

사업구분	기관프로젝트	수행구분	전반기	연구기간	'97 ~ (6년차)
연구과제명	고령지농업 안정생산기술 개발			연구책임자	김 승 경
세부과제명	무사마귀병 발생생태 및 방제법 개발				
세부과제책임자	환경농업연구과 지방농업연구사 이 재 홍 (033-258-5742)				
색인용어	배추, 무사마귀병, 생물적방제, 저항성유전자, 약제선발, 저항성품종				

1. 당해연도 목표 : 무사마귀병 저항성관련 유전자 탐색 이 생물적 방제기술 개발

2. 수행방법

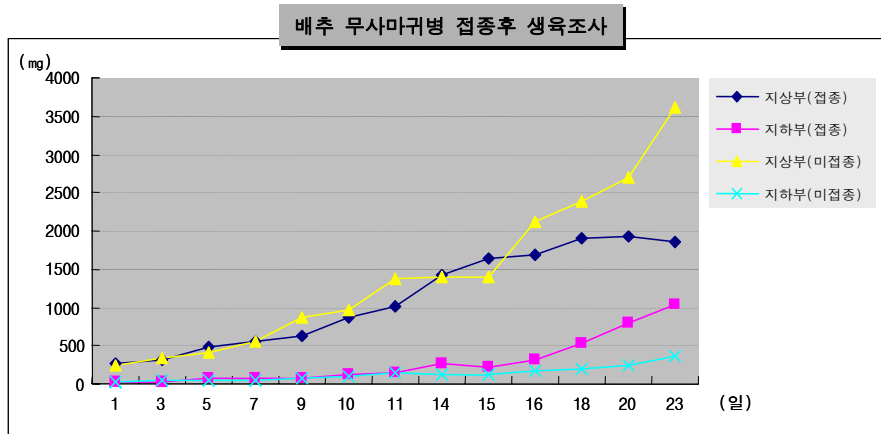
- 휴면포자 발아촉진물질 및 저항성 유전자 탐색
 - 공시품종 : CR그린(저항성), 고령지여름 배추(감수성)
 - 배추무사마귀병균 순수 분리, 정제 : Ken Suzuki외 3인(1992) 방법 이용
 - 감염 뿌리에서 filtering한후 Ficoll 400을 이용한 밀도구배원심분리 이용
 - Total RNA 분리, 정제 : TRIzol Reagent(Invitrogen사) 이용
 - 발현 유전자의 cDNA 제작 : M-MLV Reverse Transcriptase 이용
 - 저항성관련 특이유전자 분석 : P. Liang & A. B. Pardee의 DDRT-PCR 분석방법 이용
 - 전기영동 방법 : 6% denature acrylamide gel 이용
 - DNA 염색 방법 : Silver staining(Bioneer사) 방법 이용
- 생물적 방제법 개발
 - 품 종 : 고령지여름
 - 장 소 : 춘천(풋트시험), 평창(포장시험)
 - 처리내용 : 길항균 2종×상토 5종 등 10처리
 - 조사내용 : 병원균 및 길항균 밀도, 발병도
- 배추무사마귀병 약제방제 시험
 - 공시품종 : 고령지여름
 - 처리약제 : 후루셀파마이드분제 외 3종 토양훈화 및 관주
 - 시험구배치 : 난괴법 3반복
 - 조사내용 : 발병도, 생체중
- 저항성 품종 실증
 - 시험품종 : CR상심 등 9품종
 - 장 소 : 평창 방림 농가포장
 - 조사내용 : 발병주율 및 발병도

3. 시험성적

◦ 휴면포자 발아촉진물질 및 저항성 유전자 탐색

- 배추 무사마귀병원균 정제 : 2,000ml (밀도 : 6×10^7 개/ml)

- 감염에 따른 생육변화 조사 : 감염유무별, 시기별 지하부 및 지상부 생육



- 채취 시료별 발현 RNA 분리 정제 : 총 16처리

·감염 시기별 4처리 : 접종후 5, 10, 15, 20일

·병원균 감염 유, 무 및 품종별(감수성 및 저항성) 4처리

- 배추 유전자에 결합 빈도가 높은 random primer 선발 : 10종(표1, 그림1, 2)

- oligo dT₁₂MN primer(12종) 이용 저항성 및 감수성 발현 특이 유전자 선발을 위한 cDNA 합성 : 4처리 48종 RT-PCR 반응

(총 16처리 시료 × 12종의 dT₁₂MN primer이용 192개 반응 시험 계획)

◦ 선발한 10mer random primer 염기서열

번호	염기서열	GC content(%)
1	5'-CAG GCC CTT C-3'	70
2	5'-CAA TCG CCG T-3'	60
3	5'-TCG GCG ATA G-3'	60
4	5'-AGC CAG CGA A-3'	60
5	5'-GTT TCG CTC C-3'	60
6	5'-TGG ATT GGT C-3'	50
7	5'-AAT CGG GCT G-3'	60
8	5'-TGA CGC GCT C-3'	70
9	5'-GAC ATC TCG C-3'	60
10	5'-GAC CAG CGA A-3'	60

