

발간등록번호

11-1543000-004366-01

# 화훼류(백합, 국화) 무병묘 효율 향상 기술개발 및 생산 체계 구축 기술개발

2023.06.15.

주관연구기관 / 서울여자대학교 산학협력단  
협동연구기관 / 강원대학교 산학협력단  
충남농업기술원 화훼연구소

농림축산식품부  
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

최종보고서							보안등급				
중앙행정기관명	농림식품기술기획평가원			사업명	사업명		일반[✓], 보안[ ]				
전문기관명 (해당 시 작성)				내역사업명 (해당 시 작성)			작물바이러스 및 병해충 대응 산업화 기술개발사업				
공고번호				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)							
				연구개발과제번호			120084-3				
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB0304	50%	LB0303	25%	LB0203	25%				
	농림식품과학기술분류	RA0304	50%	AA0202	25%	AA0203	25%				
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문										
	영문										
연구개발과제명	국문	화훼류 (백합, 국화) 무병묘 효율 향상 기술 개발 및 생산 체계 구축 기술 개발									
	영문	Improvement and establishment of virus-free stock production in flowers (lily and chrysanthemum)									
주관연구개발기관	기관명	서울여자대학교 산학협력단		사업자등록번호		217-82-04099					
	주소	(01797)서울시 노원구 화랑로 621 산학협력단		법인등록번호							
연구책임자	성명	류기현		직위		교수					
	연락처	직장전화			휴대전화						
		전자우편			국가연구자번호						
연구개발기간	전체	2020. 04. 29. - 2022. 12. 31(2년 9개월)									
	단계 (해당 시 작성)	1단계	2020. 04. 29. - 2021. 12. 31(1년 9개월)								
		2단계	2022. 01. 01. - 2022. 12. 31(1년 0개월)								
연구개발비 (단위: 천원)	정부지원	기관부담		그 외 기관 등의 지원금				합계		연구개발비 외 지원금	
	연구개발비	연구개발비	현물	현금	현물	현금	현물	현금	현물		
총계	733,000							733,000	733,000		
1단계	1년차	200,000						200,000	200,000		
	2년차	266,500						266,500	266,500		
2단계	1년차	266,500						266,500	266,500		
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자		직위		휴대전화		전자우편		비고	
										역할	기관유형
공동연구개발기관	강원대학교 산학 협력단	홍진성		교수						공동	대학
	충남농업기술원 화훼연구소	이영혜		농업연구사						공동	국립연
위탁연구개발기관											
연구개발기관 외 기관											
연구개발담당자 실무담당자	성명	송은경		직위		연구교수					
	연락처	직장전화			휴대전화						
		전자우편			국가연구자번호						

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2023년 5월 31일

연구책임자: 류기현 (인)

주관연구개발기관의 장: 서울여자대학교 산학협력단 (직인)  
 공동연구개발기관의 장: 강원대학교 산학협력단 (직인)  
 위탁연구개발기관의 장: 충청남도농업기술원 화훼연구소 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하



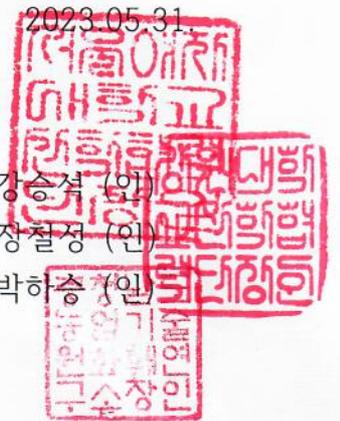
제출문

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “화훼류(백합, 국화) 무병묘 효율 향상 기술 개발 및 생산 체계 구축 기술 개발”(개발기간 : 2020.04.29. ~ 2022.12.31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

주관연구기관명 : 서울여자대학교 산학협력단 (대표자) 강승석 (인)  
협동연구기관명 : 강원대학교 산학협력단 (대표자) 장철성 (인)  
협동연구기관명 : 충남농업기술원 화훼연구소 (대표자) 박하승 (인)



주관연구책임자 : 류기현  
협동연구책임자 : 홍진성  
협동연구책임자 : 이영혜

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

## < 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		작물바이러스 및 병해충대응산업화 기술개발사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		
내역사업명 (해당 시 작성)					연구개발과제번호		120084-3
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB0304	50%	LB0303	25%	LB0203	25%
	농림식품 과학기술분류	RA0304	50%	AA0202	25%	AA0203	25%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명		화훼류 (백합, 국화) 무병묘 효율 향상 기술 개발 및 생산 체계 구축 기술 개발					
전체 연구개발기간		2020. 04. 29. - 2022. 12. 31(2년 9개월)					
총 연구개발비		총 733,000천원 (정부지원연구개발비:733,000천원, 기관부담연구개발비 : 0천원, 지방자치단체: 0천원, 그 외 지원금: 0천원)					
연구개발단계		기초[ ] 응용[ ] 개발[ <input checked="" type="checkbox"/> ] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준(2단계) 종료시점 목표(3단계)	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	백합과 국화 무병묘 생산을 위한 바이러스 관리방안과 바이러스 무병묘 생산성 향상을 위한 생산체계구축을 마련					
	전체 내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 백합 및 국화에 감염되는 바이러스에 대한 고감도 정밀진단기술 개발 및 무병묘 효율 향상을 위한 관리방안연구               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 백합 및 국화 감염 바이러스 검정을 위한 고감도 정밀진단기술 개발</li> <li>- 무병묘 생산 단계에서 바이러스 검정</li> <li>- 바이러스 무병묘 조직배양단계에서의 바이러스 관리시스템 개발</li> </ul> </li> <li>○ 백합 무병묘 생산성 향상을 위한 생산체계구축 기술개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 기존 백합 무병주 생산 구근에서 18종 바이러스에 대한 이병 조사</li> <li>- 바이러스 억제 기술접목 진정 무병 기본식물 생산 및 증식 체계구축</li> <li>- 백합 종구 대량생산 업체(농가)의 단계별 바이러스 감염 분석 및 대응 전략 개발</li> </ul> </li> <li>○ 국화 무병묘 생산성 향상을 위한 생산체계구축 기술개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 국화 내수시장 및 수출 시장 타겟 육성품종과 주력품종 생장점 배양 및 식물체 유기</li> <li>- 육성품종 및 주력품종 생장점 배양묘 무병화 및 기내 대량증식 조건 확립</li> <li>- 기내 대량증식 무병묘 순화·종묘업체 증식 조건 확립 및 농가 생육특성 검정</li> </ul> </li> </ul>					

		<p>목표</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 백합 및 국화 감염 바이러스 검정을 위한 고감도 정밀진단기술 개발</li> <li>○ 무병묘 생산 단계에서 바이러스 검정</li> <li>○ 육성품종 및 주력품종 생장점 배양묘 무병화 및 기내 대량증식 조건 확립</li> </ul>
	<p>1단계 (해당 시 작성)</p>	<p>내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 백합 감염 바이러스에 대한 고감도 정밀진단기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 19종 백합 감염 바이러스 검정을 위한 고감도 프라이머 확보 (20세트)</li> <li>- 신규 고감도 정밀진단기술 개발(8종)</li> <li>- 국화와 함께 검정할 수 있는 정밀진단기술(4종)</li> </ul> </li> <li>○ 확보된 정밀진단기술로 백합 시료에서 바이러스 감염률 조사 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 19종 백합 감염 바이러스 중 4종 바이러스가 검정됨</li> <li>- 일부 백합 시료에서 LMoV, LSV, CMV에 복합 감염된 것을 확인함</li> <li>- 일부 백합 시료에서 LMoV, LSV에 복합 감염된 것을 확인함</li> </ul> </li> <li>○ 백합 무병묘 생산 구근에서의 바이러스 감염률 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- LMoV 65%, PIAMV 34%, CMV 34%, LSV 25%</li> <li>- LMoV는 강원도, 경기도, 충청남도, 제주도에서 우점 바이러스로 분석됨</li> <li>- LSV는 전라북도에서 우점 바이러스로 분석됨</li> </ul> </li> <li>○ 백합 무병묘 생산단계에 적용하기 위한 항바이러스 후보 물질 효과 검증 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 5개의 식물유래 항바이러스 후보 물질을 대상으로 항바이러스 효과 분석</li> <li>- 10 mM 항바이러스 후보물질(A)에서 바이러스 발현 억제 효과를 검증</li> </ul> </li> <li>○ 백합 바이러스 억제 처리 생장점배양을 위한 항바이러스 후보 균 효율성 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 식물유래 항바이러스물질 15 mM에서 바이러스 발현 억제에 효과 검증</li> <li>- BD spray를 1시간 처리에서 27% 바이러스 발현 억제 효과를 검증</li> </ul> </li> <li>○ 국화 감염 바이러스에 대한 고감도 정밀진단기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 9종 국화 감염 바이러스 검정을 위한 고감도 프라이머 확보(9세트)</li> <li>- 신규 고감도 정밀진단기술 개발(4종)</li> <li>- 국화와 함께 검정할 수 있는 정밀진단기술(4종)</li> </ul> </li> <li>○ 확보된 정밀진단기술로 국화 시료에서 바이러스(바이로이드) 감염률 조사 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 조직배양묘: CChMVd 27%, CSVd 4.33%, CVB 3.33%, TAV 0.33%</li> <li>- 순화묘: CChMVd 16%, CSVd 16%</li> <li>- 육묘재배지: CChMVd 43.16%, TSWV 42.11%, CSVd 16.67%</li> </ul> </li> <li>○ 국화 무병묘 생산을 위한 생장점 배양 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 보라미, 펄키스타, 코랄킹 품종을 대상으로 1,329개체 생장점 배양</li> <li>- 266개체 발근배양 성공</li> </ul> </li> <li>○ 국화 조직배양묘 기외순화 최적 조건 확립 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 품종별 기외순화 조건 분석</li> <li>- 원예상토+피트모스&gt; 질석&gt; 원예상토&gt; 피트모스</li> </ul> </li> <li>○ 국화 조직배양묘 저장기간 기간별 생산력 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1개월 저온기간 순화묘 (100% 생존률) &gt;3개월 저온기간 순화묘 (93% 생존률)</li> </ul> </li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 신품종 국화와 기존품종 국화 사이의 염색체 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 4품종 모두 염색체 이상 없음</li> </ul> </li> <li>○ 국화 무병묘 모주 확보 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 9품종 (경기도 육묘업체)을 대상으로 3주에 1회씩 검사 후, 이병주는 제거함</li> <li>- 14품종 (코랄킹, 레이나, U366, 엘도라, 써니랑 포함)을 대상으로 233개체의 건전 모주를 확보함</li> </ul> </li> <li>○ 물리적 처리에 의한 국화 무병묘 생산 효과 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 저온처리 (4 ℃) 3주: 60% 무병묘 생산 (CSVd, CChMVd 제거)</li> <li>- 고온처리 (35 ℃) 2주 : 70% 무병묘 생산 (CSVd 제거)</li> <li>- 고온처리 (35 ℃) 4주 : 75% 무병묘 생산 (CSVd 제거)</li> </ul> </li> <li>○ 화학적 처리에 의한 국화 무병묘 생산 효과 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- DHA처리: CSVd, CChMVd 제거되지는 않았지만, 바이로이드 발현율을 낮춤</li> </ul> </li> <li>○ 국화 무병묘 생산에서 적합한 품종 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 조직배양단계: 펄키스타, 코랄킹, 엘도라, 금수 품종</li> <li>- 순화단계: SP19-138, 레드볼, 본본다크, 화이트캡 품종</li> </ul> </li> </ul>				
	2단계	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 15%; text-align: center; vertical-align: middle;">목표</td> <td style="padding: 5px;"> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 백합 및 국화에 감염되는 바이러스에 대한 고감도 정밀진단기술 개발 및 무병묘 효율 향상을 위한 관리방안연구</li> <li>○ 백합 무병묘 생산성 향상을 위한 생산체계구축 기술개발</li> <li>○ 국화 무병묘 생산성 향상을 위한 생산체계구축 기술개발</li> </ul> </td> </tr> <tr> <td style="width: 15%; text-align: center; vertical-align: middle;">내용</td> <td style="padding: 5px;"> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 백합 및 국화 감염 바이러스 정밀진단기술(qPCR) 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 백합 및 국화 감염 바이러스 정밀진단기술에 사용될 reference gene 개발</li> <li>- CMV, LSV, LMoV, CChMVd, CSV에 대한 정밀진단기술 개발</li> </ul> </li> <li>○ 무병묘 생산 단계에서 적용될 수 있는 항바이러스 후보 물질 선별 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 항바이러스 후보물질(A, G, E, F, I) 효과 검정 완료</li> </ul> </li> <li>○ 백합 원원종, 인편 증식 등 단계별 주요 감염 바이러스 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 조직 배양단계의 백합 바이러스를 qRT-PCR과 dPCR로 분석</li> <li>- 정식 전 약제처리를 통한 백합 바이러스 감염 분석</li> </ul> </li> <li>○ 백합 감염 바이러스 억제력을 위한 항바이러스제 처리, 작업 공정 개선 등을 통한 감염 억제 효과 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 생산 단계와 작업 공정에 따른 바이러스 억제 전략을 수립</li> <li>- 성장점 배양 및 항바이러스 물질을 처리하여 바이러스 억제 효과 확인</li> <li>- 조직배양 백합내에 dsRNA를 처리하여 바이러스 억제 효과 확인</li> <li>- 정식 전 항바이러스 물질을 처리하여 백합 생장률 증가 확인</li> </ul> </li> <li>○ 국화 관행묘와 조직배양묘의 생육비교 분석완료 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 무병주와 관행묘의 생육상태 비교: 초장과 엽수(무병묘&gt;관행묘)</li> </ul> </li> <li>○ 국화 바이로이드 예방 약제 ‘바이캐미’ 처리효과 검증 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 바이캐미 5회, 10회처리에서 국화왜화바이로이드 제거율 100%</li> <li>- 바이캐미 5회, 10회처리에서 황화모틀바이로이드 발현율은 차이가 없었음</li> </ul> </li> <li>○ 국화 조직배양묘에서 바이러스(바이로이드) 감염률 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- CSVd 16.67%(에일린 핑크 11.11%, 울가핑크 16.67%, 에일린 22.22%)</li> </ul> </li> <li>○ 국화 품종별 모주의 노화주와 동지아 바이러스 감염률 분석완료 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 동지아로 번식하면 CChMVd와 CSVd 감소</li> </ul> </li> </ul> </td> </tr> </table>	목표	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 백합 및 국화에 감염되는 바이러스에 대한 고감도 정밀진단기술 개발 및 무병묘 효율 향상을 위한 관리방안연구</li> <li>○ 백합 무병묘 생산성 향상을 위한 생산체계구축 기술개발</li> <li>○ 국화 무병묘 생산성 향상을 위한 생산체계구축 기술개발</li> </ul>	내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 백합 및 국화 감염 바이러스 정밀진단기술(qPCR) 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 백합 및 국화 감염 바이러스 정밀진단기술에 사용될 reference gene 개발</li> <li>- CMV, LSV, LMoV, CChMVd, CSV에 대한 정밀진단기술 개발</li> </ul> </li> <li>○ 무병묘 생산 단계에서 적용될 수 있는 항바이러스 후보 물질 선별 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 항바이러스 후보물질(A, G, E, F, I) 효과 검정 완료</li> </ul> </li> <li>○ 백합 원원종, 인편 증식 등 단계별 주요 감염 바이러스 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 조직 배양단계의 백합 바이러스를 qRT-PCR과 dPCR로 분석</li> <li>- 정식 전 약제처리를 통한 백합 바이러스 감염 분석</li> </ul> </li> <li>○ 백합 감염 바이러스 억제력을 위한 항바이러스제 처리, 작업 공정 개선 등을 통한 감염 억제 효과 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 생산 단계와 작업 공정에 따른 바이러스 억제 전략을 수립</li> <li>- 성장점 배양 및 항바이러스 물질을 처리하여 바이러스 억제 효과 확인</li> <li>- 조직배양 백합내에 dsRNA를 처리하여 바이러스 억제 효과 확인</li> <li>- 정식 전 항바이러스 물질을 처리하여 백합 생장률 증가 확인</li> </ul> </li> <li>○ 국화 관행묘와 조직배양묘의 생육비교 분석완료 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 무병주와 관행묘의 생육상태 비교: 초장과 엽수(무병묘&gt;관행묘)</li> </ul> </li> <li>○ 국화 바이로이드 예방 약제 ‘바이캐미’ 처리효과 검증 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 바이캐미 5회, 10회처리에서 국화왜화바이로이드 제거율 100%</li> <li>- 바이캐미 5회, 10회처리에서 황화모틀바이로이드 발현율은 차이가 없었음</li> </ul> </li> <li>○ 국화 조직배양묘에서 바이러스(바이로이드) 감염률 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- CSVd 16.67%(에일린 핑크 11.11%, 울가핑크 16.67%, 에일린 22.22%)</li> </ul> </li> <li>○ 국화 품종별 모주의 노화주와 동지아 바이러스 감염률 분석완료 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 동지아로 번식하면 CChMVd와 CSVd 감소</li> </ul> </li> </ul>
목표	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 백합 및 국화에 감염되는 바이러스에 대한 고감도 정밀진단기술 개발 및 무병묘 효율 향상을 위한 관리방안연구</li> <li>○ 백합 무병묘 생산성 향상을 위한 생산체계구축 기술개발</li> <li>○ 국화 무병묘 생산성 향상을 위한 생산체계구축 기술개발</li> </ul>					
내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 백합 및 국화 감염 바이러스 정밀진단기술(qPCR) 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 백합 및 국화 감염 바이러스 정밀진단기술에 사용될 reference gene 개발</li> <li>- CMV, LSV, LMoV, CChMVd, CSV에 대한 정밀진단기술 개발</li> </ul> </li> <li>○ 무병묘 생산 단계에서 적용될 수 있는 항바이러스 후보 물질 선별 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 항바이러스 후보물질(A, G, E, F, I) 효과 검정 완료</li> </ul> </li> <li>○ 백합 원원종, 인편 증식 등 단계별 주요 감염 바이러스 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 조직 배양단계의 백합 바이러스를 qRT-PCR과 dPCR로 분석</li> <li>- 정식 전 약제처리를 통한 백합 바이러스 감염 분석</li> </ul> </li> <li>○ 백합 감염 바이러스 억제력을 위한 항바이러스제 처리, 작업 공정 개선 등을 통한 감염 억제 효과 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 생산 단계와 작업 공정에 따른 바이러스 억제 전략을 수립</li> <li>- 성장점 배양 및 항바이러스 물질을 처리하여 바이러스 억제 효과 확인</li> <li>- 조직배양 백합내에 dsRNA를 처리하여 바이러스 억제 효과 확인</li> <li>- 정식 전 항바이러스 물질을 처리하여 백합 생장률 증가 확인</li> </ul> </li> <li>○ 국화 관행묘와 조직배양묘의 생육비교 분석완료 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 무병주와 관행묘의 생육상태 비교: 초장과 엽수(무병묘&gt;관행묘)</li> </ul> </li> <li>○ 국화 바이로이드 예방 약제 ‘바이캐미’ 처리효과 검증 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 바이캐미 5회, 10회처리에서 국화왜화바이로이드 제거율 100%</li> <li>- 바이캐미 5회, 10회처리에서 황화모틀바이로이드 발현율은 차이가 없었음</li> </ul> </li> <li>○ 국화 조직배양묘에서 바이러스(바이로이드) 감염률 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- CSVd 16.67%(에일린 핑크 11.11%, 울가핑크 16.67%, 에일린 22.22%)</li> </ul> </li> <li>○ 국화 품종별 모주의 노화주와 동지아 바이러스 감염률 분석완료 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 동지아로 번식하면 CChMVd와 CSVd 감소</li> </ul> </li> </ul>					

			<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 국화 조직배양묘 고온 및 저온 처리 후 바이러스 감염률 분석 완료 <ul style="list-style-type: none"> <li>- CChMVd는 고온에 15일 동안 보관</li> </ul> </li> <li>○ 무병묘 생산 체계를 위한 관리방안 마련 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 무병묘 생산단계에서 정밀진단기술 적용 단계 마련</li> <li>- 무병묘 생산단계에서 바이러스 억제기술 적용 단계를 마련</li> </ul> </li> </ul>
--	--	--	--

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 논문 1건</li> <li>○ 국내특허출원 2건</li> <li>○ 학술발표 11건(국제 7건, 국내 4건)</li> <li>○ 기술이전: 1건</li> <li>○ 정책활용: 1건(정책 제안)</li> <li>○ 인력양성: 2명(석사학위 배출)</li> <li>○ 고용창출: 1명</li> <li>○ 홍보실적: 2건</li> <li>○ 교육 및 컨설팅: 6건</li> </ul>
--------	--

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 바이러스 정밀진단기술 개발은 극미량의 바이러스 검출에 대한 정확도를 높여 바이러스 무병묘를 선발 할 수 있으며, 재배지에서의 바이러스 조기 검정으로 확산을 방지할 수 있음</li> <li>○ 국내외 바이러스 정밀진단기술에 적용될 수 있으며 식물검역에 국경감시를 위한 진단기술로 사용될 수 있음</li> <li>○ 바이러스 무병화 기술개발로 백합과 국화의 품질을 향상하고, 안정적인 작물 생산으로 농가 경쟁력을 강화할 수 있음</li> <li>○ 국내 주요 감염되는 바이러스 조사로 방제에 필요한 바이러스를 선별하여 더욱 효과적인 바이러스 방제 대책을 마련할 수 있음</li> <li>○ 본 연구에서 개발된 바이러스 무병화 기술개발은 다른 작물에 대한 무병묘 생산기술개발에 기여할 수 있음</li> </ul>
---------------------	--

연구개발성과의 비공개여부 및 사유	해당사항 없음
--------------------	---------

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
	1	2										

연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호

국문핵심어 (5개 이내)	바이러스 무병묘	백합	국화	정밀진단기술	조직배양
---------------	----------	----	----	--------	------

영문핵심어 (5개 이내)	virus-free stock	lily	chrysanthemum	precision diagnosis technique	tissue culture
---------------	------------------	------	---------------	-------------------------------	----------------

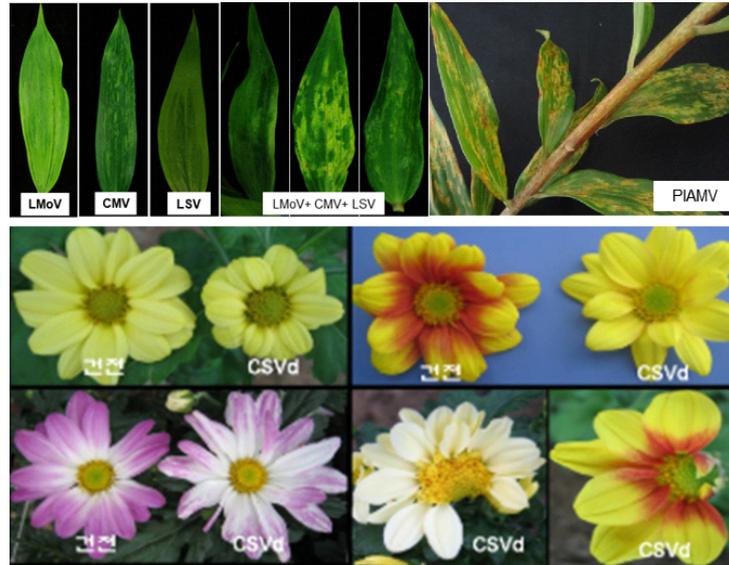
## < 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....	1
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용 .....	3
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도 .....	107
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성) .....	117
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도 .....	118
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획 .....	119
별첨 자료 (참고 문헌 등) .....	120

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발의 필요성

- 기후변화, 개방화로 고위험 바이러스병의 국내 유입 및 피해확산 사례가 지속해서 발생함에 따라 국가 주도의 대응기술 마련이 시급함
  - \* 신규 바이러스 발생 증가 : 1988년 이후 120종 이상 보고
  - \* 식물검역 금지대상 바이러스(PPV) 국내 최초 발생('15)
  - \* 연간 8,000억원 이상 경제적 손실
- 바이러스병을 예방하기 위해 과수 등 영양번식 작물의 무병묘를 생산 보급하고 있으나 농업현장에서의 무병묘 유통실적은 저조한 실정임



<그림 1> 바이러스에 감염된 백합과 국화의 병징 모습  
(서울여대, 원예연구소, Montero-Astúa et al., 2017).

- 백합의 경우, 전세계적으로 많은 바이러스의 감염이 알려져 왔지만, 주로 감염하는 바이러스는 Cucumber mosaic virus (CMV), Lily mottle virus (LMoV), Lily symptomless virus (LSV), Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV) 등이 보고되었으며, 이러한 바이러스들이 단독·복합 감염되어 백합의 구근 및 절화 생산량에 큰 피해를 주고 있음
- 세계적으로 국화에 많이 발생하는 병해는 토마토반점위조바이러스(TSWV), 오이모자이크바이러스(CMV), 국화왜화바이러스(CSVd), 국화황화모틀바이러스(CChMoVd) 등으로 감염이 되면 생산성 감소, 품질저하 및 품종이 퇴화되는 피해가 발생하고 있음
- 본 연구는 백합 및 국화 바이러스병을 예방하고 국내 백합 및 국화 주력 품종의 무병 우량묘 생산성 향상을 위해 고감도 검출 시스템의 개발과 무병묘 조직배양단계에서 바이러스 관리체계 시스템을 구축하여 무병묘 유통 활성화 및 고품질 농산물 안전생산에 기여하고자 함

## 가. 식물바이러스 조기 검정 및 정밀진단을 위한 고감도 검출 시스템 개발의 필요성

- 최근 국제적 무역 다변화, 재배환경의 변화 및 급변하는 기후변화로 인해서 외래 고병원성 식물바이러스병에 의한 피해확산 사례가 지속해서 발생하고 있음
- 기후변화 및 개방화 등으로 국내 원예 및 약용작물에 새롭게 출현하는 병원균 중 50% 이상이 식물바이러스이며, 따라서 식물바이러스는 전 세계적으로 작물 피해, 국제 식량문제 등 인간의 삶에 전반적

으로 위협요인이 되고 있음

- 또한, 고병원성 바이러스병에 감염된 작물은 세계적으로 수출 및 수입을 제한하는 금지 또는 관리급 검역병원체로서 국가적 차원의 방제 대책 및 대응기술 마련이 시급함
- 바이러스는 순환물기생체로 많은 작물에서 경쟁적으로 큰 피해를 일으키는 병원균으로 종자로 번식되는 주요작물은 물론 영양번식으로 증식되는 화훼류 및 원예작물은 대량 무성 번식체를 통해 바이러스가 지속해서 전파되므로 바이러스에 의한 피해가 다른 작물에 비해 특히 심함
- 현재까지 바이러스를 방제하기 위한 화학적 약제가 개발되지 않았기 때문에 바이러스에 의한 피해가 몇몇 작물의 경우에는 심각한 상태임이 보고되고 있으므로 감염된 식물을 조기에 진단하여 제거하거나 무병주를 재배하는 것이 바이러스 피해를 줄일 최선의 방법으로 인식되고 있음
- 특히 백합과 국화는 무병묘 생산에서는 진단기술의 검출 한계로 소량의 바이러스 및 잠복바이러스가 감염된 상태로 생산되는 경우가 있어 재배지에서의 바이러스 증식으로 품질 저하와 수확량 감소로 농가에 큰 피해를 주고 있는 실정임
- 따라서 바이러스를 조기에 고감도로 정밀 진단할 수 있는 기술의 개발은 무병묘 백합 및 국화 생산에 필수적이며, 대상 작물에서 바이러스의 피해를 줄일 수 있는 가장 효과적인 방법이라고 할 수 있음

#### 나. 백합 무병묘 연구개발의 필요성

- 백합은 절화용으로 주로 한국, 일본 등 동아시아에서 재배되어왔고 국내 주요 화훼수출농작물로 알려짐
- 백합은 일반적으로 종자로 키우면 꽃이 개화할 때까지 최소 4년 이상이 소요되기 때문에 주로 구근으로 영양 번식하는데, 영양 번식시키는 과정에서 토양이나 다른 감염원과의 접촉빈도가 높아져 바이러스의 감염률이 높아짐
- 백합에 감염하는 바이러스는 주로 Cucumber mosaic virus (CMV), Lily mottle virus(LMoV), Lily symptomless virus (LSV), Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV) 등의 바이러스들이 단독, 복합 감염되어 있으며, 이러한 바이러스의 감염 시 바이러스의 방제가 힘든 문제점이 있음
- 이러한 백합품종 내 바이러스의 감염으로 인해 구근 및 절화 생산량이 매우 감소되어 경제적 손실이 증가함
- 즉, 국내 주요 수출농작물인 백합의 영양번식 과정에서 바이러스의 감염을 효과적으로 예방하고 방제하는 무병묘를 생산하는 방법의 구축이 필요함
- 따라서 본 연구는 백합에 보고된 18종 바이러스에 대한 “진정 무병주” 생산 및 효율적인 바이러스 검정 매뉴얼 개발을 통한 무병주 생산체계 기술을 확립하고자 함

#### 다. 국화 무병묘 연구개발의 필요성

- 국화는 국내 질화재배 면적의 약 26%를 차지하는 중요한 화훼작물 중 하나이며 대표적인 영양번식 작물로 중요생산은 삽목번식에 의해서만 증식하고 있음
- 이러한 삽목 번식은 바이러스 및 바이로이드에 쉽게 전염되는 특성이 있으며, 특히 국화왜화바이러스(CSVd)는 상업용 국화 중요 생산 과정에서 가장 문제가 많이 되는 병원체로 감염 시 수량감소, 질화 품질이 떨어지는 등 심각한 문제가 발생 되고 있음
- 최근 국내육성품종의 질적 수준 향상, 보급 노력과 재배 농가의 인식전환 등으로 시장 점유율은 증가('19, 32.7%)하고 있으나, 육성품종의 무병화체계 미확립으로 고품질의 질화 생산에는 한계가 있다고 판단됨
- 국내 국화 무병묘 생산·연구 기관은 국립원에특작과학원, 충남농업기술원 화훼연구소와 실용화재단에서 실시하고 있으며, 국화 육종사업을 수행하고 있는 경기, 경남, 경북 및 전북농업기술원에서도 육성품종의 무병화 사업을 검토하고 있어 국내 환경에 맞는 무병묘 생산 및 보급체계의 모델화 제시로 예산을 절감할 필요가 있음
- 그동안 국화 육성품종에 대한 무병화 사업추진의 문제점은 식물의 생육단계와 재배환경에 따라 검정결과가 다르게 나타날 수 있다는 사실을 최근에 인지하였고, 연구기관별 무병묘 생산 시 검정 횟수와 판정 기준 오류로 인해 농가 재배 시 품질이 균일하지 못한 실정임
- 국내 육성품종의 재배수요가 증가하고 있으나, 국내 육묘산업과 업체의 영세성으로 무병묘에 대한 생산·공급이 원활하지 못하고 개화 불균일 및 바이러스·바이로이드 병 등이 지속해서 발생하고 있어 안정적인 대량생산 체계를 구축할 필요가 있음
- 국화 재배 농가의 소득향상과 육성품종의 보급 확대를 위해서는 내수시장용과 수출시장용 품종을 대상으로 조직배양 최적화 기술과 무병화 기술을 개발·적용하여 무병묘를 육성하고 중요 생산업체와 공동으로 대량생산 체계를 구축해야 함
- 또한, 국화 무병묘를 효율적으로 유지 관리 할 수 있는 방법과 기내 대량번식 시 변이체 발생 확인 방법을 검정하여 안정적인 조직배양묘 생산체계를 확립해야 함
- 국내 국화재배 농가의 모주 관리는 토경재배가 대부분으로 고품질의 우량묘 적기 안정 공급이 미흡한 실정이며, 육묘 전업화를 위한 통상실시업체에서도 기존 재배와는 다른 체계적인 모주 관리기술이 요구되고 있음

## 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

### 2-1. 연구개발의 목표

#### 가. 최종목표

- 본 연구는 백합과 국화 무병묘 생산을 위한 바이러스 관리방안과 바이러스 무병묘 생산성 향상을 위한 생산체계구축을 마련하고자 함

#### 나. 세부목표

- 백합 및 국화에 감염되는 바이러스에 대한 고감도 정밀진단기술 개발 및 무병묘 효율 향상을 위한 관리방안연구
- 백합 무병묘 생산성 향상을 위한 생산체계구축 기술개발

## 2-2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

### 가. 주관연구기관 (서울여자대학교 산학협력단):

#### <1차년도>

본 연구는 국내외 주요 백합과 국화 감염 바이러스를 조사하여 그에 따른 주요바이러스 목록을 작성하였고, 조사된 주요 감염 바이러스의 최신 유전자 정보를 확보하였음. 확보된 유전자 정보를 기초로 *in silico* 분석을 수행하여 정밀진단기술에 활용할 수 있는 표준양성시료 확보 (21개 표준양성시료 확보)와 특이적인 프라이머 (20종 바이러스 검정용 특이적인 프라이머 확보)를 제작하였음.

#### 1) 국내외 백합과 국화 감염 바이러스 목록 작성

국제바이러스분류위원회 (ICTV), 논문 및 NCBI 데이터베이스를 기초하여 백합과 국화 감염 바이러스를 조사하여 목록을 작성하였음 [표 1]. 백합에 감염되는 바이러스는 총 18종으로 그 중 Broad bean wilt virus (BBWV), Cucumber mosaic virus (CMV), Lily mottle virus (LMOV), Lily symptomless virus (LSV), Milk vetch dwarf virus (MDV), Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV), Tomato ringspot virus (ToRSV)들은 국내에서도 보고되었음. 또한, Arabis mosaic virus (ArMV), Strawberry latent ringspot virus (SLRSV), Tobacco ringspot virus (TRSV), Tomato ringspot virus (ToRSV) 들은 국내 검역관리 바이러스에 해당함.

[표 1] 국내외 백합과 국화 감염 바이러스 목록

기주명	바이러스 (virus)			
	종 (species)	속 (genus)	과 (family)	DNA/RNA
백합	Arabid mosaic virus (ArMV)	Nepovirus	Secoviridae	+ssRNA
	Broad bean wilt virus (BBWV)	Fabavirus	Secoviridae	+ssRNA
	Citrus tatter leaf virus (CTLV)	Capillovirus	Betaflexiviridae	+ssRNA
	Cucumber mosaic virus (CMV)	Cucumovirus	Bromoviridae	+ssRNA
	Lily mottle virus (LMOV)	Potyvirus	Potyviridae	+ssRNA
	Lily symptomless virus (LSV)	Carlavirus	Betaflexiviridae	+ssRNA
	Lily virus X (LVX)	Potexvirus	Alphaflexiviridae	+ssRNA
	Milk vetch dwarf virus (MDV)	Nanovirus	Nanoviridae	ssDNA
	Narcissus mosaic virus (NMV)	Potexvirus	Alphaflexiviridae	+ssRNA
	Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV)	Potexvirus	Alphaflexiviridae	+ssRNA
	Shallot yellow stripe virus (SYSV)	Potyvirus	Potyviridae	+ssRNA
	Strawberry latent ringspot virus (SLRSV)	Unassigned	Secoviridae	+ssRNA
	Tobacco mosaic virus (TMV)	Tobamovirus	Virgaviridae	+ssRNA
	Tobacco rattle virus (TRV)	Tobravirus	Virgaviridae	+ssRNA
	Tobacco ringspot virus (TRSV)	Nepovirus	Secoviridae	+ssRNA
	Tomato aspermy virus (TAV)	Cucumovirus	Bromoviridae	+ssRNA
	Tomato spotted wilt virus (TSWV)	Tospovirus	Bunyaviridae	-ssRNA
	Tomato ringspot virus (ToRSV)	Nepovirus	Secoviridae	+ssRNA
국화	Chrysanthemum B virus (CVB)	Carlavirus	Betaflexiviridae	+ssRNA
	Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV)	Tospovirus	Bunyaviridae	+ssRNA
	Cucumber mosaic virus (CMV)	Cucumovirus	Bromoviridae	+ssRNA
	Impatiens necrotic spot virus (INSV)	Tospovirus	Bunyaviridae	-ssRNA
	Tomato aspermy virus (TAV)	Cucumovirus	Bromoviridae	+ssRNA
	Tomato spotted wilt virus (TSWV)	Tospovirus	Bunyaviridae	-ssRNA
	Potato virus X (PVX)	Potexvirus	Alphaflexiviridae	+ssRNA
	Chrysanthemum chlorotic mottle viroid (CChMVd)	Pelamoviroid	Avsunviroidae	ssRNA
Chrysanthemum stunt viroid (CSVd)	Pospiviroid	Pospiviroidae	ssRNA	

\*검은색: 국외에서 보고된 바이러스

\*붉은색: 국외/국내에서 보고된 바이러스

\*푸른색칸: 국내 검역관리 바이러스

#### 2) 국내 주요 백합 및 국화 감염 바이러스에 대한 정밀진단기술개발

국내외 보고된 18종 백합 감염 바이러스들과 9종 국화 감염 바이러스들을 대상으로 국내 백합 재배지에서 주요하게 발생하는 바이러스들을 분석하여 주요 백합 및 국화 감염 바이러스들에 대한 정밀

진단기술을 개발하였음.

**가) 백합 및 국화 바이러스들의 최신 유전자 정보 확보**

주요 백합 및 국화 감염 바이러스 중, 선행 연구되어 확보된 바이러스 검정 프라이머를 제외한 10종의 바이러스들을 대상으로 미국 국립생물공학정보센터(Natioanl center for Biotechnology Information, NCBI)에서 최신 유전체 정보(complete sequence)를 확보[표 2]하여 *in silico* 분석을 수행하였음.

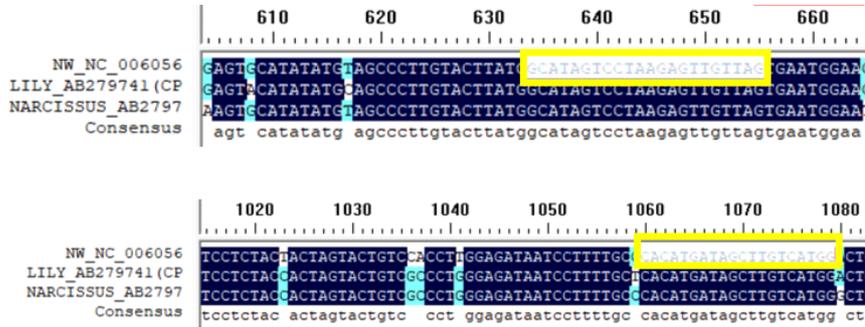
[표 2] 백합 및 국화 바이러스들에 대한 최신 유전자 정보 목록

Virus	NCBI accession no. (complete sequence)
Arabis mosaic virus (ArMV)	NC_006056, AB279741, AB279739, AB27940
Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV)	NC_027719, AB600873, MF093685, KF493771, LC126118
Citrus tatter leaf virus (CTLV)	MH144342, MH144343, MN495981, MH144341, MH108986, MH108975, MH108976, MH108977, MH108978, MH108979, MH108980, MH108981, MH108982, MH108983, MH108984, MH108985
Impatiens necrotic spot virus (INSV)	NC_003624, MN553562, LC384872, FN400773, FN400772
Lily virus X (LVX)	NC_007192, LC335818
Milk vetch dwarf virus (MDV)	MC_003646, LC010102, LC521497, LC094165, LC094153, MN059435, MN053908, MK433284, KY070235, KY070245
Strawberry latent ringspot virus (SLRSV)	NC_006965, MF796994, MF796998, MF796974, MF797976, MF796978, MF796980, MF796982, MF796984, MF796986, MF796990, MF796988, MF796992, MF796992, MF797008, MF797010, MG062674, MH237606, AY860979, MF797000, MF797012, MF797006, MF797004, MF797014
Tomato aspermy virus (TAV)	NC_003836, LC380671, LC380677, LC380674, EF153735
Tobacco ringspot virus (TRSV)	NC_005096, MK263336, MK263336, MT210151, MT563079, KJ556850, MH427298
Tomato ringspot virus (ToRSV)	NC_003839, KM083891, KM083893, KM083895

**나) 백합 및 국화 바이러스들의 최신 유전자 정보 확보**

미국 국립생물공학정보센터에서 등록된 염기서열 정보들을 확보하여 DNAMAN software(Lynnon Biosoft, Quebec, Canada)와 Lasergene DNASTAR software(DNASTAR Inc., Madison, WI, USA)를 사용하여 염기서열의 상동성 부위를 분석하여 특이적인 프라이머 위치를 선정하였음.

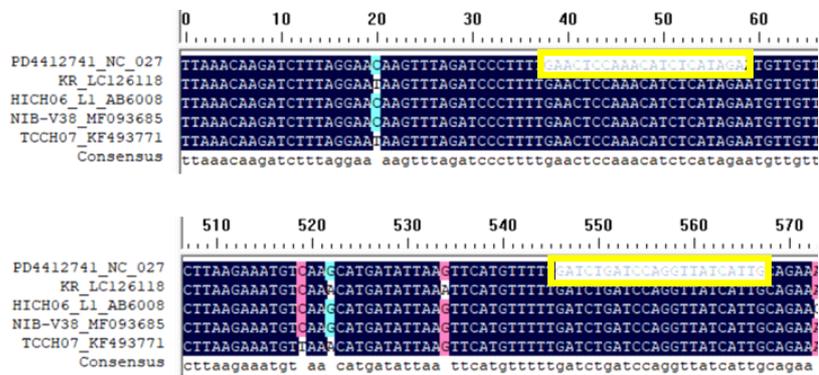
Arabis mosaic virus (ArMV)



<그림 1> *In silico* 분석을 통한 ArMV 정밀진단기술 개발에 적용될 신규 프라이머 위치선정. 노란색 박스: 신규 프라이머 염기서열 위치.

현재 보고된 ArMV 전체 염기서열들을 확보하고, *in silico* 분석을 통하여 가장 안정적으로 일치된 염기서열 위치를 탐색하였음. 그 결과 ArMV의 coat protein 부위로 선정되었고, coat protein 염기서열 중 448bp가 증폭되어 검정 될 수 있는 정밀진단용 프라이머를 제작하였음. 위치는 위 그림<그림 1>에서 노란색 박스로 표시하였음.

□ Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV)

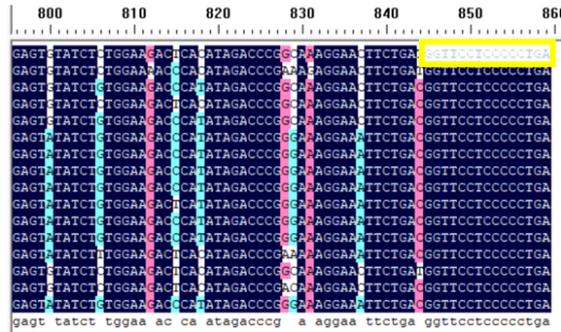
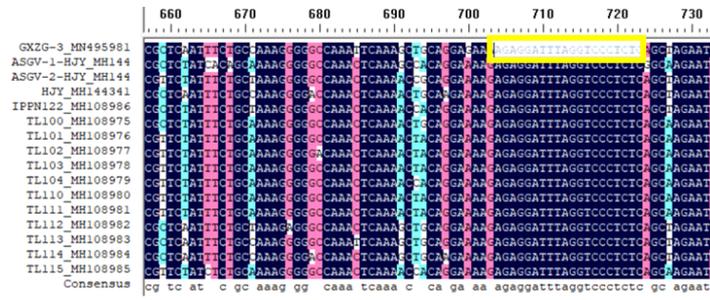


<그림 2> *In silico* 분석을 통한 CSNV 정밀진단기술 개발에 적용될 신규 프라이머 위치선정. 노란색 박스: 신규 프라이머 염기서열 위치.

현재 보고된 CSNV 전체 염기서열들을 확보하고, *in silico* 분석을 통하여 가장 안정적으로 일치된 염기서열 위치를 탐색하였음. 그 결과 CSNV의 coat protein 부위로 선정되었고, coat protein 염기서열 중 632 bp가 증폭되어 검정 될 수 있는 정밀진단용 프라이머를 제작하였음. 위치는 위 그림<그림 2>에서 노란색 박스로 표시하였음.

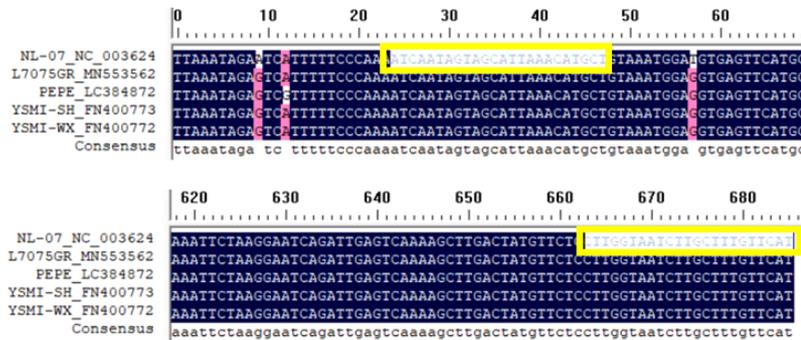
□ Citrus tatter leaf virus (CTLV)

현재 보고된 CTLV 전체 염기서열들을 확보하고, *in silico* 분석을 통하여 가장 안정적으로 일치된 염기서열 위치를 탐색하였으나, CSNV strains/isolates 염기서열들은 낮은 상동성을 나타내었음. 따라서 CTLV 전체 염기서열 중 movement protein 부위에서 156 bp를 증폭되어 검정 될 수 있는 정밀진단용 프라이머를 제작하였음. 위치는 위 그림<그림 3>에서 노란색 박스로 표시하였음.



<그림 3> *In silico* 분석을 통한 CTLV 정밀진단기술 개발에 적용될 신규 프라이머 위치선정. 노란색 박스: 신규 프라이머 염기서열 위치.

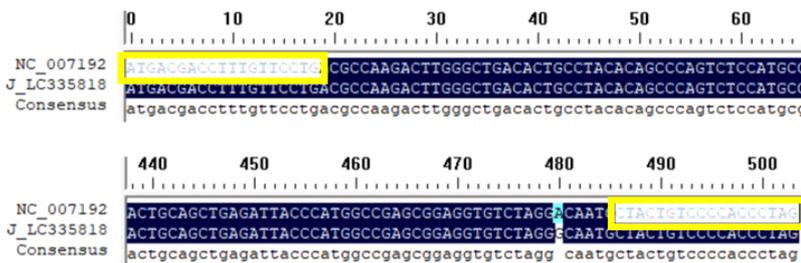
□ Impatiens necrotic spot virus (INSV)



<그림 4> *In silico* 분석을 통한 INSV 정밀진단기술 개발에 적용될 신규 프라이머 위치선정. 노란색 박스: 신규 프라이머 염기서열 위치.

현재 보고된 INSV 전체 염기서열들을 확보하고, *in silico* 분석을 통하여 가장 안정적으로 일치된 염기서열 위치를 탐색하였음. 그 결과 INSV의 coat protein 부위로 선정되었고, coat protein 염기서열 중 662 bp가 증폭되어 검정 될 수 있는 정밀진단용 프라이머를 제작하였음. 위치는 위 그림<그림 4>에서 노란색 박스로 표시하였음.

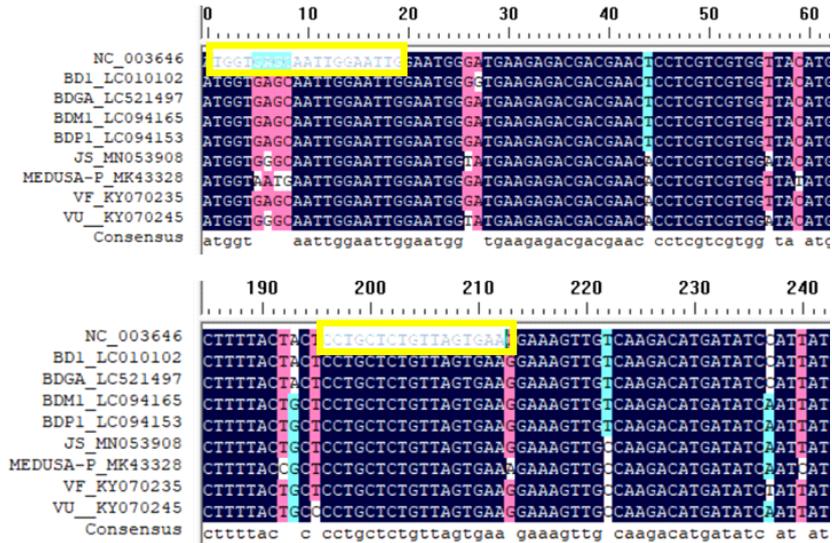
□ Lily virus X (LVX)



<그림 5> *In silico* 분석을 통한 LVX 정밀진단기술 개발에 적용될 신규 프라이머 위치선정. 노란색 박스: 신규 프라이머 염기서열 위치.

현재 보고된 LVX 전체 염기서열들을 확보하고, *in silico* 분석을 통하여 가장 안정적으로 일치된 염기서열 위치를 탐색하였음. 그 결과 LVX의 coat protein 부위로 선정되었고, coat protein 전체 염기서열 부위 (606 bp)가 증폭되어 검정 될 수 있는 정밀진단용 프라이머를 제작하였음. 위치는 위 그림 <그림 5>에서 노란색 박스로 표시하였음.

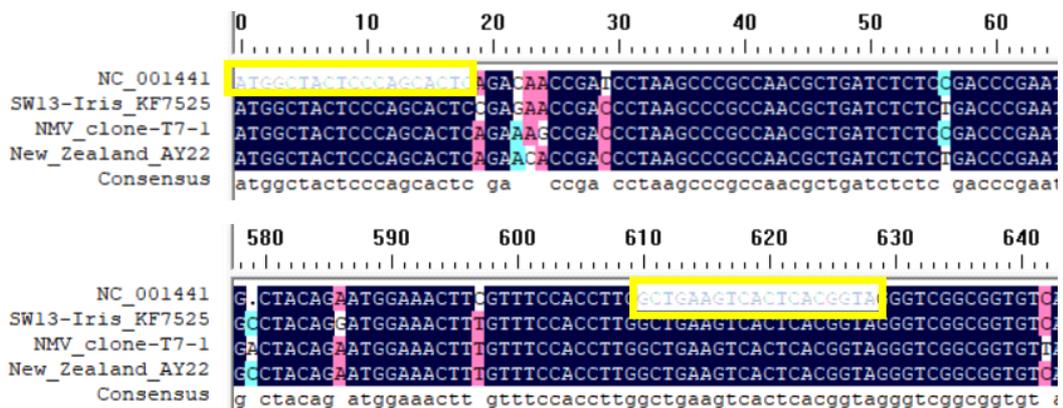
□ Milk vetch dwarf virus (MDV)



<그림 6> *In silico* 분석을 통한 MDV 정밀진단기술 개발에 적용될 신규 프라이머 위치선정. 노란색 박스: 신규 프라이머 염기서열 위치.

현재 보고된 MDV 전체 염기서열들을 확보하고, *in silico* 분석을 통하여 가장 안정적으로 일치된 염기서열 위치를 탐색하였으나, MDV strains/isolates 염기서열들은 낮은 상동성을 나타내었음. 따라서 MDV 전체 염기서열 중 가장 상동성이 높은 coat protein 부위를 선정하였고, coat protein 염기서열 중 313 bp가 증폭되어 검정 될 수 있는 정밀진단용 프라이머를 제작하였음. 위치는 위 그림<그림 6>에서 노란색 박스로 표시하였음.

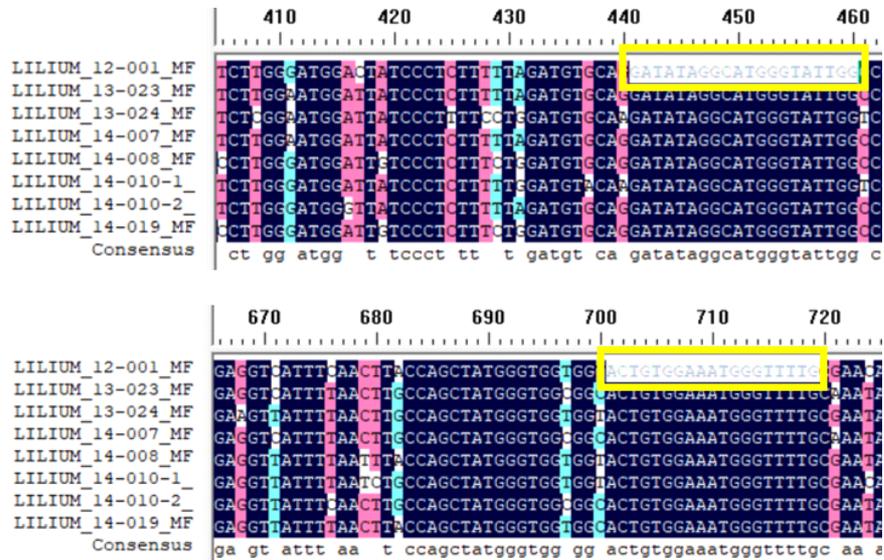
□ Narcissus mosaic virus (NMV)



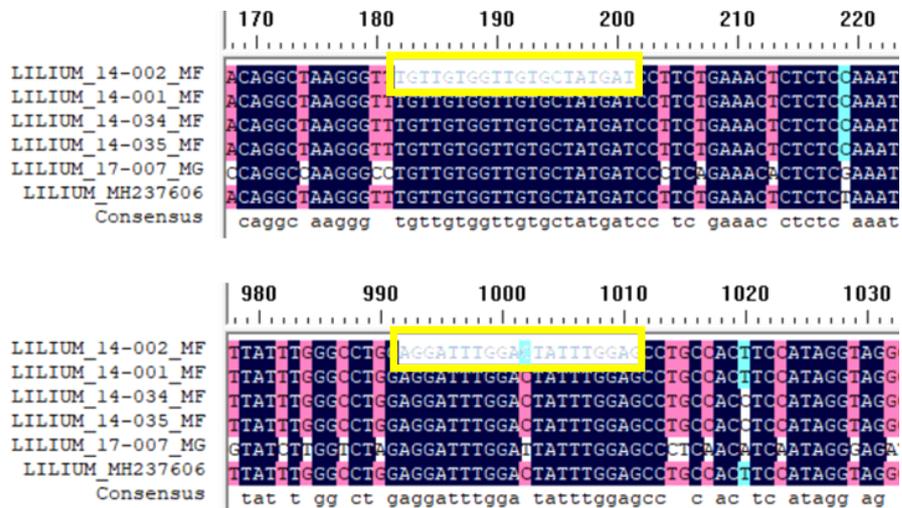
<그림 7> *In silico* 분석을 통한 NMV 정밀진단기술 개발에 적용될 신규 프라이머 위치선정. 노란색 박스: 신규 프라이머 염기서열 위치.

현재 보고된 NMV 전체 염기서열들을 확보하고, *in silico* 분석을 통하여 가장 안정적으로 일치된 염기서열 위치를 탐색하였음. 그 결과 NMV의 coat protein 부위로 선정되었고, coat protein 염기서열 부위 중 (632 bp)가 증폭되어 검정 될 수 있는 정밀진단용 프라이머를 제작하였음. 위치는 위 그림 <그림 7>에서 노란색 박스로 표시하였음.

□ Strawberry latent ringspot virus (SLRSV)



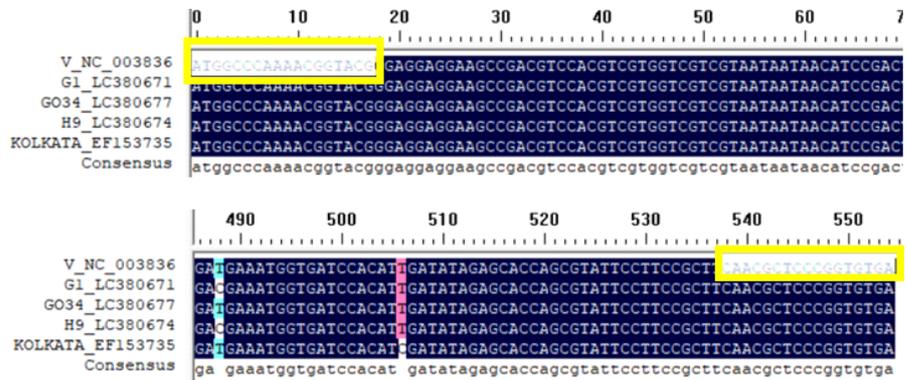
<그림 8> *In silico* 분석을 통한 SLRSV 정밀진단기술 개발에 적용될 신규 프라이머 위치선정. 노란색 박스: 신규 프라이머 염기서열 위치.



<그림 9> *In silico* 분석을 통한 SLRSV 정밀진단기술 개발에 적용될 신규 프라이머 위치선정. 노란색 박스: 신규 프라이머 염기서열 위치.

현재 보고된 SLRSV 전체 염기서열들을 확보하고, *in silico* 분석을 통하여 가장 안정적으로 일치된 염기서열 위치를 탐색하였으나, SLRSV strains/isolates 염기서열들 사이에 낮은 상동성을 나타내어 유사한 염기서열을 가지고 있는 SLRSV strains/isolates 들을 두 그룹으로 나누어서 *in silico* 분석을 수행하였음. 그 결과 RNA2 부위 중 두 개의 LCP 부위로 선정되었고, 각각 280 bp, 833 bp가 증폭되어 검정 될 수 있는 정밀진단을 위한 프라이머제작 위치를 위 그림<그림 8,9>에서 노란색 박스로 선정되었음.

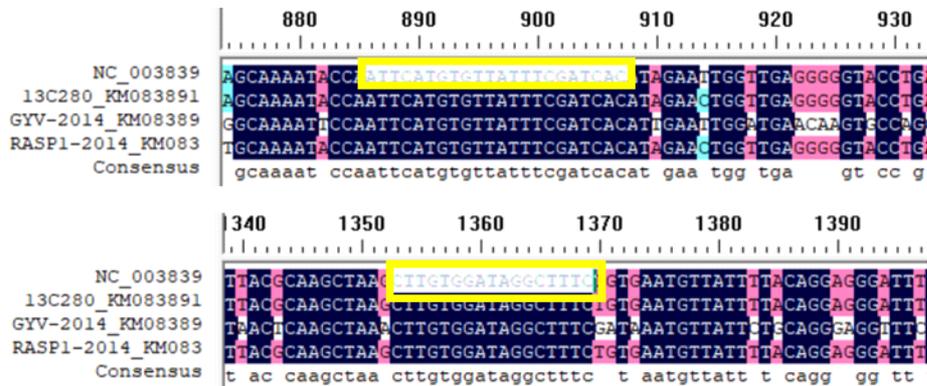
□ Tomato aspermy virus (TAV)



<그림 10> *In silico* 분석을 통한 TAV정밀진단기술 개발에 적용될 신규 프라이머 위치선정. 노란색 박스: 신규 프라이머 염기서열 위치.

현재 보고된 TAV 전체 염기서열들을 확보하고, *in silico* 분석을 통하여 가장 안정적으로 일치된 염기서열 위치를 탐색하였음. 그 결과 TAV의 coat protein 부위로 선정되었고, coat protein 전체 염기서열 부위 (657 bp)가 증폭되어 검정 될 수 있는 정밀진단용 프라이머를 제작하였음. 위치는 위 그림 <그림 10>에서 노란색 박스로 표시하였음.

□ Tomato ringspot virus (ToRSV)

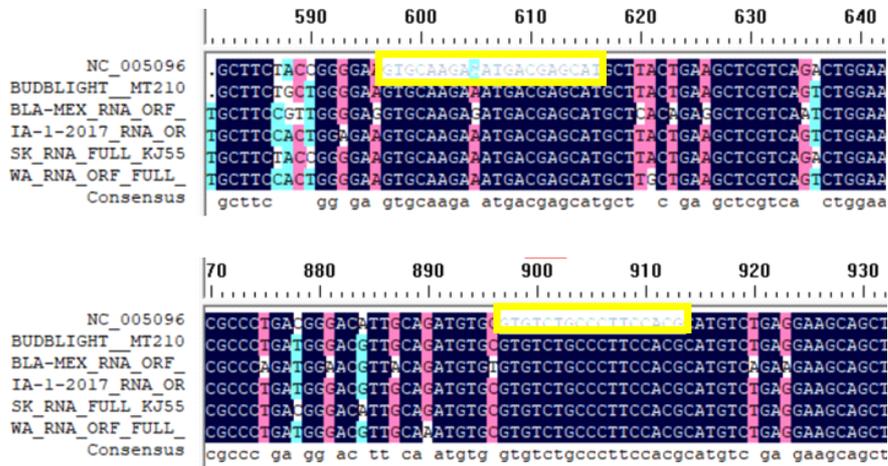


<그림 11> *In silico* 분석을 통한 ToRSV 정밀진단기술 개발에 적용될 신규 프라이머 위치선정. 노란색 박스: 신규 프라이머 염기서열 위치.

현재 보고된 ToRSV 전체 염기서열들을 확보하고, *in silico* 분석을 통하여 가장 안정적으로 일치된 염기서열 위치를 탐색하였음. 그 결과 ToRSV의 coat protein 부위로 선정되었고, coat protein 염기서열 중 484 bp가 증폭되어 검정 될 수 있는 정밀진단용 프라이머를 제작하였음. 위치는 위 그림<그림 11>에서 노란색 박스로 표시하였음.

□ Tobacco ringspot virus (TRSV)

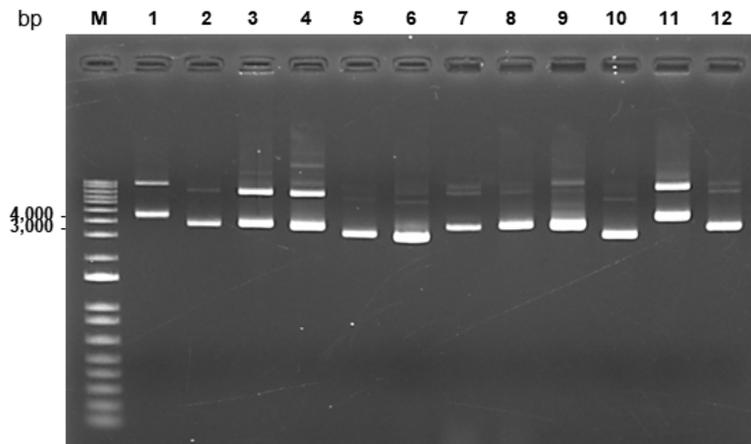
현재 보고된 TRSV 전체 염기서열들을 확보하고, *in silico* 분석을 통하여 가장 안정적으로 일치된 염기서열 위치를 탐색하였으나, TRSV strains/isolates 염기서열들은 낮은 상동성을 나타내었음. 따라서 TRSV 전체 염기서열 중 가장 상동성이 높은 movement protein 부위에서 657 bp가 증폭되어 검정 될 수 있는 정밀진단용 프라이머를 제작하였음. 위치는 위 그림<그림 12>에서 노란색 박스로 표시하였음.



<그림 12> *In silico* 분석을 통한 TRSV 정밀진단기술 개발에 적용될 신규 프라이머 위치선정. 노란색 박스: 신규 프라이머 염기서열 위치.

#### 다) 표준양성시료 확보

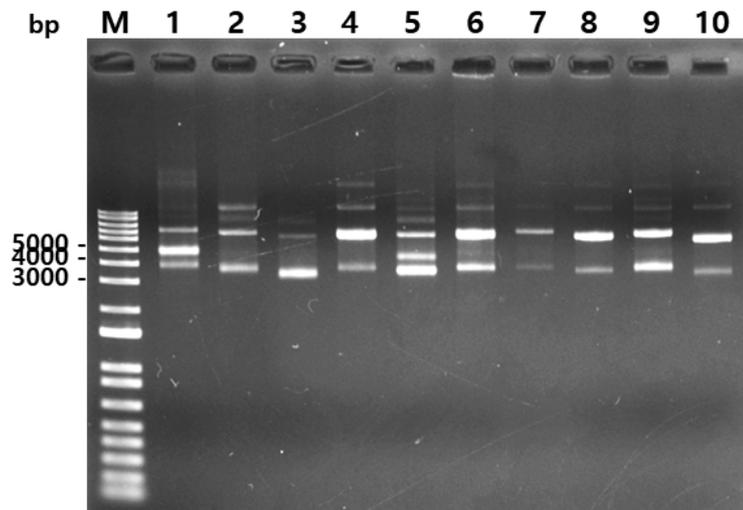
백합 및 국화 감염 바이러스 정밀진단기술 개발에 양성 시료(positive control)로 사용 될 수 있는 표준양성시료를 제작하였음. 바이러스에 감염된 식물체에서 total RNA를 분리하여 cDNA를 합성 후, 클로닝과정을 통하여 클론을 확보하였고, 일부 국내에서 확보하기 힘든 바이러스들은 cDNA 합성과정 후 클론을 확보하였음<그림 13,14>. 확보된 클론들은 모두 염기서열 분석을 통하여 유전자 정보를 검정하였으며 바이러스 정밀진단기술개발에 활용되었음.



