태적 특징이 양친 식물의 중간 또는 변이성을 나타내는 것이 하나의 특징이며 변이성이 표현형 특성으로서 관찰된 예는 엽형, 엽의 크기, 엽병, 화색, 화분의 생존도, 교잡 능력 등이 있다(Lee,1983). Austin (1993) 등은 *S. bulbocastanum*과 *S. tuberosum*사이의 체세포 융합체들이 양친형에 대한 중간 표현형을 가졌으며 각각의 융합체들 사이에서는 약간의 변이성이 있었다고 보고하였다.

BC 2세대의 생육상태는 대체적으로 양호한 편이였고, 식물체 길이는 교배양친들 보다는 컸고, 재배종과 비슷하거나 다소 작았다. 우수개체로 선발한 CT204계열의 CT204-3은 재배종보다 다소 작았으며, 줄기의 색은 화분친인 대지와 같은 초록색이였다. CT204-10은 아주 튼튼하였으며, 키는 재배종보다 다소 작았고, 줄기의 색은 초록색에 자주빛을 약간 띄고 있었다. CT206계열에서 우수개체로 선발한 CT206-9와 10, 14는 생육상태가 튼튼하였고 키는 화분친 대지보다는 작았지만 자방친 CT10b-4와 비슷하거나 컸다.

BC 2의 식물형태는 화분친인 재배종의 외형적인 모습과 유사하게 생육하는 것을 알 수 있었으며, 재배종과 생육습성은 유사하지만, 재배종에 없는 풋마름병에 대한 저항성을 가진 개체가 표현됨으로써 우리가 원하는 형질의 개체를 선발할 수 있었다.

**Table 6. Morphological characters and degree of resistance to bacterial wilt( inoculation with *R. solanacearum* mixed UW8, UW81, UW276 *in vitro* conditions) of the fusion parents, somatic hybrids and BC1 progenies in greenhouse.**

Clone	Chr. number	Growth Habit <sup>1)</sup>	Plant * Height(Cm)	Leaf <sup>2)</sup> Dissection	Stem <sup>3)</sup> Colour	Degree of Flowering <sup>4)</sup>	per <sup>5)</sup> Inflorescence	DR <sup>6)</sup>
<b>Fusion Parent</b>								
LZ 3.2	24	5	20.6	3	-	5	3	HR
PT 56	24	3	15.4	1	-	0	-	HS
<b>Somatic Hybrids</b>								
HA06-1	48	3	43.7	3	-	5	3	HR
HA06-2	48	3	45.5	3	-	5	3	R
HA06-4	47	-	-	-	-	-	-	I
HA06-9	48	2	61.4	3	-	7	3	HR
<b>BC1 Progenies</b>								
CT01-4	48	3	50	4	4	5	4	R
CT02-1	48	3	43	3	3	5	1	R
CT02-2	45	3	58	4	2	7	4	S
CT02-3	46	2	61	4	1	7	3	I
CT02-4	48	1	41	3	1	5	2	HR
CT03b-3	48	1	52	4	4	0	-	S
CT04-3	48	3	82	3	1	7	3	S
CT05-1	48	1	52	3	1	0	-	R
CT07-3	48	2	74	4	4	7	2	S
CT07-4	41 ± ?	2	101	4	4	5	3	S
CT08-3	48	1	34	3	3	5	4	HR
CT08-4	48	2	39	3	3	5	3	HR
CT09a-4	46	3	32	3	3	7	4	R
CT09b-1	47	3	49	3	3	5	4	R
CT09b-4	48	2	39	3	3	7	4	R
CT10a-1	48	3	72	4	1	1	-	S
CT10b-4	37 ± ?	1	69	3	3	3	3	R

**\* Plant Height (Cm)**

– 80 days after transplantation from *in vitro* to greenhouse

1) Growth Habit type

- 0 : Abnormal
- 1 : Erect
- 2 : Semi - erect
- 3 : Decumbent
- 4 : Prostrat
- 5 : Semi - rosette
- 6 : Rosette

2) Leaf Dissection

- 0: Abnormal
- 1.Undissected
- 2.Pinnatilobed
- 3.Scarcely
- 4.Weakly
- 5.Medium
- 6.Strongly
- 7.Very Strongly

3) Stem Colour

- 1.Green
- 2.Purple
- 3.Green with some purple
- 4.Purple with some green

4) Degree of Flowering

- 0.No buds
- 1.Bud abortion
- 3.Flowering scarce
- 5.Flowering moderate
- 7.Flowering profuse.

5) Number of per Inflorescence

- 1.Single
- 2.Few (2-5)
- 3.Intermediate number
- 4.Many (morethen 20)

6) DR - Disease reaction

- ① HR : Highly Resistant(0~20% of wilting)
- ② R : Resistant (20~40% of wilting)
- ③ I : Intermediate(40~60% of wilting)
- ④ S : Susceptible(60~80% of wilting)
- ⑤ HS : Highly Susceptible(80~100% of wilting)

**Table 7. Morphological characters of the fusion parents, somatic hybrids and cross parents BC1 and BC2 progenies in greenhouse .**

Clone	Growth Condition <sup>1)</sup>	Plant* Height(Cm)	Stem <sup>3)</sup> Colour	DR <sup>6)</sup>	
				race1	race3
<u>Fusion Parent</u>					
LZ 3.2	3		1	HR	HR
PT 56	4	27	1	HS	HS
<u>Somatic Hybrids</u>					
HA06-1	1		4	R	HS
HA06-4	1	24	4	R	HS
HA06-9	2	31	4	R	HR
<u>BC1 Progenies</u>					
CT02-4	2	20	1	R	I
CT08-4	1	15	4	HR	HR
CT10b-4	2	23	3	HR	HR
<u>S. cultiva</u>					
Dejima	3	33	1	HS	HS
Nooksak	4	20	3	HS	HS
Superior	4	30	1	HS	
Irish cobbler	4	25	1	HS	
<u>BC2 progenies</u>					
CT 201-1	2			I	
CT 201-2	2			R	
CT 201-3	4			S	
CT 202-1	1	21	3	R	
CT 203-1	4			S	
CT 203-2	4			I	
CT 204-1	2			R	HS
CT 204-2	3	20	1	I	HS
CT 204-3	2	17	1	R	HR
CT 204-4	2			R	S
CT 204-5	2			R	S
CT 204-6	2			I	HS
CT 204-7	3			S	HS
CT 204-8	3			R	I
CT 204-9	2			I	R
CT 204-10	1	20	3	R	R
CT 204-11	2			I	HS
CT 205-1	4			I	
CT 205-2	4			I	

**Table 7-1. Morphological characters of the fusion parents, somatic hybrids and cross parents BC1 and BC2 progenies in greenhouse.**

Clone	Growth Condition <sup>1)</sup>	Plant* Height(Cm)	Stem <sup>2)</sup> Colour	DR <sup>3)</sup>	
				race1	race3
CT 206-1	2	18	3	I	HS
CT 206-2	2	27	3	I	R
CT 206-3	3	22	3	I	HS
CT 206-4	2	18	4	R	HS
CT 206-5	2	20	3	R	HS
CT 206-6	2	33	3	R	R
CT 206-7	3	22	1	I	HS
CT 206-8	3	18	1	S	HS
CT 206-9	1	16	1	R	HR
CT 206-10	1	30	3	HR	HR
CT 206-11	2	21	1	R	HS
CT 206-12	3	23	3	R	HS
CT 206-13	2	17	1	I	HS
CT 206-14	2	21	4	R	R
CT 206-15	2	18	1	I	R
CT 206-16	3	24	3	R	HS
CT 206-17	4	28	3	S	HS
CT 206-18	2	18	1	I	HS
CT 206-19	3	20	1	S	HS
CT 206-20	1	30	3	R	HS
CT 206-21	1	27	3	I	HS
CT 206-22	4	15	1	S	HS
CT 206-23	4	20	1	S	HS
CT 206-24	3	22	1	R	HS
CT 206-25	3	30	1	R	HS
CT 206-26	3	15	1	I	HS
CT 206-28	3	20	1		HS
CT 206-29	3	16	1	R	HS
CT 206-31	3	30	3	R	HS
CT 206-32	3	28	4	I	HS
CT 206-33	3	22	2	I	HS
CT 206-34	2	27	2	I	HS
CT 206-36	2	28	1	I	HS

1) Growth Condition

1.Excellent 2. Good 3.intermediate 4. weak

2) Stem Colour

1.Green 2.Purple 3.Green with some purple 4.Purple with some green

3) Plant Height (Cm) - 40 days after transplantation from *in vitro* to greenhouse

4) DR - Disease reaction

① HR : Highly Resistant (0~20% of wilting)

② R : Resistant (20~40% of wilting)

③ I : Intermediate (40~60% of wilting)

④ S : Susceptible (60~80% of wilting)

⑤ HS : Highly Susceptible (80~100% of wilting)

### 3. RAPD에 의한 표지인자 검사

꽃마름병에 대한 표지인자를 찾기 위하여 UBC 와 Operon의 200종류의 random decamer primer를 사용하여 RAPD 분석을 한 결과 13종류가 polymorphic band를 부여했으나, 이중 OPA 1의 1,692bp와 UBC #407의 662bp만이 저항성 양친과 race 1에 저항성인 1대, 2대 교배잡종에 나타났다. 그러므로 이에 대한 정밀한 검사가 필요하다.

Table 8. RAPD data of clones of resistance & susceptible fusion parents, somatic hybrids, crossed parents and the progenies. Primers numbers are UBC (University of British Columbia) Code number and operon kit-number.

primer	polymorphic band (bp)	LZ3.2	PT56	HA06-9	Dejim a	CT10 b-4	CT206 -1	CT206 -2	CT206 -3	CT206 -4	CT206 -5	CT206 -6	CT206 -7	CT206 -8	CT206 -9	CT206-10
OPA 1	17885	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1692	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+

primer	polymorphic band (bp)	LZ3.2 ▲	PT56 △	HA06-1 ▲	Nook △	CT02-4 ▲	I.C ▲	CT201-1	CT201-2 ▲	CT201-3 △
UBC	2939	-	-	-	+	-	-	-	-	-
# 407	1751	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	705	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	662	+	-	+	-	+	-	-	-	-
	676	+	-	+	-	-	-	-	-	-

Nook : Nookdak, I.C : Irish cobbler

NOTE : The oligonucleotide primer(10mers) used for the generation of RAPDs.

(+ : Presence of the RAPD marker, - : Absence of the RAPD marker ▲ : Resistance clone, △ : Susceptible clone)

## 참고문헌

L.T. Laferriere. J. P. Helgeson. C. Allen, 1998, Fertile *Solanum tuberosum* + *S. commersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*.

L.T. Laferriere. J. P. Helgeson. C. Allen, 1999. Bacterial Wilt Resistance *Solanum commersonii* + *Solanum tuberosum* Somatic hybrid is Recovered in Two Potato Backcrosses, *Euphytica* June 1

Austin, S., Baer, M. A. and Helgeson, J. P., 1985. Transfer of resistance to potato leaf roll virus from *Solanum brevidens* into *Solanum tuberosum* by somatic fusion, *Plant Science* 39:75-82

Ciampi, L. & L. Sequeira, 1980. Influence of temperature on virulence of race 3 strains of *Ralstonia solanacearum*. *American Potato Journal* 57:307-317

De Jong, H. and Rowe, P. R., 1971. Inbreeding in cultivated diploid potatoes. *potato Res.* 14:74-83

French, E. R. & L De Lindo, 1983. Resistance to *Pseudomonas solanacearum* potato : Heterosis. Iowa State College Press. Ames, Iowa

Haberlach, G. T., Cohen, B. A., Reichert, N. A., Bear, M. A., Towill, L. E. and Helgeson, J. P., 1985, Isolation, culture and regeneration of protoplasts from and several related *Solanum* species, *Plant Sci Lett* 39:67-74

Ham Y. I, Kwon M. 1998. 고랭지 주요 재배작물 병해충 조사. 고령지농업시험장 보고서 236-252

Hanneman, R. E., Jr., Bamberg, J. B., 1986. Inventory of Tuber-bearing *Solanum* Species. Wis agr. Exp. Sta. Bul. 533

Helgeson, J. P., Hunt, G. J., Haberlach, Geraldine T. and Sandra Austin, 1986. Somatic hybrids between *Solanum brevidens* and *Solanum tuberosum* : Expression of a late blight resistance gene and potato leaf roll resistance, Plant Cell Report 212-214

Hideyoshi Toyoda, Kunihiko Shinizu, Kazuyuki Chatani, Nobuhiro Kita, Yoshinori Matsuda, and Seiji Ouchi, 1989. Selection of bacterial wilt-resistant tomato through tissue culture, Plant Cell Report 8:317-320

Kelman, A., 1953. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. North Carolina Agr. Exp. Sta. Tech. Bull. 99.p194

Kim, H. Y, Chae, M. S., 1994, Studies on Characteristics and Bacterial Wilt Resistance of Somatic Fusion Hybrids of Resistance *Solanum commersonii* and Susceptible *S. tuberosum* Clones. Proceedings of the Fourth APA Triennial Conference. Vol. 2

Kim, H. Y, Chae, M. S., 1994, The Studies on Plant Characteristics of Somatic

Hybrids Produced by Protoplast Fusion Between *Solanum commersonii* and Haploid *S. tuberosum* cv Superior. RDA Journal of Agricultural Science. Vol. 36

Mendoza, H. A., and F. I. Haynes. 1974. Genetic basis of heterosis for yield in the autotetraploid potato. *Theor Appl Genet* 45:21-25

Rich A. E. 1983. Potato Diseases. *Am. Potato J.* 238p

Sequeira, L. & Rowe, P. R., 1969 Selection and utilization of *Solanum phureja* clones with high resistance to different strains of *Pseudomonas solanacearum*. *Am. Potato J.* 46:451-462

Tung, P. X., 1992b. Genetic variation for bacterial wilt resistance in a population of tetraploid potato. *Euphytica* 61:73-80

Tung, P. X., John G. Th. Hersen, Petera Vander Zaag & Schmiediche, 1992a. Effects of resistance genes, heat tolerance genes and cytoplasm on expression of resistance to *Pseudomonas solanacearum*(E.F.Smith) in potato. *Euphytica* 60:21-26

Tung, P. X., Rasco, E. T., Petera Vander Zaag Jr, & Schmiediche, 1990b. Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in the potato : II.Aspects of host - pathogen - environment interaction. *Euphytica* 45:211-215

## 제3장 야생종과 융합체 후대의 glycoalkaloid 함량검사

### 제 1 절 서 론

우수한 유전적 형질을 보유하고 있는 야생근연종(*S.commersonii*)중 일부는 내병성에도 현저히 저항성이 있는 것으로 보고되고 있다(Hanneman and Bamberg. 1986). 따라서 내병성이 강한 유용한 형질을 얻기 위해서는 야생종으로부터 저항성 형질을 도입해야 하는데, 최근에는 내병성이 뛰어난 야생근연종과 재배종(*S.tuberosum*)과의 세포융합을 통해서 우수한 개체를 선발하고 있으며, 그 세포융합체 또한, 내병성은 뛰어나지만, glycoalkaloid의 내생적 함량의 변동에 대해서는 알려져 있지 않다.

대부분의 감자식물체는 glycoalkaloid라 불리는 스테로이드계의 알카로이드 화합물을 함유하고 있다. 감자의 괴경속에서 발견되는 glycoalkaloid는 95% 이상이  $\alpha$ -chaconine과  $\alpha$ -solanine형태로 존재하고 있으며, 그외 이들로부터 가수분해되어 생성된  $\beta$ -chaconine,  $\gamma$ -chaconine 및 solanine 이 미량으로 존재한다(Bushway *et al.* 1980). 이들 화합물의 구조는 당의 환원기에 aglycon(비당부분)인 solanidine이 결합하여 배당체 구조를 이루고 있다(Figure.1).

이러한 glycoalkaloid는 식물병에 대한 방어기능의 역할을 하고 있으나(Tingey.1984), 인체에 유해한 물질로서 일정량 이상 섭취하게 되면 위장 및 신경장애를 일으키는 것으로 보고되어, 스웨덴에서는 식용을 위한 감자는 신선중 100g당 20mg을 초과하지 못하도록 규정되어 있다(Van Gelder. 1991. Sinden and Webb.1974). 따라서, 감자 식물체에서의 glycoalkaloid양의 유전적 혹은 환경적인 요인에 의한 증가(품종간 교배 및 수확 후 저장조건 등)는 감자의 상품성뿐만 아니라, 식품으로서의 안정성 면에서도 문제가 되고 있다.

따라서, 본연구과제에서는 재배종과는 교배가 되지않는 야생근연종계통 중 세균성꽃마름병에 100%저항성을 보여 선발된 clone과 재배종 수미의 반수체와 세포융합

된 clone을 다른 재배종과 교배하여 얻은 후대자손들의 각 세대간 clone들을 대상으로 total glycoalkaloid의 함량을 조사하여 식품으로서의 안정성을 검토하고자 하였다.

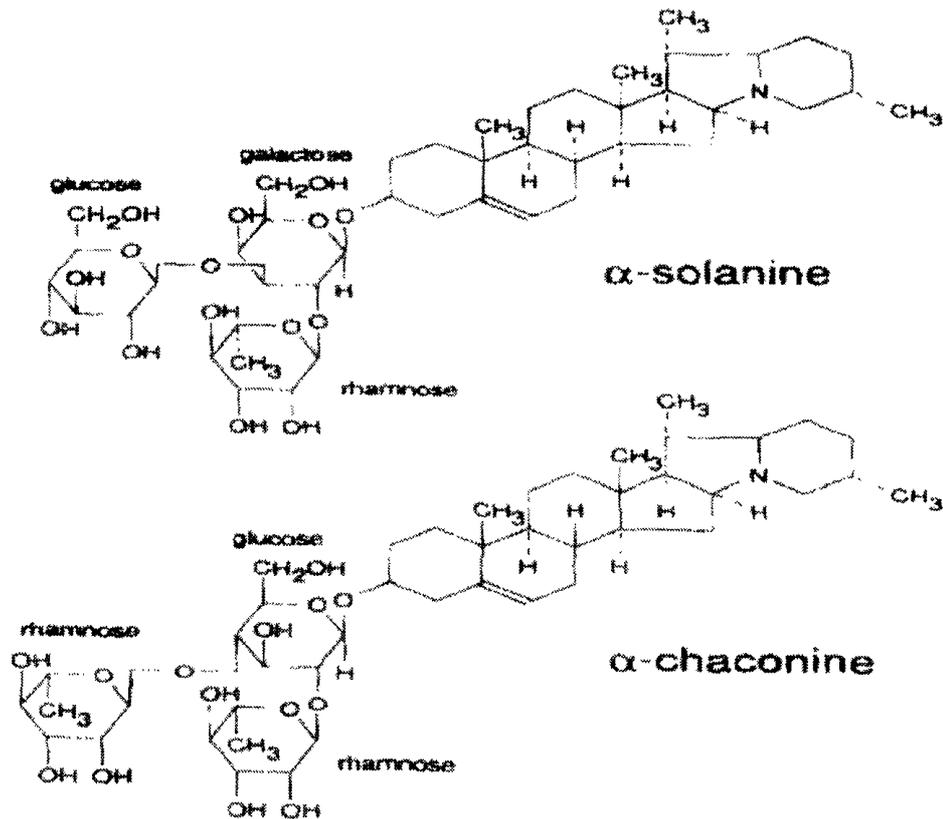


Figure 1. The chemical structures of  $\alpha$ -chaconine and  $\alpha$ -solanine from potato.

