

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업
2023년도 최종 보고서

발간등록번호

11-1543000-004367-01

NGS이용 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 감염
현황 조사 및 식물 세포 바이오파이커를
활용한 무병묘 스택 생산 기술 개발

2023.06.01.

주관연구기관 / 성균관대학교산학협력단
협동연구기관 / (주)바이오에프디엔씨

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

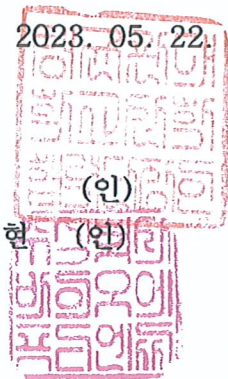
본 보고서를 “NGS이용 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 감염 현황 조사 및 식물 세포 바이오파브릭을 활용한 무병묘 스택 생산 기술 개발”(개발기간 : 2020.04. ~ 2022.12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

주관연구기관명 : 성균관대학교산학협력단 (대표자) 최재봉

(인)

협동연구기관명 : (주)바이오에프디엔씨 (대표자) 모상현, 정대현

(인)



주관연구책임자 : 조원경

협동연구책임자 : 이정훈

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

< 요약 문 >

| | | | | | | | |
|------------------------|--|---|--------------------|----------|--------------------------------|--------|-----|
| 사업명 | 작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업 | 총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성) | | | | | |
| 내역사업명 (해당 시 작성) | 진단기술 산업화 | 연구개발과제번호 | | 120085-3 | | | |
| 기술분류 | 국가과학기술 표준분류 | LB0304 | 70% | LB0202 | 20% | LB0206 | 10% |
| | 농림식품 과학기술분류 | RA0301 | 50% | AA0202 | 40% | CA0106 | 10% |
| 총괄연구개발명 (해당 시 작성) | | | | | | | |
| 연구개발과제명 | NGS이용 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 감염 현황 조사 및 식물 세포 바이오효액터를 활용한 무병묘 스탁 생산 기술 개발 | | | | | | |
| 전체 연구개발기간 | 2020. 04. 29 - 2022. 12. 31 (2년 9개월) | | | | | | |
| 총 연구개발비 | 총 947,001 천원 (정부지원연구개발비: 807,000 천원, 기관부담연구개발비 : 140,001 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원) | | | | | | |
| 연구개발단계 | 기초[] 응용[○] 개발[] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[] | | 기술성숙도 (해당 시 기재) | | 착수시점 기준(50) 종료시점 목표(95) | | |
| 연구개발과제 유형 (해당 시 작성) | | | | | | | |
| 연구개발과제 특성 (해당 시 작성) | | | | | | | |
| 연구개발 목표 및 내용 | 최종 목표 | 국내에서 상업적으로 매우 중요한 영양작물인 고구마, 마늘, 딸기를 대상으로 NGS를 이용하여, 품종별, 지역별, 조직별 감염 바이러스를 조사하고, 작물별 바이러스 통합 분자진단 시스템을 개발한다. 각 영양작물별 주요 2품종을 대상으로 바이러스 프리 캘러스를 유도하고, NGS와 RT-PCR를 이용해 바이러스 프리 캘러스를 선별한다. 선별된 바이러스 프리 캘러스는 바이오효액터 이용 대량 세포 증식하며, 동결보존 방법을 이용해 스탁을 개발한다. 개발된 스탁으로부터 바이러스 프리 모종 생산 및 바이러스 최종 검정 후 상업적으로 판매한다. | | | | | |
| | 전체 내용 | 고구마, 마늘, 딸기는 국내에서 상업적으로 매우 중요한 영양 작물로서, 바이러스 복합감염은 인해 영양 작물의 생산성과 품질에 많은 피해를 주고 있다. 오래전부터 영양작물 바이러스 프리 모종에 대한 수요 및 개발이 이루어지고 있다. 하지만 조직배양을 중점으로 하는 연구개발팀의 특성으로 인해, 실제 개발되고 보급된 대부분의 바이러스 프리 모종은 세균과 곰팡이만 제거되었을 뿐, 계속 바이러스에 복합 감염되어 있는 것으로 확인되었다. 본 연구의 첫 번째 목표는 최신 유전자 분석기술인 NGS를 이용 국내 고구마, 마늘, 딸기 감염 바이러스를 지역별, 품종별, 조직별로 조사하고, 동정된 바이러스들을 모두 검정할 수 있는 통합 분자진단 시스템을 개발하고자 한다. 두 번째 목표는 각 품종별 대표 2품종을 선별하여 NGS로 바이러스를 정밀하게 진단한 후 생장점, 열처리, 화학약품 처리를 통해 바이러스 프리 캘러스를 유도한다. 유도된 캘러스는 다시 NGS와 RT-PCR를 통해 바이러스 프리 캘러스를 확실히 선별한다. 선별된 바이러스 프리 캘러스는 식물세포 배양 대용량 바이오효액터(Bioreactor)를 이용해 대량 증식한다. 증식된 바이러스 프리 캘러스는 동결보존을 통해 장기 보존한다. 동결 보존된 캘러스로부터 바이러스 프리 모종을 생산하며, 생산된 모종은 다시 NGS와 RT-PCR를 이용해 감염 여부를 재확인한다. 최종적으로 바이러스 프리로 검정된 모종들은 상업적으로 시장에 판매하여 기존에 개발된 모종과의 확실한 품질 경쟁력 확보 및 바이러스 프리 보증 서비스를 수행할 것이다. 본 연구는 단순히 기존 연구의 답습이 아닌, 최신 NGS기술과 RT-PCR를 이용해 매우 정밀하게 바이러스를 진단하여, 바이러스 프리 캘러스와 묘를 개발하는데 주 목적을 두고 있다. 연구를 통해 개발된 작물별 통합 | | | | | |

| | | |
|------------------|----|--|
| | | 바이러스 진단 시스템, 바이러스 프리 캘러스, 식물 세포 동결보존 방법, 바이러스 프리 세포 대량 증식 기술들은 모두 특허 출원을 통해 지식 재산권 확보와 상업화를 실행할 것이다. 또한 작물별 바이러스 연구와 바이러스 진단 방법은 저명한 국외 학술지에 논문게재가 가능하다. |
| 1단계 (해당 시 작성) | 목표 | - NGS이용 고구마, 마늘 바이러스 감염 현황 조사 및 식물 세포 바이오리액터를 활용한 무병묘 스탁 생산 기술 개발 |
| | 내용 | 1) NGS이용 국내 고구마 및 마늘 감염 바이러스 정밀하게 모두 동정 및 분석 2) 고구마 및 마늘 감염 바이러스 진단 방법 개발 3) 고구마, 마늘, 딸기 작물별 2개 품종 총 6개 품종 바이러스 프리 캘러스 스탁 및 동결보존 방법 개발 |
| 2단계 (해당 시 작성) | 목표 | - NGS이용 딸기 바이러스 감염 현황 조사 및 식물 세포 바이오리액터를 활용한 무병묘 스탁 생산 기술 개발 |
| | 내용 | 1) NGS이용 국내 딸기 감염 바이러스 정밀하게 모두 동정 및 분석 2) 딸기 감염 바이러스 진단 방법 개발 3) 바이오리액터 이용 바이러스 프리 캘러스 대량 세포 증식 방법 개발 4) 6개 품종별 바이러스 프리 모종 생산(100개씩) 및 상업화 |

정량적 연구성과

정량적 성과로 SCIE논문 5건, 평균(IF) 2.719, 특허출원 2건, 학술발표 6건, 생명정보 44건, 기술실시 6건, 제품화 6건, 수상실적 2건, 고용창출 8건, 홍보실적 3건, 매출액 3천2백만원을 달성하였습니다. 모든 목표치를 달성 또는 초과 달성하였습니다.

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

| 성과지표명 | | 연도 | 계 (2020~2022) | 가중치 (%) | |
|--------------------------------|----------------------------------|---------|------------------|------------|--|
| 전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾ | 논문(SCIE) | 목표(단계별) | 3 | | |
| | | 실적(누적) | 5 | | |
| | 평균IF | 목표(단계별) | 2 | | |
| | | 실적(누적) | 2.719 | | |
| | 특허출원 | 목표(단계별) | 2 | 30 | |
| | | 실적(누적) | 2 | 30 | |
| | 학술발표 | 목표(단계별) | 3 | 20 | |
| | | 실적(누적) | 6 | 20 | |
| | 생명정보 | 목표(단계별) | 0 | | |
| | | 실적(누적) | 44 | | |
| | 연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾ | 기술실시 | 목표(단계별) | 0 | |
| | | | 실적(누적) | 6 | |
| 제품화 | | 목표(단계별) | 1 | 15 | |
| | | 실적(누적) | 6 | 15 | |
| 수상실적 | | 목표(단계별) | 0 | | |
| | | 실적(누적) | 2 | | |
| 고용창출 | | 목표(단계별) | 0 | | |
| | | 실적(누적) | 8 | | |
| 홍보실적 | | 목표(단계별) | 2 | 20 | |
| | | 실적(누적) | 3 | 20 | |
| 매출액 | | 목표(단계별) | 30,000 | 15 | |
| | | 실적(누적) | 32,000 | 15 | |
| 계 | | 목표(단계별) | 43 | 100 | |
| | | 실적(누적) | 116.719 | 100 | |

정성적 연구성과

| 추진 목표 | 달성 내용 | 달성도 (%) |
|------------------------------|--|------------|
| ○ NGS이용 품종별, 조직별 고구마 바이러스 분석 | - 호감미 5종, 진을미 2종, 밤고구마 2종, 꿀고구마 3종, 호박고구마 3종 바이러스에 복합 감염됨 - 5개 조직으로부터 총 7개 바이러스를 동정했으며, 5개 조직 중 fibrous root과 root stalk에 바이러스 양이 가장 많은 것으로 밝혀짐 | 100 |
| ○ 고구마 바이러스 진단 시스템 개발 | SPVG, SPVE, SPVC, SPSMV 등 총 4종 대상 RT-PCR 기반 진단 방법 개발 SPLCV, SPCFV, SPVC, SPSMV1 등 총 4종 대상 real time RT-PCR 기반 진단방법 개발 | 100 |

연구개발성과

| | | |
|--|--|-----|
| ○ 바이러스 프리 무병묘 개발을 위해 고구마 2품종, 딸기 2품종, 마늘 2품종 NGS이용 바이러스 분석 | 고구마 호감미 3종, 고구마 진율미 2종, 마늘 가담 11종, 마늘 홍산 7종에 감염된 바이러스 동정 딸기 설향 및 매향은 바이러스에 감염되지 않았음 | 100 |
| ○ NGS이용 품종별, 지역별 마늘 바이러스 분석 | 강원도에서 3개 샘플, 전남에서 5개 샘플, 경남 2개 샘플, 충남 1개 샘플, 제주 1개 샘플을 포함하여 총 12개 샘플 채취 RNA-sequencing을 통해 총 12개 라이브러리로부터 최소 8종에서 많게는 10종 마늘 감염 바이러스 동정 -NGS이용 신종 마늘 바이러스 Garlic virus J 동정 및 유전체 조립 12개 마늘 샘플로부터 43개 allexivirus 유전체, 26개의 potyvirus 유전체, 18개 carlavirus 유전체를 포함해서 총 87개 마늘 바이러스 유전체를 조립 및 계통수 분석 | 100 |
| ○ 마늘 바이러스 진단 시스템 개발 | 7종 allexivirus 특이적 진단을 위한 RT-PCR 진단 방법 개발 4종 GarVA, GarVC, GarCLV, OYDV 4종 real time RT-PCR 진단 방법 개발 | 100 |
| ○ RT-PCR 이용 6개 품종 바이러스 프리 캘러스 선발 | 6개 품종에 감염되어 있는 바이러스 NGS를 통해 동정 및 유전체 조립 동정된 바이러스 대상 RT-PCR 진단 방법 개발 및 기술 (㈜바이오에프디엔씨에 제공) RT-PCR방법 이용 캘러스 바이러스 감염 여부 확인 | 100 |
| ○ NGS 이용 딸기 바이러스 동정 | - RNA sequencing을 이용해 30개의 딸기 라이브러리에서 딸기 바이러스 동정 10개의 라이브러리에서 바이러스 서열 확인 - 국내 유통 딸기 품종 킹스베리, 설향, 매향에서 NGS를 이용해 딸기 바이러스 동정 - 국내 유통 딸기 설향과 매향에서 NGS 분석으로 Strawberry mottle virus 전체 서열 동정 - 딸기 킹스베리에서 바이러스 감염되지 않음을 확인 | 100 |
| ○ 딸기 바이러스 진단 방법 개발 | 딸기 설향과 매향에서 동정된 Strawberry mottle virus를 real time RT-PCR로 진단 - Strawberry mottle virus 진단 RT-PCR용 프라이머 디자인 | 100 |
| ○ 바이러스 프리 고구마, 마늘, 딸기 캘러스 라인 확인 | - 고구마, 마늘, 딸기 캘러스 유도 시료에서 RNA sequencing을 이용해 바이러스 진단 - RT-PCR 방법 이용 캘러스 바이러스 감염 여부 확인 - 고구마 진율미에서 유도된 캘러스에서 바이러스 프리 라인 확인 - 마늘 가담 캘러스에서 바이러스 프리 라인 확인 - 딸기 설향, 딸기 매향에서 유도된 기내식물에서 바이러스 프리 라인 선별 | 100 |
| ○ 바이러스 진단 키트 개발 | - 고구마 5종 바이러스 진단 프라이머 선별과 One Step RT-PCR 키트 및 매뉴얼 개발 완료 - 마늘 5종 바이러스 진단 프라이머 디자인과 One Step RT-PCR 키트 및 매뉴얼 개발 완료 - 딸기 2종 바이러스 진단 프라이머 선별과 One Step RT-PCR 키트 및 매뉴얼 개발 완료 - 본 연구에서 개발한 One Step RT-PCR 진단 키트는 국내 3종 작물을 감염시키는 대부분을 진단할 수 있음 - 연구를 통해 확보한 바이러스 유전체를 바탕으로 진단 방법을 개발하여 바이러스 진단의 정확성을 높였음 - 기존 진단 방법과 비교하여 더 많은 바이러스들을 정밀하게 진단할 수 있는 방법을 개발하여 기술의 우수성과 차별성이 매우 높음 | 100 |
| ○ 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 프리 캘러스 유도 | - 고구마의 잎과 엽병 조직 유래 캘러스 확보 - 마늘의 잎조직 유래 캘러스 확보 - 딸기의 엽병 조직 유래 캘러스 확보 | 100 |
| ○ 작물별, 품종별 세포 배양 배지 조성 개발 | - 마늘과 고구마 딸기 식물체의 캘러스 유도 배지 선별 - 마늘과 고구마 캘러스 라인선발 및 증식 - 마늘과 고구마 딸기 기내 식물체 확보 - 딸기 생장점 소독 방법 및 배지조성 개선 필요 | 100 |
| ○ 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 프리 캘러스 및 식물체 확보 | - 고구마, 마늘, 딸기 캘러스를 증식하고 RT-PCR을 이용하여 바이러스를 검정함 - 고구마 정단 생장점을 0.2~0.5mm 크기로 적출하여 2,4-D 처리 배지에서 캘러스 확보 및 BA와 NAA 조합에서 신초 및 캘러스를 - 마늘 1엽원기를 포함한 정단생장점 배양을 통해 캘러스 및 신초를 확보하였고, stem-disc배양을 통해 다수의 기내 신초를 확보 - 딸기 런너 기부의 생장점 배양으로 기내 식물체 및 캘러스 확보 | 100 |
| ○ 작물별 동결보존 기초 조건 규명 | - 고구마 1품종(호감미)에서 액체질소 처리 후 TTC 검정을 통해 캘러스 생존한 조건 확보 - 마늘 2품종(가담, 홍산)에서 액체질소 처리 후 TTC 검정을 통해 | 100 |

| | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|---|---|----------|----------|------------|-----------|----------|------------------|-----------|-----|-----|----|
| | | 동결보존 기초 조건 확보 - 딸기 2품종 모두 전처리, Loading 단계까지 캘러스 생존 확인. | | | | | | | | | | |
| ○ 바이옱리액터를 이용한 대량 생산기술 개발 | - 확보된 virus free 진율미 캘러스를 2,4-D 0.5mg/L가 첨가된 MS액체배지에 현탁배양 후 3L 바이옱리액터에 접종 배양조건 확립. - 5L 바이옱리액터로 scale up하여 대량 배양 | | 100 | | | | | | | | | |
| ○ 무병묘 상업화 | - 고구마, 딸기 바이러스 프리 기내 식물체를 대량 증식하여 기내 프리묘를 공급하여 3200만원 매출 및 상업화 성공 | | 100 | | | | | | | | | |
| 연구개발성과 활용계획 및 기대 효과 | <ul style="list-style-type: none"> - 고구마, 마늘, 딸기 지역별, 품종별, 조직별 바이러스 정밀 동정 및 유전체 확보 - 초정밀 영양 작물별 통합 바이러스 분자 진단 시스템 세계 최초 개발 총 6종 영양 작물 품종 대상 바이러스 프리 캘러스 선발 및 대량 증식 총 6종 영양 작물 품종 바이러스 프리 캘러스 동결 보존 및 장기보관 - 총 6종 영양 작물 품종 바이러스 프리묘 생산 및 판매 - 연구된 결과 발표 최고 학술지에 논문 게재 - 개발된 진단 키트, 바이러스 프리묘 특허 출원 및 상업화 - NGS와 분자 진단 키트 활용한 영양작물 바이러스 진단 서비스 구축 - 본 연구를 통해 저희 연구팀은 연구 결과들을 바탕으로 지속적으로 관련 연구논문들을 발표할 것이며, 지속적인 연구를 통해 다양한 작물들을 대상으로 바이러스 진단 키트 개발과 영양작물에 대한 바이러스 프리 무병묘 개발 연구 및 상업화를 지속적으로 수행할 계획임 | | | | | | | | | | | |
| 연구개발성과의 비공개여부 및 사유 | 해당사항 없음 | | | | | | | | | | | |
| 연구개발성과의 등록·기탁 건수 | 논문 | 특허 | 보고서 원문 | 연구 시설·장비 | 기술 요약 정보 | 소프트웨어 | 표준 | 생명자원 | | 화학물 | 신품종 | |
| | 5 | 2 | 1 | | | | | 44 | | | 정보 | 실물 |
| 연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황 | 구입기관 | 연구시설·장비명 | 규격 (모델명) | 수량 | 구입 연월일 | 구입가격 (천원) | 구입처 (전화) | 비고 (설치장소) | ZEUS 등록번호 | | | |
| 국문핵심어 (5개 이내) | 고구마 | | 마늘 | | 딸기 | 바이러스 | | 무병묘 | | | | |
| 영문핵심어 (5개 이내) | Sweet potato | | Garlic | | Strawberry | Virus | | Virus free stock | | | | |

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 중질지(80g/m²)]

< 목 차 >

| | |
|----------------------------------|-----|
| 1. 연구개발과제의 개요----- | 7 |
| 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용----- | 21 |
| 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도----- | 110 |
| 4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)----- | 168 |
| 5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도----- | 168 |
| 6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획----- | 169 |

| 최종보고서 | | | | | | 보안등급 | | | | | |
|-------------------------|-----------------|---|---------------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------|---------|---------|----------------|---------|--|
| | | | | | | 일반[○], 보안[] | | | | | |
| 중앙행정기관명 | 농림축산식품부 | | | 사업명 | 작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업 | | | | | | |
| 전문기관명 (해당 시 작성) | 농림식품기술기획평가원 | | | 내역사업명 (해당 시 작성) | 진단기술 산업화 | | | | | | |
| 공고번호 | 농축2020-111호 | | | 총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성) | | | | | | | |
| | | | | 연구개발과제번호 | 120085-3 | | | | | | |
| 기술분류 | 국가과학기술 표준분류 | LB0304 | 70% | LB0202 | 20% | LB0206 | 10% | | | | |
| | 농림식품과학기술분류 | RA0301 | 50% | AA0202 | 40% | CA0106 | 10% | | | | |
| 총괄연구개발명 (해당 시 작성) | 국문 | | | | | | | | | | |
| | 영문 | | | | | | | | | | |
| 연구개발과제명 | 국문 | NGS이용 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 감염 현황 조사 및 식물 세포 바이오 리액터를 활용한 무병묘 스탁 생산 기술 개발 | | | | | | | | | |
| | 영문 | Examination of viruses infecting sweet potato, garlic, and strawberry using NGS and development of virus-free plant stocks using a bioreactor for plant cells | | | | | | | | | |
| 주관연구개발기관 | 기관명 | 성균관대학교산학협력단 | | 사업자등록번호 | | | | | | | |
| | 주소 | (16419) 경기도 수원시 장안구 서부로 2066 | | 법인등록번호 | | | | | | | |
| 연구책임자 | 성명 | 조원경 | | 직위 | | 연구교수 | | | | | |
| | 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 연구개발비 | 기관부담 연구개발비 | | 그 외 기관 등의 지원금 | | 합계 | | | 연구개발비 외 지원금 | | |
| | | 현금 | 현금 | 현물 | 지방자치 단체 | 기타() | 현금 | 현물 | | 합계 | |
| | 총계 | 807,000 | 0 | 134,667 | | | 807,000 | 140,001 | 947,001 | | |
| | 1단계 | 1년차 | 220,000 | 0 | 33,333 | | | 220,000 | 33,333 | 253,333 | |
| | | 2년차 | 293,500 | 0 | 53,334 | | | 293,500 | 53,334 | 346,834 | |
| 2단계 | 1년차 | 293,500 | 0 | 53,334 | | | 293,500 | 53,334 | 346,834 | | |
| 공동연구개발기관 등 (해당 시 작성) | 기관명 | 책임자 | | 직위 | 휴대전화 | 전자우편 | 비고 | | | | |
| | | | | | | | 역할 | 기관유형 | | | |
| | 공동연구개발기관 | (주)바이오에프디엔씨 | | 이정훈 | 부사장 | | 공동 | 중소기업 | | | |
| | 위탁연구개발기관 | | | | | | | | | | |
| 연구개발기관 외 기관 | | | | | | | | | | | |
| 연구개발담당자 실무담당자 | 성명 | 조원경 | | 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.

2023 년 02 월 06 일

연구책임자: 조원경 (인)

주관연구개발기관의 장: 성균관대학교산학협력단장 (직인)
공동연구개발기관의 장: (주)바이오에프디엔씨 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하



1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구최종 목표

NGS이용 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 감염 현황 조사 및 식물 세포 바이오파브릭을 활용한 무병 묘 스탁 생산 기술 개발

○ 연구내용 요약

- 성균관대 연구팀

1) NGS이용 고구마, 마늘, 딸기 품종별, 지역별 및 조직별 바이러스 조사

2) 고구마, 마늘, 딸기 3종 작물 통합 분자진단(RT-PCR, Real time RT-PCR) 시스템 개발

3) NGS이용 고구마, 마늘, 딸기 6품종 바이러스 프리 무병묘 선발 및 바이러스 진단

- (주)바이오에프디엔씨 연구팀

1) 작물별 2개 품종 총 6개 품종 바이러스 프리 캘러스 스탁 및 동결보존 방법 개발

2) 바이오파브릭 이용 바이러스 프리 캘러스 대량 세포 증식 방법 개발

3) 6개 품종별 바이러스 프리 모종 생산(100개씩) 및 상업화



그림 2. 연구개발 주요 핵심기술 및 연구내용 모식도

○ 핵심기술

- 서울대 연구팀

1) 식물 바이러스에 특화된 NGS 수행 기술: 국내 유일하게 식물 샘플로부터 total RNA 추출, RNA-Sequencing용 라이브러리 제작 가능

2) 세계 최고의 식물 바이러스에 특화된 생물정보학 분석 능력: 분석용 workstation 3대 보유 및

연구 경험 보유(데이터 분석을 통한 500여종 이상의 식물 신종 바이러스 및 120종 신종 곰팡이 바이러스 동정)

3) 식물 바이러스 진단용 RT-PCR 및 Real time RT-PCR 개발 기술 보유: 알려진 바이러스뿐만 아니라 신종 바이러스를 포함하여, 주요 과수, 화훼, 식량 작물별 통합 진단 시스템 개발을 수행하였음

- (주)바이오에프디엔씨 연구팀

1) 국내외 최대 100여종이 넘는 다양한 식물 켈러스 유도 기술 보유

2) 켈러스 동결 보존 기술 및 동결된 켈러스로부터 식물 세포 재생 기술 보유

3) 식물 세포 바이오리액터 배양기술 보유

4) 식물세포 대량배양 설비 및 배양기술 보유

1-2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

1) 국내 식물 바이러스 진단 기술 현황

- 분자진단 기술: 바이러스는 DNA 또는 RNA로 구성되어 있어서 기존에 알려진 식물 바이러스의 경우 일반적으로 DNA virus는 PCR로, RNA 바이러스는 주로 RT-PCR과 Real time RT-PCR 기술을 사용하고 있음

- 국내 식물 바이러스 분자진단 능력: 동물바이러스와 달리 식물바이러스 경우 바이러스 진단에 관련된 수요가 매우 적어, 대부분 대학, 연구기관 중심으로 각 연구소내에서 직접 프라이머를 디자인하여 바이러스를 진단하거나, 기존에 출간된 논문을 참조하여 RT-PCR이나 Real time RT-PCR를 수행하고 있음

- 항체 기반 진단 기술: 대표적으로 잘 알려진 식물 바이러스의 경우 항체 기반 DAS-ELISA와 Rapid immuno gold stripe 진단 기술들이 개발됨. 특히 원예특작원에서는 대표적인 원예 작물 감염 식물 바이러스들을 대상으로 stripe형식의 진단 기술을 개발해 사용하고 있음. 하지만 직접 손으로 만들고 있으며, 제작 단가가 비싸고 많은 시간을 요구함. 또한 항체가 이용가능한 제한된 식물 바이러스에 대해서만 제작을 하고 있음

- 국내에서는 large-scale oligonucleotide (LSON) chip이라는 이름으로 538종의 바이러스들을 동정할 수 있는 식물 바이러스 용 DNA-chip이 개발됨(Nam et al., Plant Pathol J 2014). 현재까지 2200여개가 넘는 식물바이러스종들이 동정되었으며, LSON chip은 1/4만 커버하며, 이미 알려진 바이러스만 동정 가능. 가격, 활용 측면에서 많은 단점이 있어, LSON chip은 개발만 되고 사용되고 있지 않음

- 차세대염기서열분석(Next-generation sequencing, NGS) 기반 바이러스 진단 기술: NGS 기술의 발달로 인해 많은 식물바이러스 관련 연구실들이 NGS이용 다양한 식물종으로부터 신규 또는 신종 바이러스들을 동정하고 있음. 대부분의 국내 연구팀이 NGS와 관련 데이터분석을 업체에 의존하고 있음. 업체에 의존할 경우 한 건당 대략 300만원~500만원의 높은 비용을 지불하고 있음. 하지만 서울대 연구팀의 경우 자체적으로 데이터 분석 기술을 보유하고 있어 한 건당 40만원 비용으로 바이러스 진단을 수행하고 있음

2) 국내 바이러스 무병묘 개발 기술 현황

- 고구마, 마늘, 딸기는 모두 영양번식 식물로서 고구마의 경우 고구마 순이라 불리는 부분줄기를 잘라서 땅에 심어 번식시키며, 마늘은 인편(마늘 알뿌리의 한 조각)을 이용한 번식이 이루어지고 있으며, 딸기의 경우 런너(runner)를 통해 영양 번식하는 작물임
- 오래전부터 바이러스 free한 무병묘의 수요가 늘어남에 따라, 농진청, 지역별 농업기술센터, 농업법인들을 중심으로 고구마, 마늘, 딸기 무병묘에 대한 개발 및 보급사업이 이루어지고 있음
- 국내 대학 및 연구소들이 보유하고 있는 조직배양 기술은 세계 최고이며, 생장점, 열처리, 화학처리등을 이용해 무병묘를 개발하고 있음
- 대부분의 무병묘 공동생산팀의 경우 육종 및 조직배양 전문가로 구성되어 있어, 기존에 알려진 바이러스 몇 종에 대해 ELISA 또는 RT-PCR를 이용해 검증하여 무병묘로 인증하여 보급 또는 판매하고 있음
- 하지만 이러한 연구팀은 바이러스에 대한 정확한 정보 및 기술력이 없으며, 바이러스 복제량이 적을 경우 검증이 어려울 수 있고, 신종 바이러스에 대한 진단이 전혀 이루어지고 있지 않고 있음
- 현재 보급되고 있는 고구마, 마늘, 딸기 무병묘는 대부분 바이러스에 복합 감염되어 있으며, 가장 문제는 바이러스 프리한 무병묘 stock을 보유하고 있지 않음. 바이러스 무병묘에 대한 보증 및 바이러스 진단 서비스가 없어 문제 발생시 농업인들이 고스란히 손해를 보고 있음
- 무병묘를 증명해 줄 수 있는 제 3의 국내 기관, 연구소, 업체는 현재 전무함

○ 시장현황

- **고구마**는 전 세계 열대 및 온대지역에서 재배하는 식량 작물이며, 한국의 경우 18세기 후반부터 재배되기 시작하여 현재는 생산량 기준 (331,514 tons) 국내에서 세 번째로 가장 중요한 식량 작물임
- **마늘(*Allium sativum* L.)**은 백합과에 속하는 인경채소로, 우리나라에서는 4대 채소(고추, 마늘, 배추, 무) 중의 하나로, 우리나라 김치를 비롯한 여러 음식에 들어가는 필수적인 양념 채소이다. 특히 전 세계적으로 중국, 인도 다음으로 세 번째로 마늘을 많이 재배하는 나라이며, 매년 재배면적과 생산량이 증가하고 있음



그림 3. 국내 대표 품종 인 딸기 “설향”의 모습
<http://www.hani.co.kr/arti/society/area/613511.html>

- **딸기는 국내에서 가장 많이 사랑받는 원예작물** 중의 하나로 2002년 5726억이던 국내 딸기 생산액은 2013년 1조3359억원(과채류 생산액의 24%)으로 이를 정도로 매우 급성장하였다. 2011년 기준 대한민국은 전 세계 딸기 생산량 기준으로 7번째로 해당할 만큼 많은 양의 딸기를 생산하고 있으며, **2015년 기준 390억원 이상의 딸기를 수출하였음**
- **고구마, 마늘, 딸기의 경우 영양번식으로 인해 오랜 세월동안 다양한 바이러스에 이미 복합 감염되어 있으며, 복합 감염된 바이러스로 인해 상품성과 생산성이 급격하게 저하되고 있으며, 최근 급격한 기후변화로 인한 매개충의 증가로 인해 예측하지 못한 바이러스병이 증가하고 있음**
- 국내에서 딸기는 시설재배를 통한 겨울 딸기가 주로 재배되고 있으며, 딸기는 모주의 유전 특성이 그대로 후대에 영향을 주기 위해서 주로 영양번식을 한다. 따라서 바이러스를 비롯한 다양한 병원성 미생물로부터 free한 무병묘 생산은 수량에 많은 영향을 주고 있음
- 딸기 육묘시장 규모는 정식묘가 2410억원(단가 350원 적용), 원묘가 270억원(단가 1000원 적용)에 달해 매우 큰 시장을 형성하고 있으며, 딸기 바이러스 무병묘에 대한 수요와 시장은 매우 큰 것으로 예상됨. 아직 농가 자가육묘 비율이 80%를 차지함
- 마늘의 경우 국내 지역 농업기술센터를 중심으로 바이러스 프리 종자를 생산하기 위하여 마늘의 주아(bulblet)를 이용하여 마늘씨를 생산하고 있지만, 실제로 마늘 주아도 바이러스에 복합 감염되어 있어 무병묘가 아님
- 괴산, 해남, 여주등 국내 고구마 주산지에서 **생장점 및 조직배양을 이용해 바이러스 무병묘**를 개발 보급하고 있으나 바이러스 검정이 전혀 이루어지고 있지 않으며, 선행연구에 의하면 대부분 **바이러스에 복합 감염되어 있었음**

| 품종명 | 생태형 | 추대성 | 인편수 | 재배지역 | 파종기 | 수확기 | 원산지 |
|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|
| 서산종 | 한지형 | 완전추대 | 6~8 | 중부해안 | 10중·하 | 6하 | 재래종 |
| 의성종 | 한지형 | 완전추대 | 6~8 | 중부내륙 | 10중·하 | 6하 | 재래종 |
| 단양종 | 한지형 | 완전추대 | 6~8 | 중부내륙 | 10중·하 | 6하~7상 | 재래종 |
| 제주종 | 난지형 | 완전추대 | 9~10 | 제 주 도 | 8하·상 | 6상 | 재래종 |
| 해남종 | 난지형 | 완전추대 | 9~10 | 남부해안 | 8하 | 6상 | 재래종 |
| 남도마늘 | 난지형 | 완전추대 | 6~8 | 남 부 | 9하 | 6상·중 | 중국 |
| 대서마늘 | 극난지형 | 완전추대 | 12~13 | 남 부 | 9하 | 5중 | 스페인 |
| 자봉마늘 | 극난지형 | 불완전추대 | 10~11 | 제 주 도 | 8하 | 4중 | 인도 |

그림 4. 국내 주요 마늘 품종 (<http://www.nongsaro.go.kr/>)

○ 경쟁기관현황

1) 식물바이러스 진단

- 국내 식물 바이러스를 주로 하는 연구팀은 대략 15개 이상이 있으며, 대부분 대학이며, 농진청과 기타 기관에서 연구를 수행하고 있음
- 각 연구팀의 경우 대부분 기존에 많이 사용한 PCR기반 RT-PCR과 Real time RT-PCR기술을 이용해 바이러스를 진단하고 있음
- 농진청의 경우 stripe 형태 및 RT-PCR를 이용해 식물 바이러스를 진단하고 있음

- 국내 소수의 연구팀이 바이러스 진단을 위해 NGS를 업체를 통해 수행하고 있으나, 높은 NGS 비용으로 인해 개별적인 샘플보다는 샘플들을 pooling하여 바이러스를 동정하고 있음
- 본 서울대 연구팀의 경우 주요 작물 대상으로 지역별, 품종별, 조직별 바이러스 동정 및 진단 방법을 개발하여 논문으로 발표함

2) 바이러스 프리 무병묘 개발

- 국내에는 조직배양을 할 수 있는 수많은 연구소와 업체들이 있으며, 대부분 높은 수준의 조직 배양기술을 보유하고 있어 **생장점을 이용한 다양한 바이러스 프리 무병묘를 개발, 보급 및 판매**하고 있음
- 하지만 바이러스 프리 무병묘 개발에 있어서 가장 중요한 점은 **바이러스 무병묘 스태크 개발과 정확한 바이러스 진단**이지만 대부분 연구팀은 바이러스 프리 무병묘 개발시 바이러스 진단에 대해서 비전문가이며 많은 노력을 하지 않고 있음
- 개발된 바이러스 프리묘 대부분 2종 이상의 바이러스에 복합 감염되어 있으며, 기존 묘보다 생산성이 높은 이유는 바이러스의 완전한 제거보다는 **조직배양을 통한 세균과 곰팡이가 제거**되었기 때문임
- **바이러스를 정확히 진단할 수 있는 기술력**을 가진 연구팀의 적극적인 참여가 바이러스 프리묘 개발의 가장 중요한 역할임

○ 지식재산권현황

1) 바이러스 진단 기술

- “고구마잎말림바이러스를 검출하기 위한 등온증폭 반응용 프라이머 조성물, 및 이의 이용“이라는 특허 등록은 2012년에 되어 있으며, 고구마 DNA 바이러스인 Sweet potato leaf curl virus를 등온 조건으로 증폭시킬 수 있는 방법임
- ”고구마 바이러스 진단용 프라이머 쌍 및 이를 이용한 진단방법“이라는 특허 등록은 2012년에 이루어졌으며, 국내 고구마에 발생하는 4종 바이러스(SPLCV, SPFMV, SPGV, SwPLV) 동시진단하거나 한번의 RT-PCR 반응으로 모두 진단할 수 있는 방법임
- 하지만 본 연구팀의 경우 신종 고구마 바이러스 3종을 진단할 수 있는 RT-PCR방법을 작년에 출원하였으며, 현재 11종 고구마 감염 바이러스를 진단할 수 있는 Real time RT-PCR를 개발 중임
- “마늘 바이러스 다중 진단용 특이 프라이머 및 이의 용도”라는 특허는 2008년도에 출원되었으며, GLV, LYSV, GCLV, OYDV를 한꺼번에 진단할 수 있는 RT-PCR 기반 진단 방법임
- “마늘 알렉시바이러스의 진단용 특이 프라이머 및 이의 용도“는 마늘 알렉시 바이러스를 진단할 수 있는 RT-PCR 기반 진단 방법임
- ”마늘의 양파 황색 위축 바이러스 진단용 프라이머 세트 및이를 이용한 양파 황색 위축 바이러스 진단방법“은 2003년도에 출원되었으며, OYDV를 진단할 수 있는 RT-PCR기반 진단방법임
- ”마늘일반잠재바이러스의 진단용 특이 프라이머 및 이의 용도“는 2008년도에 출원되었으며, GCLV를 진단할 수 있는 RT-PCR기반 진단방법임



그림 5. 거창군, 딸기(설향) 바이러스 무병묘 공동생산 (중앙일보) 2017년3월7일
http://pds.joins.com/news/component/newsis/201703/07/NISI20170307_0012762753_web.jpg

- “마늘잠재바이러스의 진단용 특이 프라이머 및 이의 용도”는 2008년도에 출원되었으며, GLV 를 진단할 수 있는 RT-PCR기반 진단방법임
- 마늘 바이러스의 경우 개별적 바이러스 진단이며 특히 RT-PCR기반이다. 따라서 통합적이면서 Real time RT-PCR 기반 바이러스 진단 방법을 개발하면 충분히 특허 등록이 가능함
- 딸기 바이러스 진단에 관련해서는 딸기잠재원형반점바이러스(Strawberry latent ringspot virus) 진단용LAMP 프라이머 및 PCR 방법만이 국내에서 개발됨
- “고구마 조직배양묘의 증식을 위한 액체 배지 조성물 및 이를 이용한 증식방법“이 2010년 특허 출원됨
- ”공기주입형 생물반응기를 이용한 딸기 조직배양묘의 생산“이 2011년 특허 출원됨
- 고구마, 마늘, 딸기 무병묘에 직접 관련된 특허 출원이나 등록은 없음

○ 표준화현황

- 식물바이러스 및 바이로이드 진단은 현재 NGS이용, 대규모로 알려진 식물바이러스나 바이로이드를 동정한 후 PCR과 RT-PCR 기반으로 결과를 확인하고, 정밀하게 동정할 수 있는 시스템 구축이 필요함
- 현재 NGS와 RT-PCR를 병행하는 방법이 가장 범용적이며 표준화되기 쉬운 기술임
- 최근에 유행하고 있는 LAMP기술의 경우 많은 바이러스 대상으로 기술이 개발되었으나 바이러스 복제량이 높은 경우에만 진단이 되며, 휴대용 UV Lamp와 real-time turbidimeter (LA-200; Eiken Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan) 또는 real-time fluorescence detection platform (Genie III; OptiGene, West Sussex, UK)와 같은 고가의 장비가 필요하여 표준화되기 어려움
- NGS가 나오기 전까지는 DNA-chip을 이용한 microarray가 바이러스 진단에 사용될 수 있다는 가능성을 보여주었으나 아래와 같은 단점으로 인해 전혀 사용되지 않고 있음

- DNA chip은 일단 NGS에 비해 가격이 비싸며, hybridization signal을 얻기 위해서는 전용 scanner가 필요함(범용성이 없으며 독점화 가능성)
- 바이러스 프리 무병묘 개발에 관련하여 국가 표준으로 정해 놓은 것이 전혀 없으며, 농업기술 원이나 농업기술센터 자체적으로 조직배양 기술을 이용해 주요 원예작물을 대상으로 무병묘 개발을 하고 있음

○ 기타현황

- *Potyvirus*, *Carlavirus*, *Allexvirus*, *Potexvirus* 속에 속하는 많은 종류의 마늘 감염 바이러스가 알려져 있으며, 대부분의 경우 복합 감염되어 있음
- 과거 담양지역 '설향' 품종에서의 딸기바이러스 감염 여부를 RT-PCR를 통해 확인하였다는 연구 발표가 있음(Yang et al., 2010 원예학회지)
- 2007-2008년까지 국내 딸기 주요 품종에 대한 바이러스 감염 여부를 조사하였다. 조사결과, Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV), Strawberry mottle virus (SMoV), Strawberry vein banding virus (SVBV) 및 Strawberry pallidosis associated virus (SPaV)가 동정됨(Choi et al., 2009 식물병 연구)
- **고구마 바이러스 경우 서울대 연구팀과 식량원의 공동연구로 국내 고구마 주산지 8곳과 호감미, 베니하루카 2 품종을 NGS로 분석하여 2개의 신종 바이러스를 포함하여 총 10종 바이러스를 동정하였고, 30개의 바이러스 유전체를 조립함. 또한 11종 고구마 바이러스를 진단할 수 있는 RT-PCR 진단법을 개발함**(Jo et al., 2020 Scientific Reports)

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

1) 국외 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 연구

- 고구마의 경우 전 세계적으로 중국에서 가장 많이 재배되며, 지금까지 **30개가 넘는 고구마 바이러스가 동정됨**
- NGS를 이용하여 중국에서 총 15종의 고구마 감염 바이러스를 동정하여 발표함(Gu et al., 2014 PLoS One)
- 아프리카도 많은 고구마 생산을 하고 있으며, 아프리카 고구마 감염 바이러스 연구가 대규모로 발표됨
- 마늘의 경우 매우 다양한 바이러스가 복합 감염되어 있으며, 특히 중국, 미국, 멕시코, 아르헨티나, 스페인등에서 수입한 마늘을 대상으로 바이러스를 진단한 결과 41개의 바이러스 분리주를 얻었음(Wylie et al., 2014 PLoS One)
- 딸기의 경우 미국, 중국을 중심으로 **다양한 딸기 바이러스 관련 연구가 발표되었으며,**
- Strawberry vein banding virus (SVBV) isolate NS8이 캐나다 Nova Scotia 지역으로부터 분리 및 유전체가 밝혀졌다. SVBV는 double stranded (ds) DNA로 구성되어 있으며, 총 7개의 ORFs로 구성되어 있음(Dickison et al., 2017 Arch Virol)
- SVBV는 지금까지 북미, 호주, 브라질, 일본, 유럽 및 중국의 다양한 지역에서 동정되었으며, 감염된 딸기의 경우 mild vein-banding과 chlorosis를 보인다. SVBV isolate CN의 유전체가 밝혀졌으며 감염성 있는 full-length DNA 클론이 만들어짐(Feng et al., 2016 Virol J)
- 재조합 SVBV DNA 클론을 제작하여 particle bombardment를 이용해 딸기에서 감염성을

보여줌(Mahmoudpour et al., 2003 J Gen Virol)

- SVBV를 감염시킨 후 Woodland strawberry(*Fragaria vesca*)의 전사체 변화를 RNA-Seq연구를 통해 밝혔으며, 광합성, 식물-병원체 상호작용에 관련된 유전자들의 발현이 변화된 것을 알 수 있음(Chen et al., 2016 Virol J)
- Strawberry necrotic shock virus (SNSV)를 진단할 수 있는 TaqMan(®) quantitative RT-PCR과 RT-PCR를 개발하였으며, qPCR이 일반적인 PCR보다 100배 더 민감성이 높은 것을 알 수 있음(Veetil et al., 2016 J Virol Methods)
- Ilarvirus속의 멤버인 blackberry chlorotic ringspot (BCRV), strawberry necrotic shock (SNSV), 및 tobacco streak viruses (TSV)는 *Rubus*와 *Fragaria* 종을 감염시킬 수 있으며, 이 세 바이러스의 계통학 분석을 수행하였음(Tzanetakis et al., 2010 Arch Virol)
- SNSV가 Tobacco streak virus(TSV)와 서로 다른 바이러스라는 것이 밝혀짐(Tzanetakis et al., 2004 Arch Virol)
- 진딧물에 의해 주로 감염되는 4종의 딸기바이러스, Strawberry crinkle virus (SCV), Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV), Strawberry mottle virus (SMoV) 및 Strawberry vein banding virus (SVBV)를 한꺼번에 진단할 수 있는 하나의 multiplex reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) 방법을 개발함(Thompson et al., 2003 J Virol Methods)

Table 1. Strawberry viruses, names, acronyms, natural modes of transmission, genera, and means of laboratory detection^a

| Virus name | Acronym | Mode of transmission | Genus | Laboratory detection ^b |
|---|---------|----------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| <i>Apple mosaic</i> | ApMV | Pollen, seed | <i>Ilarvirus</i> | ELISA, RT-PCR |
| <i>Arabidopsis mosaic</i> | ArMV | Nematode, seed | <i>Nepovirus</i> | ELISA, RT-PCR |
| <i>Beet pseudo-yellow</i> | BPYV | Whitefly | <i>Crinivirus</i> | RT-PCR |
| <i>Fragaria chiloensis cryptic</i> | FCICV | Unknown | Unknown | RT-PCR |
| <i>Fragaria chiloensis latent</i> | FCILV | Pollen, seed | <i>Ilarvirus</i> | ELISA, RT-PCR |
| <i>Raspberry ringspot</i> | RpRSV | Nematode, seed | <i>Nepovirus</i> | ELISA, RT-PCR |
| <i>Strawberry chlorotic fleck</i> | StCFV | Aphid | <i>Closterovirus</i> | RT-PCR |
| <i>Strawberry crinkle</i> | SCV | Aphid | <i>Cytorhabdovirus</i> | RT-PCR |
| Strawberry feather leaf | NA | Unknown | Unknown | NA |
| Strawberry latent | SLV | Unknown | <i>Cripavirus</i> | RT-PCR |
| <i>Strawberry latent C</i> | SLCV | Aphid | <i>Nucleorhabdovirus</i> | NA |
| <i>Strawberry latent ringspot</i> | SLRSV | Nematode, seed | <i>Sadwavirus</i> | ELISA, RT-PCR |
| <i>Strawberry mild yellow edge</i> | SMYEV | Aphid | <i>Potexvirus</i> | ELISA, RT-PCR |
| <i>Strawberry mottle</i> | SMoV | Aphid | <i>Sadwavirus</i> | RT-PCR |
| Strawberry necrotic shock | SNSV | Thrips, pollen, seed | <i>Ilarvirus</i> | ELISA, RT-PCR |
| Strawberry pallidosis associated | SPaV | Whitefly | <i>Crinivirus</i> | RT-PCR |
| <i>Strawberry pseudo mild yellow edge</i> | SPMYEV | Aphid | <i>Carlavirus</i> | ELISA |
| <i>Strawberry vein banding</i> | SVBV | Aphid | <i>Caulimovirus</i> | PCR |
| <i>Tobacco necrosis</i> | TNV | Oomycete | <i>Necrovirus</i> | ELISA, RT-PCR |
| <i>Tomato black ring</i> | TBRV | Nematode, seed | <i>Nepovirus</i> | ELISA, RT-PCR |
| <i>Tomato ringspot</i> | ToRSV | Nematode, seed | <i>Nepovirus</i> | ELISA, RT-PCR |

^a NA = not available, indicates the virus disease has been described in the literature but that the authors are unaware of a known isolate of the virus currently maintained in a collection.