<그림 13> 백합 및 국화 감염 바이러스 정밀진단기술에 활용될 신규 표준양성시료 제작. M, 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA); lane 1, arbis mosaic virus (ArMV); lane 2, chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV); lane 3, citrus tatter leaf virus (CTLV); lane 4, impatiens necrotic spot virus (INSV); lane 5, lily virus X (LVX); lane 6, milk vetch dwarf virus (MDV); lane 7, narcissus mosaic virus (NMV); lane 8, strawberry latent ringspot virus (SLRSV) #1; lane 9, strawberry latent ringspot virus (SLRSV) #2; lane 10, tobacco aspermy virus (TAV); lane 11, tomato ringspot virus (ToRSV); lane 12, tobacco ringsopt virus (TRSV).

신규로 제작한 표준양성시료들을 대상으로 전기영동을 수행하여 그들의 plasmid DNA 상태를 확인 하였음<그림 13>.

선행 연구에서 확보한 백합 및 국화 감염 바이러스 표준양성시료를 전기영동을 통하여 검정하였음 <그림 14>. 바이러스에 감염된 식물체에서 total RNA를 분리하여 cDNA를 합성 후, 클로닝과정을 통하여 클론을 확보하였음. 확보된 클론들은 모두 염기서열 분석을 통하여 유전자 정보를 검정하였으며 바이러스 정밀진단기술개발에 활용되었음.

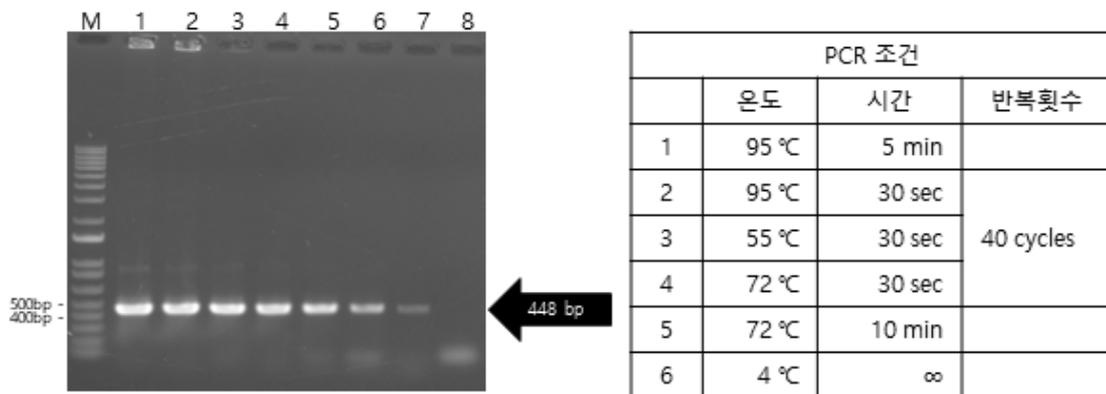


<그림 14> 선행 연구에서 확보한 백합 및 국화 감염 바이러스 표준양성시료 검정. M, 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA); lane 1, broad bean wilt virus 2 (BBWV2); lane 2, cucumber mosaic virus (CMV); lane 3, lily mottle virus (LMoV); lane 4, lily symptomless virus (LSV); lane 5, plantago asiatica mosaic virus (PIAMV); lane 6, potato virus X (PVX); lane 7, shallot yellow stripe virus (SYSV); lane 8, tobacco mosaic virus (TMV); lane 9, tomato spotted wilt virus (TSWV); lane 10, tobacco rattle virus (TRV).

**라) 신규 특이적인 프라이머 적용 정밀진단기술 개발**

신규로 제작된 ArMV, CSNV, CTLV, INSV, LVX, MDV, NMV, SLRSV, SLRSV, TAV, ToRSV, TRSV 프라이머들을 대상으로 정밀진단을 위한 최적의 PCR 조건을 확립하였고, 개발된 정밀진단기술의 민감도 및 비특이적 반응을 분석하였음.

**□ Arabis mosaic virus (ArMV)**

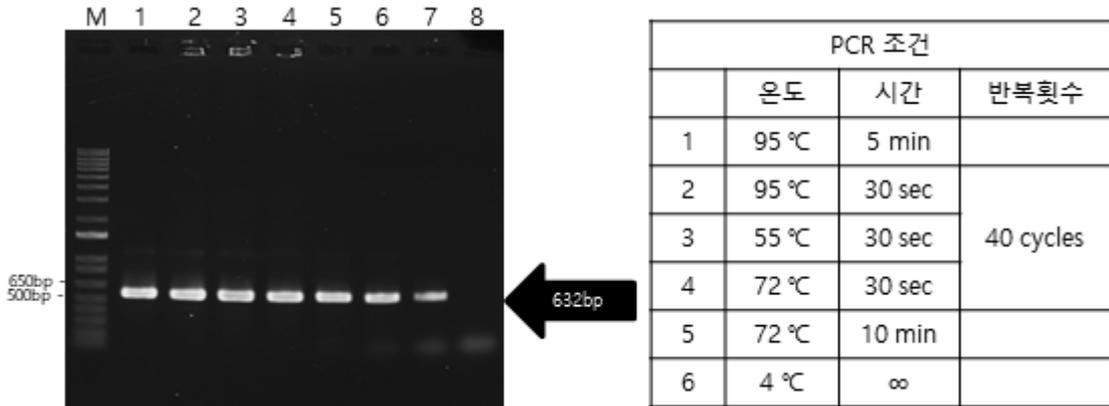


<그림 15> ArMV 정밀검정을 위한 프라이머 제작 및 민감도 검정. M, 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA); lane 1, 10 ng ArMV plasmid DNA; lane 2, 1 ng ArMV plasmid DNA; lane 3, 100 pg ArMV plasmid DNA; lane 4, 10 pg ArMV plasmid DNA; lane 5, 1 pg ArMV plasmid DNA; lane 6, 100 fg ArMV plasmid DNA; lane 7, 10 fg ArMV plasmid DNA; lane 8, 1 fg ArMV plasmid DNA.

확보된 ArMV 검정용 프라이머의 민감도를 확인하기 위해 ArMV 클론(plasmid DNA) 10 ng 농도에서부터 10배 단계 희석법(10-fold serial dilution)을 사용하여 위와 같은 PCR 조건으로 수행하였음<그림 15>. 그 결과 ArMV 검정용 프라이머는 10 fg ArMV plasmid DNA까지 검정되는 것을 확인하였고, 목표한 448 bp에서만 증폭된 단일 밴드로 보여주어 비특이적인 반응이 나타나지 않는 것을 확인

하였음.

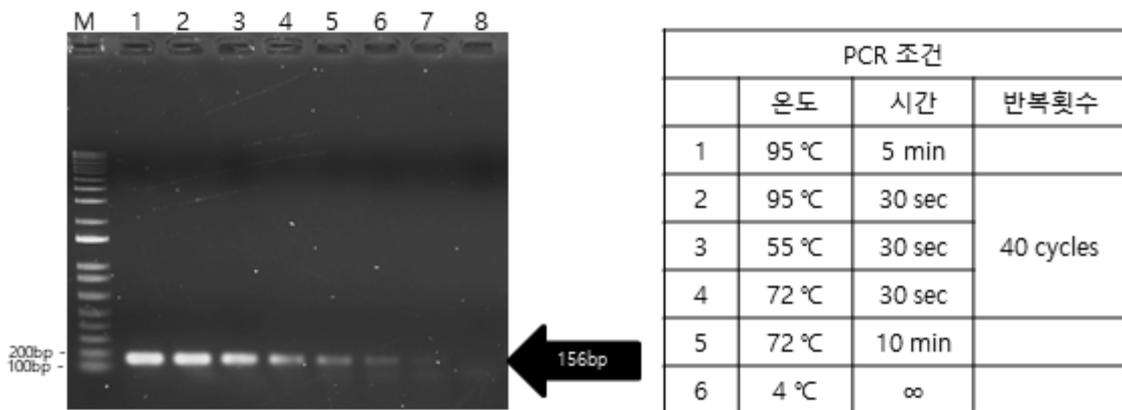
□ Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV)



<그림 16> CSNV 정밀검정을 위한 프라이머 제작 및 민감도 검정. M, 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA); lane 1, 10 ng CSNV plasmid DNA; lane 2, 1 ng CSNV plasmid DNA; lane 3, 100 pg CSNV plasmid DNA; lane 4, 10 pg CSNV plasmid DNA; lane 5, 1 pg CSNV plasmid DNA; lane 6, 100 fg CSNV plasmid DNA; lane 7, 10 fg CSNV plasmid DNA; lane 8, 1 fg CSNV plasmid DNA.

확보된 CSNV 검정용 프라이머의 민감도를 확인하기 위해 CSNV 클론(plasmid DNA) 10 ng 농도에서부터 10배 단계 희석법(10-fold serial dilution)을 사용하여 위와 같은 PCR 조건으로 수행하였음 <그림 16>. 그 결과 CSNV 검정용 프라이머는 10 fg CSNV plasmid DNA까지 검정되는 것을 확인하였고, 목표한 632 bp에서만 증폭된 단일 밴드로 보여주어 비특이적인 반응이 나타나지 않는 것을 확인하였음. 추가로 100 fg ~1 fg CSNV plasmid DNA에서 약간의 primer dimer가 형성되는 것을 확인하였음.

□ Citrus tatter leaf virus (CTLV)

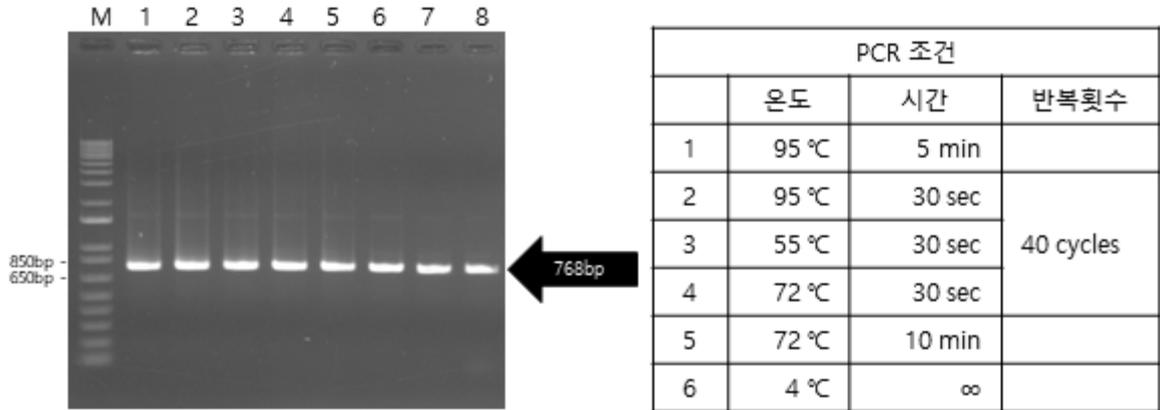


<그림 17> CTLV 정밀검정을 위한 프라이머 제작 및 민감도 검정. M, 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA); lane 1, 10 ng CTLV plasmid DNA; lane 2, 1 ng CTLV plasmid DNA; lane 3, 100 pg CTLV plasmid DNA; lane 4, 10 pg CTLV plasmid DNA; lane 5, 1 pg CTLV plasmid DNA; lane 6, 100 fg CTLV plasmid DNA; lane 7, 10 fg CTLV plasmid DNA; lane 8, 1 fg CTLV plasmid DNA.

확보된 CTLV 검정용 프라이머의 민감도를 확인하고자 CTLV 클론(plasmid DNA) 10 ng 농도에서부터 10배 단계 희석법(10-fold serial dilution)을 사용하여 위와 같은 PCR 조건으로 수행하였음 <그림 17>. 그 결과 CTLV 검정용 프라이머는 100 fg CTLV plasmid DNA까지 검정되는 것을 확인하였고, 목표한 156 bp에서만 증폭된 단일 밴드로 보여주어 비특이적인 반응이 나타나지 않는 것을 확인하

였음.

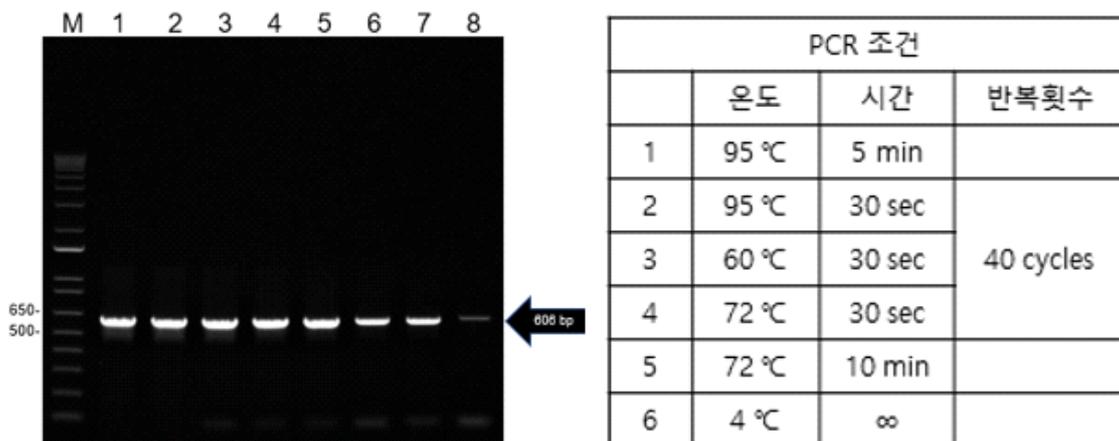
□ Impatiens necrotic spot virus (INSV)



<그림 18> INSV 정밀검정을 위한 프라이머 제작 및 민감도 검정. M, 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA); lane 1, 10 ng INSV plasmid DNA; lane 2, 1 ng INSV plasmid DNA; lane 3, 100 pg INSV plasmid DNA; lane 4, 10 pg INSV plasmid DNA; lane 5, 1 pg INSV plasmid DNA; lane 6, 100 fg INSV plasmid DNA; lane 7, 10 fg INSV plasmid DNA; lane 8, 1 fg INSV plasmid DNA.

확보된 INSV 검정용 프라이머의 민감도를 확인하고자 INSV 클론(plasmid DNA) 10 ng 농도에서부터 10배 단계 희석법(10-fold serial dilution)을 사용하여 위와 같은 PCR 조건으로 수행하였음<그림 18>. 그 결과 INSV 검정용 프라이머는 1 fg INSV plasmid DNA까지 검정되는 것을 확인하였고, 목표한 768 bp에서만 증폭된 단일 밴드로 보여주어 비특이적인 반응이 나타나지 않는 것을 확인하였음.

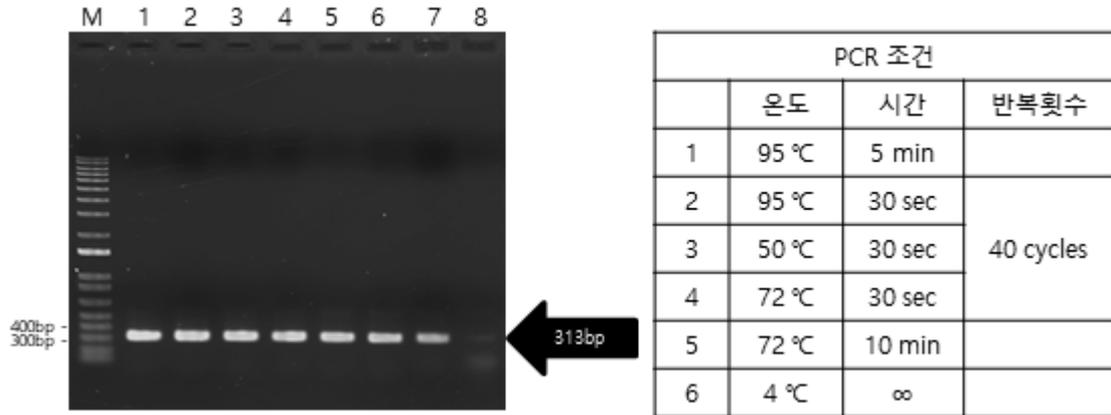
□ Lily virus X (LVX)



<그림 19> LVX 정밀검정을 위한 프라이머 제작 및 민감도 검정. M, 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA); lane 1, 10 ng LVX plasmid DNA; lane 2, 1 ng LVX plasmid DNA; lane 3, 100 pg LVX plasmid DNA; lane 4, 10 pg LVX plasmid DNA; lane 5, 1 pg LVX plasmid DNA; lane 6, 100 fg LVX plasmid DNA; lane 7, 10 fg LVX plasmid DNA; lane 8, 1 fg LVX plasmid DNA.

확보된 LVX 검정용 프라이머의 민감도를 확인하고자 LVX 클론(plasmid DNA) 10 ng 농도에서부터 10배 단계 희석법(10-fold serial dilution)을 사용하여 위와 같은 PCR 조건으로 수행하였음<그림 19>. 그 결과 LVX 검정용 프라이머는 1 fg LVX plasmid DNA까지 검정되는 것을 확인하였고, 목표한 606 bp에서만 증폭된 단일 밴드로 보여주어 비특이적인 반응이 나타나지 않는 것을 확인하였음.

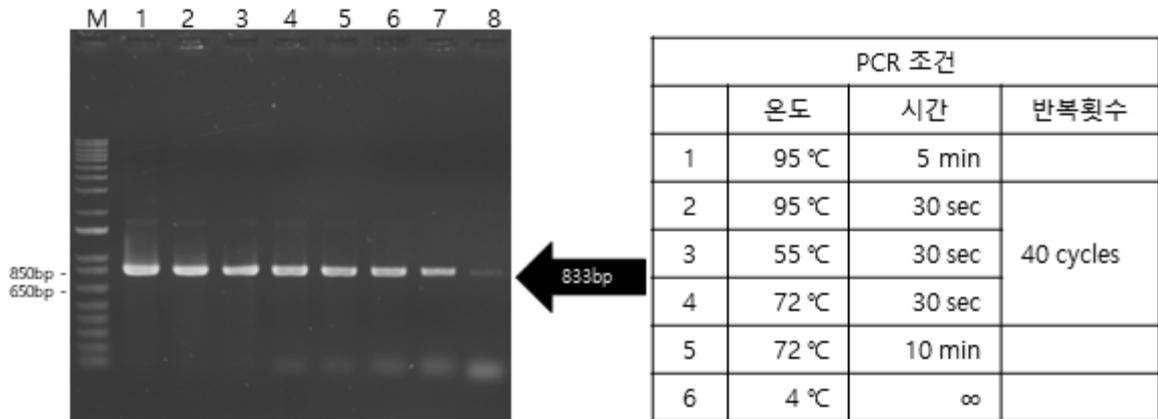
□ Milk vetch dwarf virus (MDV)



<그림 20> MDV 정밀검정을 위한 프라이머 제작 및 민감도 검정. M, 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA); lane 1, 10 ng MDV plasmid DNA; lane 2, 1 ng MDV plasmid DNA; lane 3, 100 pg MDV plasmid DNA; lane 4, 10 pg MDV plasmid DNA; lane 5, 1 pg MDV plasmid DNA; lane 6, 100 fg MDV plasmid DNA; lane 7, 10 fg MDV plasmid DNA; lane 8, 1 fg MDV plasmid DNA.

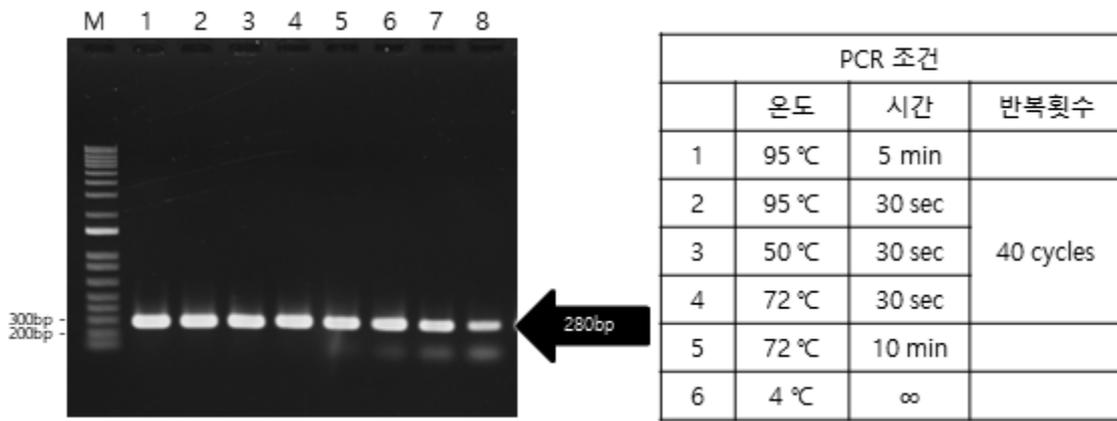
확보된 MDV 검정용 프라이머의 민감도를 확인하고자 MDV 클론(plasmid DNA) 10 ng 농도에서부터 10배 단계 희석법(10-fold serial dilution)을 사용하여 위와 같은 PCR 조건으로 수행하였음<그림 20>. 그 결과 MDV 검정용 프라이머는 10 fg MDV plasmid DNA까지 검정되는 것을 확인하였고, 목표한 313 bp에서만 증폭된 단일 밴드로 보여주어 비특이적인 반응이 나타나지 않는 것을 확인하였음.

□ Strawberry latent ringspot virus (SLRSV)



<그림 21> SLRSV 정밀검정을 위한 프라이머#1 제작 및 민감도 검정. M, 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA); lane 1, 10 ng SLRSV plasmid DNA; lane 2, 1 ng SLRSV plasmid DNA; lane 3, 100 pg SLRSV plasmid DNA; lane 4, 10 pg SLRSV plasmid DNA; lane 5, 1 pg SLRSV plasmid DNA; lane 6, 100 fg SLRSV plasmid DNA; lane 7, 10 fg SLRSV plasmid DNA; lane 8, 1 fg SLRSV plasmid DNA.

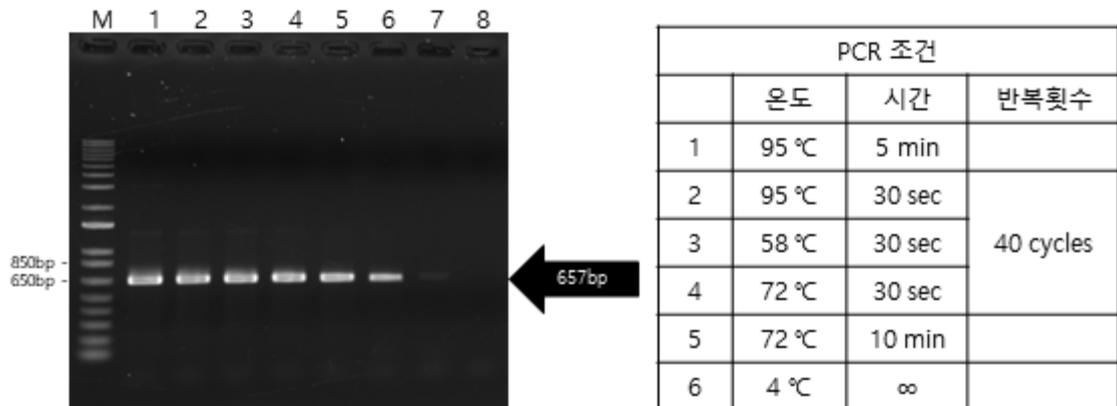
확보된 SLRSV 검정용 프라이머의 민감도를 확인하고자 SLRSV 클론(plasmid DNA) 10 ng 농도에서부터 10배 단계 희석법(10-fold serial dilution)을 사용하여 위와 같은 PCR 조건으로 수행하였음<그림 21>. 그 결과 SLRSV 검정용 프라이머는 1 fg SLRSV plasmid DNA까지 검정되는 것을 확인하였고, 목표한 833 bp에서만 증폭된 단일 밴드로 보여주어 비특이적인 반응이 나타나지 않는 것을 확인하였음.



<그림 22> SLRSV 정밀검정을 위한 프라이머#2 제작 및 민감도 검정. M, 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA); lane 1, 10 ng SLRSV plasmid DNA; lane 2, 1 ng SLRSV plasmid DNA; lane 3, 100 pg SLRSV plasmid DNA; lane 4, 10 pg SLRSV plasmid DNA; lane 5, 1 pg SLRSV plasmid DNA; lane 6, 100 fg SLRSV plasmid DNA; lane 7, 10 fg SLRSV plasmid DNA; lane 8, 1 fg SLRSV plasmid DNA.

확보된 SLRSV 검정용 프라이머의 민감도를 확인하고자 SLRSV 클론(plasmid DNA) 10 ng 농도에서부터 10배 단계 희석법(10-fold serial dilution)을 사용하여 위와 같은 PCR 조건으로 수행하였음<그림 22>. 그 결과 SLRSV 검정용 프라이머는 1 fg SLRSV plasmid DNA까지 검정되는 것을 확인하였고, 목표한 280 bp에서만 증폭된 단일 밴드로 보여주어 비특이적인 반응이 나타나지 않는 것을 확인하였음.

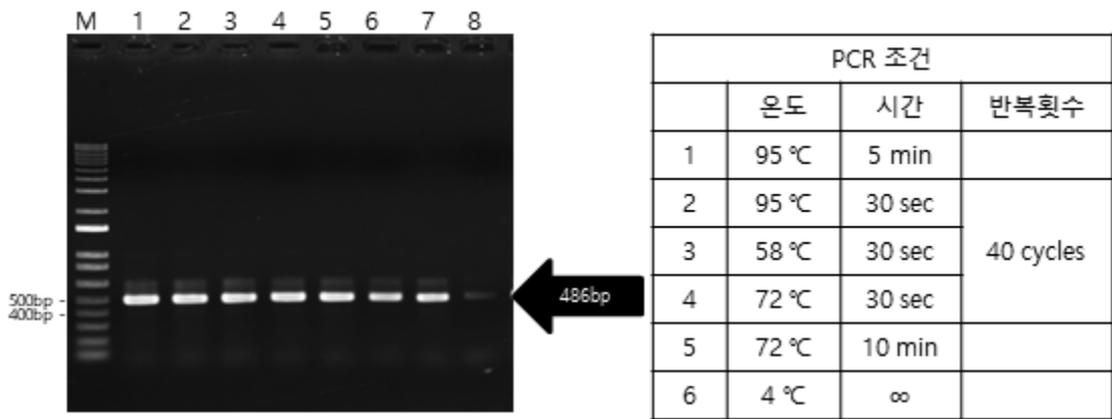
□ Tomato aspermy virus (TAV)



<그림 23> TAV 정밀검정을 위한 프라이머 제작 및 민감도 검정. M, 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA); lane 1, 10 ng TAV plasmid DNA; lane 2, 1 ng TAV plasmid DNA; lane 3, 100 pg TAV plasmid DNA; lane 4, 10 pg TAV plasmid DNA; lane 5, 1 pg TAV plasmid DNA; lane 6, 100 fg TAV plasmid DNA; lane 7, 10 fg TAV plasmid DNA; lane 8, 1 fg TAV plasmid DNA.

확보된 TAV 검정용 프라이머의 민감도를 확인하고자 TAV 클론(plasmid DNA) 10 ng 농도에서부터 10배 단계 희석법(10-fold serial dilution)을 사용하여 위와 같은 PCR 조건으로 수행하였음<그림 23>. 그 결과 TAV 검정용 프라이머는 10 fg TAV plasmid DNA까지 검정되는 것을 확인하였고, 목표한 657 bp에서만 증폭된 단일 밴드로 보여주어 비특이적인 반응이 나타나지 않는 것을 확인하였음.

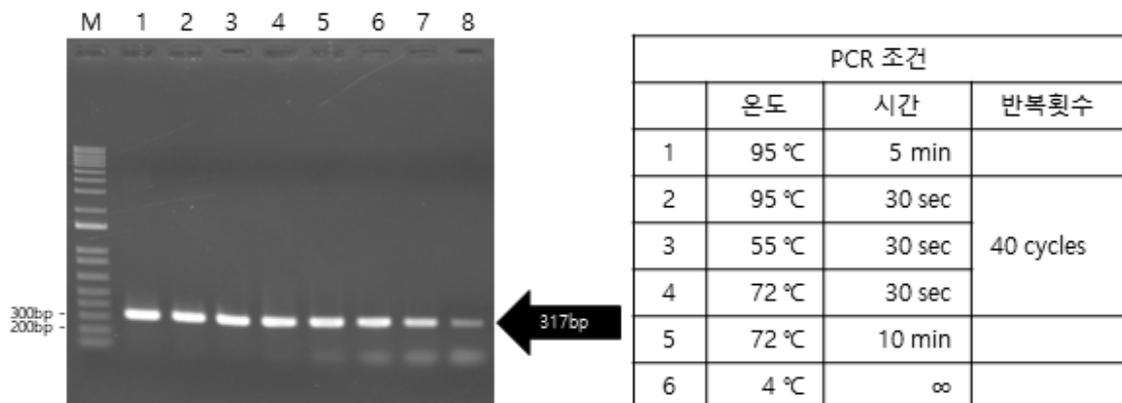
□ Tomato ringspot virus (ToRSV)



<그림 24> ToRSV 정밀검정을 위한 프라이머 제작 및 민감도 검정. M, 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA); lane 1, 10 ng ToRSV plasmid DNA; lane 2, 1 ng ToRSV plasmid DNA; lane 3, 100 pg ToRSV plasmid DNA; lane 4, 10 pg ToRSV plasmid DNA; lane 5, 1 pg ToRSV plasmid DNA; lane 6, 100 fg ToRSV plasmid DNA; lane 7, 10 fg ToRSV plasmid DNA; lane 8, 1 fg ToRSV plasmid DNA.

확보된 ToRSV 검정용 프라이머의 민감도를 확인하고자 ToRSV 클론(plasmid DNA) 10 ng 농도에서부터 10배 단계 희석법(10-fold serial dilution)을 사용하여 위와 같은 PCR 조건으로 수행하였음<그림 24>. 그 결과 ToRSV 검정용 프라이머는 10 fg ToRSV plasmid DNA까지 검정되는 것을 확인하였고, 목표한 484 bp에서만 증폭된 단일 밴드로 보여주어 비특이적인 반응이 나타나지 않는 것을 확인하였음.

#### □ Tobacco ringspot virus (TRSV)



<그림 25> TRSV 정밀검정을 위한 프라이머 제작 및 민감도 검정. M, 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA); lane 1, 10 ng TRSV plasmid DNA; lane 2, 1 ng TRSV plasmid DNA; lane 3, 100 pg TRSV plasmid DNA; lane 4, 10 pg TRSV plasmid DNA; lane 5, 1 pg TRSV plasmid DNA; lane 6, 100 fg TRSV plasmid DNA; lane 7, 10 fg TRSV plasmid DNA; lane 8, 1 fg TRSV plasmid DNA.

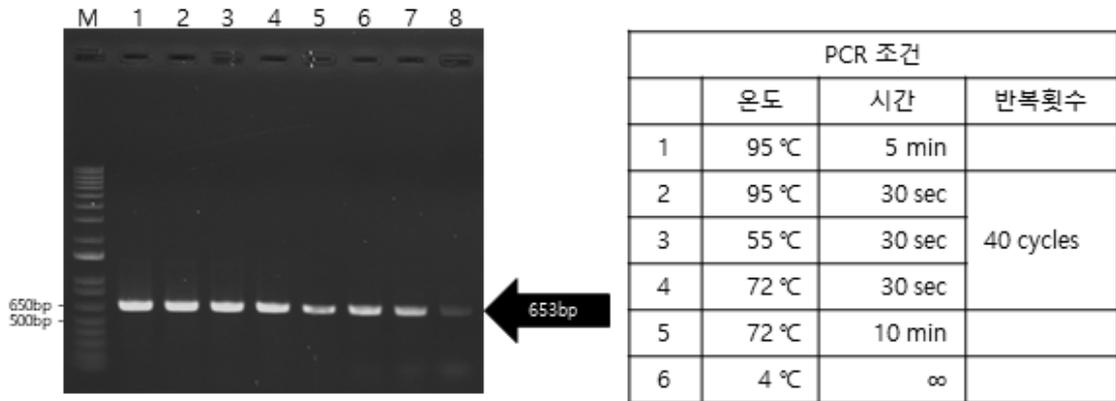
확보된 TRSV 검정용 프라이머의 민감도를 확인하고자 TRSV 클론(plasmid DNA) 10 ng 농도에서부터 10배 단계 희석법(10-fold serial dilution)을 사용하여 위와 같은 PCR 조건으로 수행하였음<그림 25>. 그 결과 TRSV 검정용 프라이머는 1 fg TRSV plasmid DNA까지 검정되는 것을 확인하였고, 목표한 317 bp에서만 증폭된 단일 밴드로 보여주어 비특이적인 반응이 나타나지 않는 것을 확인하였음. 1 pg ~ 1 fg TRSV plasmid DNA에서는 100 bp 아랫부분에 약간의 primer dimer가 나타남.

#### 마) 선행 연구된 특이적인 프라이머 적용 정밀진단기술 개발

선행 연구된 BBWV2, CMV, LMoV, LSV, PIAMV, PVX, SYSV, TMV, TSWV, TRV 프라이머들을 대상

으로 정밀진단을 위한 최적의 PCR 조건을 확립하였고, 개발된 정밀진단기술의 민감도 및 비특이적 반응을 분석하였음.

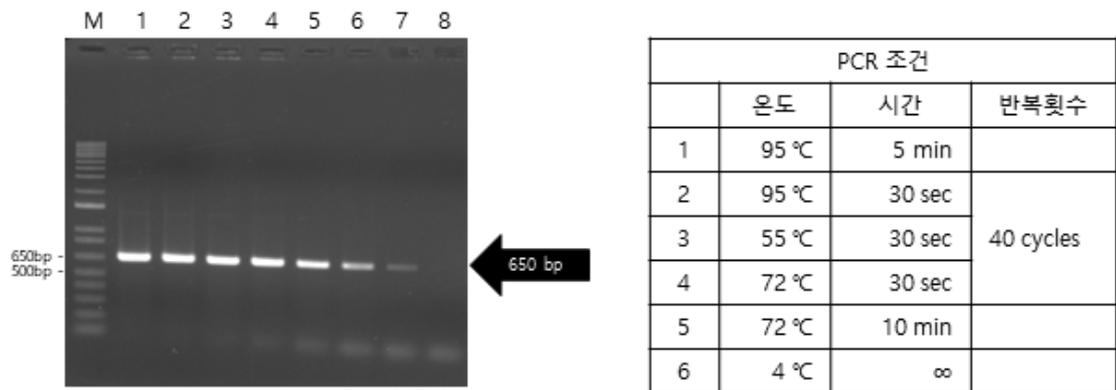
□ Broad bean wilt virus2 (BBWV2)



<그림 26> BBWV2 정밀검정을 위한 프라이머 제작 및 민감도 검정. M, 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA); lane 1, 10 ng BBWV2 plasmid DNA; lane 2, 1 ng BBWV2 plasmid DNA; lane 3, 100 pg BBWV2 plasmid DNA; lane 4, 10 pg BBWV2 plasmid DNA; lane 5, 1 pg BBWV2 plasmid DNA; lane 6, 100 fg BBWV2 plasmid DNA; lane 7, 10 fg BBWV2 plasmid DNA; lane 8, 1 fg BBWV2 plasmid DNA.

확보된 BBWV2 검정용 프라이머의 민감도를 확인하기 위해 BBWV2 클론(plasmid DNA) 10 ng 농도에서부터 10배 단계 희석법(10-fold serial dilution)을 사용하여 위와 같은 PCR 조건으로 수행하였음<그림26>. 그 결과 BBWV2 검정용 프라이머는 1 fg BBWV2 plasmid DNA까지 검정되는 것을 확인하였고, 목표한 653 bp에서만 증폭된 단일 밴드로 보여주어 비특이적인 반응이 나타나지 않는 것을 확인하였음.

□ Cucumber mosaic virus (CMV)

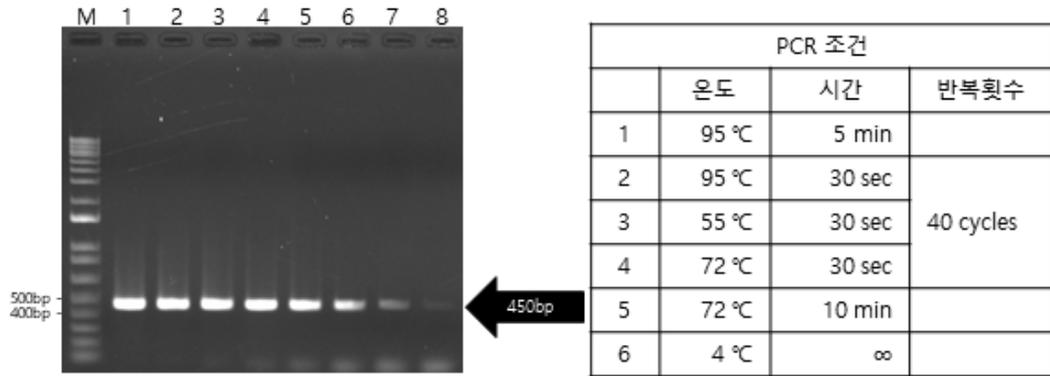


<그림 27> CMV 정밀검정을 위한 프라이머 제작 및 민감도 검정. M, 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA); lane 1, 10 ng CMV plasmid DNA; lane 2, 1 ng CMV plasmid DNA; lane 3, 100 pg CMV plasmid DNA; lane 4, 10 pg CMV plasmid DNA; lane 5, 1 pg CMV plasmid DNA; lane 6, 100 fg CMV plasmid DNA; lane 7, 10 fg CMV plasmid DNA; lane 8, 1 fg CMV plasmid DNA.

확보된 CMV 검정용 프라이머의 민감도를 확인하기 위해 CMV 클론(plasmid DNA) 10 ng 농도에서부터 10배 단계 희석법(10-fold serial dilution)을 사용하여 위와 같은 PCR 조건으로 수행하였음<그림 27>. 그 결과 CMV 검정용 프라이머는 10 fg CMV plasmid DNA까지 검정되는 것을 확인하였고, 목표한 650 bp에서만 증폭된 단일 밴드로 보여주어 비특이적인 반응이 나타나지 않는 것을 확인하

였음.

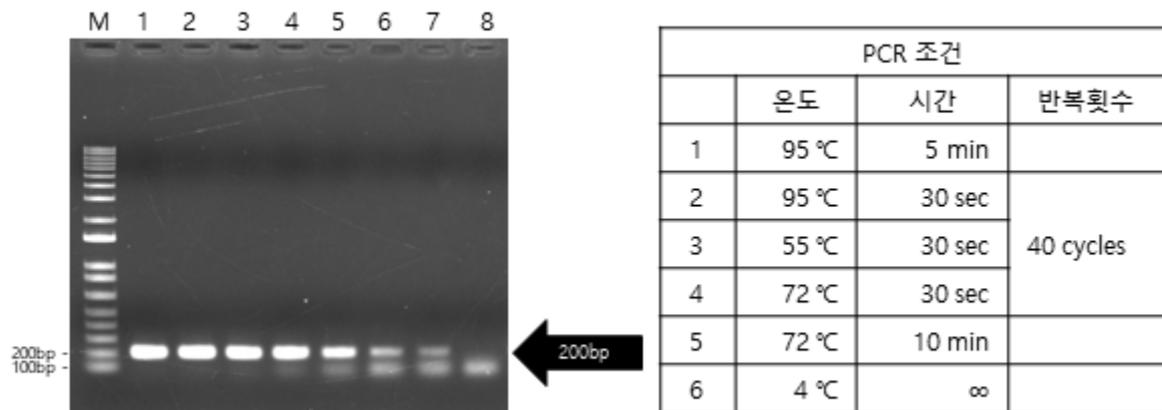
□ Lily mottle virus (LMoV)



<그림 28> LMoV 정밀검정을 위한 프라이머 제작 및 민감도 검정. M, 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA); lane 1, 10 ng LMoV plasmid DNA; lane 2, 1 ng LMoV plasmid DNA; lane 3, 100 pg LMoV plasmid DNA; lane 4, 10 pg LMoV plasmid DNA; lane 5, 1 pg LMoV plasmid DNA; lane 6, 100 fg LMoV plasmid DNA; lane 7, 10 fg LMoV plasmid DNA; lane 8, 1 fg LMoV plasmid DNA.

확보된 LMoV 검정용 프라이머의 민감도를 확인하기 위해 LMoV 클론(plasmid DNA) 10 ng 농도에서부터 10배 단계 희석법(10-fold serial dilution)을 사용하여 위와 같은 PCR 조건으로 수행하였음 <그림 28>. 그 결과 LMoV 검정용 프라이머는 1 fg LMoV plasmid DNA까지 검정되는 것을 확인하였고, 목표한 450 bp에서만 증폭된 단일 밴드로 보여주어 비특이적인 반응이 나타나지 않는 것을 확인하였음.

□ Lily symptomless virus (LSV)

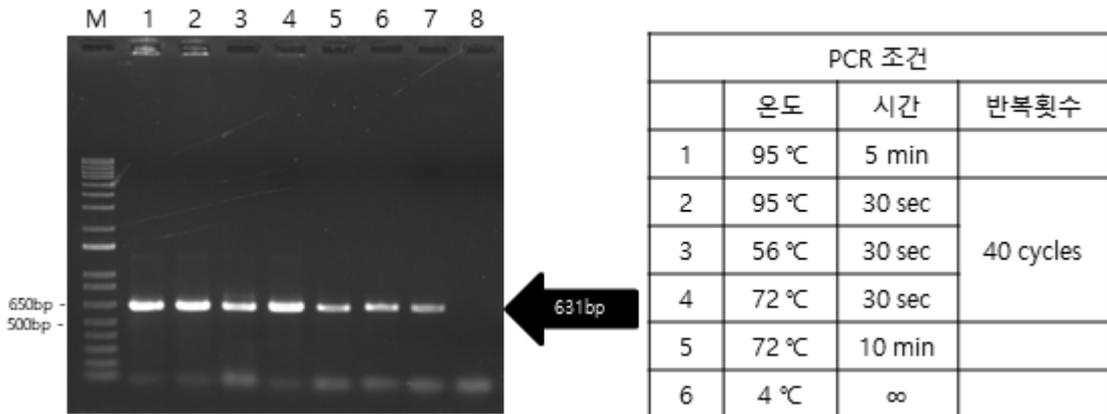


<그림 29> LSV 정밀검정을 위한 프라이머 제작 및 민감도 검정. M, 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA); lane 1, 10 ng LSV plasmid DNA; lane 2, 1 ng LSV plasmid DNA; lane 3, 100 pg LSV plasmid DNA; lane 4, 10 pg LSV plasmid DNA; lane 5, 1 pg LSV plasmid DNA; lane 6, 100 fg LSV plasmid DNA; lane 7, 10 fg LSV plasmid DNA; lane 8, 1 fg LSV plasmid DNA.

확보된 LSV 검정용 프라이머의 민감도를 확인하기 위해 LSV 클론(plasmid DNA) 10 ng 농도에서부터 10배 단계 희석법(10-fold serial dilution)을 사용하여 위와 같은 PCR 조건으로 수행하였음<그림 29>. 그 결과 LSV 검정용 프라이머는 10 fg LSV plasmid DNA까지 검정되는 것을 확인하였고, 목표한 200 bp에서만 증폭된 단일 밴드로 보여주어 비특이적인 반응이 나타나지 않는 것을 확인하였음. 1 pg ~ 1 fg LSV plasmid DNA에서 목표한 밴드 아래쪽에 형성되는 밴드들은 LSV plasmid DNA에

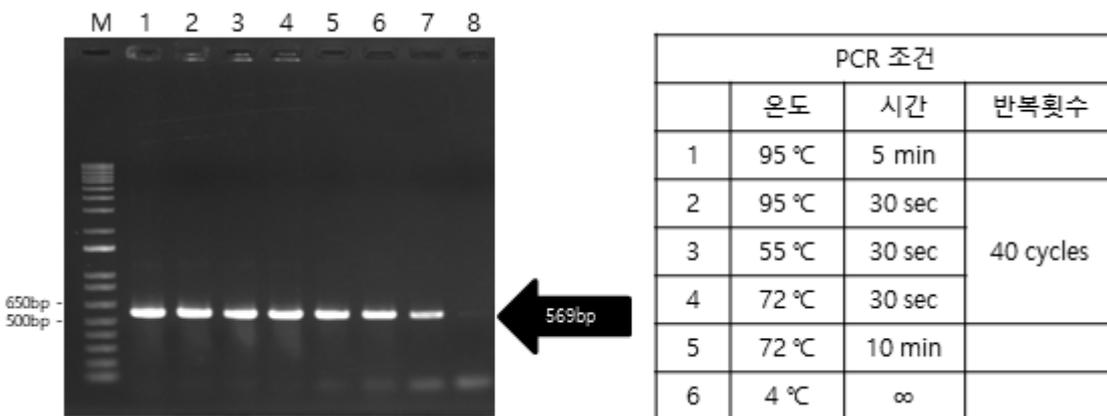
반응하지 않고 형성된 primer dimer로 추정됨.

□ Narcissus mosaic virus (NMV)



<그림 30> NMV 정밀검정을 위한 프라이머#1 제작 및 민감도 검정. M, 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA); lane 1, 10 ng NMV plasmid DNA; lane 2, 1 ng NMV plasmid DNA; lane 3, 100 pg NMV plasmid DNA; lane 4, 10 pg NMV plasmid DNA; lane 5, 1 pg NMV plasmid DNA; lane 6, 100 fg NMV plasmid DNA; lane 7, 10 fg NMV plasmid DNA; lane 8, 1 fg NMV plasmid DNA.

확보된 NMV 검정용 프라이머의 민감도를 확인하기 위해 NMV 클론(plasmid DNA) 10 ng 농도에서부터 10배 단계 희석법(10-fold serial dilution)을 사용하여 위와 같은 PCR 조건으로 수행하였음<그림 30>. 그 결과 NMV 검정용 프라이머는 10 fg NMV plasmid DNA까지 검정 되는 것을 확인하였고, 목표한 631 bp에서만 증폭된 단일 밴드로 보여주어 비특이적인 반응이 나타나지 않는 것을 확인하였음. 100 fg ~ 1 fg NMV plasmid DNA에서 목표한 밴드 아래쪽에 형성되는 밴드들은 NMV plasmid DNA에 반응하지 않고 형성된 primer dimer로 추정됨.

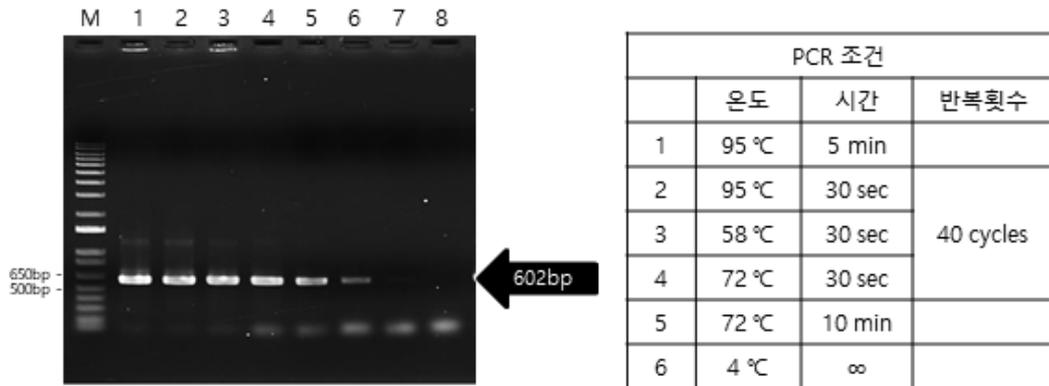


<그림 31> NMV 정밀검정을 위한 프라이머#2 제작 및 민감도 검정. M, 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA); lane 1, 10 ng NMV plasmid DNA; lane 2, 1 ng NMV plasmid DNA; lane 3, 100 pg NMV plasmid DNA; lane 4, 10 pg NMV plasmid DNA; lane 5, 1 pg NMV plasmid DNA; lane 6, 100 fg NMV plasmid DNA; lane 7, 10 fg NMV plasmid DNA; lane 8, 1 fg NMV plasmid DNA.

확보된 NMV 검정용 프라이머의 민감도를 확인하기 위해 NMV 클론(plasmid DNA) 10 ng 농도에서부터 10배 단계 희석법(10-fold serial dilution)을 사용하여 위와 같은 PCR 조건으로 수행하였음<그림 32>. 그 결과 NMV 검정용 프라이머는 10 fg NMV plasmid DNA까지 검정되는 것을 확인하였고, 목표한 569 bp에서만 증폭된 단일 밴드로 보여주어 비특이적인 반응이 나타나지 않는 것을 확인하

였음. 100 fg ~ 1 fg NMV plasmid DNA에서 목표한 밴드 아래쪽에 형성되는 밴드들은 NMV plasmid DNA에 반응하지 않고 형성된 primer dimer로 추정됨.

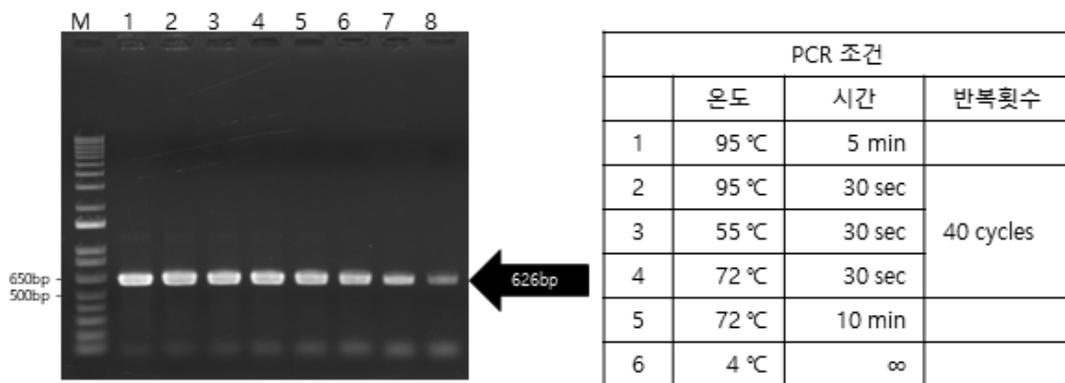
□ *Plantago asiatica* mosaic virus (PIAMV)



<그림 32> PIAMV 정밀검정을 위한 프라이머 제작 및 민감도 검정. M, 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA); lane 1, 10 ng PIAMV plasmid DNA; lane 2, 1 ng PIAMV plasmid DNA; lane 3, 100 pg PIAMV plasmid DNA; lane 4, 10 pg PIAMV plasmid DNA; lane 5, 1 pg PIAMV plasmid DNA; lane 6, 100 fg PIAMV plasmid DNA; lane 7, 10 fg PIAMV plasmid DNA; lane 8, 1 fg PIAMV plasmid DNA.

확보된 PIAMV 검정용 프라이머의 민감도를 확인하기 위해 PIAMV 클론(plasmid DNA) 10 ng 농도에서부터 10배 단계 희석법(10-fold serial dilution)을 사용하여 위와 같은 PCR 조건으로 수행하였음 <그림 32>. 그 결과 PIAMV 검정용 프라이머는 100 fg PIAMV plasmid DNA에서까지 검정 되는 것을 확인하였고, 목표한 602 bp에서만 증폭된 단일 밴드로 보여주어 비특이적인 반응이 나타나지 않는 것을 확인하였음.

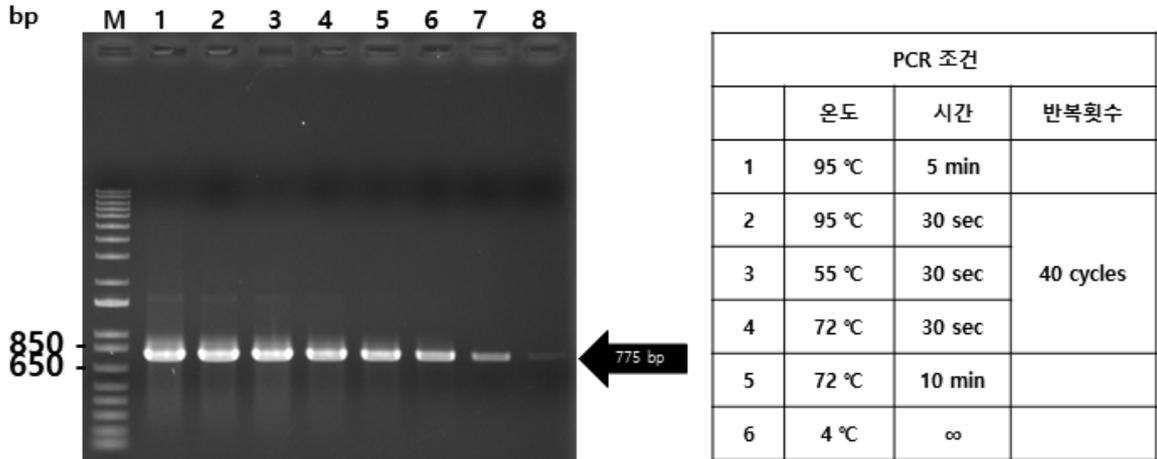
□ *Potato virus X* (PVX)



<그림 33> PVX 정밀검정을 위한 프라이머 제작 및 민감도 검정. M, 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA); lane 1, 10 ng PVX plasmid DNA; lane 2, 1 ng PVX plasmid DNA; lane 3, 100 pg PVX plasmid DNA; lane 4, 10 pg PVX plasmid DNA; lane 5, 1 pg PVX plasmid DNA; lane 6, 100 fg PVX plasmid DNA; lane 7, 10 fg PVX plasmid DNA; lane 8, 1 fg PVX plasmid DNA.

확보된 PVX 검정용 프라이머의 민감도를 확인하기 위해 PVX 클론(plasmid DNA) 10 ng 농도에서부터 10배 단계 희석법(10-fold serial dilution)을 사용하여 위와 같은 PCR 조건으로 수행하였음 <그림 33>. 그 결과 PVX 검정용 프라이머는 1 fg PVX plasmid DNA까지 검정되는 것을 확인하였고, 목표한 626 bp에서만 증폭된 단일 밴드로 보여주어 비특이적인 반응이 나타나지 않는 것을 확인하였음.

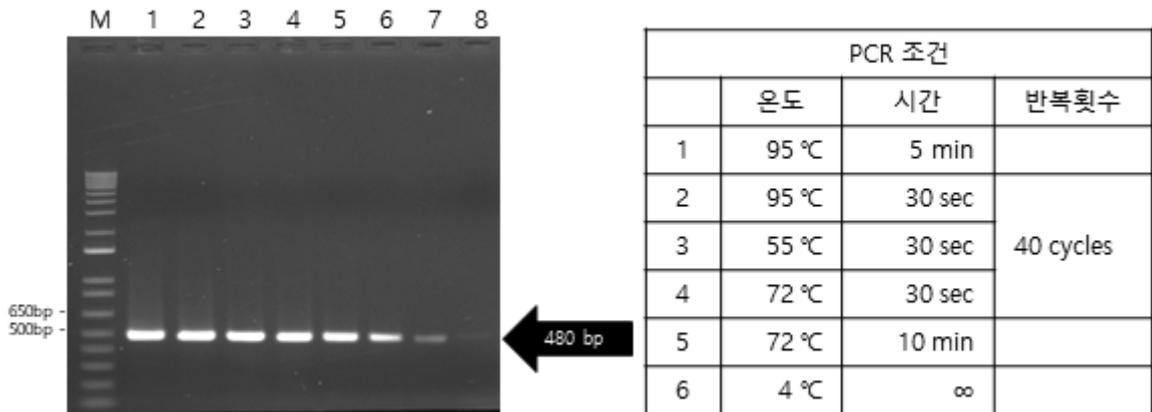
□ Shallot yellow stripe virus (SYSV)



<그림 34> SYSV 정밀검정을 위한 프라이머 제작 및 민감도 검정. M, 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA); lane 1, 10 ng SYSV plasmid DNA; lane 2, 1 ng SYSV plasmid DNA; lane 3, 100 pg SYSV plasmid DNA; lane 4, 10 pg SYSV plasmid DNA; lane 5, 1 pg SYSV plasmid DNA; lane 6, 100 fg SYSV plasmid DNA; lane 7, 10 fg SYSV plasmid DNA; lane 8, 1 fg SYSV plasmid DNA.

확보된 SYSV 검정용 프라이머의 민감도를 확인하기 위해 SYSV 클론(plasmid DNA) 10 ng 농도에서부터 10배 단계 희석법(10-fold serial dilution)을 사용하여 위와 같은 PCR 조건으로 수행하였음<그림 35>. 그 결과 SYSV 검정용 프라이머는 1 fg TMV plasmid DNA까지 검정되는 것을 확인하였으나, 1 fg SYSV plasmid DNA에서는 흐릿하게 증폭된 밴드를 관찰할 수 있었음. 목표한 775 bp에서만 증폭된 단일 밴드로 보여주어 비특이적인 반응이 나타나지 않는 것을 확인하였음.

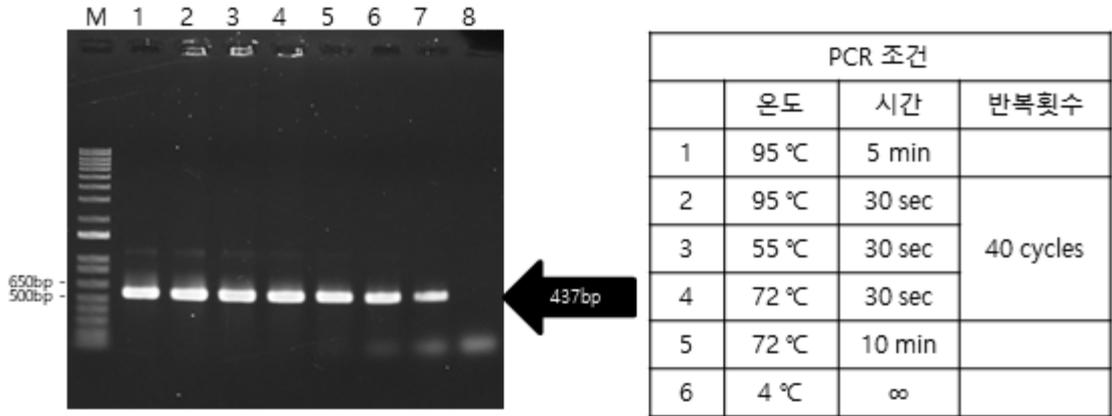
□ Tobacco mosaic virus (TMV)



<그림 35> TMV 정밀검정을 위한 프라이머 제작 및 민감도 검정. M, 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA); lane 1, 10 ng TMV plasmid DNA; lane 2, 1 ng TMV plasmid DNA; lane 3, 100 pg TMV plasmid DNA; lane 4, 10 pg TMV plasmid DNA; lane 5, 1 pg TMV plasmid DNA; lane 6, 100 fg TMV plasmid DNA; lane 7, 10 fg TMV plasmid DNA; lane 8, 1 fg TMV plasmid DNA.

확보된 TMV 검정용 프라이머의 민감도를 확인하기 위해 TMV 클론(plasmid DNA) 10 ng 농도에서부터 10배 단계 희석법(10-fold serial dilution)을 사용하여 위와 같은 PCR 조건으로 수행하였음<그림 35>. 그 결과 TMV 검정용 프라이머는 1 fg TMV plasmid DNA까지 검정되는 것을 확인하였으나, 1 fg TMV plasmid DNA에서는 흐릿하게 증폭된 밴드를 관찰할 수 있었음. 목표한 480 bp에서만 증폭된 단일 밴드로 보여주어 비특이적인 반응이 나타나지 않는 것을 확인하였음.

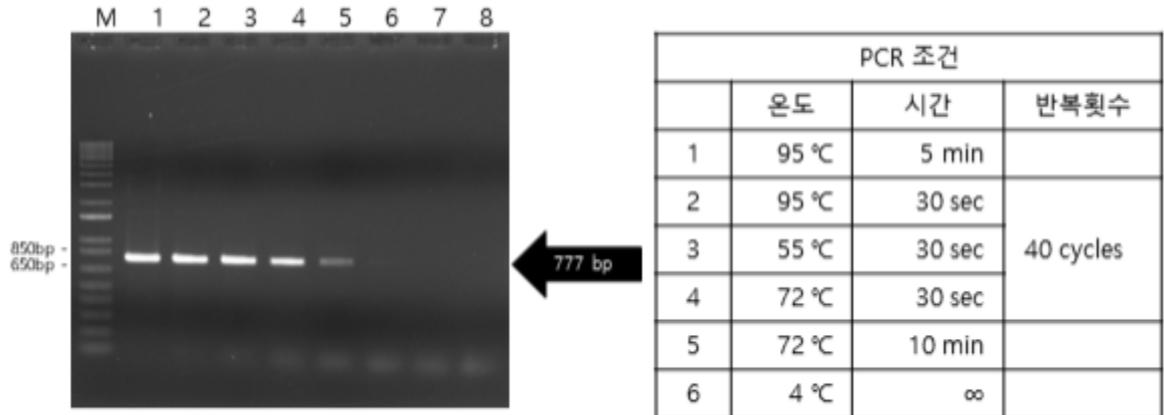
□ Tobacco rattle virus (TRV)



<그림 36> TRV 정밀검정을 위한 프라이머 제작 및 민감도 검정. M, 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA); lane 1, 10 ng TRV plasmid DNA; lane 2, 1 ng TRV plasmid DNA; lane 3, 100 pg TRV plasmid DNA; lane 4, 10 pg TRV plasmid DNA; lane 5, 1 pg TRV plasmid DNA; lane 6, 100 fg TRV plasmid DNA; lane 7, 10 fg TRV plasmid DNA; lane 8, 1 fg TRV plasmid DNA.

확보된 TRV 검정용 프라이머의 민감도를 확인하기 위해 TRV 클론(plasmid DNA) 10 ng 농도에서부터 10배 단계 희석법(10-fold serial dilution)을 사용하여 위와 같은 PCR 조건으로 수행하였음<그림 36>. 그 결과 TRV 검정용 프라이머는 10 pg TRV plasmid DNA까지 검정되는 것을 확인하였고, 목표한 437 bp에서만 증폭된 단일 밴드로 보여주어 비특이적인 반응이 나타나지 않는 것을 확인하였음. 추가로 100 fg ~ 1 fg TRV plasmid DNA에서 약간의 primer dimer 형성을 확인하였음.

□ Tomato spotted wilt virus (TSWV)



<그림 37> TSWV 정밀검정을 위한 프라이머 제작 및 민감도 검정. M, 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA); lane 1, 10 ng TSWV plasmid DNA; lane 2, 1 ng TSWV plasmid DNA; lane 3, 100 pg TSWV plasmid DNA; lane 4, 10 pg TSWV plasmid DNA; lane 5, 1 pg TSWV plasmid DNA; lane 6, 100 fg TSWV plasmid DNA; lane 7, 10 fg TSWV plasmid DNA; lane 8, 1 fg TSWV plasmid DNA.

확보된 TSWV 검정용 프라이머의 민감도를 확인하기 위해 TSWV 클론(plasmid DNA) 10 ng 농도에서부터 10배 단계 희석법 (10-fold serial dilution)을 사용하여 위와 같은 PCR 조건으로 수행하였음 <그림 37>. 그 결과 TSWV 검정용 프라이머는 1 pg TSWV plasmid DNA에서까지 검정 되는 것을 확인하였고, 목표한 777 bp에서만 증폭된 단일 밴드로 보여주어 비특이적인 반응이 나타나지 않는 것을 확인하였음.

## <2차년도>

본 연구는 1차년도에 완성한 백합과 국화 감염 바이러스 정밀진단기술에서 추가적으로 필요한 국화 바이로이드 검정 정밀진단기술을 개발하였으며, 1, 2차년도에 개발된 바이러스 정밀진단기술로 무병묘 생산 단계에서 확보한 조직배양묘와 순화된 시료들에서 검정을 수행하였음. 또한, 시료들로부터 확보한 검정 결과를 분석하여 정밀진단기술 보완연구를 수행하였으며, 무병묘 생산을 위해 항바이러스 후보 물질을 사용하여 효과 검정을 수행하였음.

### 1) 국화 감염 바이러스에 대한 정밀진단기술개발

1차년도에 개발된 국화 감염 바이러스 정밀진단기술에서 추가적으로 바이로이드 2종 (chrysanthemum chlorotic mottle viroid, CChMVd; chrysanthemum stunt viroid, CSVd)과 바이러스 1종 (chrysanthemum virus B, CVB)을 대상으로 정밀진단기술을 개발하였음.

#### 가) 국화 바이로이드 2종과 바이러스 1종의 최신 유전자 정보 확보

국화 바이로이드 2종(Chrysanthemum chlorotic mottle viroid, CChMVd; Chrysanthemum stunt viroid, CSVd)과 바이러스 1종(Chrysanthemum virus B, CVB)을 대상으로 최신 유전자 정보 (complete sequence)를 미국 국립생물공학정보센터 (National center for Biotechnology Information, NCBI)에서 확보하여 *in silico* 분석에서 활용하였음.

