

ORIGINAL ARTICLE

Trichoderma 수집균주별 오이 덩굴쪄김병 방제효과

박윤진 · 이영수¹⁾ · 안승원²⁾ · 조용구³⁾ · 이형원⁴⁾ · 장명준³⁾*

공주대학교 두과농비자원연구센터, ¹⁾경기도농업기술원, ²⁾공주대학교 원예학과, ³⁾공주대학교 식물자원학과, ⁴⁾유니온바이오

Control Effect of Fusarium Wilt of Cucumber by Trichoderma Collection Strain

Youn Jin Park, Young Su Lee¹⁾, Seoung-Won Ann²⁾, Yong-Koo Cho³⁾, Hyung-Won Lee⁴⁾,
Myoung-Jun Jang³⁾*

Green Manure and Legumes Resource Center, Kongju National University, Yesan 32439, Korea

¹⁾Environmental Agriculture Research Division, GARES, Hwaseong 18388, Korea

²⁾Department of Horticultural Science, Kongju National University, Yesan 32439, Korea

³⁾Department of Plant Resources, Kongju National University, Yesan 32439, Korea

⁴⁾Union Bio Co., Daejeon 34068, Korea

Abstract

This study investigated the relationship among seven species of trichoderma through the identification of strains collected in Korea. The phylogenetic tree among the collected strains was classified into four groups. The trichoderma strains isolated in this way showed inhibitory effect on the fusarium wilt which is parasitic to cotyledon stem. The invisibility of J9, J10, J13 and J16 strains were higher in comparison with other strains in vitro test stand, and their spore production level was also higher. In the aluminum ring tests, it showed that the yield of the spores in J9, J10 and J13 were more than any other strain. As a result conducting the port test for cucumbers, the plant lengths of J13 were larger than the control plot, and the root lengths of all strains, except for J2 were longer than the control plot, and the root weights of J1, J9, J10, J13 and J16 were larger than the control plot. The disease severity for the fusarium wilt showed the smallest values at J13 and J16 in comparison with the control plot, and the control values of J13 and J16 were higher than other strains.

Key words : Disease control, Fusarium wilt, Trichoderma species

1. 서론

Trichoderma 속은 토양 생태계에 존재하고, 특히 식물 뿌리에서 자주 발견되는 토양곰팡이에 속한다(Harman et al., 2004). 이러한 trichoderma와 같은 곰팡이류는 비

병원성으로 식물의 근권에 기생하는 특성이 있으며 식물 병원균의 균사체에 기생하거나 식물의 체내 방어기작을 활성화시키는 것으로 알려져 있다(Francesco et al., 2008). 또한 식물생장촉진균(plant growth promoting Fungi)으로 뿌리표면에 균체를 형성(colonization)며, 식물 체내

Received 20 February, 2019; Revised 12 March, 2019;

Accepted 14 March, 2019

*Corresponding author: Myoung-Jun Jang, Department of plant Resources, Kongju National University, Yesan 32439, Korea
Phone:+82-41-330-1204
E-mail: Plant119@kongju.ac.kr

The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.
© This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Table 1. Source and geographic origin of fungi in this study

Strain	Speccies	Geographical origin
<i>F. oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	Hwaseong
J1	<i>Trichoderma pleuroticola</i>	Yeoju
J2	<i>Trichoderma koningii</i>	Yeoju
J9	<i>Trichoderma koningii</i>	Gwangju
J10	<i>Trichoderma koningii</i>	Gimpo
J13	<i>Trichoderma koningii</i>	Gimpo
J16	<i>Trichoderma koningii</i>	Yangpyeong
J17	<i>Trichoderma hazianum</i>	Commercial Products

물질대사에 영향을 준다는 보고들이 있다(Harman et al., 2004). 이러한 식물근권내에 기생하는 곰팡이류중 *trichoderma* 균들은 식물의 성장을 촉진시키고, 이용 가능한 영양분의 흡수를 증가시켜 작물의 생산량을 향상시키고 식물 병에 대한 저항성을 강화시키는 것으로 알려져 있다(Harman et al., 2004). 또한 *trichoderma* 균류는 섬유소분해 효소 등을 생성하며 키틴분해효소(chitinase), 글루칸분해효소(glucanase) 등은 식물병원균의 세포벽 분해 효소를 분비한다는 보고들이 있다(McKeen et al., 1986; Monaghan and Tkacz, 1990; Inbar and Chet, 1995; Haran, et al., 1996; Harman et al., 1996).