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

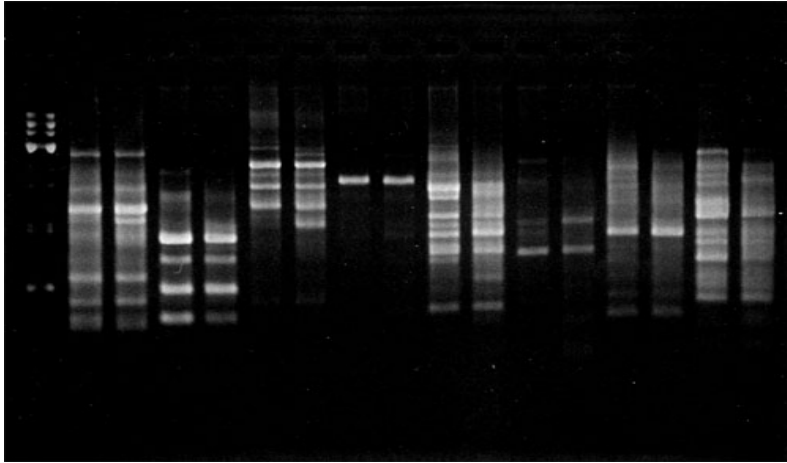


그림 1 . 배추유전자에 대한 random primer의 RAPD 양상
M:1kb ladder, Lane1,3,5,7,9,11,13,15 : CR그린
2,4,6,8,10,12,14,16 : 고행지여름, Lane9,10 : primer 05

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

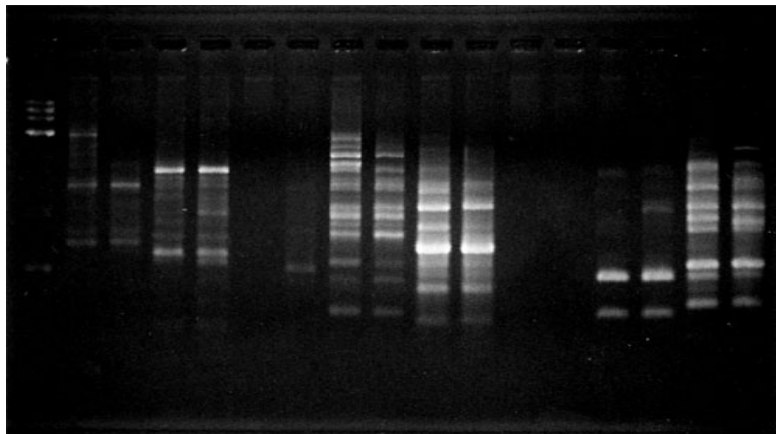


그림2. 배추유전자에 대한 random primer의 RAPD 양상
M:1kb ladder, Lane1,3,5,7,9,11,13,15 : CR그린
2,4,6,8,10,12,14,16 : 고행지여름, Lane7,8 : primer 12

◦ 생물적 방제기술 개발

- 기내시험에서 우수한 길항균으로 Bacillus속 세균 3종을 선발하였으나 포장검증시험에서는 방제효과가 낮았음
- ⇒ 현재 여러 가지 상토와 길항균을 조합한 복합처리를 포트에서 시험중에 있음

◦ 우수약제 선발

- 처리방법

번호	공 시 약 제 및 처 리 방 법
1	후루셀파마이드분제 정식전 전면 토양훈화처리(20kg/10a)
2	트리프록시스트로빈입상수화제 1,000배액 정식시 침지
3	트리프록시스트로빈입상수화제 2,000배액 정식시 관주(150ml/주)
4	트리프록시스트로빈입상수화제 3,000배액 정식시 관주(150ml/주)
5	아족시스트로빈수화제 750배액 정식시 관주(150ml/주)
6	후루셀파마이드분제 토양훈화(20kg/10a) + 트리프록시스트로빈입상수화제 3,000배액 정식시 침지
7	후루셀파마이드분제 토양훈화(20kg/10a) + 아족시스트로빈수화제 750배액 정식시 침지
8	무처리

- 처리결과

처리 번호	발 병 도				방제가 (%)	주당 생체중(g)			
	I	II	III	평균		I	II	III	평균
1	47	33	0	26.7	66.7	2930	3140	3280	3117
2	56	38	36	43.3	45.9	2660	2960	3170	2930
3	30	6	0	12.0	85.0	2700	3040	3460	3067
4	38	11	33	27.3	65.9	2940	3090	2870	2967
5	55	3	27	28.3	64.6	2640	2560	2780	2660
6	27	17	9	17.7	77.9	3470	3120	3250	3280
7	43	2	34	26.3	67.1	2970	3340	2515	2942
8	90	87	63	80.0	-	1880	2740	2970	2530

◦저항성 품종 실증

품종명	발병주율(%)	발병도	품종명	발병주율(%)	발병도
큰여름	100	90	CR산촌	0	0
고냉지여름	100	90	CR그린	0	0
CR상심	0	0	CR하계	0	0
씨알파워	0	0	노랑만점	65	34
CR안심	0	0			

4. 주요결과 요약

- 가. 감수성 품종의 외형상 병징은 접종후 10일경에 나타나고, 15일경에는 지상부 생육이 둔화되며 뿌리혹의 비대가 급격히 촉진됨
- 나. 저항성관련 유전자 탐색실험에서는 임의 증폭primer 역할을 하는 random primer 10종을 선발하였고, oligo dT₁₂MN primer(12종) 이용 cDNA 합성조건 결정 및 48종을 합성하였다.
- 다. 생물적 방제시험에서는 기내시험에서 우수한 길항균으로 *Bacillus*속 세균 3종을 선발하였으나 포장검증시험에서는 방제효과가 낮았음
- 라. 트리프록시스트로빈입상수화제 2,000배액 관주처리가 방제가 85%로 가장 효과가 좋았다.
- 마. 저항성 품종중 노랑만점만이 발병주율 65%로 저항성 품종의 이병화현상이 나타났다.

5. 금후계획

- 무사마귀병 휴면포자 발아 및 저항성 발현기작에 대한 유전적 인자 연구 추진
- 무사마귀병 경종적, 화학적 및 생물적 방제 등 종합적인 방제기술 확립