^b Detection methods listed do not include sap inoculation, graft transmission, or vector transmission to indicator plants.

그림 6. 국외에서 연구 발표된 딸기 감염 바이러스 종류, 매개체, 및 진단 방법(Plant Disease Vol.90 No. 4)

- 다양한 딸기 바이러스에 대한 리뷰 논문이 발표됨(Martin et al., 2006 Plant Dis)

2) 국외 고구마, 마늘, 딸기 무병묘 개발

- 중국에서 바이러스 프리 고구마를 생장점을 이용해 개발하였고, 산동과 장수지역에 보급하여 생산량 증가 효과를 보았음(Feng et al., 2000 Crop Prot)
- 아프리카 에티오피아에서도 생장점과 열처리를 통해 바이러스 프리 고구마를 개발하였음(Feyissa et al., 2011 Ethiopian J Sci)
- 인도에서 생장점과 뜨거운 공기를 처리하여 바이러스 프리 마늘을 개발함(Devanna et al.,

2015 J Hort Sci Biotech)

- 이탈리아에서 열처리 후 생장점을 이용해 **바이러스 프리 마늘**을 개발하여 보급함(Conci et al., 2005 Acta Hort)
- 일본에서 생장점을 이용해 **바이러스 프리 딸기**를 대량 생산하는 방법을 개발함(Nishi et al., 1973 JARQ)
- 인도에서 바이러스 프리 딸기 생산에 관련된 리뷰 논문 발표(Sharma et al., 2018 Int J Sci Environ Tech)

3) 체세포배 배양기술을 이용한 바이러스 제거

- **체세포배 발생**은 생식 세포의 융합 없이 체세포 배아로부터 식물을 개발하는 방법으로 **염색체 변이를 최소화하면서 빠르고 효율적인 대량 번식**이 가능함
- 바이러스는 주로 유관속 조직에서 발견되지만, **체세포 배**는 비 유관속 조직에서 발생하는 특징을 바탕으로 **체세포배 발생을 통한 바이러스 제거 방법**이 다양한 작물에서 보고됨 (Bhat A.I. and Rao G.P., 2020, SPH ,479-489)
- 조직배양 조건에서 **체세포배 배양**은 호르몬, 자당 및 에틸렌과 같은 다양한 요인에 영향을 받음 (Lakshmanan P. et al., 2006, Plant Cell Reports 25: 1007-1015, Gong et al., 2015, South African Journal of Botany 71(1): 110-113, Levi et al., 1990, J Plant Physiol 137:184-189)
- **체세포배 배양**을 통하여 바이러스가 없는 식물을 생산하는데 효율적인 방법으로 항바이러스제 처리를 병행하는 논문 발표 (Dewanti P et al., 2006, Agriculture and Agricultural Science Procedia 9:456-461)
- 체세포배 배양 공정 확립을 위한 연구가 **고구마**(Manrique-Trujillo S., 2013, Scientia Horticulturae 161: 95-100), **마늘**(Hassan M. N. et al., 2014, J. Bangladesh Agril. Univ. 12(1): 1-6), **딸기**(Gerdakaneh M. and Zohori M., 2013, British Biotechnology Journal 3(2): 13-142)에서 보고됨

4) 동결보존 기술을 이용한 식물세포 동결보존

- 배양세포를 계대 배양하여 유지시키는 경우 계대배양 중에 **세포의 모양이나 성질이 변화하거나 계대배양 중에 진균류 감염 등을 보호하는 방법**으로 배양세포를 동결보존하고 필요시마다 해동하여 사용할 수 있는 **동결보존 방법**이 사용됨
- 국내 농업유전자원센터에서는 **마늘**과 마늘 류의 총 **1,158 개 자원**을 동결보존 후에 **65.9%가 재생**되었음(kim H. et al., 2012, CRYOBANKING OF KOREAN ALLIUM GERMPASM COLLECTIONS: RESULTS FROM A 10 YEAR EXPERIENCE, CryoLetters 33 (1), 45-57)
- 약용으로 사용되는 음나무의 체세포배에서 동결손상이 최소화되는 동결보존 방법이 연구되었으며 동결보존되지 않은 세포주와 같은 분열능력을 확인함 (Shin D. et al., 2012, CryoLetters 33 (5), 402-410)

○ 시장현황

1) 국외 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 진단 시장

- **활발한 무역교류**로 인해 현재 대부분의 작물들이 세계 서로 각기 다른 곳에 널리 재배되고 있으며, 이에 따라 **감염된 바이러스도 매우 급속하게 퍼지고 있음**
- 특히 영양 작물의 경우 작물에 감염되어 수입 또는 수출되기 때문에 현재 비슷한 종류의 바이러스들이 동정되고 있음

- 비록 영양작물에 많은 수의 바이러스가 복합감염되어 있지만, 동물바이러스에 비해 **식물바이러스 피해는 경제적으로 규모가 적어** 진단 시장도 매우 작은게 사실임
- 하지만 **미래 기후 변화나 특정 바이러스의 위협에 대비하기 위해 바이러스 진단 키트 개발이 필요함**
- 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 진단도 각 나라의 대학 또는 연구소에서 자체적으로 개발한 RT-PCR 시스템을 이용해 진단하고 있음

2) 국외 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 무병묘 개발 시장

- 각 나라마다 주요 영양작물에 대한 무병묘 수요는 매우 높으나, **실제로 무병묘를 개발하고 증식하는 연구는 많이 없음**
- 주요 영양작물 품종에 대한 바이러스 프리 식물을 개발하고 저장할 수 있는 기술을 가지고 있으면 추후 높은 수익을 기대할 수 있음
- **미래 수요를 예측하고 이에 대비하여 기술 개발이 필요함**

○ 경쟁기관현황

1) 국외 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 진단

- 국외 고구마 관련 바이러스 연구는 핀란드 헬싱키 대학의 Jari P. T. Valkonen교수 연구팀이 가장 활발하게 연구를 수행하고 있음
- 마늘 바이러스 경우 호주 Wylie 박사 연구팀이 활발하게 연구를 수행하고 있음
- 딸기 바이러스의 경우 미국 중국 및 유럽의 여러 과학자들이 연구를 수행하고 있으나 다른 작물에 비해 많은 연구가 되어 있지는 않음

2) 국외 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 프리 무병묘 개발

- 1980년 후반 국제 감자 센터는 중국 농업관련 과학자들과 함께 바이러스 프리 고구마 개발을 시작하였으며, 특히 산둥 지역에서 1994년 농민들에게 바이러스 프리 고구마를 보급하여 생산성을 높였음
- 영국에서 1980년대 생장점을 이용한 바이러스 프리 마늘을 생산한 연구가 있음
- 대부분 국가에서 바이러스 프리 무병묘 개발은 지역 연구소들을 중심으로 이루어지고 있음

○ 지식재산권현황

- **고구마, 마늘, 딸기 바이러스 진단과 관련하여 해외 특허를 조사하였으나, 직접적으로 관련 있는 지식재산권을 찾을 수가 없었음.** 보통 식물 바이러스 진단의 경우 이미 논문을 통해 진단방법에 대해 공개를 하며, 특히 관련 수요가 많지 않기 때문에 특허 출원이나 등록이 없는 것으로 생각됨
- 따라서 본 연구와 관련하여 작물별 통합 분자 진단 방법을 개발하여 출원한다면 선구자적 역할을 할 수 있을 것으로 생각됨
- **바이러스 무병묘 개발에 대한 특별히 관련된 해외 출원이나 등록을 찾을 수가 없었음.** 따라서 고구마, 마늘, 딸기 국내 주요 품종에 대해 바이러스 프리 개발 연구를 수행하여 기술력을 확보한다면 추후 다른 영양 작물에도 적용이 가능하며 많은 지식재산권을 선점할 수 있을 것으로 생각됨
- 식물 동결보존(plant cryopreservation)으로 국내 특허를 검색하였을 때 **재배마의 신초 또는 접합자 배를 이용하여 효율적으로 초저온 동결보존 및 재생하고, 이를 이용하여 마 모자이크 바이러스(YMV-K)가 없는 마 식물체를 효율적으로 생산하는 방법과 형질전환 벼세포의 동결보존**

방법 및 상기 동결보존된 벼세포의 회수방법에 관한 특허가 검색되지만 직접적으로 관련이 없는 것으로 생각됨

- 동결보존 방법에 관련한 해외 특허에는 식물 세포를 동결 보존하고 동결 보존된 세포를 재생하기 위한 방법 및 조성물에 관련된 특허가 등록되어 있음

○ 표준화현황

- 현재 대부분의 식물 바이러스 연구자들은 **신종 바이러스나 대규모 바이러스 동정 연구**를 위해서 **NGS를 사용하여, 알려진 바이러스에 대한 진단은 RT-PCR과 Real time RT-PCR 기술을 사용하고 있다.** 따라서 기술적으로 대부분의 나라가 표준화되었다고 할 수 있음
- 바이러스 프리 개발을 위해 사용된 기술들 대부분은 생장점을 사용했으며, 열처리를 통해 바이러스를 제거하였음
- 하지만 대부분의 바이러스 프리 개발시 바이러스 진단 방법은 알려진 바이러스에 대한 ELISA 방법을 사용하였기 때문에, 바이러스 진단 정확성은 매우 떨어진다고 할 수 있음
- **NGS와 RT-PCR를 함께 사용하여 바이러스를 정확하게 진단해야** 정말로 필요한 바이러스 프리 영양 작물들을 개발할 수 있음
- 조직배양에서는 같은 종의 식물에서도 품종에 따라 배양효율이나 배양조건의 차이가 있으므로 **타겟 품종에 맞게 바이러스 프리 한 품종을 개발하는 공정을 개발하는 것이 필요함**

○ 기타현황

- 바이러스 프리 영양 작물 개발은 실용성과 상업성이 매우 높은 연구 개발로 **정확한 바이러스 진단을 통해 확실한 바이러스 프리 식물을 확보하는 것이 가장 중요할 것으로** 생각됨

1-3. 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구개발의 최종목표

가. 최종목표

○ NGS이용 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 감염 현황 조사 및 식물 세포 바이오파이클러를 활용한 무병묘 스탁 생산 기술 개발

- 1) NGS이용 국내 고구마, 마늘, 딸기 감염 바이러스 정밀하게 모두 동정
- 2) 작물별 바이러스 통합 진단 방법 개발(RT-PCR 및 Real time RT-PCR)
- 3) 작물별 2개 품종 총 6개 품종 바이러스 프리 캘러스 스탁 및 동결보존 방법 개발
- 4) 바이오파이클러 이용 바이러스 프리 캘러스 대량 세포 증식 방법 개발
- 5) 6개 품종별 바이러스 프리 모종 생산(100개씩) 및 상업화

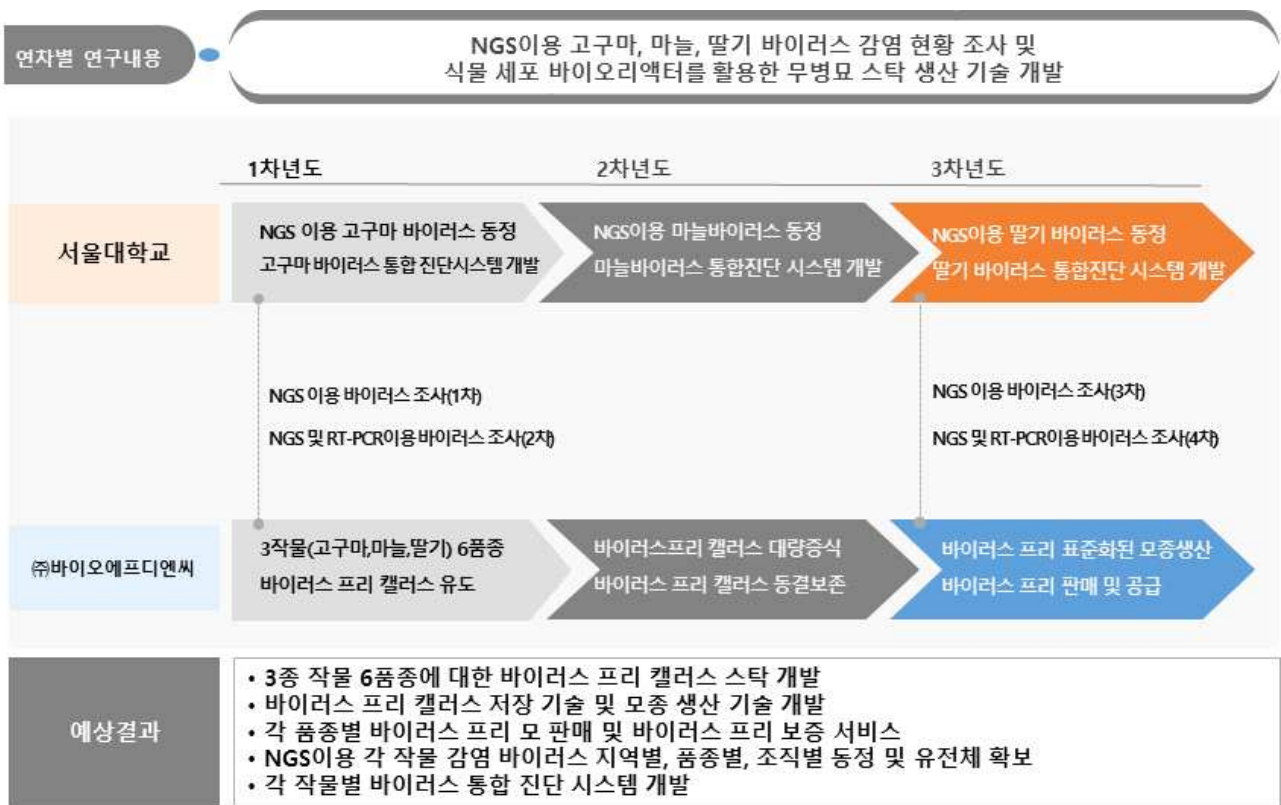


그림 7 연차별 주요 연구내용 및 예상 결과

나. 세부목표

- 국내 고구마, 마늘, 딸기 감염 바이러스들을 차세대염기서열분석기술(Next-generation sequencing; NGS)을 이용하여 대규모로 정밀하게 동정(지역별, 품종별, 세포 조직별로 연구 수행)(서울대)
- 고구마, 마늘, 딸기 작물별 통합 정밀 진단 시스템 개발 (RT-PCR)(서울대)
- 무병묘 개발 대상 고구마, 마늘, 딸기 주요 품종에 감염된 바이러스들을 NGS를 이용해 동정 및 진단(서울대)
- 무병묘 개발 대상 고구마, 마늘, 딸기 주요 품종으로부터 다양한 방법 이용 바이러스 프리 캘러스(Callus) 유도((주)바이오프로덕션씨)
- RT-PCR 및 NGS이용 각 주요 품종으로부터 유도된 캘러스 바이러스 진단 수행(서울대)

- 각 품종별로 최종 선발된 바이러스 프리 캘러스 스탭(stock) 동결 보존 방법 개발((주)바이오에프디엔씨)
- 바이오리액터(Bioreactor) 이용 바이러스 프리 캘러스 대량 세포 증식 방법 개발((주)바이오에프디엔씨)
- 바이러스 프리 캘러스로부터 표준화된 모종 개발((주)바이오에프디엔씨)
- RT-PCR 및 NGS이용 개발된 바이러스 프리 모종별 바이러스 진단 수행(서울대)
- 바이러스 프리 모종의 상업화((주)바이오에프디엔씨)
- 대상 작물
 - 고구마 2품종: 국내 개발 고유 품종(호감미, 풍원미)
 - 마늘 2품종: 한지형(재래종), 난지형
 - 딸기: 국내 개발 고유 품종 (실향, 매향(수출용))

- 핵심 보유 기술
 - 서울대 연구팀
 - 1) 식물 바이러스에 특화된 NGS 수행 기술: 국내 유일하게 식물 샘플로부터 total RNA 추출, RNA-Sequencing용 라이브러리 제작 가능
 - 2) 세계 최고의 식물 바이러스에 특화된 생물정보학 분석 능력 및 경험(분석용 workstation 3대 보유) 및 연구 경험 보유(데이터 분석을 통한 500여종 이상의 식물 신종 바이러스 및 120종 신종 곰팡이 바이러스 동정)
 - 3) 식물 바이러스 진단용 RT-PCR 및 Real time RT-PCR 개발 기술 보유: 알려진 바이러스 뿐만 아니라 신종 바이러스를 포함하여, 주요 과수, 화훼, 식량 작물별 통합 진단 시스템 개발을 수행하였음
 - (주)바이오에프디엔씨 연구팀
 - 1) 130여종이 넘는 다양한 식물 캘러스 유도 기술 보유
 - 2) 캘러스 동결 보존 기술 및 동결된 캘러스로부터 식물 세포 재생 기술 보유
 - 3) 식물 세포 바이오리액터 대량 설비 보유
 - 4) 식물세포 대량 배양기술 보유

다. 연차별 개발목표 및 내용

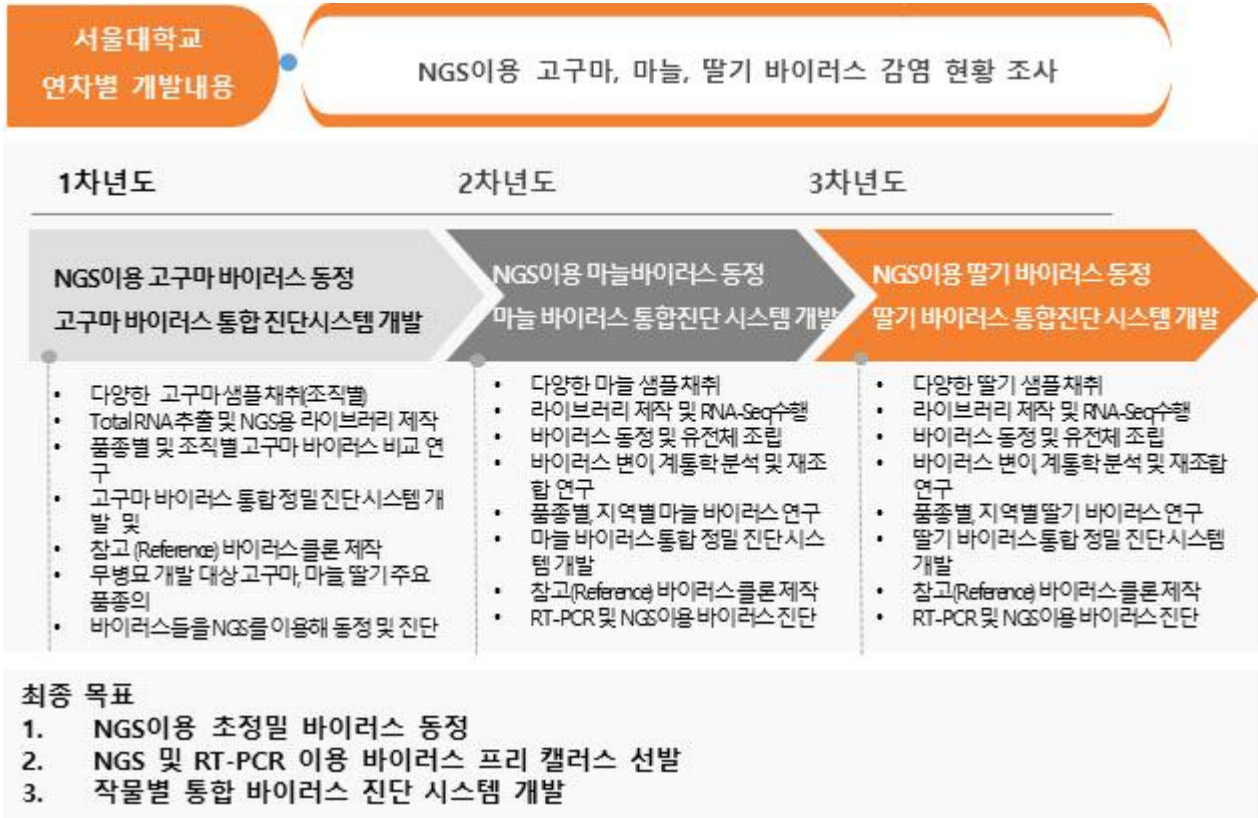


그림 8. 서울대 연차별 연구개발 계획 모식도

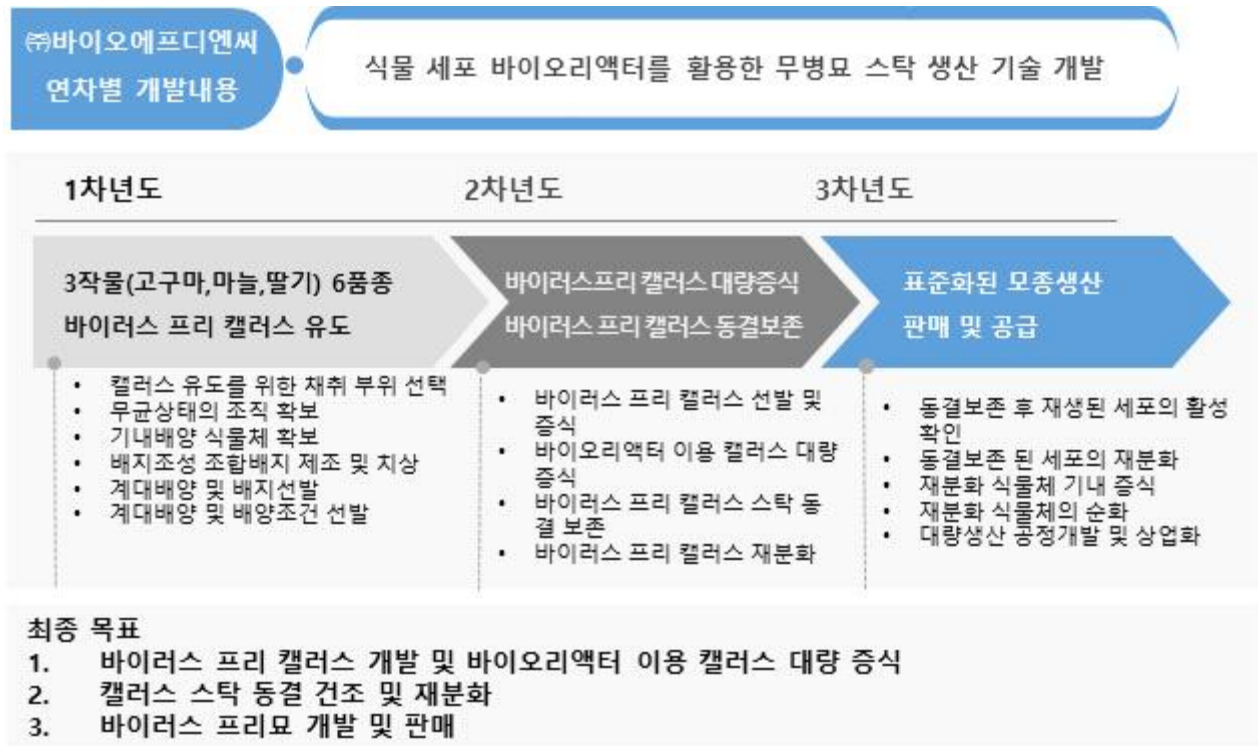


그림 9. (주)바이오프디엔씨 연차별 연구개발 계획 모식도

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

1차년도 연구개발 목표 및 결과(서울대)

표 1. 1차년도 연구개발 목표 및 결과 요약(서울대)

| 구분 (연도) | 세부과제명 | 세부연구목표 | 연구개발 수행내용 | 연구결과 |
|--------------------|--|---|---|--|
| 1차 년도 (2020) | NGS이용 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 감염 현황 조사 | NGS이용 품종별, 조직별 고구마 바이러스 분석 | 호감미, 진율미, 밤고구마, 꿀고구마, 호박고구마 5개 품종 NGS이용 바이러스 분석 및 fibrous root, leaf, root body, root stalk, stem 등 총 5개 고구마 조직 샘플로부터 NGS이용 바이러스 분석 | 호감미 5종, 진율미 2종, 밤고구마 2종, 꿀고구마 3종, 호박고구마 3종 바이러스에 복합감염됨 5개 조직으로부터 총 7개 바이러스를 동정했으며, 5개 조직 중 fibrous root과 root stalk에 바이러스 양이 가장 많은 것으로 밝혀짐 |
| | | 고구마 바이러스 진단 시스템 개발 | RT-PCR과 real time RT-PCR 기반 고구마 감염 바이러스 프라이머 제작 및 진단방법 개발 | SPVG, SPVE, SPVC, SPSMV등 총 4종 대상 RT-PCR 기반 진단방법 개발 SPLCV, SPCFV, SPVC, SPSMV1등 총 4종 대상 real time RT-PCR 기반 진단방법 개발 |
| | | NGS이용 6개 품종 바이러스 분석 | 고구마 2품종, 딸기 2품종, 마늘 2품종 NGS이용 바이러스 분석 | 고구마 호감미 3종, 고구마 진율미 2종, 마늘 가담 11종, 마늘 홍산 7종에 감염된 바이러스 동정 딸기 설향 및 매향은 바이러스에 감염되지 않았음 |

1차년도 주관연구기관 연구결과(서울대)

○ NGS이용 고구마 품종별 바이러스 분석

- 농진청에서 새롭게 개발된 품종인 호감미와 진율미 그리고 시중에서 판매되고 있는 호박고구마, 밤고구마, 꿀고구마 묘종을 구입하여 직접 노지에 재배함
- 호감미와 진율미는 바이러스 프리 무병묘에 직접 사용되는 품종이며, 나머지 세 품종은 일반적으로 감염되어 있는 고구마 바이러스 조사를 위해 구입 및 재배함
- 호감미와 진율미는 특별히 다른 바이러스 병징을 보여주지 않았으며, 진율미의 경우 꽃이 피는 것까지 확인하였으며, 시중에서 묘종으로 판매되는 호박, 밤, 꿀고구마의 경우 병징이 거의 없거나 약한 병징을 보여줌(그림 9)



그림 10. 노지에 심어 재배한 고구마의 줄기, 잎, 꽃 사진

- 5종 고구마 품종에 감염되어 있는 바이러스 조사를 위해 각 품종으로부터 잎을 채취하여 total RNA를 추출하였고, 추출된 total RNA를 이용해 Library 구축 및 Illumina NovaSeq6000 시스템을 이용해 (Next-generation sequencing, NGS)를 수행함
- NGS수행 결과 적게는 33,370,560 reads(호박고구마)에서 많게는 43,581,886 reads(호감미)를 각 라이브러리로부터 얻음(표 2)
- 고구마의 경우 대부분 알려진 바이러스가 RNA이기 때문에 RNA-sequencing을 수행함
- 염기서열 분석 결과 Q20이 차지하는 비율이 대부분 98%가 넘어 sequencing 결과가 매우 좋은 것으로 밝혀짐

표 2. 5종 고구마 품종 NGS 수행 후 확보된 raw data 요약

| 품종 | Total read bases (bp) | Total reads | GC(%) | AT(%) | Q20(%) | Q30(%) |
|---------|-----------------------|-------------|-------|-------|--------|--------|
| 고구마-호감미 | 4,401,770,486 | 43,581,886 | 46.56 | 53.44 | 98.23 | 94.63 |
| 고구마-진율미 | 3,490,116,206 | 34,555,606 | 45.58 | 54.42 | 98.27 | 94.75 |
| 밤고구마 | 4,223,859,592 | 41,820,392 | 47 | 53 | 98.55 | 95.71 |
| 꿀고구마 | 4,172,401,304 | 41,310,904 | 47 | 53 | 98.42 | 95.46 |
| 호박고구마 | 3,370,426,560 | 33,370,560 | 56.26 | 43.74 | 98.57 | 95.96 |

- 확보된 raw data로부터 size가 큰 contig들을 얻기 위해, Trinity 프로그램을 이용해 *de novo* 조립을 수행하였음 (표 3)
- 수행 결과 호박고구마(54,712 contigs)로부터 가장 적은 수의 contigs를 얻었으며, 호감미(139,969 contigs)로부터 가장 많은 수의 contigs를 얻었음
- 조립된 contigs의 average size는 진을미(1082.72 bp)가 가장 길었으며, 호박고구마의 경우 694.98bp로 가장 짧았음

표 3. 5종 고구마 *de novo* 전사체 조립한 결과

| 품종 | Total trinity transcripts | Percent GC | Contig N50 | Median contig length | Average contig | Total assembled bases |
|---------|---------------------------|------------|------------|----------------------|----------------|-----------------------|
| 고구마-호감미 | 139969 | 43.29 | 1461 | 666 | 946.2 | 132438061 |
| 고구마-진을미 | 130320 | 42.17 | 1719 | 735 | 1082.72 | 141099886 |
| 밤고구마 | 109116 | 44.25 | 1467 | 649 | 941.45 | 102726767 |
| 꿀고구마 | 110380 | 43.93 | 1504 | 678 | 969.51 | 107014410 |
| 호박고구마 | 54712 | 47.19 | 873 | 540 | 694.98 | 38023800 |

- 조립된 고구마 전사체로부터 바이러스 관련 contig들을 동정하기 위해서, 각 조립된 전사체들을 식물바이러스 유전체 데이터베이스에 BLASTN을 수행함(표 4)
- 수행 결과 각 고구마 품종으로부터 다양한 종류의 바이러스 관련 contig들을 확보함

표 4. BLASTN을 수행하여 조립된 각 고구마 전사체에서 동정된 바이러스 관련 전사체 정보 및 매치되는 바이러스 정보

| 품종 | Transcript ID | Size | Accession No. | Name of virus |
|------|--------------------------|------|---------------|---------------------------------------|
| 밤고구마 | TRINITY_DN59823_c0_g1_i1 | 379 | NC_014742.1 | Sweet potato virus C |
| 밤고구마 | TRINITY_DN55055_c0_g1_i1 | 350 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 밤고구마 | TRINITY_DN8554_c0_g1_i4 | 1481 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 밤고구마 | TRINITY_DN8554_c0_g1_i8 | 2011 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 밤고구마 | TRINITY_DN8554_c0_g1_i6 | 1808 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 밤고구마 | TRINITY_DN8554_c0_g1_i9 | 2010 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 밤고구마 | TRINITY_DN8554_c0_g1_i1 | 1808 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 밤고구마 | TRINITY_DN8554_c0_g1_i5 | 1915 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 밤고구마 | TRINITY_DN8554_c0_g1_i7 | 1113 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 밤고구마 | TRINITY_DN9972_c0_g1_i5 | 1224 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |

| | | | | |
|---------|--------------------------|------|-------------|---------------------------------------|
| 밤고구마 | TRINITY_DN9972_c0_g1_i4 | 344 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 밤고구마 | TRINITY_DN53508_c0_g1_i1 | 360 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 꿀고구마 | TRINITY_DN52286_c0_g1_i1 | 291 | NC_001841.1 | Sweet potato feathery mottle virus |
| 꿀고구마 | TRINITY_DN61474_c0_g1_i1 | 362 | NC_014742.1 | Sweet potato virus C |
| 꿀고구마 | TRINITY_DN63835_c0_g1_i1 | 372 | NC_014742.1 | Sweet potato virus C |
| 꿀고구마 | TRINITY_DN7160_c1_g2_i1 | 2092 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 꿀고구마 | TRINITY_DN7160_c1_g2_i4 | 2092 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 꿀고구마 | TRINITY_DN417_c0_g1_i9 | 2326 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 꿀고구마 | TRINITY_DN417_c0_g1_i2 | 2335 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 꿀고구마 | TRINITY_DN417_c0_g1_i6 | 2332 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 꿀고구마 | TRINITY_DN417_c0_g1_i5 | 2335 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 꿀고구마 | TRINITY_DN3115_c0_g1_i8 | 1086 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 꿀고구마 | TRINITY_DN7026_c3_g1_i1 | 407 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 꿀고구마 | TRINITY_DN1834_c0_g2_i1 | 2373 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 꿀고구마 | TRINITY_DN8496_c0_g1_i9 | 868 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 꿀고구마 | TRINITY_DN8496_c0_g1_i1 | 600 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 꿀고구마 | TRINITY_DN7444_c0_g1_i25 | 2500 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 꿀고구마 | TRINITY_DN7444_c0_g1_i46 | 1971 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 꿀고구마 | TRINITY_DN7444_c0_g1_i26 | 2006 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 고구마-호감미 | TRINITY_DN16512_c0_g1_i1 | 253 | NC_014742.1 | Sweet potato virus C |
| 고구마-호감미 | TRINITY_DN50936_c0_g1_i1 | 364 | NC_014742.1 | Sweet potato virus C |
| 고구마-호감미 | TRINITY_DN65956_c0_g1_i1 | 290 | NC_014742.1 | Sweet potato virus C |
| 고구마-호 | TRINITY_DN4448_c0_g2_i | 1212 | NC_014742.1 | Sweet potato virus C |

| | | | | |
|-------------|--------------------------------|------|-------------|---------------------------------------|
| 감미 | 1 | | | |
| 고구마-호 감미 | TRINITY_DN4448_c0_g3_i 2 | 6193 | NC_014742.1 | Sweet potato virus C |
| 고구마-호 감미 | TRINITY_DN4448_c0_g3_i 1 | 6193 | NC_014742.1 | Sweet potato virus C |
| 고구마-호 감미 | TRINITY_DN2165_c1_g1_i 9 | 2220 | NC_015328.1 | Sweet potato caulimo-like virus |
| 고구마-호 감미 | TRINITY_DN2165_c1_g1_i 3 | 2326 | NC_015328.1 | Sweet potato caulimo-like virus |
| 고구마-호 감미 | TRINITY_DN2165_c1_g1_i 10 | 491 | NC_015328.1 | Sweet potato caulimo-like virus |
| 고구마-호 감미 | TRINITY_DN2165_c1_g1_i 4 | 1459 | NC_015328.1 | Sweet potato caulimo-like virus |
| 고구마-호 감미 | TRINITY_DN2165_c1_g1_i 1 | 2091 | NC_015328.1 | Sweet potato caulimo-like virus |
| 고구마-호 감미 | TRINITY_DN50924_c0_g1_i i1 | 330 | NC_018093.1 | Sweet potato virus G |
| 고구마-호 감미 | TRINITY_DN4448_c0_g1_i 1 | 971 | NC_018093.1 | Sweet potato virus G |
| 고구마-호 감미 | TRINITY_DN3347_c0_g1_i 5 | 1838 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 고구마-호 감미 | TRINITY_DN3347_c0_g1_i 1 | 3050 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 고구마-호 감미 | TRINITY_DN3347_c0_g1_i 6 | 991 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 고구마-호 감미 | TRINITY_DN3347_c0_g1_i 2 | 3142 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 고구마-호 감미 | TRINITY_DN3347_c0_g1_i 3 | 3059 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 고구마-호 감미 | TRINITY_DN3347_c0_g3_i 1 | 315 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 고구마-호 감미 | TRINITY_DN6221_c0_g2_i 3 | 278 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 고구마-호 감미 | TRINITY_DN1649_c5_g1_i 1 | 457 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 고구마-호 감미 | TRINITY_DN3452_c0_g1_i 6 | 670 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 고구마-호 감미 | TRINITY_DN3452_c0_g1_i 1 | 2118 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 고구마-호 감미 | TRINITY_DN7556_c0_g1_i 5 | 1025 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 고구마-호 감미 | TRINITY_DN10010_c0_g1_i i20 | 647 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 고구마-호 감미 | TRINITY_DN10010_c0_g1_i i2 | 951 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |

| | | | | |
|-------------|--------------------------|------|-------------|--|
| 고구마-호 감미 | TRINITY_DN10010_c0_g1_i5 | 848 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 고구마-호 감미 | TRINITY_DN42373_c0_g1_i1 | 404 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 고구마-호 감미 | TRINITY_DN1760_c0_g1_i3 | 1105 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 고구마-호 감미 | TRINITY_DN62252_c0_g1_i1 | 404 | NC_011620.1 | Potato virus X |
| 고구마-호 감미 | TRINITY_DN57049_c0_g1_i1 | 221 | NC_011620.1 | Potato virus X |
| 고구마-호 감미 | TRINITY_DN56811_c0_g1_i1 | 216 | NC_011620.1 | Potato virus X |
| 고구마-호 감미 | TRINITY_DN55434_c0_g1_i1 | 633 | NC_011620.1 | Potato virus X |
| 호박고구 마 | TRINITY_DN41076_c0_g1_i1 | 289 | NC_001841.1 | Sweet potato feathery mottle virus |
| 호박고구 마 | TRINITY_DN3428_c0_g1_i3 | 1811 | NC_015328.1 | Sweet potato caulimo-like virus |
| 호박고구 마 | TRINITY_DN3428_c0_g1_i12 | 1699 | NC_015328.1 | Sweet potato caulimo-like virus |
| 호박고구 마 | TRINITY_DN3428_c0_g1_i4 | 1823 | NC_015328.1 | Sweet potato caulimo-like virus |
| 호박고구 마 | TRINITY_DN3428_c0_g1_i7 | 1711 | NC_015328.1 | Sweet potato caulimo-like virus |
| 호박고구 마 | TRINITY_DN43641_c0_g1_i2 | 374 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 호박고구 마 | TRINITY_DN3622_c0_g1_i1 | 979 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 호박고구 마 | TRINITY_DN8614_c0_g1_i1 | 292 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 호박고구 마 | TRINITY_DN15458_c0_g3_i2 | 716 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 호박고구 마 | TRINITY_DN15458_c0_g3_i1 | 716 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 고구마-진 울미 | TRINITY_DN40685_c0_g1_i1 | 247 | NC_011620.1 | Potato virus X |
| 고구마-진 울미 | TRINITY_DN6272_c0_g1_i2 | 1251 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 고구마-진 울미 | TRINITY_DN6272_c0_g1_i4 | 1257 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 고구마-진 울미 | TRINITY_DN6272_c0_g2_i6 | 2106 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 고구마-진 울미 | TRINITY_DN6272_c0_g2_i7 | 2199 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 고구마-진 | TRINITY_DN6272_c0_g2_i | 2353 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless |

| | | | | |
|-------------|--------------------------|------|-------------|---------------------------------------|
| 울미 | 3 | | | mastrevirus 1 |
| 고구마-진 울미 | TRINITY_DN13342_c0_g1_i1 | 244 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 고구마-진 울미 | TRINITY_DN7565_c0_g1_i1 | 2007 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 고구마-진 울미 | TRINITY_DN7565_c0_g2_i2 | 551 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 고구마-진 울미 | TRINITY_DN3081_c0_g1_i7 | 722 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 고구마-진 울미 | TRINITY_DN3081_c0_g1_i3 | 1587 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 고구마-진 울미 | TRINITY_DN3081_c0_g1_i4 | 1530 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| 고구마-진 울미 | TRINITY_DN3081_c0_g1_i2 | 1554 | NC_034630.1 | Sweetpotatosymptomless mastrevirus1 |

- 바이러스 관련 contig수의 확인 해 본결과 호감미에서 총 33개의 바이러스 관련 contig를 얻었으며, 진울미에서 13개 contig, 밤 고구마 2개 contig, 꿀고구마 17개 contig, 호박 고구마에서는 총 10개의 바이러스 관련 contig를 동정함(표 5)
- 호감미에서는 sweet potato virus C, Sweet potato symptomless mastrevirus 1, Sweet potato caulimo-like virus, Sweet potato virus G 및 potato virus X등 5개의 바이러스에 감염된 것을 확인하였고, 진울미에서는 Sweet potato symptomless mastrevirus 1과 Potato virus X에 감염된 것을 확인함
- 호감미와 진울미의 경우 기존 재배종 고구마에 비해 바이러스 감염 정도가 심하지 않았으며, 바이러스 무병묘 개발에 사용함
- 밤고구마는 총 2종, 꿀고구마는 3종, 호박고구마는 3종의 바이러스에 감염된 것을 확인함

표 5. 각 고구마 품종별 바이러스 관련 contig수의 분포

| 품종 | 고구마-호감미 | 고구마-진울미 | 밤고구마 | 꿀고구마 | 호박고구마 |
|---------------------------------------|---------|---------|------|------|-------|
| Sweet potato virus C | 6 | | 1 | 2 | |
| Sweet potato symptomless mastrevirus1 | 16 | 12 | 1 | 14 | 5 |
| Sweet potato feathery mottle virus | | | | 1 | 1 |
| Sweet potato caulimo-like virus | 5 | | | | 4 |
| Sweet potato virus G | 2 | | | | |
| Potato virus X | 4 | 1 | | | |
| Total | 33 | 13 | 2 | 17 | 10 |

○ NGS이용 고구마 조직별 바이러스 분석

- 고구마는 영양번식 작물로 고구마의 줄기를 이용해 번식을 함
- 고구마 조직별로 바이러스 양이나 감염된 바이러스의 차이를 알기 위하여, 바이러스 병징이 심한 고구마 샘플을 선택하여 NGS이용 바이러스 분석을 수행함
- 선택된 고구마 조직은 그림 3번처럼 표시된 조직 중, fibrous root, leaf, root body root stalk,

stem 등 총 5개의 조직임

- 서로 다른 2개의 고구마 식물로부터 각각 5개 고구마 조직 샘플을 채취하였고, 채취된 샘플로부터 total RNA를 추출함
 - 추출한 total RNA로부터 RNA-seqencing용 라이브러리를 구축하고, NGS를 수행함(표 6)
- 표 6. 2개 고구마 식물로부터 채취한 5개 고구마 조직별 NGS수행 결과

| Tissue | Total Size, Mb | Total Spots | Total Bases |
|----------------|----------------|-------------|-------------|
| Fibrous root-1 | 1218.05 | 9591460 | 1937474920 |
| Fibrous root-2 | 1283.78 | 10099544 | 2040107888 |
| Leaf-1 | 2003.96 | 15040514 | 3038183828 |
| Leaf-2 | 2306.85 | 17373851 | 3509517902 |
| Root body-1 | 861.54 | 7023952 | 1418838304 |
| Root body-2 | 1216.16 | 9831021 | 1985866242 |
| Root stalk-1 | 1070.64 | 8747163 | 1766926926 |
| Root stalk-2 | 1207.63 | 9679621 | 1955283442 |
| Stem-1 | 1356.11 | 10719419 | 2165322638 |
| Stem-2 | 1268.66 | 10026803 | 2025414206 |

- 잎 조직으로부터 가장 많은 양의 raw data를 얻었으며, root stalk와 root body에서 가장 적은 양의 raw data를 얻었음(표 6)
- 얻어진 raw data를 Trinity 프로그램을 이용해 전사체를 조립함
- Root body에서 가장 적은 수의 contig들을 얻었으며, 줄기에서 가장 많은 수의 conti를 얻었음 (표 7)

표 7. 10개 고구마 조직 관련 전사체 조립 결과 요약

| Tissue | Total trinity transcripts | Percent GC | Contig N50 | Median contig length | Average contig | Total assembled bases |
|----------------|---------------------------|------------|------------|----------------------|----------------|-----------------------|
| Fibrous root-1 | 54116 | 47.47 | 855 | 420 | 623.98 | 33767229 |
| Fibrous root-2 | 62017 | 46.94 | 909 | 447 | 653.75 | 40543355 |
| Leaf-1 | 54696 | 44.46 | 951 | 435 | 663.81 | 36308005 |
| Leaf-2 | 57331 | 44.31 | 1080 | 476 | 726.96 | 41677267 |
| Root body-1 | 44551 | 44.96 | 1135 | 507 | 759.08 | 33817964 |
| Root body-2 | 48829 | 44.85 | 1217 | 571 | 816.92 | 39889446 |
| Root stalk-1 | 48539 | 45.26 | 1169 | 558 | 791.11 | 38399664 |
| Root stalk-2 | 56178 | 44.87 | 1247 | 560 | 821.57 | 46154021 |
| Stem-1 | 67014 | 45.61 | 1110 | 530 | 764.52 | 51233462 |
| Stem-2 | 62285 | 46.06 | 1053 | 504 | 731.78 | 45579111 |

- 조립된 contig들의 N50 사이즈의 경우 적게는 855bp에서 많게는 1217bp로 분포됨(표 7)
- 이번에는 생물정보학 분석을 통해 조립된 전사체 정보에서 바이러스를 동정함
- Sweet potato feathery mottle virus, Sweet potato latent virus, Sweet potato virus 2, Sweet potato virus C, Sweet potato virus G, Sweetpotato badnavirus B, Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 등 7개 고구마 감염 바이러스를 동정함

- 각 조직에서 바이러스가 차지하는 비율을 각 라이브러리별 read수와 바이러스 관련 read수의 비율을 통해 분석함(그림 10)
- 5개의 고구마 조직 중 바이러스가 차지하는 비율이 가장 적은 조직은 잎이었으며, 가장 높은 비율로 바이러스 관련 read가 많은 조직은 root stalk였으며, 그 뒤로 fibrous root과 줄기 순서로 바이러스가 차지하는 비율이 높았음(그림 10)
- 기존 다른 바이러스 감염 식물과 비교하여 바이러스가 차지하는 비율이 고구마에서는 대체로 매우 낮았으며, 고구마의 경우 우리가 흔히 샘플로 사용하는 잎보다는 root stalk나 줄기를 사용하는 것이 바이러스 동정하는데 유리하다는 것을 밝혔음(그림 10)

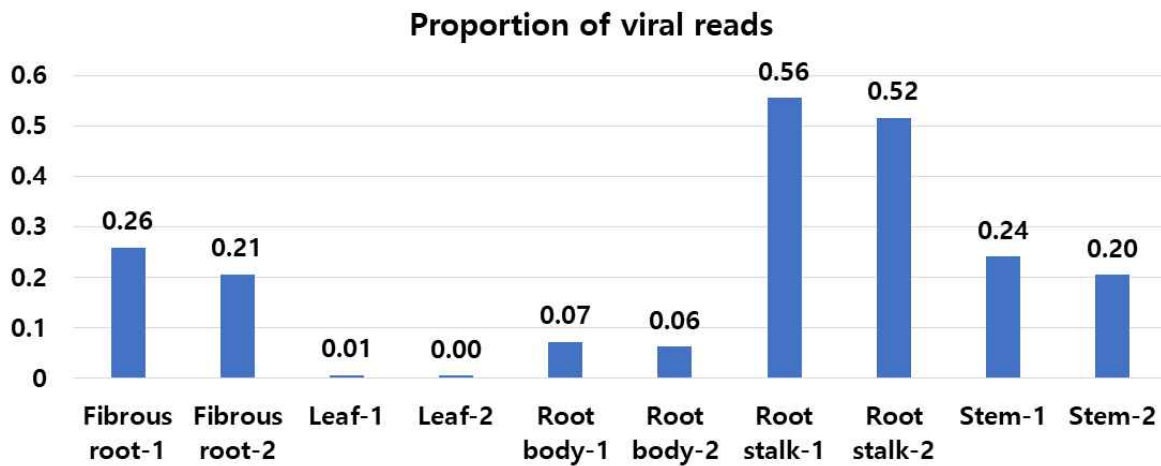


그림 11. Read수를 바탕으로 각 라이브러리별 바이러스 관련 read가 차지하는 비율(%)

- 각 조직별로 바이러스 관련 read수를 분석한 결과 sweet potato feathery mottle virus의 경우 잎에서 바이러스 양이 가장 적었으며, root stalk과 fibrous root에서 가장 많은 바이러스가 존재하였음(그림 11)
- sweet potato latent virus의 경우 fibrous root에서 가장 많은 양의 바이러스가 존재하였으나 전체적으로 관련 바이러스 read수는 다른 바이러스에 비해 매우 적은 것으로 나타남(그림 11)
- sweet potato virus 2와 sweet potato virus C의 경우 root stalk과 줄기에서 가장 많은 양의 바이러스가 검출됨(그림 11)