*Fusarium*속 균들은 토양에 존재하는 곰팡이류 중 환경적응성이 높아 여러 식물의 도관부에 침입하여 식물체를 고사시키는 식물병원균(Ploetz et al., 1996)으로써 *Fusarium*은 특정 작물에서만 병원성을 나타내는 기주 특성이 있다(Hubbard and Gerik, 1993; Garibaldi et al., 2002). 그중 *F. oxysporum*은 그 기주에 따라 약 70여종의 분화형으로 구분되어 진다(Armstrong and Armstrong, 1981).

작물 시설 재배시 시설내 습도가 높고 광투과량이 적어 지상부의 병해발생이 조장되며 동일한 토양내 연속재배시 토양전염성 병해 발생이 시설재배시 큰 문제로 대두되어있다. Lee et al.(2004)등은 고구마의 *fusarium wilt*는 토양 수분이 적을수록 병 발생이 높다고 하였고, Yang et al.(2000)은 과채류에 발생하는 *Fusarium* 병해는 하우스 내 토양 염농도(EC)와 인산 함량이 높을수록 발병이 높으며 특히 오이의 경우에 저항성대목을 이용하고는 있지만 연작 등에 의해 *Fusarium oxysporum* f. sp.

*cucumerinum*이 발병하여 생산량에 영향을 미친다.

따라서 본 연구에서는 국내에서 수집된 *trichoderma* 균주들간의 *fusarium wilt*에 대한 방제효과를 검증하여 토양내 연속재배시 연작장애를 해결하는데 기초연구를 삼기 위하여 수행하게 되었다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시험균주의 분리 및 *Trichoderma*의 배양

오이 *fusarium wilt*의 병원균은 경기도 화성에 위치한 경기도농업기술원 시험포장에서 수집하였다. 채집한 시들음 증상의 오이로부터 유관속 부위가 갈변된 줄기를 5 mm내외로 잘라서 1% 차아염소산나트륨(NaOCl)용액에서 1분간 표면 살균하였다. 살균수로 3회 세척 후 물기를 제거하고, 감자한천배지(PDA, Potato Dextrose Agar, Difco)에 치상하였다. incubator 25℃에서 3일간 배양한 균사의 선단부위를 직경 5 mm 코르크보러를 이용하여 PDA배지에 옮겨 배양하면서 시험균주로 사용하였다.

*Trichoderma*는 경기도농업기술원에서 보유 중인 균주를 사용하였다. 사용된 균주 Table 1과 같다. 모두 7균주로서 J1, J2, J9, J10, J13, J16, J17이었고, 28℃에서 3일간 PDA배지에 배양하여 사용하였으며, 광학현미경(Carl Zeiss, AX10)으로 균사의 특성을 조사하였다.

2.2. 시험균주의 동정 및 *Trichoderma* 유사성 비교

모든 균주는 ribosomal DNA-ITS 부위의 염기서열 분석을 통해 동정을 실시하였다. potato dextrose broth 배지에서 7일 배양된 *trichoderma*를 2 mL의 microtube에

넣고, 24시간 동결건조 시킨 후 균사를 고르게 분쇄하여 QIAGEN DNeasy Plant Maxi Kit를 사용하여 genomic DNA를 추출하였다(Druzhinina et al., 2005). ITS 부위의 증폭을 위해 프라이머 SR6R (5'-AAG TAT AAG TCG TAA CAA GG-3')와 LR1 (5'-GGT TGG TTT CTT TCC T-3')을 사용하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 1분 동안 pre-denaturation 시킨 후에 94°C에서 1분 denaturation, 50°C에서 1분, 74°C에서 1분 30초간 extension을 30번 반복 반응한 후에 74°C에서 7분간 extension하여 4°C에서 보관하여 ITS 유전자 염기서열 분석시료로 사용하였다. 이 분석시료는 1.5% agarose gel에 전기영동을 한 후 ethidium bromide로 염색하여 확인하였으며, marker로는 100 bp DNA ladder를 사용하였다. 그 후 PROMEGA PCR Clean-up system kit를 사용하여 정제한 후 sequencing을 하고, National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 BLAST 검색을 통해 종을 동정 하였으며, MEGA5 프로그램의 clustalW 모듈을 이용하여 균주간의 유사성을 조사하였다.