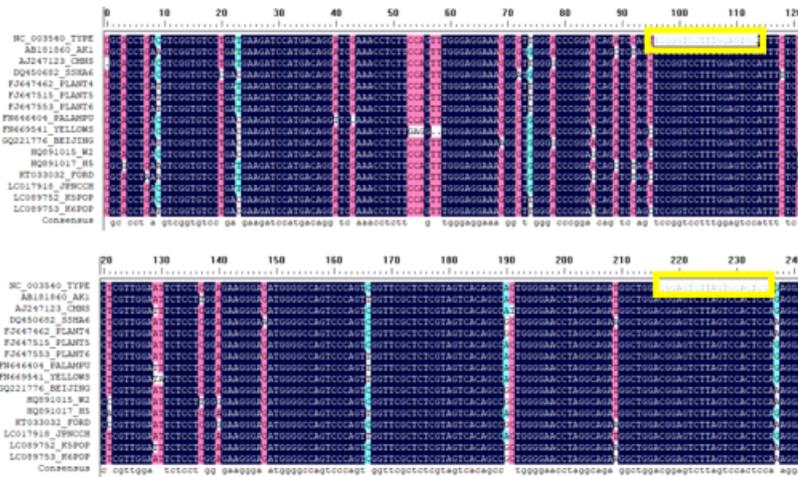
[ 표 3 ] 국화 바이로이드 2종과 바이러스 1종의 최신 유전자 정보 목록

Virus	NCBI accession no. (complete sequence)
Chrysanthemum chlorotic mottle viroid (CChMVd)	NC_003540, AB181860, AJ247123, DQ450682, FJ647462, FJ647515, FJ647553, FN646404, FN669541, GQ221776, HQ891015, HQ891017, KT033032, LC017918, LC089752, LC089753
Chrysanthemum stunt viroid (CSVd)	NC_002015, LC093172, LC062712, LC062713, LC088323, LC192498, JQ809268, JQ809254, HQ891019, AJ969017, MN718764, FN669540, FN669539, FN669538, FN669537, FN669536, FN669535, FN669534, KX096428, KX096407, KX096387, KX096366, KT005827, KX096576, KX096554, KX096532, KX096491, KX096471, KX096449
Chrysanthemum virus B (CVB)	NC_009087, AB245142, AM493895, AM765839, AM765838, AM765837, MW296553, MW296552

#### 나) *In silico* 분석으로 특이적인 프라이머 위치선정

미국 국립생물공학정보센터에서 등록된 염기서열 정보들을 확보하여 DNAMAN software(Lynnon Biosoft, Quebec, Canada)와 Lasergene DNASTAR software(DNASTAR Inc., Madison, WI, USA)를 사용하여 염기서열의 상동성 부위를 분석하여 특이적인 프라이머 위치를 선정하였음.

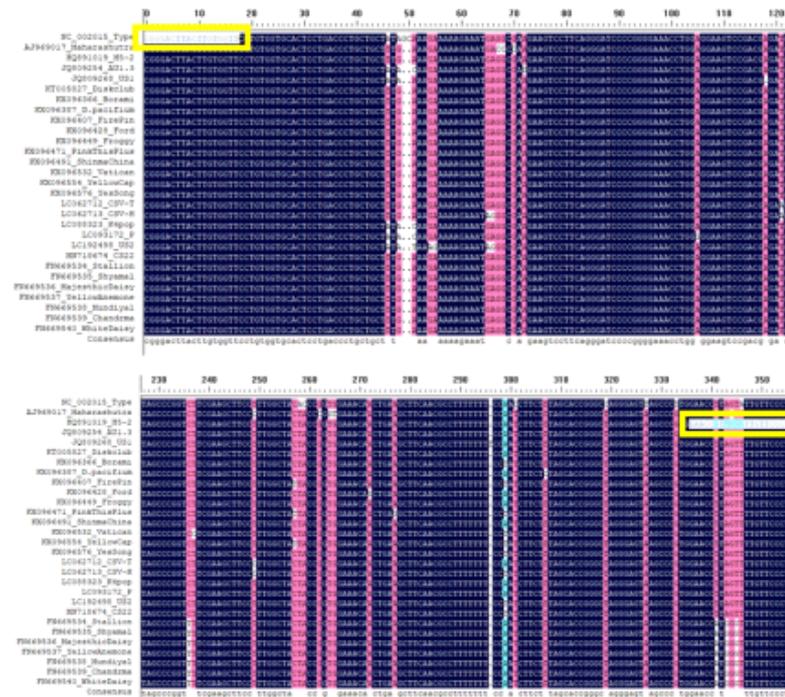
Chrysanthemum chlorotic mottle viroid (CChMVd)



<그림 38> *In silico* 분석을 통한 CChMvD 정밀진단기술 개발에 적용될 신규 프라이머 위치선정. 노란색 박스: 신규 프라이머 염기서열 위치.

현재 보고된 CChMvD 전체 염기서열들을 확보하고, *in silico* 분석을 통하여 가장 안정적으로 일치된 염기서열 위치를 탐색하였음. 그 결과 전체 염기서열 중 142 bp가 증폭되어 검정 될 수 있는 정밀진단용 프라이머를 제작하였음. 위치는 위 그림에서 노란색 박스로 표시하였음<그림 38>.

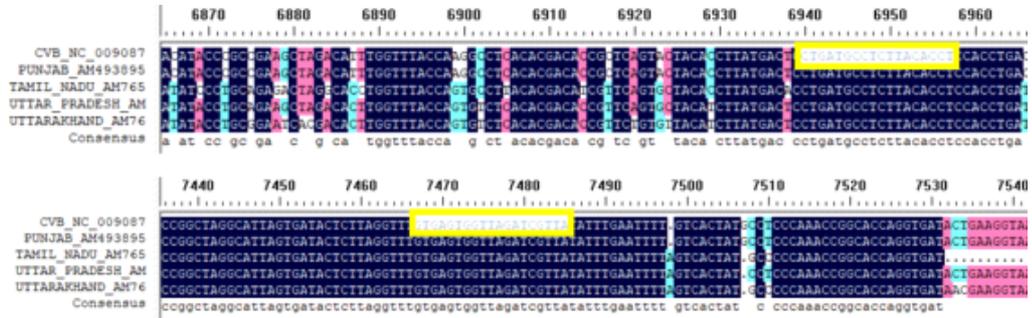
□ *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd)



<그림 39> *In silico* 분석을 통한 CSVd 정밀진단기술 개발에 적용될 신규 프라이머 위치선정. 노란색 박스: 신규 프라이머 염기서열 위치.

현재 보고된 CSVd 49 strains/isolates 전체 염기서열을 확보하고, 그 중 국내에서 주로 보고되는 CSVd와 국내에서 보고된 CSVd와 근연관계가 가까운 국외 CSVd 29 strains/isolates를 대상으로 *in silico* 분석을 수행하였음. 그중 가장 안정적으로 일치된 염기서열 위치를 탐색하였고, 전체 염기서열 (354 bp)이 증폭되어 검정 될 수 있는 정밀진단용 프라이머를 제작하였음. 위치는 위 그림에서 노란색 박스로 표시하였음<그림 39>.

□ *Chrysanthemum virus B* (CVB)

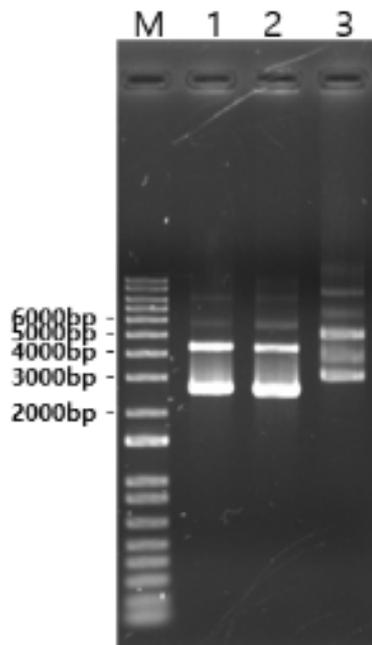


<그림 40> *In silico* 분석을 통한 CVB 정밀진단기술 개발에 적용될 신규 프라이머 위치선정. 노란색 박스: 신규 프라이머 염기서열 위치.

현재 보고된 CVB 전체 염기서열들을 확보하고, *in silico* 분석을 통하여 가장 안정적으로 일치된 염기서열 위치를 탐색하였음. 그 결과 염기서열 중 TGB1-CP 547 bp가 증폭되어 검정 될 수 있는 정밀진단용 프라이머를 제작하였음. 위치는 위 그림에서 노란색 박스로 표시하였음<그림 40>.

**다) 표준양성시료 확보**

국화 감염 바이로이드 2종(CChMVd, CSVd)과 바이러스 1종(CVB)에 대한 정밀진단기술개발에 적용될 수 있는 표준양성시료를 제작하였음. 바이로이드 및 바이러스에 감염된 식물체에서 total RNA를 분리하여 cDNA를 합성 후, 목표 DNA 단편들을 클로닝 과정(pGEM®-T Easy Vector Systems, Promega, Madison, WI, USA)을 통하여 각각 클론을 확보하였음. 확보된 클론들은 모두 염기서열 분석을 통하여 유전정보를 검정하였으며 바이러스 정밀진단기술개발에 활용되었음.

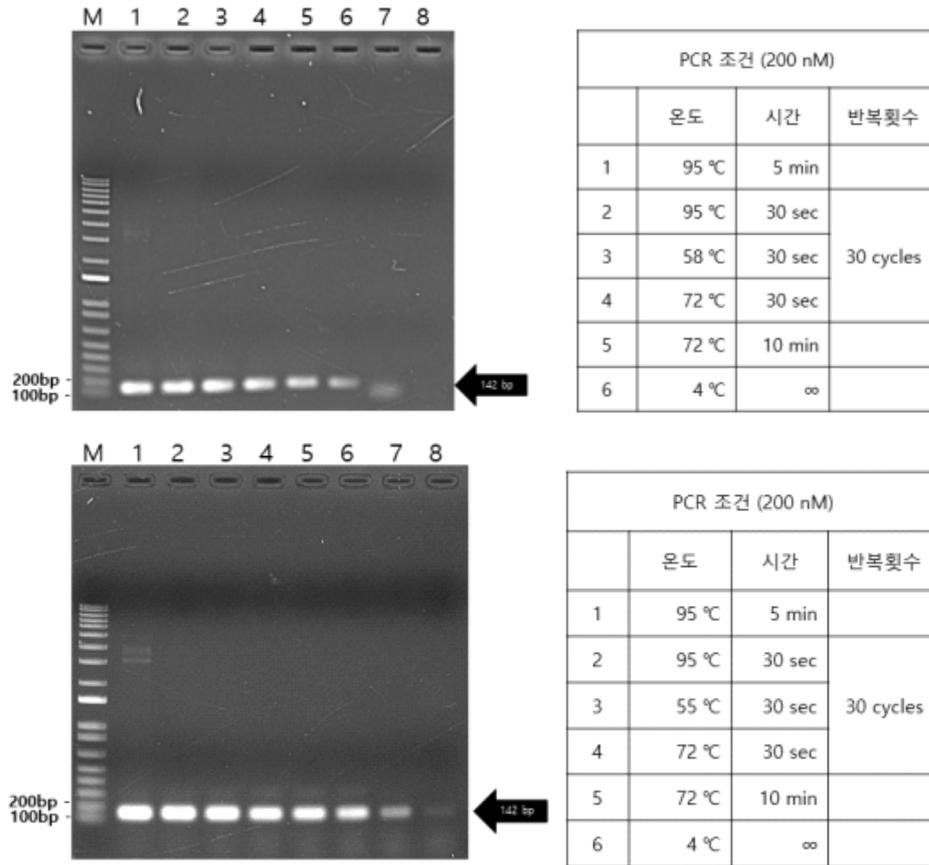


<그림 41> 국화 감염 바이로이드 2종과 바이러스 1종에 대한 정밀진단기술에 활용될 신규 표준양성시료 제작. M, 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA); lane 1, chrysanthemum chlorotic mottle viroid (CChMVd); lane 2, chrysanthemum stunt viroid (CSVd); lane 3, chrysanthemum virus B (CVB).

**라) 신규 특이적인 프라이머 적용 정밀진단기술 개발**

신규로 제작된 CChMVd, CSVd, CVB 프라이머들을 대상으로 정밀진단을 위한 최적의 PCR 조건을 확립하였고, 개발된 정밀진단기술의 민감도 및 비특이적 반응을 분석하였음.

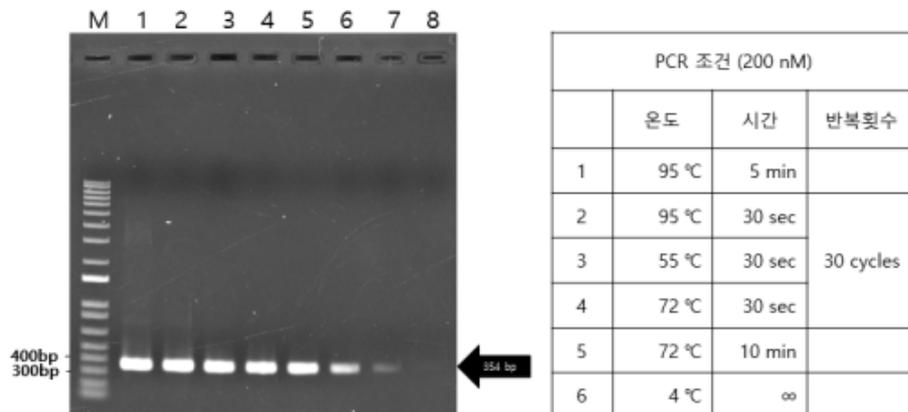
□ Chrysanthemum chlorotic mottle viroid (CChMVd)

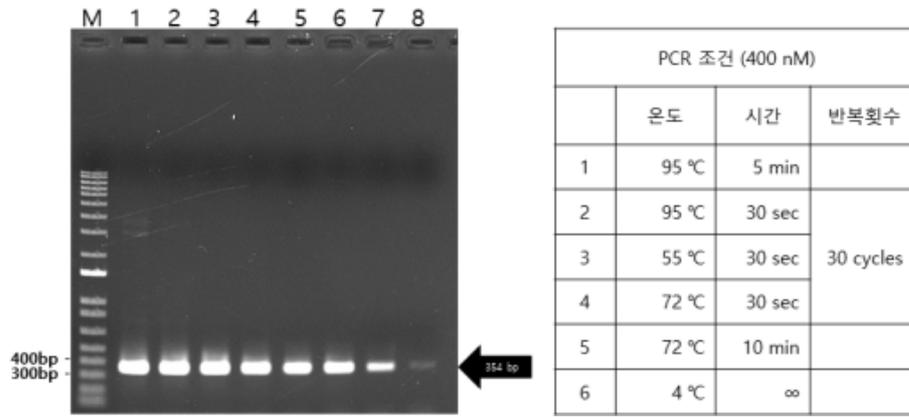


<그림 42> CChMVd 정밀검정을 위한 프라이머 제작 및 민감도 검정. M, 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA); lane 1, 10 ng CChMVd plasmid DNA; lane 2, 1 ng CChMVd plasmid DNA; lane 3, 100 pg CChMVd plasmid DNA; lane 4, 10 pg CChMVd plasmid DNA; lane 5, 1 pg CChMVd plasmid DNA; lane 6, 100 fg CChMVd plasmid DNA; lane 7, 10 fg CChMVd plasmid DNA; lane 8, 1 fg CChMVd plasmid DNA.

확보된 CChMVd 검정용 프라이머의 민감도를 확인하기 위해 CChMVd 클론(plasmid DNA) 10 ng 농도에서부터 10배 단계 희석법(10-fold serial dilution)을 사용하여 위와 같은 PCR 조건으로 수행하였음<그림 42>. 그 결과 CChMVd 검정용 프라이머는 55 °C에서 1 fg CChMVd plasmid DNA까지 검정되는 것을 확인하였고, 목표한 142 bp에서만 증폭된 단일 밴드로 보여주어 비특이적인 반응이 나타나지 않는 것을 확인하였음.

□ Chrysanthemum stunt viroid (CSVd)

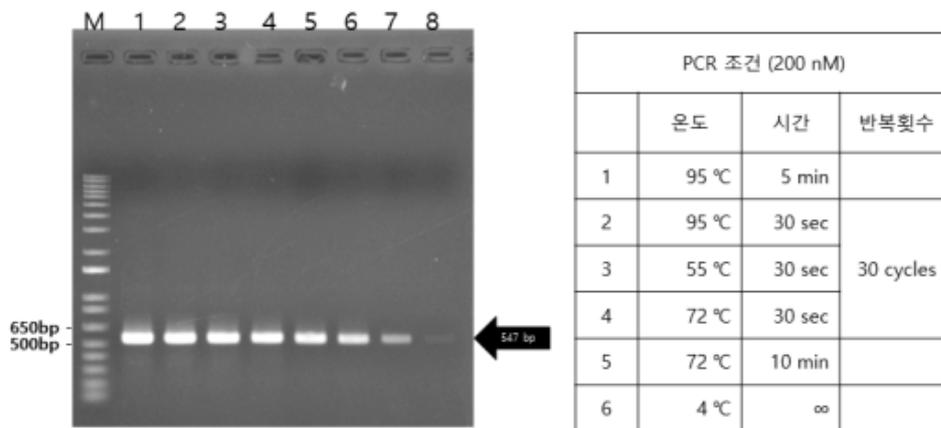




<그림 43> CSVd 정밀검정을 위한 프라이머 제작 및 민감도 검정. M, 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA); lane 1, 10 ng CSVd plasmid DNA; lane 2, 1 ng CSVd plasmid DNA; lane 3, 100 pg CSVd plasmid DNA; lane 4, 10 pg CSVd plasmid DNA; lane 5, 1 pg CSVd plasmid DNA; lane 6, 100 fg CSVd plasmid DNA; lane 7, 10 fg CSVd plasmid DNA; lane 8, 1 fg CSVd plasmid DNA.

확보된 CSVd 검정용 프라이머의 민감도를 확인하기 위해 CSVd 클론(plasmid DNA) 10 ng 농도에서부터 10배 단계 희석법(10-fold serial dilution)을 사용하여 위와 같은 PCR 조건으로 수행하였음 <그림 43>. 그 결과 CChMVd 검정용 프라이머는 400 nM에서 1 fg CSVd plasmid DNA까지 검정되는 것을 확인하였고, 목표한 354 bp에서만 증폭된 단일 밴드로 보여주어 비특이적인 반응이 나타나지 않는 것을 확인하였음.

□ Chrysanthemum virus B (CVB)



<그림 44> CVB 정밀검정을 위한 프라이머 제작 및 민감도 검정. M, 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA); lane 1, 10 ng CVB plasmid DNA; lane 2, 1 ng CVB plasmid DNA; lane 3, 100 pg CVB plasmid DNA; lane 4, 10 pg CVB plasmid DNA; lane 5, 1 pg CVB plasmid DNA; lane 6, 100 fg CVB plasmid DNA; lane 7, 10 fg CVB plasmid DNA; lane 8, 1 fg CVB plasmid DNA.

확보된 CVB 검정용 프라이머의 민감도를 확인하기 위해 CVB 클론(plasmid DNA) 10 ng 농도에서부터 10배 단계 희석법(10-fold serial dilution)을 사용하여 위와 같은 PCR 조건으로 수행하였음 <그림 44>. 그 결과 CVB 검정용 프라이머는 1 fg CSVd plasmid DNA에서까지 검정되는 것을 확인하였고, 목표한 547 bp에서만 증폭된 단일 밴드로 보여주어 비특이적인 반응이 나타나지 않는 것을 확인하였음.

## 2) 백합 시료에서 정밀진단기술을 사용하여 검정결과

국내 노지에서 재배되는 참나리와 백합을 대상으로 개발된 백합 감염 바이러스 정밀진단기술을 사용하여 바이러스 감염률을 분석하였음.

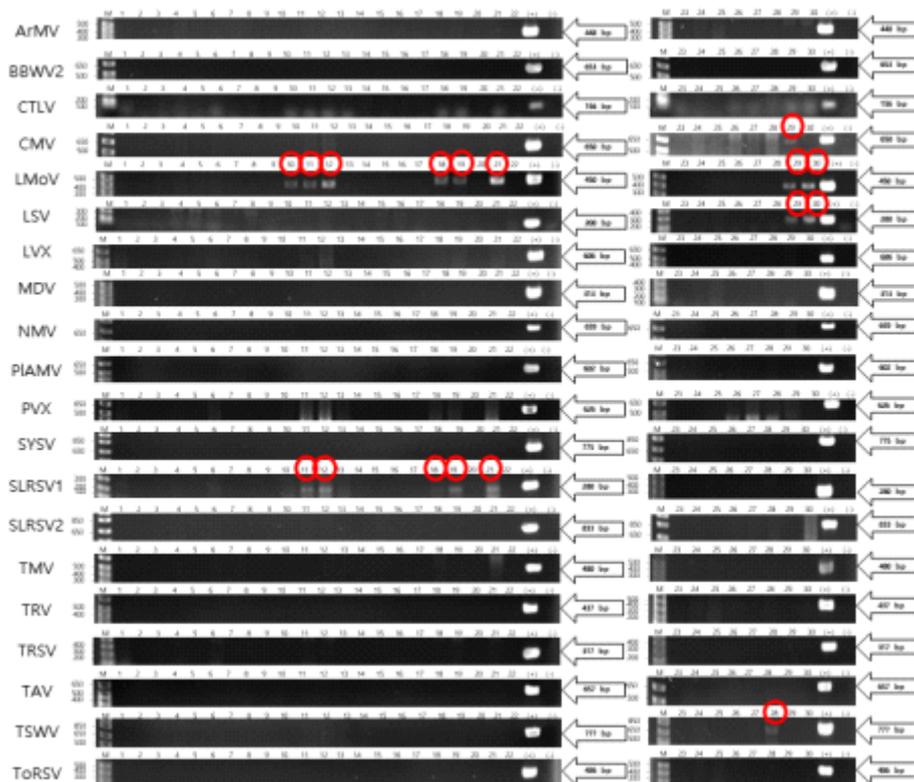
### 가) 확보된 백합 시료 사진

시료를 경기도 남양주와 강원도 춘천 지역을 중심으로 노지에서 재배되는 참나리, 백합을 중심으로 수집을 하였음<그림 45>. 남양주에서 참나리 23개체, 백합 2개체, 백합구근 3개체를 수집하였고, 강원도 춘천에서 백합 2개체를 수집하였음. 아래의 사진은 총 30개체 중 바이러스 병징의 모습을 보이며, 백합 감염 바이러스 정밀진단 기술을 사용하여 검정된 식물체들의 모습임. 10-12, 18, 19에서 모자이크, 황화 줄무늬 병징이 나타나고 있으며, 21번은 잎 뒤틀림과 괴사 반점, 29번은 전체적으로 황화현상을 보이고 있음. 28번은 잎 끝쪽이 황화되는 현상을 보이고 있으며, 30번은 모자이크와 잎 뒤트림 병징이 나타나고 있음.



<그림 45> 남양주 노지에서 수집한 참나리 및 백합 시료 사진. 10-12: 참나리 (남양주), 18-19: 참나리 (남양주), 21: 백합 (남양주), 28: 참나리 (남양주), 29-30: 백합 (강원도 춘천).

### 나) 백합 감염 바이러스 정밀진단기술을 사용하여 바이러스 검정결과



<그림 46> 확보된 참나리 및 백합 시료를 대상으로 백합 감염 바이러스 정밀진단기술을 사용하여 검정. M, 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA); lanes 1-20, 참나리 (남양주); lanes 21-22, 백합 솔본느 (남양주); lane 23-25, 백합 구근 (남양주); lanes 26-28, 참나리 (남양주); lanes 29-30, 백합 (강원도 춘천).

확보된 시료를 대상으로 total RNA를 분리한 후, random hexamer와 reverse transcriptase를 사용하여 cDNA를 합성하였음. 합성된 cDNA로 백합 감염 바이러스 정밀진단기술을 활용하여 19종의 바이러스들 (ArMV, BBWV2, CTLV, CMV, LMoV, LSV, LVX, MDV, NMV, PIAMV, PVX, SYSV, SLRSV, TMV, TRV, TRSV, TAV, TSWV, ToRSV)을 검정하였음<그림 46>.

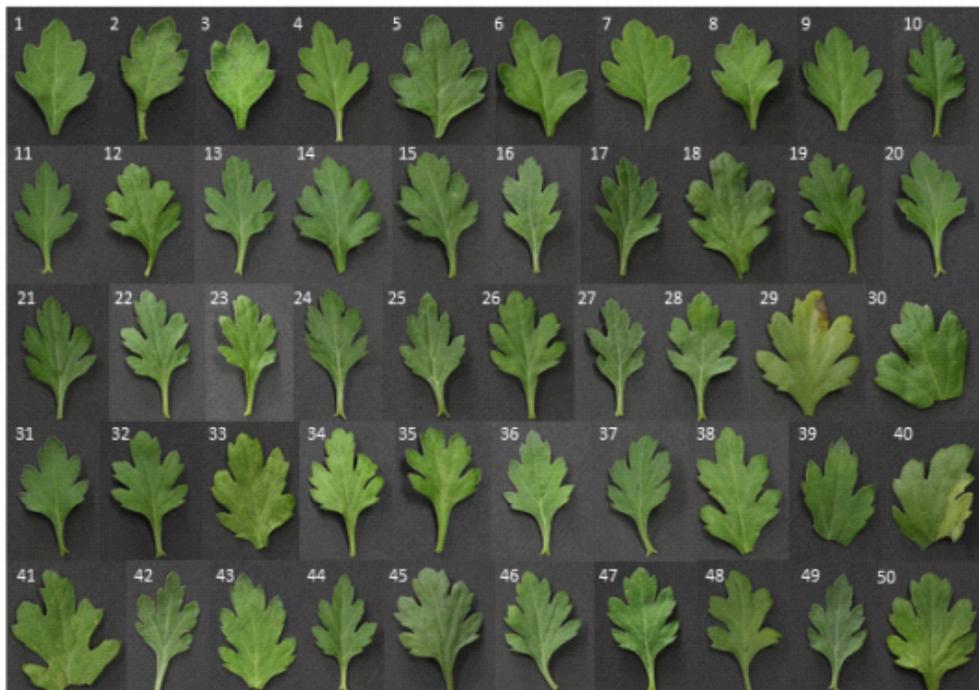
그 결과, 29에서 CMV의 목표 DNA 단편 증폭 크기가 검정 되었고, 10-12, 18-19, 21, 29-30에서 LMoV의 목표 DNA 단편 증폭 크기가 검정 되었음. 29-30번에서 LSV의 목표 DNA 단편 증폭 크기가 검정 되었으며 11-12, 18-19, 21에서 SLRSV의 목표 DNA 단편 증폭 크기가 검정 되었음. 28에서 TSWV의 목표 DNA 단편 증폭 크기가 검정되었음. 증폭된 DNA 단편들은 클로닝을 수행하여 염기서열을 분석하였으며, 그중에서 세 개의 바이러스들 (CMV, LMoV, LSV)은 염기서열을 확인하였음. SLRSV와 TSWV는 염기서열을 분석하였으나, 식물체 유래 유전자 부위로 분석되었음. 또한, 염기서열 분석으로 29번은 LMoV, LSV, CMV에 복합 감염된 것으로 확인되었고, 30번은 LMoV, LSV에 복합감염된 것으로 확인되었음. 10, 18번은 LMoV에 단독 감염된 것으로 분석되었음. 따라서 노지에서 수집한 참나리와 백합에서는 LMoV, LSV, CMV가 주로 감염되는 것으로 분석되었음.

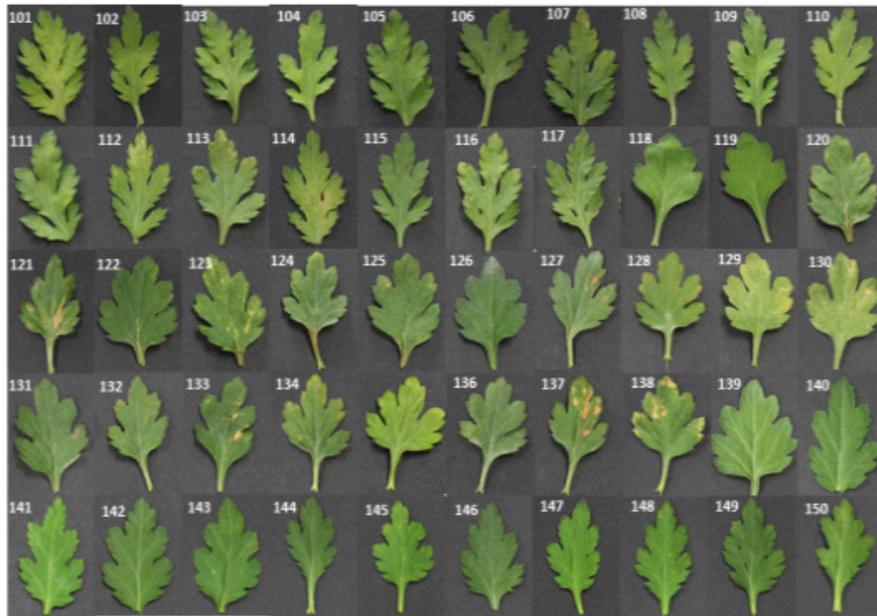
### 3) 국화 시료에서 정밀진단기술을 사용하여 검정결과

국화 무병묘 생산을 위한 조직배양묘와 순화묘에서 채집한 국화 시료들을 대상으로 개발된 국화 감염 바이러스 및 바이로이드 정밀진단기술을 사용하여 바이로이드 및 바이러스 감염률을 분석하였음.

#### 가) 확보된 무병묘 조직배양단계에서의 국화 시료 사진

제2협동(충남농업기술원 화훼연구소)에서 수행 중인 무병묘 국화 생산연구에서 확보한 국화 조직배양단계의 시료를 아래와 같이 시기별로 확보하였음. 일부 조직배양묘에서 황화와 괴사 반점이 나타나는 것을 확인할 수 있음.







<그림 47> 국화 무병묘 생산단계 (조직배양단계)에서의 시료. 1. 보라미8, 2. 보라미9, 3. 보라미 13, 4. 보라미14, 5. 보라미15, 6. 보라미16, 7. 보라미17, 8. 보라미19, 9. 보라미20, 10. 보라미 101, 11. 보라미102, 12. 보라미103, 13. 보라미104, 14. 보라미105, 15. 보라미106, 16. 보라미 107, 17. 보라미108, 18. 보라미109, 19. 보라미110, 20. 보라미111, 21. 보라미112, 22. 보라미 113, 23. 보라미114, 24. 보라미115, 25. 보라미116, 26. 보라미117, 27. 보라미118, 28. 보라미 119, 29. 보라미120, 30. 보라미121, 31. 보라미122, 32. 보라미123, 33. 보라미124, 34. 보라미 125, 35. 보라미126, 36. 보라미127, 37. 보라미128, 38. 보라미129, 39. 보라미130, 40. 보라미 131, 41. 보라미132, 42. 보라미133, 43. 보라미134, 44. 보라미135, 45. 보라미136, 46. 보라미 137, 47. 보라미138, 48. 보라미139, 49. 보라미140, 50. 보라미141, 51. 포드1, 52. 포드2, 53. 포드3, 54. 포드4, 55. 포드5, 56. 포드6, 57. 포드7, 58. 포드8, 59. 포드9, 60. 포드10, 61. 포드 100, 62. 포드101, 63. 포드102, 64. 포드103, 65. 포드104, 66. 포드105, 67. 포드106, 68. 포드 107, 69. 포드108, 70. 포드109, 71. 포드110, 72. 포드111, 73. 포드112, 74. 포드113, 75. 포드 114, 76. 포드115, 77. 포드116, 78. 포드117, 79. 포드118, 80. 포드119, 81. 포드120, 82. 포드 121, 83. 포드122, 84. 포드123, 85. 루비1, 86. 루비2, 87. 루비3, 88. 루비6, 89. 루비9, 90. 루 비11, 91. 루비12, 92. 루비14, 93. 루비19, 94. 포드125, 95. 포드126, 96. 포드127, 97. 포드 128, 98. 포드129, 99. 포드130, 100. 포드131, 101. 포드132, 102. 포드133, 103. 포드134,

104. 포드135, 105. 포드136, 106. 포드137, 107. 포드138, 108. 포드139, 109. 포드140, 110. 포드141, 111. 포드142, 112. 포드143, 113. 포드144, 114. 포드145, 115. 포드146, 116. 포드147, 117. 포드148, 118. 루비23, 119. 루비24, 120. 루비141, 121. 루비142, 122. 루비143, 123. 루비144, 124. 루비145, 125. 루비146, 126. 루비147, 127. 루비148, 128. 루비149, 129. 루비150, 130. 루비151, 131. 루비152, 132. 루비153, 133. 루비154, 134. 루비155, 135. 루비156, 136. 루비157, 137. 루비158, 138. 루비159, 139. 루비8, 140. 퍼팩트121, 141. 퍼팩트122, 142. 퍼팩트123, 143. 퍼팩트124, 144. 퍼팩트125, 145. 퍼팩트126, 146. 퍼팩트127, 147. 퍼팩트128, 148. 퍼팩트129, 149. 퍼팩트130, 150. 퍼팩트131, 151. 퍼팩트132, 152. 퍼팩트133, 153. 퍼팩트134, 154. 퍼팩트135, 155. 퍼팩트136, 156. 퍼팩트137, 157. 루비160, 158. 루비161, 159. 루비162, 160. 루비163, 161. 루비164, 162. 루비165, 163. 루비166, 164. 루비167, 165. 루비168, 166. 루비169, 167. 루비170, 168. 루비171, 169. 루비172, 170. 루비173, 171. 루비174, 172. 루비175, 173. 루비176, 174. 루비177, 175. 루비178, 176. 루비179, 177. 루비180, 178. 루비181, 179. 루비182, 180. 루비183, 181. 루비184, 182. 루비185, 183. 루비187, 184. 루비186, 185. 루비188, 186. 펄키스타2, 187. 펄키스타4, 188. 펄키스타5, 189. 펄키스타9, 190. 펄키스타12, 191. 펄키스타13, 192. 펄키스타14, 193. 펄키스타15, 194. 펄키스타16, 195. 펄키스타17, 196. 펄키스타18, 197. 펄키스타19, 198. 펄키스타24, 199. 펄키스타26, 200. 펄키스타27, 201. 퍼팩트138, 202. 퍼팩트139, 203. 퍼팩트140, 204. 퍼팩트141, 205. 퍼팩트142, 206. 퍼팩트143, 207. 퍼팩트144, 208. 퍼팩트145, 209. 퍼팩트146, 210. 퍼팩트147, 211. 퍼팩트148, 212. 홀릭1, 213. 홀릭2, 214. 홀릭3, 215. 홀릭4, 216. 홀릭5, 217. 홀릭6, 218. 홀릭7, 219. 홀릭8, 220. 홀릭9, 221. 홀릭10, 222. 홀릭11, 223. 홀릭12, 224. 홀릭13, 225. 펄키128, 226. 펄키129, 227. 펄키130, 228. 펄키131, 229. 펄키132, 230. 펄키133, 231. 펄키134, 232. 펄키135, 233. 펄키136, 234. 펄키137, 235. 홀릭14, 236. 홀릭15, 237. 홀릭16, 238. 홀릭17, 239. 홀릭18, 240. 홀릭19, 241. 홀릭20, 242. 홀릭21, 243. 홀릭22, 244. 홀릭23, 245. 금수1, 246. 금수2, 247. 금수3, 248. 금수4, 249. 금수5, 250. 금수6, 251. 금수7, 252. 금수8, 253. 금수9, 254. 금수10, 255. 금수11, 256. 금수12, 257. 금수13, 258. 금수14, 259. 금수15, 260. 금수16, 261. 금수17, 262. 금수18, 263. 금수20, 264. 금수21, 265. 금수22, 266. 금수23, 267. 금수24, 268. 금수25, 269. 금수26, 270. 금수27, 271. u366-1, 272. u366-2, 273. 엘도라1, 274. 엘도라2, 275. 엘도라3, 276. 엘도라4, 277. 엘도라5, 278. 엘도라6, 279. 엘도라7, 280. 엘도라8, 281. 엘도라9, 282. 엘도라10, 283. 코랑킹1, 284. 코랑킹2, 285. 코랑킹3, 286. 코랑킹4, 287. 코랑킹5, 288. 코랑킹6, 289. 코랑킹7, 290. 코랑킹8, 291. 코랑킹9, 292. 코랑킹10, 293. u366-3, 294. u366-4, 295. u366-5, 296. u366-6, 297. u366-7, 298. u366-8, 299. u366-9, 300. u366-10.

#### 나) 확보된 무병묘 순화단계에서의 국화 시료 사진

제2협동 (충남농업기술원 화훼연구소)에서 수행 중인 무병묘 국화 생산연구에서 확보한 국화 순화 단계의 시료를 아래와 같이 시기별로 확보하였음. 국화 순화단계에서 일부 국화에서 황화, 괴사 반점, 잎이 작아지는 현상이 나타나고 있음<그림 48>.



<그림 48> 국화 무병묘 생산단계 (순화단계)에서의 시료. 1. 핑크원더1, 2. 핑크원더2, 3. 핑크원더3, 4. 핑크원더4, 5. 핑크원더5, 6. 핑크원더6, 7. 핑크원더7, 8. 핑크원더8, 9. 레드볼1, 10. 레드볼2, 11. SP17-681-01-1, 12. SP17-681-01-2, 13. SP17-681-01-3, 14. SP17-681-01-4, 15. SP19-138-01-1, 16. SP19-138-01-2, 17. SP19-138-01-3, 18. SP19-138-01-4, 19. 보라미, 20. 화이트캡1, 21. 화이트캡2, 22. 포드, 23. 금방울1, 24. 금방울2, 25. 금방울3, 26. 금방울4, 27. 스마일볼1, 28. 스마일볼2, 29. 스마일볼3, 30. 스마일볼4, 31. 러블리살몬1, 32. 서블리살몬2, 33. 러블리살몬3, 34. 러블리살몬4, 35. 러블리살몬5, 36. SP17-425-01-1, 37. SP17-425-01-2, 38. SP17-425-01-3, 39. SP17-425-01-4, 40. 볼카레드1, 41. 볼카레드2, 42. 볼카레드3, 43.

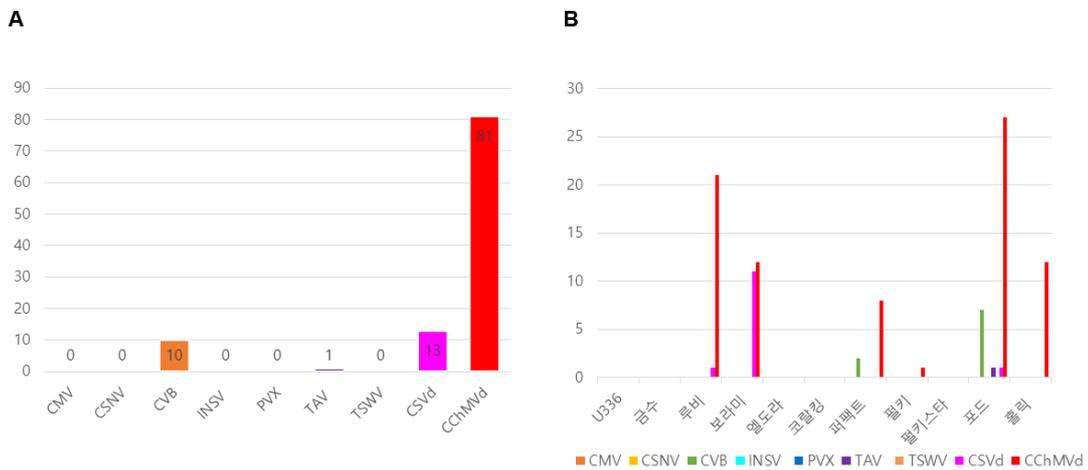
볼카레드4, 44. 볼카레드5, 45. 본본다크1, 46. 본본다크2, 47. 홀릭, 48. 루비, 49. 파이어핑크, 50. 락스.

**다) 국화 감염 바이러스 및 바이로이드 정밀진단기술을 사용하여 바이러스 검정결과**

국화 무병묘 생산을 위한 생산단계(조직배양묘와 순화묘)에서 바이러스 및 바이로이드 감염률을 분석하여 주요 감염되는 바이러스 및 바이로이드를 분석하였음. 또한, 국화 품종별 바이러스 및 바이로이드 감염률을 조사하여 무병묘 생산에 좀 더 활용 가능한 품종을 제시하였음.

**□ 국화 조직배양단계에서의 바이러스 및 바이로이드 검정 결과**

국화 조직배양단계에서 확보한 300개체 조직배양묘 시료들을 대상으로 국화 감염 바이러스 및 바이로이드 정밀검정진단기술을 활용하여 7종의 바이러스들(CMV, CSNV, CVB, INSV, PVX, TAV, TSWV)과 2종의 바이로이드들(CSVd, CChMVd)을 검정하였음.



<그림 49> 국화 조직배양묘에서 바이러스 및 바이로이드 검정 결과. A, 바이러스 및 바이로이드 종류에 따른 검정 결과. B, 국화 품종별 바이러스 및 바이로이드 검정 결과.

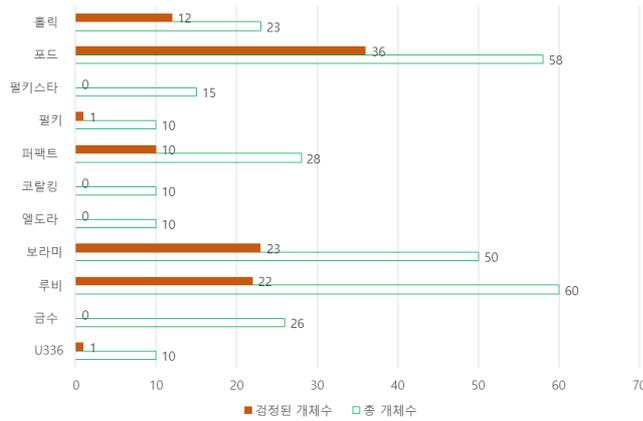
그 결과 CVB는 10개체, TAV는 1개체, CSVd는 13개체, CChMVd는 81개체에서 목표 DNA 단편 증폭 크기가 검정이 되었으며, 증폭된 DNA 단편을 클로닝하여 염기서열을 분석하였음<그림 49-A>. CVB는 U336, 퍼팩트, 포드 품종들에서 검정되었고, TAV는 포드 품종에서만 검정되었음<그림 49-B>. CSVd는 루비, 보라미, 포드 품종들에서 검정되었고, CChMVd는 루비, 보라미, 퍼팩트, 펠키, 포드, 홀릭 품종들에서 검정되었음<그림 49-B>.

[표 4] 국화 조직배양단계에서의 품종별 복합감염 검정결과

		CMV	CSNV	CVB	INSV	PVX	TAV	TSWV	CSVd	CChMVd
1	보라미 103								+	+
2	보라미 115								+	+
3	보라미 126								+	+
4	보라미 139								+	+
5	포드 6						+			+
6	포드 106			+						+
7	포드 108			+						+
8	포드 116			+						+
9	포드 128			+						+
10	포드 131			+						+

+: 국화 감염 바이러스 및 바이로이드 정밀진단기술을 사용하여 검정된 식물체.

국화 조직배양단계에서 확보한 300개 조직배양묘 시료들에서 바이러스 및 바이로이드 복합감염을 분석하였음. 그 결과 300개체 중 10개체에서 바이러스와 바이로이드에 복합감염된 것으로 분석되었음[표 4]. CVB와 CChMVd 복합감염은 5개체 (포드 106, 108, 116, 128, 131), TAV와 CChMVd는 1개체 (포드 6), CSVd와 CChMVd는 4개체 (보라미 103, 115, 126, 139) 검정되었음.



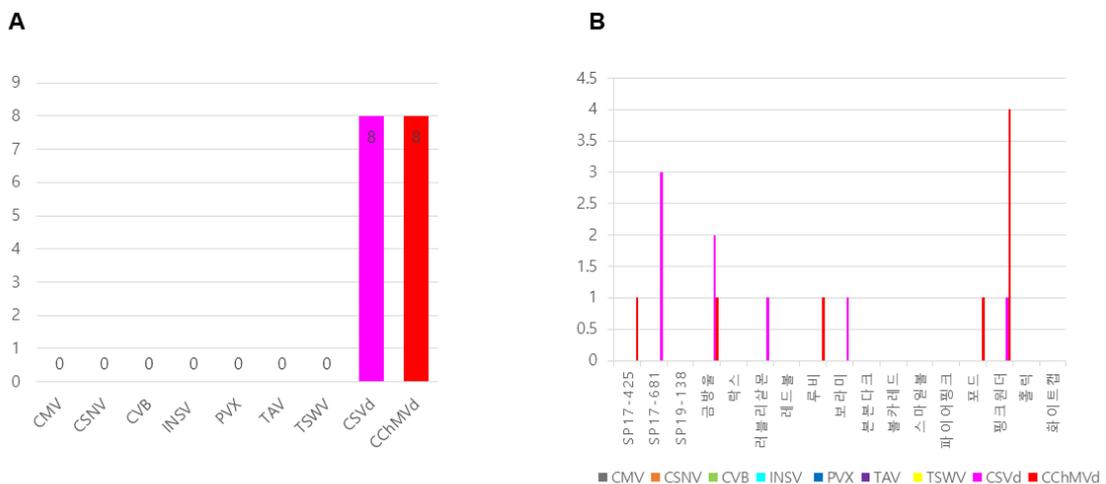
<그림 50> 국화 조직배양묘에서의 품종별 바이러스 검정률.

국화 조직배양묘에서의 품종별 바이러스 및 바이로이드 검정은 훌릭 23개체 중 12개체(38.33%), 포드 58개체 중 36개체(62.07%), 펠키스타 15개체 중 0개체(0%), 펠키 10개체 중 1개체(10%), 퍼팩트 28개체 중 10개체(35.71%), 코랄킹 10개체 중 0개체(0%), 엘도라 10개체 중 0개체(0%), 보라미 50개체 중 23개체(46%), 루비 60개체 중 22개체(36.67%), 금수 26개체 중 0개체(0%), U336 10개체 중 1개체(10%)였음<그림 50>.

국화 11품종을 같은 환경조건에서 배양했을 때, 4종 품종들 (펠키스타, 코랄킹, 엘도라, 금수)이 상대적으로 7종의 바이러스들과 2종의 바이로이드들에 감염되지 않은 것으로 분석되었음<그림 50>. 따라서 국화 무병묘를 생산할 때 위의 4품종을 선택하여 사용하면 바이러스 및 바이로이드 감염률을 낮출 것으로 사료됨.

#### □ 국화 순화단계에서의 바이러스 및 바이로이드 검정 결과

국화 순화단계에서 확보한 50개체 시료들을 대상으로 국화 감염 바이러스 및 바이로이드 정밀검정진단기술을 활용하여 7종의 바이러스들(CMV, CSNV, CSNV, 과 2종의 바이로이드들을 검정하였음.



<그림 51> 국화 순화묘에서의 바이러스 및 바이로이드 검정 결과. A, 바이러스 및 바이로이드 종류에

다른 검정 결과. B, 국화 품종별 바이러스 및 바이로이드 검정 결과.

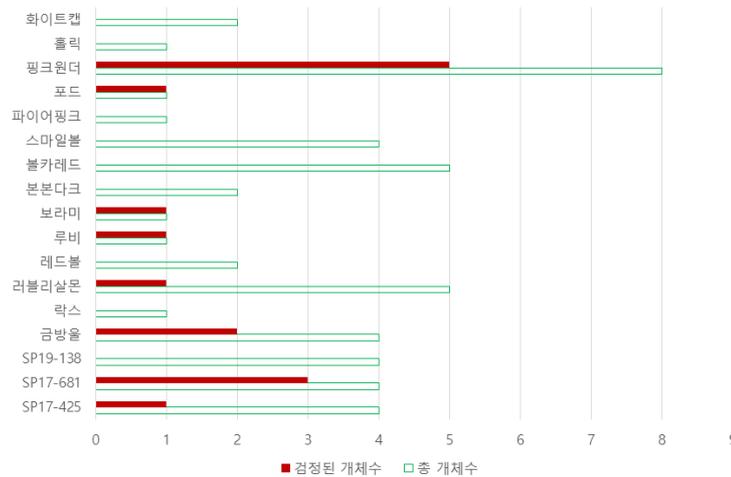
그 결과 CSVd와 CChMVd는 각각 8개체씩 목표 DNA 단편 증폭 크기가 검정이 되었으며, 증폭된 DNA 단편을 클로닝하여 염기서열을 분석하였음<그림 51-A>. 국화 품종별 바이러스 및 바이로이드 감염을 분석에서는 CSVd는 SP17-681, 금방울, 러블리살몬, 보라미, 핑크원더에서 검정되었고, CChMVd는 SP17-425, 금방울, 루비, 포드, 핑크원더에서 검정되었음. 금방울과 핑크원더는 CSVd와 CChMVd가 모두 검정되었음<그림 51-B>. SP19-138, 락스, 레드볼, 본본다크, 볼카레드, 스마일볼, 파이어핑크, 홀릭, 화이트캡에서는 바이러스 및 바이로이드가 검정되지 않았음.

[표 5] 국화 순화단계에서의 품종별 복합감염 검정 결과

	CMV	CSNV	CVB	INSV	PVX	TAV	TSWV	CSVd	CChMVd
금방울 1								+	+

+: 국화 감염 바이러스 및 바이로이드 정밀진단기술을 사용하여 검정된 식물체.

국화 순화단계에서 확보한 50개 시료들에서 바이러스 및 바이로이드 복합감염을 분석하였음. 그 결과 50개체 중 1개체에서 CSVd와 CChMV가 복합감염된 것으로 분석되었음[표 5].



<그림 52> 국화 순화단계에서의 품종별 바이러스 검정률.

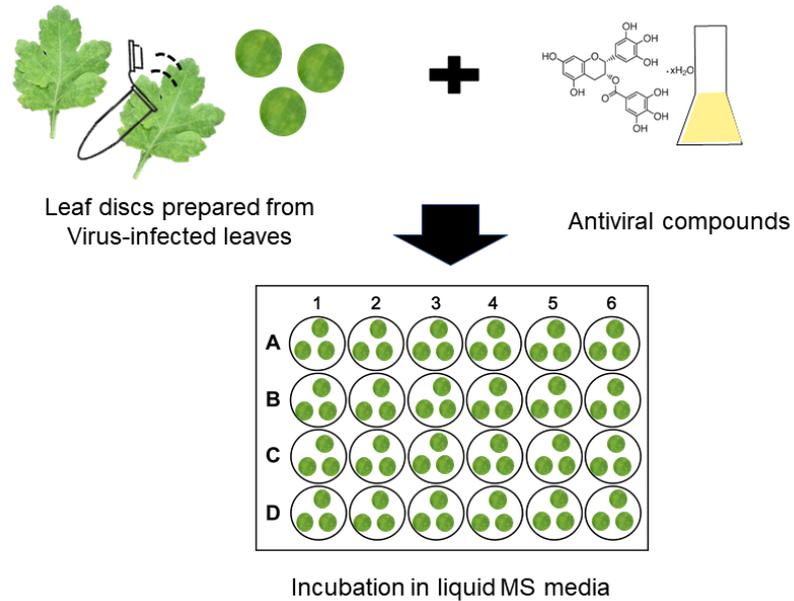
국화 순화단계에서의 품종별 바이러스 검정은 SP17-425 4개체 중 1개체 (25%), SP17-681 4개체 중 3개체 (75%), SP19-138 4개체 중 0개체 (0%), 금방울 4개체 중 2개체 (50%), 락스 1개체 중 0개체 (0%), 러블리살몬 5개체 중 1개체 (20%), 레드볼 2개체 중 0개체 (0%), 루비 1개체 중 1개체 (100%), 보라미 1개체 중 1개체 (100%), 본본다크 2개체 중 0개체 (0%), 볼카레드 5개체 중 0개체 (0%), 스마일볼 4개체 중 0개체 (0%), 파이어핑크 1개체 중 0개체 (0%), 포드 1개체 중 1개체 (100%), 핑크원더 8개체 중 5개체 (62.5%), 홀릭 1개체 중 0개체 (0%), 화이트캡 2개체 중 0개체 (0%)였음<그림 52>.

국화 17품종을 같은 환경조건에서 배양했을 때, 9종 품종들(SP19-138, 락스, 레드볼, 본본다크, 볼카레드, 스마일볼, 파이어핑크, 홀릭, 화이트캡)이 상대적으로 7종의 바이러스들과 2종의 바이로이드들에 감염되지 않은 것으로 분석되었음. 따라서 국화 무병묘를 생산할 때 위의 9품종을 선택하여 사용하면 바이러스 및 바이로이드 감염률을 낮출 것으로 사료됨.

결과적으로 국화 생산단계에서 바이러스 무병묘 생산을 위해 13종 품종들 (떨키스타, 코랄킹, 엘도라, 금수, SSP19-138, 락스, 레드볼, 본본다크, 볼카레드, 스마일볼, 파이어핑크, 홀릭, 화이트캡)이 좀 더 적합할 것으로 사료되며, 바이러스 및 바이로이드에 대한 저항성을 확인하기 위해 좀

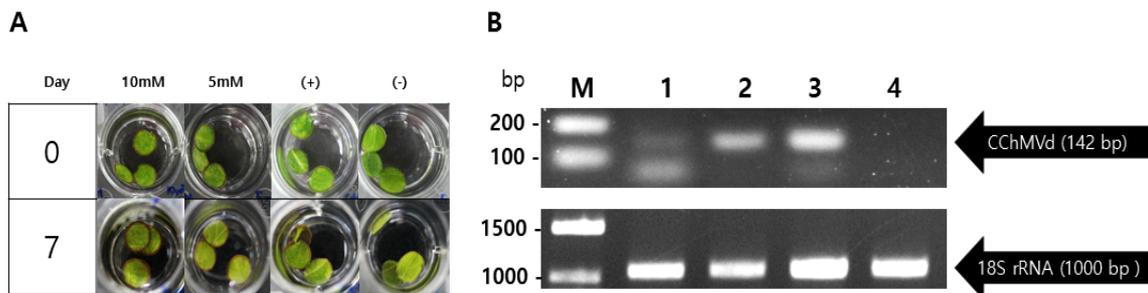
더 많은 개체를 대상으로 검정하여 결과를 보완할 필요가 있음.

#### 4) 무병묘 생산 단계에서 적용될 수 있는 항바이러스 후보 물질 효과 분석



<그림 53> 바이러스(바이로이드)에 대한 항바이러스 물질 효율 검정을 위한 검정 시스템 [연구진이 보유한 특허 제10-1372363].

무병묘 생산단계에서 적용할 수 있는 효과적인 항바이러스 후보 물질들을 탐색하고자 연구진이 보유한 항바이러스 물질 검정 시스템을 사용하였음<그림 53>. 총 5개의 식물유래 후보 물질들을 대상으로 실험을 수행하였고, 그 결과 한 개의 식물유래 항바이러스 후보 물질에서 바이러스 발현 억제 효과를 보이는 것을 확인하였음.



<그림 54> 국화 감염 바이로이드(CChMVd)를 대상으로 항바이러스 후보 물질 효과 검정. A. CChMVd 감염된 국화 잎에서 discs를 확보한 후, 항바이러스 후보 물질을 처리하여 7일까지 관찰한 모습. +, 항바이러스 후보 물질이 처리되지 않은 CChMVd에 감염된 국화; -, 건전 국화. B. 항바이러스 후보 물질을 처리한 leaf discs에서 total RNA를 분리하여 RT-PCR을 수행한 결과. M, 1 kb plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA); lane 1, 10 mM 항바이러스 후보 물질; lane 2, 5 mM 항바이러스 후보 물질; lane 3, 항바이러스 후보 물질이 처리되지 않은 CChMVd에 감염된 국화; lane 4, 건전 국화.

CChMVd에 감염된 국화 잎 discs를 항바이러스 후보 물질에 7일 동안 처리한 후, 항바이러스 효과를 검정하였음<그림 54-A>. CChMVd에 대한 항바이러스 후보 물질에 효과를 검정하기 위해 항바이러스 후보 물질을 처리한 잎 discs로부터 total RNA를 분리한 후, RT-PCR를 수행하였음. 이때 분석의 신뢰도를 높이기 위해 18S rRNA를 목표하는 프라이머와 함께 사용하여 분석하였음. 그 결과, 식물

유래 항바이러스 후보 물질 10 mM에서 CChMVd 목표 DNA 단편 크기가 양성대조군과 비교하여 현저하게 낮게 증폭된 것으로 확인할 수 있었음<그림 54-B>. 따라서 이 항바이러스 후보 물질은 성장점 배양시 함께 사용하면 CChMVd 물질을 제거하는 데 도움을 줄 것으로 사료됨.

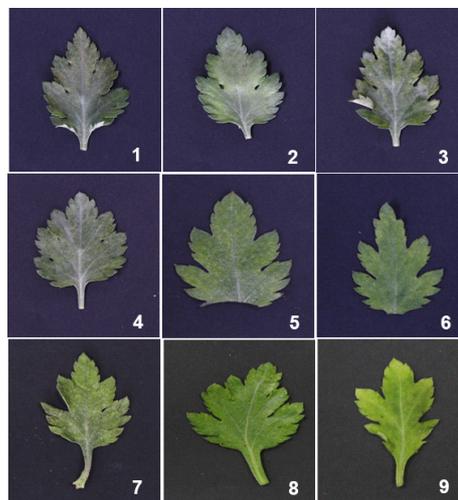
### <3차년도>

본 연구는 무병묘 생산을 위한 성장점 배양으로 성장시킨 조직배양묘에서 바이러스 및 바이로이드 감염률을 분석하여, 2차년도에서 검정된 바이러스 및 바이로이드 감염률과 비교분석하였음. 또한, 주요 바이러스 및 바이로이드에 대한 qPCR 정밀진단기술을 개발하였고, 개발된 기술을 활용하여 확보된 항바이러스 물질을 처리한 백합 및 국화에서 항바이러스 효과를 검정하였음. 연구 결과를 기초하여 무병묘 생산을 위한 항바이러스 적용 새로운 효율적인 방안을 제시하였음.

#### 1) 국화 시료에서 정밀진단기술을 사용하여 검정결과

##### 가) 국화 조직배양묘에서 병징 모습 관찰

제2협동(충남농업기술원 화훼연구소)에서 수행 중인 무병묘 국화 생산연구에서 확보한 국화 조직배양묘에서 54개체 시료를 수집하였고, 그 중에서 황화, 괴사 반점, 잎의 기형이 보였음<그림 55>.

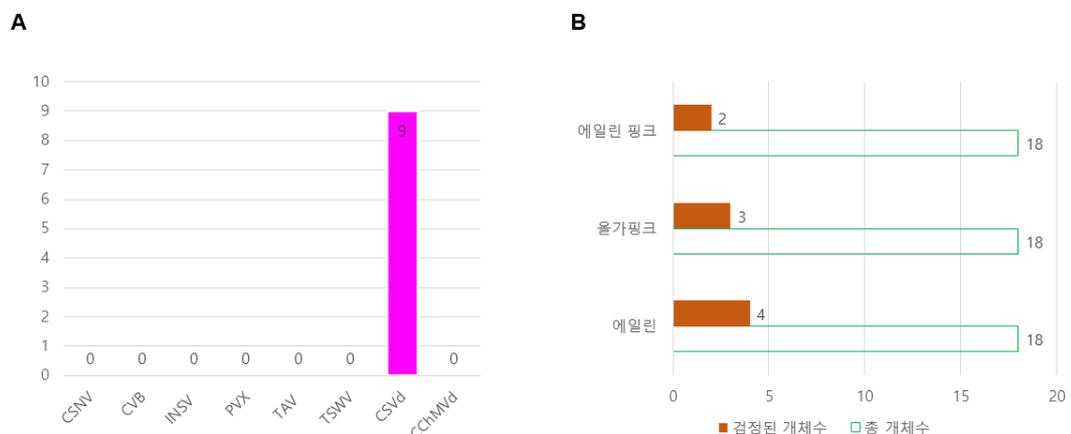


<그림 55> 국화 무병묘 조직배양묘에서의 병징 시료. 1~4: 에이린, 5~7: 울가핑크, 8~9: 에일린.

##### 나) 국화 감염 바이러스 및 바이로이드 정밀진단기술 검정 결과

□ 국화 조직배양묘에서 바이러스 및 바이로이드 검정 결과

국화 조직배양묘 54개체 시료들을 대상으로 국화 감염 바이러스 및 바이로이드 정밀검정진단기술을 활용하여 7종의 바이러스들과 2종의 바이로이드들을 검정하였음.



<그림 56> 국화 조직배양묘에서 바이러스 및 바이로이드 검정 결과. A, 바이러스 및 바이로이드 중

류별 검정 결과. B, 국화 품종별 바이러스 및 바이로이드 검정 결과.

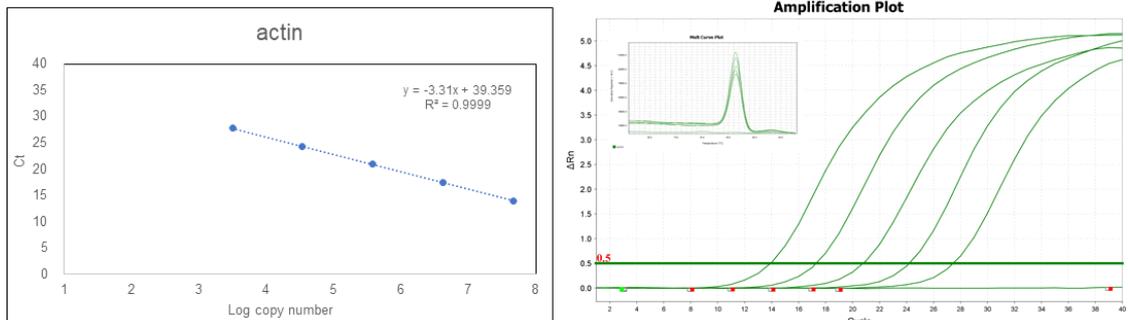
그 결과 CSVd만 9개체에서 목표 DNA 단편 증폭 크기가 검정이 되었으며, 증폭된 DNA 단편을 클로닝하여 염기서열을 분석하였음. CSVd는 에일린, 올라핑크, 에일린 핑크에서 모두 검정되었음 <그림 56>. 또한, 품종별 CSVd 감염률은 에일린 핑크 18개체 중 2개체(11.11%), 올라핑크 18개체 중 3개체(16.67%), 에일린 18개체 중 4개체(22.22%)였음<그림 56-B>.

2년차에 수집한 국화 배양묘에서는 2개의 바이러스(TAV, CVB)와 2개의 바이로이드(CSVd, CChMVd)가 검정되었으나, 3년차에 수집한 국화 배양묘에서는 오직 CSVd만 검정되었음. 또한, 전체 감염률이 35%(2022년 국화 감염률)에서 16.7%(2023년 국화 감염률)로 낮아지는 모습을 보였음. 이러한 결과는 국화 무병묘 생산을 위해 원원종 및 원종에 정밀진단기술을 적용하여 좀 더 바이러스가 감염되지 않은 원원종 및 원종을 확보하고, 단계적인 항바이러스 처리 기술을 활용하여 나타난 것으로 추측됨.

## 2) 백합 및 국화 감염 바이러스 정밀진단기술(qPCR) 개발

백합 및 국화 감염 바이러스 정밀진단기술(qPCR)은 국내 백합에서 주요 감염되는 바이러스들 중 3종의 바이러스들(CMV, LMoV, LSV)과 국화에서 주요 감염되는 2종의 바이로이드들(CChMVd, CSVd)를 대상으로 개발하였음. 제작된 qPCR용 프라이머는 2차년도에 제작된 정밀진단기술을 기초하여 가장 염기서열 상동성이 높은 부위와 민감도가 좋은 부위를 선택하여 제작하였음. 제작된 qPCR용 프라이머의 효율성과 정확도를 확인하기 위해 melt curve와 절대정량 standard curve로 분석하였음. 또한, reference gene에 대한 qPCR용 프라이머 제작과 그 프라이머의 효율성과 정확도를 확인하기 위해 melt curve와 절대정량 standard curve로 분석하였음.

### 가) 백합 및 국화 감염 바이러스 정밀진단기술(qPCR)에 사용될 reference gene 개발



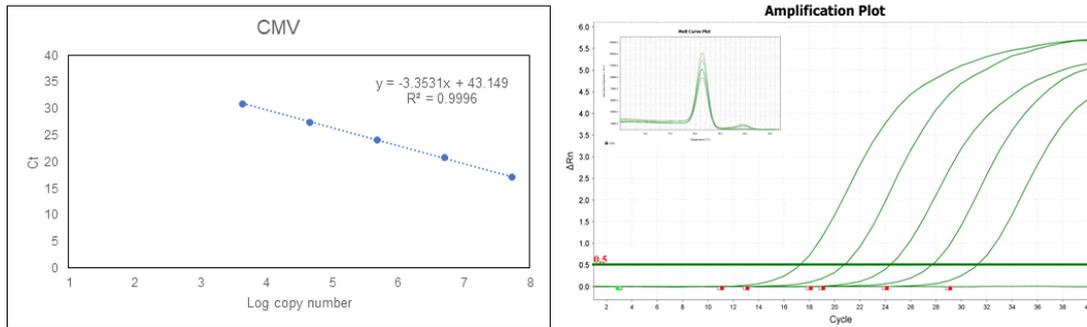
<그림 57> 백합 및 국화 감염 바이러스 정밀진단기술(qPCR)에 사용될 referenc gene( $\beta$ -actin)에 대한 절대정량 standard curve와 melt curve 분석.