## 제 2 절 재료 및 방법

### 1. glycoalkaloid 추출

동결건조한 시료 2g을 methanol 8ml와 내부표준용액 으로서 solasodine(100ug/ml) 용액 200ul를 시료에 첨가하여 추출하였다. 추출액을 10000g(5000~6000rpm)에서 10분간 2번 반복하여 원심분리 하여 각각의 상층액을 모아서 4 layer gauze로 여과하였다. 여과한 용액을 methanol 로 평형화 시킨 SAP-PAK C<sub>18</sub> cartridge에 loading후 10ml의 acetonitrile로 용출 하였다. 용출액은 다시 evaporator로 감압하에서 건조시킨 후 20mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 포함한 70% acetonitrile용액 1ml 로 녹인후, 이용액을 glycoalkaloid를 포함한 시료로써 사용하였으며, 이중 10ul를 HPLC로 분별정량 하였다(Figure.2)

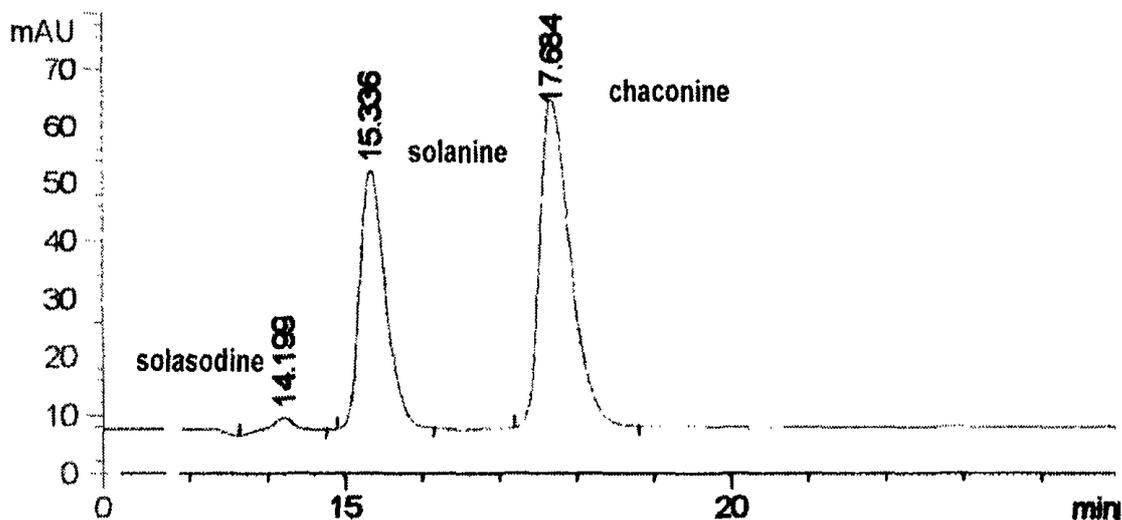


Figure 2. HPLC chromatogram of glycoalkaloid in purified extracts of potato tuber

## 2. glycoalkaloid 분별정량

glycoalkaloid 정량은 UV detector (203 nm)에 의한 HPLC로 결정하였다. 시료는 HYPERSIL packed ODS C<sub>18</sub> 의 HPLC column 에 loading 하여 고정상을 분당 1ml 의 유속으로 30% acetonitrile/ 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6.3), (3 : 7, v/v)의 이동상으로 용출하였다. glycoalkaloid 양은 같은 HPLC 분석에서 관찰한 solasodine의 회수율을 근거로 하여 계산하였다.

검량선은 ml 당 mg의 Chaconine 및 solanine을 적당한 양으로 희석하여 HPLC로 분석하여 작성하였으며, peak area 을 chaconine 및 solanine 의 양을 정량 하기 위하여 측정하였다

### 제 3 절 결과 및 고찰

내부 표준용액을 이용하여 glycoalkaloid의 회수율을 검토하였다.  $\alpha$ -solanine 및  $\alpha$ -chaconine 모두 90%이상의 회수율을 보였으며, 이 회수율을 근거로 하여 감자괴경속의 glycoalkaloid의 양을 결정하였다. 또, glycoalkaloid의 함량은  $\alpha$ -solanine과  $\alpha$ -chaconine을 합한 Total glycoalkaloid(TGA)로 나타내었다.

괴경속의 TGA의 정량결과, 융합양친인 야생근연종 LZ3.2는 신선중 100g당 30.7mg을 체세포융합체는 신선중 100g당 4.05-35.2mg을 포함하였으며, 특히 HA06-4 및 HA06-9의 clone에서 각각 35.2mg과 21.58mg으로 매우 높은 함량을 보였다. 반면 그의 후대자손 중 1세대 clone들의 TGA함량 분포는 신선중량 100g당 0.25-9.19mg, 2세대 clone들에서의 TGA 함량분포는 신선중 100g당 0.29~6.19mg으로 나타나, 식용으로서 안전한 TGA기준함량 보다 낮게 나타났다. 또한 각 세대간 TGA함량은 세대가 내려갈수록 감소하는 경향을 보였으며, 세균성 풋마름병 저항성이 강한 2세대 clone 또한 상대적으로 낮은 TGA함량을 나타냈다. (Table.1).

따라서, 현재의 연구결과들로부터, 후대자손 1세대 및 2세대 clone들의 식용으로서의 감자육중에 이용할 수 있는 유용한 clone들로서 활용가능성이 높을 것으로 추정된다.

**Table.1 The glycoalkaloid contents detected in extracts prepared from fusion parents, the somatic hybrids, crosses parents, and the 1st, 2nd sexual progenies.**

clone	contents(mg/g)		TGA	clone	contents(mg/g)		TGA
	chaconine	solanine			chaconine	solanine	
<b>Fusion parents</b>				CT09b-1	ND	0.3	0.3
LZ 3.2	17.8 <sup>x</sup>	12.9	30.7	CT09b-2	0.5	0.4	0.9
*PT 56	3.7	2.2	5.8	CT09b-4	4.7	ND	4.7
<b>Cross parents</b>				CT10b-1	1.8	1.2	3.0
Dejima	3.6	1.6	5.2	*CT10b-4	1.9	0.7	2.6
Nooksak	ND	ND	ND	CT10c-3	1.4	1.8	3.2
Irish cobbler	0.7	ND	0.7				
<b>Somatic hybrids</b>							
*HA06-1	6.2	2.7	9.0				
HA06-2	1.8	2.3	4.1				
HA06-4	16.7	18.5	35.2				
*HA06-9	15.5	6.1	21.6				
<b>Back Cross 1</b>							
CT01-1	3.2	ND	3.2				
CT01-2	1.9	2.0	3.9				
CT01-4	4.0	1.4	5.4				
CT02-2	6.1	1.8	7.9				
CT02-4	2.3	1.3	3.6				
CT03a-3	4.3	ND	4.3				
CT03b-2	6.3	1.3	7.6				
CT05-1	2.6	1.1	3.7				
CT05-2	0.4	1.5	1.9				
CT05-5	4.8	ND	4.8				
CT06-1	5.4	ND	5.4				
CT08-1	0.9	0.4	1.3				
CT08-2	1.7	2.3	4.0				
CT08-3	2.0	2.9	4.9				
CT08-4	3.0	0.8	3.8				
CT09a-1	3.0	ND	3.0				
CT09a-2	4.7	0.5	5.2				
CT09a-4	7.3	1.9	9.2				
				<b>Back Cross 2</b>			
				**CT202-1	4.7	1.4	6.1
				*CT204-3	0.7	1.4	2.1
				*CT206-5	ND	ND	ND
				*CT206-9	0.7	ND	0.7
				**CT206-1			
				0	2.0	1.8	3.8
				*CT206-12	0.2	0.1	0.3
				<b>Cross parents</b>		<b>BC 1 progenies</b>	
				HA06-1 × Dejima		CT01	
				HA06-1 × Nooksak		CT02	
				HA06-1 × L830		CT03	
				HA06-2 × L830		CT05	
				HA06-2 × P85001		CT06	
				HA06-4 × L830		CT08	
				HA06-9 × L830		CT09	
				HA06-9 × Dejima		CT10	
				<b>Cross parents</b>		<b>BC 2 progenies</b>	
				CT08-4 × Irish cobblerler		CT202	
				CT08-4 × Dejima		CT204	
				CT10b-4 × Dejima		CT206	

\* resistant(20-40% of wilting). \*\* Highly resistant(0-20% of wilting)

ND : not detect. X : Values represents the means of 3 samples

## 참 고 문 헌

1. Bomer, A. and H. Mattis. 1924. The solanine content of potatoes. *Z Unter such Nahr Genussmtl* 47: 97-127.
2. Bushway, R.J., E.S. Barden, A.M. Wilson, and A.A. Bushway. 1980. Analysis of potato glycoalkaloids by HPLC. *J. Food. Sci.* 45: 1088-1089.
3. Friedman, M.L. and G.M. McDonaldo. 1997. Potato glycoalkalois: chemistry, analysis, safety, and plant physiology. *Crit Rev Plant Sci.* 16(1):55-132.
4. Hanneman, R.E. and J.B.Jr. bamberg. 1986. Inventory of tuber-bearing *Solanum* species. *Wis. agr. Exp. Sta. Bul.* 533.
5. Sinden,S.L. and R.E. Webb.1974. Effect of environment on glycoalkaloid content of six potato varieties at 39 locations. *USDA Tech Bull.* 1472.
6. Tingey, W.M., 1984. Glycoalkaloids as pest resistance factors. *American Potato Journal.* 61:157-167.
7. Van Gelder, W.M.J. 1991. Chemistry, toxicology and occurrence of steroidal glycoalkaloids. CRC Press,Boca Raton, FL, USA. pp 117-156.
8. Slanina,P. 1990. Solanine in potatoes: toxicological evaluation. *Food Chem Toxicol.*28:759-762.

## 제 4 장 기내 및 재배식물체를 이용한 무름병

### 저항성 검사와 RAPD에 의한 표지인자 검사

#### 제 1 절 서 론

세균성 무름병을 일으키는 병원체는 *Erwinia* 속의 *Erwinia carotovora* subsp. *atroceptica*(E.c.a.), *E. carotovora* subsp. *carotovora*(E.c.c.) and *E. chrysanthemi* 에 의해 발병되고, 줄기와 괴경의 무름병을 일으키는 전 세계적으로 큰 경제적 손실을 가져오는 중요한 질병이다(Perpmbelon & Kelman, 1980). 이 질병은 대부분 감염 종자를 사용해 기른 식물체, 그리고, 저장 중에 높은 상대습도, 환기 부족으로 인한 괴경 표면에 습도의 농축 등 조잡한 취급, 저장 상태 불량에 충분하지 않은 환경 하에서 일어난다.

이 질병에 대해 효과적인 살균제는 상업적으로 사용되지 않고 있어 *Erwinias*에 대한 감자 재배종 저항성의 개발이 이 질병에 대한 손실을 줄이기 위한 가장 효과적인 방법이 되리라 생각한다(French & de Lindo, 1985; Lapwood et al., 1985; Wastie & Mackay, 1985).

괴경 무름병에 대한 저항성은 야생 *Solanum*종, 야생 *Solanum*종의 잡종, 그리고 야생 *Solanum*종 과 *Solanum tuberosum*간의 잡종과 그들의 유성적 자손에서 이미 증명이 되었다(Allefs et al., 1995; Austin et al., 1988; Carputo et al., 1997; Corsini & Pavek, 1986; French & de Lindo, 1985; Helgeson et al., 1986; 1993; Zimnoch-Guzowska & Lojikowska, 1993). 원형질체 융합에 사용된 *Solanum*종 사이의 체세포 잡종은 몇몇 연구집단에 의해 획득되었다.(Barsby, T., Shepard, J., Kemble, R., and Wong, R. et al., 1984) 특히 무름병에 저항성

이 있다고 알려진 야생종 *S. brevidens*와 재배종 *S. tuberosum* Group Tuberosum간의 세포 융합이 세균성 무름병에 저항성이 있는 것으로 알려지고, 부모의 형질을 그대로 이어 받았으며 일부 체세포 잡종들은 전통적 유성적 교배가 가능하다고 알려졌다.(Ehlenfeldt and Helgeson 1987)). 괴경과 줄기 무름병 두 저항성의 완전히 다른 기작에 대해서는 상호관계가 발견되지 않았다 (Allefs et al., 1995; Carputo et al., 1997; Hidalgo & Echandi, 1982). 그러므로 향상된 괴경 무름병 저항성을 위한 육종은 반드시 줄기 무름병에 대한 저항성 향상을 수반하지 않는다(Wastie and Mackay, 1985). 저항성의 두 형태를 모두 가지고 있는 양친의 개발이 육종 재료로 긴요하게 필요하여 본 연구에서는 이의 선발에 그 목적을 두고 있다.

## 제 2 절 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

#### 가. 공시식물

본 실험에서 감염시킨 식물체의 성장시기는 괴경과 기내 식물체와 기내식물체에서 화분에 이식한 식물체 세 가지 이다.

기내식물체는 호르몬이 첨가되지 않은 무균의 Murashige and Skoog(MS)배지 (Murashige and Skoog, 1962)에서  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 16시간의 광주기하에서 증식하여 99년 8월에 식물체의 잎을 사용하였고, 실험에 사용된 식물체는 재배종, 야생종 과 융합체 및 융합체 자손으로 Table 1과 같다.

이식된 식물체로는 두가지 방법으로 실험을 진행하였는데, 첫 번째 실험은 99년 8월 기내에서 2~3주간 성장된 식물체를 Jiffy Pots으로 이식한 후,  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 16시간의 광주기하에서 3주간 성장한 식물체의 잎을 사용하였고, 대상 식물체는 재배종, 야생종, 융합체 및 융합체 자손으로 22종 25clones이었다.(Table 1) 두 번째 실험은 2001년 7월 기내에서 증식된 식물체를 상토와 질석이 2:1로 섞인 연결 pot에 2주간 활착시킨 후 다시 화분에 이식하여 4~5주 후 10~15cm의 shoot를 채취하여 실험에 사용하였고, 실험에 사용된 식물체는 재배종, 야생종, 그리고, 융합체 및 융합체 자손으로 Table 2와 같다.

괴경은 실험은 1998년 4월에 파종을 하여 같은 해 8월에 수확된 괴경을  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 저온 저장을 하였다가 1999년 봄에 1998년 8월에 수확한 괴경을 파종하여 같은 해 여름에 수확한 괴경과 기내에서 증식된 것을 99년 3월에 연결 pot에 이식하여 3주후 동국대학교 농장의 온실 화분에 다시 이식하여 약 150일 후에 수확한 괴경을 사용하였다. 실험에 사용된 괴경은 재배종, 융합체 및 자손, 야생종, 반수체와 야생종간의 잡종으로 Table 3과 같다. 대조군으로 저항성이 있다고 검정된 개체로 *S. tuberosum* cv. Dejima와 야생종 *S. brevidens* PI218228의 체세포 잡종(1007)을 농업진흥청 원예연구소 안울관박사로부터 분양받아 이용하였다. 그리고, 두 번째 실험

에 사용된 피경은 2000년 3월에 파종을 하여 같은 해 8월에 수확된 피경을 4℃에  
저온 저장을 하다가 2001년 봄에 2000년 8월에 수확한 피경을 파종하여 같은 해  
여름에 수확한 피경과 기내에서 증식된 것을 2001년 3월에 연결 pot에 이식하여 3  
주후 동국대학교 농장의 온실 화분에 다시 이식하여 약 150일 후에 수확한 피경을  
사용하였다. 실험에 사용된 피경은 재배종, 융합체 및 자손, 야생종으로 Table 4와  
같다.