2.3. 길항력 조사

균사생장억제 효과는 대치배양(Dual culture)과 시험관테스트를 하였고, Jun and Kim(2004)이 보고한 알루미늄링 테스트도 수행하였다. 대치배양은 7종의 trichoderma를 각각 PDA배지에 한쪽에 옮기고, 다른 한쪽은 fusarium wilt를 각각 치상하여 10일 후 길항력을 조사하였다.

시험관 테스트는 양쪽에 구멍이 있는 20×200 mm 의 시험관을 사용하였다. 바로커상토 80%, 톱밥 16%, 미강 4%를 혼합하여 시험관에 충전 한 후 121°C에서 40분간 살균한 다음 냉각하여 시험균주를 접종하였다. 한 방향에 fusarium wilt원균을 접종하고, 반대편에 수집균 trichoderma 9종을 각각 접종하여 배양온도 25°C에서 균주간의 대치양상을 조사하였다.

알루미늄링법은 지름 3 cm이고 폭이 0.8 cm인 알루미늄 링을 이용하는 것으로서 알루미늄링 바닥을 알루미늄 호일로 감싼 후 121°C에서 20분간 살균한다. 이후 PDA배지를 제조한 후 균기 전에 알루미늄 링에 넣어 넘치지 않게 충전 한다. 배지가 굳은 후 fusarium wilt를 접종한 후 25°C에서 2일간 배양한 다음 다른 면에

trichoderma를 접종하여 25°C에서 3일간 배양을 실시한 다음 trichoderma의 생장특성을 조사하였다.

2.4. 오이 덩굴쪄김병에 대한 방제효과 검증

오이(품종명 : Baekchim dadagi)는 50공 연결포트에 원예용 상토(바로커)를 넣고 파종하여 8일간 재배한 유묘를 사용하였다. PDA에서 생장한 trichoderma 7종과 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*의 표면을 scraper로 모아 증류수에 넣고 Hemocytometer을 이용하여 포자현탁액 (10^7 spores/mL)을 만들어 사용하였다. 오이의 유묘는 뿌리를 절단 한 후 *Fusarium* 현탁액에 30분간 담근 후 지름 12 cm 포트묘에 정식한 후 다음날 7종의 trichoderma를 각각 50 mL씩 접종한 후 3일 간격으로 4회 추가 접종하였으며, 처리구 당 10주의 오이를 사용하였으며, 3회 반복실험 하였다. 총 생육기간은 24일로 생육 및 발병특성을 조사하였으며, 발병도는 0 = 무병징, 1 = 하엽황화, 2 = 상하엽 황화, 3 = 상하엽 황화 및 시듦, 4 = 고사의 4단계(Kim, 2010)로 구분하여 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

곰팡이의 유연관계를 조사하기 위해 유용하게 사용되는 Internal Transcribed Spacer (ITS)가 있으며, ITS1 과 ITS2의 염기서열 분석은 다른 곰팡이 중에서 *Hypocrea*와 *Trichoderma*에 관한 1,500개 이상의 종을 확인하기 위해 10년 이상 사용되었다(Druzhinina et al., 2005).

이러한 방법으로 국내에서 수집한 trichoderma 7종에

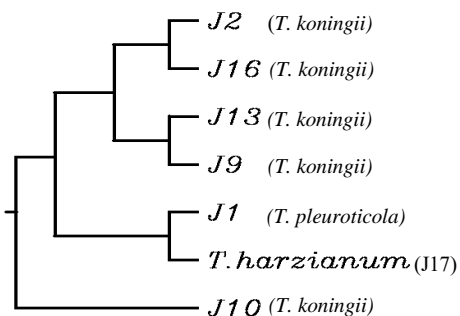


Fig. 1. Phylogenetic dendrogram generated from analysis of ITS rDNA sequence of *Trichoderma* spp.