백합 및 국화 감염 바이러스 정밀진단기술(qPCR)에 함께 사용되기 위한 reference gene(18S rRNA, GAPDH,  $\beta$ -actin 등)들을 조사하였고, 그 중  $\beta$ -actin이 가장 안정적으로 증폭되어 선택하였음. 선택된  $\beta$ -actin을 대상으로 plasmid DNA를 제작하고, 제작된 plasmid DNA로 10배 단계 희석법(10-fold serial dilution)으로 절대정량 standard curve를 분석하였음. 그 결과 한 개의 melt curve를 나타내며, standard curve의 기울기는  $-3.31(R^2=0.9999)$ 로 분석되었음<그림 57>.

### 나) 백합 및 국화 감염 바이러스 정밀진단기술(qPCR) 개발

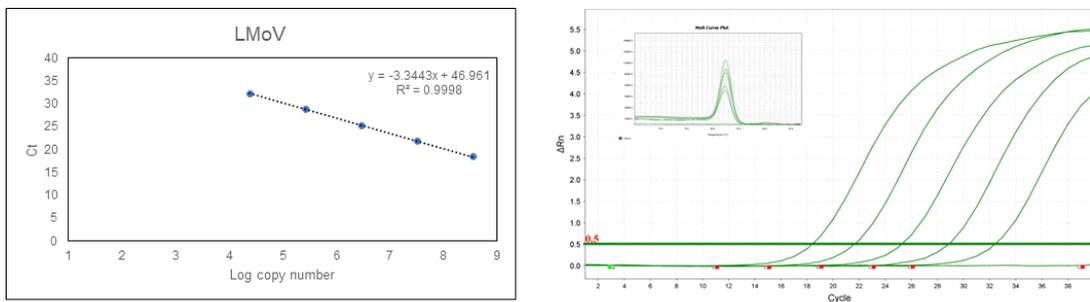
백합 및 국화에 감염되는 CMV에 대한 정밀진단기술(qPCR)을 개발하기위해 선행연구된 CMV 프라이머의 위치를 확인하고, CMV strains/isolates들의 가장 상동성이 높은 부위와 민감도가 좋은 부위를 선택하여 qPCR 프라이머를 제작하였음. 프라이머가 증폭될 수 있는 CMV 유전자를 대상으로 plasmid DNA를 제작하고, 제작된 plasmid DNA로 10배 단계 희석법(10-fold serial dilution)으

로 절대정량 standard curve를 분석하였음. 그 결과 한 개의 melt curve를 나타내며, standard curve의 기울기는  $-3.3531(R^2=0.9996)$ 로 분석되었음<그림 58>.



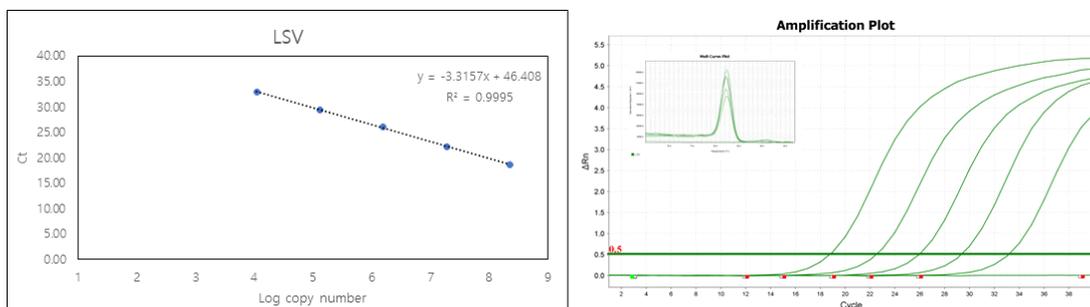
<그림 58> 백합 및 국화 감염 바이러스 정밀진단기술(qPCR)에 사용될 CMV에 대한 절대정량 standard curve와 melt curve 분석.

#### 다) 백합 감염 바이러스 정밀진단기술(qPCR) 개발



<그림 59> 백합 감염 바이로이드 정밀진단기술(qPCR)에 사용될 LMoV에 대한 절대정량 standard curve와 melt curve 분석.

백합에 주요 감염되는 LMoV에 대한 정밀진단기술(qPCR)을 개발하기위해 선행연구된 LMoV 프라이머의 위치를 확인하고, LMoV strains/isolates들의 가장 상동성이 높은 부위와 민감도가 좋은 부위를 선택하여 qPCR 프라이머를 제작하였음. 프라이머가 증폭될 수 있는 LMoV 유전자를 대상으로 plasmid DNA를 제작하고, 제작된 plasmid DNA로 10배 단계 희석법(10-fold serial dilution)으로 절대정량 standard curve를 분석하였음. 그 결과 한 개의 melt curve를 나타내며, standard curve의 기울기는  $-3.3443(R^2=0.9998)$ 로 분석되었음<그림 59>.

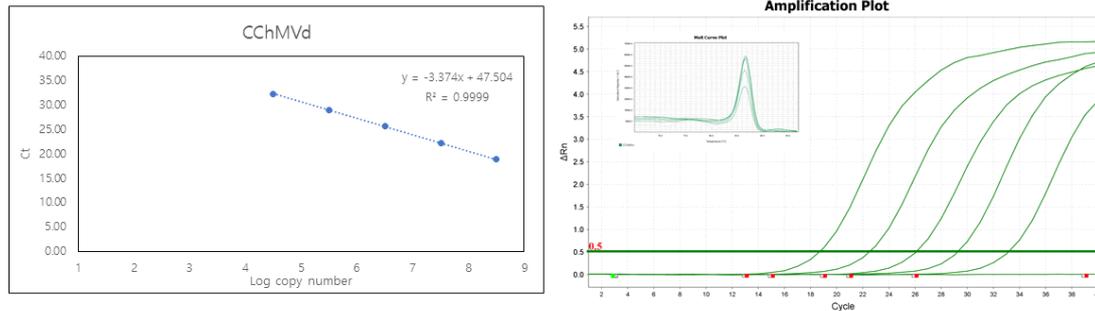


<그림 60> 백합 감염 바이러스 정밀진단기술(qPCR)에 사용될 LSV에 대한 절대정량 standard curve와 melt curve 분석.

백합에 주요 감염되는 LSV에 대한 정밀진단기술(qPCR)을 개발하기위해 선행연구된 LSV 프라이머의 위치를 확인하고, LSV strains/isolates들의 가장 상동성이 높은 부위와 민감도가 좋은 부위를

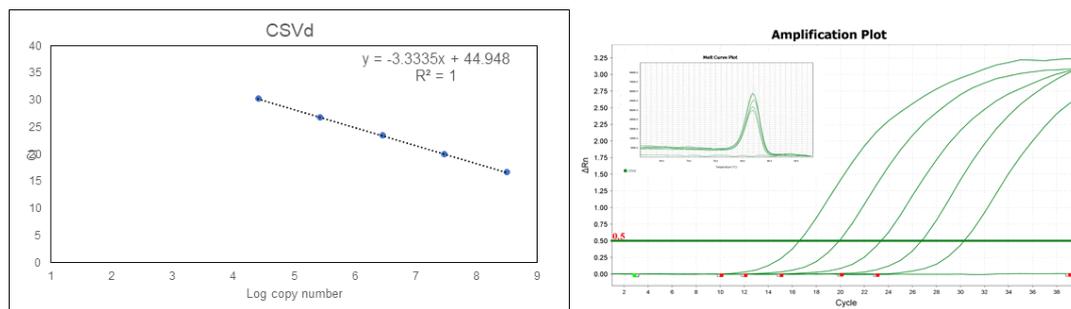
선택하여 qPCR 프라이머를 제작하였음. 프라이머가 증폭될 수 있는 LSV 유전자를 대상으로 plasmid DNA를 제작하고, 제작된 plasmid DNA로 10배 단계 희석법(10-fold serial dilution)으로 절대정량 standard curve를 분석하였음. 그 결과 한 개의 melt curve를 나타내며, standard curve의 기울기는  $-3.3157(R^2=0.9995)$ 로 분석되었음<그림 60>.

## 라) 국화 감염 바이로이드 정밀진단기술(qPCR) 개발



<그림 61> 국화 감염 바이로이드 정밀진단기술(qPCR)에 사용될 CChMVd에 대한 절대정량 standard curve와 melt curve 분석.

국화에 주요 감염되는 CChMVd에 대한 정밀진단기술(qPCR)을 개발하기위해 선행연구된 CChMVd 프라이머의 위치를 확인하고, CChMVd strains/isolates들의 가장 상동성이 높은 부위와 민감도가 좋은 부위를 선택하여 qPCR 프라이머를 제작하였음. 프라이머가 증폭될 수 있는 CChMVd 유전자를 대상으로 plasmid DNA를 제작하고, 제작된 plasmid DNA로 10배 단계 희석법(10-fold serial dilution)으로 절대정량 standard curve를 분석하였음. 그 결과 한 개의 melt curve를 나타내며, standard curve의 기울기는  $-3.3374(R^2=0.9999)$ 로 분석되었음<그림 61>.



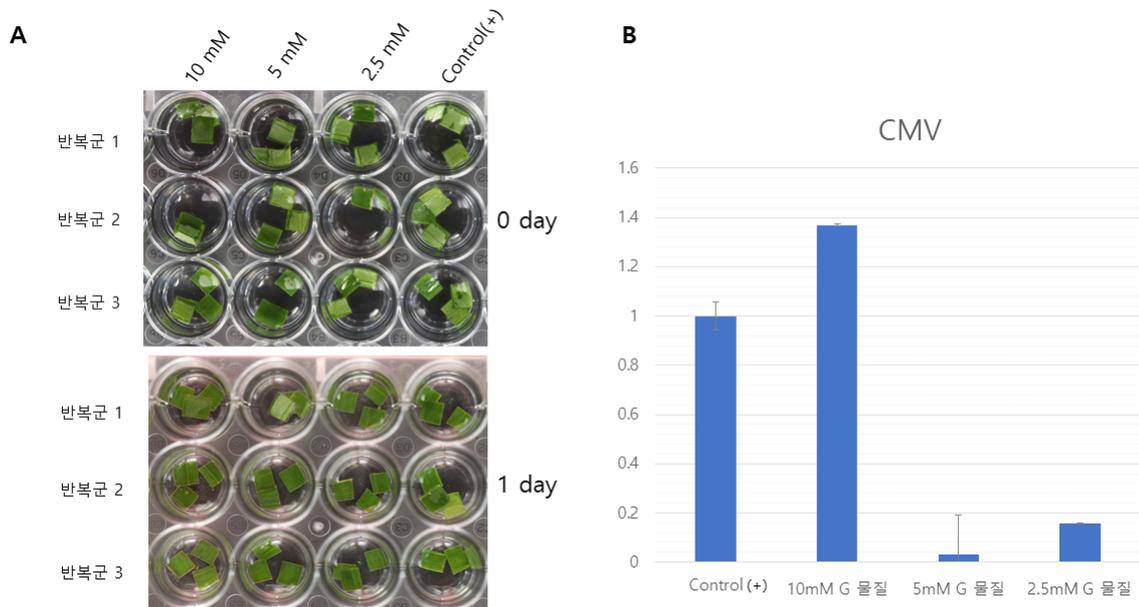
<그림 62> 국화 감염 바이로이드 정밀진단기술(qPCR)에 사용될 CSVd에 대한 절대정량 standard curve와 melt curve 분석.

국화에 주요 감염되는 CSVd에 대한 정밀진단기술(qPCR)을 개발하기위해 선행연구된 CSVd 프라이머의 위치를 확인하고, CChMVd strains/isolates들의 가장 상동성이 높은 부위와 민감도가 좋은 부위를 선택하여 qPCR 프라이머를 제작하였음. 프라이머가 증폭될 수 있는 CSVd 유전자를 대상으로 plasmid DNA를 제작하고, 제작된 plasmid DNA로 10배 단계 희석법(10-fold serial dilution)으로 절대정량 standard curve를 분석하였음. 그 결과 한 개의 melt curve를 나타내며, standard curve의 기울기는  $-3.3335(R^2=1)$ 로 분석되었음<그림 61>.

정밀진단기술(qPCR)은 항바이러스 후보 물질의 효과를 정량으로 검정하기 위해 개발되었으며, 향후 백합 및 국화 무병묘 생산으로 위한 바이러스(바이로이드) 조기 검정에 활용될 수 있을 것으로 사료됨.

### 3) 무병묘 생산 단계에서 적용될 수 있는 항바이러스 후보 물질 효과 분석

무병묘 생산 단계에서 적용할 수 있는 효과적인 항바이러스 후보 물질을 탐색하고자 연구진이 보유한 항바이러스 물질 검정 시스템[연구진이 보유한 특허 제10-1372363]을 사용하여 그 효과를 검정하였음. 항바이러스 효과를 정량 검정으로 분석하기 위해 개발된 qPCR 정밀진단기술을 사용하였으며, 식물체 안에서  $\beta$ -actin(reference gene)의 발현량을 기준으로 감염된 바이러스 발현량을 상대정량법(relative standard curve method)으로 분석하였음. 항바이러스 후보 물질에 대한 효과를 검정을 위해 백합에서는 주요 감염되는 3종의 바이러스들(CMV, LMoV, LSV)를 중심으로 분석하였으며, 국화에서는 2종의 바이로이드들(CChMVd, CSVd)을 대상으로 분석하였음.



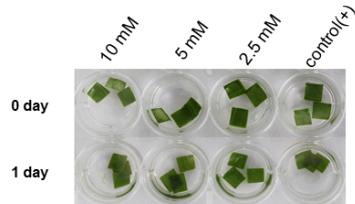
<그림 63> 백합에 감염된 CMV를 대상으로 항바이러스 후보 물질(G) 효과 검정. A. CMV 감염된 백합 잎을 0.5 cmX0.5 cm 크기로 확보한 후, 항바이러스 후보 물질(G)을 24시간 처리한 모습. control(+): 항바이러스 후보 물질(G)를 처리하지 않은 CMV 감염된 백합 잎. B. 항바이러스 후보 물질(G)를 처리한 0.5 cmX0.5 cm 크기의 잎 부위에서 total RNA를 분리한 후, qPCR을 수행한 결과. control(+): 항바이러스 후보 물질(G)를 처리하지 않은 CMV 감염된 백합 잎.

백합에 감염된 CMV에 항바이러스 후보 물질(G)의 농도별 효과를 검정하기 위해 CMV에 감염된 백합 잎 부위(0.5 cmX0.5 cm)에 항바이러스 후보 물질(G)를 각각 2.5, 5, 10 mM로 24시간 처리한 후, total RNA를 분리하여 qPCR 상대정량법(relative standard curve method)을 사용하여 그 효과를 분석하였음<그림 63>. 그 결과, 항바이러스 후보 물질(G)를 처리하지 않은 CMV 감염된 백합 잎에서의 검정된 CMV 검출량을 기준으로 2.5 mM 항바이러스 후보 물질(G)를 처리한 백합 잎에서 CMV 검출량은 약 15.7%, 5 mM 항바이러스 후보 물질(G)를 처리한 백합 잎에서 CMV 검출량은 약 3.2%로 낮게 나왔음. 그러나 10 mM 항바이러스 후보 물질(G)를 처리한 백합 잎에서 CMV 검출량은 약 136.9%로 높게 나왔음. 따라서 항바이러스 후보 물질(G)은 백합에 감염된 CMV에 항바이러스 효과를 나타내며, 특히 5 mM 농도에서 가장 높은 항바이러스 효과를 가지는 것으로 분석되었음.

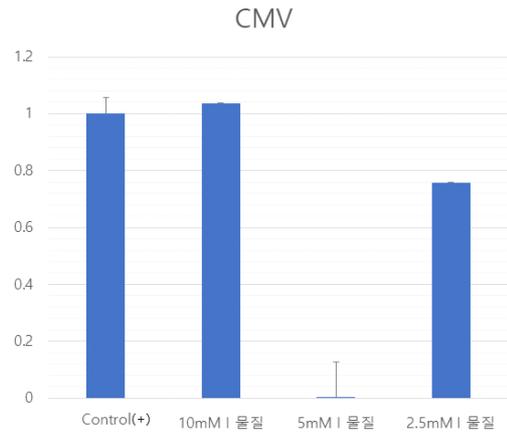
백합에 감염된 CMV에 항바이러스 후보 물질(I)의 농도별 효과를 검정하기 위해 CMV에 감염된 백합 잎 부위(0.5 cmX0.5 cm)에 항바이러스 후보 물질(I)를 각각 2.5, 5, 10 mM로 24시간 처리한 후, total RNA를 분리하여 qPCR 상대정량법(relative standard curve method)을 사용하여 그 효과를 분석하였음<그림 64>. 그 결과, 항바이러스 후보 물질(I)를 처리하지 않은 CMV 감염된 백합 잎에서의 검정된 CMV 검출량을 기준으로 2.5 mM 항바이러스 후보 물질(I)를 처리한 백합 잎에서

CMV 검출량은 약 76.0%로 낮게 나왔고, 5 mM 항바이러스 후보 물질(I)를 처리한 백합 잎에서 CMV가 검출되지 않았음. 그러나 10 mM 항바이러스 후보 물질(I)를 처리한 백합 잎에서 CMV 검출량은 약 104.0%로 높게 나왔음. 따라서 항바이러스 후보 물질(I)은 백합에 감염된 CMV에 항바이러스 효과를 나타내며, 특히 5 mM 농도에서는 CMV가 검출되지 않는 매우 좋은 항바이러스 효과를 나타내었음.

**A**



**B**

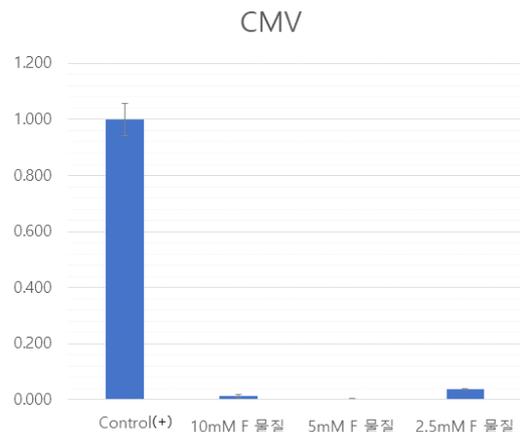


<그림 64> 백합에 감염된 CMV를 대상으로 항바이러스 후보 물질(I) 효과 검정. A. CMV 감염된 백합 잎을 0.5 cmX0.5 cm 크기로 확보한 후, 항바이러스 후보 물질(I)을 24시간 처리한 모습. control(+): 항바이러스 후보 물질(I)을 처리하지 않은 CMV 감염된 백합 잎. B. 항바이러스 후보 물질(I)을 처리한 0.5 cmX0.5 cm 크기의 잎 부위에서 total RNA를 분리한 후, qPCR을 수행한 결과. control(+): 항바이러스 후보 물질(I)을 처리하지 않은 CMV 감염된 백합 잎.

**A**



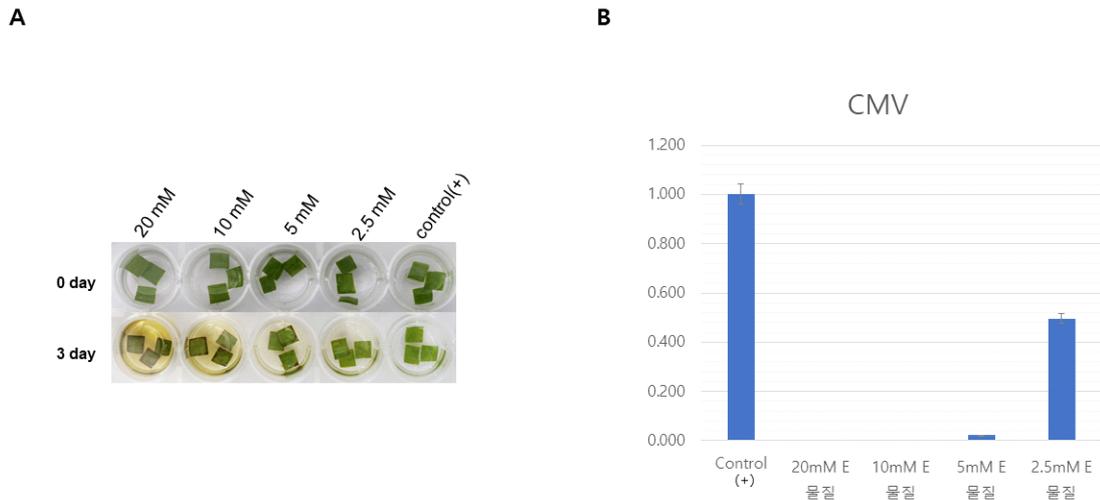
**B**



<그림 65> 백합에 감염된 CMV를 대상으로 항바이러스 후보 물질(F) 효과 검정. A. CMV 감염된 백합 잎을 0.5 cmX0.5 cm 크기로 확보한 후, 항바이러스 후보 물질(F)을 24시간 처리한 모습. control(+): 항바이러스 후보 물질(F)을 처리하지 않은 CMV 감염된 백합 잎. B. 항바이러스 후보 물질(F)을 처리한 0.5 cmX0.5 cm 크기의 잎 부위에서 total RNA를 분리한 후, qPCR을 수행한 결과. control(+): 항바이러스 후보 물질(F)을 처리하지 않은 CMV 감염된 백합 잎.

백합에 감염된 CMV에 항바이러스 후보 물질(F)의 농도별 효과를 검정하기 위해 CMV에 감염된 백합 잎 부위(0.5 cmX0.5 cm)에 항바이러스 후보 물질(F)를 각각 2.5, 5, 10 mM로 24시간 처리한 후, total RNA를 분리하여 qPCR 상대정량법(relative standard curve method)을 사용하여 그 효

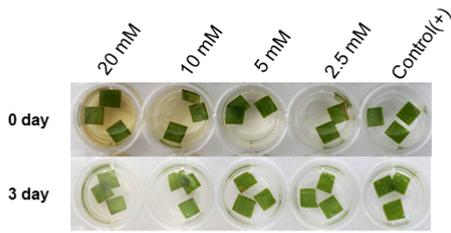
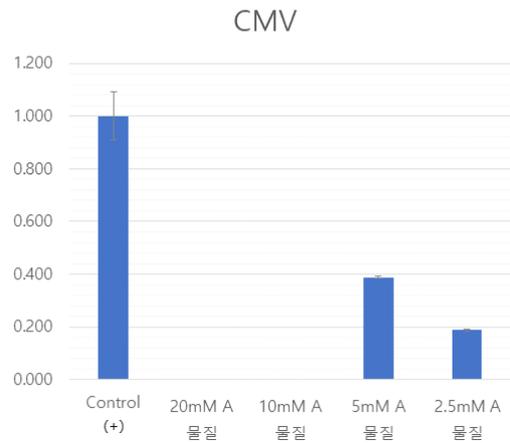
과를 분석하였음<그림 65>. 그 결과, 항바이러스 후보 물질(F)를 처리하지 CMV 감염된 백합 잎에서의 검정된 CMV 검출량을 기준으로 2.5 mM 항바이러스 후보 물질(F)를 처리한 백합 잎에서 CMV 검출량은 약 3.8%, 5 mM 항바이러스 후보 물질(F)를 처리한 백합 잎에서 CMV 검출량은 약 0.4%로 낮게 나왔음. 10 mM 항바이러스 후보 물질(F)를 처리한 백합 잎에서 CMV 검출량은 약 1.4%로 낮게 나왔음. 따라서 항바이러스 후보 물질(F)은 백합에 감염된 CMV에 항바이러스 효과를 나타내며, 특히 5 mM 농도에서 가장 높은 항바이러스 효과를 가지는 것으로 분석되었음.



<그림 66> 백합에 감염된 CMV를 대상으로 항바이러스 후보 물질(E) 효과 검정. A. CMV 감염된 백합 잎을 0.5 cmX0.5 cm 크기로 확보한 후, 항바이러스 후보 물질(E)을 72시간 처리한 모습. control(+): 항바이러스 후보 물질(E)를 처리하지 않은 CMV 감염된 백합 잎. B. 항바이러스 후보 물질(E)를 처리한 0.5 cmX0.5 cm 크기의 잎 부위에서 total RNA를 분리한 후, qPCR을 수행한 결과. control(+): 항바이러스 후보 물질(E)를 처리하지 않은 CMV 감염된 백합 잎.

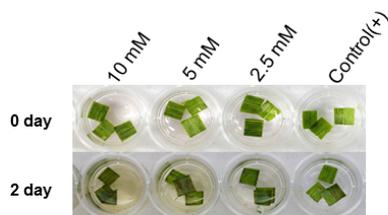
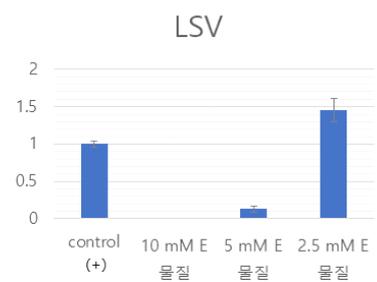
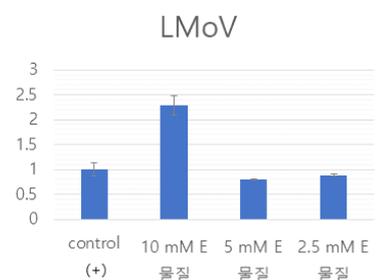
백합에 감염된 CMV에 항바이러스 후보 물질(E)의 농도별 효과를 검정하기 위해 CMV에 감염된 백합 잎 부위(0.5 cmX0.5 cm)에 항바이러스 후보 물질(E)를 각각 2.5, 5, 10, 20 mM로 72시간 처리한 후, total RNA를 분리하여 qPCR 상대정량법(relative standard curve method)을 사용하여 그 효과를 분석하였음<그림 66>. 그 결과, 항바이러스 후보 물질(E)를 처리하지 CMV 감염된 백합 잎에서의 검정된 CMV 검출량을 기준으로 2.5 mM 항바이러스 후보 물질(E)를 처리한 백합 잎에서 CMV 검출량은 약 49.6%, 5 mM 항바이러스 후보 물질(E)를 처리한 백합 잎에서 CMV 검출량은 약 2.3%로 낮게 나왔음. 10 mM 항바이러스 후보 물질(E)를 처리한 백합 잎에서 CMV가 검출되지 않았으며, 20 mM 항바이러스 후보 물질(E)를 처리한 백합 잎에서 CMV 검출량은 약 0.1%로 낮게 나왔음. 따라서 항바이러스 후보 물질(E)은 백합에 감염된 CMV에 항바이러스 효과를 나타내며, 특히 10 mM 농도에서는 CMV가 검출되지 않는 매우 좋은 항바이러스 효과를 나타내었음.

백합에 감염된 CMV에 항바이러스 후보 물질(A)의 농도별 효과를 검정하기 위해 CMV에 감염된 백합 잎 부위(0.5 cmX0.5 cm)에 항바이러스 후보 물질(A)를 각각 2.5, 5, 10, 20 mM로 72시간 처리한 후, total RNA를 분리하여 qPCR 상대정량법(relative standard curve method)을 사용하여 그 효과를 분석하였음<그림 67>. 그 결과, 항바이러스 후보 물질(A)를 처리하지 CMV 감염된 백합 잎에서의 검정된 CMV 검출량을 기준으로 2.5 mM 항바이러스 후보 물질(A)를 처리한 백합 잎에서 CMV 검출량은 약 18.7%, 5 mM 항바이러스 후보 물질(A)를 처리한 백합 잎에서 CMV 검출량은 약 38.8%로 낮게 나왔음. 10 mM과 20 mM 항바이러스 후보 물질(A)를 처리한 백합 잎에서 CMV가 모두 검출되지 않았음. 따라서 항바이러스 후보 물질(A)은 백합에 감염된 CMV에 항바이러스 효과를 나타내며, 특히 10, 20 mM 농도에서는 CMV가 검출되지 않는 매우 좋은 항바이러스 효과를 나타내었음.

**A****B**

<그림 67> 백합에 감염된 CMV를 대상으로 항바이러스 후보 물질(A) 효과 검정. A. CMV 감염된 백합 잎을 0.5 cmX0.5 cm 크기로 확보한 후, 항바이러스 후보 물질(A)을 72시간 처리한 모습. control(+): 항바이러스 후보 물질(A)를 처리하지 않은 CMV 감염된 백합 잎. B. 항바이러스 후보 물질(A)를 처리한 0.5 cmX0.5 cm 크기의 잎 부위에서 total RNA를 분리한 후, qPCR을 수행한 결과. control(+): 항바이러스 후보 물질(A)를 처리하지 않은 CMV 감염된 백합 잎.

백합에 감염된 CMV에 대한 항바이러스 효과는 항바이러스 후보 물질 5종류(A, E, F, G, I) 모두 나타내고 있으나, 물질 종류에 따라 효과 농도는 차이가 있는 것으로 분석되었음. 항바이러스 후보 물질 A와 E는 10과 20 mM에서 가장 항바이러스 효과를 보이는 것으로 분석되었으나, 20 mM에서는 식물잎이 갈변되는 현상이 보였음. 항바이러스 후보물질 F, G, I는 5 mM에서 가장 항바이러스 효과를 보이는 것으로 분석되었음. 항바이러스 후보 물질의 농도는 20 mM 이상일 경우 식물체 생육에 영향을 줄 수 있기 때문에 이후 실험에서는 10 mM 농도를 가장 높은 농도로 선택하여 항바이러스 효과를 검정하였음.

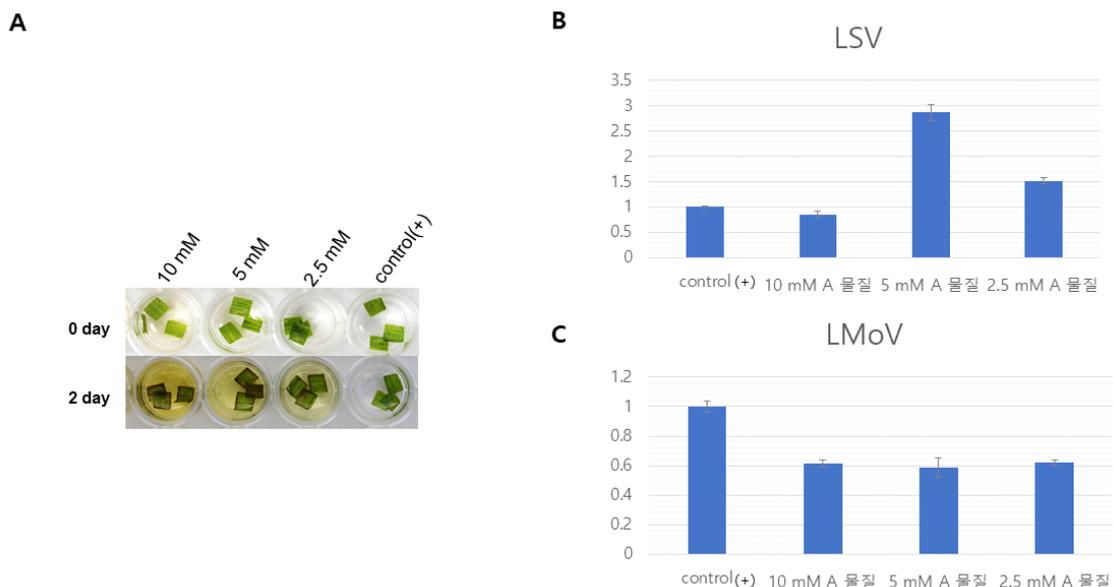
**A****B****C**

<그림 68> 백합에 감염된 LSV와 LMoV를 대상으로 항바이러스 후보 물질(E) 효과 검정. A. LSV와 LMoV가 복합 감염된 백합 잎을 0.5 cmX0.5 cm 크기로 확보한 후, 항바이러스 후보 물질(E)을 48시간 처리한 모습. control(+): 항바이러스 후보 물질(E)를 처리하지 않은 LSV 감염된 백합 잎.

B. 항바이러스 후보 물질(E)를 처리한 0.5 cmX0.5 cm 크기의 잎 부위에서 total RNA를 분리한 후, LSV를 검정하기 위한 qPCR을 수행한 결과. control(+): 항바이러스 후보 물질(E)를 처리하지 않은 LSV와 LMoV에 복합 감염된 백합 잎. C. 항바이러스 후보 물질(E)를 처리한 0.5 cmX0.5 cm 크기의 잎 부위에서 total RNA를 분리한 후, LMoV를 검정하기 위한 qPCR을 수행한 결과. control(+): 항바이러스 후보 물질(E)를 처리하지 않은 LSV와 LMoV에 복합 감염된 백합 잎.

백합에 감염된 LSV와 LMoV를 항바이러스 후보 물질(E)의 농도별 효과를 검정하기 위해 LSV와 LMoV에 복합 감염된 백합 잎 부위(0.5 cmX0.5 cm)에 항바이러스 후보 물질(E)를 각각 2.5, 5, 10 mM로 48시간 처리한 후, total RNA를 분리하여 qPCR 상대정량법(relative standard curve method)을 사용하여 그 효과를 분석하였음<그림 68>. 그 결과, 항바이러스 후보 물질(E)를 처리하지 LSV와 LMoV에 복합 감염된 백합 잎에서의 검정된 LSV 검출량을 기준으로 5 mM 항바이러스 후보 물질(E)를 처리한 백합 잎에서 LSV 검출량은 약 13.0%, 10 mM 항바이러스 후보 물질(E)를 처리한 백합 잎에서 LSV 검출량은 약 0.8%로 낮게 나왔음. 그러나 2.5 mM 항바이러스 후보 물질(E)를 처리한 백합 잎에서 LSV 검출량은 약 145.4%로 높게 나왔음. 따라서 항바이러스 후보 물질(E)은 백합에 감염된 LSV에 항바이러스 효과를 나타내며, 특히 10 mM 농도에서 항바이러스 효과가 높은 것으로 분석되었음.

항바이러스 후보 물질(E)를 처리하지 LSV와 LMoV에 복합 감염된 백합 잎에서의 검정된 LMoV 검출량을 기준으로 항바이러스 후보 물질(F)의 처리농도에 따른 백합 잎에서 LMoV 검출량은 2.5 mM에서는 88.7%, 5 mM에서는 약 79.1%, 10 mM에서는 약 228.0%로 나왔음. 따라서 항바이러스 후보 물질(E)은 백합에 감염된 LSV에 항바이러스 효과가 약하게 나타내며, 특히 10 mM 농도에서 항바이러스 효과가 없는 것으로 분석되었음. 또한, 이러한 결과들은 항바이러스 후보 물질(E)이 백합에 감염된 2종의 바이러스(LSV, LMoV) 중 LSV에 항바이러스 효과를 나타낸다고 분석될 수 있음.

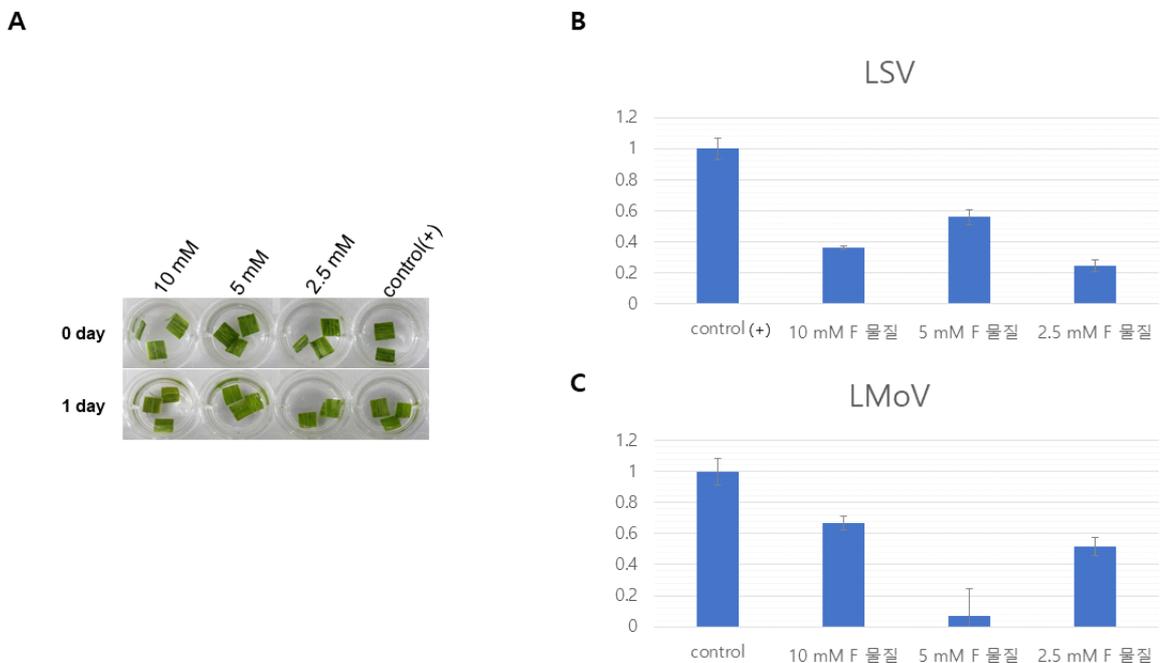


<그림 69> 백합에 감염된 LSV와 LMoV를 대상으로 항바이러스 후보 물질(A) 효과 검정. A. LSV와 LMoV가 복합 감염된 백합 잎을 0.5 cmX0.5 cm 크기로 확보한 후, 항바이러스 후보 물질(E)을 48시간 처리한 모습. control(+): 항바이러스 후보 물질(A)를 처리하지 않은 LSV와 LMoV에 복합 감염된 백합 잎. B. 항바이러스 후보 물질(A)를 처리한 0.5 cmX0.5 cm 크기의 잎 부위에서 total RNA를 분리한 후, LSV를 검정하기 위한 qPCR을 수행한 결과. control(+): 항바이러스 후보 물질(A)를 처리하지 않은 LSV와 LMoV에 복합 감염된 백합 잎. C. 항바이러스 후보 물질(A)를 처리한 0.5 cmX0.5 cm 크기의 잎 부위에서 total RNA를 분리한 후, LMoV를 검정하기 위한 qPCR을 수행한 결과. control(+): 항바이러스 후보 물질(A)를 처리하지 않은 LSV와 LMoV에 복합 감염된 백합

있.

백합에 감염된 LSV와 LMoV에 항바이러스 후보 물질(A)의 농도별 효과를 검정하기 위해 LSV와 LMoV에 복합 감염된 백합 잎 부위(0.5 cmX0.5 cm)에 항바이러스 후보 물질(A)를 각각 2.5, 5, 10 mM로 48시간 처리한 후, total RNA를 분리하여 qPCR 상대정량법(relative standard curve method)을 사용하여 그 효과를 분석하였음<그림 69>. 그 결과, 항바이러스 후보 물질(A)를 처리하지 LSV와 LMoV에 복합 감염된 백합 잎에서의 검정된 LSV 검출량을 기준으로 10 mM 항바이러스 후보 물질(A)를 처리한 백합 잎에서 LSV 검출량은 약 85.7%으로 낮게 나왔음. 그러나 2.5 mM에서는 151.8%, 5 mM에서는 약 286.6%로 LSV 검출량이 높게 나왔음. 따라서 항바이러스 후보 물질(A)은 백합에 감염된 LSV에 항바이러스 효과를 10 mM에서는 약하게 나타나지만, 그 밖에 농도에서는 항바이러스 효과를 보여주지 않았음.

항바이러스 후보 물질(A)를 처리하지 LSV와 LMoV에 복합 감염된 백합 잎에서의 검정된 LMoV 검출량을 기준으로 항바이러스 후보 물질(F)의 처리농도에 따른 백합 잎에서 LMoV 검출량은 2.5 mM에서는 약 62.4%, 5 mM에서는 약 58.7%, 10 mM에서는 약 61.7%로 나왔음. 따라서 항바이러스 후보 물질(A)은 백합에 감염된 LSV에 항바이러스 효과가 약하게 나타나는 것으로 분석되었음. 또한, 이러한 결과들은 항바이러스 후보 물질(A)이 백합에 감염된 2종의 바이러스(LSV, LMoV)에 항바이러스 효과를 약하게 나타낸다고 분석될 수 있음.

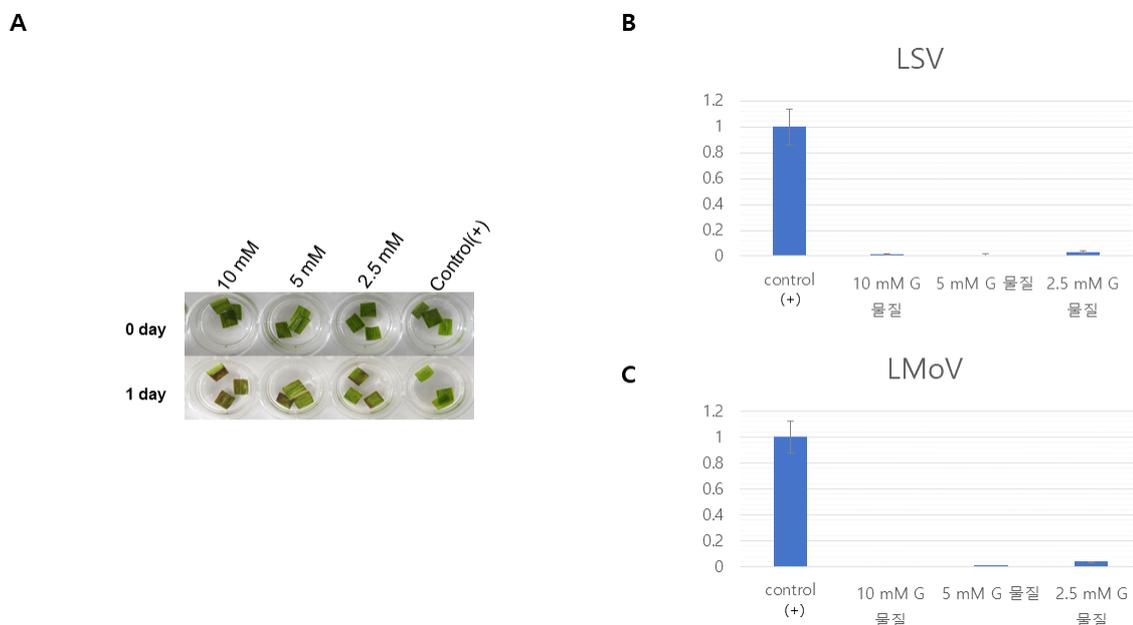


<그림 70> 백합에 감염된 LSV와 LMoV를 대상으로 항바이러스 후보 물질(F) 효과 검정. A. LSV와 LMoV에 복합 감염된 백합 잎을 0.5 cmX0.5 cm 크기로 확보한 후, 항바이러스 후보 물질(F)을 24시간 처리한 모습. control(+): 항바이러스 후보 물질(F)를 처리하지 않은 LSV와 LMoV에 복합 감염된 백합 잎. B. 항바이러스 후보 물질(F)를 처리한 0.5 cmX0.5 cm크기의 잎 부위에서 total RNA를 분리한 후, LSV를 검정하기 위한 qPCR을 수행한 결과. control(+): 항바이러스 후보 물질(F)를 처리하지 않은 LSV와 LMoV에 복합 감염된 백합 잎. C. 항바이러스 후보 물질(F)를 처리한 0.5 cmX0.5 cm크기의 잎 부위에서 total RNA를 분리한 후, LMoV를 검정하기 위한 qPCR을 수행한 결과. control(+): 항바이러스 후보 물질(F)를 처리하지 않은 LSV와 LMoV에 복합 감염된 백합 잎.

백합에 감염된 LSV와 LMoV에 항바이러스 후보 물질(F)의 농도별 효과를 검정하기 위해 LSV와 LMoV에 복합 감염된 백합 잎 부위(0.5 cmX0.5 cm)에 항바이러스 후보 물질(F)를 각각 2.5, 5,

10 mM로 24시간 처리한 후, total RNA를 분리하여 qPCR 상대정량법(relative standard curve method)을 사용하여 그 효과를 분석하였음<그림 70>. 그 결과, 항바이러스 후보 물질(F)를 처리하지 LSV와 LMoV에 복합 감염된 백합 잎에서의 검정된 LSV 검출량을 기준으로 2.5 mM 항바이러스 후보 물질(F)를 처리한 백합 잎에서 LSV 검출량은 약 24.6%, 5 mM 항바이러스 후보 물질(F)를 처리한 백합 잎에서 LSV 검출량은 약 56.1%로 낮게 나왔음. 10 mM 항바이러스 후보 물질(F)를 처리한 백합 잎에서 LSV 검출량은 약 36.1%로 낮게 나왔음. 따라서 항바이러스 후보 물질(F)은 백합에 감염된 LSV에 항바이러스 효과를 나타내며, 특히 2.5 mM 농도에서 항바이러스 효과가 높은 것으로 분석되었음.

항바이러스 후보 물질(F)를 처리하지 LSV와 LMoV에 복합 감염된 백합 잎에서의 검정된 LMoV 검출량을 기준으로 항바이러스 후보 물질(F)의 처리농도에 따른 백합 잎에서 LMoV검출량은 2.5 mM에는 약 51.6%, 5 mM에서는 약 7.2%, 10 mM에서는 약 66.8%로 나왔음. 따라서 항바이러스 후보 물질(F)은 백합에 감염된 LSV에 항바이러스 효과를 나타내며, 특히 5 mM 농도에서 항바이러스 효과가 높은 것으로 분석되었음. 또한, 이러한 결과들은 항바이러스 후보 물질(F)이 백합에 감염된 2종의 바이러스(LSV, LMoV)에 항바이러스 효과를 나타낸다고 분석될 수 있음.

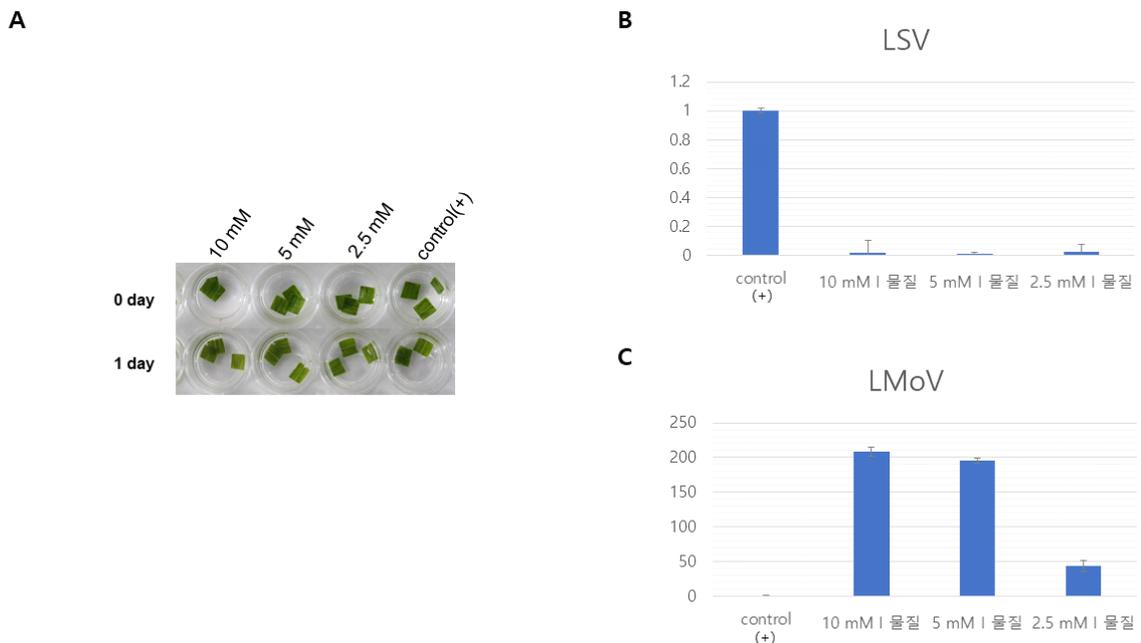


<그림 71> 백합에 감염된 LSV와 LMoV를 대상으로 항바이러스 후보 물질(G) 효과 검정. A. LSV와 LMoV가 복합 감염된 백합 잎을 0.5 cmX0.5 cm 크기로 확보한 후, 항바이러스 후보 물질(G)을 24시간 처리한 모습. control(+): 항바이러스 후보 물질(E)를 처리하지 않은 LSV와 LMoV 감염된 백합 잎. B. 항바이러스 후보 물질(G)를 처리한 0.5 cmX0.5 cm 크기의 잎 부위에서 total RNA를 분리한 후, LSV 검정을 위한 qPCR을 수행한 결과. control(+): 항바이러스 후보 물질(G)를 처리하지 않은 LSV와 LMoV 감염된 백합 잎. C. 항바이러스 후보 물질(G)를 처리한 0.5 cmX0.5 cm 크기의 잎 부위에서 total RNA를 분리한 후, LMoV 검정을 위한 qPCR을 수행한 결과. control(+): 항바이러스 후보 물질(G)를 처리하지 않은 LSV와 LMoV 감염된 백합 잎.

백합에 감염된 LSV와 LMoV를 항바이러스 후보 물질(G)의 농도별 효과를 검정하기 위해 LSV와 LMoV에 복합 감염된 백합 잎 부위(0.5 cmX0.5 cm)에 항바이러스 후보 물질(G)를 각각 2.5, 5, 10 mM로 24시간 처리한 후, total RNA를 분리하여 qPCR 상대정량법(relative standard curve method)을 사용하여 그 효과를 분석하였음<그림 71>. 그 결과, 항바이러스 후보 물질(G)를 처리하지 LSV와 LMoV에 복합 감염된 백합 잎에서의 검정된 LSV 검출량을 기준으로 2.5 mM 항바이러스 후보 물질(G)를 처리한 백합 잎에서 LSV 검출량은 약 2.8%, 5 mM 항바이러스 후보 물질(G)를 처리한 백합 잎에서 LSV 검출량은 약 1.0%로 낮게 나왔음. 10 mM 항바이러스 후보 물질(G)를 처리한 백합 잎에서 LSV 검출량은 약 1.6%로 낮게 나왔음. 따라서 항바이러스 후보 물질(G)은 백

합에 감염된 LSV에 항바이러스 효과를 나타내며, 특히 5 mM 농도에서 항바이러스 효과가 높은 것으로 분석되었음.

항바이러스 후보 물질(G)를 처리하지 LSV와 LMoV에 복합 감염된 백합 잎에서의 검정된 LMoV 검출량을 기준으로 항바이러스 후보 물질(F)의 처리농도에 따른 백합 잎에서 LMoV검출량은 2.5 mM에서 약 0.2%, 5 mM과 10 mM에서는 0.3%로 나왔음. 따라서 항바이러스 후보 물질(G)은 백합에 감염된 LSV에 항바이러스 효과를 나타내며, 특히 2.5 mM 농도에서 항바이러스 효과가 높은 것으로 분석되었음. 또한, 이러한 결과들은 항바이러스 후보 물질(G)이 백합에 감염된 2종의 바이러스(LSV, LMoV)에 항바이러스 효과를 나타낸다고 분석될 수 있음.



<그림 72> 백합에 감염된 LSV와 LMoV를 대상으로 항바이러스 후보 물질(I) 효과 검정. A. LSV와 LMoV에 복합 감염된 백합 잎을 0.5 cmX0.5 cm 크기로 확보한 후, 항바이러스 후보 물질(I)을 24 시간 처리한 모습. control(+): 항바이러스 후보 물질(I)을 처리하지 않은 LSV와 LMoV에 복합 감염된 백합 잎. B. 항바이러스 후보 물질(I)을 처리한 0.5 cmX0.5 cm 크기의 잎 부위에서 total RNA를 분리한 후, LSV를 검정하기 위한 qPCR을 수행한 결과. control(+): 항바이러스 후보 물질(I)을 처리하지 않은 LSV와 LMoV에 복합 감염된 백합 잎. C. 항바이러스 후보 물질(I)을 처리한 0.5 cmX0.5 cm 크기의 잎 부위에서 total RNA를 분리한 후, LMoV를 검정하기 위한 qPCR을 수행한 결과. control(+): 항바이러스 후보 물질(I)을 처리하지 않은 LSV와 LMoV에 복합 감염된 백합 잎.

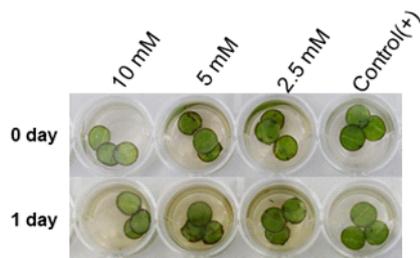
백합에 감염된 LSV와 LMoV에 항바이러스 후보 물질(I)의 농도별 효과를 검정하기 위해 LSV와 LMoV에 복합 감염된 백합 잎 부위(0.5 cmX0.5 cm)에 항바이러스 후보 물질(I)을 각각 2.5, 5, 10 mM로 24시간 처리한 후, total RNA를 분리하여 qPCR 상대정량법(relative standard curve method)을 사용하여 그 효과를 분석하였음<그림 72>. 그 결과, 항바이러스 후보 물질(I)을 처리하지 LSV와 LMoV에 복합 감염된 백합 잎에서의 검정된 LSV 검출량을 기준으로 2.5 mM 항바이러스 후보 물질(I)을 처리한 백합 잎에서 LSV 검출량은 약 2.8%, 5 mM 항바이러스 후보 물질(I)을 처리한 백합 잎에서 LSV 검출량은 약 1.0%로 낮게 나왔음. 10 mM 항바이러스 후보 물질(I)을 처리한 백합 잎에서 LSV 검출량은 약 1.6%로 낮게 나왔음. 따라서 항바이러스 후보 물질(I)은 백합에 감염된 LSV에 항바이러스 효과를 나타내며, 특히 5 mM 농도에서 항바이러스 효과가 높은 것으로 분석되었음.

항바이러스 후보 물질(I)을 처리하지 LSV와 LMoV에 복합 감염된 백합 잎에서의 검정된 LMoV 검출량을 기준으로 항바이러스 후보 물질(I)의 처리농도에 따른 백합 잎에서 LMoV검출량은 2.5 mM

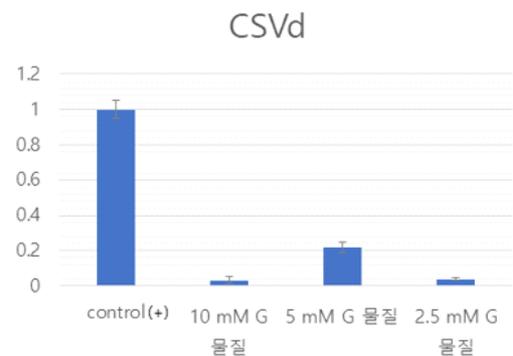
에서 4,342%, 5 mM에서는 19,530%, 10 mM에서는 20,860%로 매우 높게 나왔음. 따라서 항바이러스 후보 물질(I)은 백합에 감염된 LMoV에 대한 항바이러스 효과는 없는 것으로 분석되었음. 또한, 이러한 결과들은 항바이러스 후보 물질(I)이 백합에 감염된 2종의 바이러스(LSV, LMoV) 중 LSV에서만 항바이러스 효과를 나타낸다고 분석될 수 있음.

백합에 감염된 LMoV에 대한 항바이러스 효과는 항바이러스 후보 물질 한 종류(G)에서만 보였으며, 10 mM에서 가장 항바이러스 효과를 보이는 것으로 분석되었음. 백합에 감염된 LSV에 대한 항바이러스 효과는 항바이러스 후보 물질 3종류(E, G, I)에서 보였으며, 물질 종류에 따라 효과 농도는 차이가 있는 것으로 분석되었음. 항바이러스 후보 물질 E는 10 mM에서 가장 항바이러스 효과를 보이는 것으로 분석되었으며, 항바이러스 후보 물질 G와 I는 5 mM에서 가장 항바이러스 효과를 보이는 것으로 분석되었음.

**A**

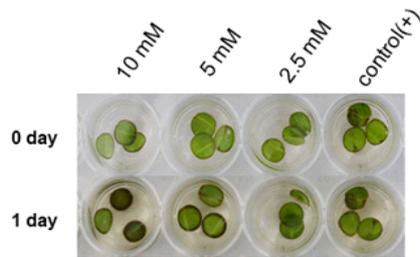
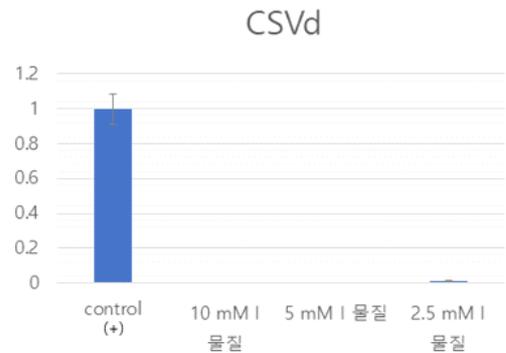


**B**



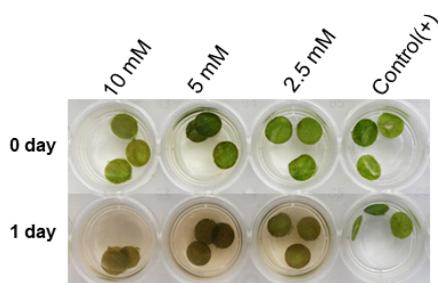
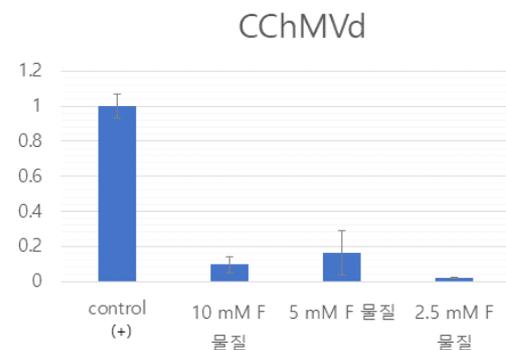
<그림 73> 국화에 감염된 CSVd를 대상으로 항바이러스 후보 물질(G) 효과 검정. A. CSVd 감염된 국화 잎을 0.5 cmX0.5 cm 크기로 확보한 후, 항바이러스 후보 물질(G)을 24시간 처리한 모습. control(+): 항바이러스 후보 물질(G)을 처리하지 않은 CSVd 감염된 국화 잎. B. 항바이러스 후보 물질(G)을 처리한 0.5 cmX0.5 cm 크기의 잎 부위에서 total RNA를 분리한 후, qPCR을 수행한 결과. control(+): 항바이러스 후보 물질(G)을 처리하지 않은 CSVd 감염된 국화 잎.

국화에 감염된 CSVd에 항바이러스 후보 물질(G)의 농도별 효과를 검정하기 위해 CSVd에 감염된 국화 잎 부위(0.5 cmX0.5 cm)에 항바이러스 후보 물질(G)을 각각 2.5, 5, 10, 20 mM로 24시간 처리한 후, total RNA를 분리하여 qPCR 상대정량법(relative standard curve method)을 사용하여 그 효과를 분석하였음<그림 73>. 그 결과, 항바이러스 후보 물질(G)을 처리하지 않은 CSVd 감염된 국화 잎에서의 검정된 CSVd 검출량을 기준으로 항바이러스 후보 물질(G)의 처리농도에 따른 국화 잎에서 CSVd 검출량은 2.5 mM에서 약 3.9%, 5 mM에서 약 22%, 10 mM에서 약 3.3%로 나왔음. 따라서 항바이러스 후보 물질(G)은 국화에 감염된 CSVd에 항바이러스 효과를 나타냄.

**A****B**

<그림 74> 국화에 감염된 CSVd를 대상으로 항바이러스 후보 물질(I) 효과 검정. A. CSVd 감염된 국화 잎을 0.5 cmX0.5 cm 크기로 확보한 후, 항바이러스 후보 물질(I)을 24시간 처리한 모습. control(+): 항바이러스 후보 물질(I)을 처리하지 않은 CSVd 감염된 국화 잎. B. 항바이러스 후보 물질(I)을 처리한 0.5 cmX0.5 cm 크기의 잎 부위에서 total RNA를 분리한 후, qPCR을 수행한 결과. control(+): 항바이러스 후보 물질(I)을 처리하지 않은 CSVd 감염된 국화 잎.

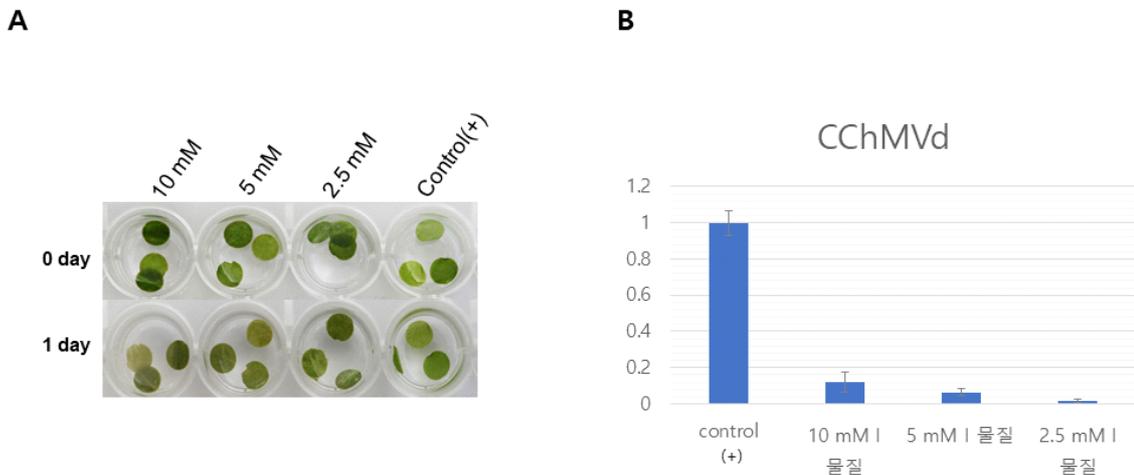
국화에 감염된 CSVd에 항바이러스 후보 물질(I)의 농도별 효과를 검정하기 위해 CSVd에 감염된 국화 잎 부위(0.5 cmX0.5 cm)에 항바이러스 후보 물질(I)을 각각 2.5, 5, 10, 20 mM로 24시간 처리한 후, total RNA를 분리하여 qPCR 상대정량법(relative standard curve method)을 사용하여 그 효과를 분석하였음<그림 74>. 그 결과, 항바이러스 후보 물질(I)을 처리하지 않은 CSVd 감염된 국화 잎에서의 검출된 CSVd 검출량을 기준으로 항바이러스 후보 물질(I)의 처리농도에 따른 국화 잎에서 CSVd 검출량은 2.5 mM에서 약 1.1%, 5mM에서 약 0.1%로 나왔음. 특히 10 mM에서는 CSVd가 검출되지 않았음. 따라서 항바이러스 후보 물질(I)은 국화에 감염된 CSVd에 항바이러스 효과를 나타냄.

**A****B**

<그림 75> 국화에 감염된 CChMVd를 대상으로 항바이러스 후보 물질(F) 효과 검정. A. CChMVd 감염된 국화 잎을 0.5 cmX0.5 cm 크기로 확보한 후, 항바이러스 후보 물질(F)을 24시간 처리한 모습. control(+): 항바이러스 후보 물질(F)을 처리하지 않은 CChMVd 감염된 국화 잎. B. 항바이러스 후보 물질(F)을 처리한 0.5 cmX0.5 cm 크기의 잎 부위에서 total RNA를 분리한 후, qPCR을 수행한 결과. control(+): 항바이러스 후보 물질(F)을 처리하지 않은 CChMVd 감염된 국화 잎.