**Table 1. List of clones tested for inoculation on leaves of *in vitro* plant and potted plant.**

<u>Origin</u>	<u>Clones</u>
<b><u>Cultivars</u></b>	
<i>S. tuberosum</i> P.I. 203900	CR4#2
<i>S. tuberosum</i> cultivar	Katahdin, Atlantic, Dejima, Superior
<b><u>Wild species</u></b>	
<i>S. brevidens</i> P.I. 218228	ps- 6A
<i>S. commersonii</i> P.I. 32026	Lz 3.1, Lz3.2, Lz3.4, Lz3.5
<i>S. brachistotrichum</i> P.I. 255530	1-7
<i>S. cardiophyllum</i> P.I. 186548	3-10
<i>S. jamesii</i> P.I. 275169	13-3, -5
<i>S. chiquidenum</i> P.I. 310942	chq-A
<i>S. chiquidenum</i> P.I. 310989	chq-B
<i>S. chiquidenum</i> P.I. 365322	chq-C
<i>S. chiquidenum</i> P.I. 473459	chq-E
<i>S. pinnatisectum</i> P.I. 230489	pin-B, pin-B-1
<i>S. pinnatisectum</i> P.I. 184764	pnt-A
<i>S. chomatophyllum</i> P.I. 762609	chm-A
<i>S. chomatophyllum</i> P.I. 762570	chm-B
<i>S. chomatophyllum</i> P.I. 762570-2	chm-B-2
<i>S. cardiophyllum</i> P.I. 283062-1	cph-A-1
<i>S. cardiophyllum</i> P.I. 283063-1	cph-C-1
<i>S. berthaultii</i> P.I. 473331-1	ber-B-1
<b><u>Fusion Hybrids and Progenies</u></b>	
CR4#2 + ps- 6A	A206, A937
A206 × <i>S. tuberosum</i> cv. Katahdin	C1-31, C1-75
C1-31 × <i>S. tuberosum</i> cv. Katahdin	C31-5, C75-5
C75-5 × <i>S. tuberosum</i> cv. Atlantic	C75-5-210, C75-5-297
*Note : + : cell fusion                      × : cross	

**Table 2. List of clones tested for inoculation on shoots of potted plant.**

<b>Origin</b>	<b>Clones</b>
<b><u>Cultivars</u></b>	
<i>S. tuberosum</i> P.I. 203900	CR4#2
<i>S. tuberosum</i> cultivar	Katahdin, Atlantic, Dejima, Superior, Irish cobbler
<b><u>Wild species</u></b>	
<i>S. brevidens</i> P.I. 218228	ps-6A
<i>S. brachistotrichum</i> P.I. 255530	1-7
<i>S. jamesii</i> P.I. 275169	13-3, -5
<i>S. chiquidenum</i> P.I. 310942	chq-A
<i>S. chiquidenum</i> P.I. 310989	chq-B
<i>S. pinnatisectum</i> P.I. 230489	pin-B-1
<i>S. pinnatisectum</i> P.I. 184764	pin-A
<i>S. chomatophillum</i> P.I. 762609	chm-A
<i>S. chomatophillum</i> P.I. 762570	chm-B
<i>S. chomatophillum</i> P.I. 762570-2	chm-B-2
<i>S. cardiophyllum</i> P.I. 283062-1	cph-A-1
<i>S. cardiophyllum</i> P.I. 283063-1	cph-C-1
<i>S. berthaultii</i> P.I. 473331-1	ber-B-1
<i>S. sparsipilum</i> P.I. 310959	spl-1, -2, -3, -4, -5, -6
<i>S. tuberosum</i> P.I. 214435	tbr1-1, -2, -3, -4, -5, tbr1-6, -7, -8, -9
<i>S. tuberosum</i> P.I. 214421	tbr2-1, -2, -3, -4, -5
<b><u>Fusion hybrids and Progenies</u></b>	
CR4#2 × ps6A	A206, A249, A937
A206 × <i>S. tuberosum</i> cv. Katahdin	C1-31, C1-75
A249 × <i>S. tuberosum</i> cv. Katahdin	WD-1,-2,-3,-4,-5,-6,-7,-8,-9
A937 × <i>S. tuberosum</i> cv. Katahdin	WE-1,-2,-3,-4,-5,-8,-9,-10,-11 -12,-13,-14,-15,-16,-17,-18
C1-31 × <i>S. tuberosum</i> cv. Katahdin	C31-12, -13, -14, -15
C1-75 × <i>S. tuberosum</i> cv. Katahdin	C75-5, -14

**Table 3. List of clones tested for tuber inoculation**

Origin	Clones
· <i>S.tuberosum</i> cv.Dejima+S.bervidens PI218228	1007
· <i>S.tuberosum</i> PI203900	CR4#2
· <i>S.tuberosum</i> cultivar	Dejima, Katahdin, Nooksac
<b><u>Fusion Hybrids and Progenies</u></b>	
· (CR4#2 + ps-6A) × S.tub cv. Katahdin	C1-31, C1-75
· C1-31 × S.tub cv. Katahdin	C31-5
· C1-75 × S.tub cv. Katahdin	C75-5
· C75-5 × S.tub cv. Atlantic	C75-5-210, C75-5-297
· LZ 3.2 + PT56	HA06-1, IIA06-2
· IIA06-1 × S.tub cv. Dejima	CT01-1, CT01-4
· HA06-1 × S.tub cv. Nooksac	CT02-1
· HA06-1 × S.tub cv. Dejima(L830)	CT03a-1, CT03a-3
· HA06-9 × S.tub cv. Dejima	CT10a-1, CT10b-4
· IIA10b-4 × S.tub cv. Dejima	CT206-4, -7, -10, -11, -15
<b><u>Wild species</u></b>	
· <i>S.brachistotrichum</i> P.I.255530	bst 1-2,1-6,1-42,1-67,1-70
· <i>S.cardiophyllum</i> P.I.283062	cph-3, cph-22
<b><u>Haploids of cultivars × Wild species</u></b>	
· Hat-15 × chc-15	F1-11, -25, -31
· Hat-15 × chc-43	F2-8, -35
· Hat-15 × stn-23	F5-18
· Hat-16 × vrn-4	F7-2
· Hat-63 × chc-32	F9-69, -98, -99, -114
· Hat-63 × chc-35	F10-66
· HIC-22 × chc-32	F13-40
· HK-22 × chc-43	F17-28
· HK-91 × chc-15	F23-11
· HK-41 × chc-32	F24-5, -6
· HK-910 × chc-39	F25-14,-27,-28,-31, F25-70,-75,-8,-93
· HK-41 × phu-58	F27-3
· HV35-36 × chc-39	F30-2
	F76-55

---

**Dihaploids**

· S.tub cv. superior × 1.22	DH4-2
· S.tub cv. × 1.22	DH33-3, DH37-2
· Haploids of S.tub cv. Atlantic	Hat-9
· S.tub cv. Irish cobbler × Hes-9	HIC-20
· W727 × 1.22	IIW-6
· 9AM-3(Remehue) × Hes-5	DH13-38
· Konafubnki × 1.22	HK-22, HV35-20, -21
· Konafubnki × Hes-2	HK-48

---

※ Note : ps-6A : *S.brevidens* PI218228                      S.tub : *Solanum tuberosum*

Lz 3.2 : *S.commersonii* PI320226

PT56 : Haploid of *S.tuberosum* cv. Superior

Hat : Haploid of *S.tuberosum* cv. Atlantic

HIC : Haploid of *S.tuberosum* cv. Irish cobbler

HK : Haploid of *S.tuberosum* cv. Konefubnki

**Table 4. List of clones tested for tuber inoculation**

Origin	Clones
· <i>S.tuberosum</i> cv.Superior+ <i>S.brevidens</i> PI218228	2007
· <i>S.tuberosum</i> cultivar	Dejima, Katahdin, Nooksac, Superior, Atlantic, Irish cobbler
<b><u>Fusion Hybrids and Progenies</u></b>	
· CR4#2 + ps-6A	A206
· A206 × <i>S.tuberosum</i> cv. Katahdin	C1-31, C1-75
· A249 × <i>S.tuberosum</i> cv. Katahdin	WD-1, -2, -3, -6, -7, -8
· A937 × <i>S.tuberosum</i> cv. Katahdin	WE-1, -4, -5, -6, -8, -10, -11, -12, -13, -18
· C1-31 × <i>S.tuberosum</i> cv. Katahdin	C31-5, C31-16
· C75-5 × <i>S.tuberosum</i> cv. Atlantic	C75-5-210, C75-5-297
<b><u>Wild species</u></b>	
· <i>S.cardiophyllum</i> P.I.283062-1	cph-A-1

\*Note ps-6A : *S.brevidens* PI 218228

CR4#2 : *S.tuberosum* PI203900

## 나. 광시 균주

세균성 무름병을 일으키는 *Erwinia*속에는 세 가지 *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*(E.c.a), *E. carotovora* ssp. *carotovora*(E.c.c), *E. chrysanthemi* (Echr)가 있는데, 이중 우리 나라에서 발병된 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 1(대관령)과 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 2(홍천), 그리고, 감자의 흑각병을 일으키는 *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*.(일본) 세균을 1998년 강원대학교의 임춘근 교수와, 2001년에는 농촌진흥청 원예연구소 안윤균 박사로부터 E.c.a(254-8 SL)와 E.c.c(381 SL)를 분양 받아 사용하였다.

## 2. 실험 방법

### 가. 세균성 무름병균의 병원성 검정 및 분리

20% glycreol solution 현탁액에 냉동 보관 중인 균 현탁액을 뽑아 MGY 고체배지에 넣은 뒤, 24°C, 암상태에서 1~2일간 증식한다. 세균이 균락을 이루면 loops를 이용하여 표면살균된 감자 조각에 세균을 striking한다. 그리고, 24°C, 암상태에서 2일간 보관한 뒤, 감자 표면의 조직이 무르는 병징이 일어나면 보관중인 세균성 무름병균은 병원성이 있는 것으로 판단하고, 세균을 분리하기 위해 loops를 이용하여 발병된 감자 조직을 MGY 고체배지에 striking한다. 2일간 24°C, 암상태에 두었다가 병균을 분리하여 저항성 검정 실험에 이용한다.

### 나. 식물체 잎을 이용한 세균성 무름병 접종

병원성이 검정되고 분리되어 보관중이던 세균성 무름병균을 MGY 고체배지에서 24±1°C, 암상태에서 48시간 증식시킨 후, 세균의 균락의 일부를 loops를 이용하여 5~6loops를 MGY 현탁배지에 현탁하여 shaking incubator에서 24±1°C, 120rpm, 암상태로 48시간 현탁배양 하였다.

기내에서 증식된 식물체와 이식되어 3주간 증식한 식물체의 잎을 멸균된 petri-dish에 filter paper를 깔고, 습도를 유지하기 위해 멸균수 3ml을 뿌려주고, 그 위에 petri-dish당 5개의 잎을 뒤집어 놓고,  $10^7$  cells/ml 균현탁액을 기내 식물의 잎에는  $20\mu\text{l}$ 를, 이식된 식물의 잎에는  $50\mu\text{l}$ 를 접종하였다. parafilm으로 petri-dish를 봉하고  $24^\circ\text{C}$ , 16시간의 광주기하에서 보관하고, 접종 후 48시간부터 144시간까지 24시간 단위로 병징을 6단계(0-잎에 아무런 증상이 일어나지 않음, 1-잎의 일부분에 무름증상일 일어남, 2-잎의 1/3까지 물러짐, 3-잎의 2/3까지 물러짐, 4-잎 전체가 물러짐, 5-잎 전체가 무르고 갈변됨)로 나누어 관찰, 기록하였다.

#### 다. 이식된 식물체 shoot의 세균성 무름병 접종

병원성이 검정되고 분리되어 보관중이던 세균성 무름병균 *Erwinia carotovora* subsp. *atroceptica*를 MGY 고체배지에서  $18^\circ\text{C}$ , 암상태에서 48시간 증식시킨 후, MGY 현탁배지에 현탁하여 shaking incubator에서  $18^\circ\text{C}$ , 120rpm, 암상태로 24시간 현탁배양 하였다.

기내에서 증식된 식물체를 상토와 질석이 2:1로 섞인 연결 pot에서 2주간 활착시킨 후 다시 화분으로 이식하여 4-5주간 자란 식물체의 10-15cm 삼수를  $10^7$  cells/ml의 농도로 조정된 균 현탁액에 30분간 침지시킨 후 상토와 질석을 2:1로 섞은 흙 50g과 멸균수 20ml를 꿀병에 넣고 삼수를 심어  $25^\circ\text{C}$  16시간의 광주기하에서 보관하고 접종 3일후 병징을 6단계(0-shoot에 아무런 증상이 일어나지 않음, 1-shoot의 1/5까지 무름증상일 일어남, 2-shoot의 2/5까지 물러짐, 3-shoot의 3/5까지 물러짐, 4-shoot의 4/5까지 물러짐, 5-shoot 전체가 무러짐)로 나누어 관찰, 기록하였다.

#### 라. 괴경의 세균성 무름병 검정

99년에 수확된 괴경은 *Erwinia carotovora* subsp. *atroceptica*(일본)와 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*(대관령, 홍천)를 접종하였고, 2001년에 수확된 괴경은

농촌진흥청 안울균 박사로부터 받은 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*(381SL)을 접종하였다.

괴경에 대한 세균성 무름병 접종 방법은 Helgeson(1994)의 방법을 변형하여 시행하였다. 기내 식물 및 이식된 식물체에 대한 세균성 무름병 검정 실험과 동일하게 접종할 세균 현탁액 ( $10^7$  cells/ml)을 준비하였다. 세균성 무름병 검정을 위해 수확된 상처가 없는 괴경은 표면에 묻어 있는 흙과 이물질을 물로 세척한 후, 0.5% Hypochloride(NaOCl)에 20분간 침지하고, 증류수로 세척한 후, 공기 중에서 말린 다음, 95% ethanol로 spray하고 공기 중에서 말렸다. 살균 및 건조된 괴경을 sterile pipette tips(blue tips)을 이용하여 25mm의 깊이로 구멍을 낸 뒤, 세균현탁액의 50 $\mu$ l를 주입하였다. 접종된 괴경을 20.5×27.5×17cm 크기의 plastic container의 바닥에 습도 92%를 유지하기 위해 종이 타올을 깔고, 살균된 망을 깔아 그 위에 괴경을 놓고, plastic container를 밀봉하여, 24±1℃, 암상태에서 배양한 후, 72시간 뒤에 괴경의 접종 부위를 잘라 sterile pipette tips의 중간부분을 기준으로 하여 병징의 크기를 측정하고, Dry, Brown, Maceration으로 나누어 판별하였다.

#### **마. DNA 추출 및 Polymerase Chain Reaction(PCR), Electrophoresis**

본 실험에서는 Isabel 등(1993)의 방법을 변형하여 사용하여 DNA를 추출하였다 (Mejjed et al., 1994, James et al., 1992).

UNO II Thermocycler(Biometra, Germany)를 이용하여 Yang등(1997)의 방법을 사용하였다.

수평 전기이동 장치(Owl's standard, OWL Scientific)를 이용하여 Hosaka 등(1994)의 방법으로 전기영동하였다.

DNA marker로는 pGEM<sup>3</sup> DNA(Promega, USA)를 사용하였고, UV illuminator(Vilber Loumat, France)로 band를 확인하고, Polaroid camera(Film 667)을 이용하여 촬영하였다.

## 제 3 절 결과 및 고찰

### 1. 접종 농도 규명 결과

괴경에 대한 세균성 무름병 검정의 적정 농도 및 접종량을 결정하기 위하여 다양한 농도의 현탁액 25 $\mu$ l와 50 $\mu$ l를 무름병에 감수성으로 알려진 재배품종 수미에 접종 실험 하였다. 접종량 25 $\mu$ l에 접종하는 경우에 시간이 5일 이상 지난 후 병징이 나타났고, 50 $\mu$ l 접종을 한 경우 72시간 후에 병징을 확인할 수 있었다. 그리고, 접종 농도는 1.1~1.1 $\times 10^9$ cells/ml로 하여 실험한 결과 1.1 $\times 10^7$ cells/ml에서 조직이 파괴되어 병징을 육안으로 확인할 수 있었고, 1.1 $\times 10^7$ cells/ml이하의 농도에서는 접종 부위에 육안으로 관찰하기에 미세한 Dry가 일어났다.( Fig 2). 따라서, 10<sup>7</sup>cells/ml의 균현탁액을 가지고 괴경에 50 $\mu$ l 접종하여 실험을 수행하였다.

### 2. 잎의 접종에 의한 저항성 검정 결과

기내 식물체의 잎에 E.c.a.와 E.c.c.를 접종한 결과는 Table 5에 나타난 바와 같다. 저항성 대조 clone으로 사용된 *S. brevidens* clone(ps-6A)가 E.c.a.와 E.c.c.에서 모두 강한 저항성을 나타내었고, *S. cardiophyllum* PI283062-1(cph-A-1), PI283063-1(cph-C-1)은 E.c.a.에 대해서는 1.28과 0.90 그리고 E.c.c.에 대해서는 0.63, 1.47로 저항성을 나타내었다. ps-6A는 이미 괴경 무름병에 대해 서만 저항성이 있다고 알려졌으나 흑각병을 일으키는 E.c.a.에 대해서도 다소 저항성인 것으로 판명되었다. cph-A-1은 E.c.c.에 대하여, cph-C-1은 E.c.a.에 대하여 상대적으로 다소 높은 저항성이 있음을 보여주고 있다.

ps-6A와 재배종 *S. tub.* clone CR4#2사이의 체세포 잡종인 A206은 두 균주에 대하여 모두 민감성인 반면, A937은 두 균주에 대하여 모두 저항성으로 판명되었다. 그러나, A206과 Katahdin의 1대, 2대 교배에는 저항성인 것(C1-31, C75-5)과 민감성인 것들이 섞여 있었다.

재배종 *S. tuberosum*은 *E.c.a.*에 대해서는 0.10~7.56으로, *E.c.c.*에 대해서는 0.27~8.25로, *S. tuberosum* cv. Katahdin은 *E.c.a.* 0.10, *E.c.c.*0.27로 평균 0.18의 강한 저항성으로 판별되었고, *S. tuberosum* cv. Dejima도 *E.c.a.*에 대해 0.41로 강한 저항성으로 판별되었다.

이식된 식물체의 잎을 이용하여 두 가지 *Erwinia*속 균, *E.c.a.*와 *E.c.c.*에 대하여 저항성 검정을 한 결과는 Table 6과 같이 나타났다.

야생 *Solanum*종에서 *E.c.a.*에 대해서는 0.23~13.34, *E.c.c.*에 대해서는 0.48~11.32의 값이 나왔다. *brevidens* PI218228(ps-6A)가 강한 저항성을 나타내었고, *S. cardiophyllum* PI283062-1(cph-A-1)이 저항성이 있는 것으로 나타났고, 그 이외의 대부분의 야생종들은 감수성과 강한 감수성을 나타냈다.

ps-6A와 재배종 *S. tub.* clone CR4#2의 체세포 잡종인 A206과 A937, 그리고 A206의 자식세대는 *E.c.a.*가 0.23~5.74로, *E.c.c.*에 대해서는 0.33~5.36로 기내 식물의 결과와 유사하였다. 잡종인 A937은 0.23, 0.33, 0.28로 두 균에 대하여 강한 저항성을 나타내었고, A206은 *E.c.a.*에 대해서는 5.74로 강한 감수성을 나타낸 반면에, *E.c.c.*에 대해서는 0.82로 저항성이 있는 것으로 나타났다. 또한 A206의 자식세대인 CL-31은 *E.c.a.*에 대해서는 0.43으로 강한 저항성을 나타냈지만, *E.c.c.*에 대해서는 0.59로 저항성을 나타내 기내 식물체의 잎을 이용한 저항성 검정 결과와 다소 차이가 있는 것으로 나타났다.

### 3. 이식된 식물체 shoot의 저항성 검정 결과

이식된 식물체의 shoot을 이용하여 *Erwinia*속 균 *E.c.a.*에 대하여 저항성 검정을 한 결과는 Table 7.8과 같이 나타났다.