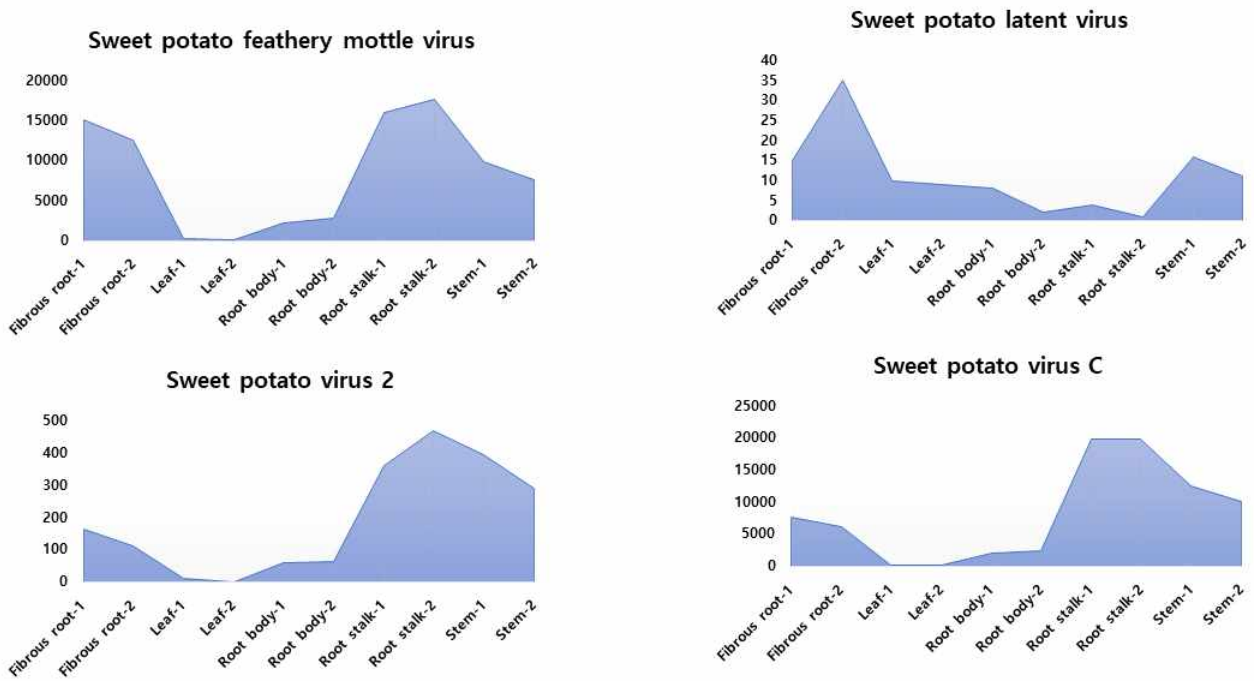


그림 12. 조직별 4개 고구마 바이러스 관련 read 수

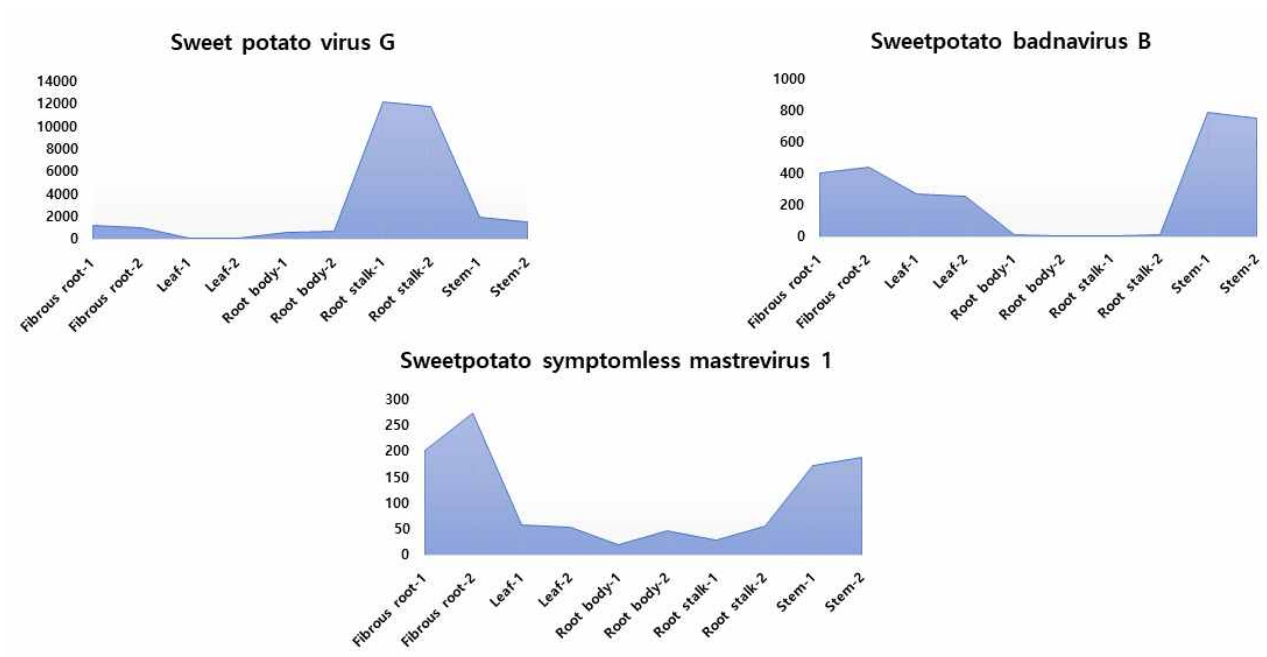


그림 13. 조직별 3개 고구마 바이러스 관련 read 수

- Sweet potato virus G의 경우 root stalk에서 가장 많은 수의 바이러스가 존재하였으며, sweet potato badnavirus B의 경우 fibrous root과 줄기에서 많은 양의 바이러스가 검출되었으며, sweet potato symptomless mastrevirus 1의 경우 fibrous root과 줄기에서 바이러스가 대체로 많이 검출됨(그림 12)

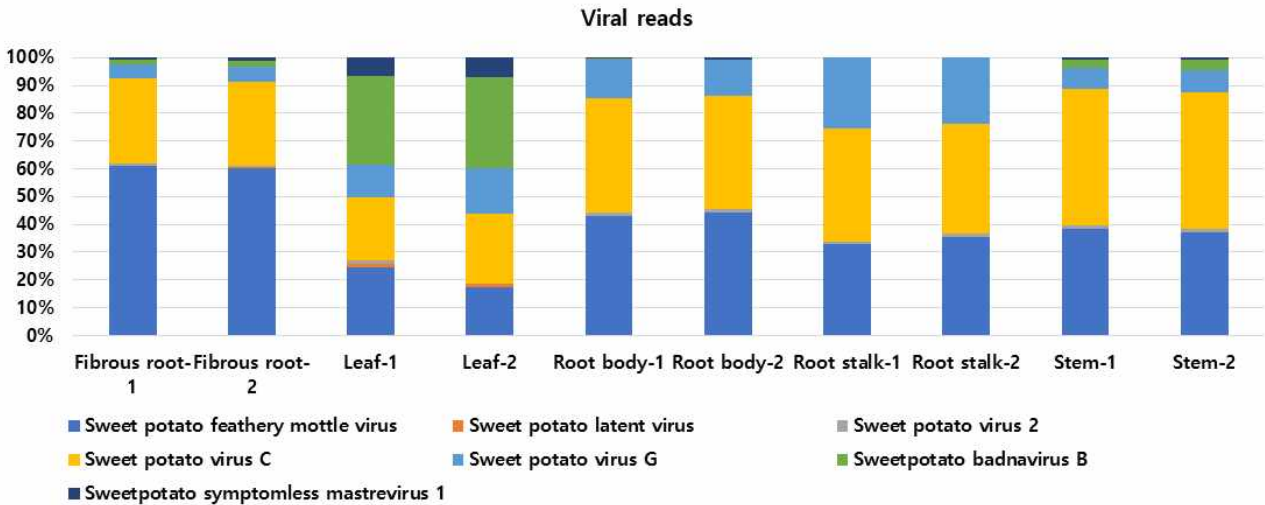


그림 14. 바이러스 read에 따른 각 조직별 바이러스의 비율 조사

- 각 조직별로 바이러스 read에 따른 바이러스의 비율을 조사함(그림 13)
- Sweet potato feathery mottle virus와 sweet potato virus의 경우 대부분의 조직에서 우점을 차지하는 고구마 바이러스로 밝혀졌으며, 그 뒤로 sweet potato virus G가 많은 양으로 존재하는 것을 확인함(그림 13)
- Sweetpotato badnavirus B의 경우 특이하게도 잎 조직에 많은 비율로 존재하였으며, 줄기에서도 바이러스 동정됨(그림 13)
- Sweetpotato symptomless mastrevirus 1의 경우 다른 조직에 비해 잎에서 상대적으로 동정이 많이 되는 것을 확인하였으며, sweet potato latent virus의 경우 다른 고구마 감염 바이러스에 비해 감염량이 매우 적은 것으로 밝혀짐
- FPKM은 Fragment Per Kilobase of transcript per Million mapped reads의 약자로 바이러스의 발현량을 바이러스 유전체 크기에 비례하여 계산하는데 사용할 수 있음(그림 14)
- SPFMV와 SPVC가 잎을 제외하고 대부분의 조직에서 우점을 나타냈음(그림 14)
- SPVG의 경우 root body와 root stalk에 많이 존재하는 것으로 나타남
- 잎 조직에서는 SPBV-B와 SPSMV-1이 차지하는 비율이 다른 조직에 비해 상대적으로 높았고, SPFMV와 SPVC가 차지하는 비율은 많이 줄어들었음(그림 14)

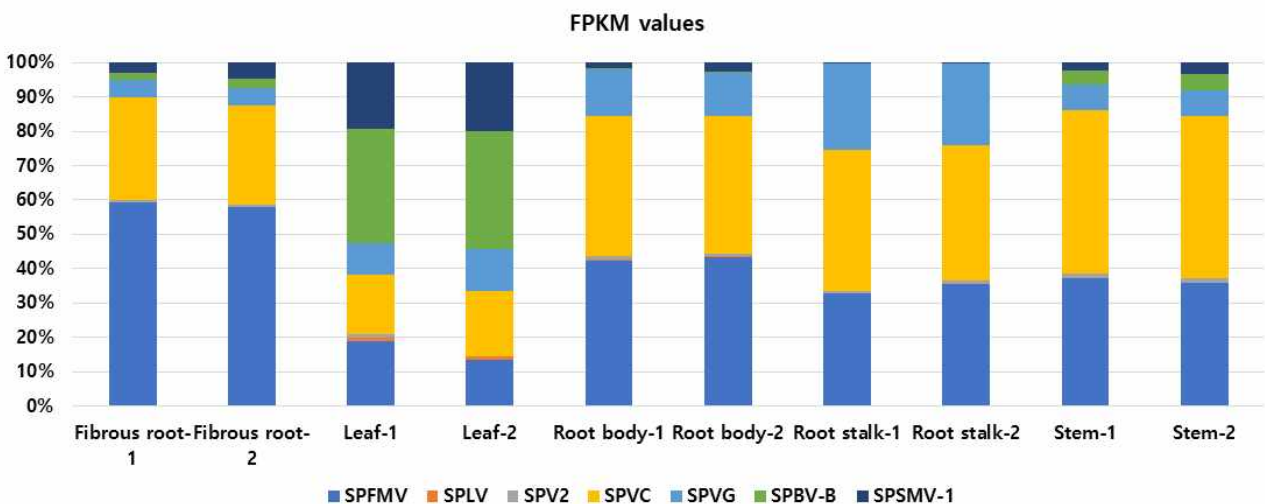


그림 15. FPKM 값에 따른 각 조직별 바이러스의 비율 조사

○ 고구마 바이러스 진단 방법 개발

- 주요 고구마 바이러스를 대상으로 바이러스를 진단할 수 있는 RT-PCR기반 프라이머를 디자인 및 제작함(표 8)
- RT-PCR로 증폭되는 PCR product의 크기를 다양하게 함으로써 multiplex가 가능할 수 있도록 제작함
- 대상 바이러스는 SPVG, SPVE, SPVC, SPSMV등 총 4종임
- 추출한 total RNA를 template로 하여, RT-PCR를 수행한 결과 그림 8과 같이 모든 샘플에서 고구마 actin 유전자 증폭되는 것을 확인할 수 있었으며, 이걸 바탕으로 추출한 total RNA quality가 좋은 것을 확인함(그림 15)
- 고구마 5개 품종을 대상으로 제작된 RT-PCR의 유용성을 확인해 본 결과 SPVG의 경우 호감미 품종에서만 동정되었고, SPSMV의 경우 진을미를 제외하고 4품종 모두에서 바이러스가 감염되었다는 것을 확인함(그림 15)
- SPVE의 경우 호감미, 꿀고구마, 밤고구마에서 동정되었으며, SPVC는 호감미에서 동정됨
- 조사한 5개 고구마 품종 중 진을미만 4종 바이러스에 감염되어 있지 않은 것을 확인함

표 8. 고구마 바이러스 진단용 RT-PCR 프라이머 정보

| 이름 | 프라이머염기서열 | 사이즈 | 참고 바이러스 정보 |
|---------------|-------------------------------------|-----|---|
| IbACT-F1 | ACTCAGTGGCGGGACTACCAT GTT | 397 | Ipomoea batatas actin AY905538.1 1-25/397-369 |
| IbACT-R1 | GTGCAACATCATAATATAACT CCTTGAAT | | |
| SPVG-9856F1 | AGAGATGTGAATGCTGGTACG GTTG | 702 | Sweet potato virus G (NC_018093.1) 9865-9889/10566-10536 |
| SPVG-10566R1 | CCTCATACCCAAGAGGTTATG TATATTCCTT | | |
| SPVE-F2 | TCTGGAGAAAAACCCGAATTT AAAGAT | 939 | Sweetpotato virus E (MH388502.1) 9751-9777/10689-10666 |
| SPVE-R2 | CTGCACACCCCTCATTCCTAA GAG | | |
| SPVC-CP1F | TCGGTGTATCATCAATCTGGC | 560 | Sweet potato virus C (NC_014742.1) 9641-9661/10200-10181 ; Gu et al., PLoS One 2014 |
| SPVC-CP1R | CCATCCATCATCGTCCAAAC | | |
| SPSMV-MastvKF | GACAGACCCCTAGGGTGA | 436 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 (NC_034630.1) 218-235/653-632 ; Mbanzibwa et al., 2011 Plant Disease 95(2):224 |
| SPSMV-MastvsR | ACTGCATATAGTACATGCCAC A | | |

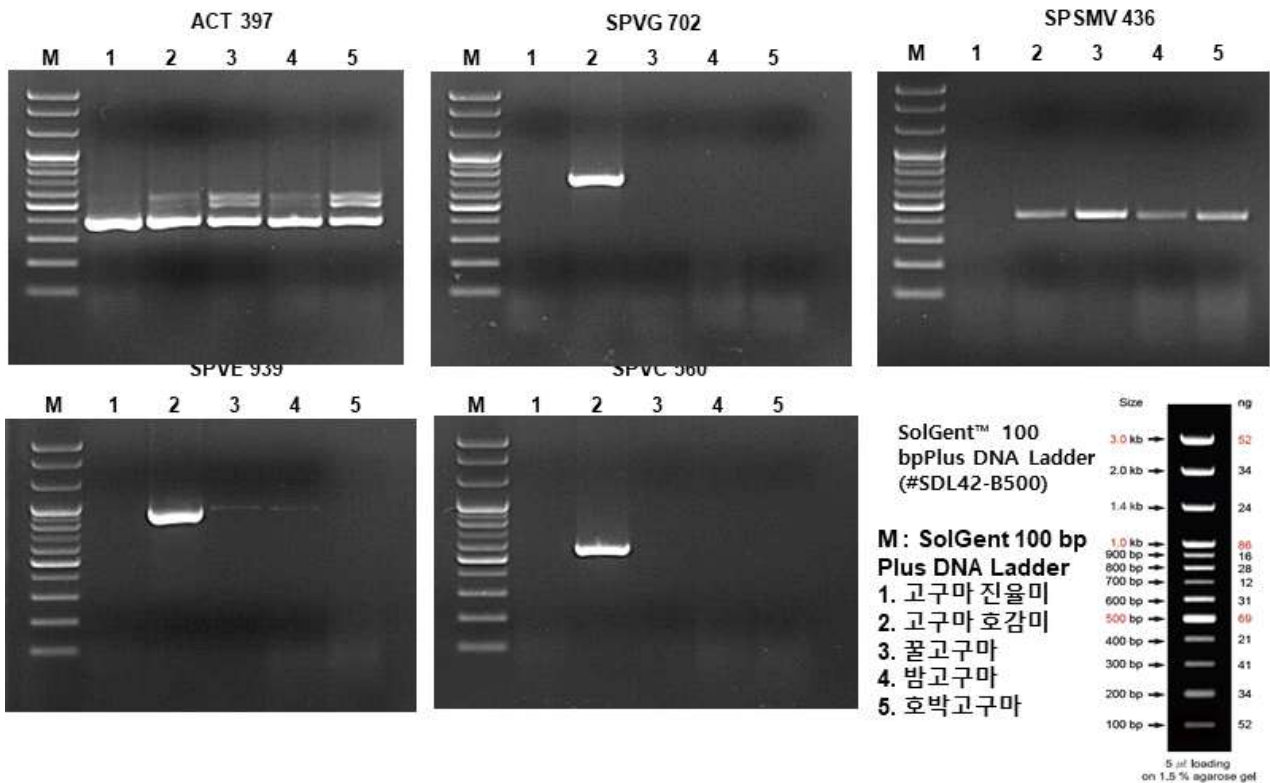


그림 16. 새롭게 제작된 바이러스 특이적 프라이머 이용 RT-PCR 수행 후 PCR product를 아가로스 젤에서 확인한 사진

- RT-PCR 뿐만 아니라 고구마 바이러스 진단을 위한 real time RT-PCR용 프라이머를 디자인함 (그림 17-20)
- Real time RT-PCR이용 바이러스 진단 방법 개발에 사용된 바이러스는 DNA바이러스인 Sweet potato leaf curl virus, 3종 RNA 바이러스인 sweet potato chlorotic fleck virus, sweet potato virus C, sweetpotato symptomless mastrevirus 1이며, 주로 바이러스의 C' region을 대상으로 프라이머를 디자인함
- 고구마 actin 유전자를 control로 사용했으며, real time RT-PCR로 증폭되는 PCR product의 크기는 163bp에서 199bp임(표 9)
- 디자인 된 프라이머는 real time RT-PCR에 사용되었으며, 그림 16와 같이 성공적으로 고구마 바이러스를 진단할 수 있었음

표 9. 고구마 바이러스 진단을 위한 real time RT-PCR용 프라이머 정보

| 이름 | 프라이머염기서열 | 크기 | 참고 바이러스 정보 |
|--------------|------------------------------------|-----|--|
| IbAct-164-F1 | TAGAATGAGCAAGGAAATAACAGC GTTGGC | 164 | Ipomoea batatas actin (AY0905538.1) 40-69/203-174 |
| IbAct-164-R1 | CGGACTCATCATACTCTGCCTTGG CAATCC | | |
| SPLCV-163-F1 | GCCATTTAAGGCGTTCCAAAATAC CAGTCC | 163 | Sweet potato leaf curl virus DNA A (NC_004650.1) 1227-1256/1389-1360 |
| SPLCV-163-R1 | AGCACACAGGGGAGAACCATCCTC AAATTC | | |
| SPSMV-199-F1 | GAGCACATTGAAAGAGAACGTGAA | 199 | Sweetpotato symptomless |

| | | | |
|--------------|-------------------------------------|-----|--|
| | AATGGA | | mastrevirus 1 (NC_034630.1) 2356-2385/2525-2554 |
| SPSMV-199-R1 | CAACCCAGAGCAAGATCAGTTTTTC TCATTC | | |
| SPVC-168-F1 | ACTCAGGAACAGTTTTCGAGCATGG TATGAA | 168 | Sweet potato virus C (NC_014742.1) 10046-10075/10213-10184 |
| SPVC-168-R1 | CACTTGTTTCATCCCCATCCATCAT CGTCCA | | |
| SPCFV-165-F1 | AAGCATGTGAAATCAAGACCGAAC TTAAAG | 165 | Sweet potato chlorotic fleck virus (NC_006550.1) 8618-8647/8782-8753 |
| SPCFV-165-R1 | GGTTCTCATGCCCTTATTGTAGTT ACTAAC | | |

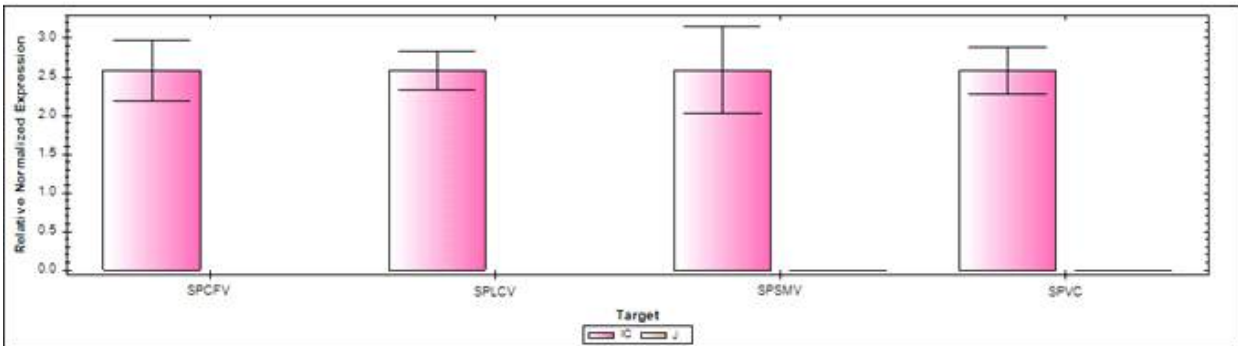
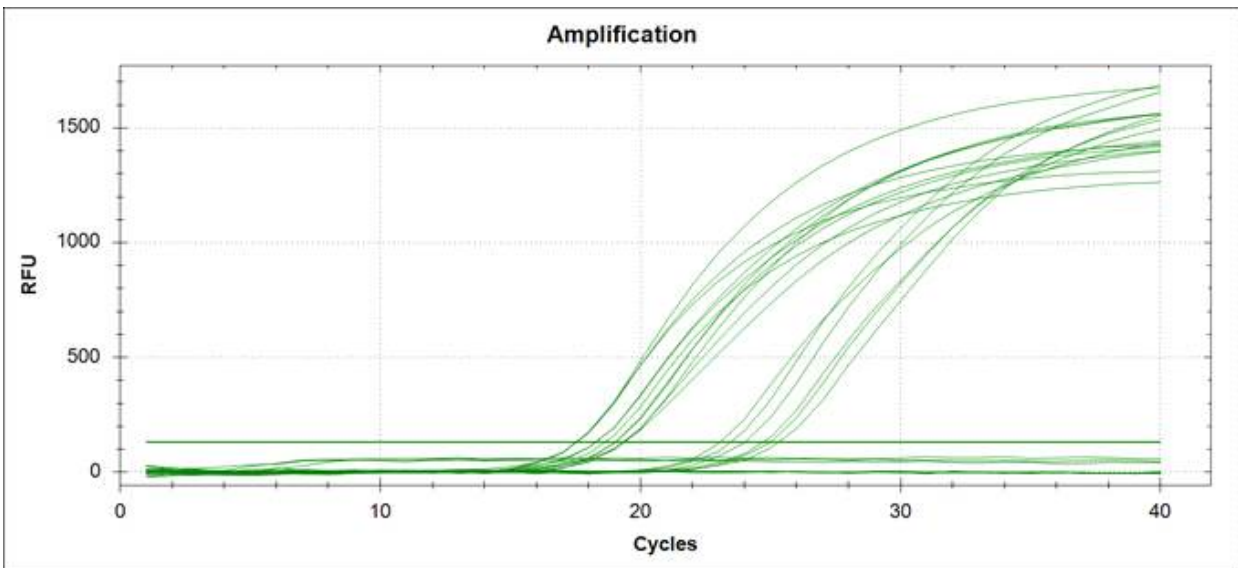
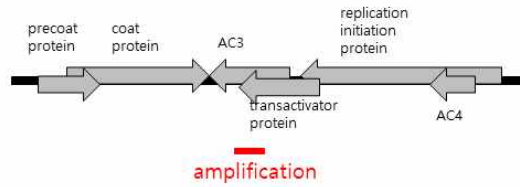


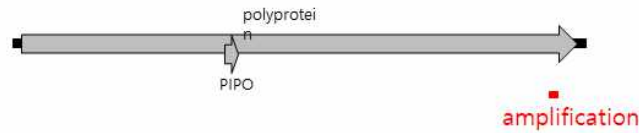
그림 17. Real time RT-PCR로 고구마 바이러스 유전자가 실시간으로 증폭되는 것을 monitoring함



Sweet potato leaf curl virus DNA A (NC_004650.1) 2828 bp

| | | |
|-------------|--|------|
| JX961674.1 | TAAACTACTTAATTCATTACAAATTCGCCATTTAAGGCGTGTCAAAATACCAAGTCCAAC | 1217 |
| JX961671.1 | TAAACTACTTAATTCATTACAAATTCGCCATTTAAGGCGTGTCAAAATACCAAGTCCAAC | 1217 |
| MH602270.1 | TAAACTAGCTAATTCATTACATATGCGCCATTTAAGGCGTTCACAAAATACCAAGTCCAAC | 1254 |
| FJ515896.1 | TAAACTAGCTAATTCATTACATATGCGCCATTTAAGGCGTTCACAAAATACCAAGTCCAAC | 1253 |
| FJ515897.1 | TAAACTAGCTAATTCATTACATATGCGCCATTTAAGGCGTTCACAAAATACCAAGTCCAAC | 1253 |
| MK052988.1 | TAAATTAGCTAATTCATTACAAAAGAGCCATTTAATGCGTTCACAAAATACCAAGTCCAAC | 1251 |
| HM754641.1 | TAAATTTGCTAATTCATTACATATGCGCCATTTAAGGCGTTCACAAAATACCAAGTCCAAC | 1253 |
| HQ333142.1 | TATGTTAGCTAATTCATTACATATGCGCCATTTAAGGCGTTCACAAAATACCAAGTCCAAC | 1254 |
| HQ333140.1 | TATGTTAGCTAATTCATTACATATGCGCCATTTAAGGCGTTCACAAAATACCAAGTCCAAC | 1253 |
| JQ349087.1 | TATATTTGCTAATTCATTACATATGCGCCATTTAAGGCGTTCACAAAATACCAAGTCCAAC | 1253 |
| KY270781.1 | TAAATTTGCTAATTCATTACAAAATGCGCCATTTAAGGCGTTCACAAAATACCAAGTCCAAC | 1253 |
| KT992067.1 | TAAATTTGCTAATTCATTACATATGCGCCATTTAAGGCGTTCACAAAATACCAAGTCCAAC | 1253 |
| HQ333141.1 | TAAATTAGCTAATTCATTACATATGCGCCATTTAAGGCGTTCACAAAATACCAAGTCCAAC | 1254 |
| JX961672.1 | TAAATTTGCTAATTCATTACATATGCGCCATTTAAGGCGTTCACAAAATACCAAGTCCAAC | 1253 |
| JX961670.1 | TAAATTTGCTAATTCATTACATATGCGCCATTTAAGGCGTTCACAAAATACCAAGTCCAAC | 1254 |
| HM754640.1 | TAAATTTGCTAATTCATTACATATGCGCCATTTAAGGCGTTCACAAAATACCAAGTCCAAC | 1254 |
| HM754639.1 | TAAATTTGCTAATTCATTACATATGCGCCATTTAAGGCGTTCACAAAATACCAAGTCCAAC | 1254 |
| MH388496.1 | TAAATTTGCTAATTCATTACATATGCGCCATTTAAGGCGTTCACAAAATACCAAGTCCAAC | 1261 |
| NC_004650.1 | TAAATTTGCTAATTCATTACATATGCGCCATTTAAGGCGTTCACAAAATACCAAGTCCAAC | 1260 |
| KY270782.1 | TAAATTTGCTAATTCATTACATATGCGCCATTTAAGGCGTTCACAAAATACCAAGTCCAAC | 1254 |
| | ** * ***** * ***** ** * ***** ** | |
| JX961674.1 | GTGAATAACACCAGTCAGACGGTGTGAATTCCTGAATGGAGAAAGATCTTGTGGAA | 1277 |
| JX961671.1 | GTGAATAACACCAGTCAGACGGTGTGAATTCCTGAATGGAGAAAGATCTTGTGGAA | 1277 |
| MH602270.1 | GTGABAAGCACCAGTTAGACGGATCGTCGATATCCGAAATTCAGGAAGAATCTTGTGGAA | 1314 |
| FJ515896.1 | GTGABAAGCACCAGTTAGACGGATCGTCGATATCCGAAATTCAGGAAGAATCTTGTGGAA | 1313 |
| FJ515897.1 | GTGABAAGCACCAGTTAGACGGATCGTCGATATCCGAAATTCAGGAAGAATCTTGTGGAA | 1313 |
| MK052988.1 | GTGAATAGCACCAGTTAGCTGGTCTGCAATATCTGAATGGAGAAAGATCTTGTGGAA | 1311 |
| HM754641.1 | GTGAATAGCACCAGTTAGACGGTCTGCAAGATCCGAAATTCAGGAAGAATCTTGTGGAA | 1313 |
| HQ333142.1 | GTGAATAGCACCAGTTAGACGGTCTGCAAGATCCGAAATTCAGGAAGAATCTTGTGGAA | 1314 |
| HQ333140.1 | GTGAATAGCACCAGTTAGACGGTCTGCAAGATCCGAAATTCAGGAAGAATCTTGTGGAA | 1313 |
| JQ349087.1 | GTGAATAGCACCAGTTAGACGGTCTGCAAGATCCGAAATTCAGGAAGAATCTTGTGGAA | 1313 |
| KY270781.1 | GTGAGTAGCACCAGTTAGACGGTCTGCAAGATCCGAAATTCAGGAAGAATCTTGTGGAA | 1313 |
| KT992067.1 | GTGAATAGCACCAGTTAGTAGCTGCTGCAAGATCCGAAATTCAGGAAGAATCTTGTGGAA | 1313 |
| HQ333141.1 | GTGAATAGCACCAGTTAGACGGTCTGCAAGATCCGAAATTCAGGAAGAATCTTGTGGAA | 1314 |
| JX961672.1 | GTGAATAGCACCAGTTAGACGGTCTGCAAGATCCGAAATTCAGGAAGAATCTTGTGGAA | 1313 |
| JX961670.1 | GTGAATAGCACCAGTTAGACGGTCTGCAAGATCCGAAATTCAGGAAGAATCTTGTGGAA | 1314 |
| HM754640.1 | GTGAATAGCACCAGTTAGACGGTCTGCAAGATCCGAAATTCAGGAAGAATCTTGTGGAA | 1314 |
| HM754639.1 | GTGAATAGCACCAGTTAGACGGTCTGCAAGATCCGAAATTCAGGAAGAATCTTGTGGAA | 1314 |
| MH388496.1 | GTGAATAGCACCAGTTAGACGGTCTGCAAGATCCGAAATTCAGGAAGAATCTTGTGGAA | 1321 |
| NC_004650.1 | GTGAATAGCACCAGTTAGACGGTCTGCAAGATCCGAAATTCAGGAAGAATCTTGTGGAA | 1320 |
| KY270782.1 | GTGAATAGCACCAGTTAGACGGTCTGCAAGATCCGAAATTCAGGAAGAATCTTGTGGAA | 1314 |
| | ***** * ***** ** * ** * ***** ** * ** * ** * | |
| JX961674.1 | TCCAGTTGCTTCTCTCTCTGTTGCTTCACTTGCAGCTGGAACCTGAGGATGTTCTCCC | 1337 |
| JX961671.1 | TCCAGTTGCTTCTCTCTCTGTTGCTTCACTTGCAGCTGGAACCTGAGGATGTTCTCCC | 1337 |
| MH602270.1 | TCCAGTTGCTTCTCTCTCTGTTGCTTCACTTGCAGCTGGAACCTGAGGATGTTCTCCC | 1374 |
| FJ515896.1 | TCCAGTTGCTTCTCTCTCTGTTGCTTCACTTGCAGCTGGAACCTGAGGATGTTCTCCC | 1373 |
| FJ515897.1 | TCCAGTTGCTTCTCTCTCTGTTGCTTCACTTGCAGCTGGAACCTGAGGATGTTCTCCC | 1373 |
| MK052988.1 | TCCAGCTGTTTCTCTCTCTGTTGCTTCACTTGCAGCTGGAACCTGAGGATGTTCTCCC | 1371 |
| HM754641.1 | TCCAGTTGCTTCTCTCTCTGTTGCTTCACTTGCAGCTGGAACCTGAGGATGTTCTCCC | 1373 |
| HQ333142.1 | TCCAGTTGCTTCTCTCTCTGTTGCTTCACTTGCAGCTGGAACCTGAGGATGTTCTCCC | 1374 |
| HQ333140.1 | TCCAGTTGCTTCTCTCTCTGTTGCTTCACTTGCAGCTGGAACCTGAGGATGTTCTCCC | 1373 |
| JQ349087.1 | TCCAGTTGCTTCTCTCTCTGTTGCTTCACTTGCAGCTGGAACCTGAGGATGTTCTCCC | 1373 |
| KY270781.1 | TCCAGTTGCTTCTCTCTCTGTTGCTTCACTTGCAGCTGGAACCTGAGGATGTTCTCCC | 1373 |
| KT992067.1 | TCCAGTTGCTTCTCTCTCTGTTGCTTCACTTGCAGCTGGAACCTGAGGATGTTCTCCC | 1373 |
| HQ333141.1 | TCCAGTTGCTTCTCTCTCTGTTGCTTCACTTGCAGCTGGAACCTGAGGATGTTCTCCC | 1374 |
| JX961672.1 | TCCAGCTGCTTCTCTCTCTGTTGCTTCACTTGCAGCTGGAACCTGAGGATGTTCTCCC | 1373 |
| JX961670.1 | TCCAGCTGCTTCTCTCTCTGTTGCTTCACTTGCAGCTGGAACCTGAGGATGTTCTCCC | 1374 |
| HM754640.1 | TCCAGCTGCTTCTCTCTCTGTTGCTTCACTTGCAGCTGGAACCTGAGGATGTTCTCCC | 1374 |
| HM754639.1 | TCCAGCTGCTTCTCTCTCTGTTGCTTCACTTGCAGCTGGAACCTGAGGATGTTCTCCC | 1374 |
| MH388496.1 | TCCAGTTGCTTCTCTCTCTGTTGCTTCACTTGCAGCTGGAACCTGAGGATGTTCTCCC | 1381 |
| NC_004650.1 | TCCAGTTGCTTCTCTCTCTGTTGCTTCACTTGCAGCTGGAACCTGAGGATGTTCTCCC | 1380 |
| KY270782.1 | TCCAGTTGCTTCTCTCTCTGTTGCTTCACTTGCAGCTGGAACCTGAGGATGTTCTCCC | 1374 |
| | ***** * ** * ** * ** * ** * ** * ***** ** * ** * ** * | |
| JX961674.1 | CGCTACGCTCTGTTGGGCGT | 1357 |
| JX961671.1 | CGCTACGCTCTGTTGGGCGT | 1357 |
| MH602270.1 | CTGTGCACCTCTGTTGGACAT | 1394 |
| FJ515896.1 | CTGTGCACCTCTGTTGGACAT | 1393 |
| FJ515897.1 | CTGTGCACCTCTGTTGGACAT | 1393 |
| MK052988.1 | CTGTGCACCTCTGTTGGACAT | 1391 |
| HM754641.1 | CTGTGTGCTCTCGGGGCAT | 1393 |
| HQ333142.1 | CTGTGTGCTCTCGTTGGACAT | 1394 |
| HQ333140.1 | CTGTGTGCTCTCGTTGGACAT | 1393 |
| JQ349087.1 | CTGTGTGCTCTCGTTGGACAT | 1393 |
| KY270781.1 | CTGTGTGCTCTCGTTGGACAT | 1393 |
| KT992067.1 | CTGTGTGCTCTCGTTGGACAT | 1393 |
| HQ333141.1 | CTGTGTGCTCTCGTTGGACAT | 1394 |
| JX961672.1 | CTGTGTGCTCTCGTTGGACAT | 1393 |
| JX961670.1 | CTGTGTGCTCTCGTTGGACAT | 1394 |
| HM754640.1 | CTGTGTGCTCTCGTTGGACAT | 1394 |
| HM754639.1 | CTGTGTGCTCTCGTTGGACAT | 1394 |
| MH388496.1 | CTGTGTGCTCTCGTTGGACAT | 1401 |
| NC_004650.1 | CTGTGTGCTCTCGTTGGACAT | 1400 |
| KY270782.1 | CTGTGTGCTCTCGTTGGACAT | 1394 |
| | * * * * * * * * | |

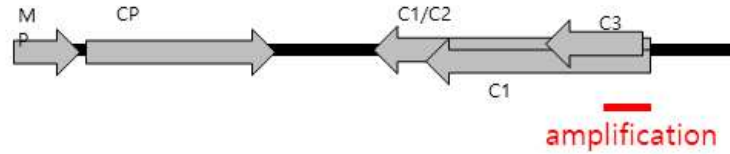
그림 18. Sweet potato leaf curl virus DNA의 유전체 모식도 및 real time RT-PCR용 프라이머 위치



Sweet potato virus C (NC_014742.1) 10820 bp

| | | |
|-------------|--|-------|
| MH388498.1 | GGGAATACACGCTCAACTCAGGAACAGTTTCAAGCATGGTATGAAGGTGTCAAAGGTGAT | 10090 |
| MH388500.1 | GGGAATACACGCTCAACTCAGGAACAGTTTCAAGCATGGTATGAAGGTGTCAAAGGTGAT | 10079 |
| MH388499.1 | GGGAATACACGCTCAACTCAGGAACAGTTTCAAGCATGGTATGAAGGTGTCAAAGGTGAT | 10090 |
| KF386015.1 | GGGAATACACGCTCAACTCAGGAACAGTTTCAAGCATGGTATGAAGGTGTCAAAGGTGAT | 10064 |
| M6656434.1 | GGGAATACACGCTCAACTCAGGAACAGTTTCAAGCATGGTATGAAGGTGTCAAAGGTGAT | 10078 |
| JX489166.1 | GGGAATACACGCTCAACTCAGGAACAGTTTCAAGCATGGTATGAAGGTGTCAAAGGTGAT | 10081 |
| M6656432.1 | GGGAATACACGCTCAACTCAGGAACAGTTTCAAGCATGGTATGAAGGTGTCAAAGGTGAT | 10099 |
| KP115622.1 | GGGAATACACGCTCAACTCAGGAACAGTTTCAAGCATGGTATGAAGGTGTCAAAGGTGAT | 10100 |
| MH782226.1 | GGGAATACACGCTCAACTCAGGAACAGTTTCAAGCATGGTATGAAGGTGTCAAAGGTGAT | 10090 |
| KU877879.1 | GGGAATACACGCTCAACTCAGGAACAGTTTCAAGCATGGTATGAAGGTGTCAAAGGTGAT | 10086 |
| MK778821.1 | GGGAATACACGCTCAACTCAGGAACAGTTTCAAGCATGGTATGAAGGTGTCAAAGGTGAT | 10217 |
| KU511269.1 | GGGAATACACGCTCAACTCAGGAACAGTTTCAAGCATGGTATGAAGGTGTCAAAGGTGAT | 10064 |
| MK778813.1 | GGGAATACACGCTCAACTCAGGAACAGTTTCAAGCATGGTATGAAGGTGTCAAAGGTGAT | 10075 |
| MK778817.1 | GGGAATACACGCTCAACTCAGGAACAGTTTCAAGCATGGTATGAAGGTGTCAAAGGTGAT | 9990 |
| MF572058.1 | GGGAATACACGCTCAACTCAGGAACAGTTTCAAGCATGGTATGAAGGTGTCAAAGGTGAT | 10064 |
| MH782228.1 | GGGAATACACGCTCAACTCAGGAACAGTTTCAAGCATGGTATGAAGGTGTCAAAGGTGAT | 10064 |
| KU511269.1 | GGGAATACACGCTCAACTCAGGAACAGTTTCAAGCATGGTATGAAGGTGTCAAAGGTGAT | 10095 |
| NC_014742.1 | GGGAATACACGCTCAACTCAGGAACAGTTTCAAGCATGGTATGAAGGTGTCAAAGGTGAT | 10090 |
| MK778815.1 | GGGAATACACGCTCAACTCAGGAACAGTTTCAAGCATGGTATGAAGGTGTCAAAGGTGAT | 10088 |
| | ***** | |
| MH388498.1 | TATGGTGTGGATGACGCTGGAATGGCAATCTTGTGAAATGGATGGTATGGTGCATA | 10150 |
| MH388500.1 | TATGGTGTGGATGACGCTGGAATGGCAATCTTGTGAAATGGATGGTATGGTGCATA | 10139 |
| MH388499.1 | TATGGTGTGGATGACGCTGGAATGGCAATCTTGTGAAATGGATGGTATGGTGCATA | 10150 |
| KF386015.1 | TATGGTGTGGATGACGCTGGAATGGCAATCTTGTGAAATGGATGGTATGGTGCATA | 10124 |
| M6656434.1 | TATGGTGTGGATGACGCTGGAATGGCAATCTTGTGAAATGGATGGTATGGTGCATA | 10138 |
| M6656432.1 | TATGGTGTGGATGACGCTGGAATGGCAATCTTGTGAAATGGATGGTATGGTGCATA | 10141 |
| JX489166.1 | TATGGTGTGGATGACGCTGGAATGGCAATCTTGTGAAATGGATGGTATGGTGCATA | 10159 |
| KP115622.1 | TATGGTGTGGATGACGCTGGAATGGCAATCTTGTGAAATGGATGGTATGGTGCATA | 10160 |
| MH782226.1 | TATGGTGTGGATGACGCTGGAATGGCAATCTTGTGAAATGGATGGTATGGTGCATA | 10150 |
| KU877879.1 | TATGGTGTGGATGACGCTGGAATGGCAATCTTGTGAAATGGATGGTATGGTGCATA | 10146 |
| MK778821.1 | TATGGTGTGGATGACGCTGGAATGGCAATCTTGTGAAATGGATGGTATGGTGCATA | 10227 |
| KT069223.1 | TATGGTGTGGATGACGCTGGAATGGCAATCTTGTGAAATGGATGGTATGGTGCATA | 10124 |
| MK778813.1 | TATGGTGTGGATGACGCTGGAATGGCAATCTTGTGAAATGGATGGTATGGTGCATA | 10135 |
| MK778817.1 | TATGGTGTGGATGACGCTGGAATGGCAATCTTGTGAAATGGATGGTATGGTGCATA | 10050 |
| MF572058.1 | TATGGTGTGGATGACGCTGGAATGGCAATCTTGTGAAATGGATGGTATGGTGCATA | 10124 |
| MH782228.1 | TATGGTGTGGATGACGCTGGAATGGCAATCTTGTGAAATGGATGGTATGGTGCATA | 10124 |
| KU511269.1 | TATGGTGTGGATGACGCTGGAATGGCAATCTTGTGAAATGGATGGTATGGTGCATA | 10150 |
| NC_014742.1 | TATGGTGTGGATGACGCTGGAATGGCAATCTTGTGAAATGGATGGTATGGTGCATA | 10150 |
| MK778815.1 | TATGGTGTGGATGACGCTGGAATGGCAATCTTGTGAAATGGATGGTATGGTGCATA | 10148 |
| | ***** | |
| MH388498.1 | GAGAATGGAACATCTCCAAATATAAATGGCGTTTGGACGATGATGGATGGGGATGAACAA | 10210 |
| MH388500.1 | GAGAATGGAACATCTCCAAATATAAATGGCGTTTGGACGATGATGGATGGGGATGAACAA | 10199 |
| MH388499.1 | GAGAATGGAACATCTCCAAATATAAATGGCGTTTGGACGATGATGGATGGGGATGAACAA | 10210 |
| KF386015.1 | GAGAATGGAACATCTCCAAATATAAATGGCGTTTGGACGATGATGGATGGGGATGAACAA | 10184 |
| M6656434.1 | GAGAATGGAACATCTCCAAATATAAATGGCGTTTGGACGATGATGGATGGGGATGAACAA | 10198 |
| M6656432.1 | GAGAATGGAACATCTCCAAATATAAATGGCGTTTGGACGATGATGGATGGGGATGAACAA | 10201 |
| JX489166.1 | GAGAATGGAACATCTCCAAATATAAATGGCGTTTGGACGATGATGGATGGGGATGAACAG | 10219 |
| KP115622.1 | GAGAATGGAACATCTCCAAATATAAATGGCGTTTGGACGATGATGGATGGGGATGAACAA | 10220 |
| MH782226.1 | GAGAATGGAACATCTCCAAATATAAATGGCGTTTGGACGATGATGGATGGGGATGAACAG | 10210 |
| KU877879.1 | GAGAATGGAACATCTCCAAATATAAATGGCGTTTGGACGATGATGGATGGGGATGAACAG | 10206 |
| MK778821.1 | GAGAATGGAACATCTCCAAATATAAATGGCGTTTGGACGATGATGGATGGGGATGAACAG | 10337 |
| KT069223.1 | GAGAATGGAACATCTCCAAATATAAATGGCGTTTGGACGATGATGGATGGGGATGAACAA | 10184 |
| MK778813.1 | GAGAATGGAACATCTCCAAATATAAATGGCGTTTGGACGATGATGGATGGGGATGAACAA | 10195 |
| MK778817.1 | GAGAATGGAACATCTCCAAATATAAATGGCGTTTGGACGATGATGGATGGGGATGAACAA | 10110 |
| MF572058.1 | GAGAATGGAACATCTCCAAATATAAATGGCGTTTGGACGATGATGGATGGGGATGAACAA | 10184 |
| MH782228.1 | GAGAATGGAACATCTCCAAATATAAATGGCGTTTGGACGATGATGGATGGGGATGAACAA | 10184 |
| KU511269.1 | GAGAATGGAACATCTCCAAATATAAATGGCGTTTGGACGATGATGGATGGGGATGAACAA | 10215 |
| NC_014742.1 | GAGAATGGAACATCTCCAAATATAAATGGCGTTTGGACGATGATGGATGGGGATGAACAA | 10210 |
| MK778815.1 | GAGAATGGAACATCTCCAAATATAAATGGCGTTTGGACGATGATGGATGGGGATGAACAA | 10208 |
| | ***** | |
| MH388498.1 | GTGACGTACCCCATAAAGCC | 10230 |
| MH388500.1 | GTGACGTACCCCATAAAGCC | 10219 |
| MH388499.1 | GTGACGTACCCCATAAAGCC | 10230 |
| KF386015.1 | GTGACGTACCCCATAAAGCC | 10204 |
| M6656434.1 | GTGACGTACCCCATAAAGCC | 10218 |
| M6656432.1 | GTGACGTACCCCATAAAGCC | 10221 |
| JX489166.1 | GTGACGTACCCCATAAAGCC | 10239 |
| KP115622.1 | GTGACGTACCCCATAAAGCC | 10240 |
| MH782226.1 | GTGACGTACCCCATAAAGCC | 10230 |
| KU877879.1 | GTGACGTACCCCATAAAGCC | 10226 |
| MK778821.1 | GTGACGTACCCCATAAAGCC | 10357 |
| KT069223.1 | GTGACGTACCCCATAAAGCC | 10204 |
| MK778813.1 | GTGACGTACCCCATAAAGCC | 10215 |
| MK778817.1 | GTGACGTACCCCATAAAGCC | 10130 |
| MF572058.1 | GTGACGTACCCCATAAAGCC | 10204 |
| MH782228.1 | GTGACGTACCCCATAAAGCC | 10204 |
| KU511269.1 | GTGACGTACCCCATAAAGCC | 10235 |
| NC_014742.1 | GTGACGTACCCCATAAAGCC | 10230 |
| MK778815.1 | GTGACGTACCCCATAAAGCC | 10228 |
| | ***** | |