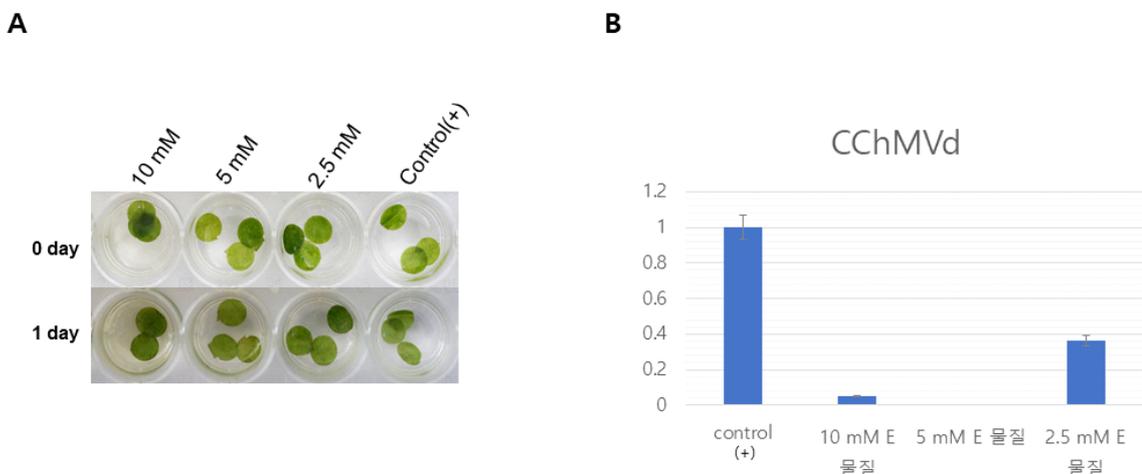
국화에 감염된 CChMVd에 항바이러스 후보 물질(F)의 농도별 효과를 검정하기 위해 CChMVd에 감염된 국화 잎 부위(0.5 cmX0.5 cm)에 항바이러스 후보 물질(F)을 각각 2.5, 5, 10, 20 mM로

24시간 처리한 후, total RNA를 분리하여 qPCR 상대정량법(relative standard curve method)을 사용하여 그 효과를 분석하였음<그림 75>. 그 결과, 항바이러스 후보 물질(F)를 처리하지 CChMVd 감염된 국화 잎에서의 검정된 CChMVd 검출량을 기준으로 항바이러스 후보 물질(F)의 처리농도에 따른 국화 잎에서 CChMVd 검출량은 2.5 mM에서 약 1.87%, 5 mM에서 약 16.5%, 10 mM에서 약 9.6%로 나왔음. 따라서 항바이러스 후보 물질(F)은 국화에 감염된 CChMVd에 항바이러스 효과를 나타냄.



<그림 75> 국화에 감염된 CChMV를 대상으로 항바이러스 후보 물질(I) 효과 검정. A. CChMVd 감염된 국화 잎을 0.5 cmX0.5 cm 크기로 확보한 후, 항바이러스 후보 물질(I)을 24시간 처리한 모습. control(+): 항바이러스 후보 물질(F)를 처리하지 않은 CChMVd 감염된 국화 잎. B. 항바이러스 후보 물질(I)을 처리한 0.5 cmX0.5 cm 크기의 잎 부위에서 total RNA를 분리한 후, qPCR을 수행한 결과. control(+): 항바이러스 후보 물질(I)을 처리하지 않은 CChMVd 감염된 국화 잎.

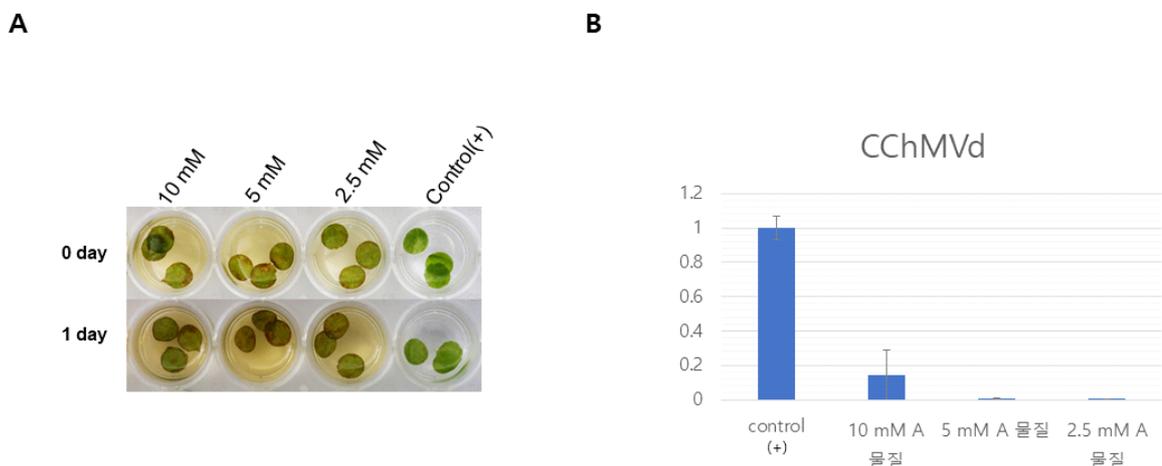
국화에 감염된 CChMVd에 항바이러스 후보 물질(I)의 농도별 효과를 검정하기 위해 CChMVd에 감염된 국화 잎 부위(0.5 cmX0.5 cm)에 항바이러스 후보 물질(I)을 각각 2.5, 5, 10, 20 mM로 24시간 처리한 후, total RNA를 분리하여 qPCR 상대정량법(relative standard curve method)을 사용하여 그 효과를 분석하였음<그림 76>. 그 결과, 항바이러스 후보 물질(I)을 처리하지 CChMVd 감염된 국화 잎에서의 검정된 CChMVd 검출량을 기준으로 항바이러스 후보 물질(I)의 처리농도에 따른 국화 잎에서 CChMVd 검출량은 2.5 mM에서 약 1.9%, 5 mM에서 약 6.4%, 10 mM에서 약 12%로 나왔음. 따라서 항바이러스 후보 물질(I)은 국화에 감염된 CChMVd에 항바이러스 효과를 나타냄.



<그림 76> 국화에 감염된 CChMV를 대상으로 항바이러스 후보 물질(E) 효과 검정. A. CChMVd

감염된 국화 잎을 0.5 cmX0.5 cm 크기로 확보한 후, 항바이러스 후보 물질(E)을 24시간 처리한 모습. control(+): 항바이러스 후보 물질(E)을 처리하지 않은 CChMVd 감염된 국화 잎. B. 항바이러스 후보 물질(E)을 처리한 0.5 cmX0.5 cm 크기의 잎 부위에서 total RNA를 분리한 후, qPCR을 수행한 결과. control(+): 항바이러스 후보 물질(E)을 처리하지 않은 CChMVd 감염된 국화 잎.

국화에 감염된 CChMVd에 항바이러스 후보 물질(I)의 농도별 효과를 검정하기 위해 CChMVd에 감염된 국화 잎 부위(0.5 cmX0.5 cm)에 항바이러스 후보 물질(E)을 각각 2.5, 5, 10, 20 mM로 24시간 처리한 후, total RNA를 분리하여 qPCR 상대정량법(relative standard curve method)을 사용하여 그 효과를 분석하였음<그림 77>. 그 결과, 항바이러스 후보 물질(E)을 처리하지 CChMVd 감염된 국화 잎에서의 검정된 CChMVd 검출량을 기준으로 항바이러스 후보 물질(E)의 처리농도에 따른 국화 잎에서 CChMVd 검출량은 2.5 mM에서 약 36.2%, 5 mM에서 약 0.5%, 10 mM에서 약 5.2%로 나왔음. 따라서 항바이러스 후보 물질(E)은 국화에 감염된 CChMVd에 항바이러스 효과를 나타냄.



<그림 78> 국화에 감염된 CChMV를 대상으로 항바이러스 후보 물질(A) 효과 검정. A. CChMVd 감염된 국화 잎을 0.5 cmX0.5 cm 크기로 확보한 후, 항바이러스 후보 물질(A)을 24시간 처리한 모습. control(+): 항바이러스 후보 물질(E)을 처리하지 않은 CChMVd 감염된 국화 잎. B. 항바이러스 후보 물질(A)을 처리한 0.5 cmX0.5 cm 크기의 잎 부위에서 total RNA를 분리한 후, qPCR을 수행한 결과. control(+): 항바이러스 후보 물질(A)을 처리하지 않은 CChMVd 감염된 국화 잎.

국화에 감염된 CChMVd에 항바이러스 후보 물질(A)의 농도별 효과를 검정하기 위해 CChMVd에 감염된 국화 잎 부위(0.5 cmX0.5 cm)에 항바이러스 후보 물질(A)을 각각 2.5, 5, 10, 20 mM로 24시간 처리한 후, total RNA를 분리하여 qPCR 상대정량법(relative standard curve method)을 사용하여 그 효과를 분석하였음<그림 78>. 그 결과, 항바이러스 후보 물질(A)을 처리하지 CChMVd 감염된 국화 잎에서의 검정된 CChMVd 검출량을 기준으로 항바이러스 후보 물질(A)의 처리농도에 따른 국화 잎에서 CChMVd 검출량은 2.5 mM에서 약 0.2%, 5 mM에서 약 0.7%, 10 mM에서 약 14.1%로 나왔음. 따라서 항바이러스 후보 물질(A)은 국화에 감염된 CChMVd에 항바이러스 효과를 나타냄.

국화에 감염된 CSVd에 대한 항바이러스 효과는 항바이러스 후보 물질 두 종류(G,I)에서 보였으며, 물질 종류에 따라 효과 농도는 차이가 있는 것으로 분석되었음. 항바이러스 후보 물질 G는 10 mM에서 가장 높은 항바이러스 효과를 보이는 것으로 분석되었으며, 항바이러스 후보 물질 I는 5 mM과 10 mM에서 가장 높은 항바이러스 효과를 보이는 것으로 분석되었음. 국화에 감염된 CChMVd에 대한 항바이러스 효과는 항바이러스 후보 물질 4종류(A, E, F, I)에서 보였으며, 물질 종류에

따라 효과 농도는 차이가 있는 것으로 분석되었음. 항바이러스 후보 물질 A, F, I는 2.5 mM에서 가장 높은 항바이러스 효과를 나타내는 것으로 분석되었음. 이 물질들은 2.5 mM 미만 농도에서도 효과를 나타낼 것을 예측됨. 항바이러스 후보 물질 E는 5 mM에서 가장 높은 항바이러스 효과 나타내는 것으로 분석되었음.

본 연구진이 확보한 항바이러스 후보 물질은 대부분 국화와 국화에 감염되는 바이러스(바이로이드)에 항바이러스 효과가 있는 것으로 분석되었음. 따라서 이러한 항바이러스 후보 물질들은 무병묘 생산 단계 중 성장점(마디, 인편) 배양 전 줄기(인편) 소독 때 적용하면 성장점(마디, 인편) 부위에 남아 있는 미량의 바이러스를 제거하여 성장점(마디, 인편) 배양의 바이러스 오염을 줄일 수 있을 것으로 예측됨.

**나. 제1협동기관 (강원대학교 산학협력단):**

**<1차년도>**

○ 백합 무병묘 생산 구근에서의 이병 바이러스 분석

□ 국내·외 다양한 백합 품종 및 국내 주력품종에서의 바이러스 검정

백합의 경우, 최신 육종기술의 향상으로 새로운 품종들이 소개되고 있지만, 현실적으로 백합 무병묘를 대량 생산의 어려움을 해소하기 위한 첫 번째 단계로 국내 주력품종인 오리엔탈 계통, 아시아틱 계통, 롱기플로럼 계통 등 다양한 계통을 선정하여 감염 바이러스를 검정하고 바이러스 계통 별 감염률 확인하였음.

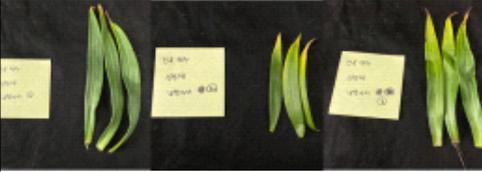
조사지역		농가수	비 고
시·도	시·군		
경기	광명, 화성, 과천	4	농진청과 합동 시료 채취 수집
강원	춘천, 원주, 횡성, 강릉, 영월	10	"
충남	태안	5	"
전북	완주	2	"
제주	제주, 서귀포	4	"
계		20-30개 내외	필요시 추가 샘플 채취와 구근농가 증상 발현 제보시 추가 수집 시료 채취, 연구

- 국내·외 백합 육성 품종에서의 바이러스를 검정하기 위해 백합 포장재배와 백합 육묘장 및 재배 농가에서 총 100개의 샘플을 채집하여 주요 감염 바이러스인 CMV, LSV, LMoV, PIAMV의 감염을 RT-PCR을 통하여 검정하였음.



<그림 79> 전국 채집 지역의 백합 농가 및 포장재배 시설

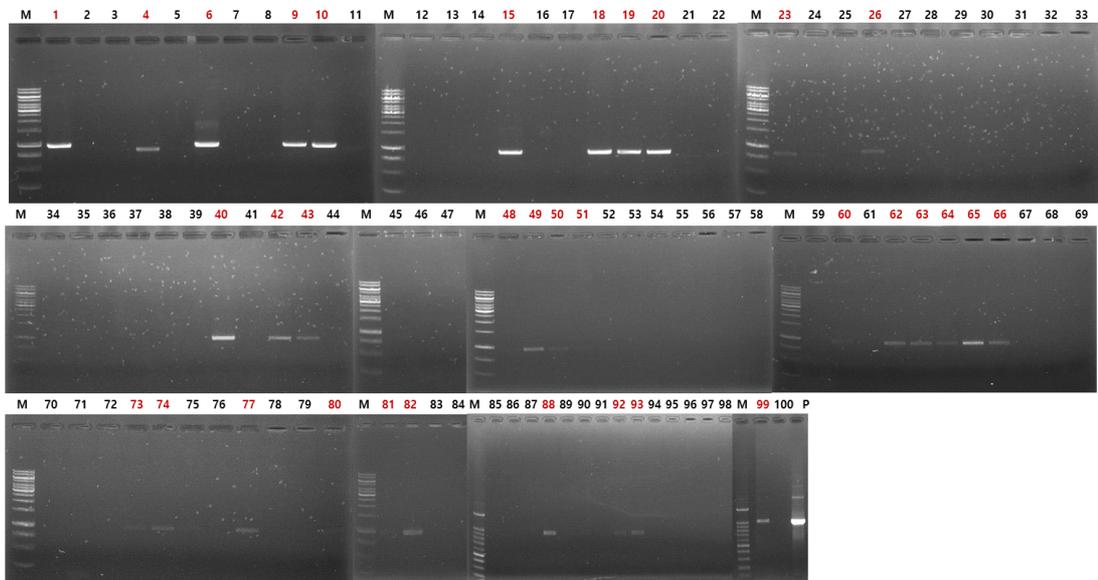
전국 (6개의 시·도, 13개 지역)에서 25개의 농가와 육묘장에 방문해 채집한 백합 100개의 샘플에 대한 바이러스 검정을 진행함<그림 79>.

채집 시료 검정 결과		
지역	경기도 광명시	경기도 광명시
채집 시료		
지역	경기도 과천시	경기도 화성시
채집 시료		
지역	충청남도 태안군	전라북도 완주군
채집 시료		
지역	전라북도 완주군	제주도 서귀포시
채집 시료		
지역	제주도 제주시	제주도 서귀포시
채집 시료		
지역	제주도 서귀포시	충청남도 태안군

채집 시료		
지역	충청남도 태안군	전라북도 완주군
채집 시료		
지역	강원도 춘천시	강원도 강릉시
채집 시료		
지역	강원도 횡성군	강원도 원주시
채집 시료		
지역	강원도 영월군	강원도 영월군
채집 시료		
지역	강원도 영월군	강원도 영월군
채집 시료	사진 없음	

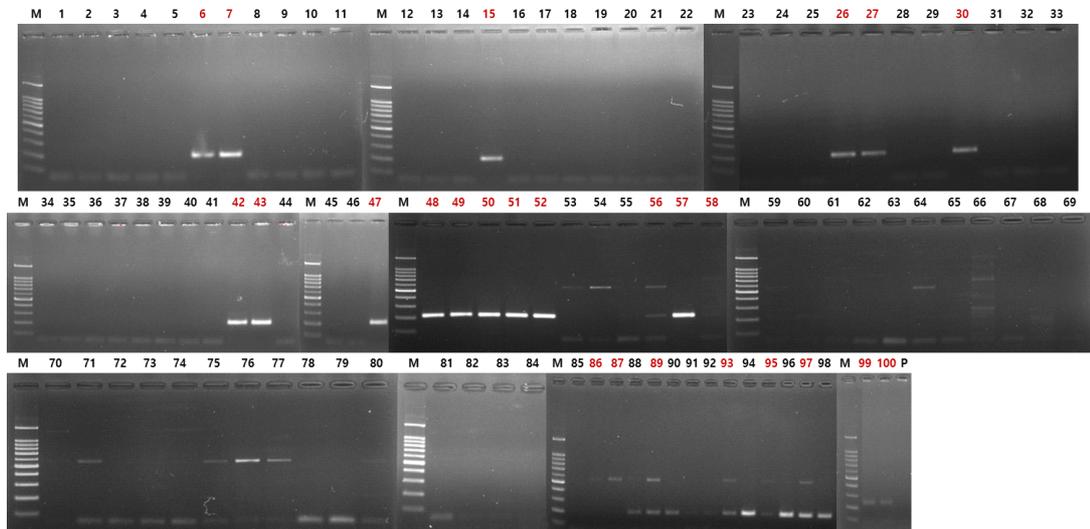
- CMV 검정

총 100개 백합 중 34개의 샘플에서 CMV의 감염이 RT-PCR 검정을 통해 확인됨.



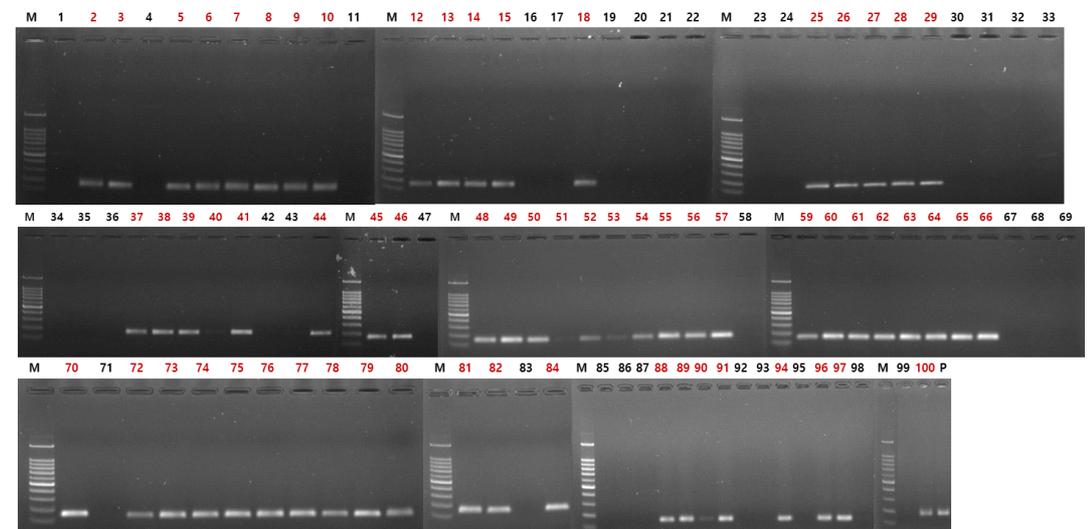
- LSV 검정

총 100개 백합 중 25개의 샘플에서 LSV의 감염이 RT-PCR 검정을 통해 확인됨.



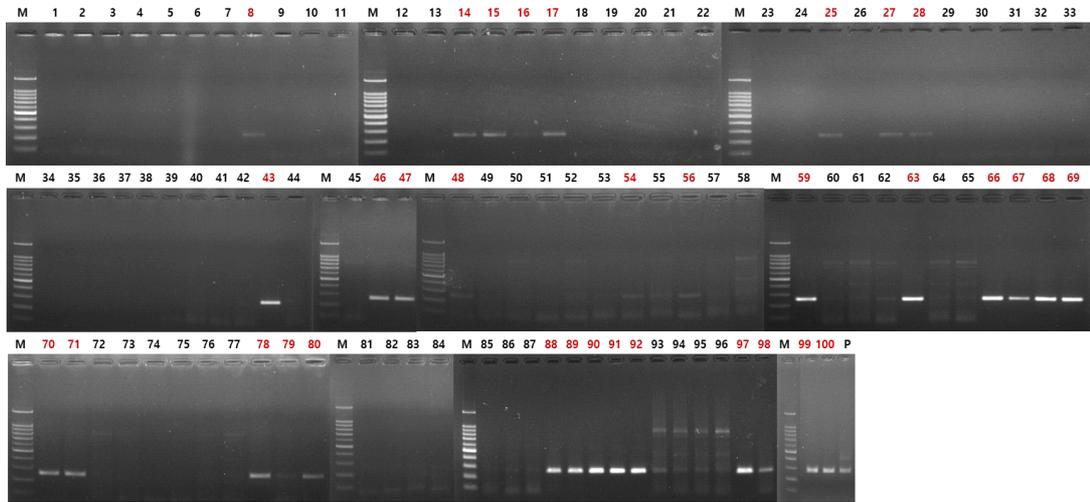
- LMoV 검정

총 100개 백합 중 65개의 샘플에서 LMoV의 감염이 RT-PCR 검정을 통해 확인됨.



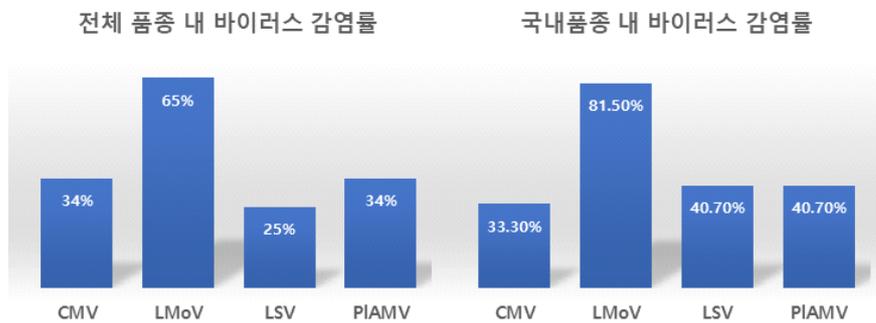
- PIAMV 검정

총 100개 백합 중 34개의 샘플에서 PIAMV의 감염이 RT-PCR 검정을 통해 확인됨.



- 국내 육성 품종 내 바이러스 감염률 확인 완료

전국 13개의 지역에서 국내 품종 (우리타워, 루시퍼, 두산, 그린스타, 오룬 다이아나 등)으로 육성한 약 30개의 백합 샘플에서의 주요바이러스 감염률을 분석함<그림 80>.



<그림 80> 전체 품종과 국내 품종 내 바이러스 감염률 그래프

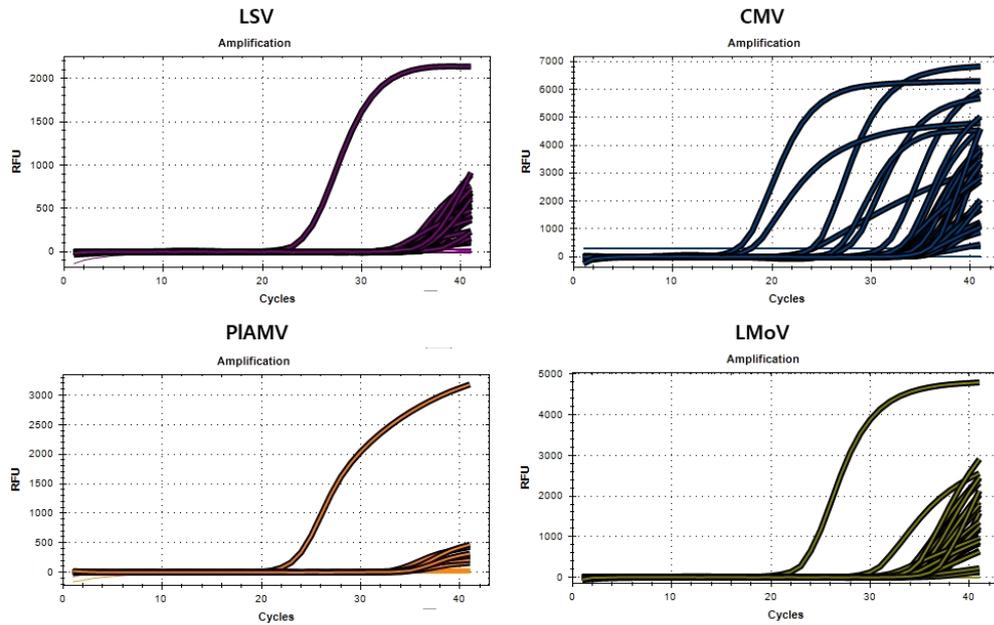
국내 육성 품종 내 바이러스 감염률을 확인해본 결과, 백합에서 가장 우점으로 감염하는 바이러스는 LMoV로 확인됨. 또한, PIAMV와 LSV는 40.7%로 동일한 감염률을 보였으며 CMV는 33%로 가장 낮은 감염률을 보임.

전체 품종 내 바이러스 감염률과 국내 품종 내 바이러스 감염률을 비교해봤을 때, LMoV가 가장 많이 감염하는 바이러스는 동일하지만, 국내 품종 내에서는 LSV가 CMV보다 더 많이 감염하는 것으로 확인됨.

□ 백합 무병묘 생산 구근에서의 이병 바이러스 분석

선행 연구 결과에 따른 조직 배양묘에서 바이러스의 감염이 확인되어 최초의 조직 배양되는 바이러스-free 백합의 선별이 필요하기 때문에 qRT-PCR을 통해 바이러스의 감염을 확인. 또한, 배양하는 과정에서 바이러스의 재감염을 확인하기 위해 2차, 3차 바이러스 검정을 실행하였음.

- 고감도 qRT-PCR을 통한 구근에서의 주요 바이러스 (CMV, LSV, LMoV, PIAMV) 감염 확인



<그림 81> 구근에서 주요 바이러스 qRT-PCR 검정 결과

qRT-PCR 결과, 구근에서는 CMV가 가장 많이 감염하는 것을 확인할 수 있었고, 다음으로 LMoV 인 것을 확인하였음<그림 81>. 추가적으로 더 많은 백합 구근 샘플에서 4개의 우점 바이러스의 분포를 확인할 예정이다.

- 기존 무병주 생산에서는 4종 바이러스만 검정이 진행되었지만, 백합에 감염한다고 보고되어있는 18종 전체에 대한 바이러스 검정이 현재까지 진행되지 않았기 때문에 주요 바이러스를 포함한 전체 바이러스에 대한 감염을 RT-PCR을 통해 검정함.

기존 백합에서 확인한 CMV, LMoV, LSV, PIAMV를 제외한 나머지 14종의 바이러스 (Lily virus X, Milk vetch dwarf virus, Citrus tatter leaf virus, Arabis mosaic virus, Tomato spotted wilt virus, Tobacco mosaic virus, Broad bean wilt virus2, Tobacco rattle virus, Tomato aspermy virus, Tobacco ringspot virus, Tomato ringspot virus, Narcissus mosaic virus, shallot yellow stripe virus, Strawberry latent ringspot virus)에 대한 검정을 하기 위해 각각 바이러스 검정 primer들을 제작함.

[표 6] 백합바이러스검정에 사용된 프라이머 리스트 및 서열정보

Target virus	Name	Sequence (5→3)*	Size (bp)
LSV	LSV-CP-F	AAG CAC GCT GGA CTG CGG AAA GTC TGC CGG	208bp
	LSV-CP-R	TCA GCA GAA GTG GGT CGC CTG ATG ATC CCC	
PIAMV	PIAMV-F	AAC GCC CGG CTT TCC AGA AAT CTC CCA CCG	246bp
	PIAMV-R	TGA ACT GGG TGG AGG TTG AGG CTA GGT TGG	
CMV	CPT-ALL-F	YAS YTT TDR GGT TCA ATT CC	950bp
	CPT-ALL-R	GAC TGA CCA TTT AAG CCG	
LMoV	LMoV-CP-F	TGA AGT TAC TTC ACG CAC GCC AGC ACG CGC	152bp
	LMoV-CP-R	ACA TCA TCT GCT GTA TGC CTC TCC GTG TCC	
BBWV2	BBWV2-506-F	GGT GAG CAG TTT GTC AGA AGT	506bp
	BBWV2-506-R	CCA GAT AAT GCA TAT TCC ACC	
TSWV	TSWV-N-F	TAG CCA AGA CAA CAC TGA TCA TCT CAA AGC	222bp
	TSWV-N-R	AGA AGG CTT GAT AGC TTG ATC AGG GTC AGG	
TMV	Tobamod-F	TKG AYG GNG TBC CNG GNT GYG G	800bp

	Tobamod-R	ACN GAV TBN ABC TGT AAT TGC TAT	
CTLV	CTLV-F	GCC ACT TCT AGG CAG AAC TCT TTG AA	272bp
	CTLV-R	AAC CCC TTT TTG TCC TTC AGT ACG AA	
MDV	MDV-DNAS-F	ACA GCT GTC TTT GCT TCG	734bp
	MDV-DNAS-R	ATG CCC TTC ATT AAT GAA GG	
ArMV	ArMV-RNA2-F	CCA ATT GCC CCA AGT GGA G	546bp
	ArMV-RNA2-R	CAA ART TYC CTC TYG GCT TGC	
LVX	LVX-CP-F	CAA CGT GCC GCA TCT ACC	761bp
	LVX-CP-R	AAG TTT AGT GTA TGG TGGGC	

\* Y=C/T; S=C/G; D=G/A/T; R=A/G, K=G/T; N, A/C/T/G; B, C/G/T; V, A/C/G

제작한 바이러스 검정 프라이머를 사용하여 전국에서 채집한 100개의 백합 샘플의 바이러스 검정 (RT-PCR)을 진행하였음.

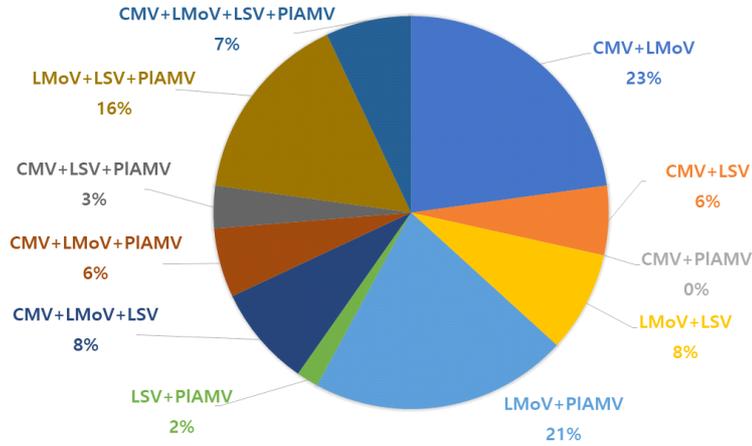
[표 7] 지역별 백합 바이러스 검정 결과

지방	지역	샘플 수	CMV	LMoV	LSV	PIAMV	LVX	MDV	CTLV	ArMV	TSWV	TMV	BBWV2
경기도	광명	7	0	7	0	2	0	0	0	0	0	0	0
	과천	3	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	화성	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
강원도	춘천	9	6	8	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	원주	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	강릉	21	6	13	8	10	0	0	0	0	0	0	0
	영월	19	10	15	8	8	0	0	0	0	0	0	0
	횡성	5	0	1	0	4	0	0	0	0	0	0	0
충청	태안	3	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0
남도	예산	10	4	8	2	1	0	0	0	0	0	0	0
전라	완주	6	1	2	3	3	0	0	0	0	0	0	0
제주도	제주	4	1	2	1	4	0	0	0	0	0	0	0
	서귀포	9	6	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>		<b>100</b>	<b>34</b>	<b>65</b>	<b>25</b>	<b>34</b>	<b>0</b>						

기존 4종의 바이러스를 포함하여 총 11종의 바이러스 검정결과 (Tobacco rattle virus, Tomato aspermy virus, Tobacco ringspot virus, Tomato ringspot virus, Narcissus mosaic virus, shallot yellow stripe virus, Strawberry latent ringspot virus 제외), 기존 4종의 바이러스 (CMV, LMoV, LSV, PIAMV)를 제외한 나머지 바이러스는 감염하지 않음이 확인됨.

100개의 샘플 대다수에서 CMV, LMoV, LSV, PIAMV의 감염을 확인됨. 각각의 바이러스의 감염률은 가장 높은 감염률을 보인 LMoV가 65%였으며, PIAMV 34%, CMV 34% 그리고 LSV가 25%로 나타남<그림 82>.

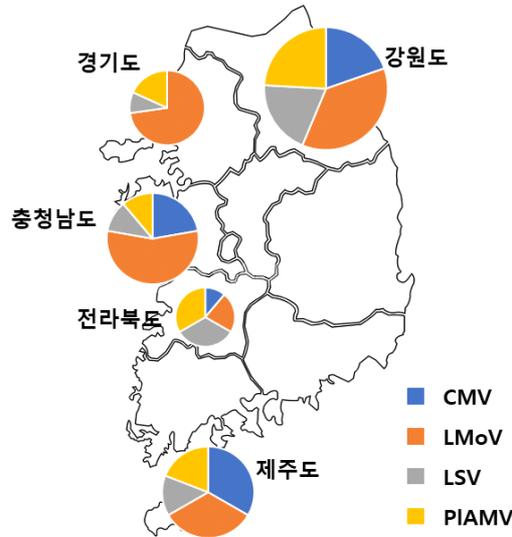
백합식물에서 혼합 감염률



<그림 82> 백합 샘플에서 검정된 주요 바이러스의 혼합 감염률 조사

또한, 백합 샘플의 전체 혼합감염률을 조사한 결과, 2종의 바이러스가 혼합 감염되어 있는 경우 58.2%의 감염률로 가장 높았으며, 3종, 4종의 바이러스가 혼합 감염되어 있는 경우는 각각 34.5%, 7.3%로 존재하였음.

백합에서 바이러스의 혼합 감염되어 있는 경우, LMoV와 CMV 또는 LMoV와 PIAMV의 구성의 혼합 감염이 가장 높은 비율을 차지하고 있는 것을 확인함.



<그림 83> 전국 백합 감염 바이러스의 분포 조사

또한, 바이러스 감염이 확인된 백합들의 전국분포를 확인하였음. 대체로 모든 지역(강원도, 경기도, 충청남도, 제주도)에서 LMoV가 우점 바이러스로 확인이 되었지만, 전라북도에서 채집된 백합은 PIAMV에 의한 감염이 제일 높은 것을 확인할 수 있었음<그림 83>.

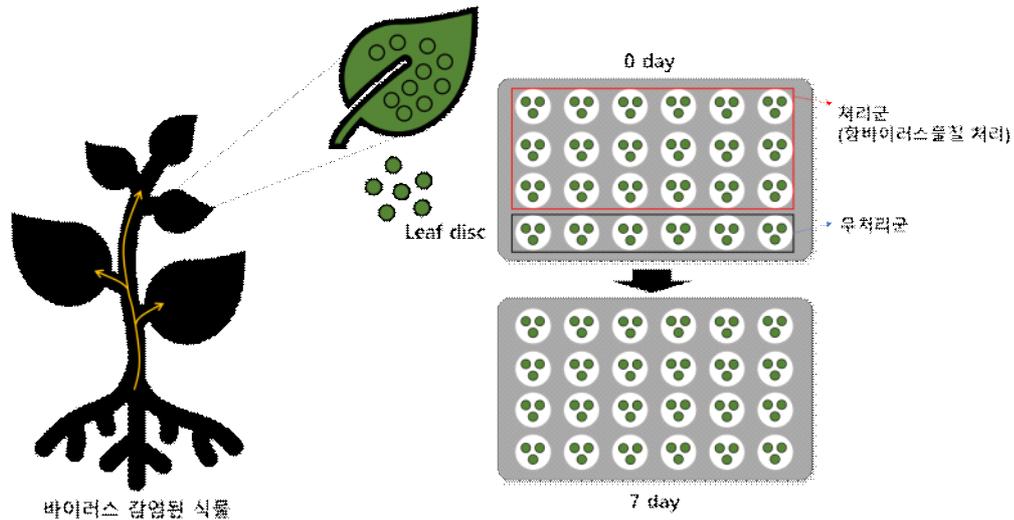
과거 백합에 피해를 주는 바이러스의 경우, 우점 바이러스로 CMV와 LSV가 보고된 것과 달리 현재 결과에서는 LMoV가 우점하는 양상을 보였음. 최근 해외 수입되는 구근이나 국내에서 유통되는 백합 구근으로부터 바이러스의 감염양상의 차이가 나타나는 이유는 국내 기후변화 등 환경변화에 의한 영향일 것으로 추측됨.

## <2차년도>

### □ 바이러스 억제 처리 성장점배양에 따른 무병묘 효율 분석 및 증식 체계구축

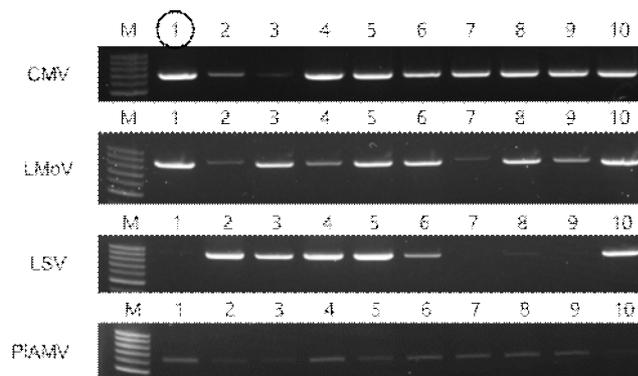
백합 무병묘 생산 과정 내에서 바이러스가 재감염 시 바이러스가 발병하지 못하게 방지하기 위해, 다양한 백합품종의 무병묘 생산 중 항바이러스제 처리를 통해 백합에 감염하는 바이러스가 증식하지 못하도록 효율적인 처리 조건 확립이 필요. 또한, 항바이러스제 처리 시 건열처리와 함께 처리하여 건열처리와 항바이러스제의 병행 처리에 대한 효과 분석을 통해 대량생산의 효율적인 증식 체계구축

- 백합 무병묘에 가장 효과적인 항바이러스제 선발 및 건열 처리 병행



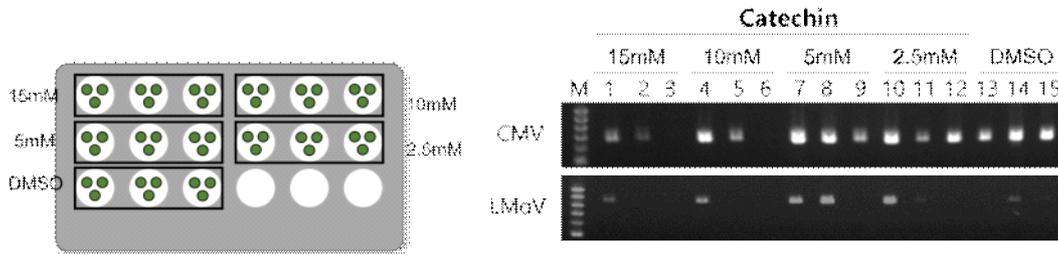
<그림 84> 백합 잎을 사용한 항바이러스 처리 모식도

가장 효율적인 항 바이러스제를 선발하기 위해, 기주식물에 바이러스를 감염시켜 leaf disc를 이용하여 배양 가능한 MS배지에 항바이러스 물질을 처리하여 바이러스에 대한 물질의 효율성을 확인하는 방법(leaf disc assay)을 사용함<그림 84>.



<그림 85> 백합 잎에서 바이러스 RT-PCR 검정 결과

leaf disc assay를 진행하기 위해, 백합에 감염하는 주요 바이러스인 cucumber mosaic virus (CMV), lily mottle virus (LMoV), lily symptomless virus (LSV), plantago asiatica mosaic virus (PIAMV)에 대하여 RT-PCR 검정을 진행하였음<그림 85>. 다양한 바이러스가 검정되었는데, 10 개체의 백합 중 1번 개체의 잎을 사용하여 leaf disc assay를 진행함. 이전 연구에서 효과를 보였던 항바이러스 물질인 catechin을 사용하였으며, 백합 잎에서의 효과를 확인하기 위해 다양한 catechin 농도 차이 (15mM, 10mM, 5mM과 2.5mM)를 두어 진행하였음<그림 86>.



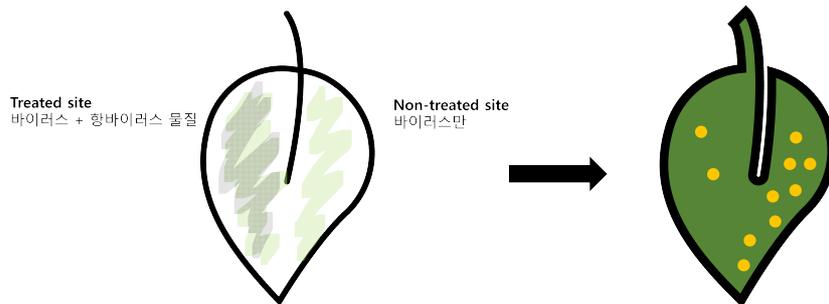
<그림 86> Catechin의 농도 차이를 통한 leaf disc assay를 진행한 모식도와 RT-PCR 검정 결과.

[표 8] 백합1 개체의 leaf disc assay (catechin 처리)의 qRT-PCR 결과

항바이러스제 처리 농도	qRT-PCR <sup>a</sup>		항바이러스제 처리 농도	qRT-PCR	
	CMV	LMoV		CMV	LMoV
백합1-15mM-1	20.3	22.9	백합1-5mM-3	21.4	20.6
백합1-15mM-2	24.1	26.2	백합1-2.5mM-1	15.2	19.5
백합1-15mM-3	24.0	27.3	백합1-2.5mM-2	20.7	18.6
백합1-10mM-1	17.6	19.8	백합1-2.5mM-3	17.1	18.6
백합1-10mM-2	18.6	23.8	백합1-DMSO-1	23.5	21.5
백합1-10mM-3	23.9	22.5	백합1-DMSO-2	17.6	18.4
백합1-5mM-1	13.9	20.4	백합1-DMSO-3	18.6	19.7
백합1-5mM-2	16.1	20.2			

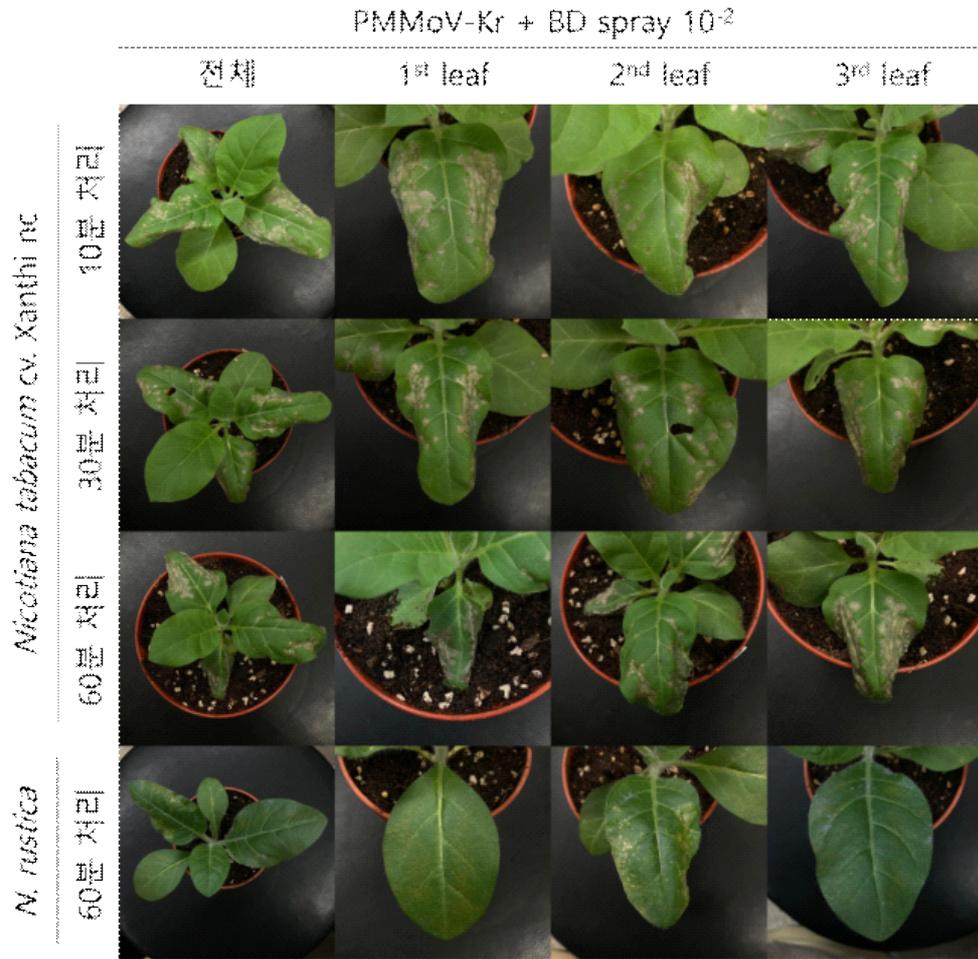
<sup>a</sup>Quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)의 평균 cycle threshold (Ct) value

백합1 개체의 leaf disc assay 결과를 RT-PCR과 qRT-PCR을 통하여 바이러스의 존재 유무와 농도를 7일이 지난 후 확인하였음. 그 결과, 15mM의 catechin을 처리하였을 때, 가장 적은 바이러스의 축적량을 확인할 수 있었음.



<그림 87> 항바이러스 물질을 통한 바이러스 불활성화 실험 모식도.

실제 식물체 앞에서 항바이러스제의 활성을 확인하기 위해서 앞의 반쪽에 물질을 처리하여 바이러스 (pepper mild mottle virus, PMMoV)를 접종하고, 나머지 반쪽의 앞은 바이러스만 접종하여 항바이러스제의 효율성 확인하였음<그림 87>. 항바이러스제는 Catechin, BD spray, BD ferm 3 가지를 사용하였음. 항바이러스제는 각각 10분, 30분, 60분 동안 바이러스와 같이 inactivation 시킨 후, 왼쪽 앞에 접종하였으며, 나머지 오른쪽 앞에는 바이러스만을 접종하여 바이러스에 의한 hypersensitive response 반응 (HR반응)인 괴사 반점 수를 통하여 바이러스의 불활성화를 확인하였음. BD spray, catechin과 BD ferm은 약해가 일어나지 않도록 Catechin은 10mM, BD spray는  $10^{-2}$ , BD ferm은 1/200의 농도로 희석하여 실험을 진행하였음<그림 88-90>.



<그림 88> BD spray를 처리한 inactivation 결과.

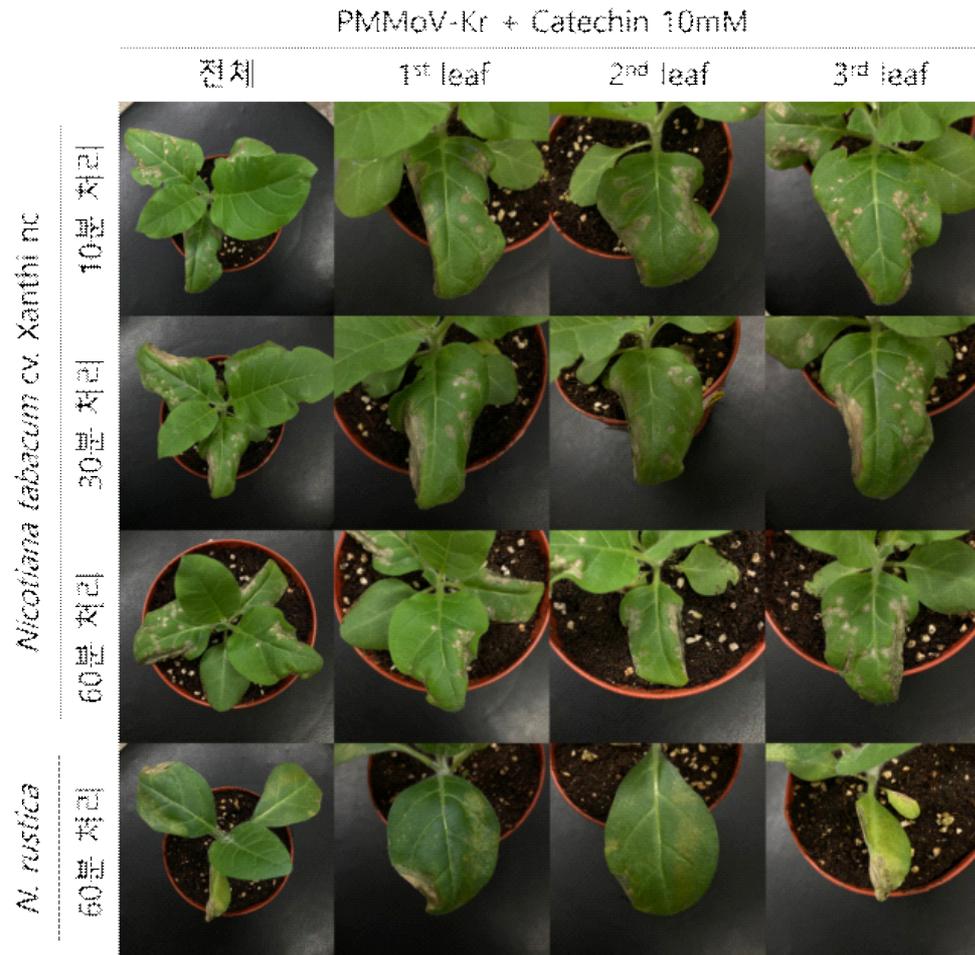
[표 9] PMMoV-Kr과 BD spray 10<sup>-2</sup>처리한 잎의 inactivation 효과

Treated plant	Inactivation time	No. of local lesion on 3 half-leaves <sup>a</sup>		Inhibition (%) <sup>b</sup>
		Treatment	control	
<i>N. tabacum</i> cv. Xanthi nc	10min	152	197	22
	30min	118	141	16
	60min	102	140	27
<i>N. rustica</i>	60min	282	376	25

<sup>a</sup>두 개체 (*N. tabacum* cv. Xanthi nc, *N. rustica*) 3개 잎의 반엽법으로 나타난 local lesion의 전체수

<sup>b</sup>Inhibition%= (1-처리한 잎의 local lesion 수/처리하지 않은 잎의 local lesion 수)x100

BD spray는 10분 처리 결과, 바이러스의 불활성화가 약 22%로 나타났으며, 30분을 처리하였을 때, 16%로 가장 낮았고, 1시간을 처리했을 때 27%로 가장 높은 결과를 나타내었음. 또한 다른 담배 개체에서도 1시간을 처리했을 때 비슷한 억제효과를 볼 수 있었음.



<그림 89> Catechin을 처리한 inactivation 결과.

[표 10] PMMoV-Kr과 catechin 10mM 처리한 잎의 inactivation 효과

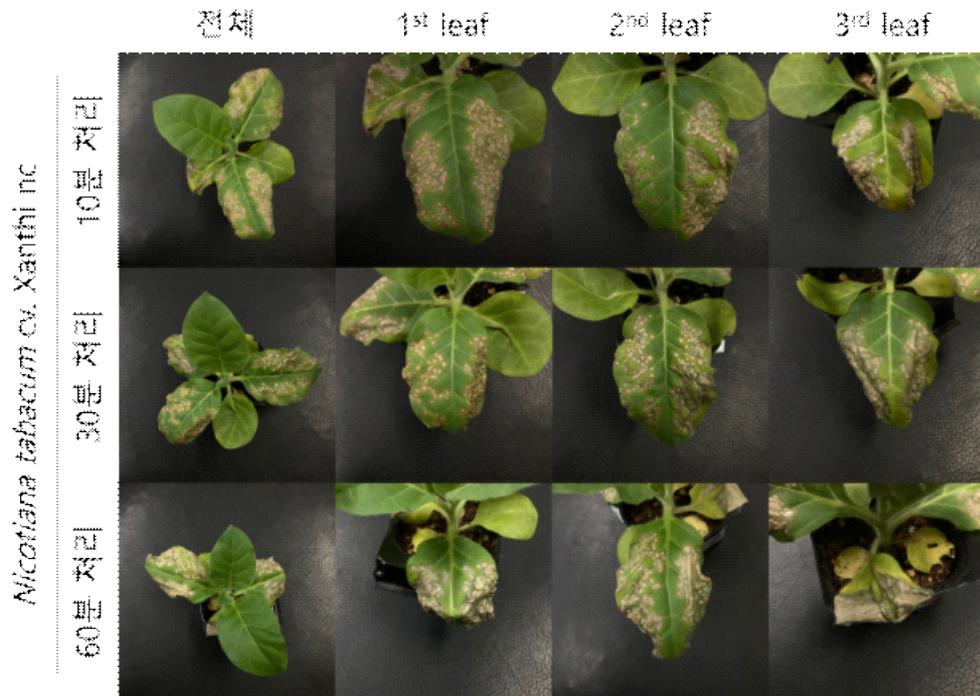
Treated plant	Inactivation time	No. of local lesion on 3 half-leaves <sup>a</sup>		Inhibition (%) <sup>b</sup>
		Treatment	control	
<i>N. tabacum</i> cv. Xanthi nc	10min	-	-	-
	30min	-	-	-
	60min	64	123	48
<i>N. rustica</i>	60min	36	175	79

<sup>a</sup>두 개체 (*N. tabacum* cv. Xanthi nc, *N. rustica*) 3개 잎의 반엽법으로 나타난 local lesion의 전체수

<sup>b</sup>Inhibition%= (1-처리한 잎의 local lesion 수/처리하지 않은 잎의 local lesion 수)x100

Catechin은 10분과 30분을 처리한 후, 접종한 잎에서는 잎 전체의 괴사가 일어났는데, 이는 바이러스에 의한 결과가 아닌 catechin에 의한 식물의 잎의 피해 인 것을 확인할 수 있었음. 60분 처리 후 항바이러스 물질을 처리한 잎에서는 바이러스만 처리한 잎보다 억제 효과가 48%로 다른 항바이러스 물질 (BD spray와 BD Ferm)보다 높은 비율을 나타냄. 또한, 다른 담배 식물에서도 79%로 아주 높은 억제 효과를 보임.

PMMoV-Kr + BD Ferm 1/200



<그림 90> BD Ferm을 처리한 inactivation 결과.

[표 11] PMMoV-Kr과 BD ferm 1/200 처리한 잎의 inactivation 효과

Treated plant	Inactivation time	No. of local lesion on 3 half-leaves <sup>a</sup>		Inhibition (%) <sup>b</sup>
		Treatment	control	
<i>N. tabacum</i> cv. Xanthi nc	10min	335	462	27
	30min	268	356	25
	60min	156	163	4

<sup>a</sup>*N. tabacum* cv. Xanthi nc 3개 잎의 반엽법으로 나타난 local lesion의 전체수

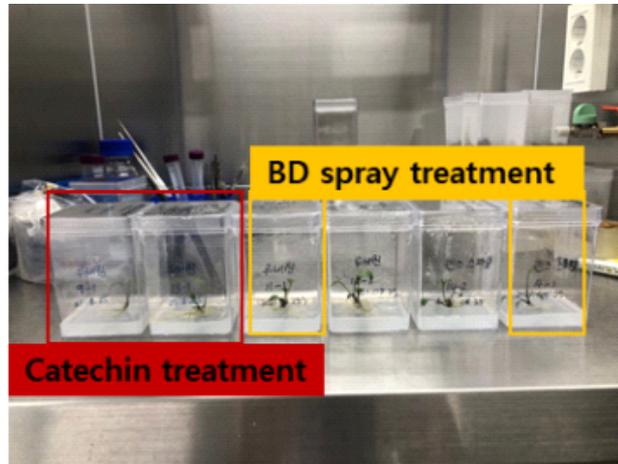
<sup>b</sup>Inhibition%= (1-처리한 잎의 local lesion 수/처리하지 않은 잎의 local lesion 수)x100

항바이러스 물질인 BD ferm의 inactivation 결과, BD ferm은 약 10분 처리 시 27%, 30분 처리 시 25% 정도로 BD spray 비슷한 효과를 보이는 것을 확인할 수 있었으며, 60분 처리할 경우, 바이러스 억제 효과를 확인할 수 없었음.

- 백합 무병묘 생산 과정 중 항바이러스제 처리 및 배양 방법 등 최적 조건 확립을 통한 효율적 증식 시스템 연계



생장점 배양을 통해 얻어진 잎에서 바이러스의 감염을 확인한 결과, 6개체의 성장점 배양 백합 중 4개체 (루비원 9-1, 루비원 11-1, 루비원 13-1, 퀸즈스파클 14-1)에서 CMV의 감염을 확인 하였음. 이를 통해 성장점 배양을 통해서도 바이러스가 일부 전염되고 있음을 확인 할 수 있었음.



<그림 91> 성장점 배양한 백합에 항바이러스제 처리.

따라서, 성장점 배양을 한 백합 중 CMV가 검정된 백합 4개체 (루비원 9-1, 루비원 11-1, 루비원 13-1, 퀸즈스파클 14-1)를 두 개체는 inactivation 효과가 가장 좋았던 catechin을 처리하였고, 나머지 두 개체는 BD spray를 처리하였음<그림 91>. 항바이러스 효과는 배양묘의 성장상태를 관찰하면서 바이러스의 농도를 3차년도에 분석할 예정임.

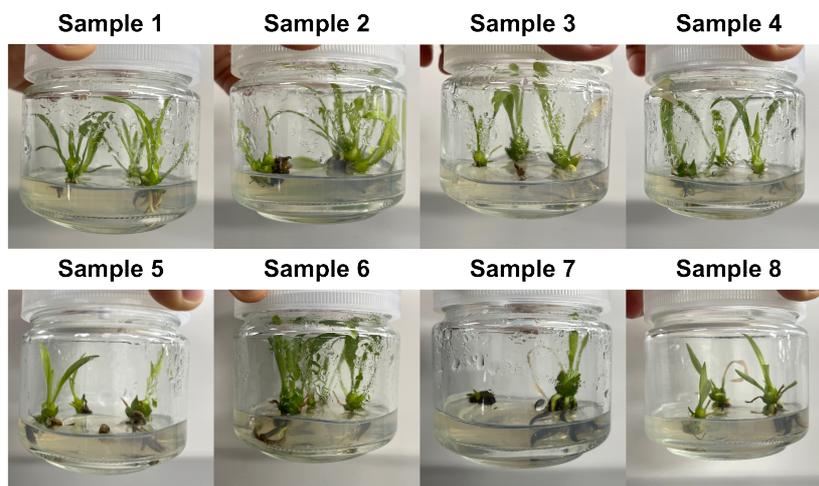
### <3차년도>

#### □ 백합 종구 대량생산 업체(농가)의 단계별 바이러스 감염 분석

백합 무병묘 생산 단계별 감염 바이러스의 검정을 통해 주요 감염하는 바이러스의 종류를 확인. 백합에 감염하는 바이러스에 대한 감염률 분석을 통해 효율적인 항바이러스제 처리 조건 확립

- 원원종, 인편 증식, 개화구 생산 등 단계별 주요 감염 바이러스 분석

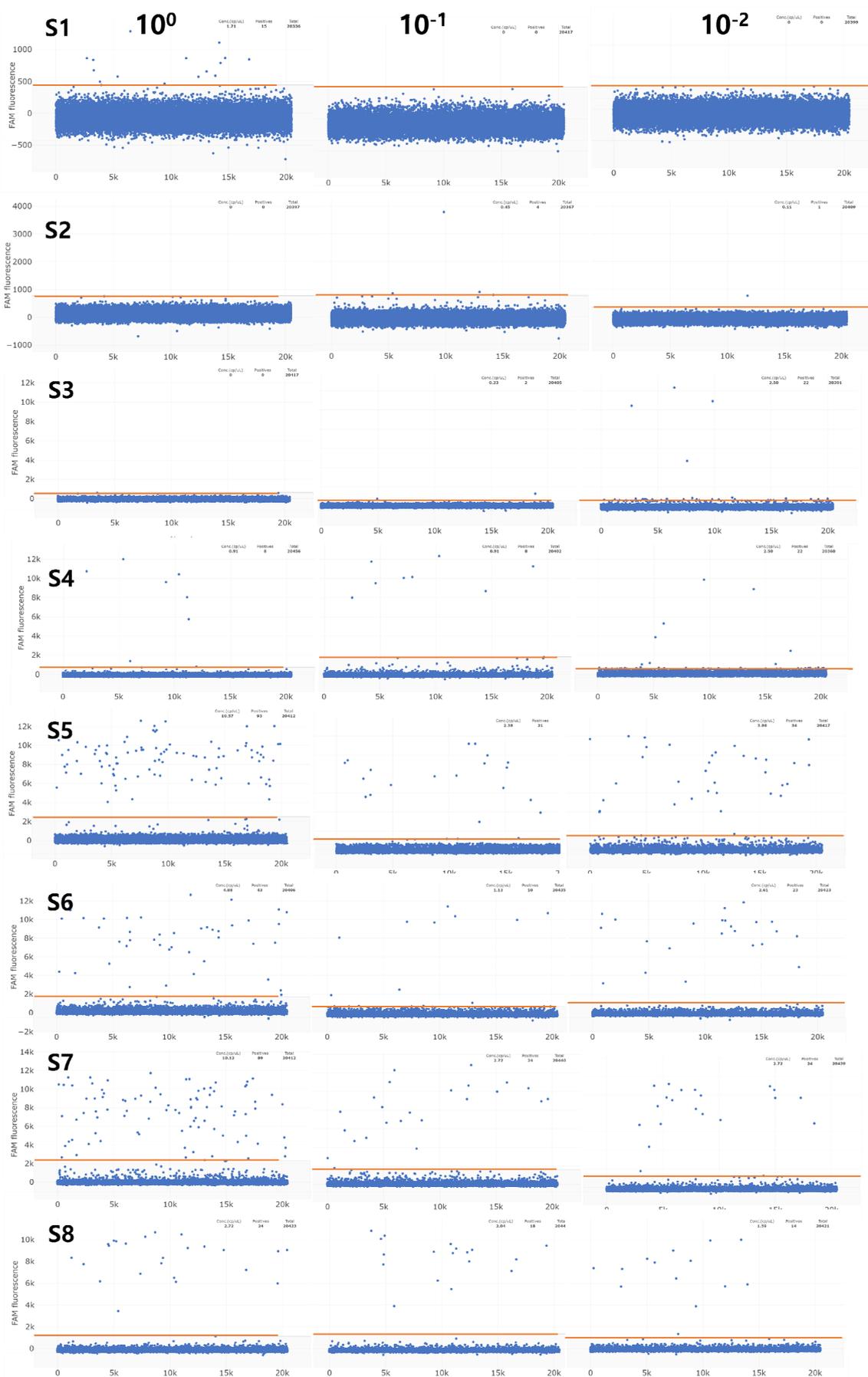
인편 증식 단계에서 RT-PCR, qRT-PCR로 검정되지 않은 바이러스에 대하여 더 정밀한 검정 방법인 digital PCR (dPCR)을 활용하여 주요 바이러스 (CMV, LMoV, LSV, PIAMV)에 대한 검정을 진행하였음.



<그림 92> 바이러스 검정하기 위한 인편 증식 단계 (조직 배양 단계)의 백합 샘플.

백합 생산 체계의 시작 단계인 인편 증식 단계 즉, 조직 배양 단계에서 주요 감염 바이러스(CMV, LMoV, LSV, PIAMV)의 감염을 확인하기 위한 조직 배양 백합 샘플들을 준비하였음<그림 92>. 조직 배양 단계에서 바이러스를 검정할 시, 주로 qRT-PCR을 사용하지만 추후 비대 배양 과정을 거친 후 바이러스가 다시 확인되는 경우가 빈번히 존재하기 때문에, 좀 더 정밀한 검정법인 digital

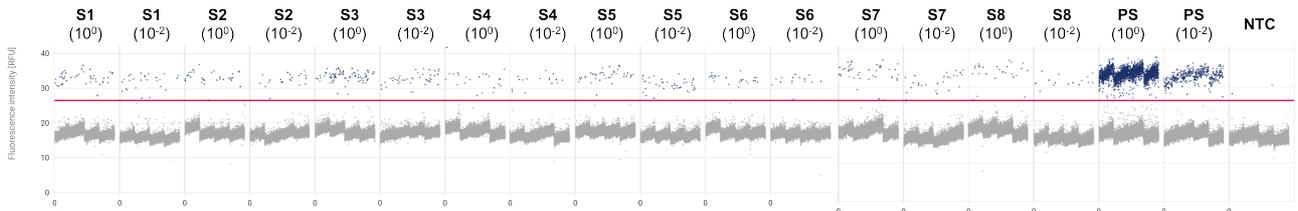
PCR을 활용하여 바이러스 검정을 진행하고자 함.