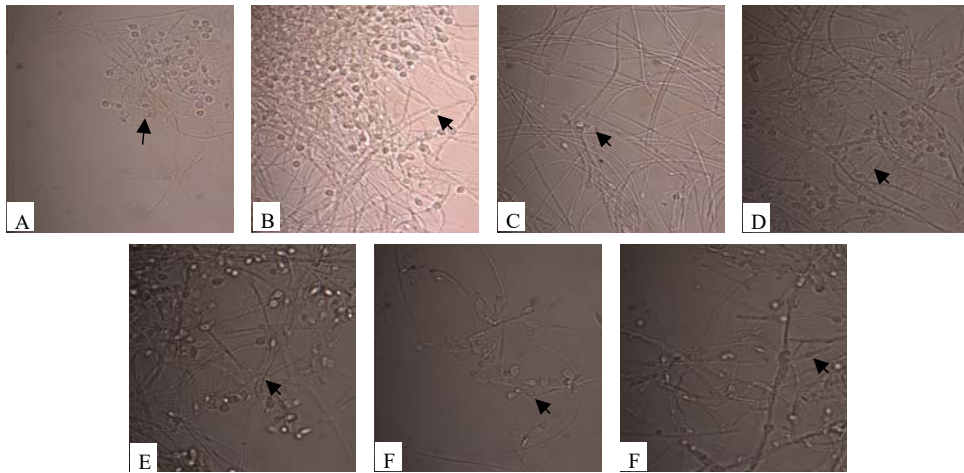


Fig. 2. Morphological features of hyphae containing chlamydospores. $\times 400$. A: J1, B: J2, C: J9, D: J10, E: J13, F: J16, G: J17.

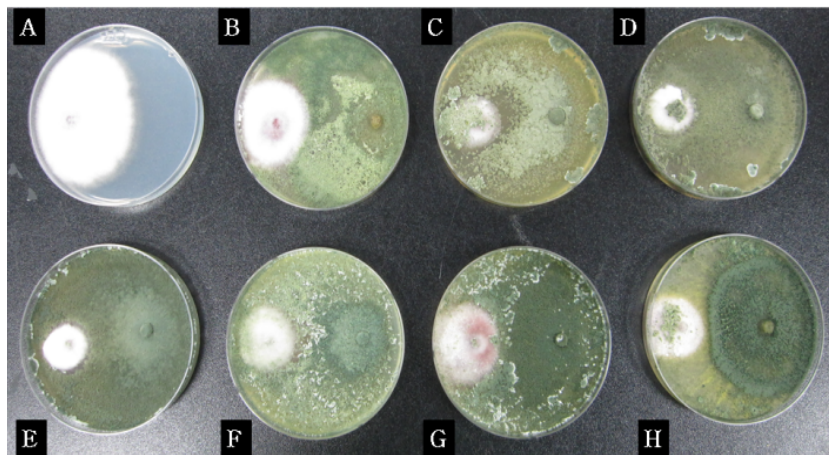


Fig. 3. Hyperparasitism activity of *Trichoderma* sp. against wilt disease by dual culture method. Left: Fusarium wilt, Right: *Trichoderma* sp.. A: Fusarium wilt, B: J1, C: J2, D: J9, E: J10, F: J13, G: J16, H: J17.

대하여 유연관계를 조사한 결과 크게 4개의 그룹으로 나타났다(Fig 1).

수집균주별로 후막포자가 생성되는 것을 확인하였다(Fig 2). *Trichoderma*의 후막포자는 미생물제제의 유효 성분으로 사용되어 왔으며(Harman et al., 1991; Jin et al., 1991; Eyal et al., 1997), 본 실험에 사용된 모든 균주들도 최종 결과에 따라 미생물제제 개발에 유용할 수 있을 것으로 판단되었다.

대치배양 결과 모든 *Trichoderma*종들이 *Fusarium*

wilt에 대하여 억제하는 효과를 보였으며 10일 후에는 녹색의 포자가 병원균 쪽으로 덮으며 자라는 것도 조사되었다(Fig 3). Yang et al.(2013)에 의하면 여러 식물병원균에 대하여 25%가량 균사생장을 저해한다고 하였으며, 그 중 고추 역병균에 대하여도 50% 이상의 균주가 균사생장 저해활성을 보인다고 하였는데 본 실험에서도 *Fusarium* wilt에 대하여 *Trichoderma*균주들이 모두 균사생장 저해활성을 나타내어 이와 유사한 경향이였다.