그림 19. Sweet potato virus C의 유전체 모식도 및 real time RT-PCR용 프라이머 위치



Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 (NC_034630.1) 2886 bp

| | | | | | | | | | | | |
|-------------|----------------------------|-----------|-----------|-----------|------------|--------|--------|--------|--------|-------|------|
| MK802081.1 | GAGCACATTGAAAGAGAADGTGAAAA | TGGAGGGAA | CCATCC | TGATGATGT | TCAGGAGCAA | 2128 | | | | | |
| MH875686.1 | GAGCACATTGAAAGAGAADGTGAAAA | TGGAGGGAA | CCATCC | TGATGATGT | TCAGGAGCAA | 2128 | | | | | |
| MG680260.1 | GAGCACATTGAAAGAGAADGTGAAAA | TGGAGGGAA | CCATCC | TGATGATGT | TCAGGAGCAA | 2128 | | | | | |
| KY565234.1 | GAGCACATTGAAAGAGAADGTGAAAA | TGGAGGGAA | CCATCC | TGATGATGT | TCAGGAGCAA | 2128 | | | | | |
| KY565233.1 | GAGCACATTGAAAGAGAADGTGAAAA | TGGAGGGAA | CCATCC | TGATGATGT | TCAGGAGCAA | 2128 | | | | | |
| KY565232.1 | GAGCACATTGAAAGAGAADGTGAAAA | TGGAGGGAA | CCATCC | TGATGATGT | TCAGGAGCAA | 2128 | | | | | |
| KY565231.1 | GAGCACATTGAAAGAGAADGTGAAAA | TGGAGGGAA | CCATCC | TGATGATGT | TCAGGAGCAA | 2128 | | | | | |
| NC_034630.1 | GAGCACATTGAAAGAGAADGTGAAAA | TGGAGGGAA | CCATCC | TGATGATGT | TCAGGAGCAA | 2415 | | | | | |
| MG603672.1 | GAGCACATTGAAAGAGAADGTGAAAA | TGGAGGGAA | CCATCC | TGATGATGT | TCAGGAGCAA | 2128 | | | | | |
| MG603671.1 | GAGCACATTGAAAGAGAADGTGAAAA | TGGAGGGAA | CCATCC | TGATGATGT | TCAGGAGCAA | 2128 | | | | | |
| MG603670.1 | GAGCACATTGAAAGAGAADGTGAAAA | TGGAGGGAA | CCATCC | TGATGATGT | TCAGGAGCAA | 2128 | | | | | |
| MG603669.1 | GAGCACATTGAAAGAGAADGTGAAAA | TGGAGGGAA | CCATCC | TGATGATGT | TCAGGAGCAA | 2128 | | | | | |
| KY565236.1 | GAGCACATTGAAAGAGAADGTGAAAA | TGGAGGGAA | CCATCC | TGATGATGT | TCAGGAGCAA | 2128 | | | | | |
| KY565235.1 | GAGCACATTGAAAGAGAADGTGAAAA | TGGAGGGAA | CCATCC | TGATGATGT | TCAGGAGCAA | 2128 | | | | | |
| ***** | | | | | | | | | | | |
| MK802081.1 | CAGCGAGA | AAAGAGA | AGATTAAAA | GGTGTG | AGGAGA | GTGATA | AGCATT | TGC | TGAATG | TATCT | 2188 |
| MH875686.1 | CAGCGAGA | AAAGAGA | AGATTAAAA | GGTGTG | AGGAGA | GTGATA | AGCATT | TGC | TGAATG | TATCT | 2188 |
| MG680260.1 | CAGCGAGA | AAAGAGA | AGATTAAAA | GGTGTG | AGGAGA | GTGATA | AGCATT | TGC | TGAATG | TATCT | 2188 |
| KY565234.1 | CAGCGAGA | AAAGAGA | AGATTAAAA | GGTGTG | AGGAGA | GTGATA | AGCATT | TGC | TGAATG | TATCT | 2188 |
| KY565233.1 | CAGCGAGA | AAAGAGA | AGATTAAAA | GGTGTG | AGGAGA | GTGATA | AGCATT | TGC | TGAATG | TATCT | 2188 |
| KY565232.1 | CAGCGAGA | AAAGAGA | AGATTAAAA | GGTGTG | AGGAGA | GTGATA | AGCATT | TGC | TGAATG | TATCT | 2188 |
| KY565231.1 | CAGCGAGA | AAAGAGA | AGATTAAAA | GGTGTG | AGGAGA | GTGATA | AGCATT | TGC | TGAATG | TATCT | 2188 |
| NC_034630.1 | CAGCGAGA | AAAGAGA | AGATTAAAA | GGTGTG | AGGAGA | GTGATA | AGCATT | TGC | TGAATG | TATCT | 2475 |
| MG603672.1 | CAGCGAGA | AAAGAGA | AGATTAAAA | GGTGTG | AGGAGA | GTGATA | AGCATT | TGC | TGAATG | TATCT | 2188 |
| MG603671.1 | CAGCGAGA | AAAGAGA | AGATTAAAA | GGTGTG | AGGAGA | GTGATA | AGCATT | TGC | TGAATG | TATCT | 2188 |
| MG603670.1 | CAGCGAGA | AAAGAGA | AGATTAAAA | GGTGTG | AGGAGA | GTGATA | AGCATT | TGC | TGAATG | TATCT | 2188 |
| MG603669.1 | CAGCGAGA | AAAGAGA | AGATTAAAA | GGTGTG | AGGAGA | GTGATA | AGCATT | TGC | TGAATG | TATCT | 2188 |
| KY565236.1 | CAGCGAGA | AAAGAGA | AGATTAAAA | GGTGTG | AGGAGA | GTGATA | AGCATT | TGC | TGAATG | TATCT | 2188 |
| KY565235.1 | CAGCGAGA | AAAGAGA | AGATTAAAA | GGTGTG | AGGAGA | GTGATA | AGCATT | TGC | TGAATG | TATCT | 2188 |
| ***** | | | | | | | | | | | |
| MK802081.1 | CAGCTGTG | AGATCACAT | TGAGAG | TAGGTG | AGAAAA | CCATAT | TTT | GAACTG | AAAA | GAAAA | 2248 |
| MH875686.1 | CAGCTGTG | AGATCACAT | TGAGAG | TAGGTG | AGAAAA | CCATAT | TTT | GAACTG | AAAA | GAAAA | 2248 |
| MG680260.1 | CAGCTGTG | AGATCACAT | TGAGAG | TAGGTG | AGAAAA | CCATAT | TTT | GAACTG | AAAA | GAAAA | 2248 |
| KY565234.1 | CAGCTGTG | AGATCACAT | TGAGAG | TAGGTG | AGAAAA | CCATAT | TTT | GAACTG | AAAA | GAAAA | 2248 |
| KY565233.1 | CAGCTGTG | AGATCACAT | TGAGAG | TAGGTG | AGAAAA | CCATAT | TTT | GAACTG | AAAA | GAAAA | 2248 |
| KY565232.1 | CAGCTGTG | AGATCACAT | TGAGAG | TAGGTG | AGAAAA | CCATAT | TTT | GAACTG | AAAA | GAAAA | 2248 |
| KY565231.1 | CAGCTGTG | AGATCACAT | TGAGAG | TAGGTG | AGAAAA | CCATAT | TTT | GAACTG | AAAA | GAAAA | 2248 |
| NC_034630.1 | CAGCTGTG | AGATCACAT | TGAGAG | TAGGTG | AGAAAA | CCATAT | TTT | GAACTG | AAAA | GAAAA | 2435 |
| MG603672.1 | CAGCTGTG | AGATCACAT | TGAGAG | TAGGTG | AGAAAA | CCATAT | TTT | GAACTG | AAAA | GAAAA | 2248 |
| MG603671.1 | CAGCTGTG | AGATCACAT | TGAGAG | TAGGTG | AGAAAA | CCATAT | TTT | GAACTG | AAAA | GAAAA | 2248 |
| MG603670.1 | CAGCTGTG | AGATCACAT | TGAGAG | TAGGTG | AGAAAA | CCATAT | TTT | GAACTG | AAAA | GAAAA | 2248 |
| MG603669.1 | CAGCTGTG | AGATCACAT | TGAGAG | TAGGTG | AGAAAA | CCATAT | TTT | GAACTG | AAAA | GAAAA | 2248 |
| KY565236.1 | CAGCTGTG | AGATCACAT | TGAGAG | TAGGTG | AGAAAA | CCATAT | TTT | GAACTG | AAAA | GAAAA | 2248 |
| KY565235.1 | CAGCTGTG | AGATCACAT | TGAGAG | TAGGTG | AGAAAA | CCATAT | TTT | GAACTG | AAAA | GAAAA | 2248 |
| ***** | | | | | | | | | | | |
| MK802081.1 | CTGATCTT | GCTCTG | GGT | TGA | | | | | | | 2268 |
| MH875686.1 | CTGATCTT | GCTCTG | GGT | TGA | | | | | | | 2268 |
| MG680260.1 | CTGATCTT | GCTCTG | GGT | TGA | | | | | | | 2268 |
| KY565234.1 | CTGATCTT | GCTCTG | GGT | TGA | | | | | | | 2268 |
| KY565233.1 | CTGATCTT | GCTCTG | GGT | TGA | | | | | | | 2268 |
| KY565232.1 | CTGATCTT | GCTCTG | GGT | TGA | | | | | | | 2268 |
| KY565231.1 | CTGATCTT | GCTCTG | GGT | TGA | | | | | | | 2268 |
| NC_034630.1 | CTGATCTT | GCTCTG | GGT | TGA | | | | | | | 2555 |
| MG603672.1 | CTGATCTT | GCTCTG | GGT | TGA | | | | | | | 2268 |
| MG603671.1 | CTGATCTT | GCTCTG | GGT | TGA | | | | | | | 2268 |
| MG603670.1 | CTGATCTT | GCTCTG | GGT | TGA | | | | | | | 2268 |
| MG603669.1 | CTGATCTT | GCTCTG | GGT | TGA | | | | | | | 2268 |
| KY565236.1 | CTGATCTT | GCTCTG | GGT | TGA | | | | | | | 2268 |
| KY565235.1 | CTGATCTT | GCTCTG | GGT | TGA | | | | | | | 2268 |
| ***** | | | | | | | | | | | |

그림 20. Sweetpotato symptomless mastrevirus 1의 유전체 모식도 및 real time RT-PCR용 프라이머 위치



그림 22. 바이러스 프리 딸기 무병묘 개발을 위해 딸기 두 품종을 재배 및 유지하고 있음

- 얻어진 raw data를 Trinity로 조립하여 설향으로부터는 98,002 contig를 얻었으며, 매향으로부터는 133,814 contig를 얻음(표 10)
- 바이러스 감염 여부를 조사하기 위하여 얻어진 전사체 정보들을 BLASTN통해 식물 바이러스데이터 베이스에 분석한 결과 매치되는 바이러스 서열을 얻지 못함(표 11)
- 추후 다시 바이러스 감염 여부를 확인할 계획이지만, 일단 두 품종은 바이러스에 감염되지 않은 것으로 밝혀짐

표 10. 딸기 두 품종으로부터 RNA-seq을 수행한 결과 요약

| 품종 | Total read bases (bp) | Total reads | GC(%) | AT(%) | Q20(%) | Q30(%) |
|-------|-----------------------|-------------|-------|-------|--------|--------|
| 딸기-설향 | 3,868,766,418 | 38,304,618 | 46.99 | 53.01 | 98.59 | 95.57 |
| 딸기-매향 | 4,416,676,470 | 43,729,470 | 45.49 | 54.51 | 98.07 | 94.24 |

표 11. 딸기 두 품종 전사체 조립 결과 요약

| 품종 | Total trinity transcripts | Percent GC | Contig N50 | Median contig length | Average contig | Total assembled bases |
|-------|---------------------------|------------|------------|----------------------|----------------|-----------------------|
| 딸기-설향 | 98002 | 43.5 | 1788 | 842 | 1157.28 | 113415372 |
| 딸기-매향 | 133814 | 42.69 | 1817 | 852 | 1174.34 | 157143430 |

○ 바이러스 프리 마늘 무병묘 개발을 위해, NGS이용 마늘 2품종 바이러스 분석

- 바이러스 프리 마늘 무병묘를 개발하기 위하여 재래종 마늘 가담 품종과 난지형 마늘 홍산 품종을 선택하여 재배 및 증식함(그림 22)
- 2품종 모두 강한 바이러스 병징을 보여주었으며, 2020년의 경우 긴 장마로 인해 마늘 생산량이 많이 감소함



그림 23. 마늘 2품종 재배 및 마늘 바이러스 병 증상

- 2품종 마늘 쪽을 수확하여 total RNA를 추출하였고, RNA-sequencing용 라이브러리를 제작하였음
- NGS수행 결과 가담 품종에서는 36,350,970 read수를 얻었으며, 홍산 품종에서는 38,250,814 read수를 확보하였음(표 12)
- 마늘 전사체를 Trinity 프로그램을 이용해 조립한 결과 가담에서는 162,668개의 contig를 얻었으며, 홍산 품종에서는 118,555개의 contig를 확보함(표 13)

표 12. 마늘 두 품종으로부터 RNA-seq을 수행한 결과 요약

| 품종 | Total read bases (bp) | T o t a l reads | GC(%) | AT(%) | Q20(%) | Q30(%) |
|-------|-----------------------|-----------------|-------|-------|--------|--------|
| 마늘-가담 | 3,671,447,970 | 36,350,970 | 44.6 | 55.4 | 98.55 | 95.41 |
| 마늘-홍산 | 3,863,332,214 | 38,250,814 | 45.67 | 54.33 | 98.48 | 95.59 |

표 13. 마늘 두 품종 전사체 조립 결과 요약

| 품종 | Total trinity transcripts | Percent GC | Contig N50 | Median contig length | Average contig | Total assembled bases |
|-------|---------------------------|------------|------------|----------------------|----------------|-----------------------|
| 마늘-가담 | 162668 | 38.85 | 1225 | 469 | 782.35 | 127263106 |
| 마늘-홍산 | 118555 | 39.84 | 1143 | 527 | 774.38 | 91806681 |

- 각 품종으로부터 조립된 contig들을 BLASTN 방법과 식물바이러스데이터베이스를 사용해 바이러스를 동정하였음
- 가담 품종으로부터는 Garlic virus X, Garlic virus A, Garlic virus C, Garlic latent virus, Shallot virus X, Leek yellow stripe virus, Garlic virus E, Onion yellow dwarf virus, Blackberry virus E, Garlic common latent virus, Garlic virus D 등 총 11개의 바이러스에 감염된 것을 확인함(표 14)

표 14. 마늘 가담 품종으로부터 동정된 마늘 바이러스 리스트

| Accession No. | Name of virus | No. of contigs |
|---------------|----------------------------|----------------|
| NC_001800.1 | Garlic virus X | 3 |
| NC_003375.1 | Garlic virus A | 1 |
| NC_003376.1 | Garlic virus C | 1 |
| NC_003557.1 | Garlic latent virus | 2 |
| NC_003795.1 | Shallot virus X | 6 |
| NC_004011.1 | Leek yellow stripe virus | 7 |
| NC_004012.1 | Garlic virus E | 2 |
| NC_005029.1 | Onion yellow dwarf virus | 3 |
| NC_015706.1 | Blackberry virus E | 2 |
| NC_016440.1 | Garlic common latent virus | 1 |
| NC_022961.1 | Garlic virus D | 8 |

- 홍산 품종으로부터는 Garlic virus A, Garlic virus C, Shallot virus X, Garlic virus E, Potato virus X, Garlic virus D, Garlic virus B 등 총 7종의 바이러스에 감염되어 있는 것을 확인함
- 마늘은 고구마, 딸기에 비교하여 굉장히 다양한 바이러스에 복합감염되어 있다는 것을 확인할 수 있었음(표 15)
- 기존 연구뿐만 아니라 본 연구에서 조사한 대부분의 마늘은 다양한 바이러스에 감염되어 있어 저감염 마늘 확보는 불가능함

표 15. 마늘 홍산 품종으로부터 동정된 마늘 바이러스 리스트

| Accession No. | Name of virus | No. of contigs |
|---------------|-----------------|----------------|
| NC_003375.1 | Garlic virus A | 1 |
| NC_003376.1 | Garlic virus C | 11 |
| NC_003795.1 | Shallot virus X | 11 |
| NC_004012.1 | Garlic virus E | 2 |
| NC_011620.1 | Potato virus X | 8 |
| NC_022961.1 | Garlic virus D | 3 |
| NC_025789.1 | Garlic virus B | 10 |

2차년도 연구개발 목표 및 결과(서울대)

표 16. 2차년도 연구개발 목표 및 결과 요약(서울대)

| 구분 (연도) | 세부과제명 | 세부연구목표 | 연구개발 수행내용 | 연구결과 |
|--------------------|--|---|---|--|
| 2차 년도 (2021) | NGS이용 고 구마, 마늘, 딸기 바이러 스 감염 현 황 조사 | NGS이용 품 종별, 지역별 마늘 바이러 스 분석 | - 주요 마늘 품종 대상 병징 확인 및 샘플 채취(지역별, 품 종별) - Total RNA 추출 및 NGS용 라이브러리 제작 - 생물정보학 분석을 통한 바 이러스 동정 및 유전체 조립 - 품종별 및 지역별 마늘 바 이러스 비교 연구 | 강원도에서 3개 샘플, 전남에서 5개 샘플, 경남 2개 샘플, 충남 1개 샘플, 제주 1개 샘플을 포함하여 총 12개 샘 플 채취 RNA-sequencing을 통해 총 12개 라이브러리로부터 최소 8종에서 많게 는 10종 마늘 감염 바이러스 동정 -NGS이용 신종 마늘 바이러스 Garlic virus J 동정 및 유전체 조립 12개 마늘 샘플로부터 43개 allexivirus 유전체, 26개의 potyvirus 유전체, 18개 carlavirus 유전체를 포함해서 총 87개 마늘 바 이러스 유전체를 조립 및 계통수 분석 |
| | | 마늘 바이러 스 진단 시스 템 개발 | - RT-PCR과 real time RT-PCR 기반 마늘 바이러스 정밀 진단 시스템 개발 | 7종 allexivirus 특이적 진단을 위한 RT-PCR 진단 방법 개발 4종 GarVA, GarVC, GarCLV, OYDV 4종 real time RT-PCR 진단 방법 개발 |
| | | RT-PCR 이 용 6개 품종 바이러스 프 리 캘러스 선 발 | - RT-PCR 이용 각 주요 품 종으로부터 유도된 캘러스를 바이러스 진단 수행 | 6개 품종에 감염되어 있는 바이러스 NGS를 통해 동정 및 유전체 조립 동정된 바이러스 대상 RT-PCR 진단 방법 개발 및 기술 (주)바이오에프디엔 씨에 제공 RT-PCR방법 이용 캘러스 바이러스 감염 여부 확인 |

2차년도 주관연구기관 연구결과(서울대)

○ NGS이용 마늘 지역별 및 품종별 바이러스 분석

- 국내 다양한 지역에서 재배되는 마늘들을 5월부터 7월까지 채취함
- 채취한 마늘은 강원도에서 3개 샘플, 전남에서 5개 샘플, 경남 2개 샘플, 충남 1개 샘플, 제주 1개 샘플을 포함하여 총 12개임(표 17)
- 대부분의 마늘 샘플의 경우 심한 바이러스 병징을 보여주고 있으며, 바이러스 진단을 위해 마늘의 쪽(clove)부분을 액체 질소에 갈아 total RNA를 추출하였다. 이때 마늘 샘플은 pooling하지 않고 한 개의 마늘 구근에 샘플만을 사용하였음

표 17. 마늘 샘플 정보

| 샘플 이름 | 샘플 정보 |
|-------|-------------------|
| KG01 | 마늘 경남 창녕 마늘 |
| KG02 | 마늘 제주 서귀포시 성산읍 |
| KG03 | 마늘 전남 해남 산이면 고흥마늘 |
| KG04 | 마늘 충남 서산 |
| KG05 | 마늘 전남 고흥 풍양면 |
| KG06 | 마늘 전남 해남 해남읍 |
| KG07 | 마늘 전남 목포 고흥마늘 |
| KG08 | 마늘 경남 남해군 서면 |
| KG09 | 마늘 전남 무안군 무안읍 |
| KG10 | 마늘 가담 마늘 강원도 횡성 |
| KG11 | 마늘 홍산 마늘 강원도 횡성 |
| KG12 | 마늘 의성 마늘 강원도 횡성 |

- 추출한 total RNA는 TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Prep Kit (Plant)을 이용해 라이브러리를 제작함
- 제작된 라이브러리는 HiSeq X Ten 시스템을 이용해 paired-end (150bp X 2) RNA-sequencing을 수행함
- Ribosome을 제거한 라이브러리의 경우 식물에 감염된 RNA 바이러스를 동정하고, 유전체를 조립하는데 아주 유리하게 사용될 수 있음
- RNA-sequencing을 통해 총 12개 라이브러리로부터 대략 3G정도의 raw data를 얻었음(표 18)
- 각 샘플마다 조금씩 차이는 있지만 25,113,804 read에서 28,326,160 read수를 얻었음

표 18. 12개 마늘 라이브러리 RNA-sequencing을 통해 확보한 raw data 요약

| Sample ID | Total read bases (bp) | Total reads | GC(%) | AT(%) | Q20(%) | Q30(%) |
|-----------|-----------------------|-------------|-------|-------|--------|--------|
| KG01 | 4,059,389,172 | 26,883,372 | 43.01 | 56.99 | 98.02 | 95.18 |
| KG02 | 4,014,998,192 | 26,589,392 | 42.83 | 57.17 | 97.75 | 94.66 |
| KG03 | 4,277,250,160 | 28,326,160 | 43.61 | 56.39 | 97.92 | 95.04 |
| KG04 | 3,972,356,094 | 26,306,994 | 44.28 | 55.72 | 97.88 | 94.91 |
| KG05 | 3,809,167,676 | 25,226,276 | 42.66 | 57.34 | 97.8 | 94.82 |
| KG06 | 4,010,173,138 | 26,557,438 | 43.06 | 56.94 | 97.94 | 95.06 |
| KG07 | 3,792,184,404 | 25,113,804 | 47.37 | 52.63 | 96.89 | 93.15 |

| | | | | | | |
|------|---------------|------------|-------|-------|-------|-------|
| KG08 | 3,976,146,496 | 26,332,096 | 43.75 | 56.25 | 97.99 | 95.16 |
| KG09 | 3,864,565,348 | 25,593,148 | 42.22 | 57.78 | 97.85 | 94.85 |
| KG10 | 4,274,775,572 | 28,309,772 | 42.46 | 57.54 | 97.9 | 94.95 |
| KG11 | 4,096,745,968 | 27,130,768 | 43.09 | 56.91 | 97.83 | 94.78 |
| KG12 | 3,895,573,500 | 25,798,500 | 42.24 | 57.76 | 97.96 | 95.07 |

- 각 라이브러리별로 얻어진 raw data는 Trinity 프로그램을 이용해 *de novo* 전사체 조립을 수행하였음
- 조립된 전사체는 NCBI의 virus 유전체 데이터베이스에 BLASTN을 수행하여 바이러스 관련 viral contig들을 동정함(표 19)
- 각 마늘별로 굉장히 많은 수의 마늘 감염 바이러스들을 동정하였음
- 대표적인 동정된 마늘 감염 바이러스는 garlic virus A, garlic virus B, garlic virus C, garlic virus D, garlic virus E, garlic virus X, garlic latent virus, garlic common latent virus, leek yellow stripe virus, onion yellow dwarf virus가 동정 되었음

표 19. 12개 마늘 전사체에서 동정된 바이러스 관련 contig수, 동정된 바이러스 별 가장 짧은(Min length) contig의 길이와 가장 긴(Max length) contig길이에 대한 정보

| Library | Acc. No. | Virus Name | No. of Contigs | Min Length (bp) | Max Length (bp) |
|---------|-------------|----------------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| KG01 | NC_001800.1 | Garlic virus X | 15 | 224 | 4602 |
| KG01 | NC_003375.1 | Garlic virus A | 60 | 203 | 11060 |
| KG01 | NC_003557.1 | Garlic latent virus | 24 | 202 | 8375 |
| KG01 | NC_004011.1 | Leek yellow stripe virus | 10 | 288 | 10199 |
| KG01 | NC_004012.1 | Garlic virus E | 12 | 232 | 928 |
| KG01 | NC_005029.1 | Onion yellow dwarf virus | 13 | 329 | 10309 |
| KG01 | NC_016440.1 | Garlic common latent virus | 5 | 303 | 3224 |
| KG01 | NC_022961.1 | Garlic virus D | 22 | 232 | 8450 |
| KG01 | NC_025789.1 | Garlic virus B | 12 | 206 | 8351 |
| KG02 | NC_001800.1 | Garlic virus X | 2 | 214 | 272 |
| KG02 | NC_003375.1 | Garlic virus A | 8 | 237 | 3954 |
| KG02 | NC_003376.1 | Garlic virus C | 1 | | 8405 |
| KG02 | NC_003557.1 | Garlic latent virus | 35 | 202 | 5959 |
| KG02 | NC_004011.1 | Leek yellow stripe virus | 6 | 257 | 10185 |
| KG02 | NC_004012.1 | Garlic virus E | 4 | 228 | 263 |
| KG02 | NC_005029.1 | Onion yellow dwarf virus | 5 | 512 | 8950 |
| KG02 | NC_016440.1 | Garlic common latent virus | 15 | 211 | 6536 |
| KG02 | NC_022961.1 | Garlic virus D | 6 | 273 | 8514 |
| KG02 | NC_025789.1 | Garlic virus B | 3 | 236 | 4637 |
| KG03 | NC_001800.1 | Garlic virus X | 31 | 202 | 4665 |
| KG03 | NC_003375.1 | Garlic virus A | 23 | 204 | 6185 |
| KG03 | NC_003557.1 | Garlic latent virus | 7 | 224 | 8472 |

| | | | | | |
|------|-------------|----------------------------|----|------|-------|
| KG03 | NC_004011.1 | Leek yellow stripe virus | 11 | 381 | 10198 |
| KG03 | NC_004012.1 | Garlic virus E | 10 | 241 | 5883 |
| KG03 | NC_005029.1 | Onion yellow dwarf virus | 15 | 268 | 10522 |
| KG03 | NC_016440.1 | Garlic common latent virus | 3 | 1002 | 8581 |
| KG03 | NC_022961.1 | Garlic virus D | 50 | 207 | 8387 |
| KG03 | NC_025789.1 | Garlic virus B | 5 | 208 | 8278 |
| KG04 | NC_001800.1 | Garlic virus X | 39 | 201 | 3813 |
| KG04 | NC_003375.1 | Garlic virus A | 16 | 224 | 8774 |
| KG04 | NC_003557.1 | Garlic latent virus | 28 | 204 | 8412 |
| KG04 | NC_004011.1 | Leek yellow stripe virus | 12 | 237 | 10194 |
| KG04 | NC_004012.1 | Garlic virus E | 6 | 232 | 2579 |
| KG04 | NC_005029.1 | Onion yellow dwarf virus | 19 | 209 | 10310 |
| KG04 | NC_016440.1 | Garlic common latent virus | 4 | 2339 | 8649 |
| KG04 | NC_022961.1 | Garlic virus D | 49 | 202 | 7618 |
| KG04 | NC_025789.1 | Garlic virus B | 9 | 202 | 8257 |
| KG05 | NC_003375.1 | Garlic virus A | 52 | 201 | 8863 |
| KG05 | NC_003376.1 | Garlic virus C | 1 | | 386 |
| KG05 | NC_003557.1 | Garlic latent virus | 49 | 201 | 8945 |
| KG05 | NC_004011.1 | Leek yellow stripe virus | 12 | 316 | 8134 |
| KG05 | NC_005029.1 | Onion yellow dwarf virus | 9 | 415 | 10682 |
| KG05 | NC_016440.1 | Garlic common latent virus | 1 | | 224 |
| KG05 | NC_022961.1 | Garlic virus D | 2 | 224 | 274 |
| KG05 | NC_025789.1 | Garlic virus B | 7 | 235 | 852 |
| KG06 | NC_001800.1 | Garlic virus X | 8 | 226 | 8320 |
| KG06 | NC_003375.1 | Garlic virus A | 10 | 235 | 6642 |
| KG06 | NC_003376.1 | Garlic virus C | 4 | 230 | 361 |
| KG06 | NC_003557.1 | Garlic latent virus | 46 | 203 | 4797 |
| KG06 | NC_004011.1 | Leek yellow stripe virus | 11 | 270 | 7078 |
| KG06 | NC_004012.1 | Garlic virus E | 8 | 267 | 8246 |
| KG06 | NC_005029.1 | Onion yellow dwarf virus | 5 | 294 | 10299 |
| KG06 | NC_016440.1 | Garlic common latent virus | 52 | 201 | 8613 |
| KG06 | NC_022961.1 | Garlic virus D | 57 | 205 | 4646 |
| KG06 | NC_025789.1 | Garlic virus B | 7 | 222 | 8304 |
| KG07 | NC_001800.1 | Garlic virus X | 5 | 218 | 315 |
| KG07 | NC_003375.1 | Garlic virus A | 5 | 258 | 8695 |
| KG07 | NC_003376.1 | Garlic virus C | 1 | | 259 |
| KG07 | NC_003557.1 | Garlic latent virus | 9 | 201 | 8433 |
| KG07 | NC_004011.1 | Leek yellow stripe virus | 6 | 471 | 9893 |
| KG07 | NC_005029.1 | Onion yellow dwarf virus | 15 | 386 | 7090 |
| KG07 | NC_016440.1 | Garlic common latent virus | 3 | 251 | 8753 |
| KG07 | NC_022961.1 | Garlic virus D | 4 | 213 | 336 |
| KG07 | NC_025789.1 | Garlic virus B | 2 | 301 | 371 |

| | | | | | |
|------|-------------|----------------------------|----|------|-------|
| KG08 | NC_001800.1 | Garlic virus X | 4 | 317 | 8466 |
| KG08 | NC_003375.1 | Garlic virus A | 7 | 206 | 8792 |
| KG08 | NC_003376.1 | Garlic virus C | 2 | 322 | 8499 |
| KG08 | NC_003557.1 | Garlic latent virus | 6 | 208 | 3854 |
| KG08 | NC_004011.1 | Leek yellow stripe virus | 12 | 203 | 10219 |
| KG08 | NC_005029.1 | Onion yellow dwarf virus | 5 | 220 | 10570 |
| KG08 | NC_016440.1 | Garlic common latent virus | 11 | 215 | 372 |
| KG08 | NC_022961.1 | Garlic virus D | 23 | 249 | 8565 |
| KG08 | NC_025789.1 | Garlic virus B | 4 | 351 | 8284 |
| KG09 | NC_001800.1 | Garlic virus X | 6 | 249 | 8120 |
| KG09 | NC_003375.1 | Garlic virus A | 8 | 549 | 8849 |
| KG09 | NC_003376.1 | Garlic virus C | 5 | 312 | 4642 |
| KG09 | NC_003557.1 | Garlic latent virus | 27 | 226 | 5404 |
| KG09 | NC_004011.1 | Leek yellow stripe virus | 21 | 223 | 10212 |
| KG09 | NC_004012.1 | Garlic virus E | 7 | 225 | 460 |
| KG09 | NC_005029.1 | Onion yellow dwarf virus | 14 | 216 | 10437 |
| KG09 | NC_016440.1 | Garlic common latent virus | 17 | 220 | 8621 |
| KG09 | NC_022961.1 | Garlic virus D | 26 | 296 | 8514 |
| KG09 | NC_025789.1 | Garlic virus B | 9 | 228 | 8505 |
| KG10 | NC_001800.1 | Garlic virus X | 6 | 201 | 8397 |
| KG10 | NC_003375.1 | Garlic virus A | 17 | 265 | 8609 |
| KG10 | NC_003376.1 | Garlic virus C | 18 | 213 | 5890 |
| KG10 | NC_003557.1 | Garlic latent virus | 12 | 246 | 8541 |
| KG10 | NC_004011.1 | Leek yellow stripe virus | 4 | 258 | 10311 |
| KG10 | NC_005029.1 | Onion yellow dwarf virus | 5 | 336 | 10331 |
| KG10 | NC_016440.1 | Garlic common latent virus | 54 | 228 | 9601 |
| KG10 | NC_022961.1 | Garlic virus D | 22 | 275 | 8501 |
| KG10 | NC_025789.1 | Garlic virus B | 4 | 263 | 8424 |
| KG11 | NC_001800.1 | Garlic virus X | 2 | 584 | 7465 |
| KG11 | NC_003375.1 | Garlic virus A | 15 | 221 | 1807 |
| KG11 | NC_003376.1 | Garlic virus C | 22 | 209 | 8381 |
| KG11 | NC_003557.1 | Garlic latent virus | 5 | 1532 | 8351 |
| KG11 | NC_004011.1 | Leek yellow stripe virus | 6 | 229 | 411 |
| KG11 | NC_004012.1 | Garlic virus E | 1 | | 222 |
| KG11 | NC_005029.1 | Onion yellow dwarf virus | 5 | 231 | 653 |
| KG11 | NC_016440.1 | Garlic common latent virus | 6 | 243 | 8001 |
| KG11 | NC_022961.1 | Garlic virus D | 27 | 204 | 8494 |
| KG11 | NC_025789.1 | Garlic virus B | 15 | 258 | 8388 |
| KG12 | NC_001800.1 | Garlic virus X | 14 | 232 | 8126 |
| KG12 | NC_003375.1 | Garlic virus A | 9 | 2580 | 4361 |
| KG12 | NC_003376.1 | Garlic virus C | 32 | 257 | 8472 |
| KG12 | NC_003557.1 | Garlic latent virus | 6 | 327 | 8365 |
| KG12 | NC_004011.1 | Leek yellow stripe virus | 4 | 1364 | 10197 |

| | | | | | |
|------|-------------|----------------------------|----|------|------|
| KG12 | NC_004012.1 | Garlic virus E | 4 | 1380 | 5286 |
| KG12 | NC_005029.1 | Onion yellow dwarf virus | 7 | 294 | 1391 |
| KG12 | NC_016440.1 | Garlic common latent virus | 38 | 206 | 9046 |
| KG12 | NC_022961.1 | Garlic virus D | 26 | 205 | 8603 |
| KG12 | NC_025789.1 | Garlic virus B | 7 | 270 | 8329 |



그림 24. 각 마늘 샘플별 감염된 바이러스 수

- 각 마늘 샘플별로 동정된 바이러스는 최소 8종(KG5)에서 많게는 10종임(그림 23)
- 각 마늘 라이브러리별 바이러스가 차지하는 비율(viral read/total read)을 계산한 결과 적게는 1%(KG11)에서 많게는 32%(KG06)을 차지하였음(그림 24)
- 일반적으로 바이러스에 감염된 다른 식물에 비해 마늘의 경우 바이러스 복제량이 굉장히 높은 것으로 밝혀짐
- 각 라이브러리별 바이러스 비율을 확인하기 위해 동정된 바이러스들의 참고 유전체에 raw data를 BWA를 이용해 mapping한 후 read수와 TPM(Transcripts Per Million)값을 express 프로그램을 이용해 계산함(그림 25)
- 각 라이브러리별로 우점 바이러스가 매우 다르게 나타났다. 예를 들면 KG01샘플의 경우 GarVA가 우점 바이러스로 나타났으며, 그 뒤로 GarVB가 많은 것으로 나타났다(그림 25)
- KG02의 경우 GarCLV가 우점 바이러스로 나타났으며, GarVD와 GarVB가 주요 바이러스로 밝혀짐
- 이와 같이 어떤 특정 바이러스가 우점으로 나타나기 보다는 다양한 바이러스들이 마늘 샘플에 따라 다양한 복제능력을 가지고 감염되어 있는 것으로 확인됨

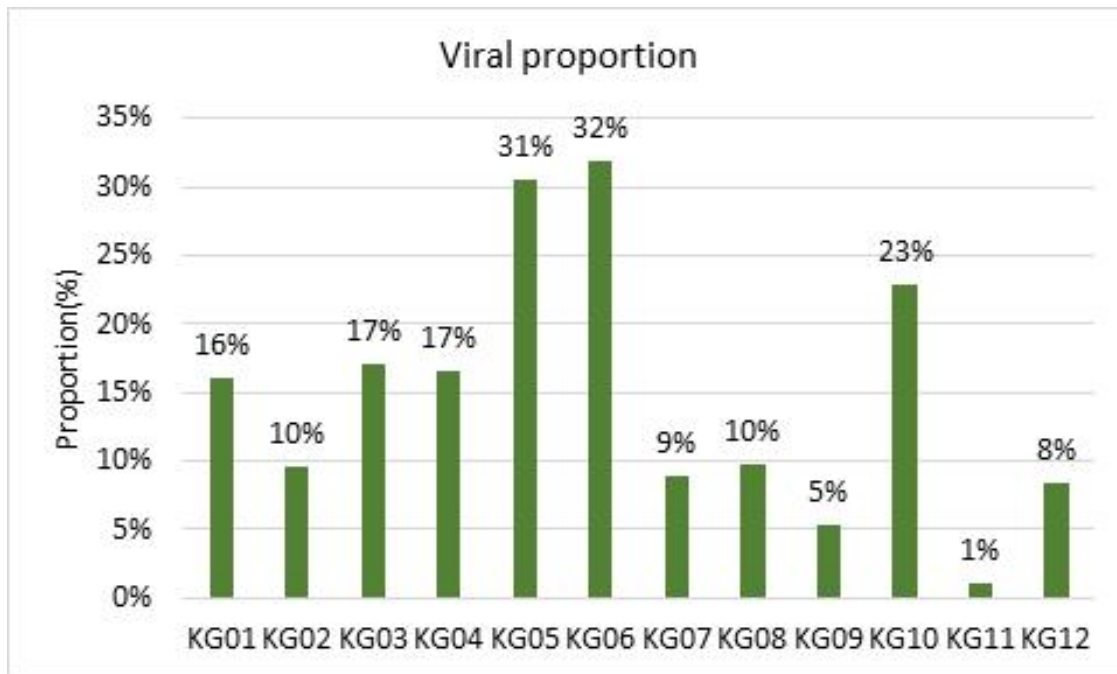


그림 25. 각 마늘 라이브러리 별 바이러스가 차지하는 비율

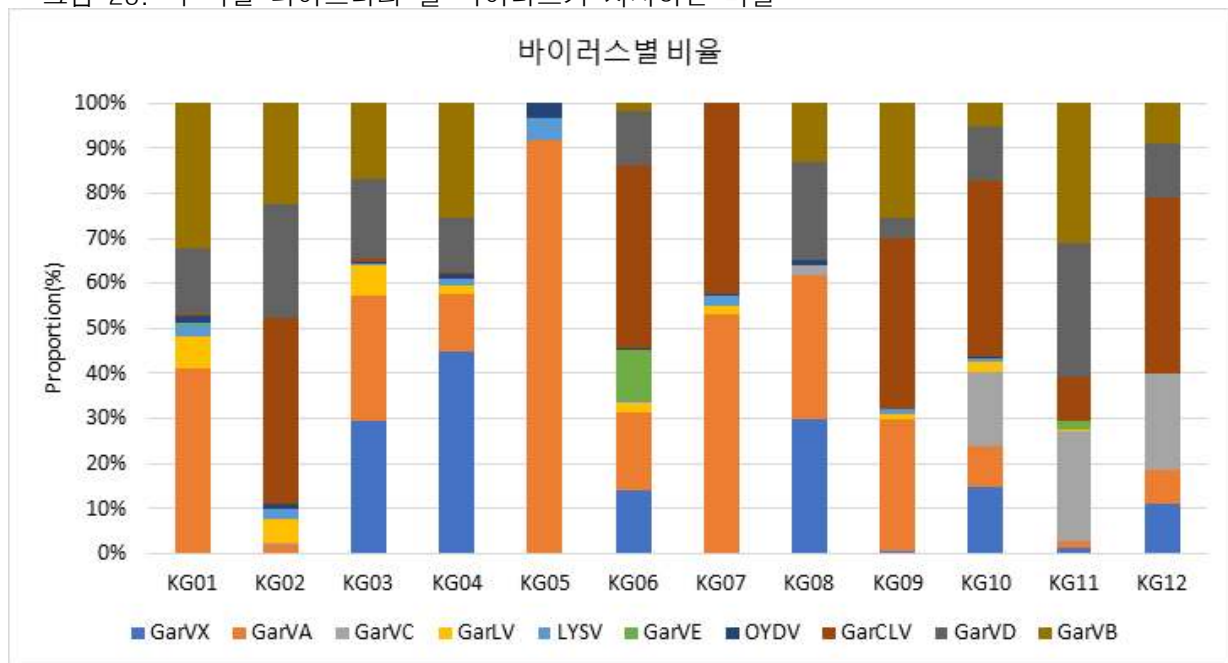


그림 26. TPM값을 이용하여 각 라이브러리별 동정된 바이러스 종 비율

- 마늘 감염 바이러스의 경우 총 10개의 바이러스 종이 동정되었으며, 10개의 바이러스 종은 3개의 속(genus)으로 나눌 수 있음
- GarVA, GarVB, GarVC, GarVD, GarVE, GarVX는 모두 allexivirus 속에 포함되며, GarLV와 GarCLV는 carlavirus 속의 바이러스이며, LYSV와 OYDV의 경우 potyvirus속의 바이러스임
- 바이러스 속에 따라 바이러스의 비율을 살펴본 결과 대부분의 라이브러리에서 allexivirus가 우점 바이러스로 밝혀졌으며, 그 뒤로 carlavirus가 차지하는 비율이 높았음(그림 26)
- Potyvirus의 경우 대부분의 마늘 샘플에 감염되어 있지만 복제량이 많지는 않았음

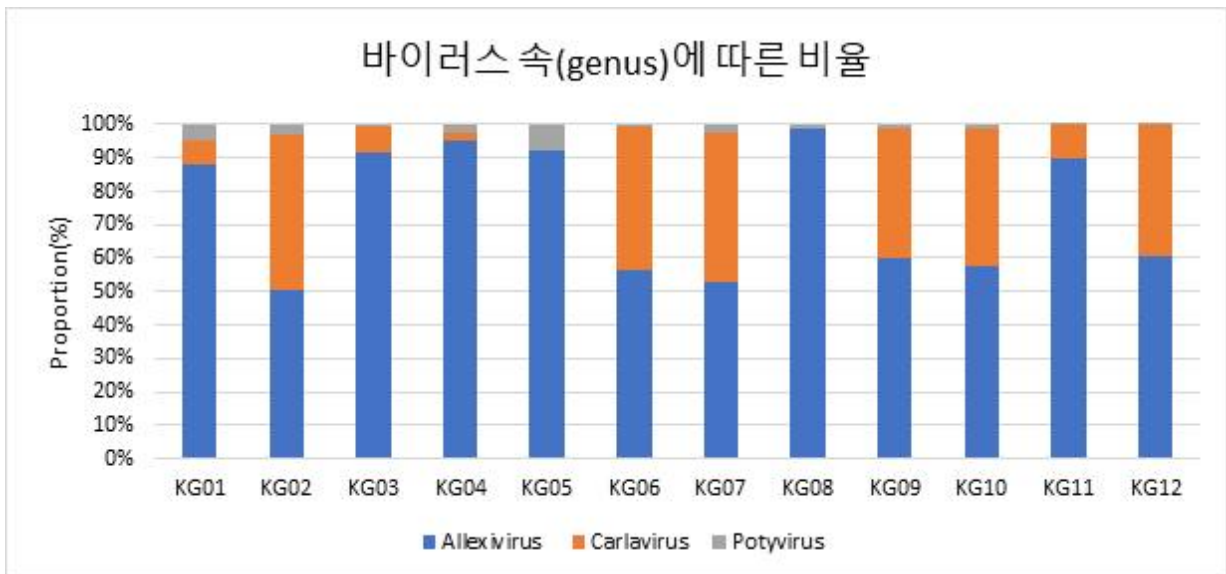


그림 27. TPM값을 이용하여 각 라이브러리별 동정된 바이러스 속(genus) 비율

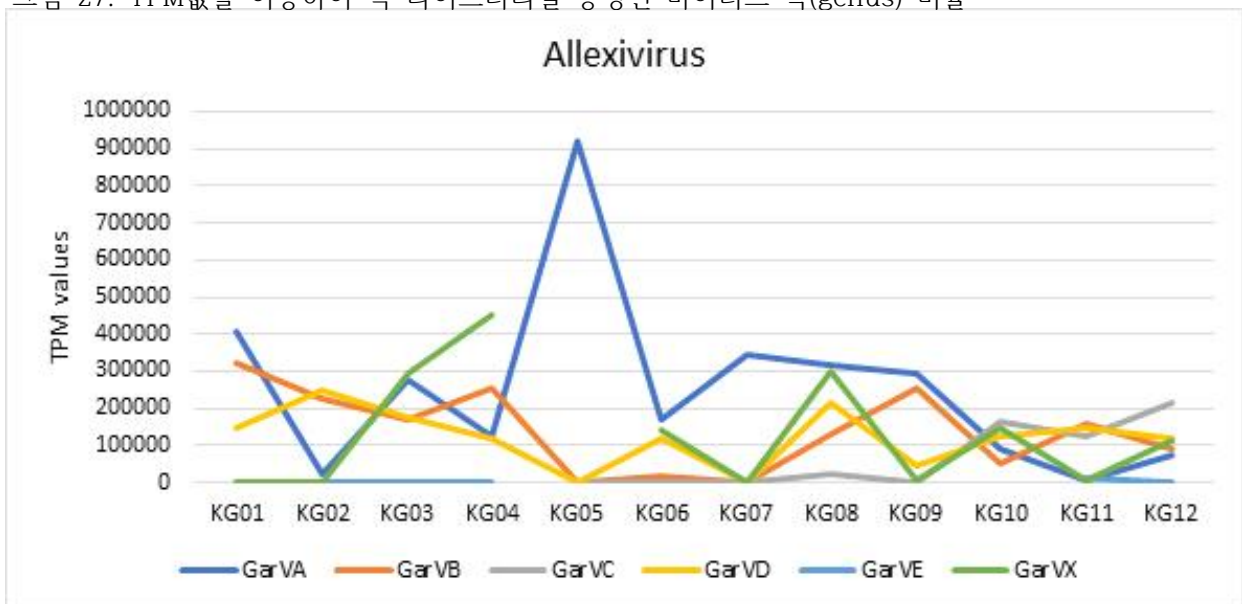


그림 28. Allexivirus속의 6종 바이러스의 각 마늘 샘플별 복제량 변화

- 각 샘플별로 Allexivirus들의 복제량을 비교해본 결과 각 샘플마다 우점으로 차지하는 바이러스가 있었으며, 그중에서도 GarVA가 우점인 경우가 가장 많았음(그림 27)