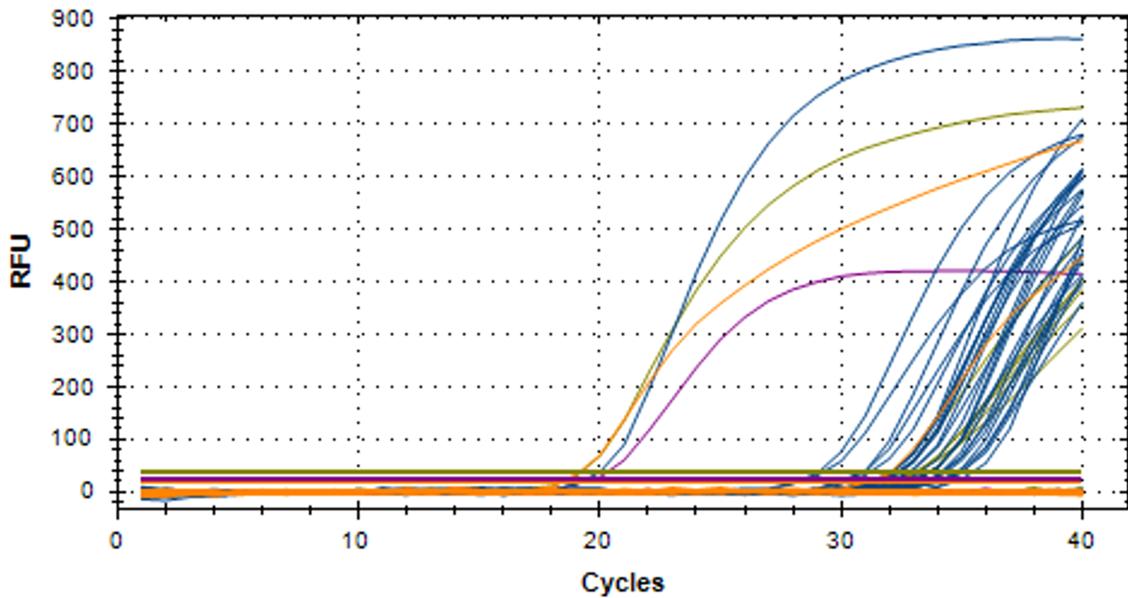
<그림 93> digital PCR을 활용한 백합 바이러스 (CMV) 검정.

dPCR을 통해 CMV를 제외한 다른 주요 바이러스들은 검정되지 않은 8개의 조직 배양 백합 (S1~S8)에서 백합의 주요 바이러스를 검정하였으며, 그 결과, dPCR을 활용하여 무병묘라고 확인된 백합에서 CMV 검정 시, 바이러스가 존재하는 것을 정량적으로 확인하였음<그림 93>. 바이러스 검정을  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  (1, 1/10, 1/100)의 희석액으로 진행하였을 때, 1/100의 희석액에서도 qRT-PCR로 무병묘로 확인된 백합에서도 CMV가 존재하는 것을 확인하였음.

건전한 조직배양 백합에서 효과적으로 바이러스의 검정을 확인하기 위해, 동일한 조직배양 백합에서 qRT-PCR과 dPCR의 검정 한계를 비교하였음. 조직배양 백합 내 주요 바이러스 중 dPCR로 검정이 되었던 CMV를 대상으로 진행하였음<그림 94,95>.



<그림 94> 건전 조직 배양 백합에서 RT-dPCR을 통한 CMV 검정.

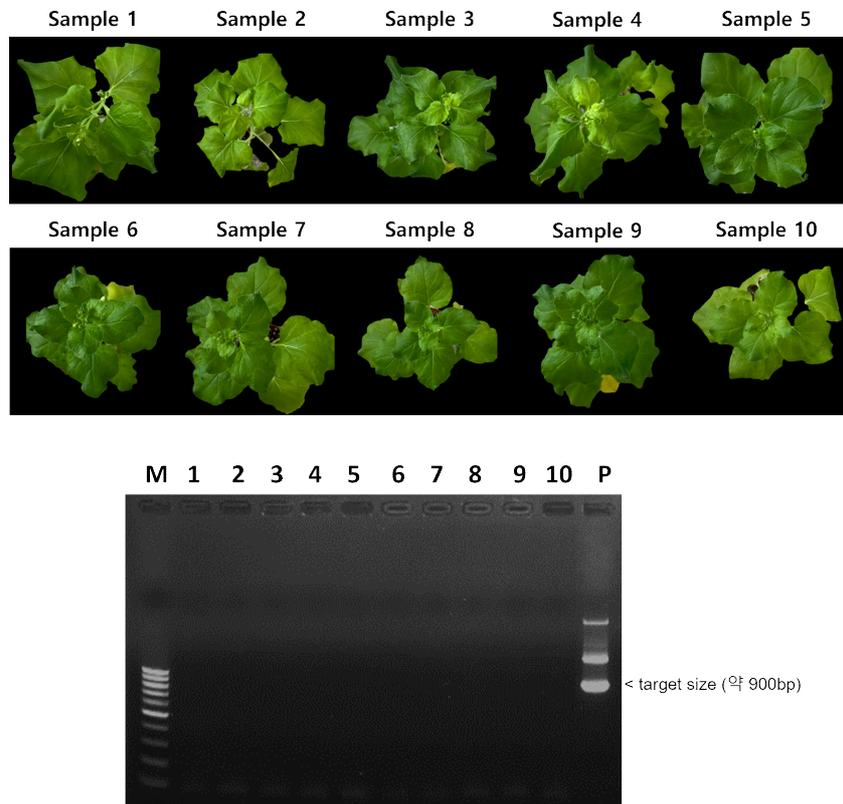


<그림 95> 건전 조직 배양 백합에서 qRT-PCR을 통한 주요바이러스 검정.

[표 12] RT-dPCR과 qRT-PCR의 CMV 검정 한계 비교

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Positive
dPCR (copies/uL)	2.285	1.684	4.048	1.221	2.094	1.338	2.366	1.457	119.6
qRT-PCR (Cq value)	30.94	29.25	32.35	32.32	32.15	31.20	29.07	30.92	19.99

Cq값에 따라 조직 배양된 백합 내 바이러스가 존재하는지 확신을 할 수 없는 결과인 qRT-PCR보다 가시적으로 바이러스의 존재가 확인되고 손쉽게 정량할 수 있는 dPCR을 통하여 더욱 정확한 검정을 진행할 수 있었음. 따라서, 효과적인 무병묘 생산체계를 구축하기 위한 첫 단계인 무병묘를 확인하는 단계에서 qRT-PCR보다는 더 정밀한 digital PCR을 사용이 필요하다고 판단됨.

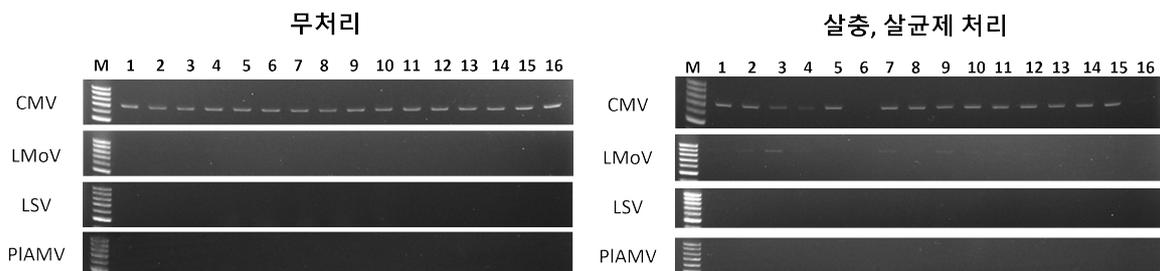


<그림 96> qRT-PCR과 RT-dPCR로 확인된 조직 배양 백합을 접종한 기주 식물의 병징 관찰과 바이러스 검정 결과.

digital PCR로 검정된 CMV가 실질적으로 기주식물이나 작물에서 발현되는지를 확인하기 위해, CMV의 기주식물 중 하나인 *Nicotiana benthamiana*에 조직배양 백합 잎의 즙액을 접종하였음. 접종된 *N.benthamiana*에서 바이러스 병징을 관찰하였으나 바이러스 병징은 보이지 않았으며, *N. benthamiana*의 잎으로 바이러스를 검정하였을 때도 바이러스는 검정되지 않았음<그림 96>. 이를 통해, 바이러스가 조직 배양되어 있는 백합에 존재하더라도 어느 정도의 수준 이하일 경우, 바이러스가 발현되지 않는 것을 확인할 수 있었음. 추후에 dPCR로만 검정된 백합 내에서 어느 정도의 수준까지의 백합을 무병묘라고 칭할 수 있는지 dPCR 결과에 대한 임계점을 알아보는 실험이 필요함.

- 수확, 세척, 선별 등 작업 공정에 따른 주요 바이러스 감염률 분석

백합 정식할 때, 냉장보관하는 구근을 꺼내어 관행으로 살균·살충제 처리를 통하여 백합 표면의 곰팡이와 세균을 방제한 뒤, 정식을 진행하는데, 이러한 세척과정이 바이러스 발현에 미치는 영향을 확인하였음. 살균·살충제를 처리하지 않은 처리구 (무처리구)와 살균·살충제를 처리한 처리구 (살균·살충제 처리구)를 정식하여 재배한 뒤, 재배된 백합의 잎을 통해 주요 감염 바이러스의 감염을 확인하였음.



<그림 97> 정식 전 선별 및 세척 작업 내 약제 처리를 통한 바이러스 검정 결과.

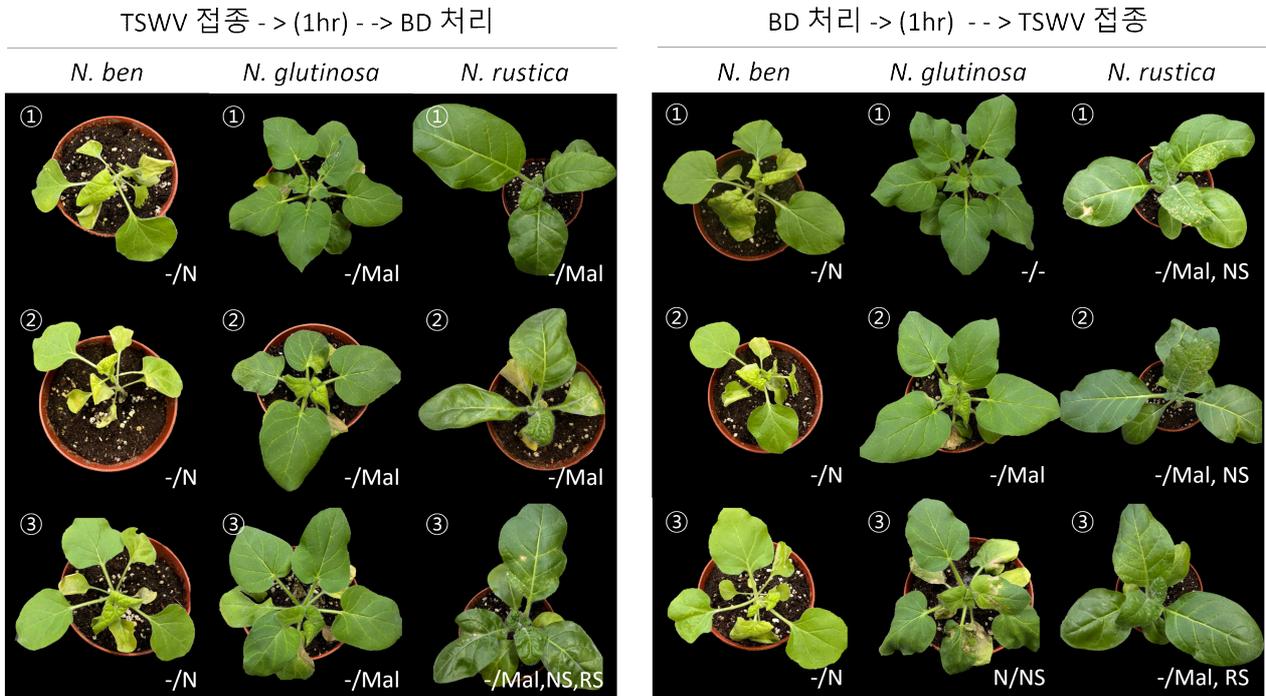
백합을 정식하기 전, 백합 구근에 침지 처리하는 살충제와 살균제를 처리하지 않고 바로 정식된 구근과 살충·살균제를 처리한 뒤 정식된 백합에서 주요 바이러스 4종에 대한 바이러스 감염을 RT-PCR을 통하여 확인하였음<그림 97>. 그 결과, 아무것도 처리하지 않고 정식한 무처리구에서는 LMoV, LSV, PIAMV의 감염은 확인할 수 없었으나, CMV는 모든 개체에 감염되어 있는 것을 확인하였음. 살충·살균제를 처리한 처리구에서도 LSV와 PIAMV는 확인되지 않았지만, 몇몇 개체에서 LMoV가 감염되어 있는 것을 확인하였으며, 무처리구와 비슷하게 대부분의 개체가 CMV에 감염되어 있음.

□ 감염 억제를 위한 항바이러스제 처리, 작업 공정 개선 등을 통한 감염 억제 효과 분석

백합 무병묘 생산 과정 내 항바이러스제 처리를 통한 효과 분석. 또한 무병묘 생산 후 백합 구근의 정식 전, 살균제(벤레이트티 또는 켈탄수화제)와 살충제(록손, 로고, 스타렉스, 피라니카 중 택 1)를 혼합해 침지 후 정식하는 과정 내에 항바이러스제의 동시 처리를 통해 바이러스의 감염을 추가 예방.

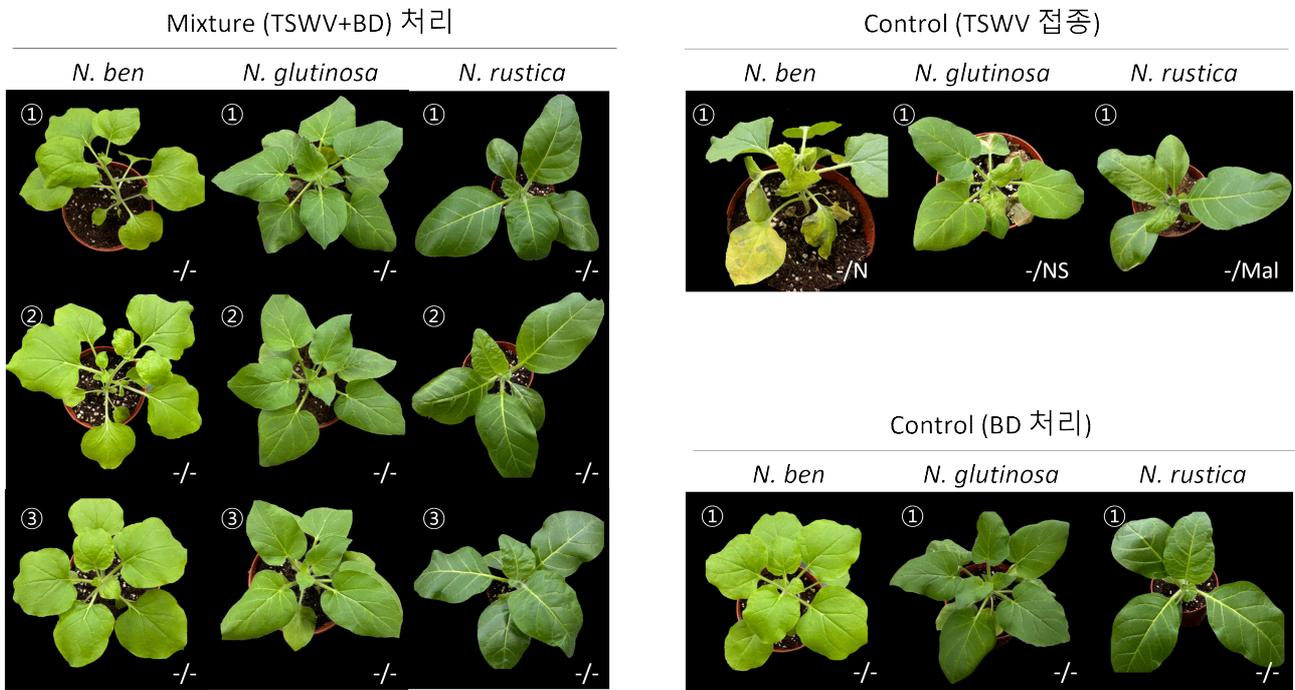
- 생산 단계와 작업 공정에 따른 바이러스 억제 전략 수립

생산 단계와 작업 공정 시에 바이러스를 억제하기 위한 약제를 처리하기 위해, 기주식물에 먼저 약제 처리를 진행하여 효과를 확인하였음. 처리 약제는 효모 기반인 BD Ferm biospray 제품을 사용하여 처리를 진행하였음.



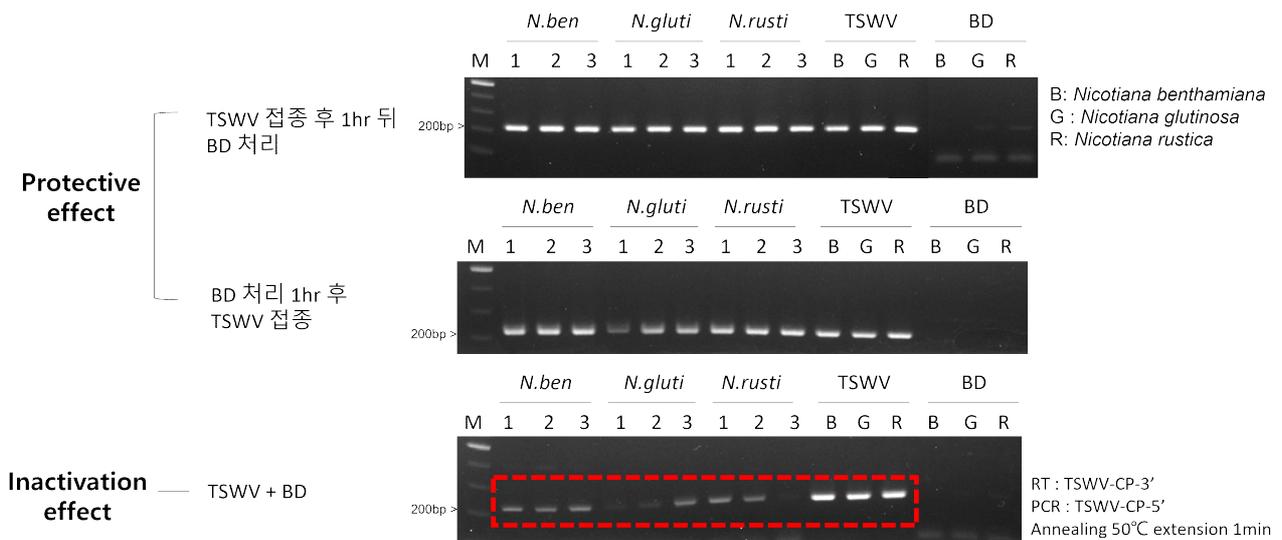
<그림 98> 방제 효과 방법으로 약제 처리한 기주식물 병징 관찰.

방제효과 (Protective effect)를 확인하기 위해, 바이러스를 접종한 후 약제 처리를 하거나, 약제 처리를 한 뒤 바이러스를 접종한 뒤 바이러스 (TSWV)의 병징의 발현을 확인하였음<그림 98>. 접종 또는 처리 후 13일이 지난 뒤 바이러스 병징을 관찰했을 때, 전·후처리 모두 바이러스 병징 발현 차이는 없음.



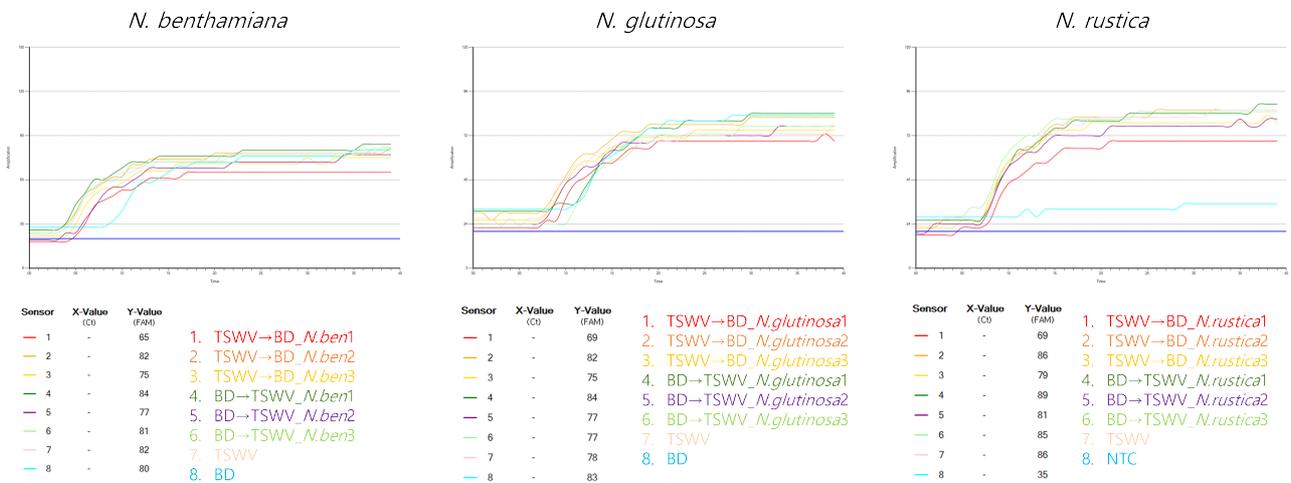
<그림 99> 불활성화 효과 방법으로 약제 처리한 기주식물 병징 관찰.

불활성화 효과 (Inactivation effect)를 확인하기 위해, 바이러스와 약제를 동시에 섞어서 혼합물 (mixture)을 만들어 접종하였을 때, 바이러스 병징의 발현을 확인하였음. Mixture (TSWV+BD)를 접종한 기주들 3반복 모두 병징을 발현하지 않음<그림 99>.



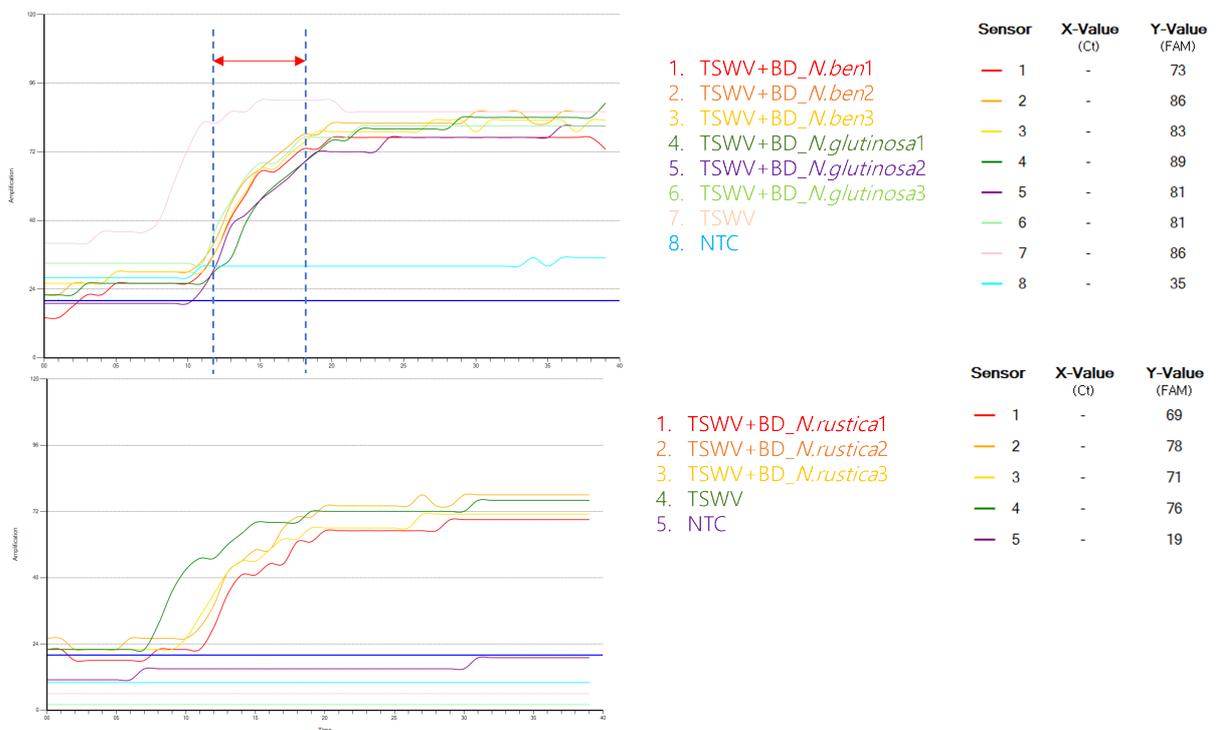
<그림 100> 방제 효과와 불활성화 효과 방법으로 약제 처리한 기주식물의 바이러스 검정.

방제 효과와 불활성화 효과를 확인하기 위해 접종했던 기주식물에서 바이러스 검정을 RT-PCR 방법으로 진행하였음. 방제 효과를 위해 약제 전·후 처리구에서는 기주식물 모두 바이러스의 농도 차이는 없는 것으로 확인되었음<그림 100>. 불활성화 효과를 위한 혼합물 처리구 (TSWV+BD)에서 바이러스 농도 차이가 있는 것으로 확인됨. 처리한 약제가 불활성화 효과에서 바이러스의 병징이 발현되는 것에 영향을 미치는 것으로 예상되었음.



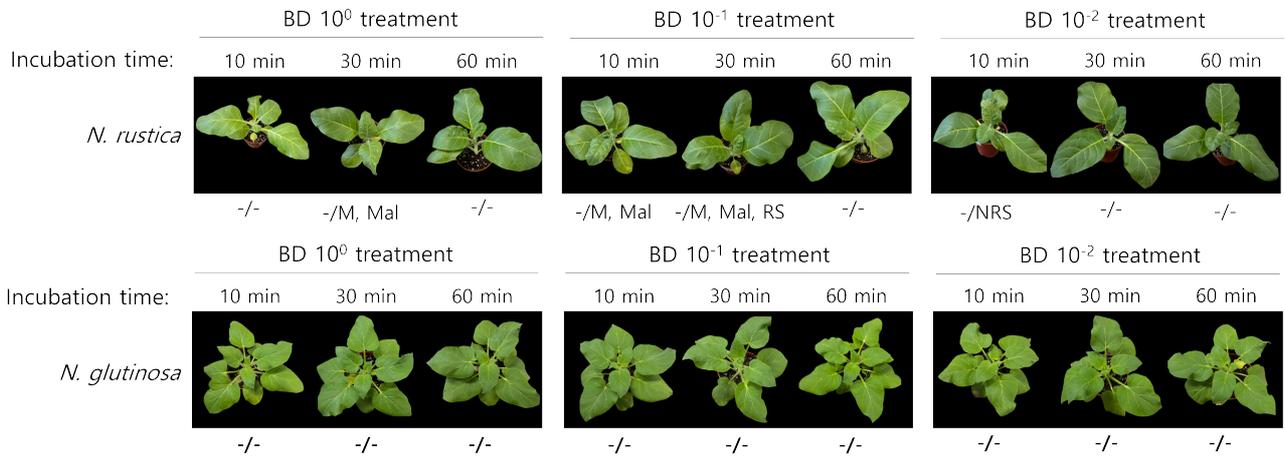
<그림 101> 방제 효과 방법으로 바이러스 약제 처리한 기주식물에서 바이러스 농도를 확인.

방제 효과를 보기 위해 약제를 전·후처리한 처리구에서 RT-PCR 검정 결과 모두 검정이 되어, 바이러스 농도에 차이가 있는지를 확인하기 위해 RT-LAMP를 진행하였음<그림 101>. 3종의 기주식물에서 모두 약제를 전·후처리한 처리구를 확인하였으나 약제를 전이나 후에 처리한 결과 모두 바이러스 농도의 큰 차이가 없었음. 이 결과를 통해 방제 효과에서는 본 약제가 큰 효과를 보이지 않는 것으로 확인됨.



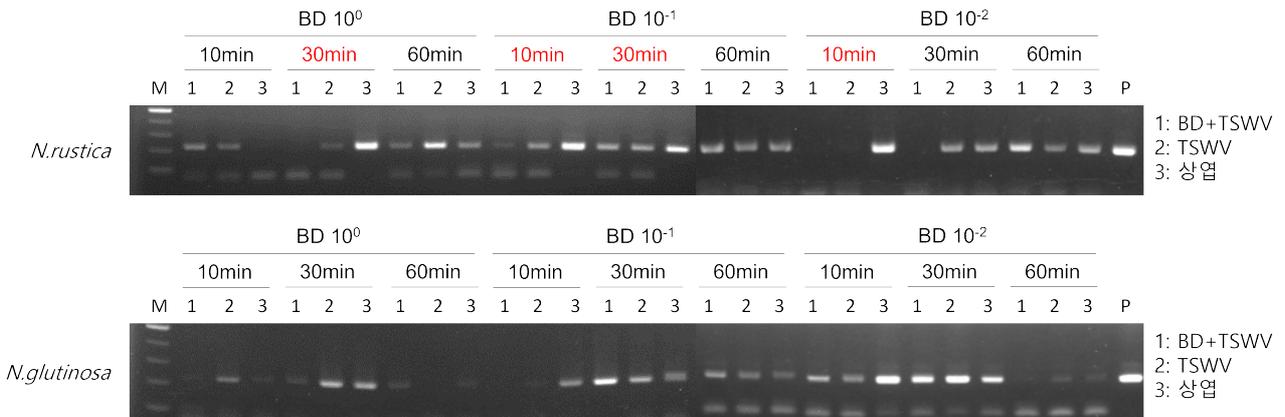
<그림 102> 불활성화 효과 방법으로 바이러스 약제 처리한 기주식물에서 바이러스 농도를 확인.

불활성화 효과를 보기 위해 약제를 혼합하여 동시에 처리한 처리구에서 RT-PCR 검정 결과 모두 검정이 되었지만, 전기영동 상에서 농도의 차이가 있는 것으로 확인되어 바이러스 농도에 차이가 있는지를 정확히 확인하기 위해 RT-LAMP를 진행하였음<그림 102>. 3종의 기주식물에서 모두 약제를 혼합하여 동시에 처리했을 때, 바이러스만 존재했을 때보다 확연히 농도가 낮은 것을 확인하였음.



<그림 103> 반엽법을 통해 바이러스 약제 처리한 기주식물의 바이러스 병징 발현 관찰.

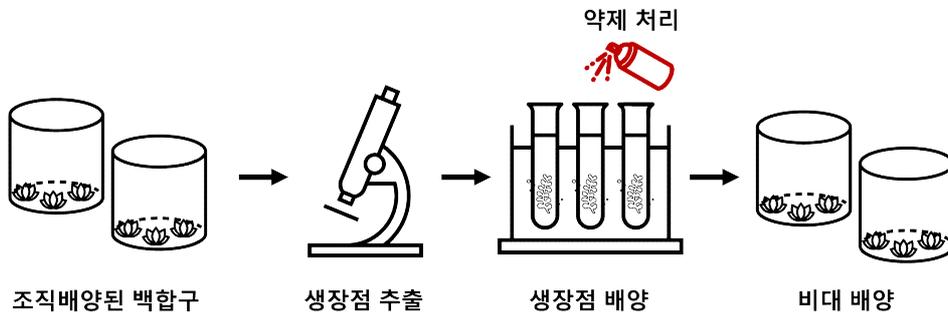
본 약제가 바이러스의 이동에도 영향을 미치는지를 확인하기 위해 반엽법을 진행하였음. 접종하는 잎의 반은 바이러스만, 다른 반쪽 잎은 바이러스와 약제를 혼합하여 처리하여 바이러스 병징의 발현을 확인하였음<그림 103>. 약제를 혼합하여 처리 시, 약제의 농도에 차이 ( $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ )를 주어 약제의 농도에도 영향을 미치는지를 동시에 확인하였음. 또한 불활성화 시간에도 마찬가지로 차이를 두어 불활성화 시간도 약제가 바이러스의 병징 발현이나 농도 축적에 영향을 미치는지를 확인하였음. 그 결과, *N.rustica*의 경우, 14일 후 상엽에  $10^0$  (30분 처리구,  $10^{-1}$  (10분 처리구, 30분 처리구),  $10^{-2}$  (10분 처리구)에서만 병징이 관찰됨. *N.glutinosa*의 경우, 14일 후 상엽에서 모두 바이러스 병징이 관찰되지 않음. 본 약제가 기주식물에 따라 적용되는 농도와 불활성화 시간이 다를 수 있음을 확인하였음.



붉은색: 바이러스 병징이 보이는 처리구

<그림 104> 반엽법을 활용한 바이러스 약제처리 RT-PCR 검정 결과.

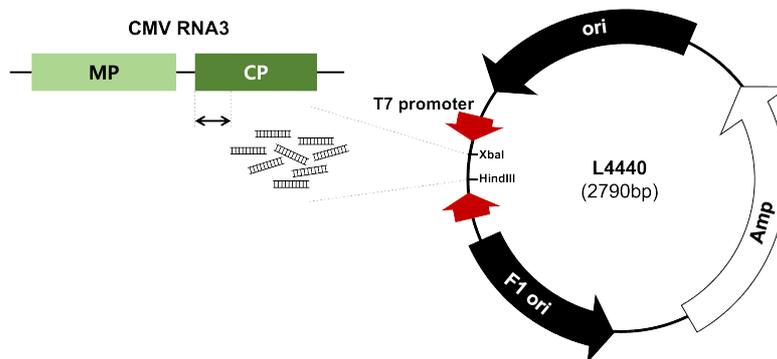
반엽법 결과, *N.rustica*의 경우에는 약제의 농도와 불활성화 시간에 따라 다양한 병징이 나타났으며, 병징이 안 나타나는 경우도 나타남. *N. glutinosa*의 경우, 모든 경우에서 병징이 보이지 않았기 때문에 두 종의 모든 개체에서 바이러스 검정 (RT-PCR)을 진행하였음<그림 104>. 바이러스 검정은 바이러스만 처리한 접종엽의 반쪽 잎, 바이러스와 약제를 동시에 처리한 접종엽의 반쪽 잎, 그리고 상엽을 확인하였음. RT-PCR 검정 결과, 두 종의 모든 개체에서 전신 감염하는 것을 확인하였으며 본 약제가 바이러스의 병징 발현에 영향을 주는 것으로 보임. BD spray 처리에 의한 불활성화 효과 (inactivation effect)는 바이러스의 병징 발현과 바이러스 농도 축적에 부분적으로 영향을 주는 것으로 확인됨.



<그림 105> 성장점 배양 내의 약제처리 과정 모식도.

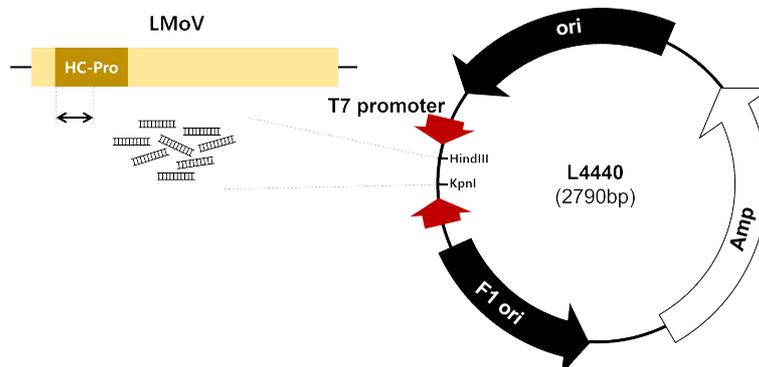
BD stray를 실질적으로 백합에 가장 효율이 높은 방식으로 처리하기 위해, 조직 배양된 백합 구를 성장점 추출하여 성장점으로 배양하는 단계에서 약제를 처리하였음<그림 105>. 또한, 성장점 배양된 백합의 구를 비대 배양하여 성장점 배양 시 검정된 바이러스의 농도가 증가하였는지도 확인하고자 하였음.

조직배양 백합 내에서도 백합에 감염하는 바이러스에 대해 방제하기 위해, RNA silencing 기작을 활용한 double stranded RNA (dsRNA)의 바이러스 방제 효과를 확인하였음. 대상 바이러스는 조직 배양 백합 내에서 많이 확인된 LMoV와 CMV를 대상으로 진행하였음.



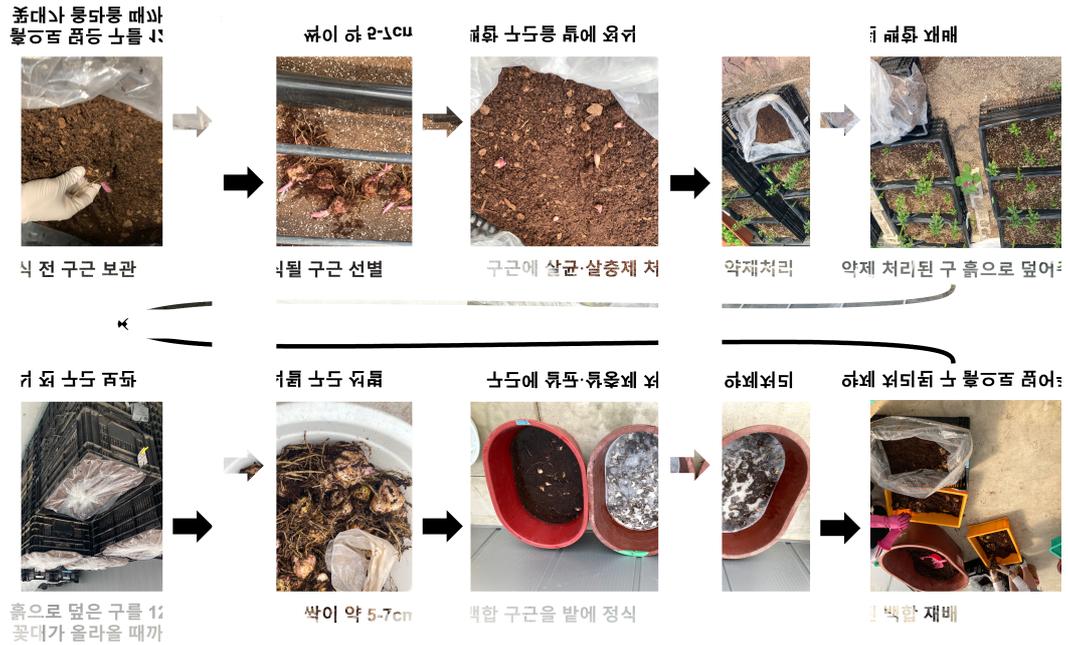
<그림 106> 조직배양 백합 내 CMV의 dsRNA처리를 위한 과정 모식도.

말단에 T7 promoter가 존재하는 L4440 벡터에 CMV의 외피단백질을 대상으로 약 230bp의 사이즈를 삽입하였음<그림 106>. HindIII와 XbaI를 태그한 프라이머를 제작하여 CMV 외피단백질의 5' 터미널 말단 부분을 타겟팅 하였음. 클로닝된 벡터를 증식하여 dsRNA 배양액을 만들어 조직 배양된 백합에 처리하였음.



<그림 107> 조직배양 백합 내 LMoV의 dsRNA처리를 위한 과정 모식도.

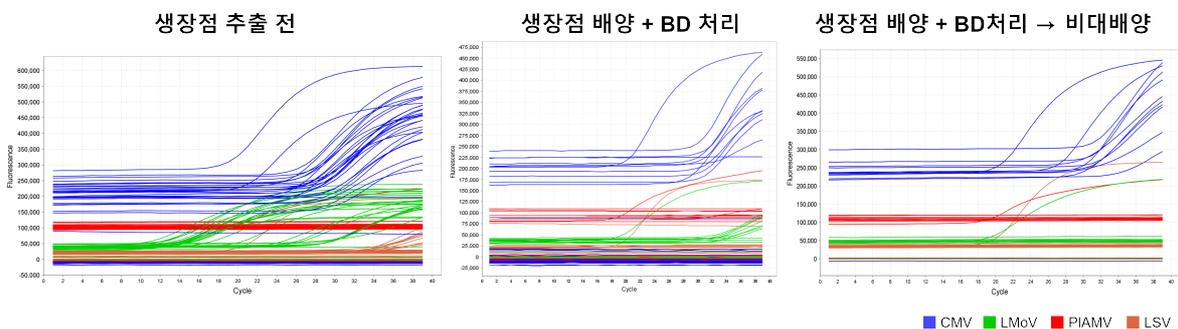
말단에 T7 promoter가 존재하는 L4440 벡터에 LMoV의 Viral suppressor of RNA silencing (VSRs)인 HC-Pro를 대상으로 약 280bp의 크기를 삽입하였음<그림 107>. HindIII와 KpnI를 태그한 프라이머를 제작하여 LMoV의 VSRs인 HC-Pro의 5' 터미널 말단 부분을 타겟팅 하였음. 클로닝된 벡터를 증식하여 dsRNA 배양액을 만들어 조직 배양된 백합에 처리하였음.



<그림 108> 백합 정식 전 관행과 선발 약제 처리 및 정식 과정.

구근을 정식하기 전, 일반적으로 구근에 붙어있는 세균이나 곰팡이를 제거하기 위해 살균·살충제를 처리하며 이 과정 내에서 백합 바이러스를 방제하기 위해 BD 물질을 함께 처리하여 바이러스의 억제력을 확인하고자 하였음<그림 108>. 또한, BD 물질만을 처리하여 백합의 성장에 영향을 주는지에 대해서도 확인하고자 하였음.

- 항바이러스제 등 감염 억제 기술 투입 효과 분석



<그림 109> 성장점 배양하는 단계 별 주요바이러스의 qRT-PCR 증폭 그래프.

성장점 배양을 한 뒤, 약제 처리하여 나타난 바이러스의 농도 변화를 qRT-PCR을 통하여 확인하였음. 성장점을 추출하기 전, CMV와 LMoV가 많이 감염되어 있는 것을 확인하였음<그림 109>. 성장점 배양하며 BD 약제를 동시에 처리한 뒤, 바이러스를 검정하였을 때, CMV나 LMoV의 축적량이 줄어든 것을 확인하였음. 또한, 추후 비대배양을 통해 백합 구의 크기를 키운 뒤, 바이러스의 축적량을 한 번 더 확인하였을 때, LMoV에서 특히 바이러스의 축적량이 많이 줄어든 결과를

보임.

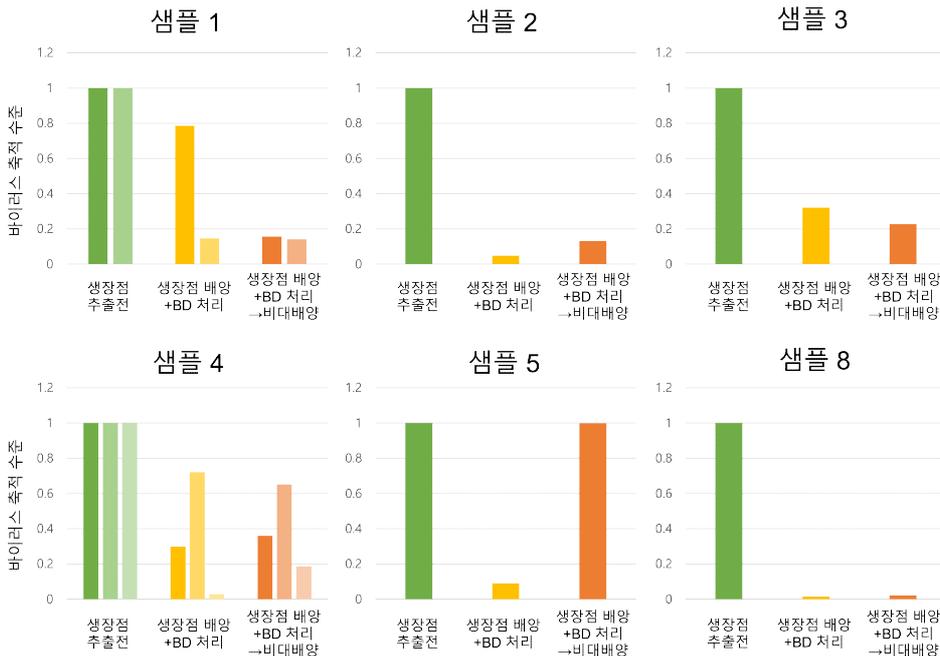
[표 13] 성장점 배양하는 단계 별 바이러스 Cq값

sample number	CMV Cq(ct)값			LMoV Cq(ct)값		
	성장점 추출 전	성장점 배양 + BD처리	성장점배양 +BD처리 → 비대배양	성장점 추출 전	성장점 배양 + BD처리	성장점배양 +BD처리 → 비대배양
1	29.108	29.455 31.876	31.778 31.931	26.988	37.772 36.643	not detected not detected
2	27.536	31.915	30.467	30.292	35.324	not detected
3	30.273	31.910	32.415	24.748	not detected	not detected
4	30.216	31.962 30.686 35.340	31.688 30.834 32.635	15.980	36.907 35.878 not detected	not detected not detected not detected
5*	27.491	30.966	27.493	16.441	38.833	not detected
6	29.793	-	-	16.897	-	-
7	29.103	-	-	31.133	-	-
8	25.415	31.516	30.881	15.580	35.486	not detected
PC	21.244	20.782	20.690	21.244	20.825	20.578

\* ) BD 약제를 처리하지 않은 처리구

qRT-PCR로 확인된 Cq값을 비교해 보았을 때, CMV에서는 성장점 추출 전과 비교하였을 때, 높은 수준은 아니지만, Cq값이 많이 증가하는 결과를 보임. LMoV의 결과, 비대 배양 단계에서는 완전히 바이러스를 검정할 수 없는 수준까지 바이러스가 방제되는 것을 확인하였음. 6번과 7번 시료의 경우, 성장점을 추출하였지만, 배양되지 않아 성장점 추출에 대한 숙련이 필요함.

### CMV qRT-PCR 검정 결과

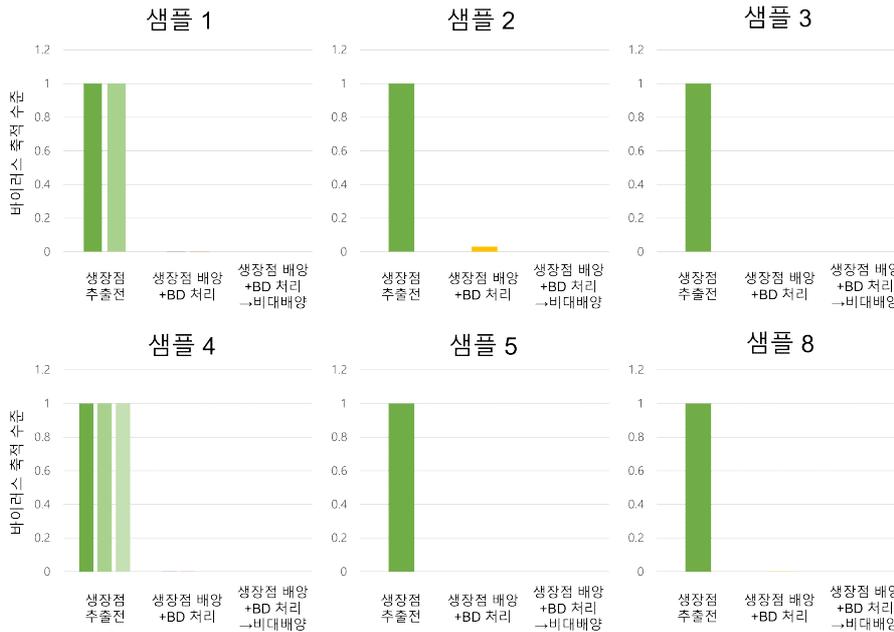


<그림 110> 성장점 추출 과정을 통한 바이러스 (CMV) 축적 수준 비교 분석.

CMV가 감염된 백합의 성장점 추출 전과 비교하였을 때, 대부분의 백합 시료에서 성장점 추출과 BD 물질 처리를 통해 성장점 추출 전에 비해 바이러스의 축적량이 감소하는 것을 확인하였음<그림 110>. 또한, 비대배양까지 완료한 뒤의 백합에서도 바이러스가 다시 증가하는 현상은 보이지 않았으며, CMV에 대해 약간의 방제 효과가 있는 것을 확인할 수 있었음. 5번 샘플의 경우, BD

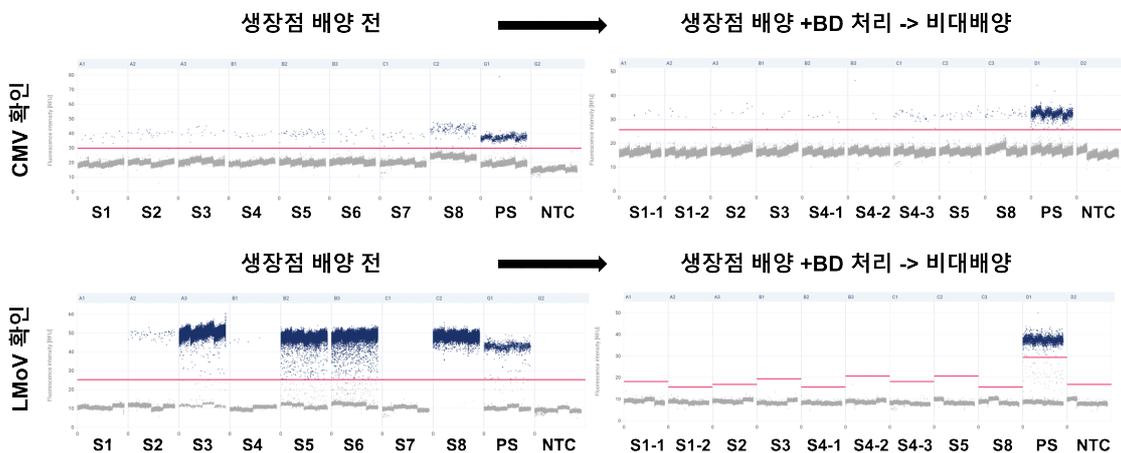
물질을 처리하지 않은 샘플로 비대 배양 후, 바이러스의 농도가 성장점 추출 전과 동일한 농도로 증가하는 것을 확인하였음. BD 물질이 CMV에 대한 방제 효과를 보이는 것으로 사려됨.

### LMoV qRT-PCR 검정 결과



<그림 111> 성장점 추출 과정을 통한 바이러스 (LMoV) 축적 수준 비교 분석.

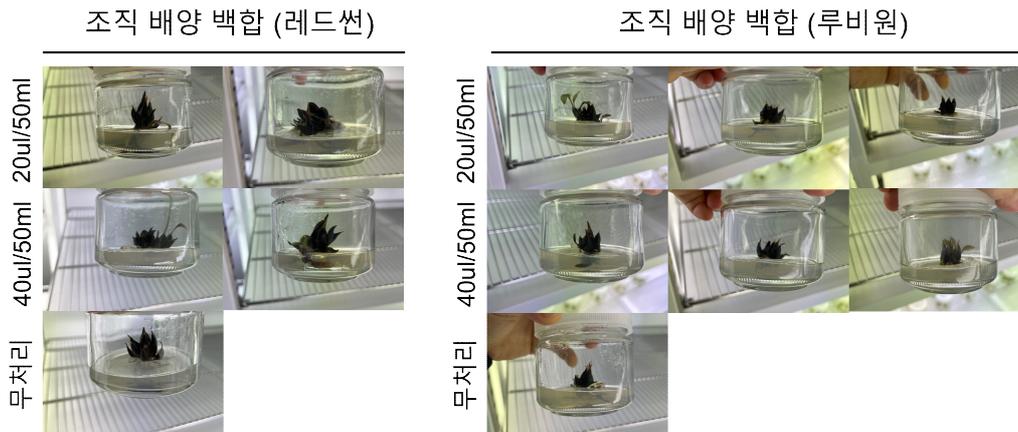
LMoV의 경우, 성장점 추출 전에 비해 성장점 배양과 BD 약제를 처리하였을 때, 바이러스의 축적량이 높은 수준으로 감소한 것을 확인하였음<그림 111>. 또한, 비대 배양을 진행 후 바이러스의 축적량 확인 결과에서는 바이러스를 완전히 검정할 수 없었음. 5번의 샘플은 성장점 추출 전 조직 배양된 백합에서 CMV와 LMoV가 동시에 감염했는데, 이 처리구는 BD를 처리하지 않았는데도 바이러스의 축적량이 감소한 것으로 보아 약제를 처리하지 않고 성장점 배양만으로도 LMoV의 축적량을 감소시키는 데 큰 영향을 미치는 것으로 보임. 성장점 배양을 마치고 비대 배양을 한 뒤에 LMoV는 완전히 바이러스의 축적을 확인 할 수 없어 성장점 배양을 통해 주요 바이러스 중 하나인 LMoV를 방제하는데 중요한 결과라고 판단됨.



<그림 112> 성장점 배양하는 단계 별 주요바이러스의 RT-dPCR 결과.

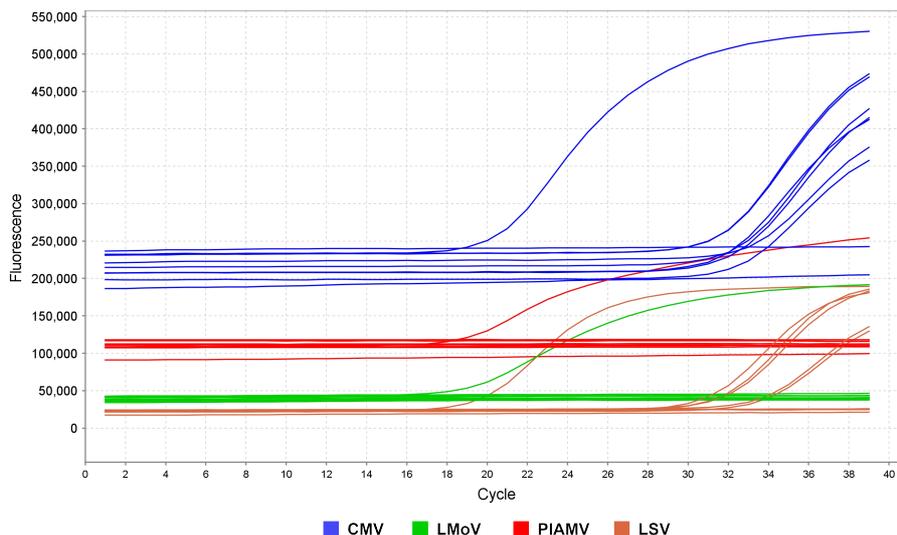
앞선 결과에 대한 바이러스를 정량적으로 확인하기 위해 dPCR을 진행하였음<그림 112>. CMV의 성장점 배양 전과 성장점 배양과 BD 약제 처리 후 비대 배양 후 결과를 비교하면 완전히 바이

러스가 제거되지는 않았지만, 축적량이 많이 감소한 것을 보임. LMoV의 성장점 배양 전과 성장점 배양과 BD 약제 처리 후 비대 배양 후 결과는 성장점 배양 전에 엄청난 양의 바이러스가 확인된 반면, 비대 배양까지 완료 후 바이러스를 확인했을 때 아무런 바이러스도 검정되지 않았음. dPCR의 결과도 qRT-PCR의 결과와 마찬가지로 LMoV가 감염된 조직 배양된 백합을 성장점 배양 했을 때, 바이러스의 축적이 완전히 억제되는 것을 확인하였음.



<그림 113> CMV dsRNA를 처리한 조직 배양 백합.

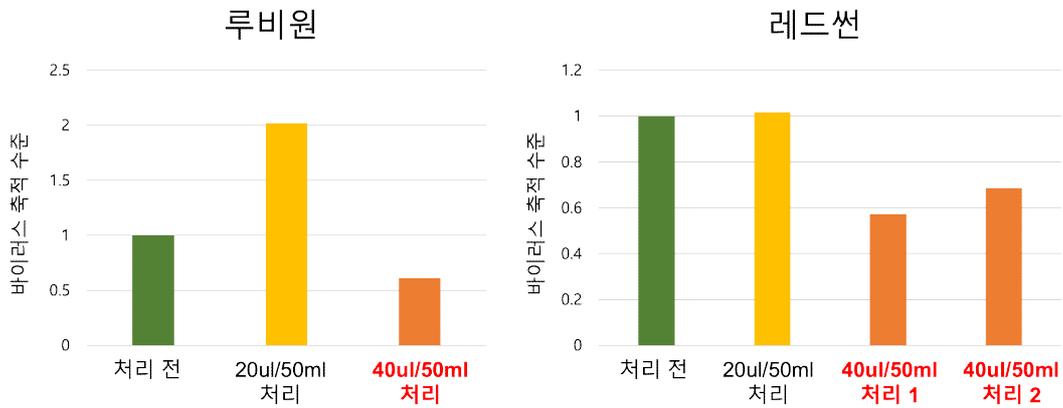
조직 배양 백합 내에서 바이러스를 방제하기 위해, CMV가 감염된 두 품종의 백합에 dsRNA를 처리하였음. 조직 배양구 내에서 dsRNA를 처리하였을 때, 구의 성장에는 피해를 끼치지 않고 바이러스를 억제하기 위한 적정 농도를 조절하기 위해 2가지 농도 (20ul/ml과 40ul/ml)를 처리하였음. 배양 과정을 통해 성장한 잎을 통하여 바이러스의 축적량을 확인하였음.



<그림 114> qRT-PCR을 통해 조직 배양 백합 내 dsRNA처리 결과 확인.

CMV dsRNA를 처리한 조직 배양 백합 구의 성장한 잎으로 RNA를 추출하여 qRT-PCR 기법으로 CMV의 발현량을 확인하였음. 루비원 품종의 20ul/50ml, 40ul/50ml 1개체씩과 무처리군, 레드썸 품종의 20ul/50ml, 40ul/50ml 2개체씩과 무처리군으로 바이러스 발현량을 확인하였음<그림 113>. 양성 대조군 (positive control) 대비 증폭곡선 (amplification plot)의 자세한 차이를 확인하기 어려워 바이러스의 축적 수준에 대한 그래프로 표현하였음<그림 114>.

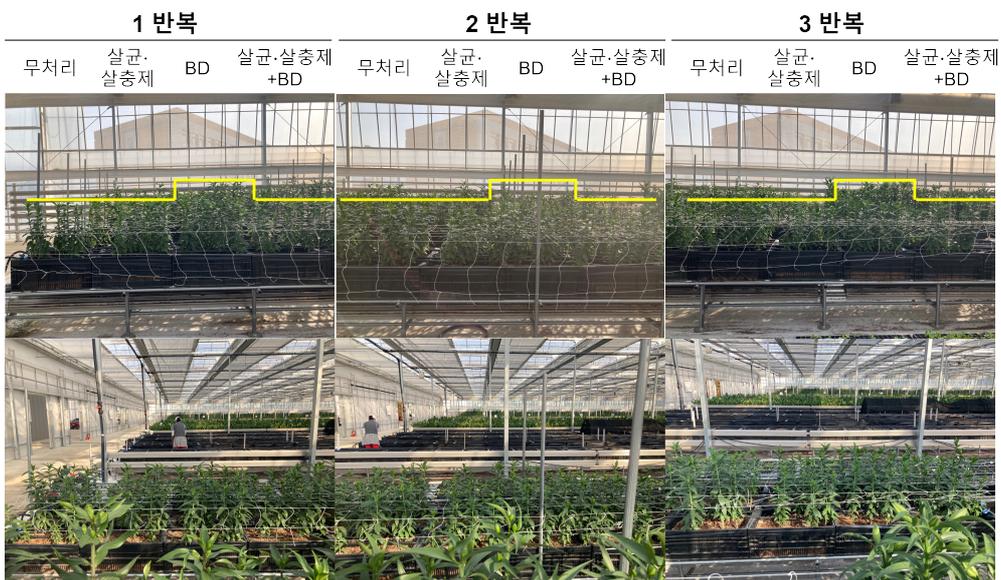
## CMV dsRNA 처리 결과



<그림 115> 조직 배양 백합 내 dsRNA처리를 통한 바이러스 축적 수준 확인.

qRT-PCR의 결과를 바탕으로 조직 배양 백합에 dsRNA를 처리한 처리구의 CMV의 축적 수준을 확인하였음<그림 115>. 루비원 품종의 경우, 처리전의 바이러스 축적 수준에 비해 dsRNA를 20ul/50ml로 처리한 처리구의 농도가 오히려 증가하는 추세를 보임. 반대로 40ul/50ml의 농도로 처리한 처리구는 바이러스의 축적이 처리 전에 비해 줄어드는 것으로 확인됨. 레드션의 품종도 루비원과 비슷한 결과를 보였는데, 아무것도 처리하지 않은 처리구와 비교했을 때, 40ul/50ml 농도의 처리구에서 바이러스의 축적이 억제되는 결과를 보임. 이를 통해, 조직 배양 내에서 40ul/50ml의 농도로 dsRNA를 처리했을 경우 CMV의 바이러스 축적 수준을 어느 수준까지 억제할 수 있을 것으로 사려됨.

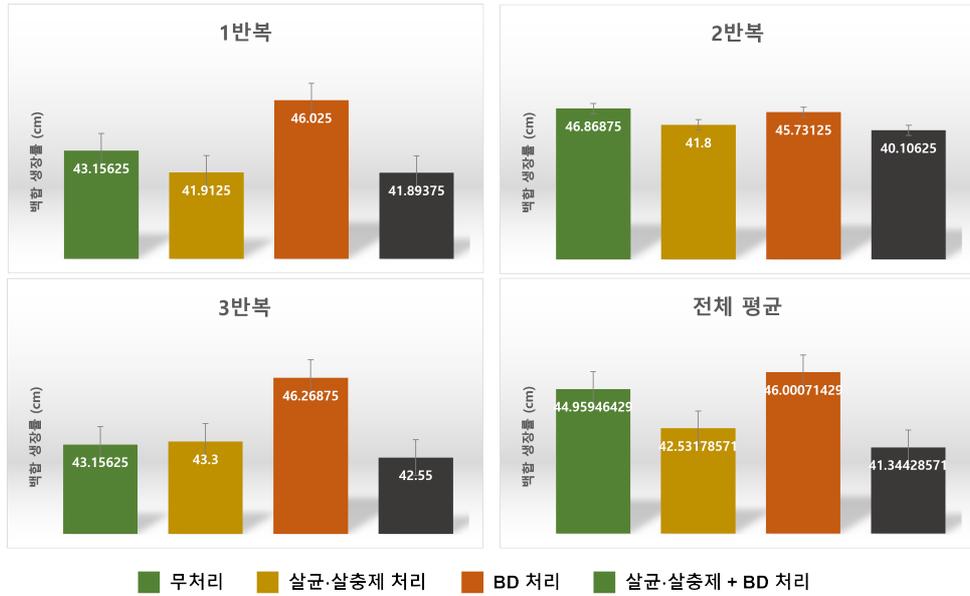
최종적으로 기내에서 배양된 구근을 정식하기 전, 관행인 살균제와 살충제를 처리하는 과정에서 항바이러스 약제 (BD 물질)를 함께 처리하여 백합의 성장에 어떠한 영향을 끼치는지를 확인함 <그림 116>.



<그림 116> 정식한 백합의 처리구에 따른 성장 비교.

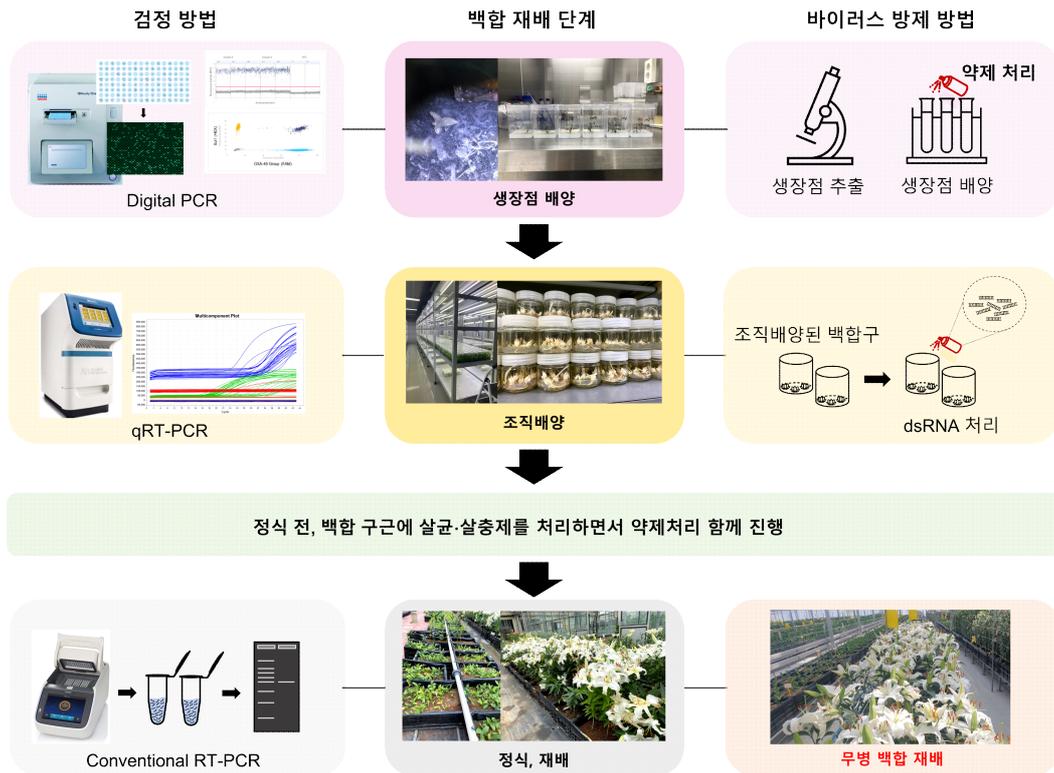
무처리, 살균·살충제 처리구, BD 처리구와 살균·살충제와 BD 동시 처리구로 총 4개의 처리구로 실험을 진행하였음. 각각을 물질 처리 후, 백합의 바이러스의 바이러스 병징을 확인했을 때, 바이

러스로 보이는 병징은 모든 처리구에서 보이지 않았음. 가시적으로 보았을 때, BD 처리구에서 특이하게 다른 처리구에 비해 높은 생장을 보임<그림 117>.