재배종들은 모든 종에서 병징의 정도가 5를 나타내어 강한 감수성임을 보여주고, 야생종에서는 *S. brevidens*(ps-6A)가 강한 저항성을 나타내었고, *S. cardiophyllum* PI283062-1(cph-A-1)과 PI283063-1(cph-C-1)이 각각 2와 1.5의 병징으로 저항성과

강한 저항성을 보여주고 있다. 또한 *S.sparsipilum* PI310959은 저항성인것과 민감성인 clone이 섞여 있었다. 그러나 다른 야생종에서는 감수성 내지 강한 감수성을 보여주고 있다. 융합체중에서는 A937과 A249는 저항성, A206은 감수성을 보여주고 있다. 그리고 융합체 A937의 1대 자손 중에서 WE-9와 WE-15, WE-8과 WE-17이 강한 저항성과 저항성을 보여 주고 있으나, 나머지 개체들은 감수성 및 강함 감수성을 보여주고 있다.

앞으로 한 실험과 shoots로 한 실험의 결과가 상이하게 나왔다. 앞의 실험에서는 그동안 민감성으로 문제가 있었던 재배종( 대지, Katahdin)이 저항성으로 나왔는데, 이는 이들 품종의 기내 식물체가 다른 식물체보다 건강하게 성장한 결과로 생각될 수 있다. 즉, 앞의 실험으로는 식물체 상태가 결과에 큰 영향을 주는 것 같다. 그러나 shoots에 접종한 결과는 민감성 대조군으로 이용된 수미, 저항성인 ps-6A가 각각 민감성과 저항성을 보여 앞보다는 shoots가 좀더 저항성 반응을 가깝게 판별할 수 있는 것으로 생각된다. 따라서, 나수의 clone을 판별하기 위하여 shoot를 이용할 수도 있다고 판단된다.

#### 4. 괴경에 대한 세균성 저항성 검정 결과

우선 99년도에 수행되어진 괴경의 세균성 저항성 검정은 재배종, 융합체 및 자손, 야생종, 반수체와 야생종의 교배종, 반수체 등 총 39종 73개체를 대상에 대한 실험 결과는 Table 9, 10, 11에 나타난 바와 같다.

야생종은 *S. cardiophyllum* PI283062(cph-3, cph-22)이 *E.c.a*와 *E.c.c*에 모두에 저항성을 보여주는 반면 나머지 중에서 두 세균에 대해 함께 저항성을 보여주는 개체는 없었다.

*S. commersonii* PI320266가 포함된 융합 잡종 및 자손은 대부분 민감하였다. *S.tub.* 반수체에서는 HW-6이 매우 낮은 저항성으로 나타났고, .HIC-20이 *E.c.c*에 저항성을 보였고, 이외의 clone들은 모두 민감하였다.

2001년도에 수행되어진 괴경의 세균성 저항성 검정에 대한 E.c.c. 집중실험 결과는 Table 12에 나타난 바와 같다.

재배종에서는 모두 강한 감수성을 보여주었으며, 야생종 중에서는 위에서 행해진 모든 실험에서와 마찬가지로 *S. cardiophyllum* PI283062-1(cph-A-1)이 저항성을 보여 주었다. 융합체 및 그 자손들중에서 A206, C1-31, C1-75, C31-5, C31-16에서 저항성을 나타내어주었다. 반면에 shoot를 이용한 실험에서 강한 저항성을 보여 주었던 A937의 후대 자손에서는 WE-13만이 약한 저항성을 보여줄뿐 다른 개체에서는 대부분 강한 감수성을 보여주고 있다. 이런 측면을 볼 때 , 괴경과 줄기에서의 세균성 무름병에 대한 방어 기작이 서로 다를 수 있다. 그러나 *S. brevidens* 융합잡종 A937과 *S. cardiophyllum* Clone (cph-A-1, cph-C-1)은 모든 실험에서 E.c.a와 E.c.c에 다 저항성으로 나타나 이들의 자손 중 저항성인 것을 추적 선발할 필요가 있다고 판단된다.

## 5. RAPD 분석

Operon primer 40개(kit A, B)와 20개 UBC primer를 이용하여 DNA band를 분석한 결과 3개의 Operon primer에서 band size가 410~3,262bp인 polymorphic band를 관찰하였고, 9개의 UBC primer에서 band size가 350~2,061bp인 polymorphic band를 관찰하였다( Table 13 ).

Operon primer에서 관찰된 polymorphic band중에서 OPA2의 1,030bp와 OPA19의 3,262bp 조각이 저항성으로 보이는 ps6A와 A937에서만 보이고 다른 교배자손 clone에는 전달되지 않았다. OPA2의 2,646bp band는 저항성 양친 ps6A와 저항성 융합잡종과 1대 자손 C1-35에만 나타나고 감수성 양친과 다른 교배 자손에는 나타나지 않았다. 또한, 괴경의 무름병에 저항성으로 보여지는 ps6A와 A206, A937, C1-31, C1-75, C31-5에 동시에 나타나는 DNA조각은 나타나지 않았다.

polymorphic band를 가진 9개의 UBC primer에서는 #472의 436bp의 band가

ps6A로부터 A937로만 전달되어져서 저항성이 있는 DNA 조각으로 보여진다.

세균성 무름병에 대한 저항성 유전자라고 알려진 *gus gene*를 이용하여 형질전환을 시도하는 연구가 수행되고 있지만 무름병에 대한 저항성 유전인자가 단지 하나의 특정 유전자에 의해 나타나는 것이 아니라 여러 유전자의 복잡한 상호작용으로 인해 나타난다고 보여지지만, 아직 유전학적 근거는 아직 알려지지 않고 있다.

본 실험에 사용된 RAPD 분석법은 RFLP에 비해 손쉽고, 동위원소를 사용하지 않는 안정성과 소량의 DNA양으로 실험이 가능하다는 이점을 가지고 있어, 현재 유전자 지도 작성, 계통수 분석, *gene targeting* 등 많은 곳에 사용되고 있다(Javed et al., 1994 ; Halden et al., 1944).

앞으로 더 많은 primer와 개체수를 이용하여 저항성에 관련된 polymorphic band를 찾아내는 실험이 수행되어야 할 것이다.

Table 5. The effects of *in vitro* plant leaf inoculation of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *E. carotovora* subsp. *carotovora* on *Solanum tuberosum*, fusion hybrids, progenies, and other *Solanum* species.

Clones	E.c.a.		E.c.c.	
	A	DR	A	DR
<b><u>Fusion hybrids and progeny</u></b>				
CR4#2	5.06	HS	4.32	HS
ps6A	0.49	HR	0.24	HR
A206	3.12	HS	5.68	HS
A937	0.34	HR	0.02	HR
CL-31	0.05	HR	0.00	HR
CL-75	2.09	S	1.18	R
C31-5	1.27	R	1.12	R
C75-5	0.74	R	1.07	R
C75-5-210	2.38	S	1.51	S
C75-5-297	2.39	S	5.52	HS
<b><u>Cultinars</u></b>				
Kat	0.10	HR	0.27	HR
Dejima	0.41	HR	11.24	HS
Nooksac	7.56	HS	8.25	HS
<b><u>Solanum species</u></b>				
Lz 3.1	2.28	S	2.49	S
Lz 3.2	4.06	HS	9.74	HS
Lz 3.4	2.48	S	9.74	HS
Lz 3.5	11.24	HS	4.08	HS
1-7	1.92	S	4.05	HS
3-10	2.73	HS	2.20	S
13-3	5.91	HS	4.02	HS
13-5	4.46	HS	3.02	HS
chq-A	1.25	R	3.83	HS
chq-B	1.62	S	1.91	S
chq-E	2.23	S	5.63	HS
pin-B	2.20	S	3.20	HS
chm-B-2	9.01	HS	7.17	HS
cph-A-1	1.28	R	0.63	R
cph-C-1	0.90	R	1.47	R
pnt-A	4.05	HS	2.97	HS
ber-B-1	12.10	HS	9.68	HS
chm-A	5.64	HS	3.30	HS

\*Note : A : (Lesion step × Frequency)Average ·

DR (Disease Reaction) :

HR (High Resistant): 0.00 ~ 0.50 · R (Resistant) : 0.51 ~ 1.50 ·  
 S (Susceptible) : 1.51 ~ 2.50 · HS (High Susceptible) : 2.51 ~

Table 6. The effects of potted plant leaf inoculation of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *E. carotovora* subsp. *carotovora* on *Solanum tuberosum*, fusion hybrids, progenies, and other *Solanum* species.

Clones	E.c.a.		E.c.c.	
	A	DR	A	DR
<b>Fusion hybrids and progenies</b>				
CR4#2	4.87	HS	2.32	S
ps6A	0.23	HR	0.48	HR
A206	5.74	HS	0.82	R
A937	0.23	HR	0.33	HR
CL-31	0.43	HR	0.59	R
CL-75	1.24	R	2.17	S
C31-5	3.39	HS	5.36	HS
C75-5	1.28	R	2.23	S
C75-5-210	0.90	R	1.06	R
C75-5-297	1.43	R	1.84	S
<b>Cultivars</b>				
Kat	0.48	HR	0.49	HR
Dejima	0.56	R	0.20	HR
Atlantic	2.32	S	1.77	S
Superior	2.72	HS	3.22	HS
Nooksac	7.01	HS	7.01	HS
<b>Solanum species</b>				
1-7	0.94	R	2.81	HS
chq-A	5.34	HS	4.73	HS
chq-B	3.13	HS	1.69	S
chq-E	2.07	S	2.07	S
pin-B	9.86	HS	11.32	HS
chm-B-2	9.24	HS	9.24	HS
cph-A-1	1.02	R	0.57	R
pnt-A	2.67	HS	1.56	S
ber-B-1	13.34	HS	4.44	HS
pin-B-1	5.97	HS	8.33	HS
PT 29	7.50	HS	7.50	HS

※Note : A : (Lesion step×Frequency)Average

DR (Disease Reaction) - HR (High Resistnat)0.00~0.50

R(Resistant):0.51~1.50

S (Susceptible):1.51~2.50

HS (Hihg Susceptible) : 2.51

Table 7. The effects of shoot inoculation of *Erwinia carotovora* subsp. *atroceptica* on *Solanum tuberosum* and wild species

Clone	Degree of Blackleg	DR	Clone	Degree of Blackleg	DR
<b><u>Cultivars</u></b>					
CR4#2	5	HS	Dejima	5	HS
Katahdin	5	HS	Superior	5	HS
Atlantic	5	HS	Irish cobbler	5	HS
<b><u>Wild species</u></b>					
ps6A	1	<b>HR</b>	ber-B-1	4.3	HS
1-7	5	HS	tbr1-1	5	HS
13-3	4.3	HS	tbr1-2	5	HS
13-5	5	HS	tbr1-3	4.4	HS
chq-A	5	HS	tbr1-4	4.2	HS
chq-B	5	HS	tbr1-5	5	HS
pin-B-1	5	HS	tbr1-6	5	HS
pin-A	5	HS	tbr1-7	5	HS
cph-A-1	2	<b>R</b>	tbr1-8	5	HS
cph-C-1	1.5	<b>HR</b>	tbr1-9	4.7	HS
spl-1	4.5	HS	tbr2-1	4.3	HS
spl-2	4.7	HS	tbr2-2	4	S
spl-3	4	S	tbr2-3	4.7	HS
spl-4	3.7	S	tbr2-4	4.6	HS
spl-5	3	<b>R</b>	tbr2-5	5	HS
spl-6	4.7	HS			

※ Note DR (Disease Reaction) :

HR (High Resistnat): 0.00 ~ 1.5 · R (Resistant) : 1.51 ~ 3.0 ·

S (Susceptible) : 3.1 ~ 4.0 · HS (Hihg Susceptible) : 4.1 ~ 5.0

Table 8. The effects of shoot inoculation of *Erwinia carotovora* subsp. *atroceptica* on fusion hybrids and progenies

Clone	Degree of Blackleg	DR	Clone	Degree of Blackleg	DR
<b><u>Fusion hybrids and Progenies</u></b>					
A206	3.1	S	WE-5	4.6	HS
A249	2	<b>R</b>	WE-8	3	<b>R</b>
A937	0.6	<b>HR</b>	WE-9	0.7	<b>HR</b>
C1-31	4	S	WE-10	4.8	HS
C1-75	4.6	HS	WE-11	4.6	HS
WD-1	4.8	HS	WE-12	4.8	HS
WD-2	4.3	HS	WE-13	4.6	HS
WD-3	4.4	HS	WE-14	4.2	HS
WD-4	4.6	IIS	WE-15	1.3	<b>HR</b>
WD-5	5	HS	WE-16	4.2	HS
WD-6	5	HS	WE-17	2.8	<b>R</b>
WD-7	4.3	HS	WE-18	4.5	HS
WD-8	4	S	C31-12	4.9	HS
WD-9	4.7	IIS	C31-13	4.5	HS
WE-1	4.2	HS	C31-14	5	HS
WE-2	4.6	IIS	C31-15	4	S
WE-3	4.2	HS	C75-5	3.8	S
WE-4	5	HS	C75-14	4.7	HS

\* Note DR (Disease Reaction) :

HR (High Resistant): 0.00 ~ 1.5 · R (Resistant) : 1.51 ~ 3.0

S (Susceptible) : 3.1 ~ 4.0 · HS (High Susceptible) : 4.1 ~ 5.0

Table 9. The effects of tuber inoculation of *Erwinia carotovora* subsp. *atroceptica* and *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on *Solanum tuberosum*, fusion hybrids, progenies, and other *Solanum* species.

Clones	E.c.a.		E.c.c.	
	LS	DR	LS	DR
	10 <sup>7</sup> cells/ml		10 <sup>7</sup> cells/ml	
1007	0	HR	D	HR
<b>Cultivars &amp; Fusion Hybrids and progenies</b>				
CR4#2	3.5M'	HS	10.5M	HS
Dejima	0.8D	R	0.5D	HR
Katahdin	0	HR	0	HR
Nooksac	0.8D	R	1.2B	R
CL-31	0.5D	HR	3.2M	HS
CL-75	D	HR	5.8M	HS
C31-5	BD	HR	10.0M	HS
C75-5	D	HR	5.0M	HS
C75-5-210	D	HR	6.5M	HS
C75-5-297	D	HR	5.7M	HS
<b>Fusion Hybrids and Progenies</b>				
HA06-1	2.0M	S	2.0B	S
HA06-2	3.2B	HS	5.5M	HS
CT01-1	2.0B	S	4.2M	HS
CT01-4	2.0B	S	3.8B	HS
CT02-1	6.8B	HS	9.0M	IIS
CT03a-1	6.0M	HS	5.2M	HS
CT03a-3	3.2B	HS	5.5M	HS
CT10a-1	12.0M	HS	2.0B	S
CT10b-4	2.2B	S	11.2M	HS
CT206-4	2.7B	R	8.0M	HS
CT206-7	3.5M	S	8.3M	HS
CT206-10	1.5D	R	3.2B	HS
CT206-11	0.8B	R	5.5M	HS
CT206-15	3.7M	HS	12.0M	HS
<b>Solanum species</b>				
bst1-2	2.0B	S	1.0B	R
bst1-6	2.5B	S	3.0B	S
bst1-42	1.0B	R	3.0B	S
bst1-67	1.0B	R	1.5B	R
bst1-70	2.2B	S	2.0B	S
cph-3	B	HR	B	HR
cph-22	1.0B	R	1.5B	R

\*Note : LS, DR, M, B, D are same Table10

**Table 10.** The effects of tuber inoculation of *Erwinia carotovora* subsp. *atroceptica* and *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on tuber between haploids of cultivars and *Solanum* species.

Clones	E.c.a.		E.c.c.	
	LS	DR	LS	DR
	10 <sup>7</sup> cells/ml		10 <sup>7</sup> cells/ml	
F1-11	2.5B	S	2.8B	S
F1-25	3.6M	HS	1.7B	S
F1-31	1.5B	R	2.0B	S
F2-8	2.5B	S	2.5B	S
F2-35	3.0B	S	3.0B	S
F5-18	2.5B	S	1.5B	R
F7-2	2.7M	S	1.8B	S
F9-19	D	HR	2.5B	S
F9-69	3.5B	HS	3.0B	S
F9-98	1.5B	R	1.5B	R
F9-99	4.0M	HS	2.5B	S
F9-114	1.0B	R	1.5B	R
F10-66	1.0B	R	2.0B	S
F13-40	2.0B	S	1.5B	R
F17-28	2.0B	S	2.5B	S
F23-11	2.5B	S	2.0B	S
F24-5	13.3M	HS	1.8B	S
F24-6	2.0B	S	2.0B	S
F25-14	1.5B	R	3.5B	HS
F25-27	0.5D	HR	0.7D	R
F25-28	1.5B	R	1.0B	R
F25-31	0.5D	HR	1.3B	R
F25-70	2.8B	S	2.8B	S
F25-75	2.0B	S	3.0B	S
F25-8	D	HR	2.0B	S
F25-93	3.5M	HS	2.3B	S
F27-3	1.0B	R	D	HR
F30-2	2.5B	S	2.5B	S
F76-55	3.0B	S	2.8B	S

\*Note : D : dry B : brown M : maceration · LS : Lesion size(mm) and symptom

DR - Disease Reaction

- HR (High Resistnat): 0.00 ~ 0.50      · R (Resistant)                      : 0.51 ~ 1.50
- S (Susceptible)                      : 1.51 ~ 3.00      · HS (Hihg Susceptible) : 3.01 ~

Table 11. The effects of tuber inoculation of *Erwinia carotovora* subsp. *atroceptica* and *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on hiploids of *S. tuberosum*.