- 특히 KG05과 KG07 샘플들의 경우 다른 샘플과 특이하게 GarVA의 복제량이 거의 대부분을 차지하였음

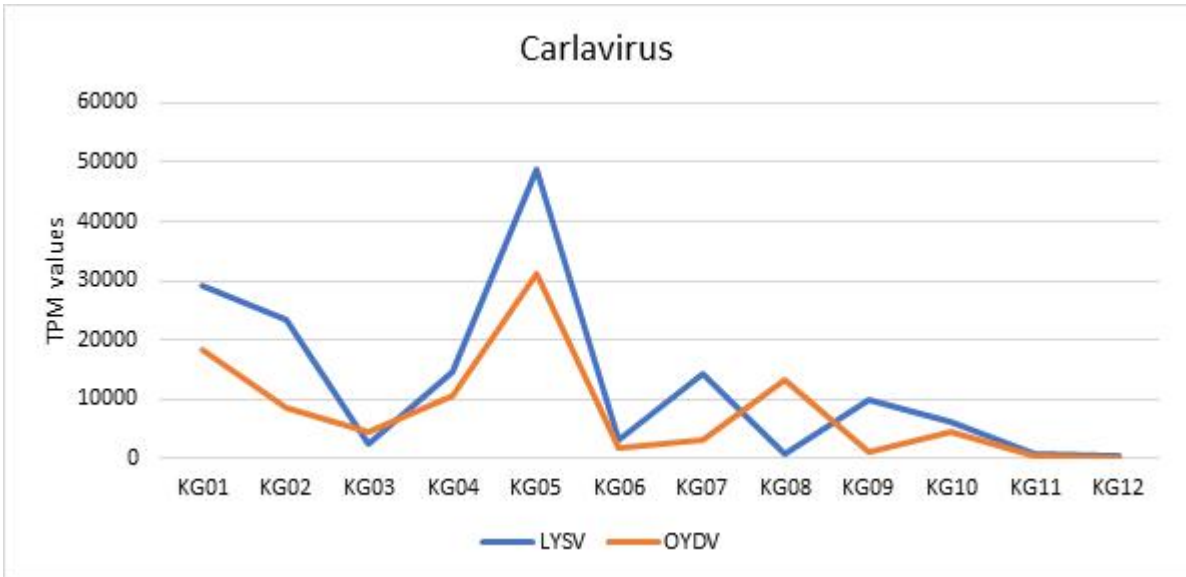


그림 29. Carlavirus속의 2종 바이러스의 각 마늘 샘플별 복제량 변화

- Carlavirus속의 LYSV, OYDV 바이러스의 경우 복제량의 변화가 각 마늘마다 비슷한 것으로 나타났음(그림 28)
- KG03, KG08 샘플들을 제외하고 대부분의 샘플에서 LYSV의 복제량이 OYDV보다 훨씬 많은 것으로 나타남(그림 28)

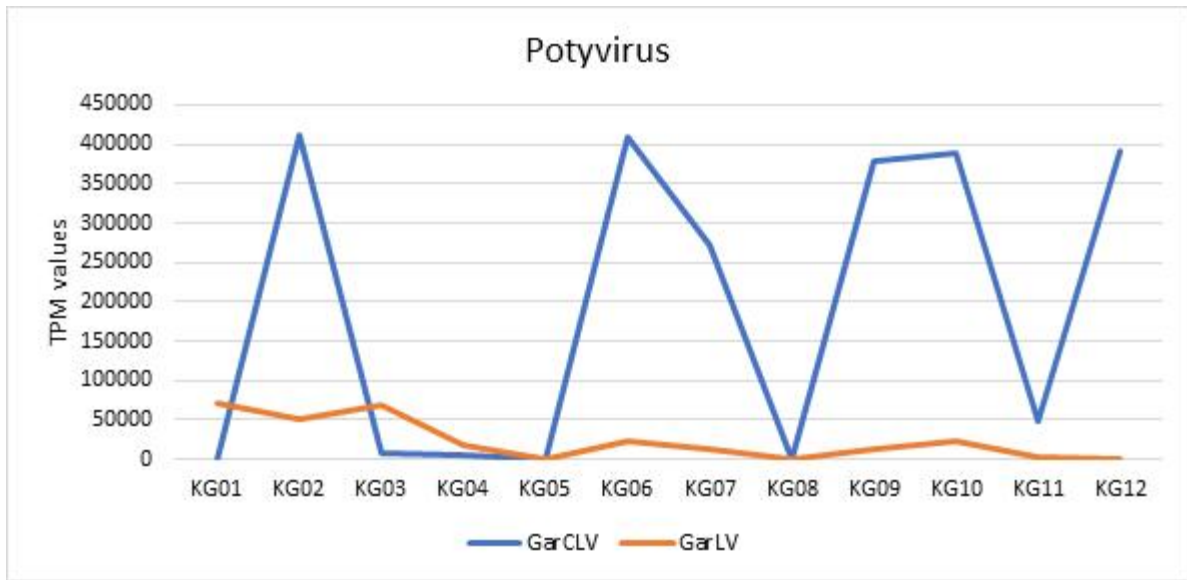


그림 30. Potyvirus속의 2종 바이러스의 각 마늘 샘플별 복제량 변화

- Potyvirus속의 GarCLV와 GarLV 바이러스의 복제량의 경우 각 샘플마다 GarLV의 경우 거의 일정하게 유지되었음(그림 29)
- GarCLV의 경우 KG02, KG06, KG09, KG10, KG12의 마늘 샘플에서 복제량이 매우 높게 나타난 것을 확인할 수 있었음(그림 29)

○ NGS이용 신종 마늘 바이러스 Garlic virus J 동정 및 유전체 조립

- RNA-sequencing을 통해 얻어진 raw data는 Trinity 프로그램 (<https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq/wiki>)을 이용해 *de novo* assembly 수행하였음
- 조립된 contig들은 NCBI's Viral genome database에 BLASTX (Evalue 1e-5 as a cutoff)를 수행하여 감염된 바이러스들을 동정하였음
- 1차년도와 2차년도 RNA-sequencing을 통해 홍산 마늘 품종에 감염되어 있는 신종 바이러스 Garlic virus J(GarVJ)를 동정하였음
- “가담” 품종에서 동정된 바이러스는 GarVA, GarVC, GarVD, GarVE, GarVX, GarLV, LYSV, OYDV, GCLV를 포함하여 9종이었으며, “홍산” 품종에서 동정된 바이러스는 GarVA, GarVB, GarVC, GarVD, GarVE, 신종 Garlic virus J(GarVJ)를 포함하여 총 6종이었음
- GarVJ를 제외하고 동정된 모든 바이러스는 이미 마늘에 자주 감염되는 바이러스로 알려져 있다.
- 2개의 홍산 마늘 전사체로부터 Gar-Hong TRINITY_DN4_c2_g1_i1와 Gar-Hong-ribdel TRINITY_DN20_c0_g1_i1의 contige들은 NCBI's nucleotide 데이터베이스에 BLASTN를 수행한 결과 기존에 알려진 allexivirus들과 유사성을 보여주었음

SuperScrip™IV One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, #12594025)

GarHong-DN4-1F1 GAACCACACCAAACCTGCACTAAACC
 GarHong-DN4-8945R1 GGTGTCTTTGTCCATGTCCAGAG

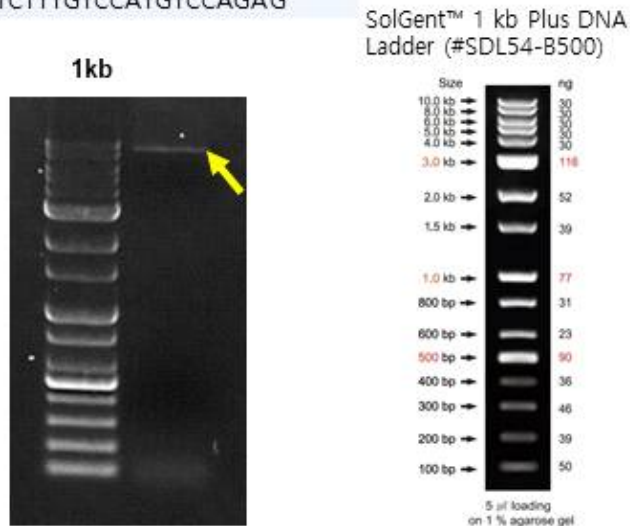


그림 31. 신종 마늘 바이러스 Garlic virus J 유전체를 RT-PCR로 증폭함

- TRINITY_DN4_c2_g1_i1 contig가 가장 높은 유사성을 보여준 시퀀스는 Garlic virus E isolate YH (GenBank AJ292230.1)로 coverage (14%)와 nucleotide identity (75.76%)가 매우 낮았음
- 새롭게 동정된 신종 바이러스의 이름을 Garlic virus J(GarVJ)라고 명명하였음
- RNA-sequencing을 통해 얻어진 GarVJ의 정확한 nucleotide sequence를 확인하기 위하여, 조립된 contig(TRINITY_DN4_c2_g1_i1)의 정보를 바탕으로 전체 바이러스 유전체를 증폭시킬 수 있는 프라이머(GarHong-DN4-1F1: GAACCACACCAAACCTGCACTAAACC, GarHong-DN4-8945R1: GGTGTCTTTGTCCATGTCCAGAG)를 새롭게 디자인하였음(그림 30)
- 새롭게 디자인한 프라이머와 SuperScrip™IVOne-Step RT-PCR System with Platinum TaqDNA Polymerase (Invitrogen, Waltham, MA, USA)를 이용해 신종 바이러스의 전체 유전

체(complete genome)를 증폭하였음(그림 30)

- 대략 9kb 길이를 가진 amplicon을 증폭하였고, 증폭된 amplicon은 TOPO™ XL-2 Complete PCR Cloning Kit (invitrogen)을 이용해 클론 한 후 RT-PCR용 프라이머를 포함하여 총 15개의 프라이머를 이용해 Sanger-sequencing을 통해 GarVJ의 전체 염기서열을 분석하였음
- 분석 결과 8,945nucleotides(nt)길이를 가진 GarVJ 전체 염기서열을 얻었으며, 확보된 신종 마늘 바이러스의 유전체를 다시 sanger-sequencing을 통해 유전체를 결정하였음(그림 30)
- 신종 Garlic virus J (GarVJ)는 allexivirus에 속하며, 6개의 ORFs를 encoding함(그림 31)



그림 32. 신종 마늘 바이러스 Garlic virus J 유전체 조직 모식도

표 20. 신종 마늘 바이러스 Garlic virus J의 6개 ORF 정보 및 단백질 서열

| |
|---|
| <pre> >replicase_86-5302 MTTVQKLLDQISDPNARAAYSQDCLSAAKQAATRASAIAPIYAVNQTEAITLERIGITTNPFATTSH HAADKIIENDCLDIIGRYLPKDPVTLIQLKRAKLHLLRRSRHGDIFQNYCHEPKDVLRFGLTNPVHCP KVDTTCAVISDTLHFMSTQQVWTLFLLNNPKLERLYGTLVLPALQKLPPLFPEVYKLEYDYDKHFA YLPGGHGGGAYVHSYGTWKWLSTAKIGPGPYSLRPNYRGQRPMFDYLSVEKIETKAAHHIMLIQR RRPELPWPLPPVWVFHASDYVKLPEIFYPKEANVQRAYPHTFIKRLQLYCFSVKAVSLRDIFAKIRQ VLPTEELARFSTADLIRLANYLLFITSMQQTSDYQSPLMESMLGKISLSIRARLREFFQDLVGKSSY AALLTVTDVKPIYFTTNPQCRPICGEAWFDEDEENQRDDPRPFTGLPTPSPDDLLEAEFEHRS RTNQSNRYDSGNSTSREETMADPSQDNLDQPGRGNTPSRDMEEFGADSHPLKNQESTAGEVKDG HLTDWSDSDSIASELSDCPLVHRNHKGGASDPEIPSNTIVMAKLGAVLEEIKSFVNGNIYTDRLHN RRVVFYSEYSESYNYNGGSHMAKKWEPTLFKLREHLELGPEFDHALIQKYDTYGRIGFHSDDDC YNEGGVVVTINLNGEADFLKQIGAVERYHLGDGDVLTMTAGLQQTHQHSVTKCTNGRVSITLR NATKAYSTKAKEPESVKEQEQQDIDDTLFEPEDEHEAMGDMNDIDITDVDINEEDIPNEEVASVEEAD DIEPEQDAENPDEQSNNPKIELQPLDEETVDILKIHGFSNLKPQHDGEFQIQPVFFNRQTDTLPRM TEFINNTGNEFSKMGQNLRRRCYHYKIDSKRATAFMSDVKNNLTGLVLPKLDRLDLSWVALAEH VNRKVGLLLVHGGAGGKSRALQELMRSGRVDINDVNIITPTINLAADWKKKLPKSIDPRRVMTFEK ACEREGKPVVIMDDYGKLPAGYVDAYLAIKSNVELLVLTGDQRQSVFHNDKRDSQIALLSPNIAWF KKYCDYYINATHRQPRRLANPIKVHAQRDHGGNIQHATLIPTNAMTLVPAFRSQTLLTDLGRQAMT YAGCQGLTLPHTIVLDKDTPLCSDEVIYALSRASETITFVNTHSNNKEFLAKLDSTPYLKTLSIG VYEDEHAGADQPPPKVVVRDGPVKTHLPVANDKIQLDQVETMEDKDTRELWSGEEKTNLMQTD DQVVQLFPHQQAQKDEALFKITINERIRLATPETNRKALRDTLNVGDLLFEAYAGFMNVPKEAQPF KNLWIHCRQLALRQYLSKPTTNLQQGSQRQDPDFPENAIALFNKSQWVKKLEKVGCKFKAGQTISA FKQSTVLLTTTALYLRKKRESHQPGNVFIMCEKTPEQFNDVFNKWFTRPNYTSDYTQYDQS QDAAFLNFELRKARHFGIPEEVVEFYFIFKTHAKTFLGNLAVMRLSGEGPTFDANTECNVAYDALR FQVDSTVRACYAGDDLVRDKACEERPGWKYAEPLFSLKAKPLVTNKPDFCGWRLTKYGIVKSPTQ LYQSLQALRLGKIEEVKRSYRIDYLFAYRMGDRLYEIFNEEELEKHQLVTRTLLKKGMPSSGDH LPVFHVTSDRILIRDPTAIKLSSESRIITNFEMLDYFQSTSRQSRQRTDMNEARERQTADNGASTT VNNSRQLPTLRDLAPTLNELMTI >TGB1_5415-6125 MKTQLLLQLLDNSGFRRTTEPLTTPLVHGVPGCGKSTLIKSLLTYSSCVAFTLGAPYGRSLAHRGV QHFDShLVEGSKAETRILDEYQLGSTEECAHFNVLVGDPPFQKQLQTAHYIKNLSHRVPRPVCEYL </pre> |
|---|

```

RSLDYDIIGEREGSLNFLPVFAKETSGPTGVILHLGAISRDLTRTYNVCSQAPSAVSGLEFTELTLVY
HSSEFLANRELFYIAATRANHTLNIITDSVNLTRT
>TGB2_6143-6454
MSFTPPPDYTRIYTTLAAGAALGAIYTLRSNHLPTVGDNTHSLPHGGRYCDGNKQILYNGPNTGS
AHSTTFWPFICALTFIIHCLSCRRSRVCVRCRESH
>TGB3_6565-7692
MEIVTTTHIYDARDYTVRRISEARDVVVSRVNNTYRDLKSLSDSIATNLSRIIEAKENVDTKLNTIS
NALQQISRKVSALIESHNVLQTREVDTLTPNSRVFFSNINAALDATRDILSYVPPNRYNVPQTTLPL
EELFGQLHALHQNLLEWLTHISKDVDHILSRTTTSTSTPGIPSDLMKVIDNIQISVDDVKSLQATTQ
EMLTAHNADGTERLNAIENHLGNLQSMNLGLLTKPSPTISDNLTPTTSDGTPSNKPVVDEDEPLRS
QIEPYQAKHPTKRCRTYGNIIYNGVNSHIPMDLLGRPVSTALKLYIDPVSTNSGTTVNYKLFDDNSL
LLAETVQTPHIMTQPLSDSLALLHSHKCEFLYKIKGYGLC
>coat protein_7713-8489
MNQDELAAAASDETLGGWRDPSPGLGSSSRPNVSAAGQVTPTGKNPRQPAMSSNASTQDELM
PDEKEVEAIAEDVVSNSVAPKSIIREILDTLKRQPAATAKDLFSLAWACYHNGSSKFVTLSTDAPC
GIAHAELKDLVEDFCTLRQFCGYAKTCYVTGRQKKPPANWARKGFPDEAKFAAFDFFNVLSD
SSPNPPAGMRFKPTQPEILSHSMNAKMSILESRKSSNMISNRADLLAQQIHEPPKPLMLTF
>nucleic acid binding protein_8503-8889
MHPYDKTFICCLHLSKPSLPVDIRRLIYELALGNRKLGRRLGQNKPFQGISKCAARRRAKRYNRCFD
CGAYLYDTHVCKVFSGRASSDCLSVIRQGPALYAEGTLRHNSDAEQLVLHDLELINLYDK

```

- 확보된 GarVJ의 전체 염기서열을 바탕으로 open reading frame(ORF)를 NCBI's ORFfinder 프로그램을 이용해 분석하였음
- 분석 결과 GarVJ는 총 6개의 ORFs를 가지고 있으며, 각 ORF가 coding하는 단백질 서열들을 NCBI non-redundant 데이터베이스에 BLASTP를 수행하였다(표 20)

표 21. GarVJ의 6개 ORF 단백질 서열의 BLASTP 결과. GarVJ 6개 ORF 단백질 서열을 NCBI's non-redundant protein 데이터베이스에 BLASTP를 수행 결과

| Name of protein | Size (AA) | Matched protein and organism | Accession No. | Coverage | Identity |
|-----------------|-----------|-------------------------------|---------------|----------|----------|
| Replicase | 1738 | Replicase [Shallot virus X] | QCY49525.1 | 98% | 62% |
| TGB1 | 236 | TGB1 [Garlic virus C] | AEV51811.1 | 99% | 64% |
| TGB2 | 103 | TGB2 [Garlic virus C] | QED43307.1 | 100% | 69% |
| TGB3 | 375 | TGB3 [Garlic virus D] | QED44640.1 | 100% | 40% |
| Coat protein | 258 | Coat protein [Garlic virus C] | QHI06001.1 | 92% | 71% |
| NAPB | 128 | NAPB [Garlic virus C] | AEV51815.1 | 99% | 68% |

- 수행결과 ORF1은 Shallot virus X의 replicase단백질과 coverage 98%, identity 62%를 보여주었고, ORF2는 Garlic virus C(GarVC)의 triple gene block(TGB)1 단백질과 coverage 99%, identity 64%를 보여주었음(표 21)

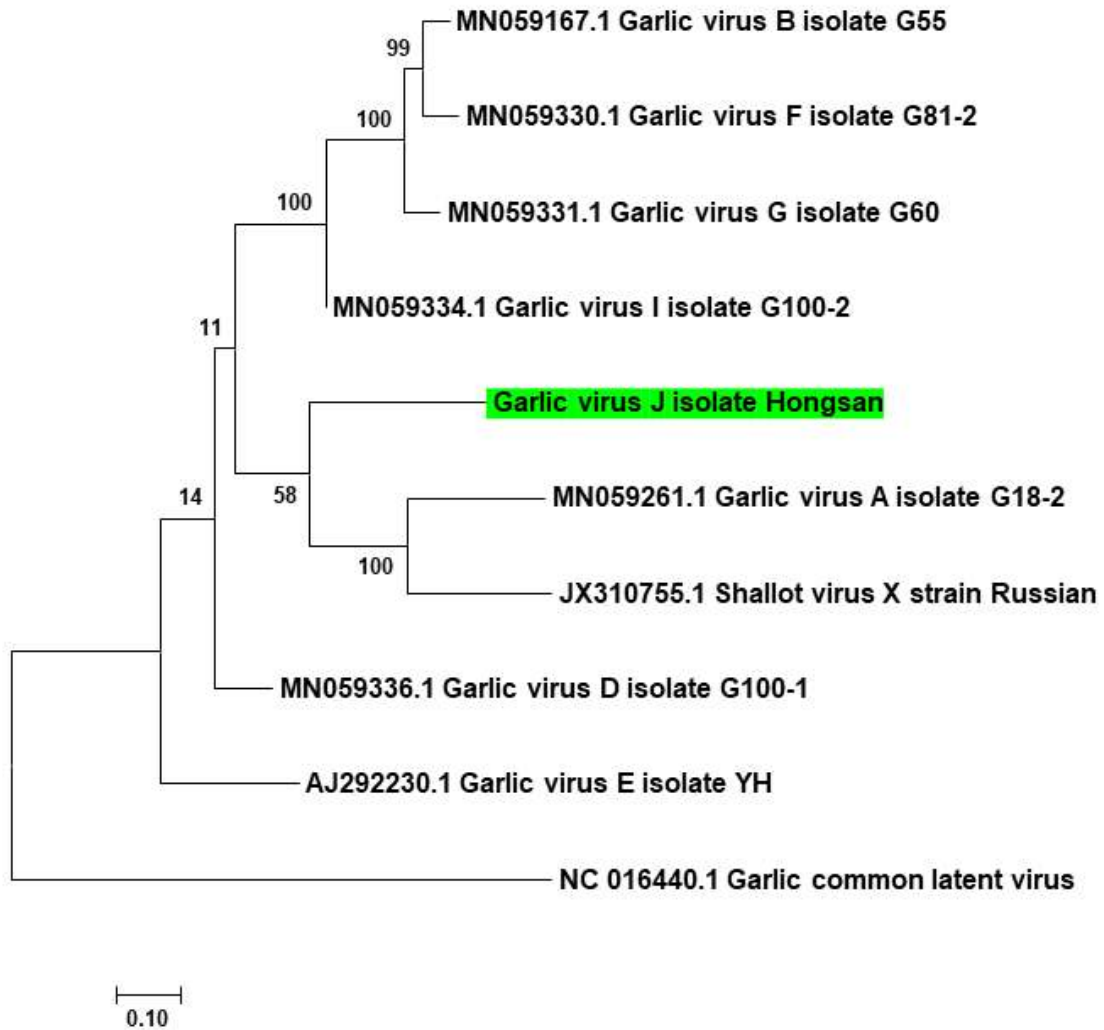


그림 33. 마늘 신종 바이러스 Garlic virus J 와 다른 allxivirus와의 계통학적 관계

- ORF3은 GarVC의 TGB2 단백질과 100% coverage, identity 69%를 보여주었고, ORF4는 GarVC의 TGB3 단백질과 100% coverage, identity 40% 를 보여주었음(표 21)
- ORF5는 GarVC의 coat protein(CP) 단백질과 coverage 92%, identity 71%를 보여주었고, ORF6은 GarVC의 nucleic acid binding protein(NABP)단백질과 coverage 99%, identity 68%를 보여주었다(표 21)
- 국제 바이러스 분류 위원회(International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)에 의하면 Allxivirus 종(species)의 경계 기준은 coat protein 또는 replicase 유전자의 nucleotide identity가 72% 미만 또는 단백질 identity가 80% 미만이어야 한다. GarVJ의 경우 coat protein은 단백질 identity가 71%이었으며, replicase 단백질 identity는 62%로 ICTV가 정해준 기준에 해당하는 새로운 신종 바이러스로 밝혀졌다. Allxivirus에 속하는 다른 바이러스 유전체 서열과 계통수 분석을 수행한 결과 GarVJ는 GarVA 및 ShVX와 같은 그룹에는 속하지만 계통학적으로 거리가 먼 새로운 바이러스 종으로 밝혀졌음(그림 32)

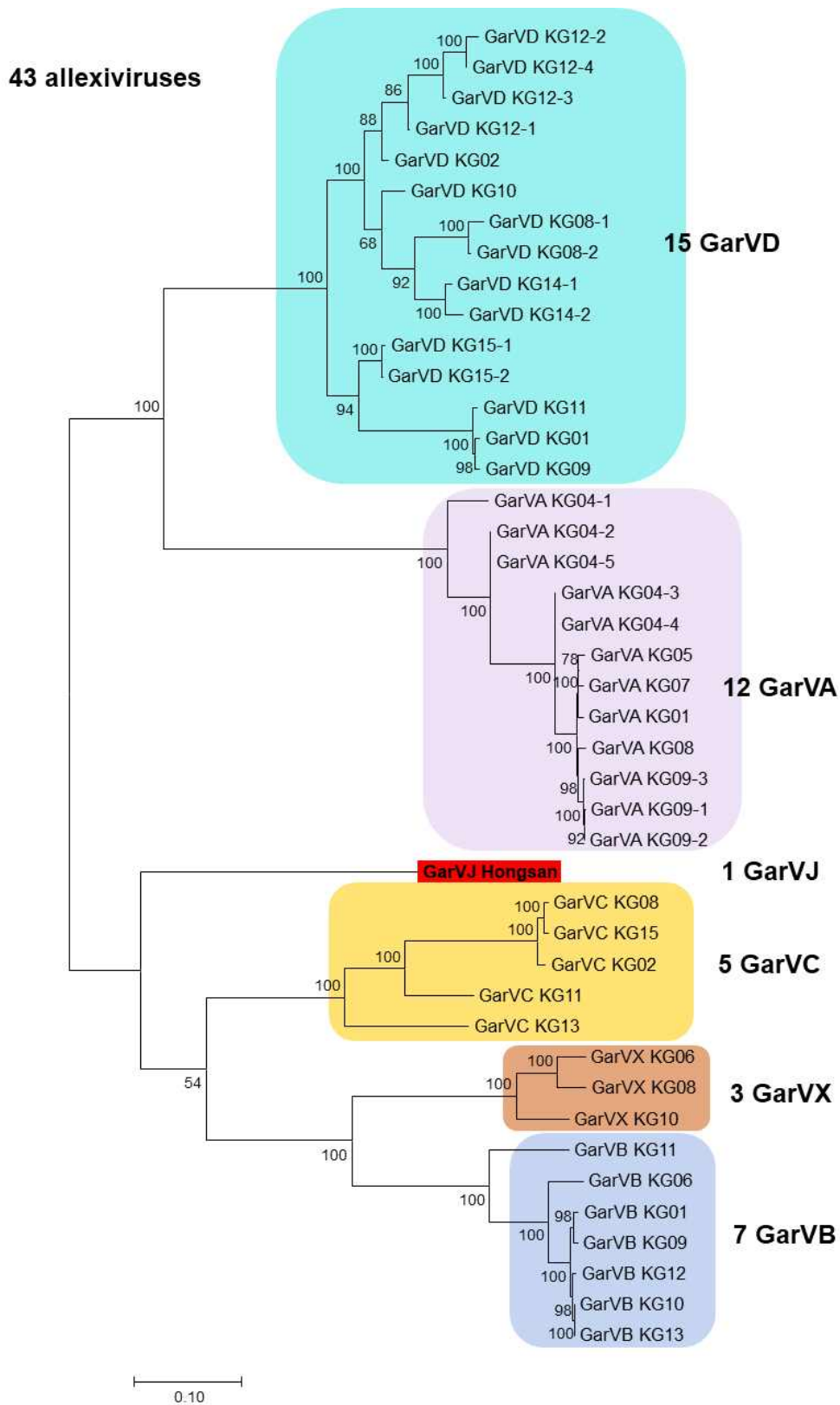


그림 34. 조립된 43개 바이러스 유전체를 바탕으로 국내 마늘 allexiviruses의 계통학적 관계

○ NGS이용 신종 마늘 바이러스 유전체 조립 및 계통학 분석

- 본 연구를 통해 12개 마늘 샘플로부터 43개 allexivirus 유전체, 26개의 potyvirus 유전체, 18개 carlavirus 유전체를 포함해서 총 87개 마늘 바이러스 유전체를 조립하여 확보함
- 43개 allexivirus의 경우 15개 GarVD 유전체, 12개 GarVA유전체, 1개 GarVJ 유전체, 5개 GarVC 유전체, 3개 GarVX 유전체, 7개 GarVB 유전체를 포함함
- 26개 potyvirus의 경우 14개 LYSV 유전체, 12개 OYDV 유전체를 포함함
- 18개 carlavirus의 경우 12개 GarLV 유전체, 6개 GarCLV 유전체를 포함함
- 확보된 마늘 감염 바이러스의 계통학적 분석을 위해 바이러스 속(genus)별로 바이러스 유전체를 분류한 후 clustalW를 이용해 전체 유전체를 정렬하였음
- 정렬된 유전체 정보를 바탕으로 MEGA7 프로그램의 maximum likelihood 방법과 bootstrap replicate 500을 이용해 계통수를 만들
- 43개 allexivirus로 구성된 계통수의 경우 크게 GarVD와 GarVA가 한 그룹을 이루었으며, GarVJ, GarVC, GarVX, GarVB가 또 다른 그룹을 이루었음(그림 33)
- 한 개의 마늘 샘플로부터 다양한 바이러스 분리주들의 유전체가 확보되었는데, 예를 들면 KG12샘플에서 총 4개의 GarVD의 분리주 유전체가 확보되었으며, 각 분리주들은 서로 엮기서 열이 달랐지만 같은 그룹에 속하는 것으로 밝혀졌음(그림 33)

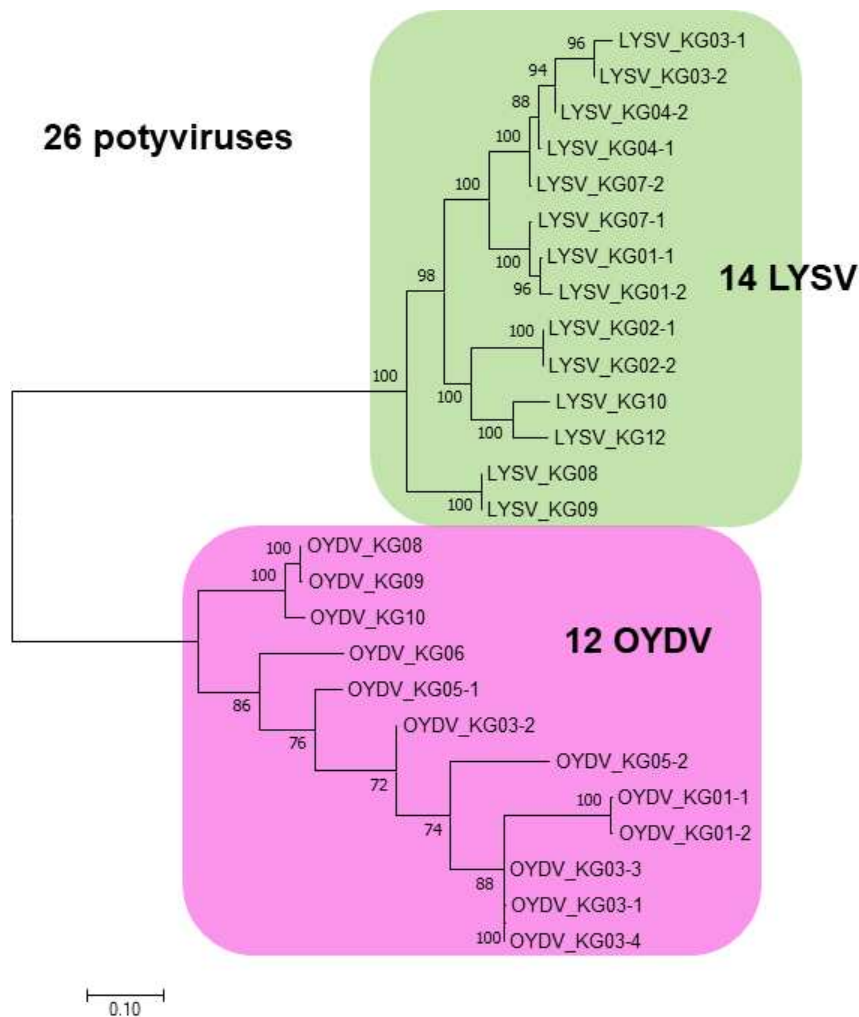


그림 35. 조립된 26개 바이러스 유전체를 바탕으로 국내 마늘 potyviruses의 계통학적 관계

- 이와 비슷하게 GarVA 3개 분리주가 KG09샘플에서 확보되었으며, 각 분리주들은 매우 유사한 염기서열을 보여줌(그림 33)
- GarVB의 경우 다섯 개의 샘플에서 동정된 한 그룹에 속하며 매우 비슷한 염기서열을 보여주었음(그림 33)
- 26개의 potyvirus의 경우 LYSV와 OYDV가 매우 뚜렷하게 구별되어 그룹을 이루었음(그림 34)
- LYSV KG03샘플 2개 분리주의 경우 매우 유사한 것으로 나타났으나, KG07샘플의 2개 LYSV분리주는 서로 다른 그룹에 속해 있는 것으로 확인됨(그림 34)
- OYDV 3개 분리주 KG08, KG09, KG10의 경우 매우 가까운 분리주로 밝혀졌으며, KG03에서 동정된 4개 OYDV 분리주의 경우 KG03-2 분리주만 제외하고 나머지 3개 분리주는 유사한 것으로 밝혀짐(그림 34)
- OYDV KG03-2로부터 세 개의 분리주 KG03-3, KG03-1, KG03-4가 유래되었다는 것을 확인할 수 있었음(그림 34)
- 18개 carlavirus의 경우 GarLV와 GarCLV 2개의 바이러스 종 그룹으로 나누어졌으며, GarLV의 경우 또 다시 2개의 그룹으로 나누어져 있음(그림 35)
- KG04샘플로부터 총 4개의 GarLV 분리주 유전체가 동정되었으며, 4개 분리주는 하나의 그룹을 이루었음(그림 35)
- GarCLV는 총 6개의 유전체가 조립되었고, KG07 분리주는 다른 GarCLV분리주와 유전적으로 다른 것으로 확인됨(그림 35)

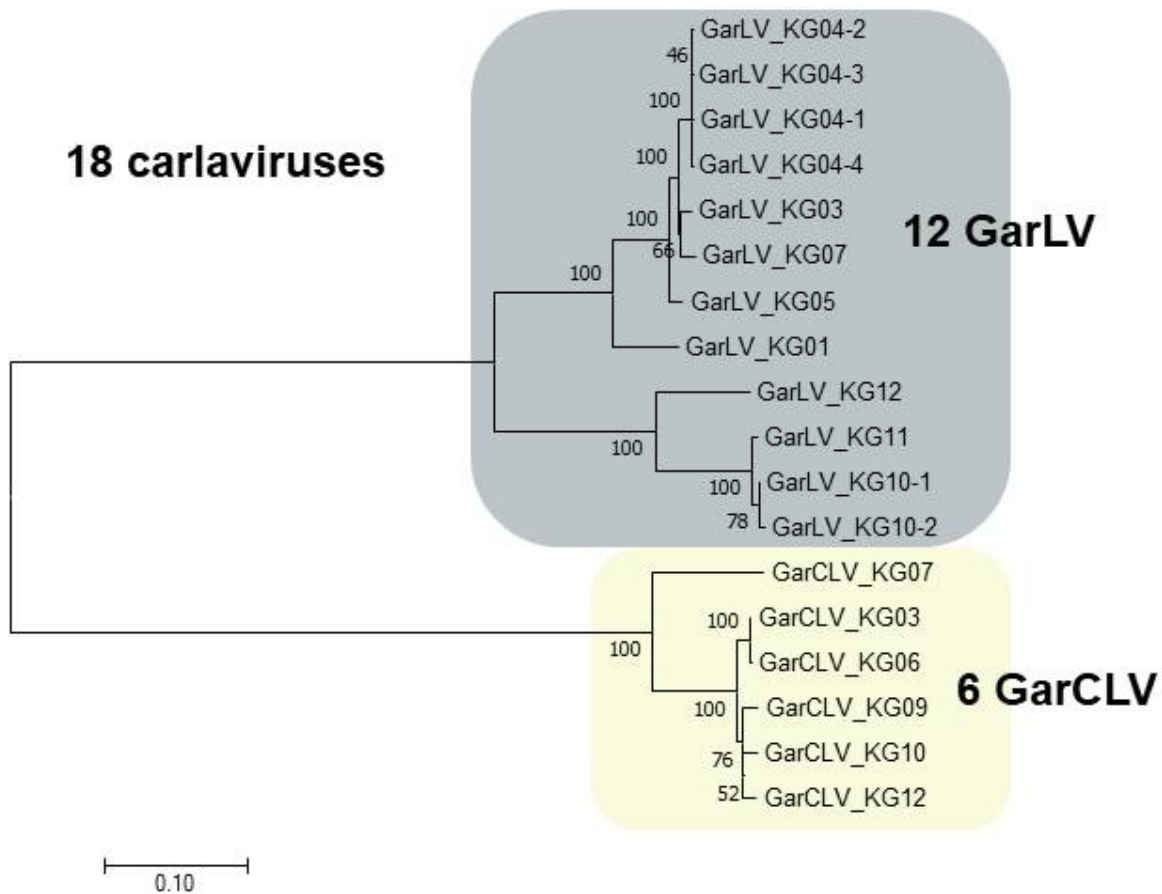


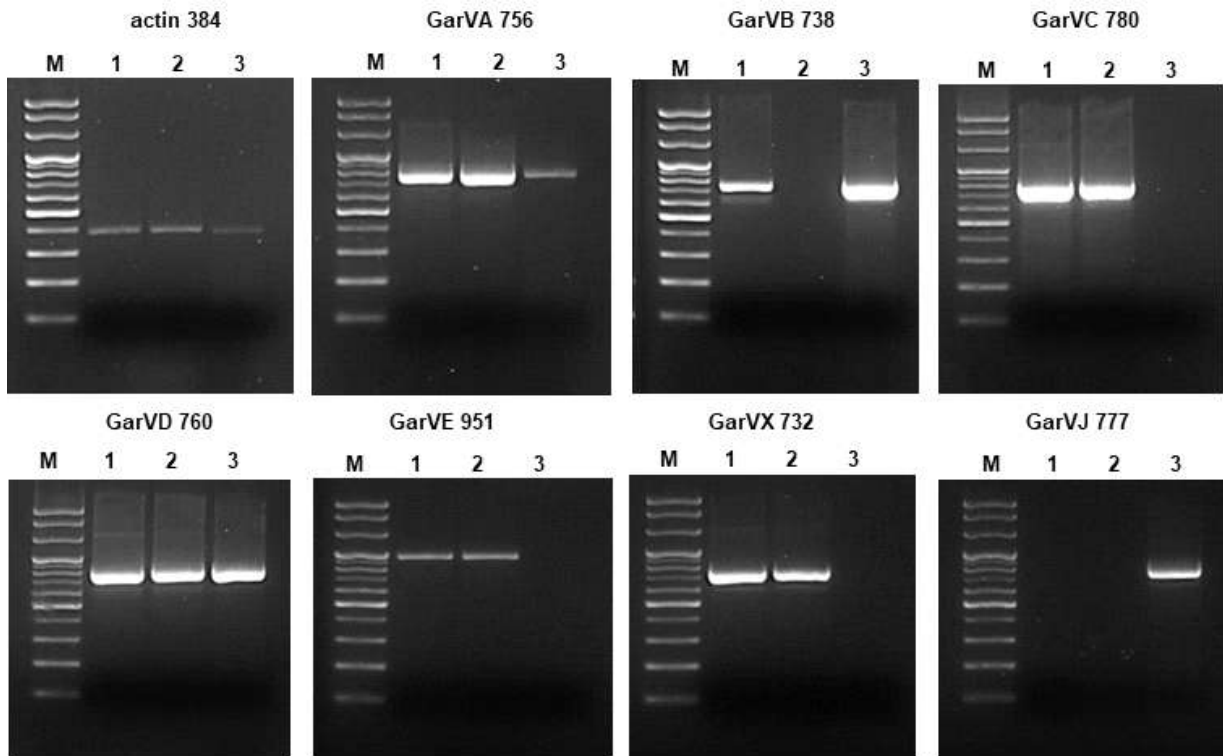
그림 36. 조립된 18개 바이러스 유전체를 바탕으로 국내 마늘 carlaviruses의 계통학적 관계

○ Allexivirus들을 특이적으로 진단할 수 있는 RT-PCR 진단 방법 개발

- 본 연구를 통해 국내 마늘의 경우 기존에 알려진 GarVA, GarVB, GarVC, GarVD, GarVE, GarVX와 신종 GarVJ를 포함해서 총 7개 바이러스가 감염되어 있다는 것을 확인함
- Allexivirus 바이러스의 경우 유전자 서열이 바이러스 종끼리 매우 비슷해 바이러스 종들을 특이적으로 진단할 수 있는 방법이 어려웠음
- 본 연구에서는 연구를 통해 확보된 allexivirus 유전체 정보를 바탕으로 각 allexivirus를 특이적으로 진단할 수 있는 RT-PCR용 진단방법을 개발함(표 22)
- 기존에 RNA-sequencing을 통해 감염된 바이러스 정보를 알고 있는 3개의 샘플을 가지고 새롭게 디자인된 RT-PCR 프라이머의 유용성을 확인하였음(그림 36)
- 또한 증폭된 PCR product들은 모두 cloning 후 플라스미드로 상태로 보관했으며, Sanger-sequencing을 통해 증폭된 PCR product sequencing을 모두 확인함

표 22. 7종 allexivirus를 특이적으로 진단할 수 있는 RT-PCR용 프라이머 리스트

| 프라이머 이름 | RT-PCR용 프라이머 정보 | Amplicon 크기 | Reference 바이러스 |
|-------------------|------------------------------|-------------|---|
| AsAct-rtF1 | TTTGCTGGTGATGATGCTCCAAG | 384 | Allium sativum actin mRNA (AY821677.1) 1-23/384-363 |
| AsAct-rtR1 | GGTACGGCCACTGGCATAGAGG | | |
| GarVA-7406F1 | ATGAACAATCCTGTTGATCCGAGC | 756 | Garlic virus A (NC_003375.1) 7406-7429/8161-8135 |
| GarVA-8161R1 | TTAGAACGTGATCATTGGAGGTTTAGG | | |
| GarVB-7074F1 | ACGATGGGAGACAGGTCGCAA | 738 | Garlic virus B (NC_025789.1) 7074-7094/7811-7784 |
| GarVB-7811R1 | CTAAAATGTAAGCATGAGTGGTTTTGGT | | |
| GarVC-7115F1 | ATGAGTGGAGACAGCCTATCTGACGA | 780 | Garlic virus C (NC_003376.1) 7115-7140/7894-7869 |
| GarVC-7894R1 | TCAAAACGTTAACATGAGAGGCTTGG | | |
| GarVD-7176F1 | ATGAATGAACAAGGAAACACGAGCA | 760 | Garlic virus D (NC_022961.1) 7176-7200/7935-7909 |
| GarVD-7935R1 | GGATGCATTAGAATGTGATCATTGGAG | | |
| GarVE-7007F1 | ATGACGGCTACCTACTGCTGTCTG | 951 | Garlic virus E (NC_004012.1) 7007-7029/7957-7932 |
| GarVE-7957R1 | TTAGAATGTTATCATTGGGGGTTTCG | | |
| GarVX-6875F1 | ATGGGCGATCGGAACCAAG | 732 | Garlic virus X (NC_001800.1) 6875-6893/7606-7582 |
| GarVX-7606R1 | TCAGAATGTGAGCATAAGGGGTTTT | | |
| GarHong-DN04-cpF1 | ATGAATCAAGACGAGCTCGCAGC | 777 | Garlic virus J CP (Gar-Hong_TRINITY_DN4_c2_g1_i1) |
| GarHong-DN04-cpR1 | TCAGAAGGTTAGCATTAAAGGTTTGGG | | |



M: SolGent 100 bp Plus DNA Ladder
 1. 마늘 146
 2. 마늘 가담
 3. 마늘 홍산

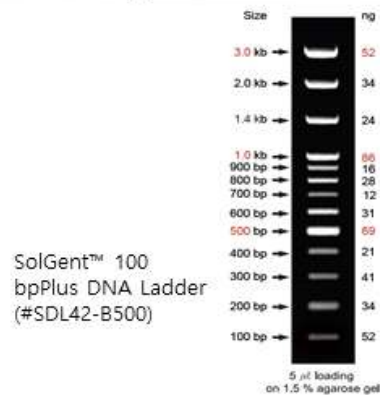


그림 37. allexivirus 특이적 프라이머 이용 RT-PCR 수행 후 amplicon을 아가로스 젤에서 확인한 결과

- 주요 4종 마늘 바이러스를 특이적으로 진단할 수 있는 real time RT-PCR 진단 방법 개발
 - PCR 기기 뿐만 아니라 real time PCR기기로 마늘 바이러스를 진단할 수 있는 방법을 개발하기 위하여 마늘의 주요 4종 바이러스를 선택함
 - 선택된 마늘 바이러스는 GarVA, GarVC, GarCLV, OYDV 4종이며, 그림 37와 38과 같이 기존 바이러스 유전체 서열을 비교 분석하여 프라이머를 디자인하였음(표 23)
 - positive control로 마늘 actin 유전자 서열을 사용함
 - GarVA, GarVC, GarCLV의 경우 바이러스의 replicase 부분을 사용하였고, OYDV의 경우 유전체의 3' 말단 부분을 사용하여 디자인함
 - 증폭되는 바이러스 amplicon의 크기는 153bp에서 200bp로 디자인함
 - Real time RT-PCR 수행결과 그림과 같이 4종 마늘 감염 바이러스를 정확히 진단이 가능하였음(그림 39)



그림 38. GarVA와 GarVC를 특이적으로 진단할 수 있는 real time RT-PCR용 프라이머 위치. 빨간색 부분이 증폭되는 바이러스 유전체 부분임.

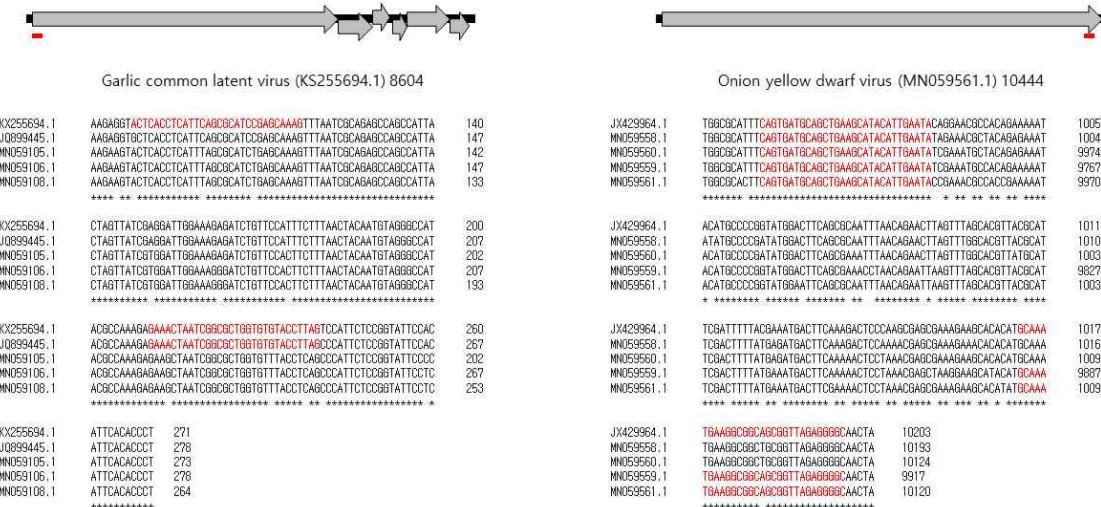


그림 39. GarCLV와 OYDV를 특이적으로 진단할 수 있는 real time RT-PCR용 프라이머 위치. 빨간색 부분이 증폭되는 바이러스 유전체 부분임.