<그림 117> 백합 정식 전 다양한 처리구에 따른 백합 생장률 분석.

백합이 꽃봉오리를 맺고 절화를 하기 전, 백합의 생장 길이를 재어 처리구가 백합 생장에 영향을 주는지 확인하였음. 백합의 생장률 확인 결과, 3번의 반복수 모두 BD 약제처리를 하였을 때 모두 높은 생장률을 보였음.



<그림 118> 백합 무병묘 향상을 위한 생산 체계 구축 모식도.

백합 무병묘를 생산하기 위해, 백합의 재배 단계별 가장 적합한 검정 방법과 이에 따른 바이러스 방제 방법을 확립하였음<그림 118>. 백합의 재배 단계는 3단계로 나뉘서 생장점 배양 단계, 조직

배양 단계 그리고 정식으로 나뉨. 생장점 배양 단계에서 dPCR, 조직 배양 단계에서 qRT-PCR, 그리고 정식 단계에서는 conventional PCR 검정일 때, 각각의 단계에서 가장 수월히 바이러스를 확인하는 것으로 사려됨. 또한, 각각의 단계별 바이러스가 검출되었을 시, 단계별 맞춤형 억제 (생장점 배양 단계-억제 처리, 조직 배양 단계-dsRNA 처리) 를 처리함으로써 바이러스가 증식하는 것을 방지할 수 있음. 최종적으로 기내에서 배양된 백합을 정식하기 전, 살균·살충제와 동시에 약제를 함께 처리하면 정식한 뒤, 백합을 재배하는 과정에서 바이러스를 방지할 수 있음. 이러한 과정을 통해 최종적인 바이러스 무병원 백합을 재배하는 생산체계를 구축하였음.

**다. 제2협동기관 (충남농업기술원):**

**<1차년도>**

**1. 국화 육묘업체 국화왜화바이로이드 감염실태 조사**

가. 재료 및 방법

국화육묘업체는 경기도 육묘업체와 충남 육묘업체를 대상으로 국화품종에 대해서 국화왜화바이로이드 (CSVd) 검사를 수행하였음. 샘플 전처리방법은 2ml 튜브에 lysis buffer 500 $\mu$ l 담은 다음 샘플을 섞은 후 Binding buffer 500 $\mu$ l 담고 vortex 함. 그 후에 13,000rpm/10분 원심분리 한 후 spin column에 넣고 8000rpm으로 3분간 원심 분리함. 여과액은 버리고 tube를 교체하고 wash buffer A 500 $\mu$ l 담은 후 8000rpm에서 3분 원심 분리함. Wash buffer B 500 $\mu$ l 담은 후 13,000rpm에서 3분 원심 분리함. Spin column을 새로운 1.5ml tube로 옮긴 후 Elution buffer 30 $\mu$ l를 spin column에 넣고, 실온에 1분간 방치한 후에 8000rpm에서 3분 원심분리하여 DNA를 확보함. RT-PCR 조건은 50 $^{\circ}$ C 30분 → 95 $^{\circ}$ C 2분 → (95 $^{\circ}$ C 30초, 60 $^{\circ}$ C 10초, 72 $^{\circ}$ C 30초), 35cycle → 72 $^{\circ}$ C 5분으로 진행함.

[표 14] 국화왜화바이로이드(CSVd)프라이머

	Sequences (5'-->3')	Target size(bp)	Tm( $^{\circ}$ C)
CSVd-1P CSVd-1M	F: CTTAGGACCCCACTCCTGCG R: CCGCGATCTCGTCGGACTTC	349	53

나. 연구결과

내수시장 및 수출용으로 인기 있는 품종들 중 육안으로 보았을 때 건전하고 우량한 삽수를 채집하여 삽목 후 30일 동안 생육시킨 후 후 16품종 총 156개체에 대하여 RT-PCR법을 이용한 바이로이드 검정을 실시하였음. 경기도 육묘업체의 국화왜화바이로이드 감염률은 61.4%로 이고 충남 육묘업체는 48%였다. 이와 같이 국화왜화바이로이드 감염율은 평균적으로 54.7%를 나타내었음.

[표 15] 국화 육묘업체 바이로이드 감염율 조사

채집지	품종	개체수	감염개체수	국화왜화바이로이드 감염율(%)
경기도 연천 국화육묘업체	옐로우캡	9	7	78
	엑스포트화이트	10	9	90
	드림라운드	10	6	60
	에스루비	8	4	50
	펄키스타	10	1	10
	퍼팩트	10	8	80
	소계	57	35	61.4
충남 예산 국 화육묘업체	금수	10	1	10
	그린소국	10	4	40
	우슬라매직	10	8	80
	슈퍼풍풍	10	1	10

	일월	10	3	30
	샤샤	10	1	10
	화이트캡	10	2	20
	슈퍼스타	10	8	80
	살롯트	10	10	100
	다이아몬드	9	9	100
	소계	99	47	48.0
평균감염률				54.7

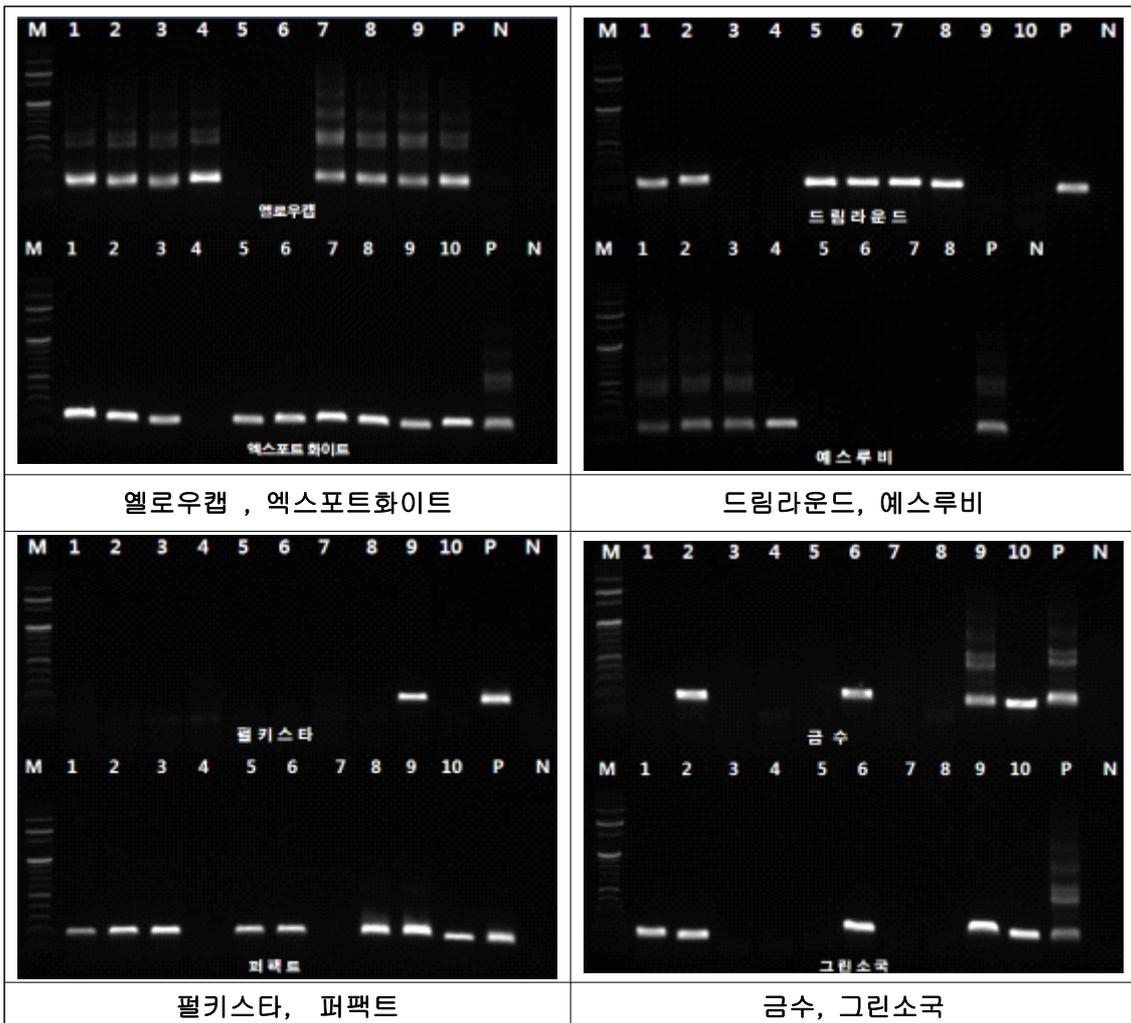


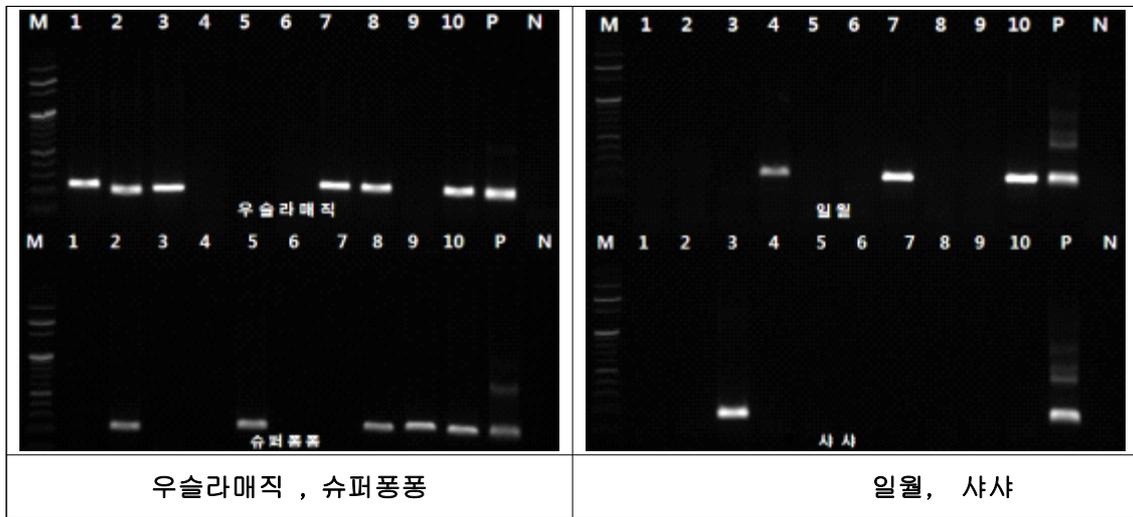
< 경기도 육묘업체 >



< 충남 육묘업체 >

<그림 119> 국화 육묘업체 모주포 전경.





<그림 120> 육묘업체 재배품종에 대한 RT-PCR 분석 결과.

## 2. 국화 무병묘 생산을 위한 성장점 배양

### 가. 재료 및 방법

국화 내수시장 및 수출시장 타겟 육성품종과 주력품종 성장점 배양을 하기 위해 식물체 유기를 위해서 성장점 배양, 증식배양, 발근 및 마디 증식 배양법을 이용하였음. 성장점배양은 배지 MS + 2.0mg/L kinetin + 0.2mg/L NAA, 1.0mg/L BA + 0.1mg/L IAA 배지를 이용하였고, 증식배양은 MS + 2.0mg/L kinetin + 0.02mg/L NAA 와 MS + 1.0mg/L BA + 1.0mg/L NAA을 이용하였음. 발근 및 마디 증식 배양은 MS 기본 배지를 이용하였고 배양실 24℃, 16시간 일장조건에서 수행하였음.

### 나. 연구결과

국내 및 수출시장 타겟 대상 품종으로 지정한 보라미, 펄키스타, 코랄킹 등을 품종별로 성장점 배양을 실시하여, 보라미 294개 개체를 포함하여 총 1,329개 개체가 성장하고 있음.

이들 개체 중 성장점 배양으로 성장한 보라미 121개 개체를 포함한 총 266개 개체는 증식 배지에서 배양 중이며, 증식 배양한 개체 중 8개 개체는 발근 배지에 옮겨 발근 배양하였음. 발근 후 다 자란 개체의 마디를 일부 잘라서 마디 증식 중인 개체는 보라미 72개 개체를 포함하여 총 134개 개체이며, 바이로이드 검정을 통해 건전한 무병묘 개체는 순화함.

[표 16] 성장점 배양중인 개체수

구분	시험품종 배양 개체수											
합계	보라미	펄키스타	코랄킹	금수	퍼펙트	에스루비	엘도라	레이나	큐티미	우아미	에스홀릭	U336
1,329	294	154	58	98	175	154	35	24	49	14	259	15

[표 17] 증식 배양중인 개체수

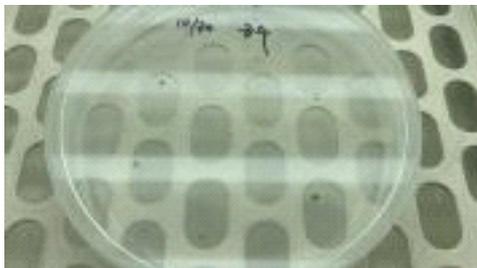
구분	시험 대상 품종				기타 품종		
품종명	보라미	코랄킹	퍼펙트	에스루비	큐티미	우아미	U336
배양 개체수	121	4	15	36	64	14	12

[표 18] 발근 배양중인 개체수

구분	시험 대상 품종	
품종명	보라미	에스 루비
배양 개체수	4	4

[표 19] 마디 증식 배양중인 개체수

구분	시험 대상 품종		기타 품종		
품종명	보라미	에스루비	큐티미	우아미	하이얀
배양 개체수	72	8	12	36	6



생장점 배양



증식 배양



발근 배양



마디 증식 배양

<그림 121> 국화 품종별 생장점, 증식 및 발근 배양

### 3. 건전한 개체 무병묘 선발

#### 가. 재료 및 방법

경기도 육묘업체에서 이병증상이 없는 건전한 국화모주를 9품종 3주씩 총 27주를 화훼연구소 온실에서 모주로 지정한 다음 국화화화바이로이드 검사를 주기적으로 실시함.

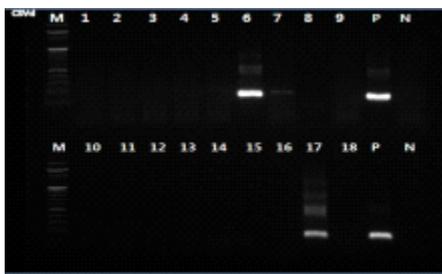
[표 20] 이병증상이 없는 건전한 국화모주

구분	품종	보유개수(분)	초장(cm)	엽수(개)
1	펠키스타	3	22.2	16
2	에스루비	3	17.4	17
3	우슬라매직	3	18.3	18
4	보라미	3	16.0	20

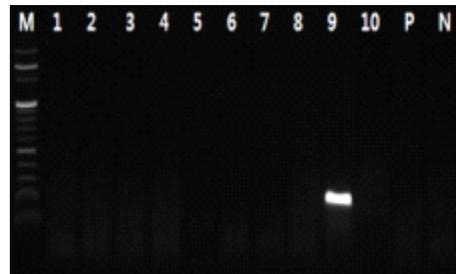
5	퍼팩트	3	18.6	25
6	포드	3	18.2	16
7	에스홀릭	3	15.3	24
8	화이트캡	3	20.4	20
9	옐로우캡	3	22.1	24

나. 연구결과

국화모주 9품종에 대해 3주씩 1회 검사 후 바이로이드 검출된 시료는 재검정을 실시하였고, 그 결과 보라미 3번 화분과 포드 2번화분 감염주로 판명되어 모주에서 제거함.

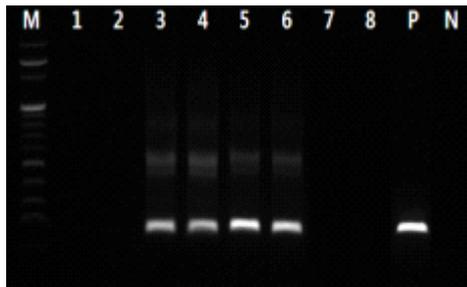


1~3 예스루비, 4~6 보라미  
7~9 화이트캡, 10~12 에스홀릭  
13~15 옐로우캡, 16~18 포드



1~3 퍼팩트, 4~6 우슬라매직  
7~9 펄키스타

1차 실험결과 바이로이드 검출된 4품종 재검정 결과



1~2 화이트캡1, 3~4 보라미3  
5~6 포드2, 7~8 펄키스타3

<그림 122> 국화화바이로이드 유무검정

표 21에서 선발된 모주와 화훼연구소 보유 품종, 농가에서 삽수 채취 후 삽목 하여 30일 동안 생육 후, 14품종의 삽목묘에 대하여 RT-PCR법을 이용한 바이로이드 검정을 669회 실시하였음. 감염주를 제외 시키고 생육상태가 좋은 삽목묘를 선발하여 총 233주의 무병묘를 선발하였음.

[표 21] 바이로이드 검정현황

구분	품종	기원	검정횟수	감염개체수	선발 무병묘개체수
1	펄키스타	경기도 연천	59	20	37
2	예스루비	연천, 화훼연구소	99	59	24
3	옐로우캡	경기도 연천	63	29	6
4	우슬라매직	경기도 연천	83	25	6
5	보라미	연천, 화훼연구소	71	33	20

6	퍼펙트	경기도 연천	48	11	24
7	포드	경기도 연천	53	40	10
8	에스홀릭	경기도 연천, 화훼연구소	44	14	23
9	화이트캡	경기도 연천	20	2	18
10	코랄킹	세종대	24	0	10
11	레이나	세종대	20	0	10
12	U366	세종대	10	0	10
13	엘도라	세종대	15	0	10
14	씨니랑	화훼연구소	60	30	25
합 계			669	263	233

무병묘 증식 과정 및 품종별 모주에서 바이로이드검정 후 선발된 삽수를 정식한 다음 각 주마다 번호를 부여하였음. 예를 들어 펠키스타1, 펠키스타2, 펠키스타3 등으로 표기하였고, 주기적으로 2~4회 왜화바이로이드 검정하였으며 모주에서 왜화바이로이드가 검출될 경우 그 모주에서 채취한 삽수는 폐기하여 최대한 건전한 모주를 233개체를 확보하였음.

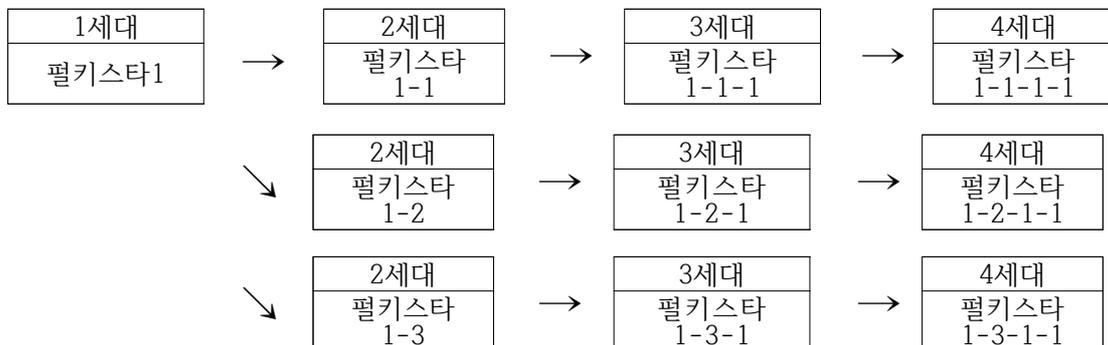


기본묘 모주증식



기본묘 모주활용

<그림 123> 무병주 생산라인 번호 부여 전경



<그림 124> 무병묘 증식 통한 번호 부여 방법

펠키스타1은 선발된 모주에서 채취한 삽수이며, 펠키스타1-1은 펠키스타1에서 1회 채취하고, 펠키스

타1-2는 펄키스타1에서 2회 채취한 것을 의미함. 화분에 정식 후 무병묘 확인을 위해 모든 무병묘에 대하여 바이로이드 검정 1회씩 진행하였고 현재 보유 무병묘 중 바이로이드 검출된 품종은 없었음. 바이로이드 검출된 품종은 모든 세대를 제거하여 안정된 무병묘 체계를 확립하고자 함. 포드, 퍼팩트 등 14종에 대해서 등 1세대에서는 238주, 2세대에서는 202주, 3세대에서는 67주를 확보했으며, 보라미, 펄키스타, 코랄킹이 3세대까지 모주를 확보하여 이것을 기반으로 차년도에 대량생산을 할 계획임[표 22].

[표 22] 왜화바이로이드검정에 의한 무병묘 보유현황

구분	품종	1세대	2세대	3세대	합계
1	포드	10	10	-	20
2	퍼팩트	24	24	-	48
3	에스홀릭	23	23	-	46
4	보라미	20	20	20	60
5	에스루비	24	24	-	48
6	펄키스타	37	37	37	111
7	코랄킹	10	20	10	40
8	레이나	10	6	-	16
9	엘도라	10	10	-	20
10	u366	10	10	-	20
11	씨니랑	25	-	-	25
12	화이트캡	18	18		36
13	옐로우캡	6	-	-	6
14	우슬라매직	6	-	-	6
합계		233	202	67	502

## <2차년도>

### 1. 국화 육묘업체 바이로이드 및 바이러스 감염실태 조사

#### 가. 재료 및 방법

경기도 육묘업체와 충남 육묘업체를 대상으로 바이러스 검정을 수행하였음. 육묘업체에서 삽수 채취 후 삽목 후 30일간 생육 하여 RT-PCR법을 이용하여 CSVd, TSWV, CSNV CChMVd, CVB 바이러스 검사를 수행하였음. 샘플 전 처리 방법은 2ml 튜브에 lysis buffer 500 $\mu$ l 담은 다음 샘플을 섞은 후 Binding buffer 500 $\mu$ l 담고 vortex 하였음. 그 후에 13,000rpm/10분 원심분리 한 후 spin column에 넣고 8000rpm으로 3분간 원심분리 하였음. 여과액은 버리고 tube를 교체하고 wash buffer A 500 $\mu$ l 담은 후 8,000rpm에서 3분 원심분리한 후, wash buffer B 500 $\mu$ l 담고 13,000rpm에서 3분 원심분리 하였음. Spin column을 멸균된 새로운 1.5ml tube로 옮긴 후 Elution buffer 30 $\mu$ l를 spin column에 넣고, 실온에 1분간 방치 한 후에 8,000rpm에서 3분 원심분리하여 DNA를 확보하였음. RT-PCR 조건은 50 $^{\circ}$ C 30분 → 95 $^{\circ}$ C 10분 → (95 $^{\circ}$ C 30초, 55 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 1분), 35cycle → 72 $^{\circ}$ C 5분으로 진행하였음.

[표 23] 바이러스 및 바이로이드 프라이머

종 류	Sequences(5' → 3')	Target size(bp)	Tm(°C)
CSVd	F: ACTCCTGACCCTGCTGCTT R: AAGGTTCCACGGGCTTACT	313	52
TSWV	F: ATCAGTCGAAAATCCTCGGCA R:AATTGCCTTGCAACCAATTC	777	55
CSNV	F: GAACTCCAAACATCTCATAGA R:CAATGATAACCTGGATCAGATC	632	55
CChMVd	F: CAGTTTCGGCTTGTGCGG R:CCGAGGAGAATATCCAACGAG	216	52
CVB	F: AGTCACAATGCCTCCCAAAC R: CATACTTTCTTAGAGTGCTATGCT	621	52

나. 연구결과

충남지역 재배농가에서 육안으로 이병엽으로 보이는 잎을 채취하여 바이러스 검정 결과 TSWV,CSNV,CVB는 매우 낮은 감염율이 보였음. 반면 CChMVd는 96%, CSVd는 81.7%로 높은 감염율을 보였음. 본 실험에서는 높은 감염율을 보이는 CChMVd와 CSVd 이병주를 대상으로 시험에 사용하였음.

[표 24] 충남 지역별 농가 바이러스 감염 현황

구분	지역(농가수)	감염수/조사수				
		CSVd	CVB	TAV	TSWV	CSNV
충남	태안군(4)	0/40	0/40	0/40	20/40	0/40
	예산군(4)	3/40	3/40	0/40	20/40	0/40
	당진시(2)	2/10	0/20	0/20	19/20	0/20
	부여군(2)	0/20	0/20	0/20	20/20	0/20

Chrysanthemum stunt viroid, 국화왜화바이로이드, Chrysanthemum virus B, 국화바이러스B, Tomato aspermy virus, 토마토아스퍼미바이러스), Tomato spotted wilt virus, 토마토반점위조바이러스), Chrysanthemum stem necrosis virus, 국화줄기괴저바이러스)

[표 25] 육묘업체 바이러스 감염 현황

구분	지역	품종	감염수/조사수				
			CSVd	CChMVd	CVB	TSWV	CSNV
경기	연천	보라미	20/40	20/20	0/20	0/20	0/20
		루비	-	39/40	0/40	1/40	0/40
		퍼펙트	-	20/20	0/20	0/20	0/20
감염율(%)			50	98.8	0	1.3	0

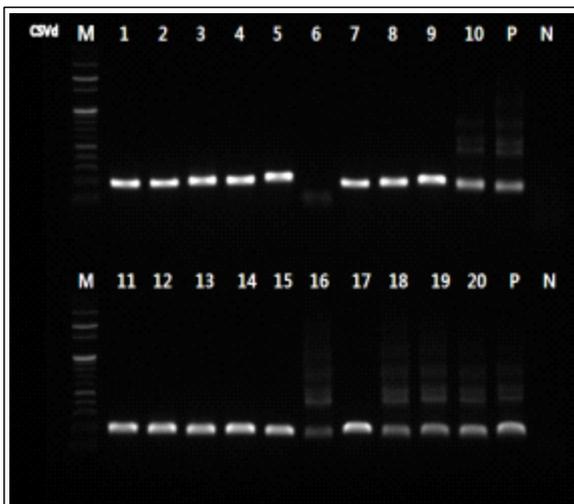
경기 육묘업체에서 생산되는 발근묘를 대상으로 바이러스 검정 결과 TSWV,CSNV,CVB는 매우 낮은 감염율을 보였음. 반면 CChMVd는 98.8%, CSVd는 50%로 높은 감염율을 보였음. 본 실험에서는 높은 감염율을 보이는 CChMVd와 CSVd 이병주로 실험을 진행하고자 하였음.



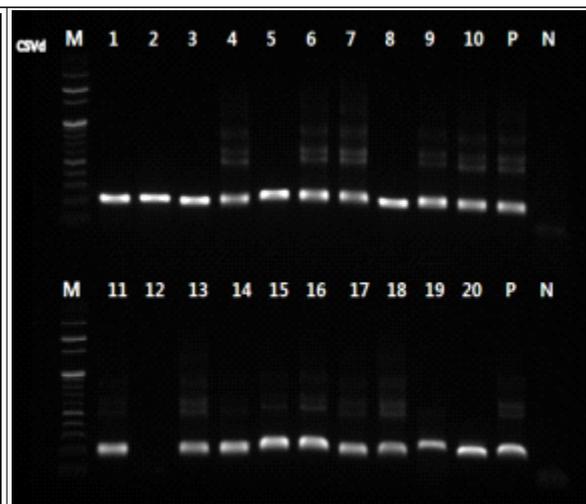
<그림 125> '핑크원더' CSVd 이병주 증상



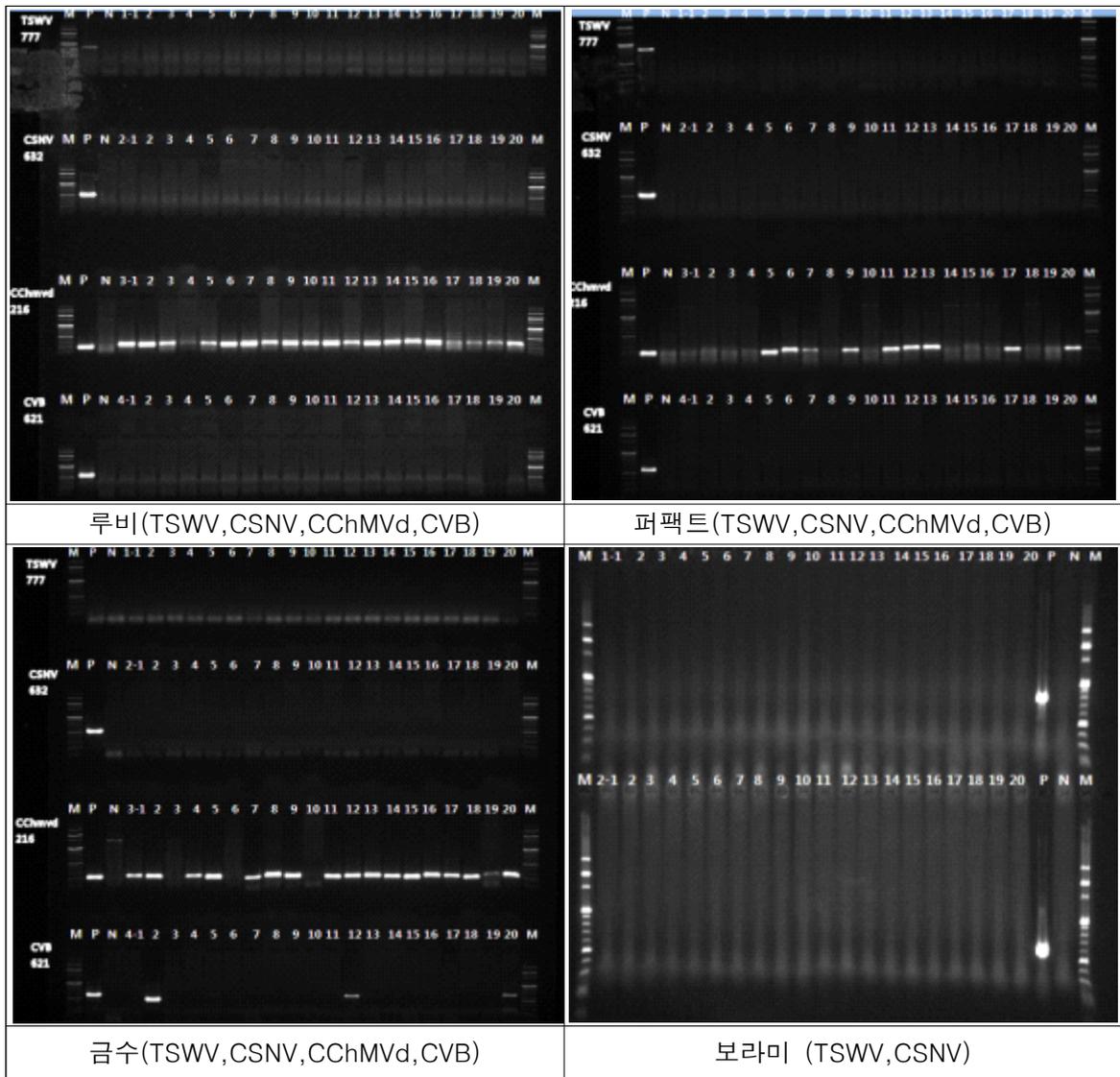
<그림 126> '금수' CChMVd 이병주 증상



핑크원더 (CSVd)



핑크원더 (CSVd)



<그림 127> 국화품종별 바이로이드 및 바이러스 RT-PCR 분석 결과

## 2. 물리적 처리에 의한 바이로이드 제거

### 가. 재료 및 방법

고온, 저온 처리 후 생장점배양을 통한 바이로이드 제거 유무를 조사하기 위해 이병주들을 각각 35℃ 고온 처리와 4℃ 저온 처리를 2, 4주간 진행하여 생장점배양을 통해 바이로이드 제거효과를 알아보는 실험하였음. 고온 처리 후 생장점에서 유기된 식물체로 바이로이드 검사하였음.

CChMVd는 생장점을 통한 바이로이드 제거가 되지 않아 CChMVd의 저온·고온에서의 특성을 조사하기 위해 CChMVd 감염주(포드,금수) 대상으로 실험진행하였음. 고온 (35℃), 저온(4℃) 으로 2주, 4주 처리하여 각각 주차의 풋트묘의 상부, 하부 잎을 채취하여 바이로이드 검사를 실시하였음.

### 나. 연구결과

CSVd감염주 보라미 저온 2주 처리 시 바이로이드 제거가 이루어지지 않았으며 저온 4주 처리 시 생장점 배양 후 5개중 4개가 생존했으며 이 중 3개의 조직배양묘에서 CSVd바이로이드가 제거되었음.

[표 26] 이병주 고온처리(35℃) 후 생장점에서 유기된 식물체로 바이로이드 검정

구분	품종	처리기간(주)	생장점 생존율(%)	처리개체수	바이로이드 제거 개체수
CSVd	보라미	2주	57.1	7	2
		4주	25	8	2
CChMVd	에스루비	2주	35.7	14	0
		4주	26.7	15	0

CSVd감염주 보라미는 고온 2주 처리 시 생장점 배양 후 5개 중 4개가 생존했으며 이 중 2개의 조직배양묘에서 바이로이드가 제거 되었으며, 고온4주 처리 시 생장점 배양 후 5개 중 2개가 생존했으며 생존한 2개의 조직배양묘 모두 바이로이드가 제거 되었으나, CChMVd 바이러스 감염주는 온도와 처리 기간에 상관없이 생장점 배양 후 바이로이드가 제거되지 않았음.

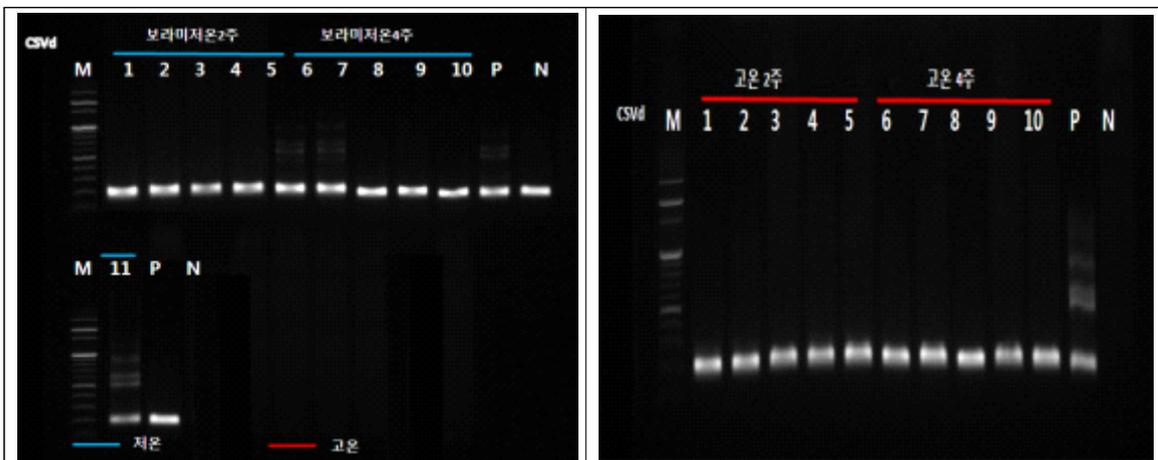
[표 27] 이병주 저온 처리(4℃) 후 생장점에서 유기된 식물체로 바이로이드 검정

구분	품종	처리기간(주)	생장점 생존율(%)	처리개체수	바이로이드 제거개체수
CSVd	보라미	2주	80	5	0
		4주	66.6	6	3
CChMVd	에스루비	2주	7.7	13	0
		4주	16.7	12	0

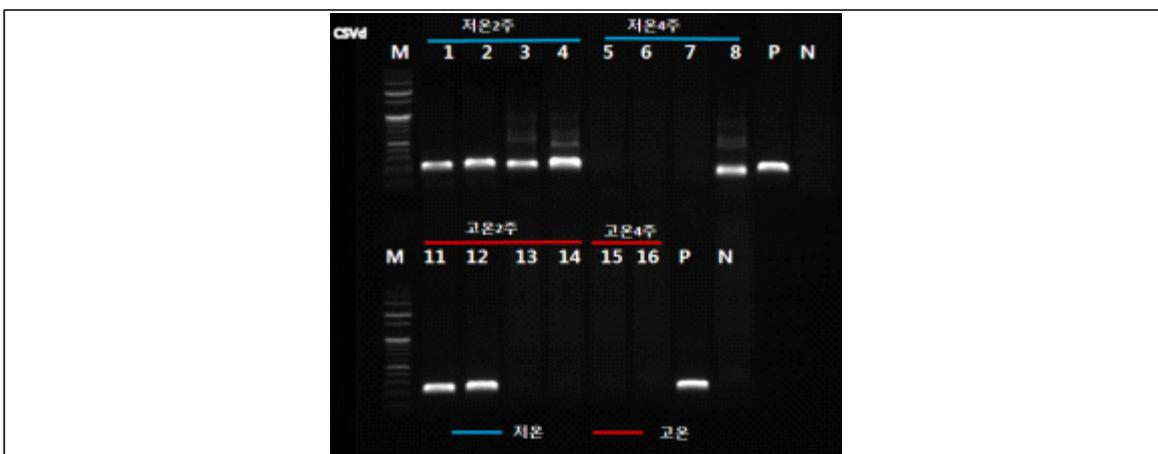
물리적 처리에 의한 바이로이드 제거 실험 결과 두 바이로이드(CSVd와 CChMVd)의 결과가 다르게 나타났다. CSVd 경우 저온저장 시 2주간 처리 시 생장점배양을 통해 바이로이드가 제거되지 않았고, 4주 처리 시 바이로이드 제거율이 50%이었음. CChMVd 경우 저온·고온 처리 후 생장점배양을 통해 바이로이드 제거되지 않았음. 추후 생장점 배양 12주후에 재검정을 했을 때 CSVd와 CChMVd 모두 감염되었음.

[표 28] 이병주 저온(4℃) 및 고온(35℃)처리 후 생장점에서 유기된 식물체에 대한 바이로이드 유무

품종	이병주 처리기간	바이러스 감염원	처리개체수	생장점 배양 12주 후 바이로이드 제거개체수
보라미	저온 2주 처리	CSVd	5	0
	저온 4주 처리	CChMVd	6	0
에스루비	고온 2주 처리	CSVd	13	0
	고온 2주 처리	CChMVd	12	0

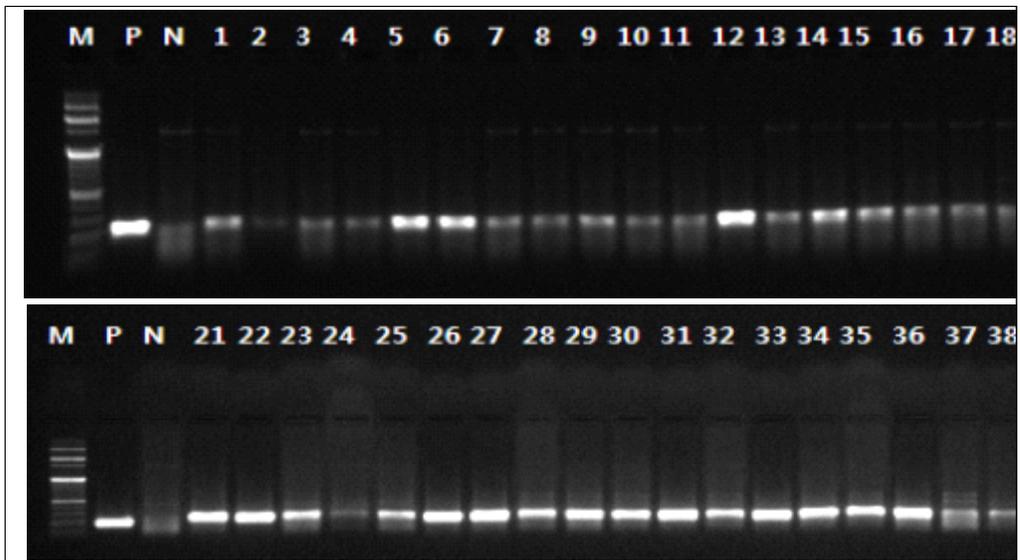


저온 및 고온처리용 풋트묘

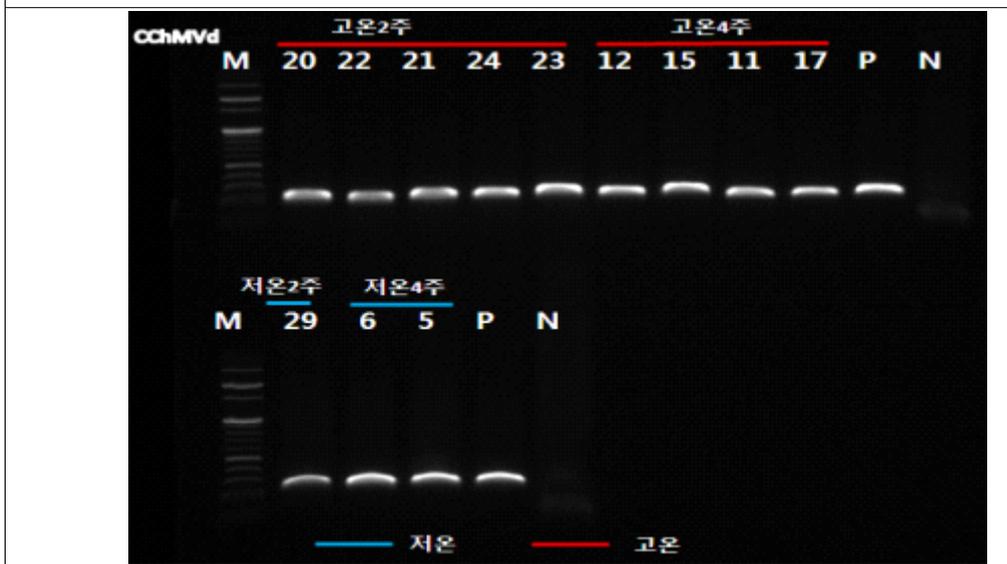


저온 및 고온 처리 후 조직배양묘

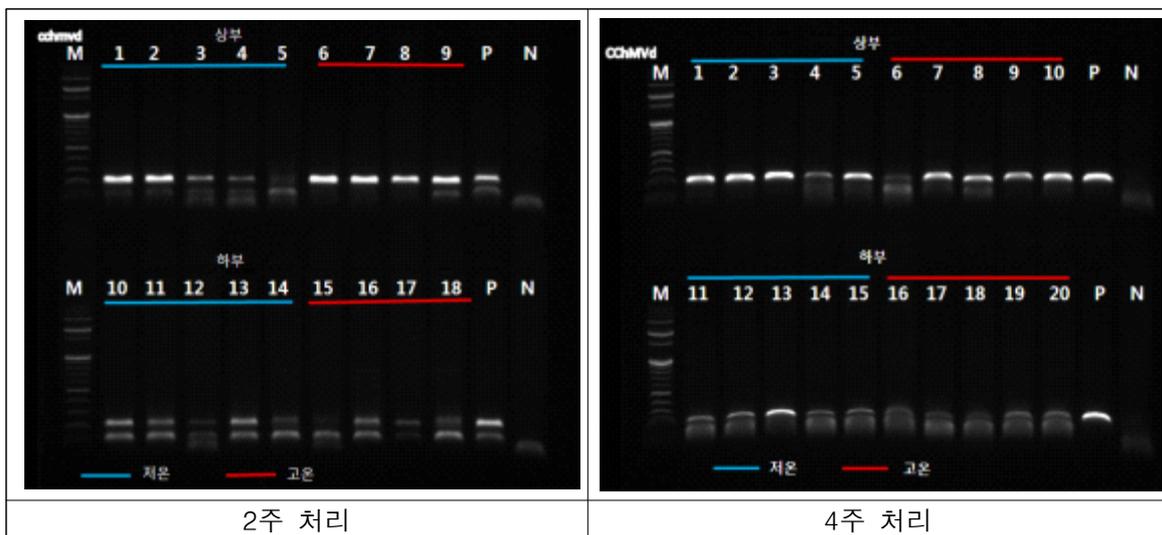
<그림 128> '보라미' 품종 풋트묘 저온 및 고온처리 후 조직배양묘 CSVd 감염조사



저온·고온처리용 포트묘



<그림 129> 저온·고온 처리 시 조직배양묘 CChMVd 감염조사



<그림 130> '포드' 품종 저온·고온 처리 시 CChMVd 특성에 대한 RT-PCR 분석 결과

CChMVd 바이로이드는 저온·고온 처리 시 바이로이드가 위로 모이는 경향을 보였음. 따라서 아래 부분이 바이로이드 농도가 약해지는 경향을 보여 상위부분보다는 하위부분을 이용해서 저온이나 고온에서

저장기간을 길게 하여 바이로이드에 대한 추가시험을 필요함.

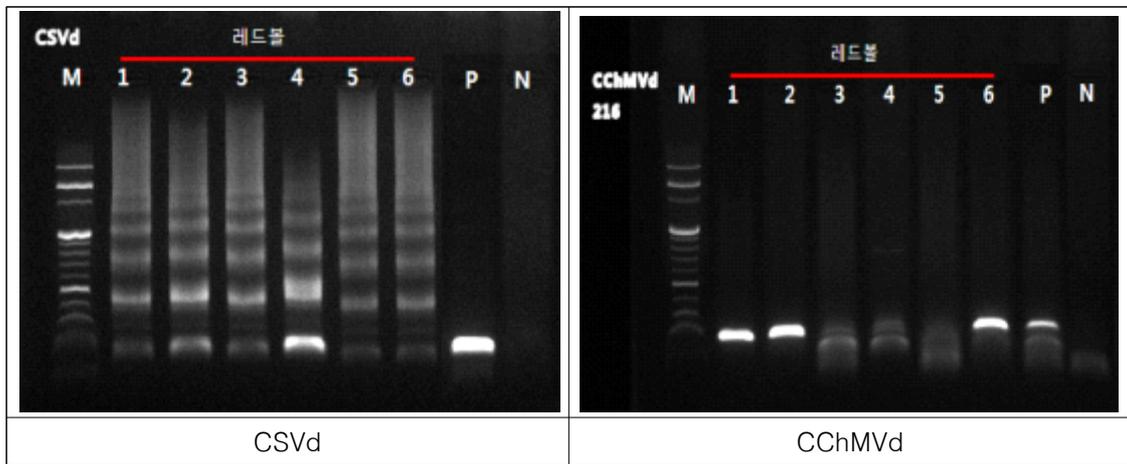
### 3. 화학적 처리에 의한 바이로이드제거

#### 1) 처리와 방법

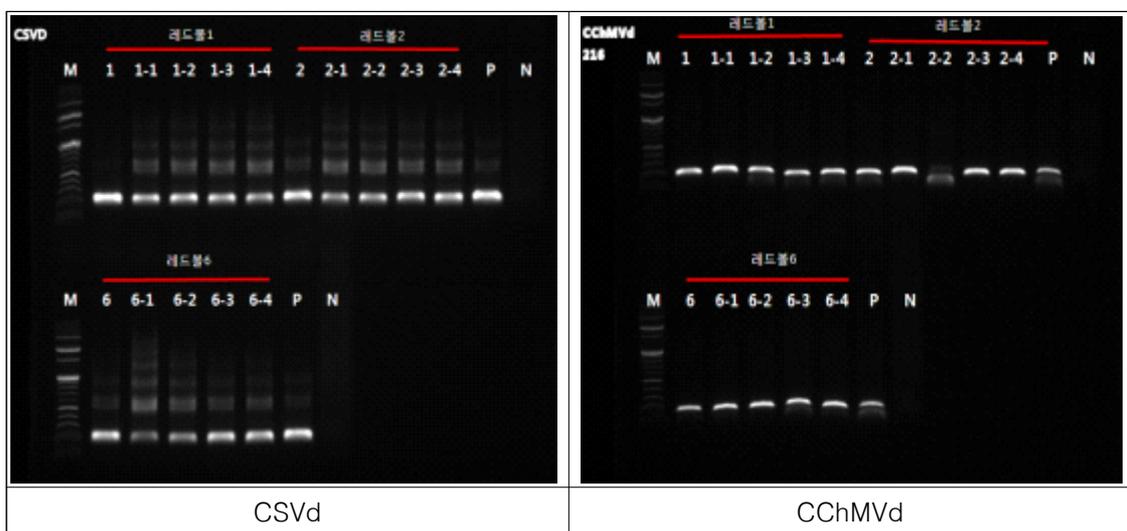
감자 바이러스 Y(PVY)에 효과가 있다고 보고된 디하이드로아르테미시닌(DHA)가 바이로이드 제거 효과 검증을 위해 소독한 이병주를 조직배양용기에 넣고 시험에 사용하였고 배지 조성 시 항바이러스제를 첨가하였음. MS 100PPM배지를 이용하였고 항바이러스 무처리, 70 $\mu$ l/70ml, 166 $\mu$ l/70ml 세가지로 실험하였음. 1, 2, 6번 조직배양묘를 계대배양하여 1개의 모주 당 5주씩 증식하여 총 15주의 조직배양묘로 시험에 사용하였음. 1번 조직배양묘는 무처리, 2번 조직배양묘 70 $\mu$ l/70ml, 6번 조직배양묘 166 $\mu$ l/70ml 항바이러스제를 첨가하였음.

#### 2) 연구결과

이병주 레드볼 조직배양묘에 대하여 RT-PCR법을 이용한 바이로이드 검정 결과 CSVd와 CChMVd 바이로이드 감염율이 높은 1, 2, 6번 조직배양묘를 이용하였다. 실험 결과 항바이러스 처리는 바이로이드가 완벽하게 제거되지 않았지만, 양성대조군과 비교하여 감염율이 낮아진 것을 확인할 수 있었음.



<그림 131> 이병주 '레드볼' 조직배양묘 항바이러스 처리 전 바이로이드 검정결과



<그림 132> 이병주 '레드볼' 조직배양묘 항바이러스 처리 후 바이로이드 검정결과

### 4. 조직배양묘 기외순화방법

#### 가. 인공토양별 생육특성

##### 1) 처리와 방법

농가에서 일반적으로 사용되고 있는 4가지 상토(원예상토, 피트모스, 원예상토+피트모스, 질석)에 비

숙한 조건의 조직배양묘를 순화한 후 생육조사 하여 기외순화 최적 조건을 규명하고자 하였음. 코랄킹과 엘도라 두 품종으로 실험진행 하였고, 삽목일은 8월 30일, 조사는 30일 후에 조사하였고, 순화 시 조직배양묘는 균일하게 초장6cm, 근장2cm 인것으로 인공토양에 이식하였음.

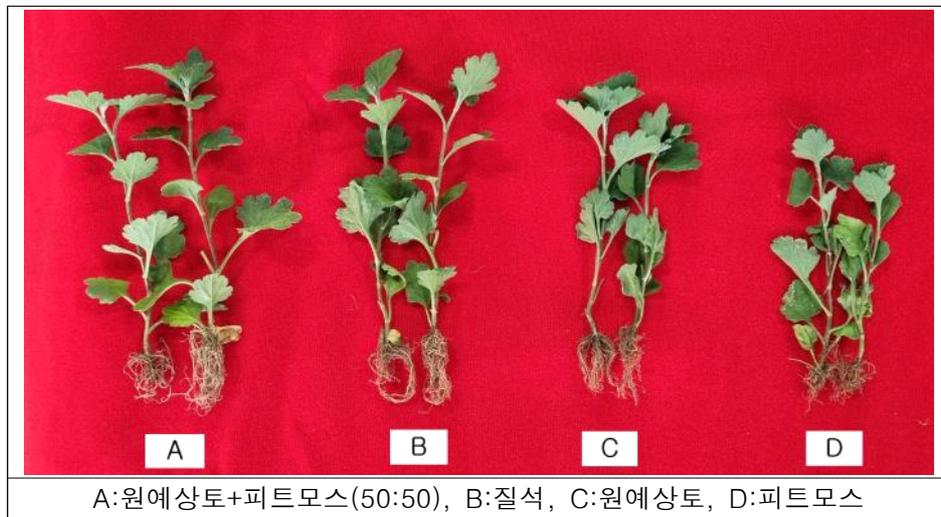
2) 연구결과

4가지의 인공토양으로 순화하여 한달 간 생육 후 생중량, 초장, 엽수, 근수, 근장을 조사한 결과 원예상토+피트모스, 질석, 원예상토, 피트모스 순으로 생육이 우수하였다. 원예상토+피트모스와 질석의 순화묘가 생육이 우수하고 원예상토 와 피트모스의 순화묘가 상대적으로 생육이 저조하였음.

[ 표 29 ] ‘코랄킹’ 기외순화 시 인공상토별 생육특성

구분	생중량(g)	초장(cm)	엽수(개)	근수(개)	근장(cm)	배양묘 생존율(%)
원예상토	2.7±0.7ab <sup>a</sup>	12.7±1.9	8.3±1.8	45.3±22.7	5.5±0.5ab	81.3±4.8
피트모스	1.4±0.4b	12.8±2.6	9.5±0.8	26.2±5.4	3.5±1.3b	87.5±5.4
원예상토+피트모스	3.5±0.6a	17.8±0.7	11.7±0.5	54.0±15.9	5.6±0.5ab	93.8±3.8
질석	3.2±0.8a	18.4±1.3	11.3±0.5	52.5±8.7	6.8± 0.7a	93.8±2.5

※ <sup>a</sup>DMRT 5% level

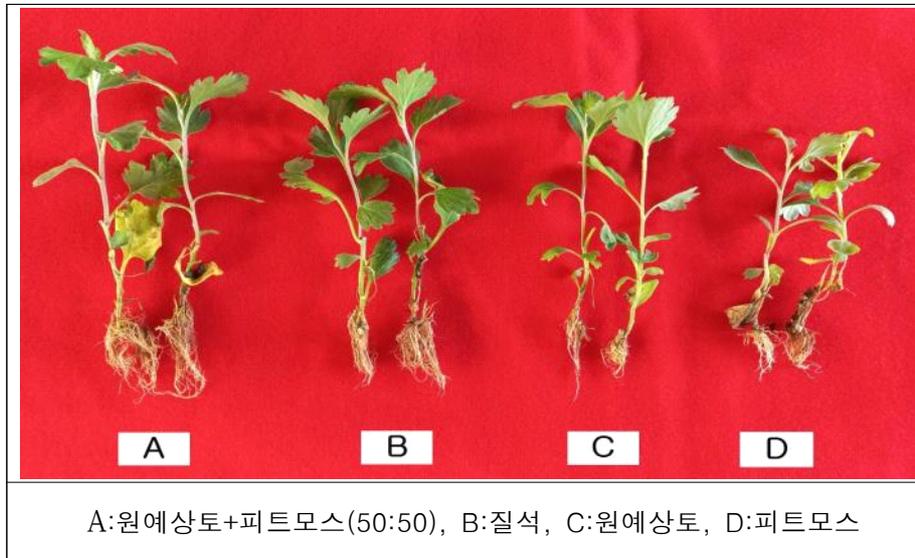


<그림 133> ‘코랄킹’ 인공토양별 생육특성

[ 표 30 ] ‘엘도라’ 기외순화 시 인공상토별 생육특성

구분	생중량(g)	초장(cm)	엽수(개)	근수(개)	근장(cm)	배양묘 생존율(%)
원예상토	2.4±0.4b <sup>a</sup>	13.1±2.0	11.0±1.4	45.7±13.2a	4.3±0.4	93.8±6.1
피트모스	2.2± 0.2b	12.4±1.0	10.8±0.8	24.0±6.2c	4.2±1.2	100±4.7
원예상토+피트모스	2.6±1.1a	13.4±2.3	12.0±0.9	38.2±13.6b	5.5±1.4	87.5±3.5
질석	2.9±0.7a	14.7±2.3	12.5±0.5	48.7±10.2a	4.6±0.7	81.3±4.2

※ <sup>a</sup>DMRT 5% level



<그림 134> '엘도라' 인공토양별 생육특성

나. 저온저장 기간별 생산력 검증

1) 처리 및 방법

조직배양묘 저장기간을 달리 하여 순화 한 후 동일 한 조건에서 생육 한 후 생육조사하여 순화 전 조직 배양묘 적정 저장 기간을 규명하고자 하였음.

코랄킹 조직배양묘를 1개월, 3개월 저장한 후 순화 시 초장(6cm)과 근장(2cm)을 동일하게 하고 무게는 1.5g~2.1g 의 묘를 30주씩 순화하였으며, 동일 한 시작점으로 실험을 진행하였음.

2) 연구결과

생육 조사에서 1개월 저온기간의 순화묘가 3개월 저온기간 순화묘보다 우수하게 나타났다. 30주씩 순화하여 1개월 저온묘는 생존율 100%를 보였고 3개월 저온 묘는 30주 중 2주가 고사하여 93%의 생존율을 보였음.

[표 31] 저온기간 별 순화 묘 생육특성

기간	생중량(g)	초장(cm)	엽수(개)	근장(cm)	근수(개)	배양묘 생존율(%)
1개월	6.7±0.5	27.3±1.6	11.9±1.2	8.6±2.4	73.7±12.2	100%
3개월	5.2±0.4	24.6±1.0	10.7±0.4	8.0±7.2	58.6±6.4	93%±4.4



<그림 135> 저온저장 기간별 생육조사

#### 다. 조직배양묘 염색체 변화

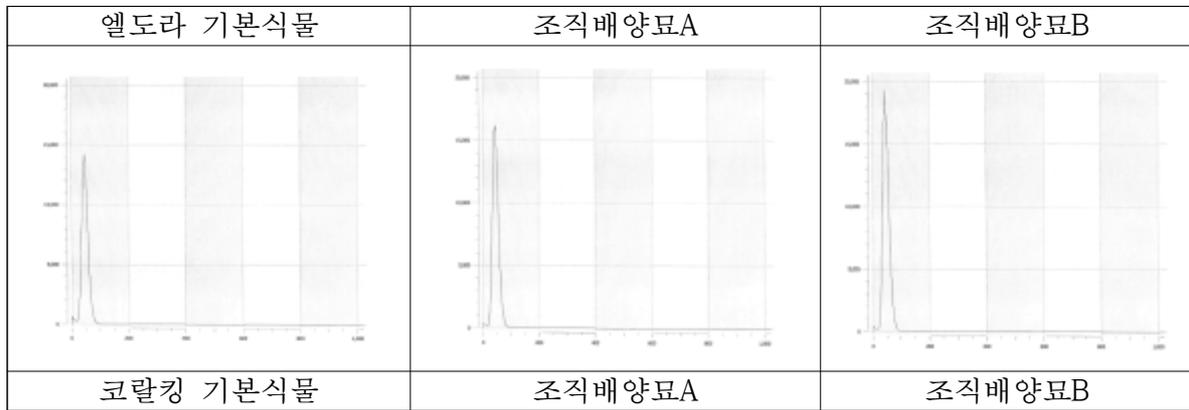
##### 1) 처리 및 방법

CyFlow cube 16 Ploidy Analyser를 이용하여 0.5cm<sup>2</sup>의 잎 조직 또는 식물체를 페트리디쉬에 담아 0.5ml 염색체 추출버퍼(Nuclei Extraction buffer)를 첨가하여 30~60초 동안 날카로운 면도날을 사용하여 식물샘을 잘게 절단하였음. 30초~5분 배양, 50 $\mu$ m필터를 통해 잘게 절단된 식물샘을 여과하여 액상한 추출하였고 여기에 2ml의 염색버퍼를 추가하여 30~60초 동안 방치시켰음. 샘플튜브에 1.2ml 샘플을 채우고 튜브를 샘플포트에 삽입하여 측정하였음.

##### 2) 연구결과

2개월 조직배양묘 ‘보라미’, ‘레이나’, ‘에스루비’, ‘엘도라’, ‘코랄킹’을 대상으로 염색체 검사를 시행한 결과 품종에 대한 기본식물과 비교시 염색체에는 이상이 없는 것으로 보였음.





<그림 136> 저온저장 기간별 생육조사 조직배양묘 염색체 변화

<3차년도>

1. 국화 무병묘 농가분양 생육육성 및 조직배양묘 농가재배 후대검정

가. 국화 무병묘 농가분양 후 후대검정

1) 처리 및 방법

국내육성 수출품종인 ‘밀키스타’ 품종을 무병묘, 관행묘를 발근하여 9월 20일 정식하여 재배하였고 생육후기에 생육조사를 실시하였음. 이병묘의 경우는 관행묘에서 수확기에 키가 작고 품질이 저조한 것을 바이로이드 검정 후 이병묘 생육조사를 실시하였음. 생육조사는 농사시험연구 조사기준에 의거하여 초장, 엽수, 경경, 엽장, 엽폭을 조사하였음.

2) 연구결과

관행묘 재배에서 육안으로 초장이 작고 잎이 작은 것은 이병주로 간주하고 조사에서 제외시키고 따로 이병주 생육조사를 실시하였음. 무병묘와 일반 관행묘의 생육에는 초장과 엽수에서 차이를 보였고, 경경, 엽장, 엽폭에서는 거의 차이를 보이지 않았음. 국화는 무병묘와 관행묘의 생육을 비교 했을 때 초장이나 엽수에서 차이가 있었음.

[표 32] 국화 ‘에스루비’ 품종 묘종류별에 따른 수확기 생육특성 비교

묘종류	초장(cm)	엽수(개)	경경(mm)	엽장(cm)	엽폭(cm)
무병묘	93.4±3.2	33.2±1.3	5.7±0.5	8.5±0.4	5.5±0.4
관행묘	88.2±3.8	31.6±3.2	5.4±0.9	7.0±0.7	5.2±0.8
이병묘	69.8±3.4	26.8±2.6	3.9±0.6	6.5±0.6	4.2±0.3

관행묘 재배포장에 육안으로 확실한 이병주도 있었고, 눈에 보이지 않는 이병주는 관행묘 중에 있을 수도 있지만, 생육에는 이상이 없는 것으로 보이나 나중에 모주로 사용 할 경우에 바이로이드가 누적되어서 이병증상이 나타남.

나. 국화 모주 관리

1) 처리 및 방법

국화 모주에서 뿌리지제부에서 발달한 동지아와 그 모주의 노화주에서 잎을 채취하여 바이로이드 검정을 실시하였음. 바이로이드 검정은 샘플 전 처리 방법은 2ml 튜브에 lysis buffer 500 $\mu$ l 담은 다음 샘플을 섞은 후 Binding buffer 500 $\mu$ l 담고 vortex 하였다. 그 후에 13,000rpm/10분 원심분리 한 후 spin column에 넣고 8000rpm으로 3분간 원심분리 하였음. 여과액은 버리고 tube를 교체하고 wash buffer A 500 $\mu$ l 담은 후 8,000rpm에서 3분 원심분리한 후, wash buffer B 500 $\mu$ l 담고 13,000rpm에서 3분

원심분리 하였음. spin column을 멸균된 새로운 1.5ml tube로 옮긴 후 Elution buffer 30 $\mu$ l를 spin column에 넣고, 실온에 1분간 방치 한 후에 8,000rpm에서 3분 원심분리하여 DNA를 확보하였음. RT-PCR 조건은 50 $^{\circ}$ C 30분  $\rightarrow$  95 $^{\circ}$ C 10분  $\rightarrow$  (95 $^{\circ}$ C 30초, 55 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 1분), 35cycle  $\rightarrow$  72 $^{\circ}$ C 5분으로 진행하였음.

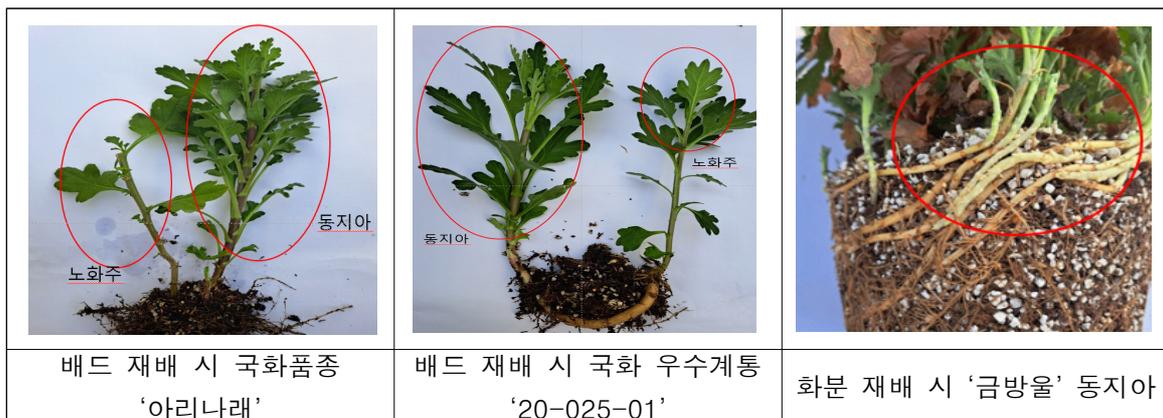
모주관리 시 바이러스 방제를 주기적으로 살포하고 있는데 바이캐미 약제를 검증하기 위해서 왜화바이로이드에 효과가 있는지 조사하였음. 연구소에서 왜화바이로이드 이병주로 보유하고 있는 풋트묘를 바이캐미 약제를 3일 간격으로 5회 살포하고 난 후 바이로이드 검정을 하였고, 3일 간격으로 10회 살포 후 바이로이드를 검정하였음.