Clones	E.c.a.		E.c.c.	
	LS	DR	LS	DR
	10 <sup>4</sup> cells/ml		10 <sup>4</sup> cells/ml	
DH4-2	2.5B	S	1.5B	R
DH13-38	1.0D	R	1.5B	R
DH33-3	1.0B	R	2.5B	S
DH37-2	2.0B	S	1.5B	R
Hat-9	2.0M	S	2.0B	S
HIC-20	2.5B	S	D	HR
HK-22	1.7B	S	1.5B	R
HK-48	2.2B	S	2.2B	S
HV35-20	2.0M	S	1.0B	R
HV35-21	2.2B	S	2.2B	S
HW-6	1.0B	R	1.5B	R

\*Note : D : dry B : brown M : maceration · LS : Lesion size(mm) and symptom

DR - Disease Reaction

· HR (High Resistnat): 0.00 ~ 0.50

· R (Resistant) : 0.51 ~ 1.50

· S (Susceptible) : 1.51 ~ 3.00

· HS (Hihg Susceptible) : 3.01 ~

**Table 12. The effects of tuber inoculation of *Erwinea carotovora* subsp. *carotovora* on *Solanum tuberosum*, fusion hybrids, progenies and other *Solanum* species**

Clones	LS	DR	Clones	LS	DR
<b><u>Cultivars</u></b>					
Dejima	8.5M	HS	Atlantic	8.0M	HS
Katahdin	7.3M	HS	Irish cobbler	8.5M	HS
Superior	9.3M	HS			
<b><u>Wild species</u></b>					
eph-A-1	1.5B	<b>R</b>			
<b><u>Fusion hybrids and progenies</u></b>					
2007	D	<b>HR</b>	WE-1	5.3M	S
A206	3.0B	<b>R</b>	WE-4	6.5M	S
C1-31	3.3B	<b>R</b>	WE-5	7.7M	HS
C1-75	3.3B	<b>R</b>	WE-6	6.3M	S
WD-1	6.2M	S	WE-8	6.0M	S
WD-2	4.6B	S	WE-10	7.6M	HS
WD-3	4.5B	S	WE-11	6.7M	S
WD-6	2.6B	<b>R</b>	WE-12	6.3M	S
WD-7	1.6B	<b>R</b>	WE-13	3.6B	<b>R</b>
WD-8	1.0B	<b>R</b>	WE-18	5.8M	S
C31-5	D	<b>HR</b>	C75-5-210	4.2B	S
C31-16	1.0B	<b>R</b>	C75-5-297	4.3B	S

※Note : D : dry B : brown M : maceration

LS : Lesion size(mm) and Symptom

DR - Disease Reaction · HR (High Resistant): 0.0 · R (Resistant) : 0.1 ~ 4.0

· S (Susceptible) : 4.1 ~ 7.0 · HS (High Susceptible) : 7.1 ~

**Table 13. RAPD data of 12 clones of resistance & susceptible fusion parents, somatic hybrids, crossed and progenies. Primer numbers are Operon Primer.**

Primer	Polymorphic Band(bp)	CR4#2	ps6A	A206	A937	Kat	C1-3 1	C1-7 5	C31- 5	C75- 5	C75-	C75-	Atl △
		△	▲								5 -210	5 -297	
OPA 2	2,645	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	2,225	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	1,181	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	1,030	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	481	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	410	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-

Note : The oligonucleotide primers(10-mers) used for generation of RAPDs.

(+ : Presence of the RAPD marker, - : Absense of the RAPD marker

▲ : Resistance clone, △ : Susceptible clone)



**Fig.1 Amplification products obtained using DNA extracted from 12 clones and employing Operon primer.**

M : pGEM DNA Marker, a : CR4#2, b : ps6A c : Kat, d : Atl,  
 h1 : a+b, A206 h2 : a+b, A937 1 : CL-31 2 : CL-75  
 3 : C75-5-210 4 : C75-5-297

## 참 고 문 헌

A. F. Reeves, O. M. Olanya, J. H. Hunter, and J. M. wells, 1999. Evaluation of Potato Varieties and Selcetions for Resistance to Bacterial Soft Rot. Amsrican Journal of Potato Research, 76:183-189.

Austin, S., Bacer, M., and Helgeson, J.P. 1985. Transfer of resistance to potato leaf roll virus from *Solanum brevidens* into *Solanum tuberosum* by somatic fusion. Plant Science. 39:75-82.

Austin, S., E. Lojkowska, M. K, Ehlenfeldt, A, Kelman & J, Helgeson, 1988. Fertile interspecific somatic hybrids of *Solanum* : a novel source of resistance to *Erwinia* soft rot. Phytopathology 78: 1216-1220.

Austin, S., Ehlenfeldt, M., Bacer, M., and Helgeson, J.P. 1986. Somatic hybrids produced by protoplast fusion between *S. tuberosum* and *S. brevidens*: Phenotypic variation under field conditions. Theor. Appl. Genet. 71:682-690.

Bai. D., Reeleder, R., Brandle, J. E., 1995. Identification of two RAPD markers tightly linked with the *Nicotina debneyi* gene for resistance to black root of tobacco, Theor. appl. Genet. 91:1184-1189.

Bain, R.A. & M.C.M. Perombelon, 1988. Methods of testing potato cultivars for resistance to soft rot of tubers caused by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. Plant Pathology 37:431-437.

Barcaccia, G., Tavoletti, S., Pezzotti, M., Falcinelli, M., & Veronesi, F., 1994.

Fingerprinting of alfalfa meiotic mutants using RAPD marker, *Euphytica* 80:19-25.

Barsby, T., Shepard, J., Kemble, R., and Wong, R. 1984. Somatic hybridization in the genus *Solanum*: *S. tuberosum* and *S. brevidens*. *Plant Cell Rep.* 3:165-167.

Binding, H., Jain, S., Finger, J., Mordhorst, G., Nehls, R., and Gressel, J. 1982. Somatic hybridization of an atrazine resistant biotype of *Solanum nigrum* with *Solanum tuberosum*. *Theor. Appl. Genet.* 63:273-277.

Bourne, W. F., D. C. McCalmont & R. L. Wastile, 1981. Assessing potato tubers for susceptibility to bacterial soft rot (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*). *Potato Research* 24: 409-415.

Butenko, R., and Kuchiko. A. 1979. Somatic hybridization of *Solanum tuberosum* L and *Solanum chacoense* Bitt. by protoplast fusion. Pages 239-397 in *Advances in Protoplast Reseach*. Akad. Kiado, Budapest.

Ciamp-Pinno, L. & N. Andrade-Soto, 1984. Preliminary evaluation of bacterial soft rot resistance in native Chilean potato clones. *American Potato Journal* 61:109-112.

Cromarty, R.W. and G.D. Easton, 1973. The incidence of decay and factors affecting bacterial soft rot of potatoes. *American Potato Journal* 50:398-407.

Corsini, D., and Pavek, J. 1986. Bacterial soft-rot resistant potato germplasm.(Abstr.) *Am. Potato J.* 63:417.

Ehlenfeldt, M. K., and Helgeson, J. P. 1987. Fertility of somatic hybrids from protoplast fusion of *Solanum brevidens* and *S. tuberosum*. *Theor. Appl. Genet.* 73:395-402.

Evans, D. 1983. Agricultural application of plant protoplast fusion. *Biotechnology* 1:253-261.

Francoise Rousselle-Bourgeois and Sylve Priou, 1995. Screening tuber-bearing *Solanum* spp. for resistance to soft rot caused by *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* (van Hall) Dyc. *Potato Research* 38, 111-118.

Hallden, C., Nilson, N. O., Rading., I. M and Sali, T. 1994. Evaluation of RFLP and RAPD markers in a comparison of *Brassica napus* breeding lines. *Theor. Appl. Genet.* 88:123-128.

Hanneman, R. E. Jr & J. B. Bamberg. 1986. Inventory of tuber-bearing *Solanum* species. Wisconsin Agricultural Experimental Station, Sturgeon Bay, USA, Bulletin 533, 216pp.

Helgeson, J.P., ZG. J. Hunt, G. T. Haberlach & Austin, 1986. Somatic hybrids between *Solanum brevidens* and *Solanum tuberosum*: Expression of a late blight resistance gene and potato leaf roll resistance. *Plant Cell Reports* 3:212-214.

Hongyu Tang & Jutta Kruger, 1994. Identification of RAPD marker linked to the Vf

gene for scab resistance in apples. *Euphytica*. 77:83-87.

Hosaka, K., Mori, M., and Ogawa, K., 1994. Genetic Relationships of Japanese Potato Cultivars Assessed by RAPD Analysis. *American Potato Journal*. 71:535-547.

Isabel, N., Tremblay, L., Michaud, M., Tremblay F. M., and Bousquet, J., 1993. RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis - derived populations of *Picea mariana*(Mill) B.S.P., *Theor. Appl. Genet.* 86:81-87.

Javed, Iqbal M. & Lane Raybura, A., 1994. Stability of RAPD markers for determining cultivars specific DNA profiles in rye(*Secale Cereale L.*). *Euphytica*. 75:215-220.

Koppel, M., 1993. Methods of assessing potato tuber for resistance to bacterial soft rot. *Potato Research* 36:183-188.

Krause, B., Koczy, T., Komorowska-Jedrzejewska, J., and Ratuszniak, E. 1982. Laboratory determination of tuber resistance to the chief storage rots in a world collection of potato varieties. *Biul. Inst. Ziemniaka* 27:111-134

Lapwood, D.H., P.J. Read, 1985. A simplified slice methods for assessing tuber susceptibility of potato cultivars to *Erwinia carotovora* subsp *atroseptica*. *Plant Pathology* 34:284-286.

Lapwood, D.H., P.J. Read, and J. Spokes, 1984. Methodss for assessing the susceptibility of potato tubers of different cultivars to rotting by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *carotovora*. *Plant Pathology* 33:13-20.

Lim, C. K. 1995. Bacterial soft rot of chicory by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Korean J. Plant Pathol.* 11: 116-119

Lyon, G.D, 1989. The biochemical basis of resistance of potatoes to soft rot *Erwinia* spp. - a review, *Plant Pathology* 38:313-339.

Maher, E. A., and Kelman, A. 1983. Oxygen status of potato tuber tissue in relation to maceration by pectic enzyme of *Erwinia carotovora*. *Phytopathology* 73:536-539.

Mcguire, R. G., and Kelman, A. 1983. Susceptibility of potato cultivars to *Erwinia* soft rot. (Abstr.) *Phytopathology* 73:809.

Melchers, A., Sacristan, M. D., and Holder, S. A. 1978. Somatic hybrid plant of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg Res. Commun.* 43:203-218.

Patricio Arce, Mauricio Moreno, Monica Gutierrez, Marlene Gebauer, Paoa Dell'Orto, Hebert Torres, Ivette Acuna, Pauline Oligier, Alejandro Venegas, Xavier Jordana, Julio Kalazich, and Loreto Holuigue. 1999. Enhanced Resistance to Bacterial Infection by *Erwinia Carotovora* Subsp. *Atroceptica* in Transgenic

Potato Plants Expressing the Attacin or the Cecropin SB-37 Genes.

Perombelon, M.C.M. and A. Kelman, 1980. Ecology of soft rot erwinias. Annual Review of Phytopathology 18:61-87

Perombelon, M.C.M. and A. Kelman, 1987. Blackleg and other potato diseases caused by soft rot erwinias: Proposal for revision of terminology. Plant Disease 71:283-285.

Piara S. Bains, Vikram S. Bisht, Dermot R. Lynch, Lawrence M. Kawchuk, and J.P. Helgeson, 1999, Identification of Stem Soft Rot (*Erwinia Carotovora* Subspecies *Atroseptica*) Resistance in Potato : American Journal of Potato Reserch 76:137-141

Priou, S., K. Al Ani & B. Jouan, 1992. Comparison of the effectiveness of two methods of screening potato soft rot induced by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Van Hall 1902). Proceeding of the Joint Conference of the EAPR Breeding & Varietal Assesment Section and the EUCARPIA Potato Section. Lnderneau, France, January 1992, pp, 139-140.

Scott, D. H., Phillip, N. M., Lucia, A., James, D. K., 1994. Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD) Marker Variability between and within Gene Pools of Common Bean, J. AMER. SOC. HORT. SIC. 119(1):122-125.

Taku, O., Minoru, M., and Fusao, M., 1995. RAPD markers linked to the tomato

mosaic virus resistance gene, Tm-1, in tomato. *Jpn. J. Genet.* 70:179-184

Tzeng, K.C., R.G. McGuire, and A. Kelman, 1990. Resistance of tubers from different potato cultivars to soft rot caused by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *American Potato Journal* 67:287-305.

# 제 5 장 감자 유전자원의 세균병 포장저항성 검정 및 농업형질 특성검정

## 제 1 절 서 론

감자의 무름병(연부병, soft rot)은 *Erwinia carotovora* subsp. *caratovora*에 의해 유발되는 병으로 현재 국내의 모든 감자 재배지역에 많은 피해를 주고있는 병으로, 재배지가 습할 경우 재배초기에 발병해 수량에 막대한 영향을 줄뿐만 아니라, 감자수확 후 저장 및 수송 중에 많이 발병하여 감자의 품질을 크게 저하시킨다. 풋마름병은 중부 이남에 발생하는 토양성 병해이며, 세계적으로 감자에 심각한 피해를 주는 병으로 *Pseudomonas ralstonia(solanacaerum)*에 의해 유발된다.

아직까지 이러한 세균병에 저항성인 품종이 효과적으로 육성되지 못했고 야생종 중에서도 이에 대한 저항성 clone이 보고된 바 없다. 저항성을 가진 야생종을 교배, 혹은 세포융합을 통하여 재배종에 이전시키는 것은 재배종 간의 교배로는 이루어질 수 없는 작물육종에 매우 중요한 역할을 할 수 있다. 그러므로 야생종을 이용한 저항성 육종에는 무엇보다도 먼저 저항성 야생종 clone을 선별하는 것이 중요하다. 또 감자의 유전자원 중 유용한 유전자를 갖고 있으나, 재배종인 *S. tuberosum* 과 교배가 어려운 것들이 많으며(Hanneman 1994), 이들은 재배종의 반수체와의 교잡이나 세포융합을 하여 유전자를 도입할 수 있다. 저항성 야생종과 재배종과의 교배 혹은 세포융합에 의한 잡종은 저항성유전자의 도입뿐 아니라 최대한의 잡종강세를 유도할 수 있다는 점에서 영양번식 작물인 감자에서는 매우 효율적인 육종 효과를 얻을 수 있으리라 판단된다.

따라서 기존의 감자 품종뿐만 아니라 다양한 유전자원에 대하여 풋마름병 또는 무름병에 대한 저항성을 검정하여 유망계통을 선별함으로써 감자육종을 위한 기초자료를 얻고자 하였다.

## 제 2 절 재 료 및 방 법

### 1. 실험재료

세균병 저항성 검정을 위하여 사용된 시험재료는 표 1에서 보는 바와 같다. 종간 잡종 유전자원으로는 4배체로부터 유기된 감자 반수체와 근연야생종 2배체의 원형질체를 이용하여 체세포 융합을 통하여 획득된 유전자원 48계통과 감자 반수체와 근연야생종간의 교잡을 통하여 획득된 유전자원 115계통이 각각 사용되었다. 또한 수집된 유전자원 70 품종 및 계통과 우리나라 장려품종 10품종 등 총 243품종 및 계통이 사용되었다.

표 1. 세균병 저항성 검정에 사용된 감자 유전자원

구 분	계 통 수	비 고
종간잡종 1	48	원형질체 융합
종간잡종 2	115	반수체-야생종간 교잡후대
4배체 유전자원	70	
장려품종	10	
계	243	

### 2. 시험방법

세균병의 포장저항성 검정은 고랭지지역인 대관령 지역에서 조사되었다. 일반적으로 풋마름병원균은 온도가 높은 조건에서 다발하는 경향이다. 감자 유전자원의 검정 시료는 농촌진흥청 표준재배법에 따라 시비량은 질소-인산-가리를 15-18-12(N-P-K=kg/10a)의 비율로 시비하고 75 × 25cm의 간격으로 파종하여 재배하였다. 시험구 배치는 완전임의배치 3반복으로 처리하였다(표 2).

표 2. 세균병 포장저항성 검정을 위한 경종개요

공시지역	파종	수확	재식거리 (cm)	시비량 (N-P-K=kg/10a)	시험구배치
대관령	5월 상순	8월 하순	75×25	15-18-12 퇴비 1,500	완전임의배치 3반복

세균병 접종검정은 기내와 기외인 풋트 재배를 통하여 식물체에 접종하여 검정하였다. 사용된 병원 균주는 무름병의 경우 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, 풋마름병균의 경우 *Ralstonia solanacearum* 균주를 각각 이용하였다. Pot재배의 경우 정식 후 40일 경과한 감자 줄기에 풋마름병균 *R. solanacearum* race3의 농도를  $10^6$ ,  $10^8$  cell/ml 로 조절하여  $20\mu\text{l}$ 씩 접종하고 병징 발현 여부를 조사하였다.

조사방법은 발병지수를 0에서부터 5의 수준으로 분류하고 병징 발현이 전혀 나타나지 않은 경우 0, 잎 한 개가 부분적으로 시들은 경우는 1, 잎 2-3개가 시들은 경우 2, 상위 잎 2-3개를 제외하고 모두 시들은 경우 3, 모든 잎이 시들은 경우 4 그리고 지상부 식물체가 완전히 고사한 경우 5로 하여 발병지수를 측정하였다.

기타 주요 조사항목으로는 생육특성에 있어서 출현율, 경장, 경수, 초세, 초형 및 숙기 등을 조사하였고, 생리장애 특성으로는 괴경에서 주로 발생하는 열개성, 이차생장 등을 조사하였다. 아울러 괴경 및 수량 등과 관련한 농업형질특성으로서 괴경형태, 눈 깊이, 표피색 등 괴경특성과 총서수량, 괴경수 등 양적형질특성을 각각 조사하였다.

### 제 3 절 결과 및 고찰

#### 1. 체세포 중간잡종 후대 식물체의 특성 검정 및 세균병 저항성 검정

##### 가. 주요 형질특성 검정

체세포 중간잡종식물에 대하여 일차적으로 생육특성 및 개화유무를 조사하였다.

경장 및 초장의 경우 표 3에서 보는 바와 같이 계통에 따라 생육양상이 크게 차이가 났다. 초장에 있어서는 CT206-16의 경우 40cm로 가장 작았고, CT08-4는 118cm로 가장 컸으며, 평균 초장은 71.4cm였다. 경장의 경우도 초장의 분포와 유사하였으며, 평균적으로 65.7cm의 분포를 나타내었다. 이러한 결과는 체세포 융합을 통하여 획득된 식물체가 주로 4배체로서 양적형질 특성발현 양상이 2배체에 비해 높게 나타남을 알 수 있었다.

한편 공시된 48계통 중 개화된 식물체는 18.8%에 불과한 9계통만이 개화하였다. 개화특성의 경우 환경적 요인이 크게 작용하나 일차적으로는 유전적 소질이 가장 큰 영향을 미친다고 할 수 있다. 그러므로 체세포 융합잡종 식물의 경우 유전적 변이에서 유래한 불임성이 크게 작용했을 것으로 추정된다. 이와 같이 융합잡종식물에서 미개화 또는 불임에서 유래한 불화합성은 이들 식물을 이용한 교잡육종 소재로서는 부적합하다고 하겠다.