표 23. 4종 마늘 바이러스들을 특이적으로 진단할 수 있는 real time RT-PCR용 프라이머 리스트

| 프라이머 이름 | real time RT-PCR용 프라이머 정보 | Ampli con 크 기 | Reference 바이러스 |
|--------------|------------------------------------|---------------------|---|
| GarVA-3568F1 | CAACCCTGAGAAGAACGCTAAGAGTC TGCA | 195 | Garlic virus A (MN059252.1) 3568-3597/3762-3733 |
| GarVA-3762R1 | GAGGCGCCTTGCTGCAGGTTGGTAGC AGGT | | |
| GarVC-1594F1 | AGAGCTCGGATGAACCGGAAGTAAGC TGTA | 200 | Garlic virus C (NC_003376.1) 1604-1633 /1803-1774 |
| GarVC-1803R1 | CGCGTCCGGTTCCTTCTACTTCTCT AG | | |

| | | | |
|--------------|------------------------------------|-----|---|
| OYDV-9921F1 | CAGTGATGCAGCTGAAGCATACATTGA ATA | 195 | Onion yellow dwarf virus (MN059561.1) 9921-9950/10115-10086 |
| OYDV-10086R1 | GCCCCTCTAACCGCTGCCGCCTTCATT TGC | | |
| GarCLV-88F1 | ACTCACCTCATTGAGCGCATCCGAGCA AAG | 153 | Garlic common latent virus (KX255694.1) 88-117/240-211 |
| GarCLV-240R1 | CTAAGGTACACACCAGCGCCGATTAGT TTC | | |
| AsACT1-rtFor | TGCTCTGGATTATGAACAGGAACTTGA | 146 | garlic actin; Wang et al., PeerJ. 2019; 7: e7319 |
| AsACT1-rtRev | CAATCATTGAAGGCTGGAACAACACT | | |

real-time RT-PCR

TOPreal™ qPCR 2X PreMIX (SYBR Green with low ROX) (enzymomics, #RT500M)

마늘 가담 Gar-Gad cDNA (Oligo dT)

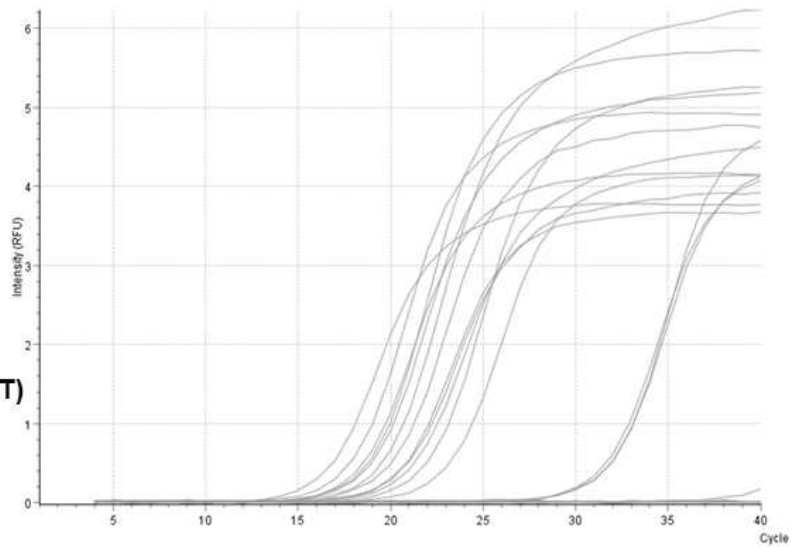


그림 40. Real time RT-PCR로 마늘 바이러스 유전자가 실시간으로 증폭되는 것을 monitoring함

○ RT-PCR 이용 6개 품종 바이러스 프리 캘러스 선발

- 6개 품종에 감염되어 있는 바이러스 NGS를 통해 바이러스 동정 및 유전체 조립하였고, 동정된 바이러스 대상 RT-PCR 진단 방법 개발 및 기술 (주)바이오에프디엔씨에 제공하였음
- RT-PCR방법 이용 캘러스 바이러스 감염 여부 확인 관련 연구 결과는 모두 공동연구기관 연구 결과에 기록됨

3차년도 주관연구기관 연구결과(성균관대)

표 27. 3차년도 연구개발 목표 및 결과 요약(성균관대)

| 구분 (연도) | 세부과제명 | 세부연구목표 | 연구개발 수행내용 | 연구결과 |
|--------------------|--|---|---|--|
| 3차 년도 (2022) | NGS이용 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 감염 현황 조사 | NGS이용 국내 딸기 감염 바이러스 정밀하게 모두 동정 및 분석 | 30개 다양한 딸기 샘플로부터 NGS이용 바이러스 분석 및 국내 판매 유통 중인 딸기 품종 킹스베리, 설향, 매향 샘플로부터 NGS이용 바이러스 분석 | 30개 딸기 라이브러리의 바이러스 조사 결과 10개 라이브러리에서 바이러스 서열이 동정됨 국내 유통 중인 3개 딸기 품종의 바이러스 분석 결과 설향과 매향 샘플에서 Strawberry mottle virus(SMoV)만 동정됨 |
| | | 딸기 감염 바이러스 진단 방법 개발 | RT-PCR과 기반 딸기 감염 바이러스 프라이머 제작 및 진단방법 개발 | SMoV의 RT-PCR 및 real time RT-PCR 기반 진단방법 개발 |
| | | 진단키트 및 매뉴얼 개발 | 고구마, 마늘, 딸기 감염 바이러스 진단용 RT-PCR 진단 키트 및 매뉴얼 개발 | 고구마 감염 5종 바이러스 진단 원스텝 RT-PCR 진단 키트 및 매뉴얼 개발 완료 마늘 감염 5종 바이러스 진단 원스텝 RT-PCR 진단 키트 및 매뉴얼 개발 완료 딸기 감염 2종 바이러스 진단 원스텝 RT-PCR 진단 키트 및 매뉴얼 개발 완료 |

3차년도 주관연구기관 연구결과(성균관대)

○ NGS이용 딸기 샘플별 바이러스 분석

- 딸기 품종 카마로사, 스위트 찰리, 설향 등의 30개의 샘플에서 total RNA를 추출하고, 추출된 total RNA로 라이브러리를 제작과 Illumina NovaSeq6000 시스템을 이용한 Next-generation sequencing (NGS)을 수행함
- NGS 수행 결과 적게는 321,691,161(Straw-lib18) read bases를 얻었고, 많게는 8,792,539,538(Straw-lib28) read bases를 얻음 (표 28)
- 확보된 rawdata로부터 사이즈가 큰 서열을 얻기 위해 trinity 프로그램을 이용해 *de novo* 조립함
- 조립 결과 Straw-lib16(18,873 contigs) 가장 적은 수의 contigs를 얻었고 Straw-lib27(183,079 contigs)에서 가장 많은 수의 contigs를 얻음
- 조립된 서열들을 BLASTN 프로그램을 이용하여 바이러스 서열이 있는지 확인함

표 28. 딸기 30개 샘플에서 수행한 NGS 결과와 *de novo* 조립 및 바이러스 서열 검출 결과 요약

| Sample | total read bases | Total trinity transcripts | Percent GC | Average contig | Total assembled bases | No. of virus contigs |
|-------------|------------------|---------------------------|------------|----------------|-----------------------|----------------------|
| Straw-lib1 | 3,641,037,476 | 46065 | 43.85 | 403.93 | 18,437,683 | 0 |
| Straw-lib2 | 1,442,450,690 | 45020 | 43.62 | 403.93 | 18,062,384 | 0 |
| Straw-lib3 | 1,646,918,524 | 54865 | 43.71 | 403.93 | 22,010,424 | 0 |
| Straw-lib4 | 1,415,573,782 | 43243 | 43.70 | 403.93 | 17,491,563 | 0 |
| Straw-lib5 | 4,018,935,642 | 82451 | 43.09 | 403.93 | 32,524,251 | 0 |
| Straw-lib6 | 4,620,336,102 | 107907 | 43.25 | 403.93 | 43,012,486 | 0 |
| Straw-lib7 | 3,965,257,576 | 80006 | 43.10 | 403.93 | 31,627,528 | 0 |
| Straw-lib8 | 6,574,481,274 | 105920 | 41.31 | 403.93 | 39,086,291 | 0 |
| Straw-lib9 | 7,331,302,554 | 131267 | 42.88 | 403.93 | 142,043,714 | 0 |
| Straw-lib10 | 6,019,919,968 | 120566 | 43.12 | 403.93 | 130,463,054 | 0 |
| Straw-lib11 | 5,732,973,312 | 150826 | 44.19 | 403.93 | 128,177,522 | 6 |
| Straw-lib12 | 6,435,542,644 | 159609 | 43.96 | 403.93 | 133,611,824 | 3 |
| Straw-lib13 | 7,042,997,650 | 169436 | 44.13 | 403.93 | 141,096,796 | 4 |
| Straw-lib14 | 3,095,989,578 | 32977 | 43.81 | 403.93 | 31,927,044 | 9 |
| Straw-lib15 | 3,035,822,634 | 101176 | 40.72 | 403.93 | 54,779,200 | 0 |
| Straw-lib16 | 790,437,372 | 18873 | 44.19 | 403.93 | 7,183,776 | 9 |
| Straw-lib17 | 1,431,793,125 | 43548 | 43.72 | 403.93 | 21,195,804 | 4 |
| Straw-lib18 | 321,691,161 | 29221 | 44.97 | 403.93 | 17,825,034 | 3 |
| Straw-lib19 | 609,513,548 | 23437 | 46.00 | 403.93 | 11,104,668 | 4 |
| Straw-lib20 | 613,873,911 | 23584 | 45.78 | 403.93 | 11,301,606 | 4 |
| Straw-lib21 | 601,601,371 | 21046 | 45.75 | 403.93 | 9,702,233 | 0 |
| Straw-lib22 | 6,078,742,096 | 136946 | 43.48 | 403.93 | 131,934,565 | 0 |
| Straw-lib23 | 2,416,440,252 | 96978 | 43.72 | 403.93 | 90,005,868 | 0 |
| Straw-lib24 | 5,702,002,642 | 127673 | 43.48 | 403.93 | 125,835,896 | 0 |
| Straw-lib25 | 6,338,488,442 | 141011 | 43.55 | 403.93 | 128,925,631 | 5 |
| Straw-lib26 | 5,396,986,438 | 123407 | 44.06 | 403.93 | 114,413,548 | 0 |
| Straw-lib27 | 8,171,184,520 | 183079 | 43.89 | 403.93 | 149,182,153 | 0 |
| Straw-lib28 | 8,792,539,538 | 171094 | 43.56 | 403.93 | 151,431,002 | 0 |
| Straw-lib29 | 7,582,290,830 | 168235 | 43.50 | 403.93 | 144,899,706 | 0 |
| Straw-lib30 | 7,444,867,828 | 159569 | 44.31 | 403.93 | 141,160,251 | 0 |

- 전체 30개의 샘플 중 10개의 샘플에서 다양한 바이러스 관련 서열이 검출됨 (표 29)

표 29. BLASTN을 수행하여 조립된 각 딸기 전사체에서 동정된 바이러스 관련 전사체 정보와 매치되는 바이러스 정보

| Sample | Transcript ID | Size | Accession No. | Name of virus |
|--------------|---------------------------|------|---------------|---------------------------------|
| Straw-lib 11 | TRINITY_DN102131_c0_g1_i1 | 249 | NC_004725.1 | Cucumber latent virus Bulgarian |
| Straw-lib 11 | TRINITY_DN67661_c0_g1_i1 | 321 | NC_004725.1 | Cucumber latent virus Bulgarian |
| Straw-lib 11 | TRINITY_DN70733_c0_g1_i1 | 323 | NC_004725.1 | Cucumber latent virus Bulgarian |
| Straw-lib 11 | TRINITY_DN36299_c0_g1_i1 | 326 | NC_004725.1 | Cucumber latent virus Bulgarian |
| Straw-lib 11 | TRINITY_DN11727_c0_g1_i1 | 3659 | NC_006939.1 | Olive mild mosaic virus |
| Straw-lib 11 | TRINITY_DN103330_c0_g1_i1 | 208 | NC_011535.1 | Grapevine Algerian latent virus |
| Straw-lib 12 | TRINITY_DN83428_c0_g1_i1 | 491 | NC_004725.1 | Cucumber latent virus Bulgarian |
| Straw-lib 12 | TRINITY_DN5651_c0_g1_i1 | 3708 | NC_006939.1 | Olive mild mosaic virus |
| Straw-lib 12 | TRINITY_DN64680_c0_g1_i1 | 317 | NC_011535.1 | Grapevine Algerian latent virus |
| Straw-lib 13 | TRINITY_DN104759_c0_g1_i1 | 239 | NC_004725.1 | Cucumber latent virus Bulgarian |
| Straw-lib 13 | TRINITY_DN56105_c0_g1_i1 | 272 | NC_004725.1 | Cucumber latent virus Bulgarian |
| Straw-lib 13 | TRINITY_DN365_c0_g1_i1 | 3679 | NC_006939.1 | Olive mild mosaic virus |
| Straw-lib 13 | TRINITY_DN104375_c0_g1_i1 | 241 | NC_011535.1 | Grapevine Algerian latent virus |
| Straw-lib 14 | TRINITY_DN12203_c0_g1_i1 | 271 | NC_025435.1 | Strawberry polerovirus 1 |
| Straw-lib 14 | TRINITY_DN12338_c0_g1_i1 | 312 | NC_025435.1 | Strawberry polerovirus 1 |
| Straw-lib 14 | TRINITY_DN22290_c0_g1_i1 | 1399 | NC_025435.1 | Strawberry polerovirus 1 |
| Straw-lib 14 | TRINITY_DN23169_c0_g1_i1 | 304 | NC_025435.1 | Strawberry polerovirus 1 |
| Straw-lib 14 | TRINITY_DN23534_c0_g1_i1 | 581 | NC_025435.1 | Strawberry polerovirus 1 |
| Straw-lib 14 | TRINITY_DN25185_c0_g1_i1 | 365 | NC_025435.1 | Strawberry polerovirus 1 |
| Straw-lib 14 | TRINITY_DN25866_c0_g1_i1 | 265 | NC_025435.1 | Strawberry polerovirus 1 |
| Straw-lib 14 | TRINITY_DN449_c0_g1_i1 | 759 | NC_025435.1 | Strawberry polerovirus 1 |
| Straw-lib 14 | TRINITY_DN7632_c0_g1_i1 | 209 | NC_025435.1 | Strawberry polerovirus 1 |
| Straw-lib 16 | TRINITY_DN13911_c0_g1_i1 | 424 | NC_025435.1 | Strawberry polerovirus 1 |
| Straw-lib 16 | TRINITY_DN1670_c0_g1_i1 | 1106 | NC_025435.1 | Strawberry polerovirus 1 |
| Straw-lib | TRINITY_DN17141_c0_g1_i1 | 207 | NC_025435.1 | Strawberry polerovirus 1 |

| | | | | |
|--------------|--------------------------|------|-------------|---------------------------------------|
| 16 | i1 | | .1 | |
| Straw-lib 16 | TRINITY_DN17356_c0_g1_i1 | 427 | NC_025435.1 | Strawberry polerovirus 1 |
| Straw-lib 16 | TRINITY_DN1745_c0_g1_i1 | 708 | NC_025435.1 | Strawberry polerovirus 1 |
| Straw-lib 16 | TRINITY_DN5100_c0_g1_i1 | 1029 | NC_025435.1 | Strawberry polerovirus 1 |
| Straw-lib 16 | TRINITY_DN6014_c0_g1_i1 | 244 | NC_025435.1 | Strawberry polerovirus 1 |
| Straw-lib 16 | TRINITY_DN8460_c0_g1_i1 | 308 | NC_025435.1 | Strawberry polerovirus 1 |
| Straw-lib 16 | TRINITY_DN8877_c0_g1_i1 | 204 | NC_025435.1 | Strawberry polerovirus 1 |
| Straw-lib 17 | TRINITY_DN29734_c0_g1_i1 | 1093 | NC_025435.1 | Strawberry polerovirus 1 |
| Straw-lib 17 | TRINITY_DN263_c0_g1_i1 | 634 | NC_025435.1 | Strawberry polerovirus 1 |
| Straw-lib 17 | TRINITY_DN4222_c0_g1_i1 | 362 | NC_025435.1 | Strawberry polerovirus 1 |
| Straw-lib 17 | TRINITY_DN42824_c0_g1_i1 | 251 | NC_025435.1 | Strawberry polerovirus 1 |
| Straw-lib 18 | TRINITY_DN4620_c0_g1_i1 | 3458 | NC_008708.2 | Strawberry necrotic shock virus RNA 1 |
| Straw-lib 18 | TRINITY_DN5527_c0_g1_i1 | 2899 | NC_008707.1 | Strawberry necrotic shock virus RNA 2 |
| Straw-lib 18 | TRINITY_DN6743_c0_g1_i1 | 2249 | NC_008706.1 | Strawberry necrotic shock virus RNA 3 |
| Straw-lib 19 | TRINITY_DN5441_c0_g1_i1 | 1147 | NC_001725.1 | Strawberry vein banding virus |
| Straw-lib 19 | TRINITY_DN5441_c0_g2_i1 | 987 | NC_001725.1 | Strawberry vein banding virus |
| Straw-lib 19 | TRINITY_DN4915_c0_g1_i1 | 4923 | NC_001725.1 | Strawberry vein banding virus |
| Straw-lib 19 | TRINITY_DN4915_c0_g2_i1 | 988 | NC_001725.1 | Strawberry vein banding virus |
| Straw-lib 20 | TRINITY_DN6314_c0_g1_i1 | 471 | NC_001725.1 | Strawberry vein banding virus |
| Straw-lib 20 | TRINITY_DN6314_c0_g2_i1 | 1621 | NC_001725.1 | Strawberry vein banding virus |
| Straw-lib 20 | TRINITY_DN6314_c0_g2_i2 | 2708 | NC_001725.1 | Strawberry vein banding virus |
| Straw-lib 20 | TRINITY_DN6314_c0_g2_i3 | 4750 | NC_001725.1 | Strawberry vein banding virus |
| Straw-lib 25 | TRINITY_DN41196_c0_g1_i1 | 303 | NC_003446.1 | Strawberry mottle virus RNA2 |
| Straw-lib 25 | TRINITY_DN24343_c0_g1_i1 | 436 | NC_003446.1 | Strawberry mottle virus RNA2 |
| Straw-lib 25 | TRINITY_DN44578_c0_g1_i1 | 612 | NC_003446.1 | Strawberry mottle virus RNA2 |
| Straw-lib 25 | TRINITY_DN31260_c0_g1_i1 | 491 | NC_003446.1 | Strawberry mottle virus RNA2 |
| Straw-lib 25 | TRINITY_DN33875_c0_g1_i1 | 310 | NC_003446.1 | Strawberry mottle virus RNA2 |

- Straw-lib11과 Straw-lib12, Straw-lib13에서 Cucumber Bulgarian latent virus와 유사한 짧은 contigs를 얻었고, Olive mild mosaic virus 관련 서열을 확보함
- Straw-lib14와 Straw-lib16, Straw-lib17에서 Strawberry polerovirus 1 관련 짧은 contigs를 얻

있음

- Straw-lib18에서 Strawberry necrotic shock virus의 RNA1, RNA2, RNA3 서열을 확보함
- Straw-lib19와 Straw-lib20에서 Strawberry vein banding virus의 짧은 contigs를 얻음
- Straw-lib25에서 Strawberry mottle virus RNA2의 짧은 contig를 확보함
- 짧은 contig 서열은 바이러스 감염을 확신할 수 없음
- NGS 결과 분석으로 30개 딸기 샘플 중 바이러스 감염이 확실시 되는 샘플은 Straw-lib11, Straw-lib12, Straw-13로 Olive mild mosaic virus 감염이 예상됨
- NGS 분석 결과 Straw-lib18에서 Strawberry necrotic shock virus의 감염이 예상됨

○ NGS를 이용해 국내 유통 딸기 품종에서 바이러스 분석

- 국내에 유통되는 딸기 품종 킹스베리와 설향, 매향 샘플을 확보함
- 딸기 킹스베리와 설향, 매향 품종에서 각각 total RNA를 추출하여 추출된 total RNA를 이용해 library 구축과 Illumina NovaSeq6000 시스템을 이용해 NGS를 수행함
- NGS 결과 딸기 킹스베리에서 49,499,626 reads, 설향에서 49,396,156 reads, 매향에서 49,878,568 reads를 얻음 (표 30)

표 30. 딸기 설향과 매향 NGS 수행 후 확보된 raw data 요약

| Sample | Total bases(bp) | Total reads | GC(%) | AT(%) | Q20(%) | Q30(%) |
|---------|-----------------|-------------|-------|-------|--------|--------|
| 딸기 킹스베리 | 4,999,462,226 | 49,499,626 | 42.1 | 57.9 | 97.6 | 93.6 |
| 딸기 설향 | 4,989,011,756 | 49,396,156 | 42.2 | 57.8 | 97.7 | 93.9 |
| 딸기 매향 | 5,037,735,368 | 49,878,568 | 41.9 | 58.1 | 97.7 | 94 |

- 확보된 raw data를 Trinity 프로그램을 이용해 *de novo* 조립을 수행함
- 조립 결과, 딸기 킹스베리에서 90,327 contigs를 얻었고, 설향에서 101,041 contigs, 매향에서 94,078 contigs를 얻음 (표 31)
- 딸기 킹스베리의 average contig size는 979.53 bp 이고, 딸기 설향의 average contig size는 905.75 bp 이고, 딸기 매향의 size는 930.71 bp였음

표 31. 딸기 킹스베리와 설향, 매향 NGS에서 *de novo* 전사체 조립 결과

| Sample | Total trinity transcripts | Percent GC | Contig N50 | Median contig length | Average contig | Total assembled bases |
|---------|---------------------------|------------|------------|----------------------|----------------|-----------------------|
| 딸기 킹스베리 | 90327 | 42.25 | 1561 | 627 | 979.53 | 88477773 |
| 딸기 설향 | 101041 | 42.28 | 1453 | 557 | 905.75 | 91518253 |
| 딸기 매향 | 94078 | 42.21 | 1495 | 575 | 930.71 | 87559146 |

- 조립된 딸기 킹스베리와 설향, 매향의 전사체에서 BLASTN을 수행해 바이러스 관련 contigs를 검색함
- BLASTN 결과 딸기 킹스베리의 전사체에서는 바이러스 관련 contig가 없었고, 딸기 설향과 매향에서 바이러스 관련 contig들을 얻음 (표 32)

표 32. 딸기 설향과 매향 조립 전사체에서 BLASTN을 이용해 얻은 바이러스 관련 contig 정보

| Sample | Transcript ID | Size | Accession No. | Name of virus |
|--------|------------------------|------|---------------|------------------------------|
| 설향 | TRINITY_DN218_c0_g1_i1 | 7025 | NC_003445.1 | Strawberry mottle virus RNA1 |
| 설향 | TRINITY_DN218_c0_g1_i2 | 6338 | NC_003446.1 | Strawberry mottle virus RNA2 |
| 매향 | TRINITY_DN149_c0_g1_i1 | 7024 | NC_003445.1 | Strawberry mottle virus RNA1 |
| 매향 | TRINITY_DN149_c0_g2_i1 | 6322 | NC_003446.1 | Strawberry mottle virus RNA2 |

- 딸기 설향과 매향 품종에서 Strawberry mottle virus RNA1과 RNA2 관련 서열이 있는 것을 확인함
- 딸기 설향에서 얻은 Strawberry mottle virus RNA1은 Strawberry mottle virus T2 (LC550287.1, Japan)와 97.55% ident로 유사했고, RNA2는 Strawberry mottle virus NB926 (KU200454.1, Canada)와 96.70%로 유사함.
- 딸기 매향에서 얻은 Strawberry mottle virus RNA1은 설향에서 얻은 contig와 같이 T2 (LC550287.1)와 97.42% ident로 유사함을 보였고, RNA2는 NB926 (KU200454.1)와 96.66%로 유사함을 보임
- 국내 유통되는 딸기에서는 바이러스 감염이 적음을 확인함

○ 딸기 바이러스 진단

- 국내 유통 딸기 설향과 매향 RNA sequencing 결과로 Strawberry mottle virus 서열이 있음을 확인
- 딸기 설향과 매향의 RNA를 추출하여 RT-PCR을 이용해 SMoV 진단 실험을 함 (그림 40)
- SMoV의 증폭 프라이머 서열은 SMoV의 RNA1의 192 bp를 증폭하는 AGGAGTGGGTTGACGAACAC와 CCTCGGAAAGAGGGAAAATC 프라이머 세트를 사용함

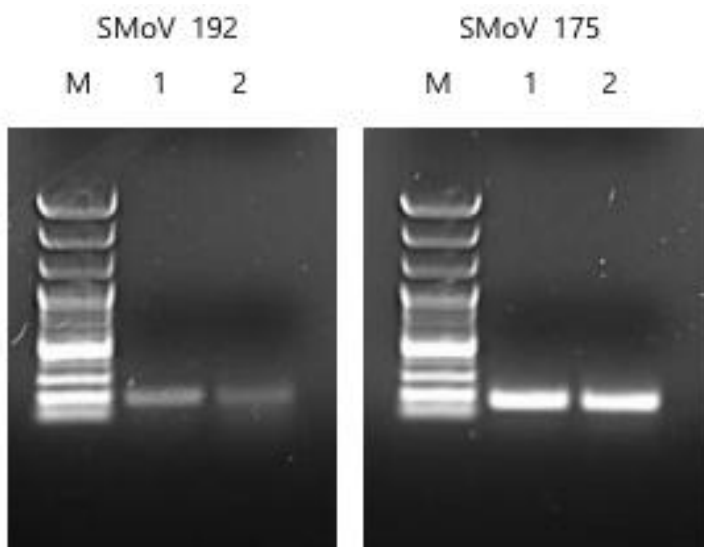


그림 41. Strawberry mottle virus RT-PCR 결과 agarose gel 사진 M: SolGent 100 bp Marker, 1: 설향, 2: 매향

- SMOV의 RT-PCR 두 번째 실험으로 SMOV의 RNA1의 175 bp를 증폭하는 CCTCGGAAAGAGGGAAAATC와 CCTCGGAAAGAGGGAAAATC 프라이머를 디자인하여 사용함
- 설향과 매향에서 RNA sequencing 결과와 같이 SMOV가 검출됨
- RT-PCR에 사용된 SMOV 특이적 프라이머를 이용하여 real time RT-PCR를 수행한 결과, SMOV에 감염된 샘플에서 성공적으로 바이러스 증폭된 것을 확인할 수 있었음(그림 41)

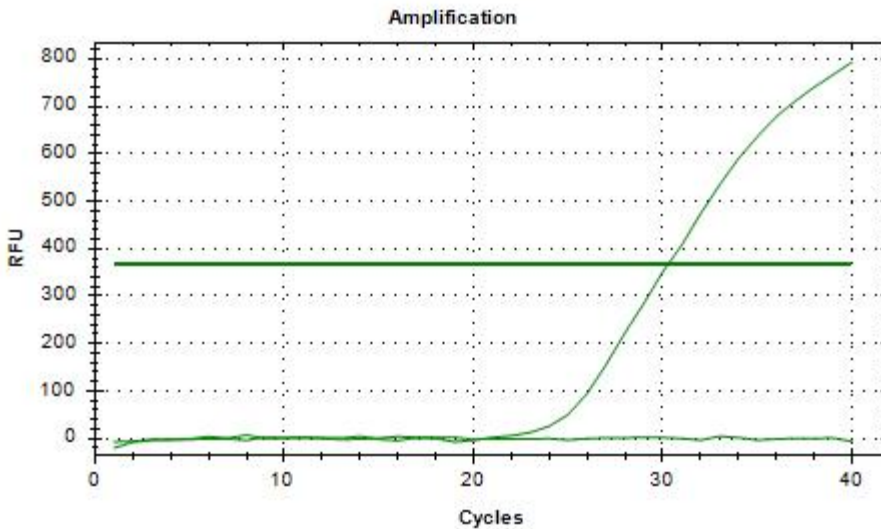


그림 42. SMOV 특이적 프라이머 이용 real time RT-PCR 수행 결과

○ NGS를 이용해 고구마 유래 캘러스에서 바이러스 프리 라인 확인

- 고구마 호감미와 진율미 품종에서 유도된 캘러스 확보
- 고구마 호감미와 진율미 캘러스에서 각각 total RNA를 추출하여 추출된 total RNA를 이용해 library 구축과 Illumina NovaSeq6000 시스템을 이용해 NGS를 수행함
- NGS 결과 호감미 캘러스에서 49,585,088 reads, 진율미 캘러스에서 49,812,358 reads를 얻음 (표 33)

표 33. 고구마 호감미와 진율미 캘러스 NGS 수행 후 확보된 raw data 요약

| Sample | Total bases(bp) | Total reads | GC(%) | AT(%) | Q20(%) | Q30(%) |
|---------|-----------------|-------------|-------|-------|--------|--------|
| 호감미 캘러스 | 5,008,093,888 | 49,585,088 | 44.2 | 55.8 | 97.8 | 94 |
| 진율미 캘러스 | 5,031,048,158 | 49,812,358 | 44.6 | 55.4 | 97.9 | 94.2 |

- 확보된 raw data를 Trinity 프로그램을 이용해 *de novo* 조립을 수행함
- 조립 결과, 호감미 캘러스에서 154,571 contigs를 얻었고, 진율미 캘러스에서 139,028 contigs를 얻음 (표 34)
- 고구마 호감미 캘러스의 average contig size는 959.62 bp 이고, 고구마 진율미 캘러스의 size는 973.24 bp였음

표 34. 고구마 호감미와 진을미 품종 캘러스 *de novo* 전사체 조립 결과

| Sample | Total trinity transcripts | Percent GC | Contig N50 | Median contig length | Average contig | Total assembled bases |
|---------|---------------------------|------------|------------|----------------------|----------------|-----------------------|
| 호감미 캘러스 | 154571 | 41.22 | 1599 | 561 | 959.62 | 148328918 |
| 진을미 캘러스 | 139028 | 41.32 | 1618 | 574 | 973.24 | 135307919 |

- 조립된 고구마 호감미 캘러스와 진을미 캘러스의 전사체에서 BLASTN을 수행해 바이러스 관련 contigs를 검색함
- 고구마 진을미 캘러스에서는 바이러스 관련 contigs가 없었음
- BLASTN 결과 고구마 호감미 캘러스 전사체에서는 바이러스 관련 contig들을 얻음 (표 35)

표 35. 고구마 호감미 캘러스 조립 전사체에서 BLASTN을 이용해 얻은 바이러스 관련 contig 정보

| Transcript ID | Size | Accession No. | Name of virus |
|--------------------------|------|---------------|---------------------------------------|
| TRINITY_DN40291_c0_g1_i1 | 744 | NC_012728.1 | Sweetpotato badnavirus B |
| TRINITY_DN71618_c0_g1_i1 | 382 | NC_012728.1 | Sweetpotato badnavirus B |
| TRINITY_DN73189_c0_g1_i1 | 323 | NC_012728.1 | Sweetpotato badnavirus B |
| TRINITY_DN58414_c0_g1_i1 | 375 | NC_012728.1 | Sweetpotato badnavirus B |
| TRINITY_DN60880_c0_g1_i1 | 412 | NC_012728.1 | Sweetpotato badnavirus B |
| TRINITY_DN68642_c0_g1_i1 | 314 | NC_012728.1 | Sweetpotato badnavirus B |
| TRINITY_DN683_c0_g1_i19 | 584 | NC_015328.1 | Sweet potato caulimo-like virus |
| TRINITY_DN65883_c0_g1_i1 | 434 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |
| TRINITY_DN19774_c0_g1_i1 | 252 | NC_034630.1 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 |

- 고구마 호감미 캘러스에서 Sweet potato badnavirus B와 Sweet potato caulimo-like virus, Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 관련 서열이 있는 것을 확인함
- 고구마 진을미 캘러스 시료는 바이러스 프리 시료로 확인됨

○ RT-PCR을 이용해 고구마 바이러스 진단

- 고구마 호감미 품종에서 유도된 캘러스에서 Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 감염을 확인하기 위해 RT-PCR을 수행함
- Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 감염 확인을 위해 real time RT-PCR 진단 방법 개발에 사용된 프라이머를 사용 (그림 42, 표 36)
- 고구마 호감미 캘러스에서 추출한 RNA로 Sweetpotato symptomless mastrevirus 1의 199 bp

증폭을 One Step RT-PCR kit을 사용해 증폭함
 - 1.5% 아가로스 젤에서 RT-PCR product를 확인함 (그림 43)

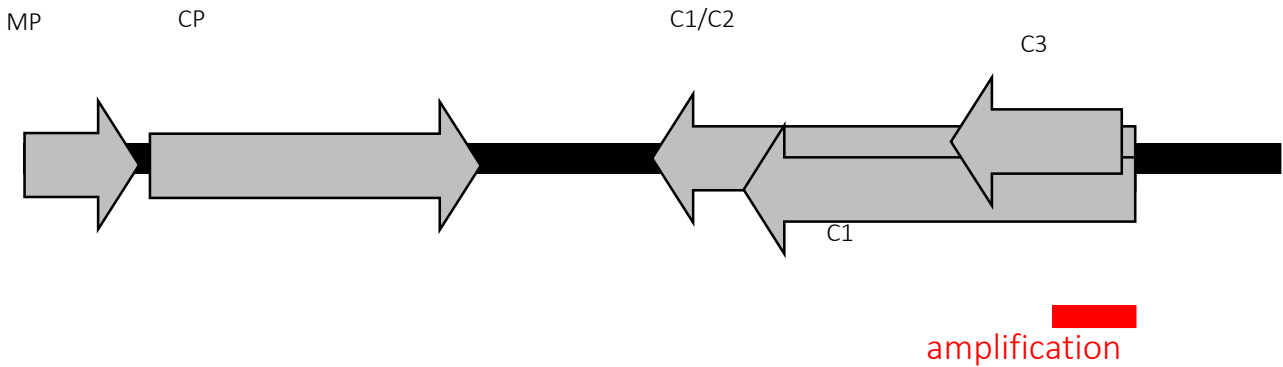
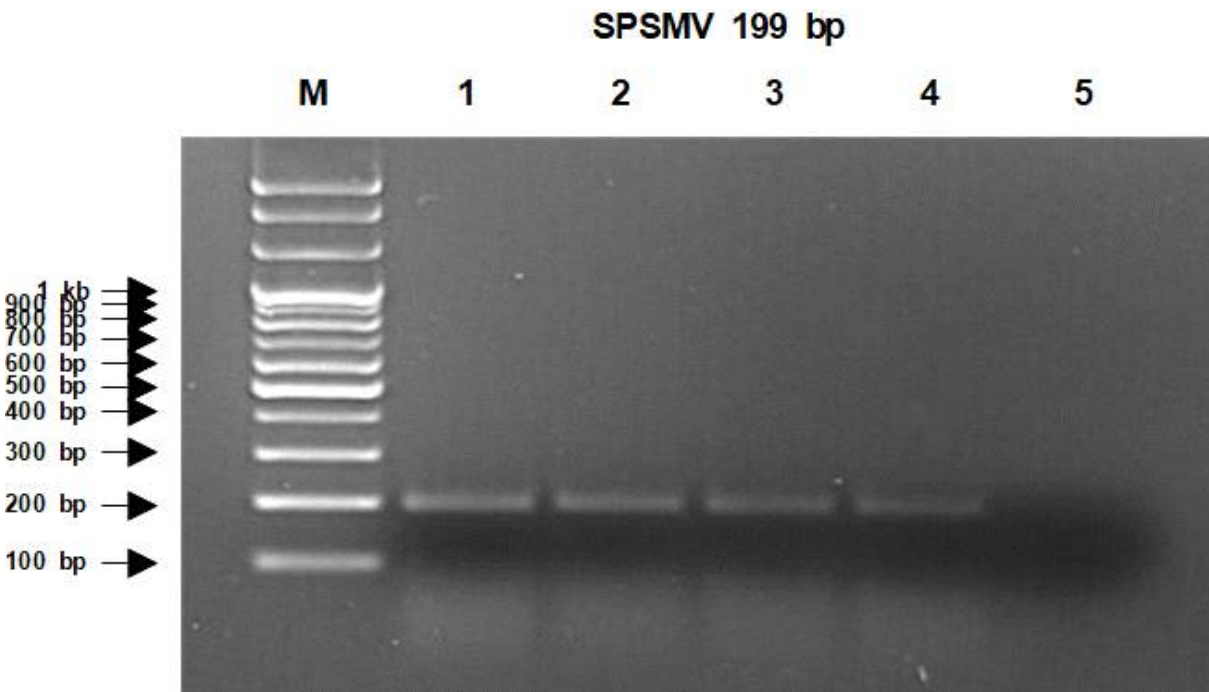


그림 43. Sweetpotato symptomless mastrevirus 1의 유전체 모식도. 빨간색 부분은 RT-PCR로 증폭되는 위치를 표시. Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 (NC_034630.1) 2886 bp

표 36. Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 진단을 위한 RT-PCR 프라이머

| 이름 | 프라이머 염기 서열 | 크기(bp) | 참고 바이러스 |
|------------------|------------------------------------|--------|---|
| SPSMV-1 99-F1 | GAGCACATTGAAAGAGAACGT GAAAATGGA | 199 | Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 (NC_034630.1) 2356-2385/2525-2554 |
| SPSMV-1 99-R1 | CAACCCAGAGCAAGATCAGTT TTCTCATTC | | |

그림 44. SPSMV RT-PCR 수행 후 PCR product를 1.5% 아가로스 젤에서 확인
 M: SolGent 100 bp Plus DNA Ladder, 1~4: 고구마 호감미, 5: negative control



○ NGS를 이용해 딸기 기내식물체에서 바이러스 프리 라인 확인

- 딸기 설향과 매향에서 유도된 캘러스에서 얻은 기내식물체 확보
- 딸기 설향과 매향 기내식물체에서 각각 total RNA를 추출하여 추출된 total RNA를 이용해 library 구축과 Illumina NovaSeq6000 시스템을 이용해 NGS를 수행함
- NGS 결과 딸기 설향 기내식물에서 49,737,846 reads, 매향 기내식물에서 29,326,612 reads를 얻음 (표 37)

표 37. 딸기 설향과 매향 기내식물 NGS 수행 후 확보된 raw data 요약

| Sample | Total bases(bp) | Total reads | GC(%) | AT(%) | Q20(%) | Q30(%) |
|---------|-----------------|-------------|-------|-------|--------|--------|
| 설향 (기내) | 5,023,522,446 | 49,737,846 | 48.3 | 51.7 | 97.6 | 93.9 |
| 매향 (기내) | 4,428,318,412 | 29,326,612 | 48.2 | 51.8 | 97 | 92.9 |

- 확보된 raw data를 Trinity 프로그램을 이용해 *de novo* 조립을 수행함
- 조립 결과, 설향 기내식물에서 76,522 contigs를 얻었고, 매향 기내식물에서 109,796 contigs를 얻음 (표 38)
- 딸기 설향 기내식물의 average contig size는 774.66 bp 이고, 딸기 매향 기내식물의 size는 764.64 bp였음

표 38. 딸기 설향과 매향 기내식물 NGS에서 de novo 전사체 조립 결과

| Sample | Total trinity transcripts | Percent GC | Contig N50 | Median contig length | Average contig | Total assembled bases |
|---------|---------------------------|------------|------------|----------------------|----------------|-----------------------|
| 설향 (기내) | 76522 | 44.25 | 1186 | 495 | 774.66 | 59278226 |
| 매향 (기내) | 109796 | 43.15 | 1174 | 472 | 764.64 | 83953931 |

- 조립된 딸기 설향과 매향 기내식물의 전사체에서 BLASTN을 수행해 바이러스 관련 contigs를 검색함
- BLASTN 결과 딸기 설향과 매향 기내식물에서는 바이러스 관련 contigs가 없었음
- 딸기 설향과 매향 기내식물 시료는 바이러스 프리 시료로 확인됨

○ NGS를 이용해 마늘 캘러스에서 바이러스 프리 라인 확인

- 마늘 가담과 홍산 품종에서 유도된 캘러스 확보
- 마늘 가담과 홍산 캘러스에서 각각 total RNA를 추출하여 추출된 total RNA를 이용해 library 구축과 Illumina NovaSeq6000 시스템을 이용해 NGS를 수행함
- NGS 결과 가담 캘러스에서 49,773,968 reads, 홍산 캘러스에서 40,855,238 reads를 얻음 (표 39)

표 39. 마늘 가담과 홍산 캘러스 NGS 수행 후 확보된 raw data 요약

| Sample | Total bases(bp) | Total reads | GC(%) | AT(%) | Q20(%) | Q30(%) |
|--------|-----------------|-------------|-------|-------|--------|--------|
| 가담 캘러스 | 5,027,170,768 | 49,773,968 | 41 | 58.6 | 97.8 | 93.9 |
| 홍산 캘러스 | 4,126,379,038 | 40,855,238 | 38.4 | 61.6 | 97.9 | 94.1 |

- 확보된 raw data를 Trinity 프로그램을 이용해 *de novo* 조립을 수행함
- 조립 결과, 가담 캘러스에서 296,627 contigs를 얻었고, 홍산 캘러스에서 169,460 contigs를 얻음 (표 40)
- 마늘 가담 캘러스의 average contig size는 581.05 bp 이고, 마늘 홍산 캘러스의 size는 396.38 bp였음

표 40. 마늘 가담과 홍산 품종 캘러스 de novo 전사체 조립 결과

| Sample | Total trinity transcripts | Percent GC | Contig N50 | Median contig length | Average contig | Total assembled bases |
|--------|---------------------------|------------|------------|----------------------|----------------|-----------------------|
| 가담 캘러스 | 296627 | 38.15 | 797 | 345 | 581.05 | 172354676 |
| 홍산 캘러스 | 169460 | 36.55 | 401 | 288 | 396.38 | 67170761 |

- 조립된 마늘 가담 캘러스와 홍산 캘러스의 전사체에서 BLASTN을 수행해 바이러스 관련 contigs를 검색함
- 마늘 가담 캘러스에서는 바이러스 관련 contigs가 없었음
- BLASTN 결과 마늘 홍산 캘러스 전사체에서는 바이러스 관련 contig들을 얻음 (표 41)

표 41. 마늘 홍산 캘러스 조립 전사체에서 BLASTN을 이용해 얻은 바이러스 관련 contig 정보

| Transcript ID | Size | Accession No. | Name of virus |
|---------------------------|------|---------------|---------------------------------------|
| TRINITY_DN287_c1_g1_i1 | 8663 | NC_003375.1 | Garlic virus A |
| TRINITY_DN144547_c0_g1_i1 | 909 | NC_003376.1 | Garlic virus C |
| TRINITY_DN144547_c0_g1_i6 | 284 | NC_003376.1 | Garlic virus C |
| TRINITY_DN287_c0_g2_i1 | 8350 | NC_003376.1 | Garlic virus C |
| TRINITY_DN287_c0_g3_i1 | 8170 | NC_003376.1 | Garlic virus C |
| TRINITY_DN287_c0_g3_i2 | 8167 | NC_003376.1 | Garlic virus C |
| TRINITY_DN287_c0_g4_i1 | 265 | NC_003376.1 | Garlic virus C |
| TRINITY_DN2980_c0_g1_i1 | 8230 | MH120170.1 | Garlic yellow mosaic-associated virus |
| TRINITY_DN287_c1_g2_i1 | 8417 | NC_022961.1 | Garlic virus D |

- 마늘 홍산 캘러스에서 Garlic virus A와 Garlic virus C, Garlic yellow mosaic-associated virus, Garlic virus D 관련 서열이 있는 것을 확인함
- 마늘 가담 캘러스 시료는 바이러스 프리 시료로 확인됨

○ RT-PCR을 이용해 마늘 바이러스 진단

- 마늘 홍산 캘러스에서 유도된 캘러스에서 Garlic yellow mosaic-associated virus 감염을 확인하기 위해 RT-PCR을 수행함
- Garlic yellow mosaic-associated virus 감염 확인을 위해 TGB3부분의 일부를 포함해 CP전체 서열, 3'UTR 부분을 포함한 747 bp를 증폭하는 프라이머를 디자인함 (그림 44, 표 42)
- 마늘 홍산 캘러스에서 추출한 RNA로 Garlic yellow mosaic-associated virus의 747 bp 증폭을 One Step RT-PCR kit을 사용해 증폭함
- 1.5% 아가로스 젤에서 RT-PCR product를 확인함 (그림 45)

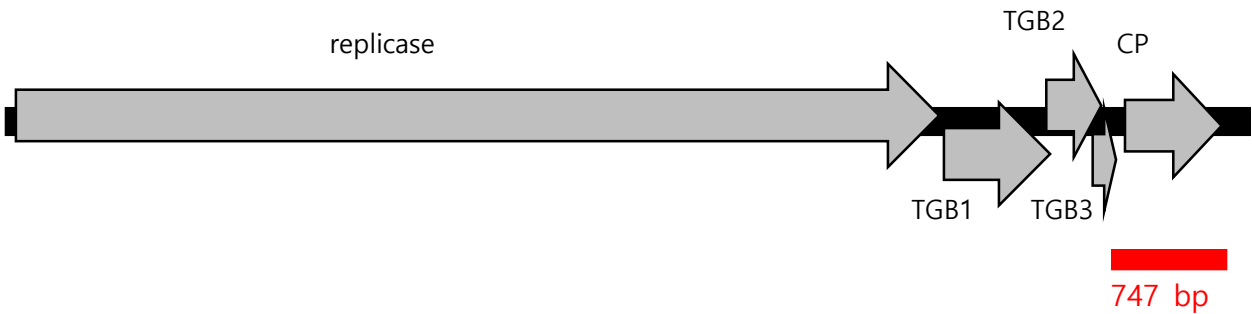


그림 45. Garlic yellow mosaic-associated virus(MH120170.1) 8209 bp 의 유전체 모식도

표 42. Garlic yellow mosaic-associated virus 진단을 위한 RT-PCR 프라이머

| 이름 | 프라이머 염기 서열 | 크기(bp) | 참고 바이러스 |
|------------------|-----------------------------|--------|---|
| GYMaV-7 330F1 | AATCATGGCTTAAGTCTTAAC CG | 747 | Garlic yellow mosaic-associated virus (M H 1 2 0 1 7 0 . 1) 7330-7352/8076-8054 |
| GYMaV-8 076R1 | GAAGCTCAATGTAATTCATTC GG | | |