‘바이캐미’ 라는 바이러스 예방약제가 시중에 판매되고 있는데 바이로이드 억제에 효과가 있는지 검증하였음. 예방약제 살포기간은 살포전에 바이로이드 검사하고, 3일 간격으로 5회, 3일 간격으로 10회를 각각 약제살포 끝난 후에 바이로이드 검정을 수행하였음.

## 2) 연구결과

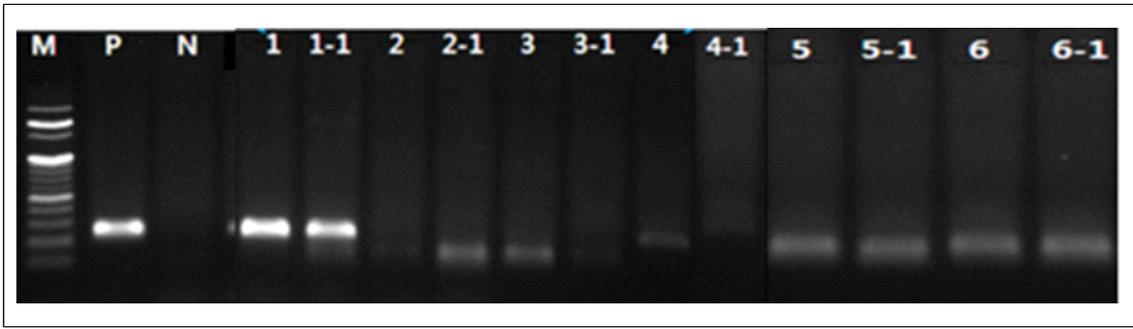
국화를 모주로 사용할 경우 생장점을 채취해서 조직배양묘를 만들 수 있는데 무병묘가 없을 경우 이병주에서 생장점을 채취하는데, 이병주를 고온이나 저온에서 처리 후 생장점 채취하였을 경우 바이로이드가 없어지지 않았음. 또한, 생장점 처리 후에도 화학적 약제처리를 해도 제거되지 않았음. 우선은 이병주라고 해도 바이로이드 감염이 약하거나 중간인 경우는 생육차이는 크지 않지만 심한 경우는 생육에서 차이를 보였음. 조직배양묘나 화학적처리를 안하고도 동지아를 채취해서 모주사용을 검토하기 위해 노화주와 동지아를 분리하여 바이로이드 검정을 실시 하였음.

국화 모주 증식 시 토양재배, 배드재배, 화분재배 등 다양한 방법을 통해서 재배하고 있는데 노화주에서 유래되어 뿌리지제부에서 발달한 동지아의 경우 대개 노화주보다 활력이 좋고 생육이 왕성하였음. 품종별로 동지아의 발달정도가 다른데 금방울은 동지아가 많이 발달되었고, ‘아리나래’ 품종은 완전히 땅속 줄기보다는 지제부 근처에서 약하게 땅속줄기에서 새로 나온 줄기가 발달하였음. 국화 우수계통인 ‘20-025-01’은 동지아가 잘 발달하였음.



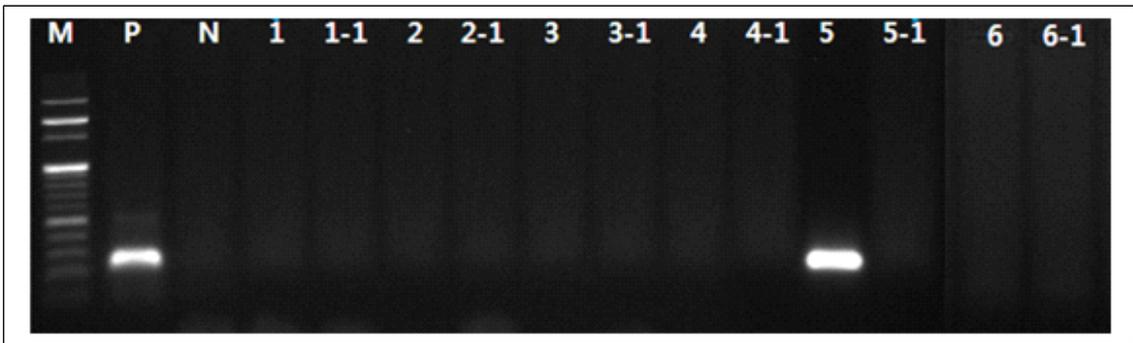
<그림 137> 품종별 국화 모주의 노화주와 동지아

국화황화모틀바이로이드(CChMVd) 검정에서 모주가 확실히 이병주인 ‘20-025-01’에는 모주와 동지아가 모두가 바이로이드에 감염되어 있었고, ‘아리나래’ 품종에서는 모주는 바이로이드에 감염되었으나 동지아에는 감염이 안되어 있는 것으로 분석되었음. 추후 시료수를 늘려서 추가 시험이 더 필요함.



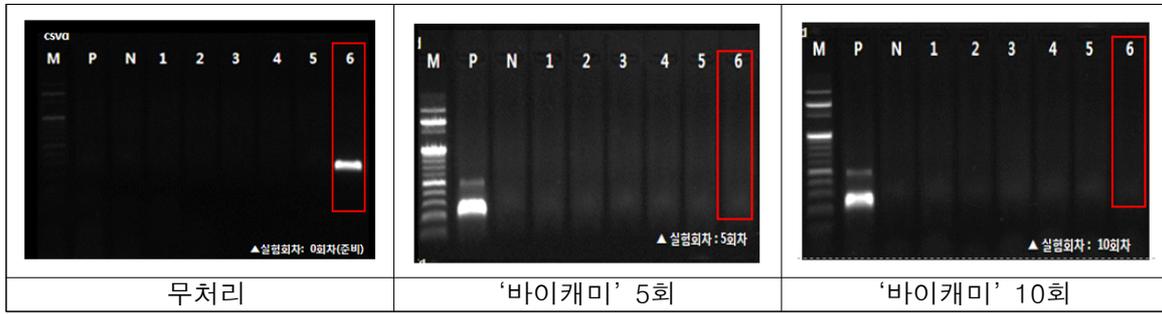
<그림 138> 품종별 국화 노화주와 동지아 국화황화모틀바이러스(CChMVd)바이러스 검정  
 1: 20-025-01모주, 1-1:20-025-01동지아/ 2: 20-025-01모주, 2-1:20-025-01동지아, 3: 아리나래 모  
 주, 3-1:아리나래 동지아/ 4: 아리나래 모주, 4-1:아리나래 동지아, 5: 금방울 모주, 5-1:금방울 동지아/  
 6: 금방울 모주, 6-1:금방울 동지아

국화왜화바이러스(CSVd) ‘금방울’ 품종 제외하고 다른 품종에서는 CSVd에 감염되지 않은 것으로 나타  
 났음. 모주가 확실히 이병주인 ‘금방울’에는 감염이 되어 있는 것으로 나타났으나, 동지아는 감염이 되어  
 있지 않은 것으로 나타났음. 아리나래 품종에서 이병주를 확보해서 시험한 후 동지아 확실히 감염이 안되  
 는지 추후 시험연구가 필요함. 모주 증식시 노화모주는 버리고 동지아 위주로 삽수를 채취해서 증식하면  
 절화품질을 향상시킬 수 있음.

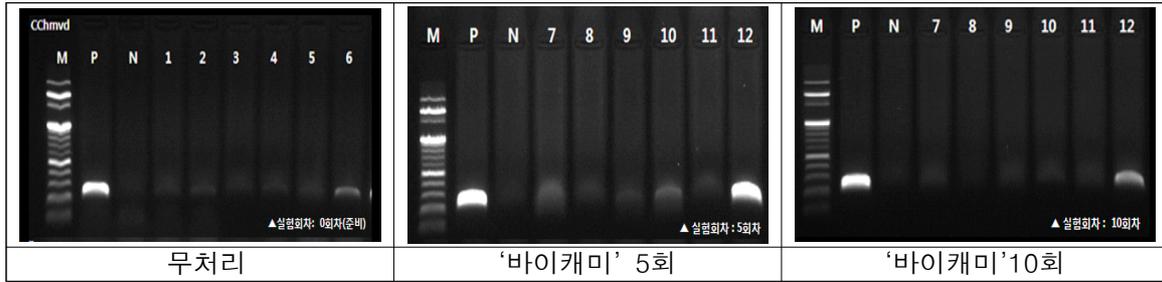


<그림 139> 품종별 국화 노화주와 동지아 국화왜화바이러스(CSVd)바이러스 검정  
 1: 20-025-01모주, 1-1:20-025-01동지아/ 2: 20-025-01모주, 2-1:20-025-01동지아, 3: 아리나래 모  
 주, 3-1:아리나래 동지아/ 4: 아리나래 모주, 4-1:아리나래 동지아, 5: 금방울 모주, 5-1:금방울 동지아/  
 6: 금방울 모주, 6-1:금방울 동지아

국화 모주 증식 시 병해충 방제를 주기적 하고 있지만, 미소해충인 점박이응애나 총채벌레는 방제가 잘  
 되지 않는다. 아무리 무병주가 있더라도 해충로 인해 바이러스가 옮길 수 있다고 추측하지만 실제 추가  
 실험이 더 필요함. 완전히 건전묘 육묘장은 무병온실과 같이 병해충 출입이 되지 않도록 설비가 되어  
 있어야 하며, 작업하는 사람도 출입 시 병해충 전염을 차단해야 하는데 보통 열악한 육묘업체는 시설완  
 비에 어려움이 있음. 따라서 건전묘관리를 할 경우, 병해충 농약을 1주일 간격으로 살포하는 것이 중요  
 함. 바이러스 예방약제로 바이캐미 약제가 시중에 유통되고 있는데 국화왜화바이러스(CSVd) 감염주  
 에 효과가 있는 것으로 나타났지만, 추후 이병주를 늘려서 조사가 필요함. 국화황화모틀바이러스  
 (CChMVd) 이병주에도 바이캐미를 약제를 살포한 후 바이러스 검정을 한 결과 처리별로 효과는 없었  
 음.



<그림 140> 바이러스 예방약제 '바이캐미' 횟수별 CSVd 검정 유무



<그림 141> 바이러스 예방약제 '바이캐미' 횟수별 CChMVd 바이로이드 검정 유무.

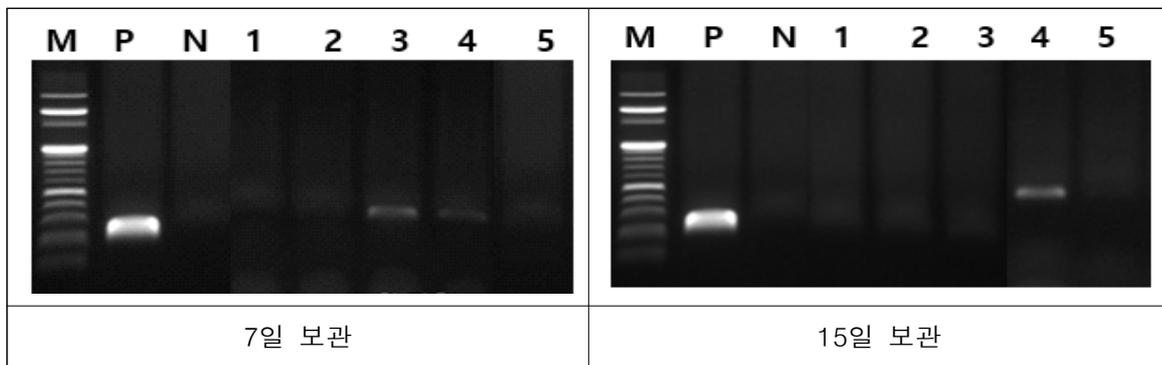
## 2. 저온 및 고온처리에 의한 조직배양묘 바이로이드 유무 검정

### 가. 재료 및 방법

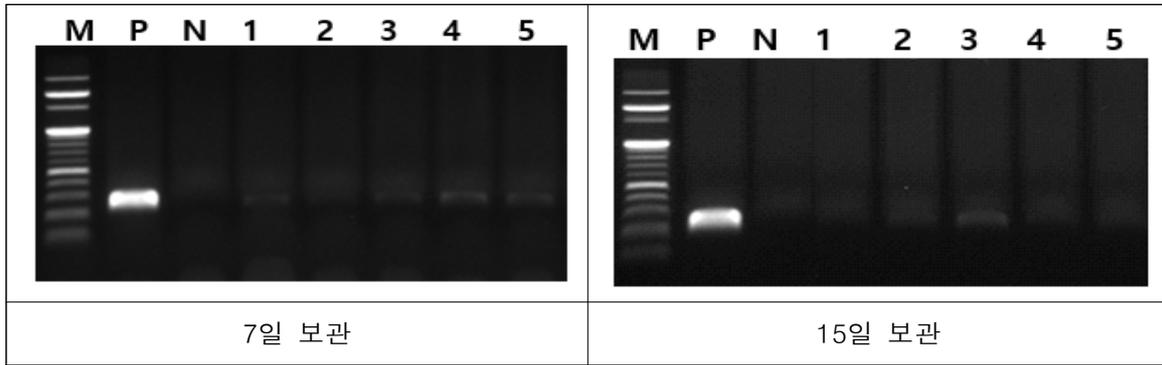
이병주 조직배양묘를 고온(35℃)과 저온(4℃)에 각각 7일, 15일 동안 유지 되는 동안 CChMVd와 CSVd가 제거되는지 검정하였음.

### 나. 연구결과

'보라미' 이병주 조직배양묘를 고온에서 7일 보관보다는 15일 보관했을 때 CChMVd 발현이 약해지는 것이 보였고, 저온에서는 발현이 약해지는 시료도 있었으나 발현이 더 잘되는 시료도 있었다. 시료채취 부위에 따라 발현 차이가 있을 것이라 사료됨.

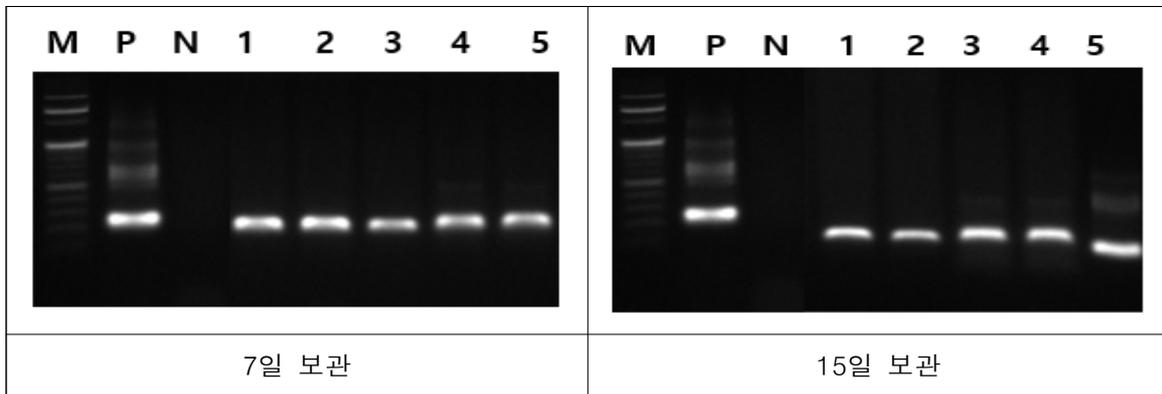


<그림 142> 이병주 '보라미' 조직배양묘 저온(4℃) 보관기간별 CChMVd 검정유무.

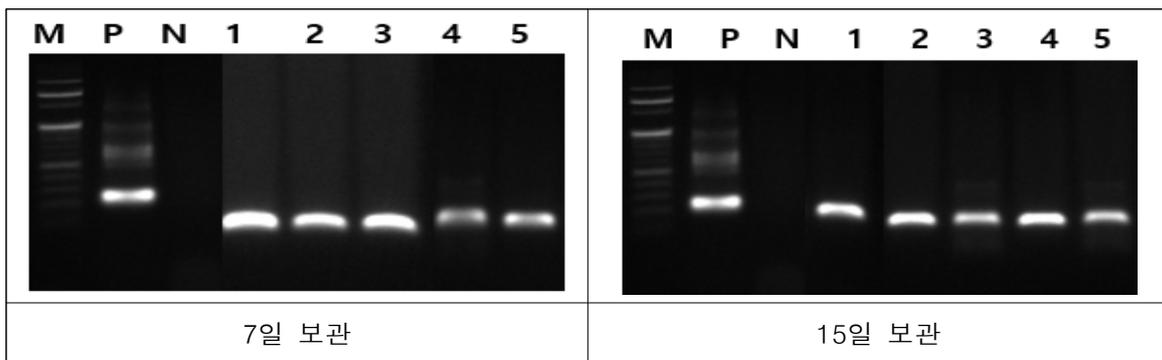


<그림 143> 이병주 '보라미' 조직배양묘 고온(35°C) 보관기간별 CChMVd 검정유무

'보라미' 이병주 조직배양묘를 저온과 고온에 7일, 15일 보관 한 다음 온도별로 CSVd 검정한 결과 바이러스 발현율저온과 고온에서는 차이가 없었음.



<그림 144> 이병주 조직배양묘 저온(4°C) 보관기간별 CSVd 검정유무



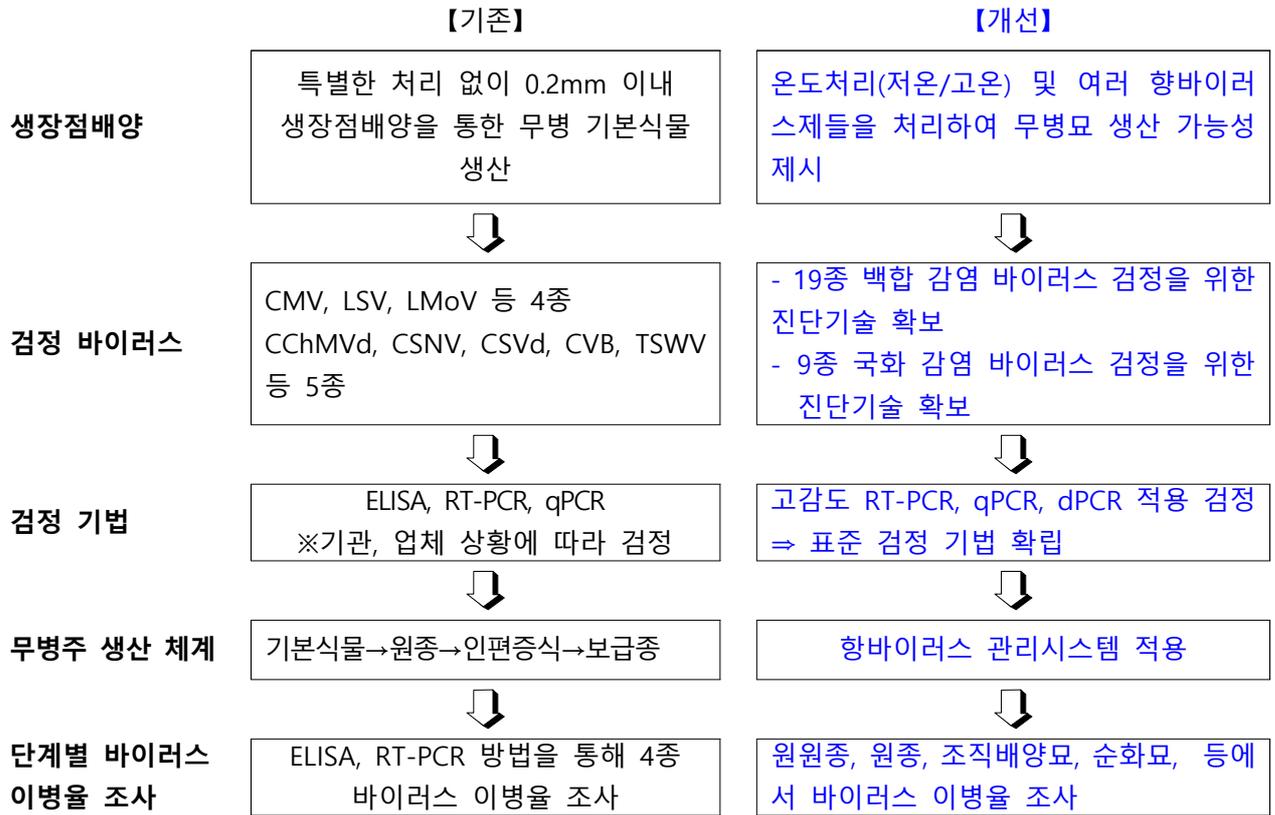
<그림 144> 이병주 조직배양묘 고온(34°C) 보관기간별 CChMVd 검정유무

## 라. 백합 및 국화 무병묘 효율 향상을 위한 생산 체계 구축

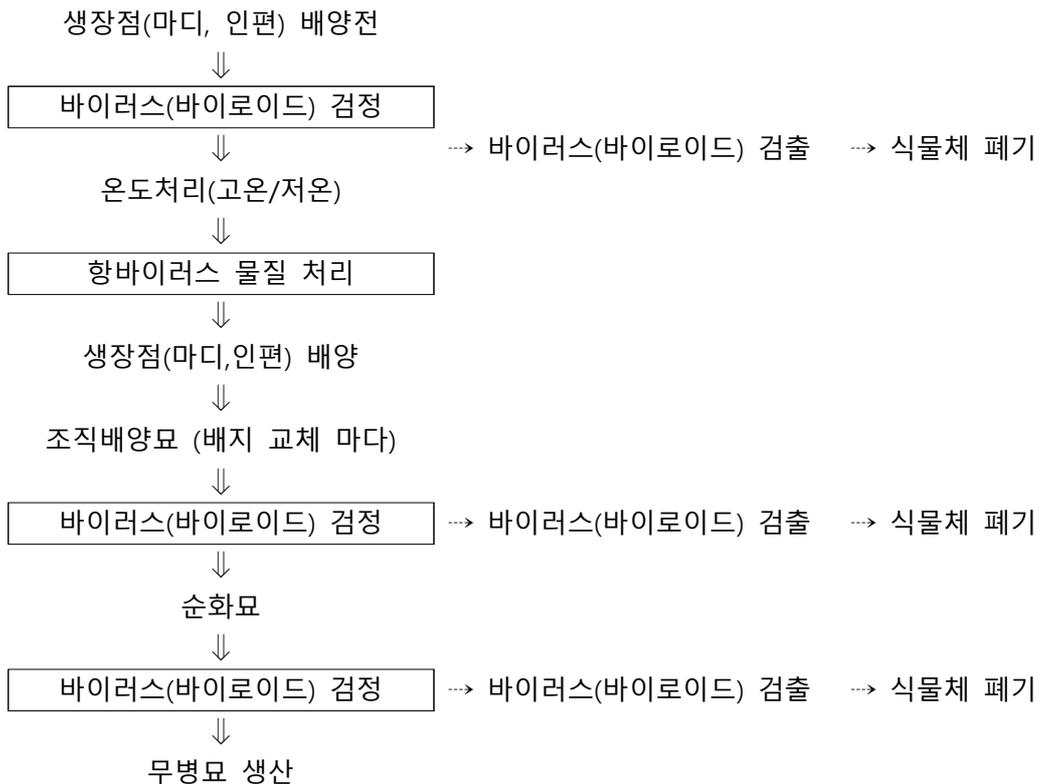
### 1) 개선된 백합 및 국화 무병묘 효율 향상을 위한 생산 체계 구축

무병묘 생산에 어려움은 1) 성장점 배양시 바이러스 오염, 2) 시설재배시 관리 도구 및 해충의 유입으로 인한 바이러스 감염으로 구분할 수 있으며, 본 연구에서는 1) 성장점 배양시 바이러스 오염을 줄이기 위한 관리체계를 마련하였음. 성장점 배양시 바이러스 오염을 줄이기 위해서는 1) 성장점 배양을 위해 선택한 식물체 및 성장점 배양 후 조직배양단계에서의 바이러스(바이로이드) 감염을 정밀하게 검정할 수 있어야 하고, 2) 정밀진단기술의 검출의 한계로 잠재되어 있는 미량의 바이러스(바이로이드)를 제거하기 위한 물리적 처리 및 항바이러스 처리가 필요함. 이러한 문제를 해결하기 위해 잠재되어 있는 바이러스(바이로이드) 감염 식물체 및 조직을 선별할 수 있는 고감도 정밀진단기

술을 개발하였으며, 바이러스(바이로이드)를 제거하기 위한 온도처리(35℃, 4℃)와 항바이러스 물질을 선발하였음. 따라서 본 연구에서 개발한 바이러스(바이로이드) 정밀진단기술과 항바이러스 물질들을 적용하여 아래와 같이 생산관리 방안을 마련하였음<그림 145, 146>.



<그림 145> 본 연구에서 제시하는 백합 및 국화 무병묘 생산체계의 개선 사항.



<그림 146> 본 연구에서 제시하는 항바이러스 적용 무병묘 생산 관리시스템 계획(안).



<그림 147> 본 연구에서 제시하는 무병묘 생산체계구축(안).

본 연구에서 제시하는 무병묘 생산 관리시스템은 번식하고자 하는 개체들을 대상으로 고감도 정밀 진단기술을 사용하여 무병묘를 확인하고, 확인된 무병묘 개체들의 생장점(마디, 인편) 배양을 하기 전에 온도처리와 항바이러스 물질 처리를 권장함. 생점점(마디, 인편) 배양으로 증식된 조직배양묘에서 배양 배지 교체 시점 마다 고감도 정밀진단기술을 사용하여 무병묘를 확인한 후, 순화 단계를 수행하고, 마지막 포장으로 나가기 전에 한번 더 고감도 정밀진단기술을 사용하여 무병묘 임을 검증하는 것을 권장함. 추가적으로 포장에서 주기적으로 식물체의 병징을 관찰하고, 병징이 나타나지 않았을 경우에는 무작위로 시료를 채취하여 고감도 정밀진단기술로 바이러스(바이로이드) 감염을 감시함.

본 연구에서 제시하는 무병묘 생산체계구축(안)은 위의 무병묘 생산 관리시스템(안)을 국가 연구기관을 중심으로 실시되고, 육묘업체(대량증식)과 재배농가(수요처 납품)에서의 병발생을 지속적으로 모니터링하여 품질관리하는데 있음. 국가 연구기관(예, 충남농업기술원 화훼연구소)에서 우선적으로 무병묘 생산 관리시스템(안)을 적용하여 무병묘 우수 품종들을 육성하고, 대량증식 기술을 확보하고 있는 육묘업체에게 무상 기술실시를 통한 무병묘를 공급함. 무병묘 우수 품종을 보급받은 육묘업체는 연구기관과 협력하여 지속적인 병발생 모니터링을 진행하여 무병묘를 유지하고, 대량증식하여 재배농가에게 보급함. 대량증식된 우수 품종들을 보급받은 농가들은 수요처 납품 전까지 연구기관과 협력하여 지속적인 병발생 모니터링을 진행하여 무병묘를 재배함. 이러한 생산체계는 신뢰할 수 있는 무병묘 공급과 이병묘에 대한 빠른 제거로 국내 무병묘 생산 체계를 향상시켜 국가 경쟁력을 높일 수 있을 것으로 예상됨.

현재 국내 화훼 산업의 위축 속에서 큰 어려움을 겪고 있는 농가들에 대한 지원 정책으로 본 연구에서 제시하는 무병묘 생산체계구축(안)은 우선적으로 국가 연구기관을 중심으로 실시하는 방향으로 제시함. 육묘업체 및 재배농가에서 바이러스억제 약제사포나 동지아를 사용하는 방법 등 재배상 이상이 없는 것을 선별하여 모주로 사용하는 방법 등 무병묘 생산 관리시스템으로 인한 추가 비용이 실질적인 농가에 부담이 되지 않도록 무병묘 생산을 위한 육묘비 생산비 지원과 관련된 정책건의를 제출하였음.

### 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

#### 1) 연구수행 결과

##### (1) 정성적 연구개발성과

- 백합 감염 바이러스에 대한 고감도 정밀진단기술 개발
  - 19종 백합 감염 바이러스 검정을 위한 고감도 프라이머 확보(20세트)
  - 신규 고감도 정밀진단기술 개발(8종)
  - 국화와 함께 검정할 수 있는 정밀진단기술(4종)
  
- 백합에서 바이러스 감염률 분석
  - 국내 주요 백합 품종별 바이러스 감염률 분석
  - 무병묘 생산을 위한 조직 배양 단계에서의 바이러스 감염률 분석
  - 무병묘 생산을 위한 순화 단계에서의 바이러스 감염률 분석
  
- 백합 무병묘 생산을 위한 바이러스 억제 기술 개발
  - 백합 감염 바이러스에 효과있는 항바이러스 물질 선발
  - 항바이러스제 적용 성장점 배양으로 무병묘 생산
  - dRNA 적용 조직 배양구에서의 바이러스 억제 효과 확인
  
- 국화 감염 바이러스에 대한 고감도 정밀진단기술 개발
  - 9종 국화 감염 바이러스 검정을 위한 고감도 프라이머 확보(9세트)
  - 신규 고감도 정밀진단기술 개발(4종)
  - 국화와 함께 검정할 수 있는 정밀진단기술(4종)
  
- 국화에서 바이러스 감염률 분석
  - 국내 주요 국화 품종별 바이러스 감염률 분석
  - 무병묘 생산을 위한 조직 배양 단계에서의 바이러스 감염률 분석
  - 무병묘 생산을 위한 순화 단계에서의 바이러스 감염률 분석
  
- 국화 무병묘 생산을 위한 바이러스(바이로이드) 억제 기술 개발
  - 국화 감염 바이러스(바이로이드)에 효과있는 항바이러스 물질 선발
  - 온도처리로 바이러스 억제 효과 확인
  - 항바이러스제로 바이러스 억제 효과 확인
  
- 백합 및 국화 무병묘 생산을 위한 관리방안 마련
  - 무병묘 생산단계에서의 개발된 정밀진단 기술을 적용할 수 있는 단계를 마련함
  - 무병묘 생산단계에서의 항바이러스 물질을 적용할 수 있는 단계를 마련함
  - 무병묘 생산단계에서의 바이러스 억제와 관련된 온도조건을 적용할 수 있는 단계를 마련함

(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명		연도	1단계 (2020~2021)	n단계 (2022)	계	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표 <sup>1)</sup>	특허출원	목표(단계별)	0	1	1	50
		실적(누적)	0	2	2	
	특허등록	목표(단계별)	0		0	
		실적(누적)	0		0	
	논문	목표(단계별)	4	2	6	
		실적(누적)	0	1	1	
	학술발표	목표(단계별)	4	2	6	10
		실적(누적)	6	5	11	
연구개발과제 특성 반영 지표 <sup>2)</sup>	기술이전	목표(단계별)	0	1	1	40
		실적(누적)	0	1	1	
	교육지도	목표(단계별)	0		0	
		실적(누적)	4	2	6	
	인력양성	목표(단계별)	0		0	
		실적(누적)	2	0	2	
	정책활용	목표(단계별)	0	2	2	
		실적(누적)	0	1	1	
	홍보전시	목표(단계별)	0		0	
		실적(누적)	1	1	2	
	고용창출	목표(단계별)	0		0	
		실적(누적)	1	0	1	
	계	목표(단계별)	8	8	16	
		실적(누적)	13		13	

\* 1) 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[에스시아이 Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신물질 등을 말하며, 논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.

\* 2) 연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(투자실적, 제품화, 매출액, 수출액, 고용창출, 고용효과, 투자유치), 비용 절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도), 교육지도, 인력양성(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 실제 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다 (연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	충남 예산 지역의 국화에서 바이러스 및 바이로이드 병들의 발생 현황	식물병 연구	방윤현	28	대한민국	한국식물병리학회	비SCI	2022.12.31	2233-9191	100%

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	The 2020 KSPP Conference & Special Symposium	민동주, 박지수, 홍진성	2020.10.14	한국과학기술회관 (온라인 개최)	대한민국
2	The 2020 KSPP Conference & Special Symposium	민동주, 박지수, 홍진성	2020.10.14	한국과학기술회관 (온라인 개최)	대한민국
3	2021 춘계 식물병리학회 학술대회	박지호, 방윤현, 이해민, 오지은, 송은경, 류기현	2021.04.21	서울대학교 (온라인 개최)	대한민국
4	2021 Spring International Conference of KSAE Applied Entomology	이영혜, 조은하, 박하성, 함인기	2021.04.29	SONO Belle Cheonan	대한민국
5	2021 Fall International Conference of KSAE	이영혜, 조은하, 박하성, 함인기	2021.10.28	SOL BEACH Samcheok	대한민국
6	2021 추계 식물병리학회 국제 학술대회	김주만, 방윤현, 이해민, 박지호, 오지은, 송은경, 이영혜, 류기현	2021.11.10	온라인 개최	대한민국
7	The 2022 KSPP spring conference; current topics of plant pathology in Korea	민동주, 박지수, 박태선, 홍진성	2022.04.20	변산소노벨	대한민국
8	2022 원예학회 정기총회 및 제115차 춘계학술발표회	이영혜, 김동찬, 조은아, 박하성, 최옥, 함인기	2022.05.25	대전컨벤션센터(DCC)	대한민국
9	the 2022 KSPP 60th annual meeting & fall international conference	민동주, 박태선, 홍진성	2022.10.18	순천대학교	대한민국
10	the 2022 KSPP 60th annual meeting & fall international conference	방윤현, 이해민, 송은경, 이영혜, 류기현	2022.10.19	순천대학교	대한민국
11	the 2022 KSPP 60th annual meeting & fall international conference	이해민, 송은경, 이재숙, 류기현	2022.10.19	순천대학교	대한민국

기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도

[기술적 성과]

지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	카페산을 포함하는 식물바이러스 방제용 조성물 및 이를 이용한 식물바이러스 방제 방법	대한민국	류기현, 송은경, 이혜민	2022.12 .01	10-2022 -016561 1				100	활용예 정	
2	멀티플렉스 피씨알 기반 백합 감염 바이러스 진단을 위한 조성물 및 이의 용도	대한민국	류기현, 송은경, 이혜민	2022.12 .09	10-2022 -017127 5				100	활용예 정	

지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

표준화

국내표준

번호	인증구분 <sup>1)</sup>	인증여부 <sup>2)</sup>	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 <sup>3)</sup>	제안/인증일자

\* 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.

\* 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.

\* 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

국제표준

번호	표준화단계구분 <sup>1)</sup>	표준명	표준기구명 <sup>2)</sup>	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 <sup>3)</sup>	제안자	표준화 번호	제안일자

\* 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.

\* 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.

\* 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	통상권실시	산업화활용을 위한 월명팜영농조합법인 기술이전	월명팜	2022.10.18	무상	

\* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

<기술 실시(이전)>

충청남도농업기술원 화훼연구소 육성품종의 산화업을 위해 본 과제에서 육성한 무병묘 '국화'를 대상으로 일반 관행묘에서 건전주를 선발하여 선발된 묘주를 지속적으로 모니터링 한 후, 충청남도농업기술원 화훼연구소에서 농업회사법인 육묘업체인 월명팜에 국화묘(1,000)를 보급하였고, 육묘업체에서는 국화묘를 증식하여 재배농가에게 분양하였음.

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 <sup>1)</sup>	사업화 형태 <sup>2)</sup>	지역 <sup>3)</sup>	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

\* 1) 기술이전 또는 자기실시

\* 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등

\* 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과					
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(천원)				
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내			
	국외				
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
	수출				

고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2020년	2022년	
1	작물 바이러스 및 병해충 대응 산업화 기술개발	강원대학교 산학협력단	1	1	1
합계			1	1	1

고용 효과

구분			고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력		
		생산인력		
	개발 후	연구인력		
		생산인력		

비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/ 수입

## [사회적 성과]

## □ 법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

## □ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용
1	제안	국화 국내 육성품종 보급을 위한 육묘 생산비 지원	국립원예특작과학원 기술지원과	2022	국화 육성품종 보급률을 높이기 위한 국화묘 구입비의 자부담비를 지원하고, 육묘업체 시설 개선비용을 지원하여 재배능가의 육성품종에 대한 무단 증식 방지와 육묘업체의 효율적인 건전묘 관리에 집중할 수 있도록 하여 국내 육성품종에 대한 재배면적이 확대 될 수 있도록 함

## □ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

## □ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1		2021		2				2	2				

## □ 산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

## □ 다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

## □ 국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	월간잡지	월간원예	충남농기원, '국화흰녹병'쾌적한 재배환경 당부	2021.04.07
2	지방일간지	투데이충남	충남농기원, '국화흰녹병'쾌적한 재배환경 당부	2022.10.19

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

210mm×297mm[(백상지(80g/m<sup>2</sup>) 또는 중질지(80g/m<sup>2</sup>)  
(22쪽 중 11쪽)]

[인프라 성과]

□ 연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

\* 「과학기술기본법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 기간	참석 대상	인원
1	국화 무병묘 생산을 위한 육묘업체 현장교육	국산 국화 모주재배관리 방법 교육 모주 무병묘관리, 병충해 방제 등 현장점검 및 컨설팅	충남농업기술원 화훼연구소	2020.10.14	농가	10
2	국화 재배기술 현장 컨설팅	국화 재배시 발생되는 문제점 점검 국화왜화바이러스 드 감염 예방법 교육	충남농업기술원 화훼연구소	2021.03.08	농가	10
3	2021년도 화훼 신품종 농가 컨설팅	국내 국화 농가를 방문하여 현장의 재배 문제점 및 병충해 피해도 확인 병충해 피해를 방지하기 위한 방제법 교육	충남농업기술원 화훼연구소	2021.07.14	농가	10
4	국화 무병묘 생산을 위한 육묘업체 현장교육	국산 국화 모주재배관리 방법 모주 무병묘관리, 병충해 방제 등 현장점검 및 컨설팅	충남농업기술원 화훼연구소	2021.10.27	농가	10
5	2022년도 3분기	국화 재배농가	충남농업기술원	2022.07.14	농가	3

	화훼 신품종 및 핵심기술 농가 컨설팅	정식 후 재배현황 확인 및 컨설팅, 병해충관리 방제 및 수출 작형 파악	화훼연구소			
6	2022년도 3분기 화훼 신품종 및 핵심기술 농가 컨설팅	국화 해충 발생으로 인한 현지 점검	충남농업기술원 화훼연구소	2022.09.15	농가	4

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

- 교육지도 : 6건 (농가를 대상으로 무병묘 국화 생산관리 및 재배에 관한 교육지도)
- 인력양성 : 2건 (석사학위 배출)
- 고용창출 : 1건
- 홍보 : 2건

## 2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)	
1 차 년 도	○ 백합 및 국화 감염 바이러스 검정을 위한 고감도 정밀진단 기술 개발	○ 백합 감염 바이러스에 대한 고감도 정밀진단기술 개발 - 19종 백합 감염 바이러스 검정을 위한 고감도 프라이머 확보 (20세트) - 신규 고감도 정밀진단기술 개발 (8종) ○ 국화 감염 바이러스에 대한 고감도 정밀진단기술 개발 - 6종 국화 감염 바이러스 검정을 위한 고감도 프라이머 확보 (6세트) - 신규 고감도 정밀진단기술 개발 (4종) ※국화와 함께 검정할 수 있는 정밀진단기술 (4종)	100
	○ 기존 백합 무병주 생산 구근에서 18종 바이러스에 대한 이병조사	○ 백합 무병묘 생산 구근에서의 바이러스 감염률 분석 - LMoV 65%, PIAMV 34%, CMV 34%, LSV 25% ○ 백합 무병묘 생산 구근에서의 우점바이러스 분석 - 강원도, 경기도, 충청남도 제주도에서 LMoV가 우점바이러스로 분석됨 - 전라북도는 LSV가 우점바이러스로 분석됨	100
	○ 국화 내수시장 및 수출시장 타켓 육성 품종과 주력품종 생산장점배양 및 식물유기	○ 국화 무병묘 생산을 위한 생장점 배양 - 보라미, 펄키스타, 코랑킹 품종을 대상으로 1,329개체 생장점 배양 - 그 중 266개체 발근배양 성공 ○ 국화 무병묘 모주 확보 - 9품종(경기도 육묘업체)을 대상으로 3주에 1회씩 검사 후, 이병주는 제거함 - 14품종(코랑킹, 레이나, U366, 엘도라, 써니랑 포함)을 대상으로 233개체의 건전 모주를 확보함	100
2 차 년 도	○ 백합 및 국화 감염 바이러스 검정을 위한 고감도 정밀진단 기술 개발	○ 1차년도에 개발된 백합 바이러스 진단기술의 최적 환경조건 확립 - Ta 온도 조절에 따른 환경조건 확립 - 프라이머 농도 조절에 따른 환경조건 확립 ○ 국화 감염 바이러스에 대한 고감도 정밀진단기술 개발 - 신규 고감도 정밀진단기술 개발 (3종) - 최종 9종 국화 감염 바이러스 검정을 위한 고감도 프라이머 확보 (9세트)	100
	○ 무병묘 생산 단계에서 바이러스 검정	○ 백합 재배지에서 바이러스 감염률 분석 - LMoV, LSV, CMV 또는 LMoV, LSV에 복합감염 확인 ○ 국화 생산단계에서 바이러스 검정 - 조직배양묘: CChMVd 27.00%, CSVd 4.33%, CVB 3.33%, TAV 0.33% - 순화묘: CChMVd 16.00%, CSVd 16.00% - 육묘재배지: CChMVd 43.16%, TSWV 42.11%, CSVd 16.67%	100
	○ 백합 바이러스 억제 기술접목 진정 무병 기본식물 생산 및 증식 체계 구축	○ 바이러스 감염된 백합 앞에서 항바이러스 억제 효과 검정 - 15 mM 식물유래물질 (B)에서 바이러스 발현 억제 효과 확인 ○ 식물유래물질 (B)와 바이러스를 함께 처리하여 바이러스 억제 효과 검정 - 식물유래물질 (B)는 60분 처리에서 79%의 바이러스 억제 효과 확인 ○ BD spray와 바이러스를 함께 처리하여 바이러스 억제 효과 검정 - 식물유래물질 (B)는 60분 처리에서 27%의 바이러스 억제 효과 확인	100
	○ 국화 육성 품종 및 주력 품종 생산장점 배양묘 무병화	○ 온도처리에 따른 바이러스 억제 효과 분석 - 저온처리 (4 °C) 3주: 60% 무병묘 생산 (CSVd, CChMVd 제거) - 고온처리 (35 °C) 2주 : 70% 무병묘 생산 (CSVd 제거) - 고온처리 (35 °C) 4주 : 75% 무병묘 생산 (CSVd 제거) ○ 화학적처리에 따른 바이러스 억제 효과 분석 - DHA처리: CSVd, CChMVd 제거되지는 않았지만, 바이로이드 발현율을 낮춤 ○ 항바이러스 후보 물질 대상으로 바이러스 억제 효과 분석 - 10 mM 식물유래물질 (A)에서 국화 감염 바이러스에서 효과	100
	○ 국화 기내 대량 증식 조건 확립	○ 국화 조직배양묘 기외순화 최적 조건 확립 - 품종별 기외순화 조건 분석 - 원예상토+피트모스> 질석> 원예상토> 피트모스 ○ 국화 조직배양묘 저장기간 기간별 생산력 분석 - 1개월 저온기간 순화묘 (100% 생존률) >3개월 저온기간 순화묘 (93% 생존률) ○ 신품종 국화와 기존품종 국화 사이의 염색체 분석 - 4품종 모두 염색체 이상 없음 ○ 국화 무병묘 생산에서 적합한 품종 분석 - 조직배양단계: 펄키스타, 코랑킹, 엘도라, 금수 품종 - 순화단계: SP19-138, 레드블, 본본다크, 화이트캡 품종	100
	○ 백합 및 국화	○ 국화 조직 배양묘에서 바이러스(바이로이드) 감염률 분석	100

	<p>화에 감염되는 바이러스에 대한 고감도 정밀진단기술 개발 및 무병묘 효율 향상을 위한 관리방안연구</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- CSVd 16.67%(에일린 핑크 11.11%, 올가핑크 16.67%, 에일린 22.22%)</li> <li>○ 백합 및 국화 감염 바이러스 정밀진단기술(qPCR) 개발</li> <li>- 백합 및 국화 감염 바이러스 정밀진단기술에 사용될 reference gene 개발</li> <li>- CMV, LSV, LMoV, CChMVd, CSV에 대한 정밀진단기술 개발</li> <li>○ 무병묘 생산 단계에서 적용될 수 있는 항바이러스 후보 물질 선발</li> <li>- 항바이러스 후보물질(A, G, E, F, I) 효과 검정 완료</li> <li>○ 무병묘 생산 체계를 위한 관리방안 마련</li> <li>- 개발된 정밀진단기술 및 항바이러스 물질을 적용한 무병묘 생산 체계 마련</li> </ul>	
<p>차 년 도</p>	<p>○ 백합 무병묘 생산성 향상을 위한 생산체계구축기술개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 원원종, 인편 증식 등 단계별 주요 감염 바이러스 분석</li> <li>- 조직 배양단계의 백합 바이러스를 qRT-PCR과 dPCR로 분석</li> <li>- 정식 전 약제처리를 통한 백합 바이러스 감염 분석</li> <li>○ 감염 억제를 위한 항바이러스제 처리, 작업 공정 개선 등을 통한 감염 억제 효과 분석</li> <li>- 생산 단계와 작업 공정에 따른 바이러스 억제 전략을 수립</li> <li>- 성장점 배양 및 항바이러스 물질을 처리하여 바이러스 억제 효과 확인</li> <li>- 정식 전 백합내에 dsRNA를 처리하여 바이러스 억제 효과 확인</li> <li>- 정식 전 항바이러스 물질을 처리하여 백합 생장을 증가 확인</li> </ul>	<p>100</p>
	<p>○ 국화 무병묘 생산성 향상을 위한 생산체계구축기술개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 국화 관행묘와 조직배양묘의 생육비교 분석완료</li> <li>- 무병주와 관행묘의 생육상태 비교: 초장과 엽수(무병묘&gt;관행묘)</li> <li>○ 바이러스 예방 약제 '바이캐미' 처리효과 검증</li> <li>- 바이캐미 5회, 10회처리에서 국화왜화바이로이드 제거율 100%</li> <li>- 바이캐미 5회, 10회처리에서 황화모틀바이로이드 발현율은 차이가 없었음</li> <li>○ 국화 품종별 모주의 노화주와 동지아 바이러스 감염률 분석완료</li> <li>- 동지아로 번식하면 CChMVd와 CSVd 감소</li> <li>○ 이병주 조직배양묘 고온 및 저온 처리 후 바이러스 감염률 분석완료</li> <li>- CChMVd는 고온에 15일 동안 보관</li> </ul>	<p>100</p>

#### 4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

##### 1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

---

해당 사항 없음

---

##### 2) 자체 보완활동

---

해당 사항 없음

---

##### 3) 연구개발 과정의 성실성

---

해당 사항 없음

---

## 5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

### 가) 기술적 측면

- 바이러스 정밀진단기술 개발은 극미량의 바이러스 검출에 대한 정확도를 높여 식물바이러스 정밀한 진단을 통한 무병묘를 생산할 수 있으며, 재배지에서의 바이러스 방제 및 확산을 방지에 기여할 수 있음
- 국내 주요 감염되는 바이러스를 조사하여 방제가 필요한 바이러스를 선별하여 더욱 효과적인 바이러스병 방제 대책을 마련할 수 있음
- 바이러스 무병묘 생산을 위한 바이러스 모니터링 시스템 구축의 토대를 마련할 수 있어 바이러스병 조기진단 및 외부로의 확산 방지가 가능해짐
- 국화의 효율적인 바이러스 무병화 기술개발로 안정적인 묘 수급체계 구축이 가능해짐

### 나) 경제적·산업적 측면

- 다수의 바이러스 종을 진단할 수 있는 정밀진단기술개발은 식물바이러스 진단키트 시장 창출이 가능해짐
- 고위험 바이러스병에 대한 조기진단으로 고품질 화훼 작물이 안정적인 것으로 생산되어 국내 농업 경쟁력 및 농가 소득 증가에 이바지할 수 있음
- 종묘업체(통상실사업체)의 효율적인 무병묘 증식 및 농가 보급으로 내수 및 수출 시장 경쟁력향상을 가져다줄 수 있음
- 국내 백합품종의 무병묘 생산 향상을 통해 국내 및 해외 화훼 시장에서의 경쟁력향상을 줄 수 있음

(단위 : 백만원, %)

총괄과제명	세부과제명	기관명	유형	총 연구개발비 (A)	정부지원 연구개발비 (B)	정부지원 연구개발비 비율 (C=B/A)	성과 유형	기술기여도	
								산정 근거	비율
화훼류 (백합, 국화) 무병묘 효율 향상 기술 개발 및 생산 체계 구축 기술 개발	○ 백합 및 국화에 감염되는 바이러스에 대한 고감도 정밀진단기술 개발 및 무병묘 효율 향상을 위한 관리방안연구	서울여자대학교 산학협력단	대학 (비영리)	293	293	1.000	신규 기술개발	해당 없음	-
	○ 백합 무병묘 생산성 향상을 위한 생산체계구축 기술 개발	강원대학교 산학협력단	대학 (비영리)	220	220	1.000	신규 기술개발	해당 없음	-
	○ 국화 무병묘 생산성 향상을 위한 생산체계구축 기술 개발	충남노업기술원 화훼연구소	국립연 (영리)	220	220	1.000	신규 기술개발	해당 없음	-
<b>계</b>				<b>733</b>	<b>733</b>	-	-	-	-

## 6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- 출원된 특허 2건을 대상으로 향후 5년 이내 특허 등록을 하고자 함
- 대학원 연계 연구원들은 학위를 취득 할 수 있게 지도함
- 농가를 대상으로 바이러스 무병묘 생산을 위한 교육 및 컨설팅 수행을 계획함
- 바이러스 진단기술 상업화를 위해 기업에 기술이전 및 시제품개발을 시도하고자 함

**< 연구개발성과 활용계획표 >**

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후	
국외논문	SCIE	1	
	비SCIE	0	
	계	1	
국내논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
특허출원	국내		
	국외		
	계		
특허등록	국내	2	
	국외		
	계	2	
인력양성	학사		
	석사		
	박사	1	
	계	1	
사업화	상품출시		
	기술이전		
	공정개발		
제품개발	시제품개발		
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보			
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			

## 참고문헌

- An, T., Huang, R., Yang, Z., Zhang, D., Li, G., Yao, Y., Gao, J. 2001. Alkaloids from *Cynanchum komarovii* with inhibitory activity against the tobacco mosaic virus. *Phytochemistry* 58; 1267–1269.
- Gan, X., Wang, Z., Hu, D. 2021. Synthesis of novel antiviral ferulic acid–eugenol and isoeugenol hybrids using various link reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 69:13724–13733.
- Ge, Y., Liu, K., Zhang, J., Mu, S., Hao, X. 2012. The limonoids and their antitobacco mosaic virus (TMV) activities from *Munronia unifoliolata* Oliv. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 4289–4295
- Chang, M.U., Chung, J.D. 1987. Studies on viruses isolated from *Lilium* spp. in Korea. *Plant Pathology Journal* 3:223–235.
- Chen, J., Shi, Y., Adams, M.J., Chen, J. 2005. The complete sequence of the genomic RNA of an isolate of lily virus X (genus *Potexvirus*). *Archives of Virology* 150:825–832.
- Choi, H., Jo, Y., Zhou, Y., Cho, W.K. 2019. First report of milk vetch dwarf virus infecting lily in Korea. *Plant Disease* 103:2144.
- Cohen, J., Gera, A., Loebenstein, G. 1995. Strawberry latent ringspot virus in lilies. *European Journal of Plant Pathology* 101:217–219.
- Derks, A.F.L.M. 1975. Tobacco rattle virus in lilies. *Netherlands journal of Plant Pathology* 81:78–80.
- Hammond, J., Bampi, D., Reinsel, M.D. 2015. First report of plantago asiatica mosaic virus in imported asiatic and oriental lilies (*Lilium* hybrids) in the United States. *Plant Disease* 99:292,
- Kim, J.S., Choi, G.S. 1990. Tomato ringspot virus isolated from lily showing yellow stripe symptom in Korea. *Plant Pathology Journal* 63:369–375.
- Kwon, J.Y., Ryu, K.H., Choi, S.H. 2013. Reverse transcription polymerase chain reaction–based system for simultaneous detection of multiple lily–infecting viruses. *Plant Pathology Journal* 29:338–343.
- Li, Y., Wang, L., Li, S., Hao, X. 2007. Seco–pregnane steroids target the subgenomic RNA of alphavirus–like RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:8083–8088.
- MAFRA (Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs). 2021. Annual report of floriculture. MAFRA press, Sejong, Korea. 17 pp.
- Nesi, B., Lazzereshi, S., Pecchioli, S., Grassotti, A. 2013. Detection of viruses infecting *Lilium* spp. by RT–PCR and real–time PCR. *Acta Horticulturae* 1002:215–221.

- Niimi, Y., Han, D., Mori, S. Kobayashi, H. 2003. Detection of cucumber mosaic virus, lily symptomless virus and lily mottle virus in *Lilium* species by RT-PCR technique. *Scientia Horticulturae* 97:57-63.
- Masuta, C., Seshimo, Y., Mukohara, M., Jung, H.J., Ueda, S., Ryu, K.H., Choi, J.K. 2002. *Journal of General Plant Pathology* 68:163-168.
- Ohira, K., Ito, T., Kawai, A., Namba, S., Kusumi, T., Tsuchizaki, T. 1994. Nucleotide sequence of the 3' -terminal region of citrus tatter leaf virus RNA. *Virus Genes* 8:169-172.
- Park, C.H., Song, E.G., Ryu, K.H. 2011. A multiplex PCR assay for the simultaneous detection of five potexviruses infecting cactus plants using dual-priming oligonucleotides (DPOs) primers. *Journal of Virological Methods* 298:114-280
- Ryu, S.M., Lee, H.M, Song, E.G., Seo, Y.H., Lee, J., Guo, Y., Seok, Kim, B.S., Kim, J., Hong, J.S., Ryu, K.H., Lee, D. 2017a. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65:4273-4279.
- Ryu, S.M., Kwon, J., Seo, Y.H., Song, E.G., Hong, S.S. Kim, B.S., Hong, J.S., Ryu, K.H., Lee, D. 2017b. Quassinoids isolated from *Brucea javanica* inhibit pepper mottle virus in pepper. *Virus Research* 227:49-56.
- Song, H., Liu, Y., Liu, Y., Wang, L., Wang, Q. 2014. Synthesis and antiviral and fungicidal activity evaluation of  $\beta$ -carboline, dihydro- $\beta$ -carboline, tetrahydro- $\beta$ -carboline alkaloids, and their derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62: 1010-1018.
- Wang, J. Hao, K., Yu, F., Shen, L., Wang, F., Yang, J., Su, C. 2022. Field application of nanoliposomes delivered quercetin by inhibiting specific hsp70 gene expression against plant virus disease. *Journal of Nanobiotechnology* 20:16.
- Wang, K., Hu, Y., Liu, Y., Mi, N., Fan, Z., Liu, Y., Wang, Q. 2010. Design, synthesis, and antiviral evaluation of phenanthrene-based tylophorine derivatives as potential antiviral agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 12337-12342.
- Wang, Z., Wei, P., Wang, L., Wang, Q. 2012. Design, synthesis, and antitobacco mosaic virus (TMV) activity of phenanthroindolizidines and their analogues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 10212-10219.
- Xu, L., Song, M., Ming, J. 2022. Application of multiplex TaqMan real-time PCR assay in survey of five lily viruses infecting *Lilium* spp. *Agronomy* 12:47.
- Yang, P.P., He, G.R, Cao, Y.W, Xu, LF, Ming, J. 2019. First report of shallot yellow stripe virus in *Lilium lancifolium* in China. 103:2145.
- Zhang, Y., Wang, Y., Xie, Z., Wang, R., Guo, Z., He, Y. 2020. Rapid detection of lily mottle virus and arabis mosaic virus infecting lily (*Lilium* spp.) using reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *Plant Pathology Journal* 36:170-178.

Zhang, B., Yang, D., Zhang, Y., Xu, Y., Zhao, X., Liang, J., Fan, x., Du, Y., Zhu, Z., Shi, B., Zhang, Q., Zhang, X., Cai, Y., Zhao, K. 2018. Rapid visual detection of lily mottle virus using a loop-mediated isothermal amplification method. *Archives of Virology* 163:545-548.

Zhang, Y., Wang, Y., Meng, J., Xie, Z., Wang, R., Kutcher, H.R. Guo, Z. 2015. Development of an immunochromatographic strip test for rapid detection of lily symptomless virus. *Journal of Virological Methods* 220:13-17.

별첨자료-표1. 백합 및 국화 감염 바이러스(바이로이드) 검정을 위한 프라이머 정보

Species	Primer name	Sequences (5' -->3')	Amplicon size	Ta (°C)
Arabidopsis mosaic virus (ArMV)*	ArMV CP 737 F	GCATAGTCCTAAGAGTTGTTAG	448	55
	ArMV CP 1184 R	CCATGACAAGCTATCATGTG		
Arabidopsis mosaic virus (ArMV)	ArMV-RNA2-F	CCAATTGCCCAAGTGAG	546	
	ArMV-RNA2-R	CAAARTTYCCTCTYGGCTTGC		
Broad bean wilt virus2 (BBWV2)	BBWV2 RNA2 1442 F	AATGAAGTGGTCTCAACTAC	653	55
	BBWV2 RNA2 2095 R	TTTTGGAGCATCAATTT		
Broad bean wilt virus2 (BBWV2)	BBWV2-506-F	GGTGAGCAGTTTGTCTCAGAAGT	506	
	BBWV2-506-R	CCAGATAATGCATATCCACC		
Chrysanthemum chlorotic mottle viroid (CChMVd)*	CChMVd 226 F	TCCGGTCCTTTGGAGTCC	142	58
	CChMVd 367 R	TGGAGTGGACTAAGACTCCG		
Chrysanthemum chlorotic mottle viroid (CChMVd)	CChMVd F	CAGTTTCGGCTTGTGCGG	216	52
	CChMVd R	CCGAGGAGAATATCCAACGAG		
Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV)*	CSNV CP 39 F	GAACTCCAACATCTCATAGA	614	55
	CSNV CP 670 R	CAATGATAACCTGGATCAGATC		
Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV)	CSNV F	GAACTCCAACATCTCATAGA	632	55
	CSNV R	CAATGATAACCTGGATCAGATC		
Chrysanthemum stunt viroid (CSVd)*	CSVd full F	CGGGACTTACTTGTGGTT	354	60
	CSVd full R	AGGGAACAAAATAAGGTTTC		
Chrysanthemum stunt viroid (CSVd)	CSVd F	ACTCCTGACCCTGCTGCTT	313	52
	CSVd R	AAGGTTCCACGGGCTTACT		
	CSVd-1P	CTTAGGACCCCACTCTGCG	349	53
	CSVd-1M	CCGCGATCTCGTGGACTTC		
Citrus tatter leaf virus (CTLV)*	CTLV MP 808 F	AGAGGATTTAGGTCCCTCTC	156	55
	CTLV MP 963 R	TCAGGGGGAGGAACC		
Citrus tatter leaf virus (CTLV)	CTLV-F	GCCACTTCTAGGCAGAACTCTTTGA A	272	
	CTLV-R	AACCCCTTTTTGTCCTTCAGTACGA A		
Cucumber mosaic virus (CMV)	CMV CP full F	ATGGACAAATCTGAATCAACC	650	55
	CMV CP full R	TCAGACTGGGAGCACTCCAGA		
	CPTALL F	YASYTTTDRGGTTCAATTCC	950	
	CPTALL R	GACTGACCATTTAAGCCG		
Chrysanthemum virus B (CVB)	CVB 6952 F	CTGATGCCTTACACCT	547	60
	CVB 7498 R	TAACGATCTAACCACTCAC		
	CVB F	AGTCACAATGCCTCCCAAAC	621	52
	CVB R	CATACCTTTCTTAGAGTGCTATGCT		
Impatiens necrotic spot virus (INSV)*	INSV CP 23 F	ATGAACAAAGCAAAGATTACCAAG	768	55
	INSV CP 640 F	ATCAATAGTAGCATTAAACATGCT		
Lily mottle virus (LMoV)	LMoV HC-Pro F	GCCCAGGCGATAAATTCTGGG	450	55
	LMoV HC-Pro R	GCCGACCTGGTAGTGCTTCATT		
	LMoV-CP-F	TGAAGTTACTTCACGCACGCCAGC ACGCGC	152	
	LMoV-CP-R	ACATCATCTGCTGTATGCCTCTCCG TGTC		

Lily symptomless virus (LSV)	LSV TGB1 5934 F	ATGGATGTTTTACTAGCATTGTT	200	55
	LSV TGB1 6133 R	TTAATCCGGACACCAGTGATG		
	LSV-CP-F	AAGCACGCTGGACTGCGGAAA GTCTGCCGG	208	
	LSV-CP-R	TCAGCAGAAGTGGGTGCGCCTG ATGATCCCC		
Lily virus X (LVX)*	LVX CP full F	ATGACGACCTTTGTTCCTG	606	55
	LVX CP full R	CTAGGGTGGGGACAGTAG		
Lily virus X (LVX)	LVX-CP-F	CAACGTGCCGCATCTACC	761	
	LVX-CP-R	AAGTTTAGTGATGGTGGGC		
Milk vetch dwarf virus (MDV)*	MDV CP 2 F	TGGTGAGCAATTGGAATTG	313	50
	MDV CP 314 R	TTCCTAACAGAGCAGG		
Milk vetch dwarf virus (MDV)	MDV-DNAS-F	ACAGCTGTCTTTGCTTCG	734	
	MDV-DNAS-R	ATGCCCTTCATTAATGAAGG		
Narcissus mosaic virus (NMV)	NMV 63 F	GAATAGAGCTCCATCACTGGA	659	55
	NMV CP 631 R	TACCGTGAGTGACTTCAGC		
Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV)	PIAMV UP	ATGGCACTCAACCAAGCT	602	58
	PIAMV DN	AACTGGATTTGCGGAGCC		
	PIAMV-F	AACGCCCGGCTTCCAGAAATCTC CCACCG	246	
	PIAMV-R	AACTGGATTTGTGAACTGGGTGG AGGTTGAGGCTAGGT TGCGGAGCC		
Potato virus X (PVX)	PVX CP 5658 F	ACCAGCTAGCACAAACACA	626	55
	PVX CP 6283 R	TGGCAAAGTCGTTGGATT		
Shallot yellow stripe virus (SYSV)	SYSV CP full F	GCATCAGAATCAGAAGACGC	775	55
	SYSV CP full R	CATACGAAGACCGAACAG		
Strawberry latent ringspot virus (SLRSV)*	SLRSV-lily 1 LCP 544 F	GATATAGGCATGGGTATTGG	280	50
	SLRSV-lily 1 LCP 823 R	CAAAACCCATTCCACAGT		
	SLRSV-lily 2 LCP 284 F	TGTTGTGGTTGTGCTATGAT	833	55
	SLRSV-lily 2 LCP 1116 R	CTCCAAATAGTCCAAATCCT		
Tobacco mosaic virus (TMV)	TMV CP full F	ATGTCTTACAGTACTACTAC	480	55
	TMV CP full R	TCAAGTTGCAGGACCAGAGG		
	Tobamod-F	TKGAYGGNGTBCCNGGNTGYGG	800	
	Tobamod-R	ACNGAVTBNABCTGTAATTGCTAT		
Tobacco rattle virus (TRV)	TRV RNA2 646 F	ATACAAGCTGACAGGGAC	437	55
	TRV RNA2 1081 R	GGAACCCACCTAGTGTTG		
Tobacco ringspot virus (TRSV)*	TRSV MP 16 F	GTGCAAGAAATGACGAGCAT	317	55
	TRSV MP 332 R	CGTGAAGGGCAGACAC		
Tomato aspermy virus (TAV)*	TAV CP full F	ATGGCCAAAACGGTACG	657	58
	TAV CP full R	CAACGCTCCCGGTGTGA		
Tomato ringspot virus (ToRSV)*	ToRSV CP 990 F	ATTCATGTGTTATTTGATCAC	486	58
	ToRSV CP 1475 R	CTTGTGGATAGGCTTTC		
Tomato spotted wilt virus (TSWV)	TSWV CP full F	TTAAGCAAGTTCTGTGAGTTTTGC	777	55
	TSWV CP full R	ATGTCTAAGGTTAAGCTCACTAA		
	TSWV-N-F	TAGCCAAGACAACACTGATCATCT CAAAGC	222	
	TSWV-N-R	AGAAGGCTTGATAGCTTGATCAGG GTCAGG		

Tomato spotted wilt virus (TSWV)	TSWV F	ATCAGTCGAAATCCTCGGCA	777	55
	TSWV R	AATTGCCTTGCAACCAATTC		

흰색: 백합 감염 바이러스 검정용 프라이머

노란색: 국화 감염 바이러스 검정용 프라이머

주황색: 국화 및 백합 감염 바이러스 검정용 프라이머

\*: 본 연구에서 신규로 제작된 프라이머