표 3. 꽃마름병 저항성 체세포융합 계통의 생육특성

계통명	경장(cm)	초장(cm)	개화유무 및 화색
CT01-1	48	54	-
CT01-2	59	62	-
CT01-4	61	69	-
CT02-1	41	45	-
CT02-2	75	80	purple+white
CT02-3	58	68	-
CT03A-1	93	100	-
CT03B-3	74	78	-
CT05-5	76	77	white
CT08-3	98	105	purple+white
CT08-4	66	73	purple+white
CT09A-3	110	118	purple+white
CT10B-2	37	47	-
CT10B-4	72	82	-
CT201-1	35	40	-
CT201-2	30	34	-
CT201-3	45	50	-
CT204-1	58	64	-
CT204-6	57	64	-
CT205-2	67	69	-
CT206-1	76	83	-
CT206-2	82	89	-
CT206-3	66	76	-
CT206-4	101	105	light purple+white
CT206-5	74	77	-
CT206-6	82	90	-
CT206-7	75	80	-
CT206-8	52	59	-
CT206-9	55	58	-

표 3. 계속

계 통 명	경장(cm)	초장(cm)	개화유무 및 화색
CT206-18	58	65	-
CT206-19	89	95	-
CT206-20	69	73	-
CT206-21	85	88	purple+white
CT206-10	80	84	light purple+white
CT206-11	40	45	-
CT206-12	42	45	-
CT206-13	63	70	-
CT206-14	79	87	-
CT206-15	53	59	-
CT206-16	35	40	-
CT206-17	64	67	-
CT206-18	58	65	-
HA06-1	64	70	-
HA06-9	52	56	-
HB28-2	104	114	-
LZ3.2	50	53	white
LZ3.4	50	53	-
LZ3.5	90	94	-
평 균	65.7	71.4	

부름병 저항성을 나타내는 것으로 알려진 C75-5등 6계통은 초장 및 경장이 비교적 작게 나타났는데, 평균적으로 각각 47.3cm 및 42.5cm의 크기를 보였다. 물론 계통간에 커다란 변이를 나타내었다. 또한 개화유부에 있어서는 모든 계통들이 전혀 개화되지 않았다(표 4).

표 4. 무류병 저항성 체세포융합 계통의 생육특성

계통명	경장(cm)	초장(cm)	개화유부 및 화색
C75-5	60	69	-
C75-5-210	35	38	-
C75-5-297	66	71	-
CL-31	42	48	-
C31-5	40	45	-
A937	12	13	-
평균	42.5	47.3	-

#### 나. 세균병 저항성 검정

체세포 융합잡종의 주요 세균병 중의 하나인 풋마름병에 대한 저항성을 조사한 결과는 표 5와 같다. LZ3.1은 *S. commersonii*에서 유래된 계통중의 한 clone으로 본 시험에서는 발병지수가 2.9로서 중도저항성을 나타내었다. 기내 접종실험에서 이들 LZ 계통 네 clone중 둘(LZ3.1, LZ3.5)은 감수성 둘(LZ3.2, LZ3.4)은 저항성이었다.

한편 LZ3.1계통에 재배종 계통을 교잡하여 육성한 HA그룹과 이들 HA그룹에 다시 재배종을 여교잡한 후대에서는 발병지수가 최저 1.2에서 최고 4.1까지의 분포를 나타내었다. 이러한 결과는 세균병에 약한 재배종 그룹에 체세포 융합잡종을 교잡하여 후대를 양성할 경우 효과적으로 세균병에 저항성인 식물체를 획득할 수 있음을 말해준다. 따라서 본 시험을 통하여 풋마름병에 비교적 저항성인 10계통의 체세포 융합잡종이 선발되었다.

표 5. 기내보존 유전자원에 대한 감자 꽃마름병 저항성 검정

계통명 <sup>1</sup>	발병지수 <sup>2</sup>	저항성 정도
LZ3.1	2.9	M
HA06-1	1.4	R
HA06-4	1.6	R
HA06-9	1.2	R
CT08-4	1.2	R
CT10B-4	1.6	R
CT201-1	1.1	R
CT201-2	2.4	M
CT201-3	2.1	M
CT204-1	2.0	M
CT204-4	2.2	M
CT204-5	1.8	R
CT204-6	2.1	M
CT204-7	2.1	M
CT204-8	2.1	M
CT204-9	2.1	M
CT204-10	1.9	R
CT206-1	2.1	M
CT206-3	2.0	M
CT206-4	2.1	M
CT206-5	2.4	M
CT206-9	1.8	R
CT206-11	2.4	M
CT206-13	4.1	S
CT206-16	1.9	R
CT206-17	4.2	S
CT206-20	2.4	M
CT206-21	2.5	M

<sup>1</sup>LZ3.1(*Solanum commersonii*-resistant to bacterial wilt)

HA(LZ×*Solanum tuberosum*)

CT(HA×*Solanum tuberosum*)

<sup>2</sup>Disease Index - 0: 무병징, 1: 잎 하나가 부분적으로 시듦, 2 : 잎 2-3개가 시듦  
3 : 상위 2-3잎을 제외한 나머지 잎이 시듦, 4 : 모든 잎이 시듦, 5 : 완전고사

## 2. 감자 반수체와 야생종의 중간교잡 후대잡종 식물체의 특성검정

재배종 감자 반수체( $2n=2x=24$ )와 근연야생종( $2n=2x=24$ )간의 교잡을 통하여 획득된 후대잡종( $2n=2x=24$ )에 대하여 생육특성 및 바이러스 이병도 그리고 무름병 저항성에 대하여 포장검정을 실시하였다.

중간교잡 후대잡종 식물체의 생육특성은 초세를 1에서부터 9까지의 지수를 적용하여 조사한 결과 계통군에 따라 최저 1.0에서부터 최고 9.0의 매우 커다란 분포를 나타내었고 평균적으로 4.4의 지수를 나타내었다. 한편 대비품종으로 사용된 4배체 장려품종인 수미의 초세가 6.7 정도인 것을 감안한다면 중간잡종 후대 식물체가 2배체임에도 불구하고 F-5 그룹의 경우 매우 강한 생육양상을 나타낸다고 하겠다. 이러한 결과는 이종간에서 유래한 유전자좌간의 상호작용 증대에 따른 잡종강세 현상으로 추정된다.

바이러스 이병도의 경우에 있어서도 계통군에 따라 최저 0에서부터 최고 9까지의 분포를 나타내었고 평균적으로 2.8의 지수분포를 보였다. 대비품종인 수미의 경우 평균 5.9의 높은 바이러스 이병도를 나타내었다.

한편 포장검정을 통한 이병도에 따른 무름병 저항성 검정을 생육시기별로 3회에 걸쳐 조사한 결과는 표 6에서 보는 바와 같다. 무름병의 발병조사는 장마기인 7월 하순부터 15일 간격으로 3회에 걸쳐 조사되었다. 1차 조사시기에는 무름병의 발병도가 상대적으로 적었으나 시기가 거듭됨에 따라 발병도가 점차 증대되었다. 1차 시기의 경우 후대잡종의 평균 발병도는 0.5였으나 2차 시기에는 1.5 그리고 3차 시기에는 6.3의 발병도를 나타내었다. 이러한 발병양상은 물론 계통군 및 계통에 따라 매우 큰 차이를 나타내었다. 또한 대비품종인 4배체 장려품종인 수미의 평균 발병도보다는 현저히 낮은 경향을 보여 중간교잡육종을 통하여 세균병 저항성 계통의 선발이 효과적으로 이루어 질 수 있음을 말해준다고 하겠다.

표 6. 대관령 포장에서 지상부 생육 및 병해 저항성

조합 군	조사 계통수	초세	virus				무름병 이병도			
			이병도		1차		2차		3차	
			평균	범위	평균	범위	평균	범위	평균	범위
F1	7	6.7	1.2	0.3-3.7	0.2	0.0-1.0	1.8	0.7-4.0	6.8	5.0-9.0
F2	2	4.5	1.3	0.5-2.0	0.0	0.0-0.0	0.8	0.5-1.0	7.0	5.0-9.0
F5	1	9.0	0.5	0.5	0.5	0.5	2.0	2.0	7.0	7.0
F7	1	1.0	9.0	9.0	3.0	3.0	3.0	3.0	7.0	7.0
F8	1	2.0	1.5	1.5	0.0	0.0	0.5	0.5	5.0	5.0
F9	11	5.5	1.2	0.0-2.7	0.5	0.0-2.0	1.7	0.3-4.3	6.4	3.0-8.3
F10	3	3.7	3.4	0.3-5.0	1.0	0.0-2.0	2.3	1.0-3.0	6.6	4.3-8.3
F13	6	3.7	2.8	0.7-7.0	0.3	0.0-1.5	1.1	0.0-1.3	5.8	1.0-9.0
F17	3	3.3	4.4	3.0-6.0	0.3	0.0-1.0	1.2	1.0-1.5	5.4	3.0-7.0
F19	1	1.0	9.0	9.0	0.0	0.0	1.0	1.0	7.0	7.0
F21	1	3.0	0.7	0.7	0.0	0.0	1.7	1.7	9.0	9.0
F24	4	3.7	2.1	1.3-3.0	0.1	0.0-0.3	1.3	0.0-3.0	5.2	1.0-9.0
F25	12	5.0	2.7	0.0-9.0	0.7	0.0-3.5	1.5	0.3-5.0	5.6	3.7-9.0
F26	2	4.8	2.7	2.3-3.0	0.2	0.0-0.3	0.4	0.3-0.5	4.5	3.0-6.0
F27	1	3.0	1.0	1.0	0.0	0.0	1.0	1.0	7.0	7.0
F28	1	7.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	3.0
F30	1	7.7	1.0	1.0	0.7	0.7	2.3	2.3	8.3	8.3
F70	1	1.0	9.0	9.0	0.0	0.0	1.0	1.0	9.0	9.0
92HC	24	4.5	3.6	0.7-9.0	1.0	0.0-3.7	2.3	0.5-7.3	4.2	1.0-7.0
92HV	2	6.0	0.2	0.0-0.3	0.7	0.3-1.0	1.3	1.0-1.7	6.3	5.7-7.0
92VC	2	5.0	3.6	3.5-3.6	0.3	0.0-0.7	2.4	0.5-4.3	6.0	5.0-7.0
소 계	115	4.4	2.8		0.5		1.5		6.3	
수 미		6.7	5.9	5.0-7.9	3.0		5.3		7.0	

※ 초세 : 1(매우 약함) ~ 9(매우 강함)

바이러스 및 무름병 이병도 : 0 (건전) ~ 9 (극심 또는 고사)

### 3. 주요 4배체 유전자원의 세균병(꽃마름병) 저항성 검정

수집된 4배체 유전자원의 꽃마름병 접종을 통하여 저항성 유무를 검정한 결과는 표 7과 같다.

표 7. 온실재배 식물을 이용한 감자 수집유전자원의 꽃마름병 접종 저항성

육성계통	접종농도		저항성 정도
	10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>	
La chipper	3	5	S
DIPV-226	4	5	S
Darita	2	5	M
B8284-1	5	5	S
313-06	5	5	S
DTO-33	5	5	S
R7	4	5	S
Remehue-9	2	5	M
Gemchip	3	5	S
U255-2	4	5	S
Folva	5	5	S
Arran pibt	4	4	S
B5306-40	4	5	S
H82914-122	5	5	S
Drita	5	5	S
B9368-1	3	5	S
75A15-530	5	5	S
Record	5	4	S
Torva	5	5	S
대관62호	4	5	S
B8284-1	5	5	S
ND2417-6	4	5	S
네팔미상3	4	5	S
H83002-2	5	5	S
LT-8	5	5	S
Jl-406	4	5	S
88K71-4	3	5	S
Recent	5	3	S
대관66호	5	4	S
83H58-4	5	5	S
H85033-2	5	5	S
대관22호	5	5	S
Yagana Inta	5	5	S
대관31호	3	5	S
AVRDC NO.11	3	4	S

표 7. 계속

육성계통	집종농도		저항성 정도
	10 <sup>b</sup>	10 <sup>s</sup>	
La rouge	2	5	M
SY-15	5	5	S
SY-15	5	5	S
Oct-78	5	5	S
75A33-1029	5	5	S
ONA-INTA	5	5	S
Maritta	5	5	S
Konahubuki	5	3	S
Darita	5	5	S
Penobscot	5	5	S
대관70호	5	5	S
ND860-2	5	5	S
ND2417-6	5	5	S
B8455-4	3	3	S
고시1호	5	5	S
1216-1	4	3	S
Whitu	3	3	S
H82JI-2	5	5	S
Oct-02	4	5	S
대관2호	5	5	S
75A15-597	5	5	S
8TB-8	5	5	S
Misang A	4	5	S
네팔미상3	4	5	S
R10	3	4	S
AK-red	5	5	S
Chitose	5	5	S
Chacay-INTA	3	3	S
R2	5	4	S
대관46호	5	5	S
Oct-78	5	5	S
Asva	5	5	S
JuI-35	3	5	S
E86.604	5	5	S
대관64호	5	5	S

Disease Index - 0 : 무병징 1: 잎 하나가 부분적으로 시듦 2 : 잎 2-3개가 시듦, 3  
상위 2-3잎을 제외한 나머지 잎이 시듦 4 : 모든 잎이 시듦, 5 : 고사

수집된 4배체 유전자원 중 저항성 정도는 접종농도에 따라서도 큰 차이가 없었고 이병도에 따른 저항성 검정결과 Darita, Remehue-9 및 La rouge 등 만이 중도저항성을 나타냈고 나머지 품종 및 계통들은 모두 이병성을 나타내었다. 이와 같이 S. tuberosum 유래의 4배체 재배종은 그 유전적 배경이 좁아 병해 저항성을 비롯한 유전적 다양성이 매우 결여되어 있음을 알 수 있다. 따라서 재배종만을 이용한 교잡육종은 병해 저항성 품종육종 소재로서는 부적합하다고 하겠다.

#### 4. 주요 장려품종의 세균병 저항성

현재 우리나라에서 육성되어 재배되고 있는 4배체 장려품종에 대하여 풋마름병 저항성 정도를 검정하였다. 일차적으로 포장재배를 통한 발병률을 조사하였고, 이차적으로 온실에서 접종검정을 통한 저항성 정도를 검정하였다.

장려품종들의 포장 발병률은 표 8에서 보는 바와 같이 가장 높은 그룹으로 추백이 50%, 그 다음은 남서가 40%의 높은 발병률을 보였다. 중간 그룹으로는 남작, 조풍 및 대지 등으로 10 ~ 26%의 발병률을 나타내었다. 한편 발병률이 가장 낮은 그룹으로는 세풍 및 자심으로 0 ~ 5.6%의 발병률 분포를 보였다.

표 8. 장려품종에 대한 풋마름병 포장저항성 검정 결과

품	종	발병율(%)
조	풍	25
남	작	26
세	풍	0
남	서	40
추	백	50
대	지	10
자	심	5.6

\* 발병률(%) : (이병주수/조사주수)×100

한편 이들 품종들은 포장에서의 발병률에 따른 저항성 정도에 이어 접종검정을 통한 저항성 유무를 검정코자 하였으며 그 결과는 표 9와 같다. 접종 저항성을 검정하

기 위해 풋트 정식 후 40일 경과한 감자 줄기에 풋마름병균(2029) 농도를  $10^6$ ,  $10^8$  cell/ml 로 조절하여 20 $\mu$ l씩 접종하고 병징발현 여부를 조사하였다. 그 결과 접종원 농도가  $10^8$  cell/ml 경우 장려품종간 큰 차이가 없었으나 병징 발현정도의 차이는 세품과 자심에서 가장 낮은 발병지수를 보여 포장검정에서와 마찬가지로 풋마름 저항성이 가장 강한 것으로 나타났다. 그 다음으로는 남서, 대지, 가원 등이 1.5 ~ 1.8의 지수를 보였고, 남작과 수미는 4.0으로 가장 높은 발병지수를 보여 이병성인 것으로 판별되었다.

표 9. 장려품종에 대한 온실내 풋마름병 저항성 검정 결과

품	종	발병지수
조	풍	2.0 (0.0)
남	작	4.0 (0.0)
세	풍	0.3 (0.0)
남	서	1.5 (0.5)
추	백	2.8 (2.0)
대	지	1.5 (0.0)
자	심	0.3 (0.0)
가	원	1.8 (0.0)
수	미	4.0 (0.5)
대	서	3.0 (0.5)

발병지수 0 ; 무병징, 1 ; 25% 미만의 잎이 위조, 2 ; 25 이상 50% 미만의 잎이 위조,

3 ; 50 이상 75% 미만의 잎이 위조, 4 ; 75%이상의 잎이 위조

( ) : race 1 접종

## 제 4 절 결과요약

기존의 감자 품종뿐만 아니라 다양한 유전자원에 대하여 풋마름병 또는 무름병에 대한 저항성을 검정하여 유망계통을 선발함으로써 감자육종을 위한 기초자료를 얻고자 시험한 결과는 다음과 같다.

체세포 융합 후대잡종의 경우 LZ3.1은 *S. commersonii*에서 유래된 계통 LZ3.1은 풋마름병 발병지수가 2.9로서 중도저항성을 나타내었으나 LZ3.1계통에 재배종 계통을 교잡하여 육성한 HA그룹과 이들 HA그룹에 다시 재배종을 여교잡한 후대에서는 발병지수가 최저 1.2에서 최고 4.1까지의 분포를 나타내었다.

감자 반수체와 근연야생종간 후대잡종에 대해 무름병 저항성을 생육시기별로 3회에 걸쳐 포장검정 결과 발병도는 생육시기가 진전됨에 따라 증대되어 1차시기의 경우 평균 발병도는 0.5였으나 2차 시기에는 1.5 그리고 3차 시기에는 6.3의 발병도를 나타내었다. 이러한 발병양상은 물론 계통군 및 계통에 따라 매우 큰 차이를 나타내었다. 또한 대비품종인 4배체 장려품종인 수미의 평균 발병도보다는 현저히 낮은 경향을 보였다.