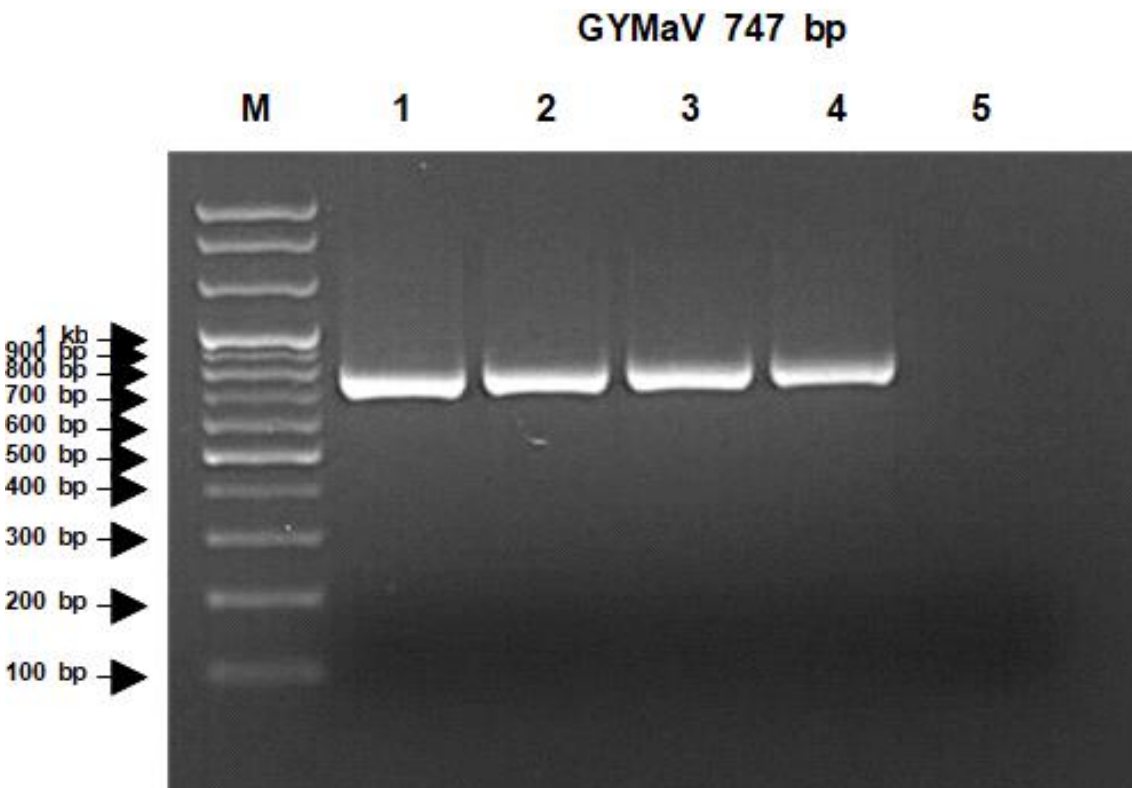


그림 46. GYMaV RT-PCR 수행 후 PCR product를 1.5% 아가로스 젤에서 확인
M: SolGent 100 bp Plus DNA Ladder, 1~4: 마늘 홍산, 5: negative control

○ 바이러스 진단을 위한 원스텝 RT-PCR 진단 키트 개발

- 고구마, 마늘, 딸기 감염 바이러스의 RNA를 RT-PCR로 진단
- 주요 고구마 감염 바이러스 중 Sweet potato feathery mottle virus (SPFMV), Sweet potato virus C (SPVC), Sweet potato latent virus (SPLV), Sweet potato virus 2 (SPV2), Sweet potato leaf curl virus (SPLCV)를 선별
- 5종 고구마 바이러스의 바이러스 특이적 프라이머를 product 300~900 bp 크기로 디자인함 (표 43)

표 43. 고구마 바이러스 별 RT-PCR 프라이머 세트와 product 증폭 예상 사이즈

| name | sequence | size | reference |
|---------------|----------------------------------|------|--|
| SPFMV-SP1F | CTCCACCACCCACA ATAACTG | 402 | Sweet potato feathery mottle virus (NC_001841.1) 9719-9739/10120-10101 (Gu et al., PLoS One 2014) |
| SPFMV-SP1R | TCCCCATTTCCTGTA TCGTCA | | |
| SPVC-CP1F | TCGGTGTATCATCA ATCTGGC | 560 | Sweet potato virus C (NC_014742.1) 9641-9661/10200-10181 (Gu et al., PLoS One 2014) |
| SPVC-CP1R | CCATCCATCATCGT CCAAAC | | |
| SPLV-9003F1 | CAAGCCGATGAAAC CATCCTCG | 873 | Sweet potato latent virus (NC_020896.1) 9003-9024/9875-9848 (Jo et al., Scientific Reports 2020) |
| SPLV-9875R1 | ACGCATTCCAAGTA GTGTGTGTATGTTC | | |
| SPV2-IVMV-P1F | TGCTGAAATGGGCA TACTCC | 489 | Sweet potato virus 2 (NC_017970.1) 10026-10045/10514-10493 (Gu et al., PLoS One 2014) |
| SPV2-IVMV-P1R | TGCACACCTCTCAT TCCTAACA | | |
| SPLCV-P1F | GAAGCTATGTCCCG GTTTCAAGAG | 300 | Sweet potato leaf curl virus (NC_004650.1) 425-448/724-703 (Gu et al., PLoS One 2014) |
| SPLCV-P1R | GCCTTCTGTCACGA ATCAACCA | | |

- 주요 마늘 감염 바이러스 중 Garlic virus A (GarVA), Garlic virus C (GarVC), Garlic virus D (GarVD), Garlic latent virus (GarLV), Leek yellow stripe virus (LYSV)를 선별
- 5종 마늘 바이러스의 바이러스 특이적 프라이머를 product 450~920 bp 크기로 디자인함 (표 44)

표 44. 마늘 바이러스 별 RT-PCR 프라이머 세트와 product 증폭 예상 사이즈

| name | sequence | size | reference |
|--------------|---------------------------------|------|---|
| GarVA-7406F1 | ATGAACAATCCTGTTGA TCCGAGC | 756 | Garlic virus A (NC_003375.1) 7406-7429/8161-8135 |
| GarVA-8161R1 | TTAGAACGTGATCATTG GAGGTTTAGG | | |
| GarVC-7115F1 | ATGAGTGGAGACAGCCT ATCTGACGA | 780 | Garlic virus C (NC_003376.1) 7115-7140/7894-7869 |
| GarVC-7894R1 | TCAAAACGTTAACATGA GAGGCTTGG | | |
| GarVD-7176F1 | ATGAATGAACAAGGAAA CACGAGCA | 760 | Garlic virus D (NC_022961.1) 7176-7200/7935-7909 |
| GarVD-7935R1 | GGATGCATTAGAATGTG | | |

| | | | |
|--------------|------------------------------------|-----|--|
| | ATCATTGGAG | | |
| GarLV-7066F1 | CAGCGCTCTAAATTGAT ATTATGACTAACG | 918 | Garlic latent virus (NC_003557.1) 7066-7095/7983-7955 |
| GarLV-7983R1 | TTGATCAACATCGATTC TCTCTGAAATTG | | |
| LYSV-9088F1 | CTGATGGTGTGGTGTAT AGAGAATGG | 459 | Leek yellow stripe virus (NC_004011.1) 9088-9113/9546-9526 |
| LYSV-9546R1 | CTGCATATGCGCACCAT CAAG | | |

- 주요 딸기 감염 바이러스 중 Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV), Strawberry mottle virus (SMoV)를 선별
- 2종 딸기 바이러스의 바이러스 특이적 프라이머를 product 700~800 bp 크기로 디자인함 (표 45)

| name | sequence | size | reference |
|----------|------------------------------|------|---|
| SMYEV-CF | ACAATCGCCCTGGTCAG TAATTCC | 729 | Strawberry mild yellow edge virus (Kwon et al., Res. Plant Dis. 2019) |
| SMYEV-CR | TGGAGCTGGGTAGAAGA AGTGAGA | | |
| SMoV-3UF | CGACAGTTCTCTATGTA GGACACC | 782 | Strawberry mottle virus (Kwon et al., Res. Plant Dis. 2019) |
| SMoV-3UR | CATCTATCTAAAGTTAA GTCTACA | | |

표 45. 딸기 바이러스 별 RT-PCR 프라이머 세트와 product 증폭 예상 사이즈

- 바이러스 진단 키트에는 고구마 바이러스 특이적 프라이머 세트와 One Step RT-PCR pre mix를 제공함
- 바이러스에 감염되었다고 생각되는 샘플에서 total RNA를 추출하여 total RNA 10~100 ng을 준비함
- 바이러스 특이적 프라이머 세트를 2 µl, 2X One Step RT-PCR pre mix를 10 µl를 넣고, 나머지는 RNase free water를 넣어 total volume 20 µl로 맞춤
- 혼합물을 PCR 기계에 넣고 reverse transcription 50°C 30분, initial denaturation 95°C 15 min, denaturation 95°C 20 sec, annealing 52°C 40 sec, extension 72°C 1 min, final extension 72°C 5 min로 설정하고, denaturation부터 extension은 35 cycle로 설정하여 RT-PCR함
- 반응이 끝나면 1.5% agarose gel에서 전기영동으로 증폭된 product를 확인함
- 고구마 5종 바이러스(그림 46), 마늘 5종 바이러스(그림 48), 딸기 2종 바이러스(그림 50) 진단을 위한 원스텝 RT-PCR 진단 키트 시제품 개발 완료
- 원스텝 RT-PCR 진단 키트 매뉴얼 개발 완료(그림 47, 49, 51)

고구마 감염 바이러스 진단을 위한 원스텝 RT-PCR 진단 키트(Lot. OC241018E)
 - 5종 바이러스(SPFMV, SPVC, SPLV, SPV2, SPLCV)



그림 47. 고구마 감염 바이러스 진단을 위한 원스텝 RT-PCR 진단 키트

- 매뉴얼 개발

Virome-HST

고구마 감염 바이러스 진단을 위한
원스텝 RT-PCR 진단 키트

용도

고구마 감염 바이러스의 RNA를 역전사(reverse transcription) 과정을 거쳐 PCR 증폭까지 간편하게 진행할 수 있는 제품입니다. 본 제품은 주요 고구마 감염 바이러스 5종 Sweet potato feathery mottle virus (SPFMV), Sweet potato virus C (SPVC), Sweet potato latent virus (SPLV), Sweet potato virus 2 (SPV2), Sweet potato leaf curl virus (SPLCV)를 각각 특이적으로 증폭시킬 수 있는 프라이머들을 제공합니다.

One Step RT-PCR 내용물 (총 20 reactions)

| 내용물 | 용량 |
|----------------------------|--------|
| SPFMV 특이적 프라이머 | 20 µl |
| SPVC 특이적 프라이머 | 20 µl |
| SPLV 특이적 프라이머 | 20 µl |
| SPV2 특이적 프라이머 | 20 µl |
| SPLCV 특이적 프라이머 | 20 µl |
| 2X One Step RT-PCR pre mix | 200 µl |
| RNase free water | 200 µl |

바이러스 특이적 프라이머(primer)는 각 바이러스의 forward primer (10 pmole/µl) 10 µl와 reverse primer (10 pmole/µl) 10 µl가 포함되어 있습니다.

사용방법

1. 바이러스에 감염되었을 것이라고 생각되는 샘플로부터 추출한 total RNA (template RNA로 사용) 10-100 ng를 준비한다.
2. PCR tube (0.2ml)에 아래 비율에 맞춰 RT-PCR에 필요한 시약(reagent)을 넣는다.

| | |
|--|---------------|
| Template RNA | 대략 1~3µl |
| 바이러스 특이적 프라이머 | 2 µl |
| 2X One Step RT-PCR pre mix | 10 µl |
| 마지막 RNase-free Water를 넣어 총 부피를 20 µl로 맞춘다. | 대략 7 µl ~5 µl |

3. 혼합물을 PCR 기계(예시: Thermal Cycler)에 넣고 반응 온도와 시간을 맞춰 반응시킨다.

| | | | |
|-----------------------|------|--------|-------------|
| Reverse transcription | 50°C | 30 min | X 1 cycle |
| Initial denaturation | 95°C | 15 min | X 1 cycle |
| Denaturation | 95°C | 20 sec | |
| Annealing | 52°C | 40 sec | X 35 cycles |
| Extension | 72°C | 1 min | |
| Final extension | 72°C | 5 min | X 1 cycle |
| 보관온도 | 8°C | ∞ | |

4. 1.5% Agarose gel에 전기 영동을 하여 증폭된 PCR product를 확인한다

각 바이러스별 PCR product 증폭 예상 사이즈

| 바이러스 이름 | 프라이머 정보 | 예상 증폭 사이즈 (bp) |
|------------------------------------|---------|----------------|
| Sweet potato feathery mottle virus | SPFMV | 402 |
| Sweet potato virus C | SPVC | 560 |
| Sweet potato latent virus | SPLV | 873 |
| Sweet potato virus 2 | SPV2 | 489 |
| Sweet potato leaf curl virus | SPLCV | 300 |

주의사항

증폭된 PCR product는 -20°C에 보관하십시오.

그림 48. 고구마 감염 바이러스 진단을 위한 원스텝 RT-PCR 진단 키트 매뉴얼

마늘 감염 바이러스 진단을 위한 원스텝 RT-PCR 진단 키트(Lot. OC241018A)
 - 5종 바이러스(GVA, GVC, GVD, GLV, LYSV)



그림 49. 마늘 감염 바이러스 진단을 위한 원스텝 RT-PCR 진단 키트

- 매뉴얼 개발

Virome-HST

마늘 감염 바이러스 진단을 위한
원스텝 RT-PCR 진단 키트

용도

마늘 감염 바이러스의 RNA를 역전사(reverse transcription) 과정을 거쳐 PCR 증폭까지 간편하게 진행할 수 있는 제품입니다. 본 제품은 주요 마늘 감염 바이러스 5종 Garlic virus A (GVA), Garlic virus C (GVC), Garlic virus D (GVD), Garlic latent virus (GLV), Leek yellow stripe virus (LYSV)를 각각 특이적으로 증폭시킬 수 있는 프라이머들을 제공합니다.

One Step RT-PCR 내용물 (총 20 reactions)

| 내용물 | 용량 |
|----------------------------|--------|
| GVA 특이적 프라이머 | 20 µl |
| GVC 특이적 프라이머 | 20 µl |
| GVD 특이적 프라이머 | 20 µl |
| GLV 특이적 프라이머 | 20 µl |
| LYSV 특이적 프라이머 | 20 µl |
| 2X One Step RT-PCR pre mix | 200 µl |
| RNase free water | 200 µl |

바이러스 특이적 프라이머(primer)는 각 바이러스의 forward primer (10 pmole/µl) 10 µl와 reverse primer (10 pmole/µl) 10 µl가 포함되어 있습니다.

사용방법

1. 바이러스에 감염되었을 것이라고 생각되는 샘플로부터 추출한 total RNA (template RNA로 사용) 10-100 ng를 준비한다.
2. PCR tube (0.2ml)에 아래 비율에 맞춰 RT-PCR에 필요한 시약(reagent)을 넣는다.

| | |
|--|---------------|
| Template RNA | 대략 1~3µl |
| 바이러스 특이적 프라이머 | 2 µl |
| 2X One Step RT-PCR pre mix | 10 µl |
| 마지막 RNase-free Water를 넣어 총 부피를 20 µl로 맞춘다. | 대략 7 µl ~5 µl |

3. 혼합물을 PCR 기계(예시: Thermal Cycler)에 넣고 반응 온도와 시간을 맞춰 반응시킨다.

| | | | |
|-----------------------|------|--------|-------------|
| Reverse transcription | 50°C | 30 min | X 1 cycle |
| Initial denaturation | 95°C | 15 min | X 1 cycle |
| Denaturation | 95°C | 20 sec | X 35 cycles |
| Annealing | 52°C | 40 sec | |
| Extension | 72°C | 1 min | |
| Final extension | 72°C | 5 min | X 1 cycle |
| 보관온도 | 8°C | ∞ | |

4. 1.5% Agarose gel에 전기 영동을 하여 증폭된 PCR product를 확인한다

각 바이러스별 PCR product 증폭 예상 사이즈

| 바이러스 이름 | 프라이머 정보 | 예상 증폭 사이즈 (bp) |
|--------------------------|---------|----------------|
| Garlic virus A | GVA | 756 |
| Garlic virus C | GVC | 780 |
| Garlic virus D | GVD | 760 |
| Garlic latent virus | GLV | 918 |
| Leek yellow stripe virus | LYSV | 459 |

주의사항

증폭된 PCR product는 -20°C에 보관하십시오.

그림 50. 마늘 감염 바이러스 진단을 위한 원스텝 RT-PCR 진단 키트 매뉴얼

딸기 감염 바이러스 진단을 위한 원스텝 RT-PCR 진단 키트(Lot. OC241018D)

- 2종 바이러스(SMoV, SMYEV)



그림 51. 딸기 감염 바이러스 진단을 위한 원스텝 RT-PCR 진단 키트

- 매뉴얼 개발

Virome-HST

딸기 감염 바이러스 진단을 위한
원스텝 RT-PCR 진단 키트

용도

딸기 감염 바이러스의 RNA를 역전사(reverse transcription) 과정을 거쳐 PCR 증폭까지 간편하게 진행할 수 있는 제품입니다. 본 제품은 주요 딸기 감염 바이러스 2종 Strawberry mottle virus (SMoV)와 Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV)를 각각 특이적으로 증폭시킬 수 있는 프라이머들을 제공합니다.

One Step RT-PCR 내용물 (총 20 reactions)

| 내용물 | 용량 |
|----------------------------|--------|
| SMoV 특이적 프라이머 | 20 µl |
| SMYEV 특이적 프라이머 | 20 µl |
| 2X One Step RT-PCR pre mix | 200 µl |
| RNase free water | 200 µl |

바이러스 특이적 프라이머(primer)는 각 바이러스의 forward primer (10 pmole/µl) 10 µl와 reverse primer (10 pmole/µl) 10 µl가 포함되어 있습니다.

사용방법

- 바이러스에 감염되었을 것이라고 생각되는 샘플로부터 추출한 total RNA (template RNA로 사용) 10-100 ng를 준비한다.
- PCR tube (0.2ml)에 아래 비율에 맞춰 RT-PCR에 필요한 시약(reagent)을 넣는다.

| | |
|--|---------------|
| Template RNA | 대략 1~3µl |
| 바이러스 특이적 프라이머 | 2 µl |
| 2X One Step RT-PCR pre mix | 10 µl |
| 마지막 RNase-free Water를 넣어 총 부피를 20 µl로 맞춘다. | 대략 7 µl ~5 µl |

3. 혼합물을 PCR 기계(예시: Thermal Cycler)에 넣고 반응 온도와 시간을 맞춰 반응시킨다.

| | | | |
|-----------------------|------|--------|-------------|
| Reverse transcription | 50°C | 30 min | X 1 cycle |
| Initial denaturation | 95°C | 15 min | X 1 cycle |
| Denaturation | 95°C | 20 sec | X 35 cycles |
| Annealing | 52°C | 40 sec | |
| Extension | 72°C | 1 min | |
| Final extension | 72°C | 5 min | X 1 cycle |
| 보관온도 | 8°C | ∞ | |

4. 1.5% Agarose gel에 전기 영동을 하여 증폭된 PCR product를 확인한다

각 바이러스별 PCR product 증폭 예상 사이즈

| 바이러스 이름 | 프라이머 정보 | 예상 증폭 사이즈 (bp) |
|-----------------------------------|---------|----------------|
| Strawberry mottle virus | SMoV | 782 |
| Strawberry mild yellow edge virus | SMYEV | 729 |

주의사항

증폭된 PCR product는 -20°C에 보관하십시오.

1차년도 공동연구기관 연구결과((주)바이오에프디엔씨)

표 46. 1차년도 연구개발 목표 및 결과 요약((주)바이오에프디엔씨)

| 구분 (연도) | 세부과제명 | 세부연구목표 | 연구개발 수행내용 | 연구결과 |
|--------------------|---|--|--|---|
| 1차 년도 (2020) | 식물 세포 바이오리액 터를 활용한 무병묘 스탁 생산 기술 개발 | 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 프리 캘러스 유도 | 고구마 잎, 엽병부위 소독 후 캘러스 유도 -마늘 잎, 인편, 뿌리 소독 후 캘러스 유도 딸기 잎, 엽병부위 소독 후 캘러스 유도 | 고구마의 잎과 엽병 조직 유래 캘러스 확보 마늘의 잎조직 유래 캘러스 확보 딸기의 엽병 조직 유래 캘러스 확보 |
| | | 작물별, 품종별 세포 배양 배지 조성 개발 | - 8종의 배지에서 고구마 캘러스 유도 3종의 배지에서 마늘 캘러스 유도 -4종의 배지에서 딸기 캘러스 유도 마늘과 고구마 딸기 기내 식물체 확보 딸기 성장점 소독 방법 및 배지조성 개선 필요 | 마늘과 고구마 딸기 식물체의 캘러스 유도 배지 선발 마늘과 고구마 캘러스 라인선발 및 증식 마늘과 고구마 딸기 기내 식물체 확보 딸기 성장점 소독 방법 및 배지조성 개선 필요 |

1차년도 공동연구기관 연구결과 ((주)바이오에프디엔씨)

○ 고구마, 마늘, 딸기 캘러스 유도

- 캘러스 유도를 위한 시료 준비
- 고구마, 마늘, 딸기 캘러스 유도에 적합한 조직을 선발하기 위하여 시료 준비
- 고구마의 진율미와 호감미, 마늘의 홍산과 가담, 딸기의 설향과 매향 품종 확보(그림 52)
- 고구마의 잎과 줄기, 마늘의 잎, 뿌리, 인편, 딸기 잎과 엽병 사용



그림 53. 그림 1. 캘러스 유도조직과 배지선발을 위한 고구마, 마늘, 딸기 시료. A: 진율미 고구마, B: 호감미 고구마, C: 홍산 마늘, D: 가담 마늘, E: 설향 딸기

- 시료별 다양한 조직의 시료 소독

- 시료를 소독하기 위하여 70% 에탄올에 30초간 침지한 후 멸균수로 세척하고 다시 0.3% 차아염소산나트륨(Sodium hypochlorite, Waco, Cat no. 197-02206, Japan)에 20분 간 진탕하여 살균한 후 멸균수로 세척 함(그림 53)

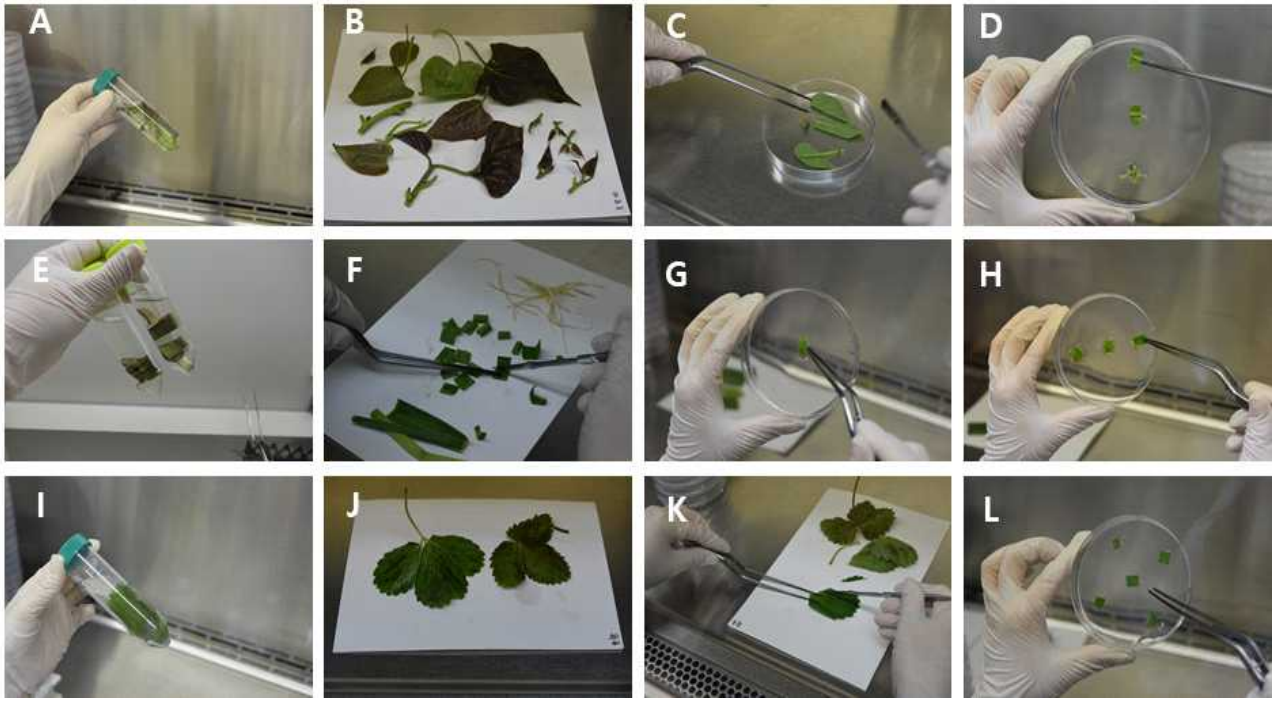


그림 54. 캘러스 유도 시료 소독 및 배지 치상. A~D 고구마 시료, E-H 마늘 시료, I-L 딸기 시료

- 조직 선발을 위한 캘러스 유도 배지제조

· MS 기본 배지에 옥신류의 식물생장조절제(Plant Growth Regulator, PGR) 2,4-D가 함유된 캘러스 유도 기본 배지 제조(그림 54)

- 조직절편 및 캘러스 유도

· 소독 된 조직을 0.5~1cm로 잘라서 배양 배지에 치상한 후 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 조건으로 암배양

- 2~3주 마다 계대배양 하면서 캘러스를 증식하고 재분화 유도에 적합한 조직을 선발

- 조직별 캘러스 유도 결과 조직별

· 고구마의 잎과 엽병을 1mg/L 2,4-D 배지에 치상한 결과 4주 후에 잎과 엽병 조직에서 캘러스 발생

· 마늘의 잎과 인편, 뿌리를 1mg/L 2,4-D 배지에 치상한 결과 11주 후 인편에서 캘러스 발생

· 마늘의 뿌리 조직은 완전히 살균되지 않아서 전체 시료에 오염 발생하므로 뿌리 조직 사용을 위해서 무균식물체 확보 필요

· 딸기의 잎과 엽병 부위를 1mg/L 2,4-D 배지에 치상한 결과 8주 후 엽병 조직에서 캘러스 발생

· 딸기의 잎과 엽병에는 털이 있기 때문에 오염이 다수 발생

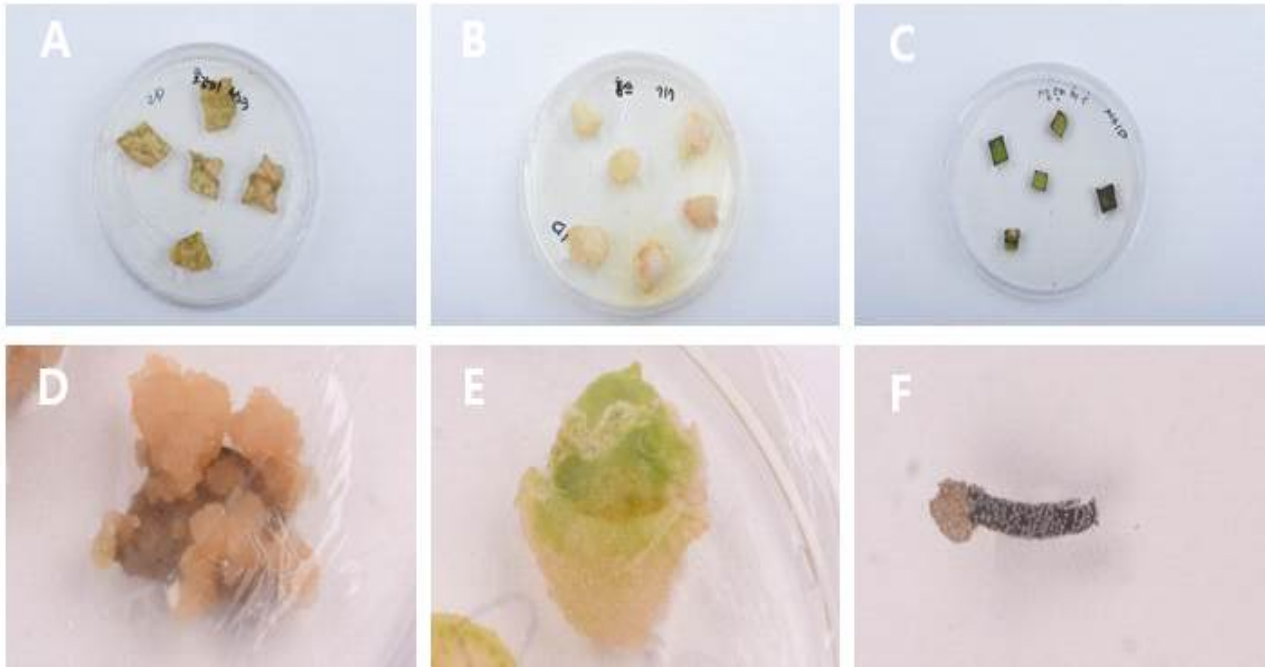


그림 55. 고구마, 마늘, 딸기 캘러스 유도부위 선발을 위한 캘러스 유도. A,D: 고구마 캘러스, B,E: 마늘 캘러스, C-F: 딸기 캘러스

○ 작물별 세포배양 배지조성 개발

- 캘러스 유도 배지조성 선발을 위한 시료 준비

- 고구마에서 캘러스 유도에 적합한 배지를 선별하기 위하여 잎 조직 사용
- 마늘에서 캘러스 유도에 적합한 배지를 선별하기 위하여 인편 조직 사용
- 딸기에서 캘러스 유도에 적합한 배지를 선별하기 위하여 잎과 엽병 조직 사용

- 캘러스 유도용 배지제조

· 고구마 캘러스 유도 배지를 제조하기 위하여 MS 기본 배지에 옥신과 사이토키닌류의 식물생장 조절제가 함유된 배지 10종 제조(표 47)

표 47. 고구마 캘러스 유도를 위한 배지 조성

| 배지번호 | 배지조성 |
|------|--|
| 1 | MS powder+ 3% Sucrose+ NAA 1mg/L+AgNO ₃ 4mg/L+pH5.8 |
| 2 | MS powder+ 3% Sucrose+ NAA 2mg/L+AgNO ₃ 4mg/L+pH5.8 |
| 3 | MS powder+ 3% Sucrose+ BA 2mg/L + NAA 0.1mg/L +pH5.8 |
| 4 | MS powder+ 3% Sucrose+ BA 2mg/L + NAA 1mg/L +pH5.8 |
| 5 | MS powder+ 3% Sucrose+ BA 3mg/L + NAA 3mg/L +pH5.8 |
| 6 | MS powder+ 3% Sucrose+ BA 5mg/L + NAA 0.1mg/L +pH5.8 |
| 7 | MS powder+ 3% Sucrose+ BA 5mg/L + NAA 1mg/L +pH5.8 |
| 8 | MS powder+ 3% Sucrose+TDZ 0.2mg/L+pH5.8 |
| 9 | MS powder+ 3% Sucrose+TDZ 0.4mg/L+pH5.8 |
| 10 | MS powder+ 3% Sucrose+2,D-D 2mg/L+pH5.8 |

· 마늘 캘러스 유도 배지를 제조하기 위하여 MS 기본 배지에 옥신계 식물생장 조절제 2,4-D를 0.5~2mg/L 첨가한 배지 3종 제조(표 48)

표 48. 마늘 캘러스 유도를 위한 배지 조성

| 배지번호 | 배지조성 |
|------|---|
| 1 | MS powder+ 3% Sucrose+2,4-D 0.5mg/L+pH5.8 |
| 2 | MS powder+ 3% Sucrose+2,4-D 1mg/L+pH5.8 |
| 3 | MS powder+ 3% Sucrose+2,4-D 2mg/L+pH5.8 |

· 딸기 캘러스 유도 배지를 제조하기 위하여 MS 기본 배지에 BA와 NAA를 첨가한 배지 6종 제조 (표 49)

표 49. 딸기 캘러스 유도를 위한 배지조성

| 배지번호 | 배지조성 |
|------|--|
| 1 | MS powder+ 3% Sucrose+ BA 1mg/L + NAA 0.1mg/L +pH5.8 |
| 2 | MS powder+ 3% Sucrose+ BA 1mg/L + NAA 1mg/L +pH5.8 |
| 3 | MS powder+ 3% Sucrose+ BA 1mg/L + NAA 2mg/L +pH5.8 |
| 4 | MS powder+ 3% Sucrose+ BA 2mg/L + NAA 0.1mg/L +pH5.8 |
| 5 | MS powder+ 3% Sucrose+ BA 2mg/L + NAA 1mg/L +pH5.8 |
| 6 | MS powder+ 3% Sucrose+ BA 2mg/L + NAA 2mg/L +pH5.8 |

- 고구마 캘러스 유도 결과

- 고구마 캘러스 유도 배지에 치상된 배지는 2주 부터 절단 부위가 부풀어 올라 4주 후 캘러스 발생(그림 55)
- 2,4-D가 포함된 배지에서 유도된 고구마 캘러스는 입자가 작고 수분이 많은 캘러스가 분화
- NAA 단독 또는 BA와 NAA가 포함된 배지에서는 비교적 단단한 캘러스 유도
- TDZ가 포함된 배지에서 유도된 캘러스는 분화 속도가 느리지만 적당한 경도의 캘러스 분화
- 고구마 조직에서 유도된 캘러스는 2~3주 마다 계대배양 하면서 세포라인 선발(표 50, 51)

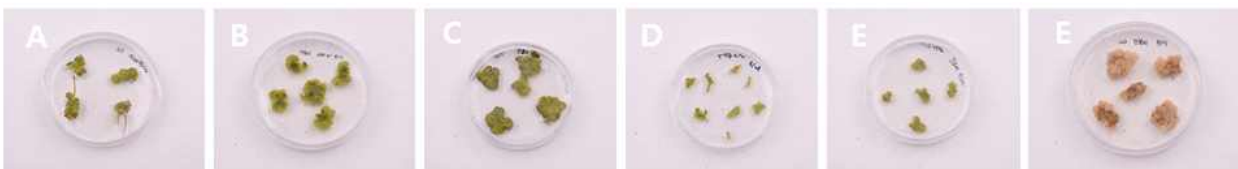


그림 56. 고구마 캘러스 유도 배지에서 유도된 캘러스. A: NAA 1mg/L 첨가 배지, B: BA 2mg/L와 NAA 0.1mg/L 첨가 배지, C: B: BA 5mg/L와 NAA 1mg/L 첨가 배지, D: TDZ 0.2mg/L 첨가배지. E: TDZ 0.4mg/L 첨가배지, F: 2,4-D

표 50. 진을미 고구마 켈러스 유도 결과

| 배지번호 | 조직 | 조직수 | 켈러스발생 | 발생율(%) | 생장량 | 경도 |
|------|----|-----|-------|--------|-------|------|
| 1 | 앞 | 20 | 16 | 80 | ++ | ++++ |
| 2 | 앞 | 22 | 20 | 91 | +++ | +++ |
| 3 | 앞 | 25 | 25 | 100 | ++++ | ++++ |
| 4 | 앞 | 15 | 15 | 100 | +++ | +++ |
| 5 | 앞 | 30 | 30 | 100 | +++ | +++ |
| 6 | 앞 | 15 | 15 | 100 | ++ | ++ |
| 7 | 앞 | 22 | 22 | 100 | ++ | +++ |
| 8 | 앞 | 16 | 12 | 75 | ++ | +++ |
| 9 | 앞 | 15 | 15 | 100 | +++ | +++ |
| 10 | 앞 | 15 | 15 | 100 | +++++ | + |

표 51. 호감미 고구마 켈러스 유도 결과

| 배지번호 | 조직 | 조직수 | 켈러스발생 | 발생율(%) | 생장량 | 경도 |
|------|----|-----|-------|--------|------|------|
| 3 | 앞 | 24 | 24 | 100 | ++++ | +++ |
| 4 | 앞 | 21 | 21 | 100 | +++ | +++ |
| 5 | 앞 | 24 | 24 | 100 | +++ | +++ |
| 6 | 앞 | 22 | 22 | 100 | ++ | ++ |
| 7 | 앞 | 24 | 24 | 100 | ++++ | ++++ |

- 마늘 켈러스 유도 결과

- 가담 마늘의 앞과 인편 조직에서 0.2~2mm 크기의 단단하고 둥근 형태의 켈러스 분화(표 52-53)
- 유도 된 가담 마늘 켈러스는 2~3주마다 계대배양 하면서 재분화에 적합한 라인 선발(표 53)

표 52. 홍산 마늘 켈러스 유도 결과

| 배지번호 | 조직 | 조직수 | 켈러스발생 | 발생율(%) | 생장량 | 경도 |
|------|----|-----|-------|--------|-----|----|
| 1 | 앞 | 12 | 0 | 0 | ND | ND |
| 1 | 인편 | 14 | 0 | 0 | ND | ND |
| 2 | 앞 | 10 | 0 | 0 | ND | ND |
| 2 | 인편 | 8 | 3 | 0 | ND | ND |
| 3 | 앞 | 13 | 0 | 0 | ND | ND |
| 3 | 인편 | 10 | 0 | 0 | ND | ND |

*ND: Not Determined

표 53. 가담 마늘 캘러스 유도 결과

| 배지번호 | 조직 | 조직수 | 캘러스발생 | 발생율(%) | 생장량 | 경도 |
|------|----|-----|-------|--------|------|-------|
| 1 | 잎 | 13 | 0 | 0 | ND | ND |
| 1 | 인편 | 15 | 1 | 7 | ++++ | +++++ |
| 2 | 잎 | 8 | 0 | 0 | ND | ND |
| 2 | 인편 | 14 | 3 | 21 | ++++ | +++++ |
| 3 | 잎 | 20 | 1 | 5 | +++ | ++++ |
| 3 | 인편 | 13 | 2 | 5 | ++++ | +++++ |

*ND: Not Determined

- 딸기 캘러스 유도 결과

- 딸기 조직은 오염으로 유의한 결과를 확보하지 못하였나 설향 딸기의 2mg/L NAA와 1mg BA 배지에서 캘러스 발생(표 54)
- 유의적인 실험결과를 위하여 위해서는 기내 식물체 확보 필요

표 54. 설향 딸기 캘러스 유도 결과

| 배지번호 | 조직 | 조직수 | 캘러스발생 | 발생율(%) | 생장량 | 경도 |
|------|------|-----|-------|--------|------|----|
| 1 | 잎/엽병 | 6 | ND | ND | ND | ND |
| 2 | 잎/엽병 | 5 | ND | ND | ND | ND |
| 3 | 잎/엽병 | 10 | 2 | 20 | **** | ** |
| 4 | 잎/엽병 | 5 | ND | ND | ND | ND |
| 5 | 잎/엽병 | 5 | ND | ND | ND | ND |
| 6 | 잎/엽병 | 15 | ND | ND | ND | ND |

*ND: Not Determined

○ 무균 기내 식물체 확보

- 무균 기내 식물체 확보를 위한 시료 준비
 - 고구마의 기내 식물체를 확보하기 위하여 괴근(Tuberous root) 사용
 - 마늘의 기내 식물체를 확보하기 위하여 마늘의 인편 사용
 - 딸기의 기내 식물체를 확보하기 위하여 딸기의 영양생식 기관인 러너(기는줄기) 사용
- 작물의 생장점 부위 시료 소독
 - 작물의 생장점 부위를 포함하는 조직 소독 후 1/2MS 배지에서 신초와 뿌리 유도
 - 고구마의 괴근에서 발생하는 신초 부위에서 생장점 부위를 포함하는 조직을 채취
 - 마늘의 인편을 소독한 후 소독된 조직에서 생장점 부위를 포함하는 조직을 채취
 - 딸기의 영양생식 기관(러너)에서 생장점 부위를 포함하는 조직을 채취(그림 56)

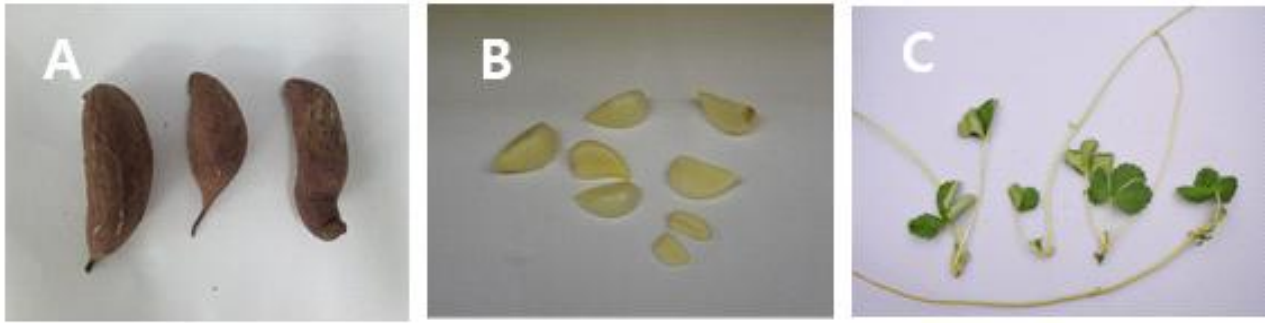


그림 57. 무균 기내 식물체 확보를 위한 시료. A: 고구마 괴근(덩이뿌리), 마늘 인편, 딸기 러너

- 무균식물체 확보를 위한 성장점 부위 배양 결과

- 고구마는 성장점 부위로부터 무균 식물체를 확보 한 후 식물체는 잎을 포함하는 마디를 잘라 삼목하는 방법으로 잎과 줄기 증식(그림 57)
- 고구마 기내 식물체는 잎을 포함하는 마디를 잘라 삼목하는 방법으로 개체를 증식시킨 후 캘러스 유도에 최적화 하기 위하여 암배양(그림 58)
- 마늘은 인편의 성장점 부위에서 싹을 유도한 후 뿌리 조직 증식
- 마늘 기내 식물체는 안정적인 캘러스 유도에 필요한 뿌리 조직을 증식하기 위하여 광배양
- 딸기는 러너의 성장점 부위를 소독하여 잎과 엽병 조직 증식
- 딸기 기내 식물체 배양은 오염율이 높았으며 싹과 뿌리 유도 개선 방법 필요



그림 58. 성장점 부위에서 배양된 식물체 형태의 시료. A: 고구마, B: 마늘, C: 딸기

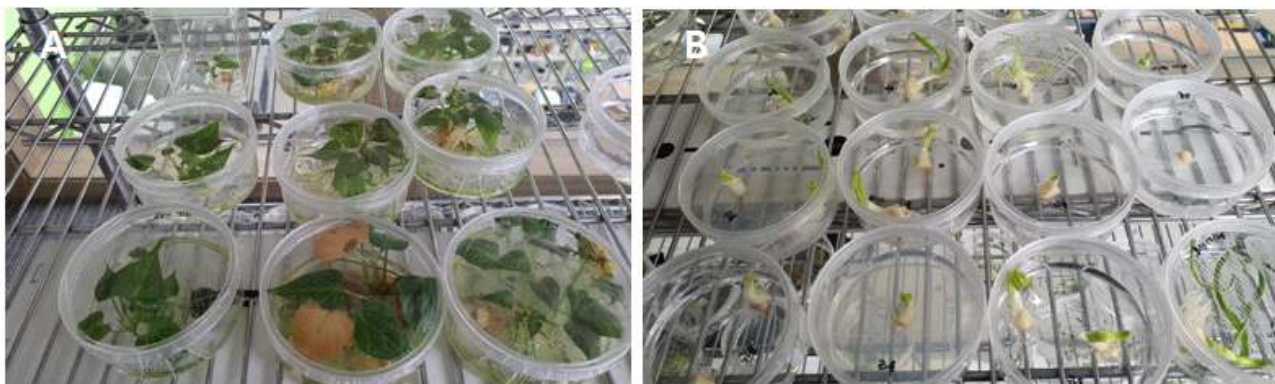


그림 59. 기내 식물체 증식. A: 고구마 기내 식물체 B: 마늘 기내 식물체

2차년도 공동연구기관 연구결과((주)바이오에프디엔씨)

표 55. 1차년도 연구개발 목표 및 결과 요약((주)바이오에프디엔씨)

| 구분 (연도) | 세부과제명 | 세부연구목표 | 연구개발 수행내용 | 연구결과 |
|--------------------|---|---|--|---|
| 2차 년도 (2021) | 식물 세포 바이오리액 터를 활용한 무병묘 스탁 생산 기술 개발 | 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 프리 캘러스 및 식물체 확보 | - 고구마, 마늘, 딸기 바이러 스 검정 및 대량증식 방법 개 발 고구마 성장점 부위 적출 배 양을 통한 바이러스 프리 캘 러스 및 식물체 유도 마늘 성장점과 stem-disc를 배양하여 바이러스 프리 캘러 스 및 식물체 유도 딸기 성장점 배양을 통한 바 이러스 프리 캘러스 및 식물 체 유도 | 고구마, 마늘, 딸기 캘러스를 증식하 고 RT-PCR을 이용하여 바이러스를 검정함 고구마 정단 성장점을 0.2~0.5mm 크 기로 적출하여 2,4-D 처리 배재에서 캘러스 확보 및 BA와 NAA 조합에서 신초 및 캘러스를 마늘 1엽원기를 포함한 정단성장점 배양을 통해 캘러스 및 신초를 확보하 였고, stem-disc배양을 통해 다수의 기내 신초를 확보 딸기 런너 기부의 성장점 배양으로 기 내 식물체 및 캘러스 확보 |
| | | 작물별 동결보존 기초 조건 규명 | - 고구마에서 2종의 dehydration용액을 처리하여 동결보존 기초 조건 확보 - 마늘에서 3종의 dehydration용액을 처리 동결보존 기초 조건 확보 - 딸기에서 2종의 dehydration용액을 처리 동결보존 실험 수행 | - 고구마 1품종(호감미)에서 액체질소 처리 후 TTC 검정을 통해 캘러스 생존한 조건 확보 - 마늘 2품종(가담, 홍산)에서 액체질소 처리 후 TTC 검정을 통해 동결보존 기초 조건 확보 - 딸기 2품종 모두 전처리, Loading 단계까지 캘러스 생존 확인. |

2차년도 공동연구기관 연구결과((주)바이오에프디엔씨)

○ 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 검정 및 대량증식 방법 개발

- 고구마 캘러스 및 재분화 유도

- 고구마 신초배양을 통해 기내 도입된 식물체와 잎조직으로부터 발생된 캘러스를 대량배양 공정 개발을 위해 NAA 5mg/L와 BA 1mg/L 배지에서 증식함 (그림 59)
- 신초배양을 통해 기내 도입된 식물체와 잎조직으로부터 발생된 캘러스의 바이러스 검정을 위하여 3종의 바이러스 검정을 위한 RT-PCR을 수행함 (그림 60)
- 고구마 신초배양과 캘러스 배양을 통해 증식된 조직에서 SPVC와 SPVG 바이러스가 검출되지 않았음
- SPSMV 바이러스는 진을미에서는 검출되지 않았으며 호감미에서는 기내식물과 캘러스 모두에서 검출됨