Tokimoto et al.(1994)의 방법을 응용하여 양쪽이 풀린

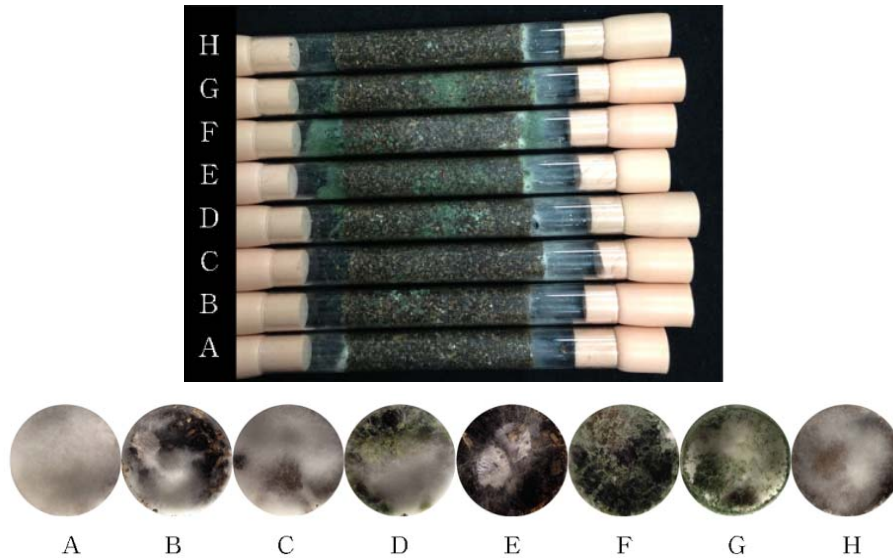


Fig. 4. Dual cultures of *Trichoderma* species and fusarium wilt on substrate at 25 °C. Left: *Trichoderma* sp., Right: Fusarium wilt. A: Fusarium wilt, B: J1, C: J2, D: J9, E: J10, F: J13, G: J16, H: J17.

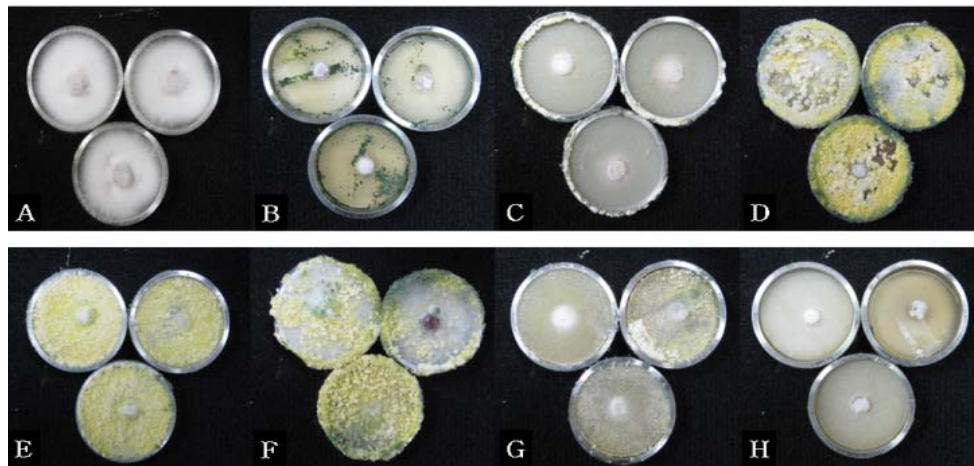


Fig. 5. Antibiotic effect of *Trichoderma* spp. on fusarium wilt. A: Fusarium wilt, B: J1, C: J2, D: J9, E: J10, F: J13, G: J16, H: J17.

시험관에 배지를 충전한 후 한쪽에는 trichoderma, 다른 한쪽에는 fusarium wilt를 접종하여 15일 후 조사한 결과 Fig 4와 같다. 다른 균주들에 비해 J9, J10, J13, J16 균주들의 침입력이 높았고, 포자생성량도 많았다. 또한 15일 후 fusarium이 접종되었던 부위를 조사한 결과 J9, J13, J16의 포자가 fusarium의 위에 생성되는 것을 확인할 수 있었다.

Fusarium의 독소생성에 따른 trichoderma의 성장 정도를 조사한 결과 J9, J10, J13에서 포자의 생성량이 다른 균주 보다 많은 것으로 나타났다(Fig 5). Jun and Kim(2004)에 의하면 Pythium spp에 trichoderma 균주들이 균사생장을 억제한다고 하였으며, 본 실험의 fusarium에서도 생장억제효과를 확인할 수 있었다.

오이에 대한 포트검정을 실시한 결과 Table 2와 같다.