한편 4배체 유전자원 70품종에 대한 풋마름병 집중저항성 검정 결과 저항성인 품종 또는 계통은 없었다. 그러나 기존 장려품종 10품종에 대해 포장 및 집중 저항성을 검정한 결과 세풍과 자심에서 가장 낮은 발병지수를 보여 포장검정에서와 마찬가지로 풋마름 저항성이 가장 강한 것으로 나타났고, 그 다음으로는 남서, 대지, 가원 등이 1.5 ~ 1.8로 중간정도를 나타냈으며, 남작과 수미는 4.0으로 가장 높은 발병지수를 보여 이병성인 것으로 판별되었다.

<시험 II> 감자유전자원에 대한 저항성 검정체계 확립 및 계통선발

- 품종별 풋마름병에 대한 저항성 검정 결과 수미, 남작, 대서 등이 가장 이병성으로 대지, 자심, 세풍 등이 저항성으로 평가되었음
- 기내 보존 유전자원에 대한 저항성 검정 결과 28계통 중 CT 206-6 등 5계통을

저항성으로 선발하였음

- 괴경 보존 유전자원에 대한 저항성 검정 결과 AG34258 등 총 130계통 중 AG34189 등 9계통을 저항성으로 선발하였음

## 참 고 문 헌

- Hanneman R.E. Jr. 1994. Assignment of Endosperm Balance Numbers to the tuber-bearing *Solanums* and their close non-tuber-bearing relatives. *Euphytica* 74:19-25.
- Helgeson J.P., Hunt G.J., Haberlach G.T. and Austin S. 1986. Somatic hybrids between *Solanum brevidense* and *Solanum tuberosum*: Expression of a late blight resistance gene and potato leaf roll resistnace, *Plant Cell Report* 212-214.
- Hermundstad S. and Peloquin S.J. 1986. Tuber yield and tuber traits of haploid-wild species F1 hybrids. *Potato Research* 29:289-297.
- Isabel N., Tremblay L., Michaud M., Tremblay F.M. and Bousquet J. 1993. RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis-derived populations of *Picea mariana*(Mill.) B.S.P. *Theor. Appl. Genet.* 86:81-87.
- Kelman A. 1953. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. North Carolina Agr. Exp. Sta. Tech. Bull 99. p194
- Kim H., Choi S.U., Chae M.S., Wielgus S.M., and Helgeson J.P. 1993. Identificatiion of somatic hybrids produced by protoplast fusion between *Solanum commersonii* and *S. tuberosum* haploid. *Korean J. Plant Tissue Culture* 20:337-344.
- Kim-Lee H. and Chae M.S. 1994. Studies on plant characteristics and bacterial wilt resistance of somatic fusion hybrids of resistant *Solanum commersonii* and susceptible *S. tuberosum* clones. Proc. 4th APA tri, cof. Daekwanryeong, KOREA.

Logemann J, Mayer JE, Schell J and Willmitzer L 1988. Differential expression of genes in potato tubers after wounding. *Proceedings of the National Academy of Scie. USA* 85:1136-1140

Robertis E, Kutchan T and Kolattududy PE 1988. Cloning and sequencing of cDNA for a highly anionic peroxidase from potato and the induction of its mRNA in suberizing potato tubers and tomato fruits. *Plant Mol. Biol.* 11:15-26

Schoedel C and Collmer A 1986. Evidence of homology between the pectate lyase-encoding *pelB* and *pelC* genes in *Erwinia chrysanthemi*. *J. Bacteriology* 167:117 -123

# 제 6 장 세균병 저항성 계통의 DNA 표지인자 개발 및 유전분석

## 제 1 절 서 론

본 연구는 감자 육종 계통으로서 병저항성 검정 결과, 저항성으로 판명된 다양한 감자 유전자원들을 random primer를 이용하여 RAPD 분석하여 그들의 유연관계 및 저항성 유전자가 포함된 유전자원을 조기에 선발하여 육종 프로그램에 이용하는데 그 목적이 있다.

유전적 다형성을 이용한 마커의 개발방법으로는 RAPD와 AFLP분석을 포함한 많은 방법들이 개발되어 있으며, 품종 등의 구분방법으로 부분적으로 실용화되어 있다. 특히, RAPD 분석방법은 품종구분, 유전적 다형성 판별과 계통분류의 연구방법으로 많이 적용되고 있다. RAPD 분석의 결과는 환경, 조직의 형태나 부위에 대한 차이가 없어 동위효소 분석 등에 의한 결과보다 재현성이 높다. 식물체 게놈내의 반복염기서열 (repetitive sequence) 들은 그 크기와 다형성의 수준이 종간, 혹은 종내 변이체에서도 매우 높은 것으로 알려져 있다. 따라서 이러한 점을 이용하여 많은 작물에서 반복염기서열들을 이용하여 품종 및 계통간의 변이를 유전적 다형성을 이용하여 판단하는데 이용하고 있다.

## 제 2 절 재료 및 방법

### 1. DNA의 준비

감자의 RAPD 분석에 가장 적절한 DNA를 효과적으로 준비하는 방법을 찾기 위하여 본 연구에서는 DNA준비 방법을 여러 가지 방법으로 달리하였다. 시료 1~2 g 으로부터 DNA를 준비하는 방법은 크게 SDS를 이용하는 방법 (Tai와

Tanksley, 1990)과 CTAB을 이용하는 방법 (Luo등, 1992)을 응용하였으며 약 1cm 직경의 잎 시료로부터 신속하게 DNA를 준비하는 방법을 적용하기 위해서는 Oard 와 Dranaralli (1992)의 방법을 조사 비교 하였다.

감자의 RAPD 최적조건 구명 및 유전자 지도 작성 연구를 위해서는 Luo등 (1992)의 CTAB 방법을 변형하여 준비된 DNA만을 이용하였다. 기내 유식물에서 유래된 개통의 식물체로부터 각 개체별 1~2 g의 어린잎을 채취하여 액체질소를 사용하여 곱게 마쇄하고 50 mL 튜브로 옮긴 후 시료 1 g당 6 mL의 buffer (2%CTAB, 1.4 M NaCl, 0.2% 2-mercapto ethanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-C ; pH 8.0)를 첨가하여 60°C에서 2~10시간 반응시켰다. 반응액과 동량의 chloroform / isoamyl alcohol (24 : 1)을 섞어 10분간 반응시킨 후 3,000 rpm으로 원심분리한 후 상등액을 새 튜브로 옮겼다. 전체양의 2/3에 해당하는 isopropyl alcohol을 넣어 조심스럽게 섞은 후 2,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 침전된DNA pellet을 70% ethanol로 세척한 후 공기 중에서 잘 말렸다. 이때 다당류가 많이 분리되면 TE buffer에 녹인 후 NaCl을 최종농도가 2 M이 되게 첨가한 후 2배 부피의 차가운 99.9% ethanol을 첨가하여 DNA를 진의 과정과 같이 침전시킨 후 잘 말렸다. 잘 말린 DNA pellet에 적당량의 TE buffer를 첨가하여 잘 녹인 후 1.5 mL 튜브로 옮겼다. RNA를 제거하기 위하여 최종량이 10  $\mu$ g/mL가 되게 RNase를 첨가하여 37°C에서 두시간 동안 반응시켰으며 동량의 phenol/chloroform/isoamylalcohol (25 : 24 : 1)를 첨가하여 10분간 반응 후 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 채취하였다. 새 튜브로 옮긴 상등액에 2.5배 부피의 차가운 99.9% ethanol을 첨가하여 침전시킨 후 70% ethanol로 세척하고 잘 건조시켜 200~500  $\mu$ L의 TE buffer에 녹여 냉동 보관하였다. DNA정량은 DNA Fluorometer, TKO 100 (Hoefer 사)을 이용하였으며, 10 ng/ $\mu$ l로 희석하여 PCR 분석에 이용하였다.

## 2. RAPD 분석

### 가. 풋마름병 저항성 유전자원의 URP primer를 이용한 RAPD 방법

이번 연구에서 사용한 URP primer(Patent No. 97-016981, Universal rice primer)는 농촌진흥청(농과원)에서 개발한 것으로 한국산 적미벼(Korean Red Rice, *Oryza sativa* L.)의 반복 염기서열로부터 무작위적으로 제작된 것으로 여러 생물종의 유전적 다형성을 확인하는데 매우 유리한 것으로 확인되고 있다.

〈표 1〉 풋마름병 저항성 유전자원 감자 RAPD에 이용된 12개 URP primer들의 염기서열

No.	Products	염기서열
1	URP1	5'-ATCCAAGGTCCGAGACAACC-3'
2	URP2	5'-CCCAGCAACTGATCGCACAC-3'
3	URP3	5'-GTGTGCGATCAGTTGCTGGG-3'
4	URP4	5'-AGGACTCGATAACAGGCTCC-3'
5	URP5	5'-GGCAAGCTGGTGGGAGGTAC-3'
6	URP6	5'-ATGTGTGCGATCAGTTGCTG-3'
7	URP7	5'-GGTGAACAGTGAGATGAACC-3'
8	URP8	5'-TACATCGCAAGTGACACAGG-3'
9	URP9	5'-AATGTGTGGCAAGCTGGTGG-3'
10	URP10	5'-GATGTGTTCTTGGAGCCTGT-3'
11	URP11	5'-GGACAAGAAGAGGATGTGGA-3'
12	URP12	5'-GGCATTCTACCACCACAAGT-3'

또한, RAPD 분석을 위해 사용한 PCR기는 Perkin Elmer사의 thermal cycler 480을 사용하였다. RAPD 반응을 위한 시료의 조제는 다음의 표와 같다.

**<표 2> RAPD 반응시료 조제법**

성분	Taq DNA polymerase	DNA dNTPs	Tris-HCl	KCl	MgCl <sub>2</sub>	Template (감자 DNA)	3 차 증류수
농도 및 함량	1 unit	250 μM	50mM	40 mM	1.5 mM	50~100ng	반응액량을 20μL로 맞춤

각각의 반응시간 및 온도는 초기 full denaturation을 위해 5분간 반응시킨 후 denaturation은 94°C에서 60초, anealing을 위해 55°C에서 60초, extention을 위해 72°C에서 120초간 35회 반응시킨 후 72°C에서 5분간 full extention시켰다. 증폭된 DNA 산물은 1.2% (w/v) 아가로스겔에서 전기영동하여 분리된 DNA의 다형성을 확인하였다.

식물재료는 풋마름병 저항성 표지인자를 탐색하기 위한 저항성 재료로서 이 중 CT206 계통은 융합잡종체를 대지 품종과 교잡후 다시 대지 품종에 여교잡한 분리 세대 집단이며 HA 계통은 high resistant한 풋마름병 저항성을 가진 Lz3.2와 수미의 dihaploid와의 원형질체 융합 계통이다.

**나. 풋마름병 및 무름병 저항성 유전자원의 다양한 random primer와 SSR targeted primer를 이용한 RAPD 방법**

식물재료로 유전분석 및 유전자 지도 작성을 위해 선발된 HDA210과 Yatsufusa 그리고 이들 간의 F1 식물체를 이용하였다.

RAPD 분석을 위해 사용한 PCR기계는 파인 사의 PCR robot를 주로 이용하였고, 비교 연구용으로 Perkin Elmer Cetus의 thermal cyler 480을 이용하였다. 각각의 반응시간 및 온도는 초기 full denaturation을 위해 5분간 반응시킨 후 denaturation은 94°C에서 60초, anealing을 위해 36°C에서 60초, extention을 위해 72°C에서 90초간 45회 반응시킨 후 72°C에서 5분간 full extention시켰다. 파인 사의

PCR기계는 수조형식으로 되어 있으므로 각각의 목표온도에서의 실제 반응시간은 denaturation에 20초, annealing에 20초 그리고 extention에 50초 반응한 것으로 판단하였으며, 따라서 block형인 Perkin Elmer Cetus의 thermal cycler에서 20초, 20초, 그리고 50초의 반응시간을 주었다.

사용된 *Taq* polymerase는 Bionex 사의 TCA polymerase를 주로 이용하였고 보조 연구용으로 Promega사의 *Taq* polymerase를 이용하였다. 이때 사용된 buffer의 조성은 40 mM의 KCl, 10 mM의 Tris(pH 8.3), 1 mM의 DTT 그리고 0.5  $\mu$ g/mL의 BSA였다.

사용된 primer는 총 557종류를 사용하였다. Random decamer primers로서는 UBC(University of British Columbia)에서 제작된 UBC primer 1번, 2번, 4번, 그리고 8번 세트 400종류와 (부록1) Operon사의 G셋트 20개를 사용하였으며, UBC에서 제작된 SSR(simple sequence repeats) targeted primer 100종류, 그리고 곤충의 미토콘드리아 염기서열을 바탕으로 만들어진 mtD primers(18-27 mer) 37종류를 이용하였다.

PCR 기본반응은 25  $\mu$ L 반응액에 위의 buffer 조성과 3 mM의  $MgCl_2$ 를 첨가하고 DNA 20 ng, primer 200 nM, dNTP 200  $\mu$ M 그리고 *Taq* polymerase를 1 unit를 첨가하여 45회 반응시켰다. 그리고 시험에 사용한 튜브와 팁은 Sarstardt 사의 제품을 이용하였다.

PCR 반응 후 증폭된 DNA는 FMC 사의 Seakem LE agarose를 1.3~2.0%로 하여 수평전기영동장치(Owl's standard, OWL Scientific)를 이용하여 분리하였다. 일부 해석이 어려운 밴드의 해상도를 높이기 위해서는 Metaphor agarose(FMC 사)를 밴드의 크기에 따라 Seakem LE agarose(FMC 사)와 임의비율(LE : Metaphor agarose=1.0% : 2.0%~1.0% : 0.6%)로 섞어 전기영동하였으며 ethidium bromide에 염색한 후 UV trans-illuminator에서 관찰하였으며, Polaroid 667 film을 이용하여 사진촬영 후 결과를 해석하였다. RAPD 수행에 있어 사용한 DNA를 제한효소에

미리 절단하였을 때 다형화 표지인자의 개발 효율을 알아보기 위해 Biorad 사의 제한효소를 이용하였으며  $\mu\text{g}$ 당 4 unit를 사용하여 DNA를 완전 절단하여 사용하였다.

### 제 3 절 결과 및 고찰

#### 1. 풋마름병 저항성 유전자원의 URP primer를 이용한 RAPD 결과

풋마름병 저항성 표지인자를 탐색하기 위한 저항성 재료로서 고도의 저항성을 가진 유전자원으로 CT08-4, CT201-1, CT204-5, CT204-10, CT204-9, HA06-1 및 HA06-4를 사용하였고 저항성 유전자원으로 CT204-1, CT204-4, CT204-6, CT204-9, CT206-3, CT204-4 및 CT204-20을 사용하였다. 또한, 감수성 계통으로는 HA06-1과 HA06-4를 사용하였다. 이들 재료에 대한 풋마름병에 대한 저항성 정도와 일반적 특징은 위의 표 3.과 같다.

유전적 다형성과 품종구분 기술로서 URP primer를 이용한 기술은 감자에서 일정 수준 정착되어 있는 단계이며 감자의 다양한 유전자원을 이용한 예비실험에서

〈표 3〉 저항성 표지인자 탐색용 재료와 주요특징

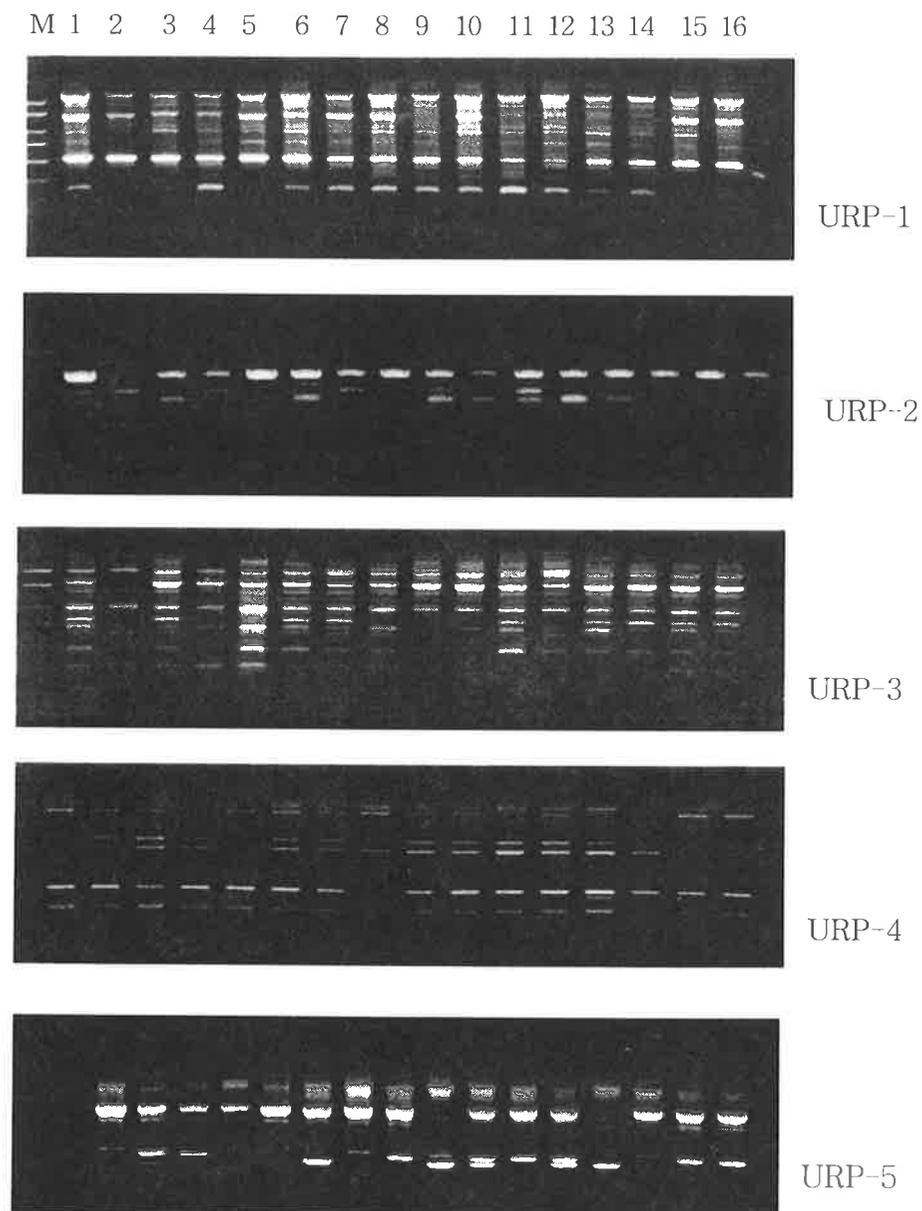
No.	계통명	꽃마름병 저항성	Average scale
1	CT08-4	HR	1.2
2	CT201-1	IIR	1.1
3	CT204-1	R	2.0
4	CT204-4	R	2.2
5	CT204-5	IIR	1.8
6	CT204-6	R	2.1
7	CT204-9	R	2.1
8	CT204-10	HR	1.9
9	CT206-3	R	2.0
10	CT204-4	R	2.1
11	CT204-9	HR	1.8
12	CT204-13	HS	4.1
13	CT204-17	HS	17
14	CT204-20	R	2.4
15	HA06-1	HR	1.4
16	HA06-4	HR	1.6

12종류의 primer 중 URP2, URP4, URP6, URP8의 경우는 유전적 다형성 판단에 이용할 수 있는 것으로 생각되었다.

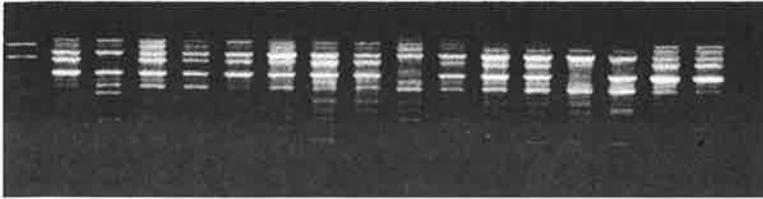
품종 및 계통 구분 전용 URP primer를 이용한 RAPD 분석은 12개의 primer를 이용하여 이루어졌으며 재료들의 DNA를 준비 정량하고 RAPD 분석 기본조건을 확립하였다. 그 중 1~11까지 11개의 primer에서 계통간 다수의 다형화밴드를 탐지할 수 있었다 (그림 1).

12 종류의 URP primer를 사용한 결과, 저항성 계통들과 높은 감수성을 갖는 계통들간에 서로 구분되는 독특한 밴드패턴을 찾을 수 없었으나 계통간 다형화밴

드를 이용하여 세포융합여부와 이들 융합체와 재배품종과의 교배 여부 그리고 분리세대에서 이들 다형성 밴드가 분리되는 것을 알 수 있었다(그림1).



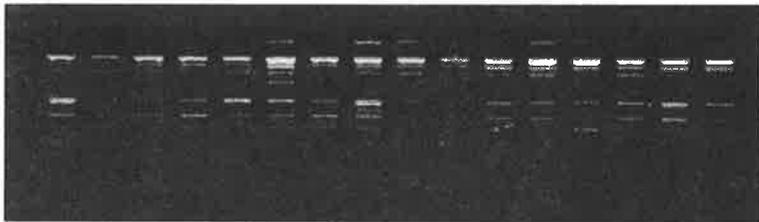
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



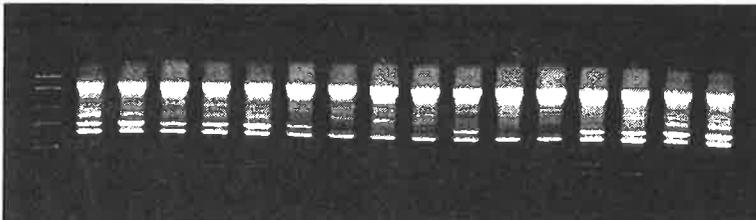
URP-6



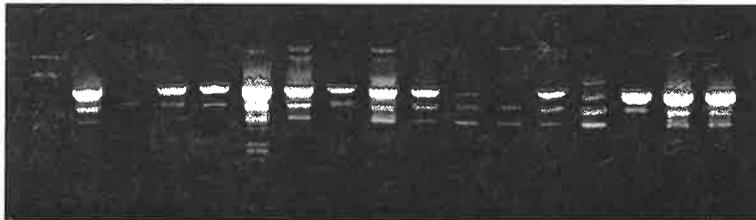
URP-7



URP-8



URP-9



URP-10

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

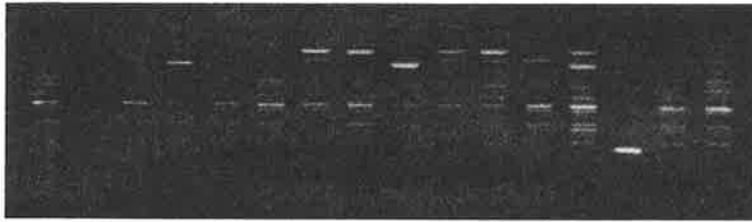


그림1. URP primer 1~11에 의한 풋마름 저항성 감자 계통의 RAPD profile : M, PCR marker : 1~16, CT08-4, CT201-1, CT204-1, CT204-4, CT204-5, CT204-6, CT204-9, CT204-10, CT206-3, CT204-4, CT204-9, CT204-13, CT204-17, CT204-20, HA06-1, HA06-4

## 2. 풋마름병 및 무름병 저항성 유전자 표지인자 개발용 재료와 주요 특징

풋마름병 저항성 표지인자를 탐색하기 위한 저항성 재료로서 야생종인 Lz 3.2 (*S. commersonii*, PT 320266)와 수미 품종의 반수체간 융합체를 대지품종과 Nooksack, 남작 품종과 교배시켜 나온 실생 후대 개체들(P5~P22)을 이용하였다. 이들 재료에 대한 풋마름병에 대한 저항성 정도와 일반적 특징은 표4.와 같다.

〈표 4〉 저항성 표지인자 탐색용 재료와 주요특징

구 분	번호	계통명	꽃마름병 저항성	배수성	주 요 특 징	비 고
	1	Lz 3.1	S	2X	<i>S. commersonii</i>	
	2	Lz 3.2	HR	2X	<i>S. commersonii</i> (PT 320266)	야생종: 저항성친
	3	Lz 3.4	HR	2X	<i>S. commersonii</i>	
	4	Lz 3.5	S	2X	<i>S. commersonii</i>	
	5	HA06-1	HR	4X	P2 + PT56 (Dihaploid of Superior)	Fusion hybrid
	6	HA06-4	I	4X	"	
	7	HA06-9	HR	4X	"	
	8	CT01-1	R	4X	P5 (HA06-1) x P23 (Dejima) <sup>z</sup>	
	9	CT01-2	R	4X	"	
꽃마름병 관 련	10	CT02-1	R	4X	P5 x P24	
	11	CT02-2	S	4X	"	
	12	CT02-3	I	4X	"	
	13	CT02-4	HR	4X	"	
	14	CT201-1	HR	4X	P11(P5 x P24) x P26	
	15	CT201-2	R	4X	"	
	16	CT201-3	R	4X	"	
	17	CT206-9	HR	4X	(P7 x P23) x P23	
	18	CT206-13	HS	4X	"	
	19	CT206-16	HR	4X	"	
	20	CT206-17	HS	4X	"	
	21	HB9-2	-	6X	"	Fusion hybrid
	22	HB28-2	-	6X	"	"
재배품종	23	Dejima	HS	4X	Cultivar: Male parent	
	24	Nooksack	S	4X	Cultivar: Male parent	
	25	Superior	HS	4X	Cultivar	
	26	I r i s h cobbler	I	4X	Cultivar: Male parent	
	27	Jopung	-	4X	Korean cultivar	
	28	Katahdin	-	4X	Cultivar	
	29	Atlantic	-	4X	Cultivar	
무 림 병 관 련	30	C75-5	-	4X	(P34 x P28) x P28	
	31	C75-5-210	-	4X	(P34 x P28) x P29	
	32	C75-5-297	-	4X	(P34 x P28) x P29	
	33	CL31-5	-	4X	(P34 x P28) x P28	
	34	A206	-	4X	ps 6A ( <i>S. bre.</i> : PI 218228) + R4#2 ( <i>S. tub.</i> : PI 203900)	Fusion hybrid

z The cross combinations were designated by the PCR DNA No.

부름병 저항성 표지인자를 탐색하기 위한 재료로서는 야생종이며 저항성인 ps 6A (*S. bre.*: PI 218228)와 R4#2 (*S. tub.*: PI 203900)의 융합잡종 개체인 A206과 이것을 Katahdin과 Atlantic 품종과 교배시켜 나온 실생 후대 개체 (P30~P33)들을 이용하고자 하였으며 이들 재료에서 저항성 유전자를 찾기 위한 재료를 육성하기 위하여 기내 유식물을 순화시켜 재배종과 교잡을 하였다.

### 3. 저항성표지탐색용 재료들의 DNA 다형화 탐색 및 계통간 유전적 다양성 분석

단백질의 다형화 탐색 및 유전적 다양성 분석을 위하여 시험재료들의 DNA를 준비 정량하고 RAPD 및 AFLP분석 기본조건을 확립하였다. 이들 재료에 대해 RAPD와 AFLP 분석을 수행하여 유전적 다양성을 분석중이다. 지금까지의 결과에 의하면 그림 2와 3의 결과에서처럼 RAPD와 AFLP에서 공히 다수의 다형화밴드를 탐지할 수 있었다.

그림 2와 그림3 에서 저항성 계통인 야생종 품종들의 경우 일반 재배품종들과 구분되는 독특한 밴드패턴을 보였으며 이런 다형화밴드를 이용하여 세포융합여부와 이들 융합체와 재배품종과의 교배 여부 그리고 분리세대에서 이들 다형성 밴드가 분리되는 것을 알수 있었다. 현재까지의 결과와 추후 더 다양한 종류의 primers를 이용하여 분석하므로써 야생종과의 세포융합개체와 교배후손개체들간의 유전적 거리 그리고 재배종과 교잡에 의한 유전자의 혼입정도, 조환된 정도 등을 알 수 있으리라 파악된다.

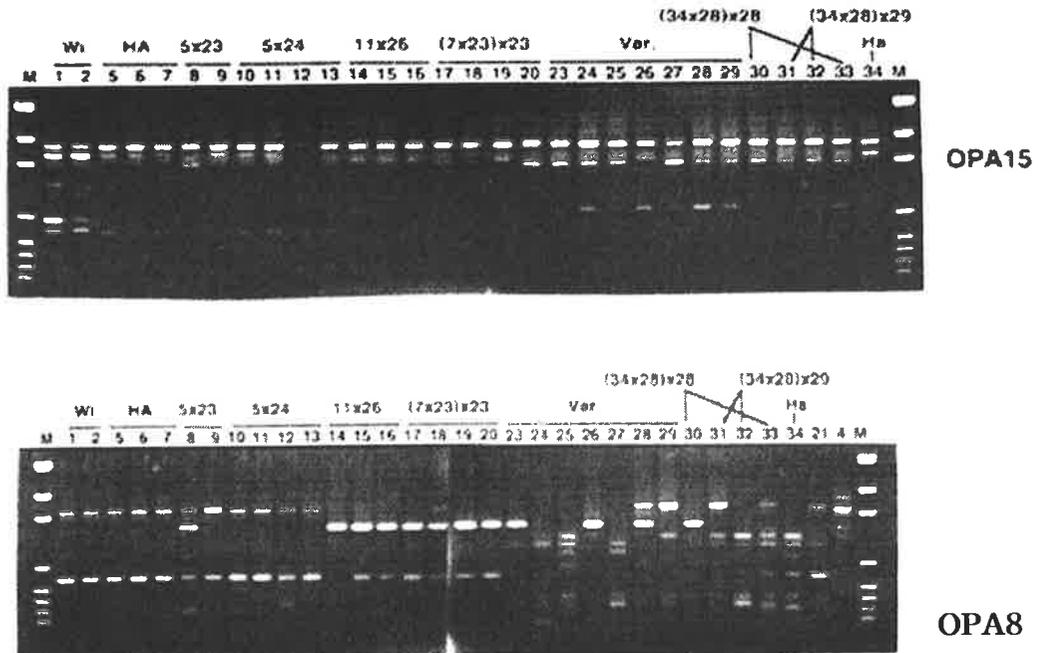


그림 2. OPA8과 OPA15 primer에 의한 감자 계통의 RAPD profile :

야생종 감자, 세포융합체와 교배후대에서의 다형화밴드의 분리 분석. Lane 번호 : 표1에 있는 DNA 일련번호, Wi : Wild relatives, HA : fusion hybrid (2+PT56), 5 x 23 : 5(HA06-1) x 23 (Dejima) 조합의 교잡 실생개체, 5 x 24 : 5(HA06-1) x 24(Nooksack), 11 x 26 : (5 x 24) x 26 : {5(HA06-1) x 24(Nooksack)} x 26(Irish cobbler), (7x 23) x 23 :(HA06-9)x23(Dejima) Var. : Commercial variety, (34x28)x28: x23(Dejima), {34(A316)x28(Katahdin)} x 28(Katahdin, (34x28)x29:{34(A316)x28(Katahdin)}x29(Atlantic), M: molecular marker, pGEM DNA marker.

Wi            HA    5x23        5x24        11x26    (7x23)x23    HA            Var.    (34x28)x28/29    Ha  
 \_\_\_\_\_|  
 M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 28 29 25 26 30 31 32 33 34 27 M

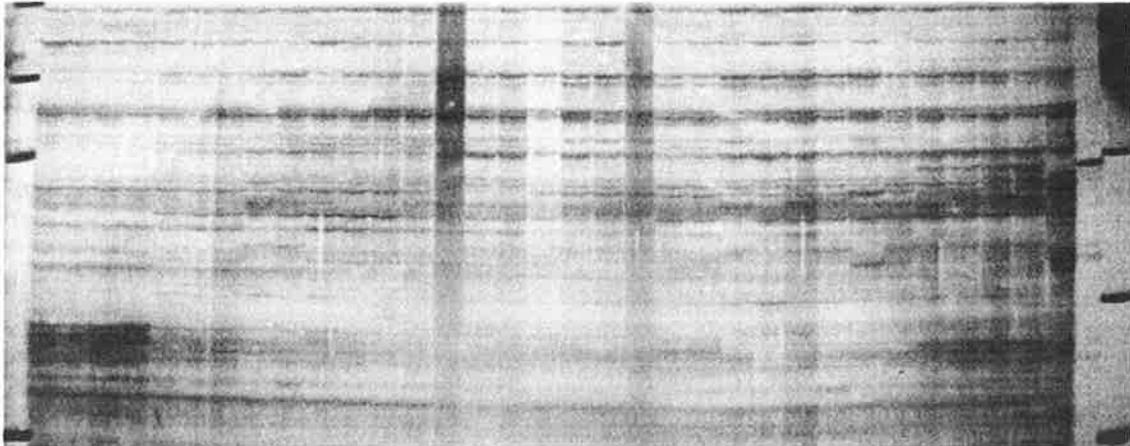


그림 3. AFLP Profiles by 0403 primer combination: 야생종 감자, 세포융합체  
 와 교배후대에서 다형화 AFLP 밴드의 분리 분석. Lane 번호: 표1에 있는  
 DNA 일련번호, Wi : Wild relatives, HA: fusion hybrid (2 + PT56), 5 x 23  
 : 5(HA06-1) x 23 (Dejima) 조합의 교잡 실생개체, 5 x 24 : 5(HA06-1) x  
 24(Nooksack), 11 x 26: (5 x 24) x 26 : {5(HA06-1) x 24(Nooksack)} x 26  
 (Irish cobbler), (7 x 23) x 23: {(HA06-9) x 23(Dejima)} x 23(Dejima), Var.  
 : Commercial variety, (34 x 28) x 28 : {34(A316) x 28(Katahdin)} x  
 28(Katahdin), (34 x 28) x 29 : {34(A316) x 28(Katahdin)} x 29(Atlantic), M:  
 molecular marker, pGEM DNA marker.

## 4. 연구결과 요약

### 가. 세균병 저항성 계통의 DNA표지인자 개발 및 유전분석

- 1) 재료들의 DNA를 준비 정량하고 RAPD 및 AFLP분석 기본조건을 확립하였다.
- 2) 품종 및 계통 구분용 URP primer는 몇몇 primer에서 계통간 독특한 밴드패턴을 보였으며, 이러한 다형화 밴드를 이용하여 저항성과 관련된 다형성 밴드를 탐지할 수 있었다.
- 3) 이들 재료에 대해 RAPD와 AFLP 분석을 수행하여 유전적 다양성을 분석하였으며, RAPD와 AFLP에서 공히 다수의 다형화밴드를 탐지할 수 있었다.
- 4) 야생종 품종들의 경우 일반 재배품종들과 구분되는 독특한 밴드패턴을 보였으며 이런 다형화 밴드를 이용하여 세포융합여부와 이들 융합체와 재배품종과의 교배 여부 그리고 분리세대에서 이들 다형성 밴드가 분리되었다.

## 참 고 문 헌

Arce et al. 1999. Enhanced resistance to bacterial infection by *Erwinia* spp. *atroceptica* in transgenic potato plants expressing the Attacin or the Cecropin SB-37 genes. *Ame. J. of Potato Res.*

Weber, J. 1990. *Erwinia*-a review of recent research. In Proc. 11th. Triennial Conference of the EAPR. Edinburgh. 8-13th July, 1990 : 112-121.

Elphinstone, J. G. 1994. Inheritance of resistance to bacterial disease In : J. E. Bradshaw and G. K. Mackay(eds.). *Potato genetics*. CAB International, Cambridge, UK : 429-446.

Krauze, B. T. et al. 1982. Laboratory assesment of tuber resistance of world potato cultivar collection to main causes of storage rots. *Biuletyn Instytutu Ziemiaka* 27 :111-134.

Tzeng, K. et al. 1990. Resistance of tubers from different potato cultivars to soft rot caused by *E. carotovora* spp. *atroceptica*. *Ame. J. of Potato Res.*

Bourne, W. F. et al. 1981. Assessing potato tubers for susceptibility to bacterial soft rot. *Potato Research* 24 : 409-415.

Soest, L. J. M. van. 1983. Evaluation and distribution of important properties in German-Netherlands potato collection. *Potato Research* 26 : 109-121.

Huaman, Z et al. 1989. Screening for resistance to *S. tuberosum* spp. andigena with resistance to *Erwinia chrysanthemi*. *Ame. J. of Potato Res.* 66 : 357-364.

Hayward. A. C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 29 : 65-87.

Parent J. G. et al. 1996. Identification of *Erwinia carotovora* from soft rot diseased plants by random amplified polymorphic DNA analysis. *Plant Disease* 80 : 494-499.

Griep, R. A. et al. 1998. Development of specific recombinant monoclonal antibodies against the lipopolysaccharide of *Ralstonia solanacearum* race 3. *Phytopathology* 88 : 795-803.