Table 2. Growth characteristics, disease severity, and control value according to port test of cucumbers

Process contents	Plant Length (cm)	Root Length (cm)	Root Weight (g)	Disease Severity (%)	Control Value (%)
<i>F. oxysporum</i> (control)	20.0 ^d	6.4 ^c	1.0 ^b	86.6 ^a	-
<i>F. oxysporum</i> + J1	29.6 ^{ab}	14.1 ^{ab}	2.0 ^a	34.8 ^d	59.8 ^b
<i>F. oxysporum</i> + J2	21.3 ^{cd}	9.6 ^{bc}	1.3 ^{ab}	48.9 ^b	43.6 ^d
<i>F. oxysporum</i> + J9	25.6 ^{bc}	14.0 ^{ab}	2.1 ^a	37.9 ^{cd}	56.3 ^{bc}
<i>F. oxysporum</i> + J10	28.5 ^{ab}	12.3 ^{ab}	1.9 ^a	45.5 ^{bc}	47.5 ^{cd}
<i>F. oxysporum</i> + J13	33.0 ^a	15.1 ^a	2.4 ^a	22.4 ^e	74.1 ^a
<i>F. oxysporum</i> + J16	30.3 ^{ab}	15.9 ^a	2.0 ^a	25.4 ^e	70.7 ^a
<i>F. oxysporum</i> + J17	28.4 ^{ab}	11.5 ^{ab}	1.6 ^{ab}	50.2 ^b	42.1 ^d

a Values followed by the same letter do not differ significantly at $p < 0.05$ according to Duncan's multiple range test.



Fig. 6. Root form of cucumbers during treating 7 kinds of trichoderma for fusarium wilt. A: Fusarium wilt, B: J1, C: J2, D: J9, E: J10, F: J13, G: J16, H: J17.

초장은 J13에서 대조구 보다 크게 나타났고, 근장은 J2를 제외한 모든 균주에서 대조구 보다 길었으며, 근중은 J1, J9, J10, J13, J16이 대조 보다 많았다(Fig 6). fusarium wilt에 대한 발병도는 대조구 대비 J13과 J16에서 가장 작았으며, 방제가는 J13과 J16에서 다른 균주들에 비해 높게 나타났다.

이상과 같은 결과 J13과 J16이 fusarium wilt에 대한 방제효과가 우수한 것으로 판단되었고, 농업현장에서의 활용을 위해 제제화에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

4. 결 론

국내에서 수집한 trichoderma 7종에 대하여 유연관계를 조사한 결과 크게 4개의 그룹으로 나타났고, 수집균주 별로 후막포자가 생성되는 것을 확인하였다. 대치배양

결과 모든 trichoderma종들이 fusarium wilt에 대하여 억제하는 효과를 보였다. 시험관테스트서 다른 균주들에 비해 J9, J10, J13, J16균주들의 침입력이 높았고, 포자 생성량도 많았다. 알루미늄링 테스트에서는 J9, J10, J13에서 포자의 생성량이 다른 균주 보다 많은 것으로 나타났다. 오이에 대한 포트검정을 실시한 결과 초장은 J13에서 대조구 보다 크게 나타났고, 근장은 J2를 제외한 모든 균주에서 대조구 보다 길었으며, 근중은 J1, J9, J10, J13, J16이 대조 보다 많았다. fusarium wilt에 대한 발병도는 대조구 대비 J13과 J16에서 가장 작았으며, 방제가는 J13과 J16에서 다른 균주들에 비해 높게 나타났다.

감사의 글

본 연구는 2017년도 중소벤처기업부의 기술개발사업 지원에 의한 연구임 [C0513579].

REFERENCES

- Armstrong, G. M., Armstrong, J. K., 1981, Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt disease. In *Fusarium: Disease, biology, and taxonomy*, Nelson, P. E., Toussoun, T. A., and Cook, R. J. (eds), University Park, PA: Pennsylvania State University Press. 391-399.
- Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G., Komoj, M., Bissett, J., Szakacs, G., Kubicek, C. P., 2005, An Oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*, *Fungal Genetics and Biology*, 42, 813-828.
- Eyal, J., Baker, C. P., Reeder, J. D., Devane, W. E., Lumsden, R. D., 1997, Large-scale production of chlamydospores of *Gliocladium virens* strain GL-21 in submerged culture. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 19, 163-168.
- Francesco, V., Sivasithamparam, K., Ghisalbertic, E. L., Marra, R., Woo, S. L., Lorito, M., 2008, *Trichoderma*-lantathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 1-10.
- Garibaldi, A., Gilardi, G., Gullino, M. L., 2002, First report of *Fusarium oxysporum* on lettuce in Europe, *Plant Dis*, 86, 1052.
- Haran, S., Schickler, H., Oppenheim, A. B., Chet, I., 1996, Differential expression of *T. harzianum* chitinases during mycoparasitism. *Phytopathology*, 86(9), 980-985.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., 2004, *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts, *Nature Review Microbiology*, 2, 43-56.
- Harman, G. E., Jin, X., Stasz, T. E., Peruzzotti, G., Leopold, A. C., Taylor, A. G., 1991, Production of conidial biomass of *Trichoderma harzianum* for biological control, *Biological control*, 1, 23-28.
- Hubbard, J. C., Gerik, J. S., 1993, A new wilt disease incited by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucum* forma specialis nov, *Plant Dis*, 77, 750-754.
- Inbar, J., Chet, I., 1995, The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*, *Microbiology*, 141(11), 2823-9.
- Jin, X., Harman, G. E., Taylor, A. G., 1991, Conidial biomass and desiccation tolerance of *Trichoderma harzianum* produced at different medium water potentials, *Biological Control*, 1, 237-243.
- Jun, O. K., Kim, Y. H., 2004, *Aphelenchus avenae* and antagonistic fungi as biological control agents of *Pythium* spp, *The Plant Pathology Journal*, 20, 271-276.
- Kim, J. Y., 2010, Developmental characteristics and control of fusarium wilt of lettuce caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucaae* in Korea Ph. D. Dissertation, Chungnam National University, Korea.
- Lee, Y. H., Cha, K. H., Lee, D. G., Shim, H. K., Ko, S. J., Park, I. J., Yang, K. Y., 2004, Cultural and rainfall factors involved in disease development of fusarium wilt of sweet potato, *Plant Pathology J*, 20, 92-96.
- McKeen, C. D., Reilly, C. C., Pusey, P. L., 1986, Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*, *Phytopathology*, 7, 136-139.
- Monaghan, R. L., Tkacz, J. S., 1990, Bioactive microbial products: Focus upon mechanism of action, *Annu. Rev. Microbiol*, 44, 271-301.
- Ploetz, R. C., Bensch, D., Vazquez, A., Colls, A., Nagel, J., Schaffer, B., 1996, A Reexamination of mango decline in Florida, *Plant Disease*, 80, 664-668.
- Ploetz, R. C., Schnell, R. J., Haynes, J., 2002, Variable response of open-pollinated seedling progeny of avocado to *Phytophthora* root rot, *Phytoparasitica*, 30, 262-268.
- Tokimoto, K., Komatsu, M., Fukumasa-nakai, Y., 1994, Establishing the selection method for the *Lentinula edodes* strains resistant to *Trichoderma* spp. *Proc. Japan Acad.*, 70(B), 112-116.
- Yang, N., Lee, S. W., Kim, H. T., Park, K. S., 2013, Growth promotion and induction of systemic resistance against *Phytophthora capsici* on red-pepper plant by treatment of *Trichoderma harzianum* MPA167, *The Korean Society of Pesticide Science*, 17, 394-401.
- Yang, S. S., Kim, C. H., Nam, K. W., Song, Y. S., 2000, Ecological studies on fusarium diseases of fruit-vegetables under structure cultivation 1. Disease incidence and environmental characteristics of the tomato and cucurbits fields infested by *Fusarium* spp., *Plant Dis. Res.*, 6, 59-64.

Zhang, S., White, T. L., Martinez, M. C., McInroy, J. A., Kloepper, J. W., Klassen, W., 2010, Evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria for control of Phytophthora blight on squash under greenhouse conditions, *Biological Control*, 53, 129-135.

• 박윤진, 공주대학교 두과농비자원연구센터 연구교수
cocono@naver.com

• 이영수, 경기도농업기술원 연구사
yslee75@gg.go.kr
• 안승원, 공주대학교 원예학과 교수
annsw@kongju.ac.kr
• 조용구, 공주대학교 식물자원학과 조교
choyk09@kongju.ac.kr
• 이형원, 유니온바이오 이사
blue2sky11@naver.com
• 장명준, 공주대학교 식물자원학과 교수
plant119@kongju.ac.kr