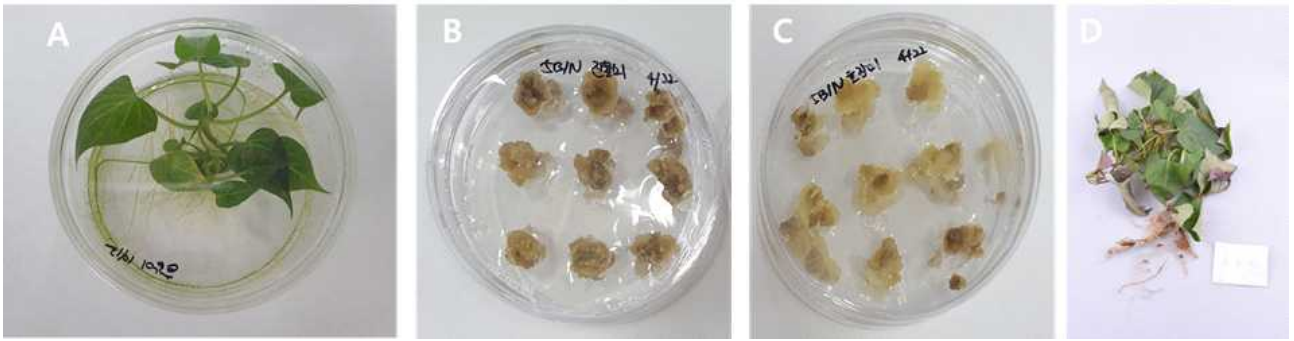


그림 60. 고구마 신초배양 및 캘러스

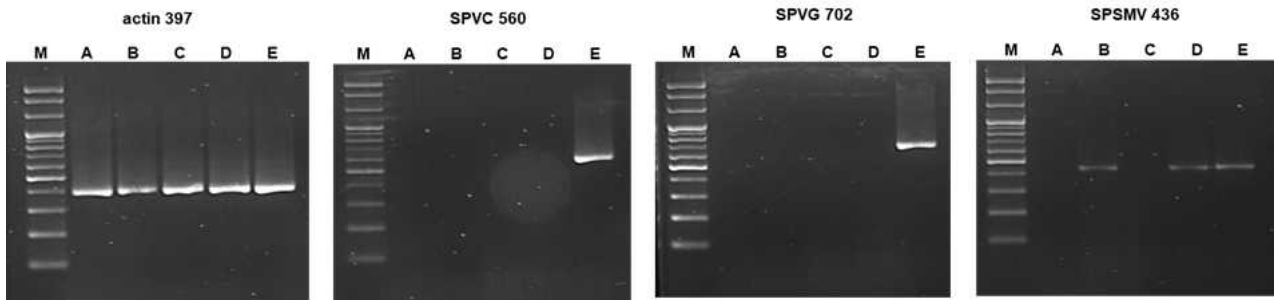


그림 61. 신초배양 기내식물 및 잎에서 유래된 캘러스 바이러스 검정을 위한 RT-PCR

(A) 진율미 기내식물 (B) 호감미 기내식물 (C) 진율미 캘러스(D) 호감미 캘러스(E) 바이러스에 감염된 호감미 식물체(대조구)

- 마늘 캘러스 유도

- 마늘 조직으로부터 발생된 캘러스를 대량배양 공정 개발을 위해 2,4-D 1mg/L 배지에서 증식함
- 마늘 조직으로부터 발생된 캘러스와 생장점을 포함하는 disc 배양을 통해 기내 도입된 식물체에서 RT-PCR을 이용하여 바이러스 검정을 수행함 (그림 61)
- 5종의 바이러스는 disk 배양을 통해 기내 도입된 가담 기내식물체와 캘러스에서 모두 검출되지만 LYSV, OYDV, SLV 바이러스는 캘러스에서 다소 약하게 검출됨
- 홍산 기내식물체와 캘러스에서 GCLV 바이러스는 다소 약하게 검출되고 LYSV, OYDV, SLV 바이러스는 검출되지 않음
- AL 바이러스는 가담 대조구를 포함하여 가담과 홍산 기내식물체와 캘러스에서 모두 검출 됨

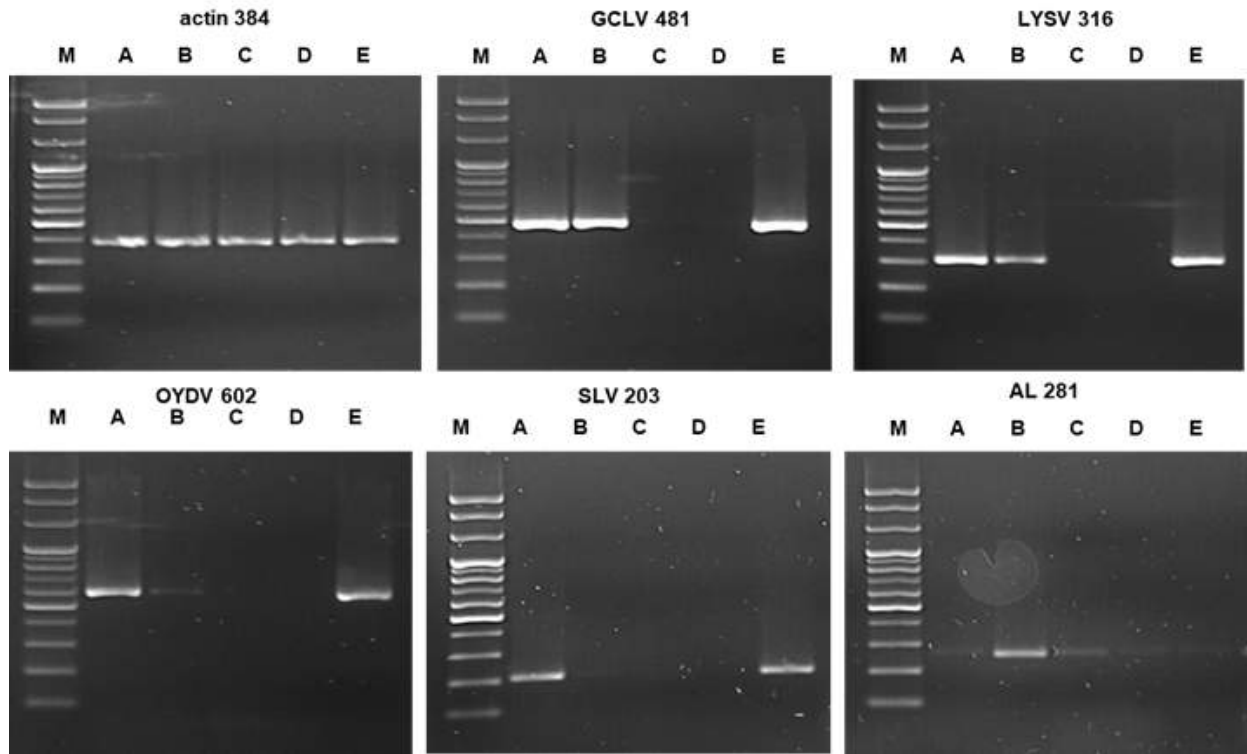


그림 62. 마늘 RT-PCR 검정결과 (A)가담기내식물 (B) 홍산 기내식물 (C) 가담캘러스 (D) 홍산캘러스 (E) 바이러스에 감염된 가담 식물체(대조구)

- 딸기 캘러스 유도

- 딸기에서 캘러스를 유도하기 위하여 매향딸기(A-D)와 설향딸기(E-H) 식물체의 엽병(A,B,E,F)과 잎(C,D,G,H) 조직을 캘러스 유도 배지에 배양함 (그림 62)
- 딸기의 엽병 조직을 2,4-D 1mg/L와 BA 0.2mg/L, 0.5mg/L를 각각 첨가한 1D02B(A,C,E,G)와 1D05B(B,D,F,H) 배지에서 배양한 결과 1D02B배지에서 가장 양호한 결과를 보임
- 딸기 엽병 및 잎에서 발생된 캘러스와 신허 배양을 통해 기내 도입된 식물체의 바이러스 검정을 위해 RT-PCR을 수행함 (그림 63)
- SMoV 바이러스는 캘러스와 기내 식물체에서 검출되고 SMETV 바이러스는 대조구를 포함하여 캘러스와 기내식물에서 검출되지 않았음

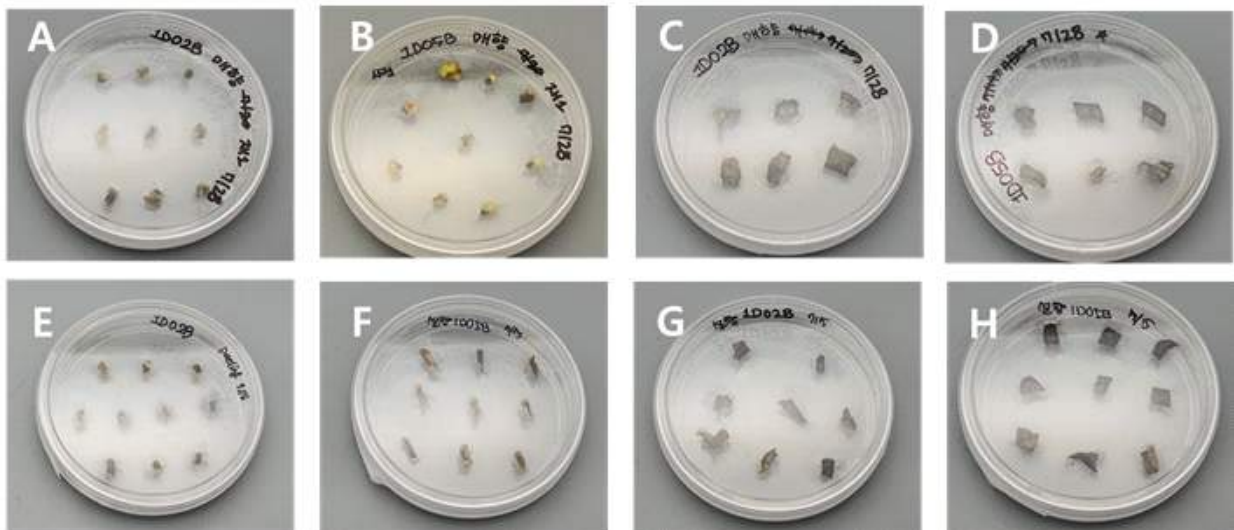


그림 63. 설향과 매향 딸기의 엽병과 잎에서 유도된 캘러스

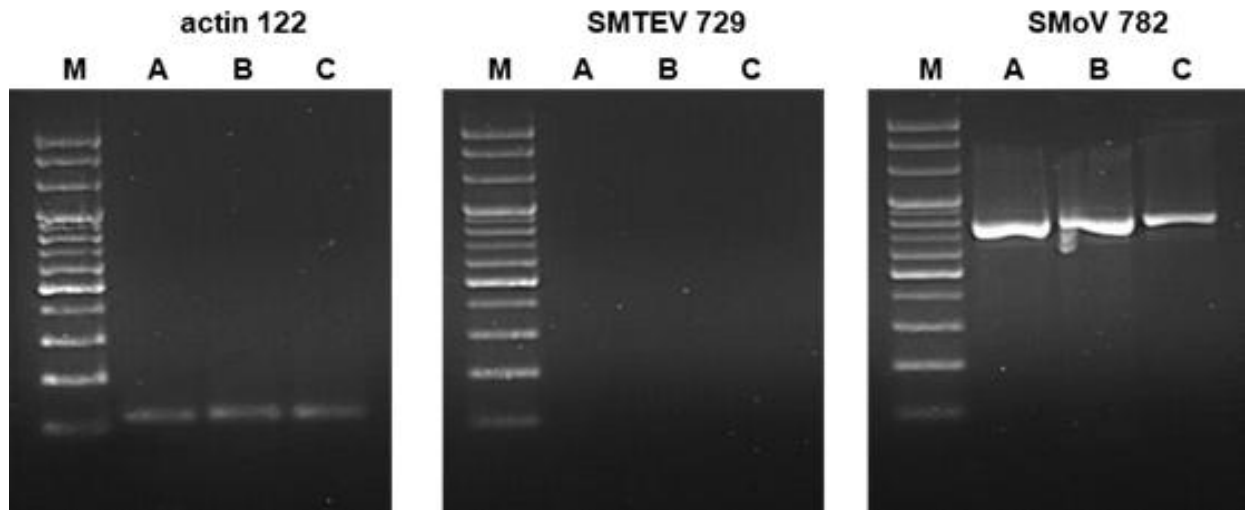


그림 64. 딸기 신초배양 유래 기내식물체(A)와 설향식물체(B, 대조구), 매향식물체(C, 대조구) RT-PCR

○ 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 프리 캘러스 및 식물체 확보

- 고구마 캘러스 및 재분화 유도

- 고구마의 잎과 엽병 조직을 각각 1% NaOCl에서 20분간 소독 함
- 소독된 조직을 0.5~1cm 길이로 잘라 각각 NAA와 BA가 농도별로 단독 또는 혼용 처리된 12종의 배지에 치상 함(그림 64)
- 고구마(진율미)의 캘러스 발생은 NAA를 0.1~5mg/L 사용한 모든 배지에서 대체적으로 양호 함
- 고구마(진율미)의 엽병 조직에서 NAA 0.1mg/L 처리와 NAA 0.1mg/L와 BA 0.1mg/L를 처리한 배지에서 재분화가 가장 양호한 결과를 보임(그림 65)
- 캘러스에서 재분화된 식물체를 발근 배지(1/2 MS)로 옮겨 완전한 식물체로 배양함

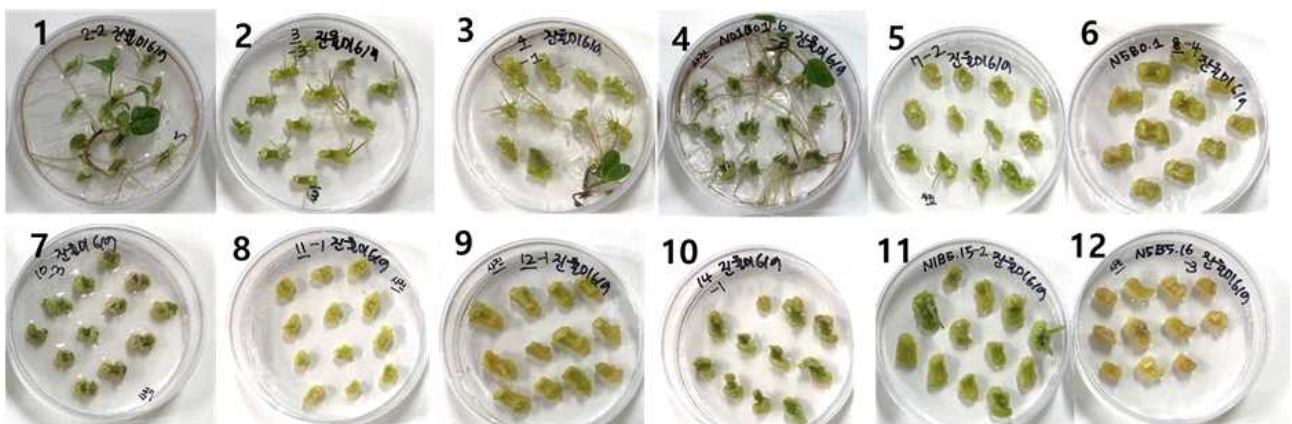


그림 65. 고구마 엽병 부위 캘러스 및 신초 유도

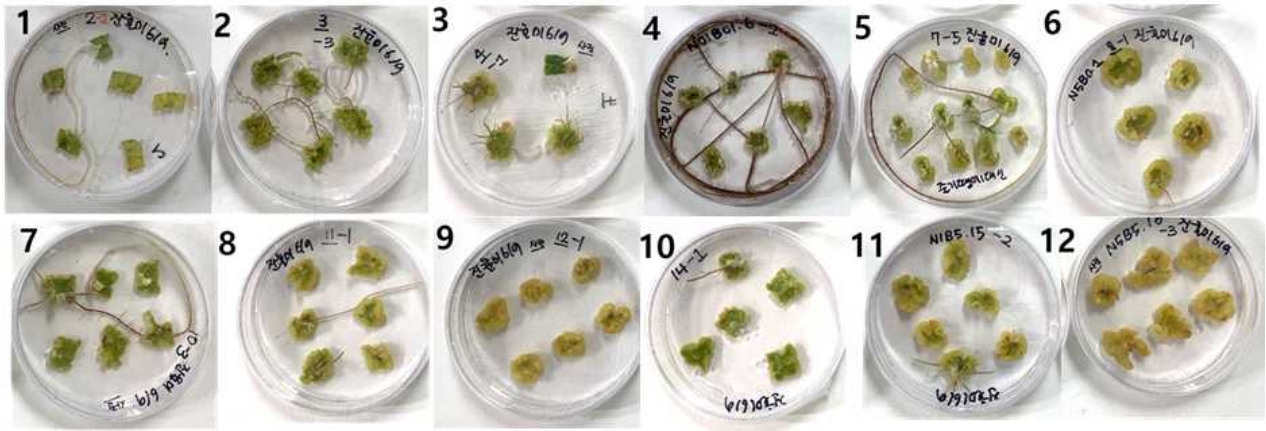


그림 66. 고구마 잎 부위 캘러스 및 신초 유도

- 고구마 성장점 적출 및 배양

- 고구마 정단 부분을 1cm 정도로 자른 후 1% NaOCl에서 30분간 소독(그림 66)
- 클린벤치에서 실체현미경을 사용하여 0.2~0.5mm 크기로 성장점을 적출하여 배지에 치상 함



그림 67. 고구마 정단 부위(좌,중앙)와 실체현미경으로 본 성장점(우)

- 고구마 성장점으로부터 캘러스 유도 및 식물체 유도

- MS 기본 배지에 옥신류의 식물생장조절제(Plant Growth Regulator, PGR) 2,4-D가 함유된 캘러스 유도 기본 배지 제조함
- 적출한 성장점 조직을 배양 배지에 치상한 후 25±2℃ 조건으로 암배양 함
- 고구마 성장점 배양에서 호감미의 경우 배양 8주시 모든 처리구에서 1~3mm크기의 캘러스가 유도되었으며 처리별 효과가 뚜렷하지 않으나, 육안 관찰시 1mg/L 2,4-D 배지에서 가장 양호한 결과를 보임
- 고구마 성장점 배양에서 진올미의 경우 배양 5주차에 관찰한 결과 모든 처리구에서 캘러스가 유도 되었으며, 2,4-D를 5mg/L 처리한 배지에서 가장 양호한 결과를 보임
- 성장점에서 유래한 캘러스 재분화를 위하여 고구마의 성장점에서 유도한 캘러스를 배양함

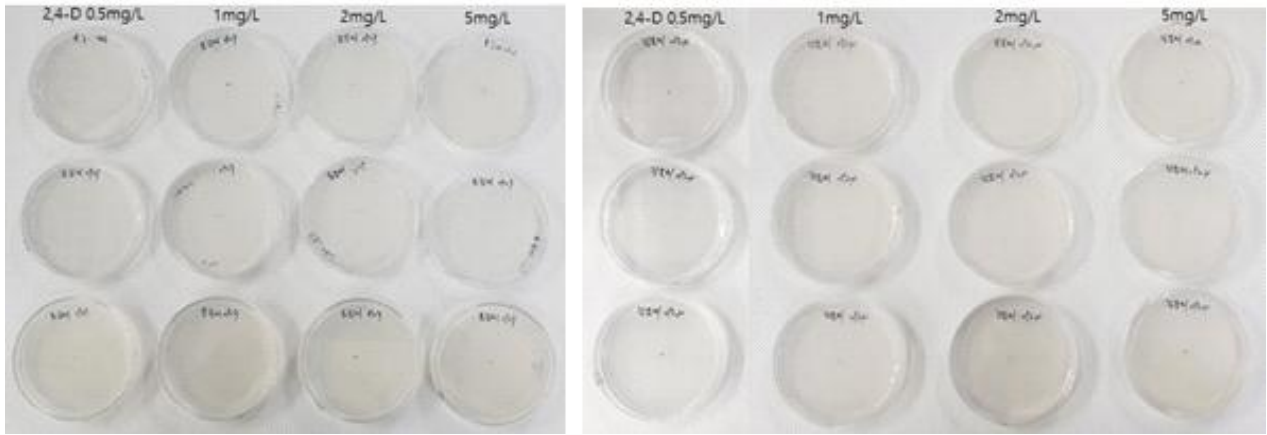


그림 68. 2,4-D 농도별 성장점배양. 호감미(좌), 진율미(우)

- 고구마 성장점 배양에서 BA 2mg/L와 NAA 0.1mg/L 처리구에서 배양시 캘러스 와 식물체 모두가 유도됨(그림 67)

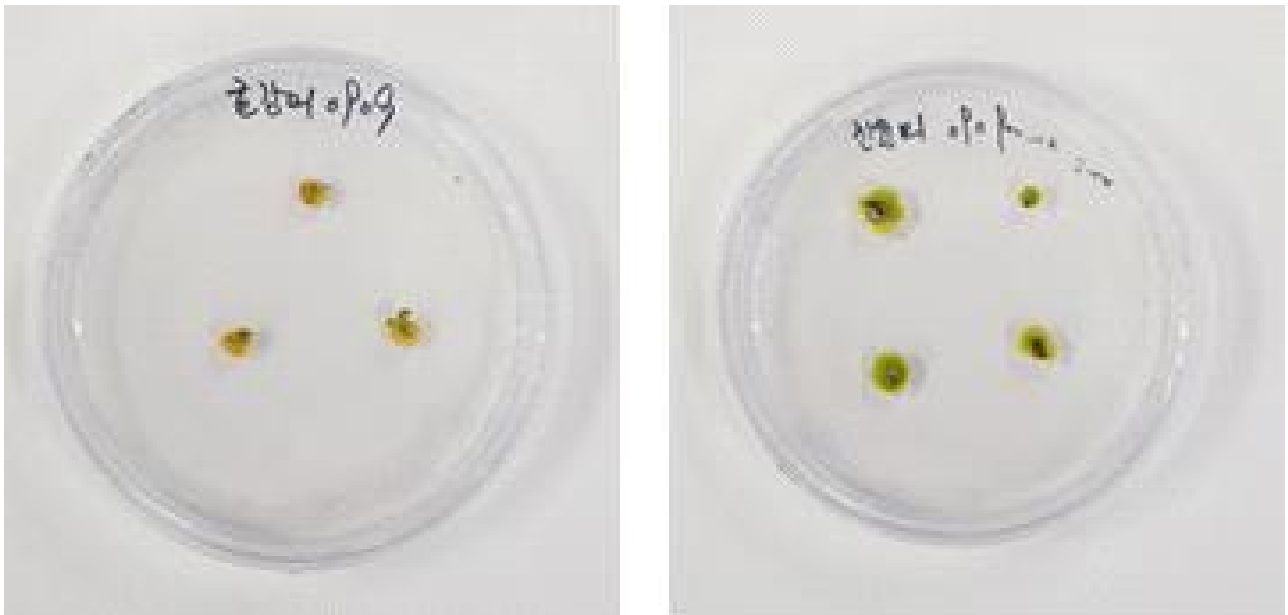


그림 69. 성장점 유래 고구마 캘러스(좌)와 재분화(우)

- 고구마 기내식물체 바이러스검정을 통한 바이러스 프리 식물체 확보
- 고구마 캘러스로 부터 재분화된 기내식물(진율미)과 엽원기를 포함한 성장점 배양으로부터 유도된 기내식물(호감미)의 바이러스를 RT-PCR 방법으로 검정함(그림 68, 69)
- 검정결과 캘러스로부터 재분화된 진율미 품종에서는 바이러스 프리 식물체를 확보하였으며, 호감미의 경우 모식물체는 SPVC와 SPSMV에 감염되어 있었으며, 성장점배양을 통해 SPVC는 제거되었으나, SPSMV는 제거 되지 않아 추 후 엽원기를 포함하지 않은 성장점 배양 및 캘러스 유도 배양 및 재분화를 수행하여 바이러스 프리 식물체를 확보할 계획임(그림 70)



그림 70. 캘러스 재분화된 진음미 기내식물체(좌)와 생장점에서 유도된 호감미 기내식물체(우)

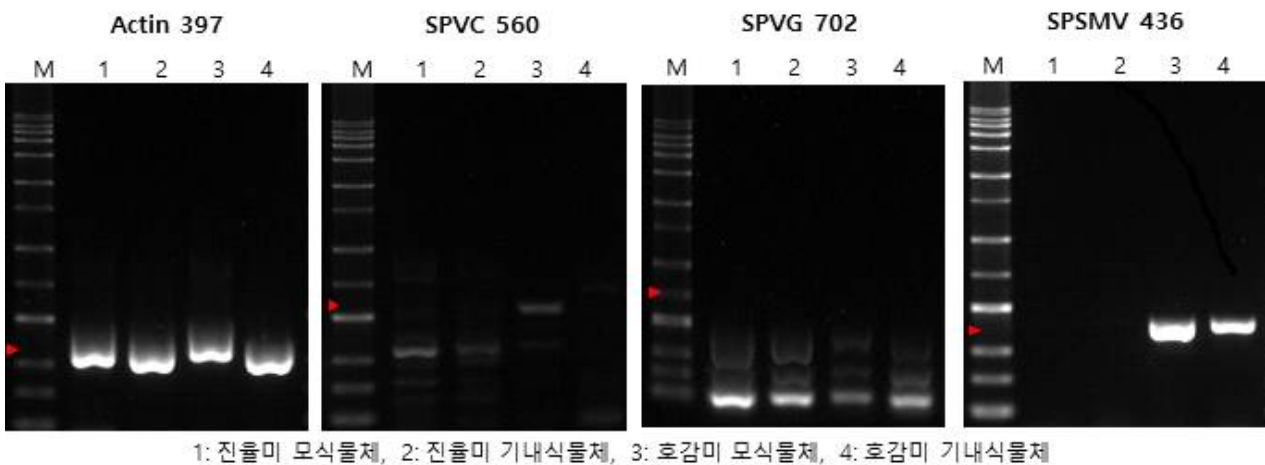


그림 71. 고구마 기내식물체 및 RT-PCR 검정 결과

- 마늘 생장점 적출 및 stem-disc 배양

- 마늘 인편 분리하여 껍질을 모두 제거한 후 1% NaOCl에서 30분간 소독하고 수회 멸균수로 세척 함(그림 71)
- 클린벤치에서 실체현미경을 사용하여 인편 하부에 위치한 생장점을 엽원기가 1개 포함된 0.2mm 크기로 생장점을 적출하였으며, 생장점 적출 후 하부에 있는 stem-disc를 가로, 세로 5mm 크기로 잘라내어 캘러스 유도 및 기내 신탠 유도배지에 치상 함

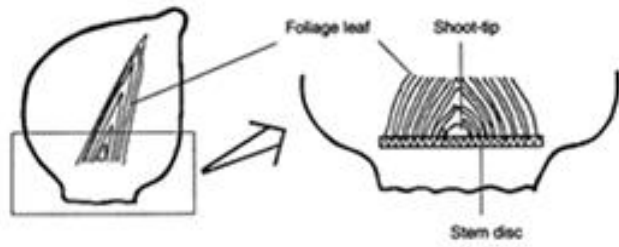


그림 72. 마늘 인편의 성장점과 stem-disc

- 마늘 성장점과 stem-disc로부터 캘러스 유도 및 식물체 유도
- 성장점으로부터 캘러스 유도를 위해 MS 기본 배지에 2,4-D가 함유된 캘러스 유도 기본 배지 제조하였고, 식물체 유도를 위해 BA와 IAA가 조합된 신초유도를 배지를 조제 함
- 적출한 성장점과 stem-disc는 배양 배지에 치상한 후 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 조건으로 명배양 함
- 마늘 성장점 배양에서 바이러스 프리 캘러스 유도를 위해 2,4-D 0.5 ~ 5mg/L 처리 시 가담마늘과 홍산마늘 두 품종 모두 배양 6주 후 모든 처리구에서 캘러스가 유도되기 시작하였으나, 0.5mg/L 처리구에서는 다른 처리구에 비해 캘러스 유도가 잘 이뤄지지 않았으며, 1mg/L와 2mg/L배지에서 가장 양호한 결과를 보임(그림 72)
- 성장점과 stem-disc 배양에서는 BA 2mg/L + NAA 0.1mg/L 조합과 BA 1mg/L + IAA 0.2mg/L에서 신초가 유도 되었으며, BA, NAA 조합에서는 성장점에서는 신초가 유도되지 않았으며, stem-disc에서 유도된 신초도 유리화되었으나, BA, IAA조합에서는 성장점과 stem-disc 모두에서 건전한 신초가 유도되었으며, 하나의 stem-disc에서 다수의 신초가 유도되어 기내식물체 대량 증식에 활용 가능함(그림 73, 74)

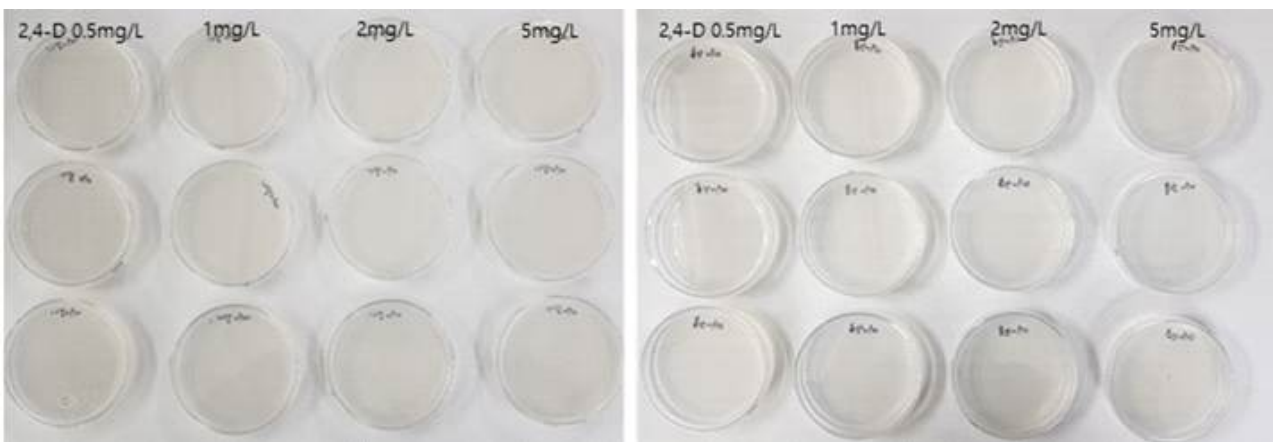


그림 73. 마늘성장점 배양 6주차 2,4-D 농도별 캘러스 유도

좌: 가담마늘 우: 홍산마늘

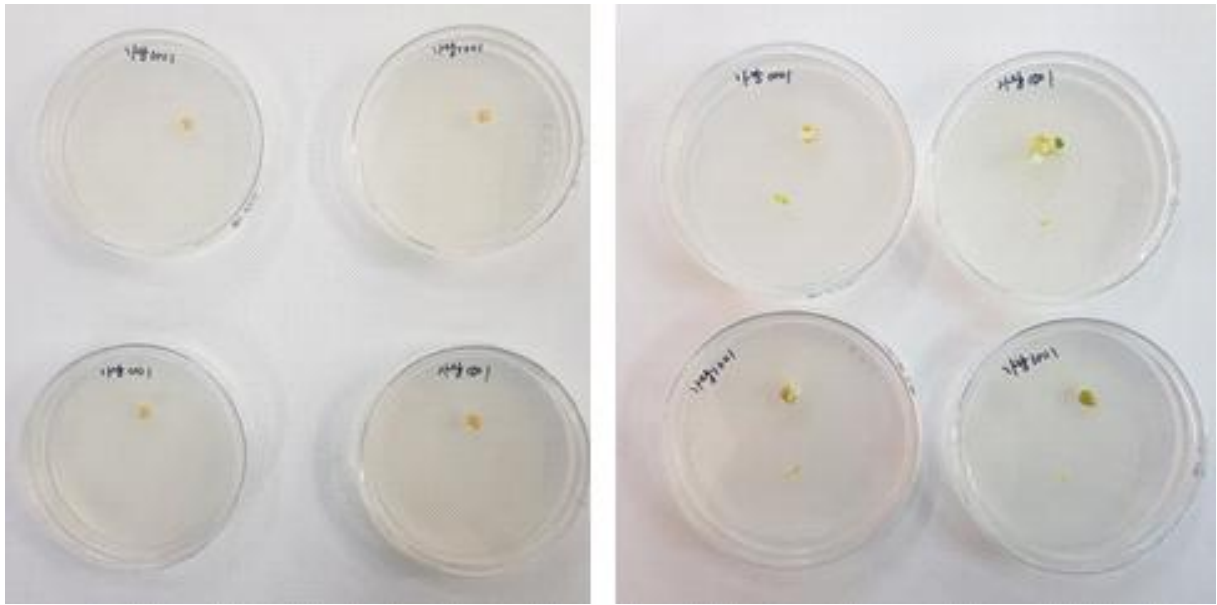


그림 74. 배지에 치상된 성장점과 stem-disc(좌)에서 배양 3주 후 신초가 유도된 모습(우)

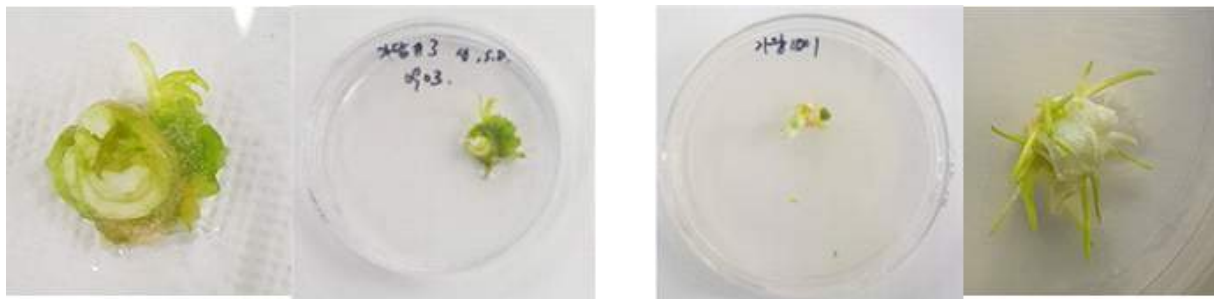
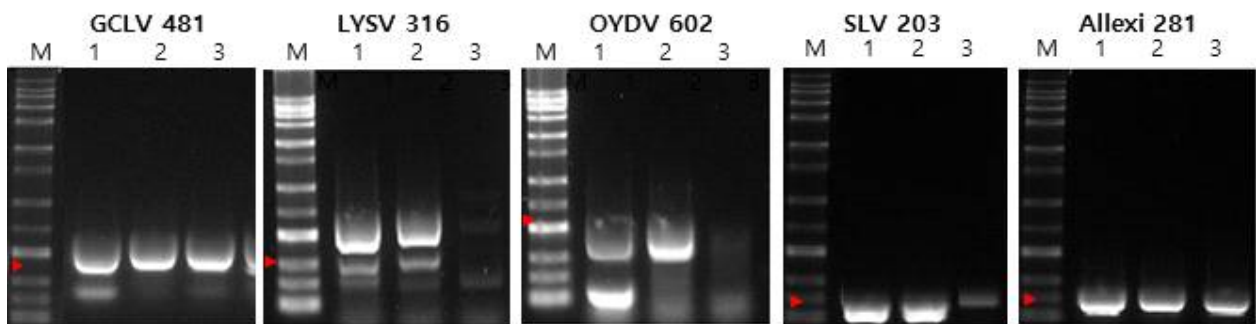


그림 75. Stem-disc에서 유도된 유리화된 신초(左) 및 건전한 신초(右)

- 마늘 stem-disc배양에서 바이러스 제거 효과확인

- 가담마늘과 홍산마늘의 stem-disc배양 기내식물체의 바이러스 검정을 위해 RT-PCR을 수행함 (그림 75)
- GCLV 등 5종의 바이러스 검정 결과 OYDV는 모식물체와 2종의 기내 식물체 모두에서 감염되지 않았음을 확인하였고 LYSV는 홍산기내식물체에만 감염되지 않았음을 확인함
- stem-disc배양을 통해서 바이러스 제거효과가 낮은 것으로 사료됨
- 성장점 배양을 통해 유도된 캘러스 바이러스 검정을 위해 RT-PCR 수행



1: 마늘 모식물체, 2: 가담 기내식물체, 3: 홍산 기내식물체

그림 76. Stem-disc에서 유도된 기내식물체 RT-PCR결과

- 딸기 성장점 적출 및 배양

- 딸기 런너의 하부의 있는 성장점이 포함된 부분을 1% NaOCl에서 30분간 소독후 멸균수로 수회 세척 함(그림 76)
- 클린벤치에서 실체현미경을 사용하여 0.2mm 크기로 성장점을 적출하여 배지에 치상 함



그림 77. 딸기 런너의 성장점 포함 부위(좌) 및 실체현미경으로 본 딸기의 성장점(우)

- 딸기 성장점으로부터 식물체 유도

- 1/2 MS를 기본 배지로 하여 사이토카닌류의 식물성장조절제(Plant Growth Regulator, PGR) BA가 함유된 식물체 유도 기본 배지 제조함(그림 77)
- 적출한 성장점 조직을 배양 배지에 치상한 후 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 조건으로 암배양 함
- 딸기의 경우 성장점 배양에서 설향 및 매향 모두 모든 처리구에서 식물체가 유도되었으며, BA 0.5mg/L처리구에서 가장 좋은 생육상태를 보임

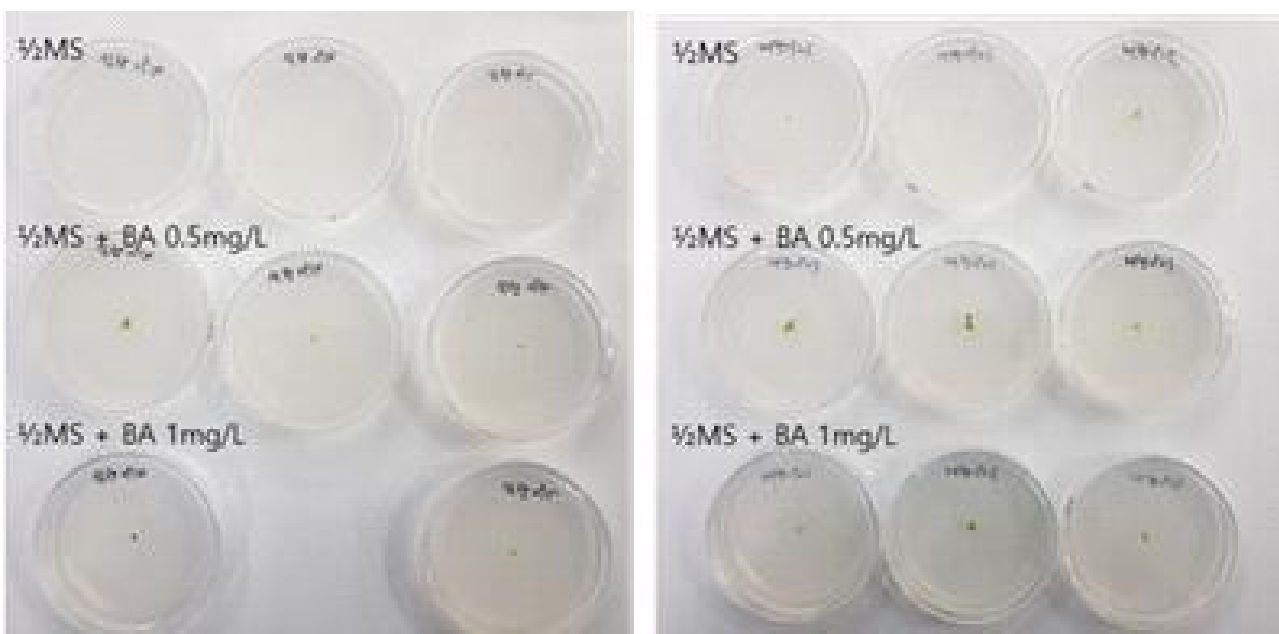


그림 78. 딸기 성장점배양 5주 후 BA농도별 유도된 식물체. 좌:설향, 우:매향

- 딸기 성장점으로부터 바이러스 프리 식물체 확보
- 1/2 MS를 기본 배지에 성장점을 6주 배양하여 기내 식물체 확보하였으며, 확보된 기내 식물체를 RT-PCR을 이용하여 바이러스 검정을 수행함(그림 78)
- 4종의 바이러스 검정결과 딸기 샘플에서 SMoV가 감염된 것을 확인하였으나, 기내식물체에서는 4종의 바이러스에 감염되지 않은 것으로 나와 성장점 배양을 통한 바이러스 제거된 것을 확인 함



그림 79. 성장점배양에서 유도된 기내 식물체

- 딸기 성장점배양에서 바이러스 제거 효과확인
- 매향과 설향 딸기 캘러스의 바이러스 검정을 위해 RT-PCR을 수행함(그림 79)

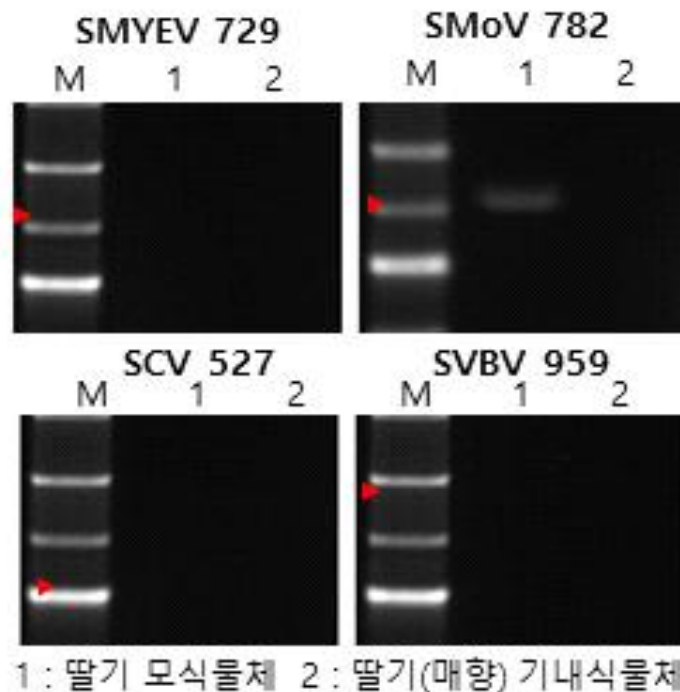


그림 80. RT-PCR을 이용한 바이러스 검정결과

○ 작물별 동결보존 기초 조건 확립

- Vitrification 법을 이용한 동결보존 과정

· 캘러스를 10% Sucrose 전처리 용액에 3시간 배양 후 전처리 용액을 제거하고 Loading solution에 30분간 Loading 처리를 실시함(그림 80)

· Loading용액을 제거하고 DH1, PVS2, PVS3 용액에서 다양한 시간으로 dehydration 처리 후 액체 질소에서 1일 이상 동결보존을 실시 함

· 액체질소에 꺼낸 후 42℃에서 1분간 신속히 해동 후 Unloading 용액에서 30분간 처리 후 2% TTC 용액으로 염색하여 생존유무를 판단 함

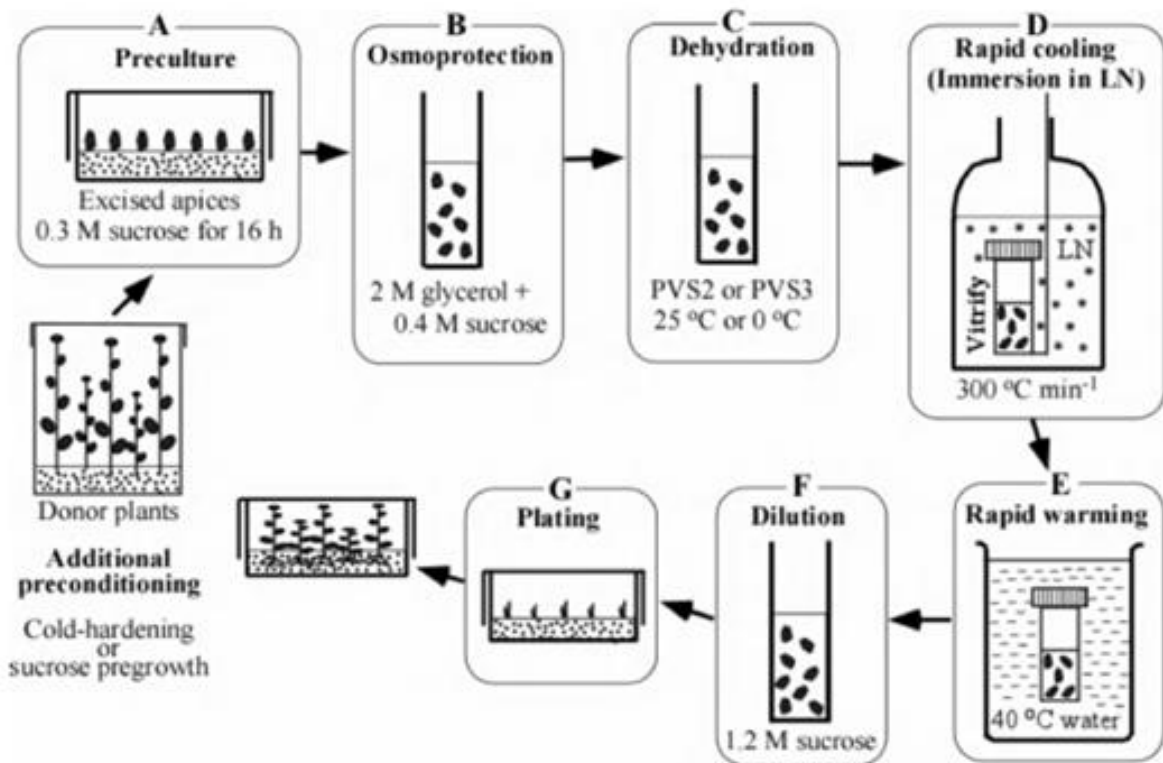


그림 81. PVS-base vitrification 동결보존 과정

- 동결보존 실험에 사용된 용액의 조성

· Pre-Culture : MS배지 + 10% Sucrose, pH5.8

· Loading solution : 17.5% Glycerol + 17.5% Sucrose

· DH1(Dehydration solution 1) : 37.5% Glycerol(w/v) +15% DMSO(w/v) + 15% Ethylen glycol(w/v) + 22.5% Sucrose

· PVS2 (Preservation vitrification solution 2) : 30% Glycerol(w/v) +15% DMSO(w/v) + 15% Ethylen glycol(w/v) + 22.5% Sucrose

· PVS3 (Preservation vitrification solution 3) : 50% Glycerol(w/v) + 50% Sucrose

· Unloading solution : MS배지 + 30% Sucrose, pH5.8

- 고구마 동결보존 기본조건 확립

- 고구마 캘러스를 전처리와 loading 처리 후 dehydraton과정에서 3가지 처리 (DH1용액에서 40분, PVS2용액에 30분, 60분)하여 동결보존을 실시함
- 고구마에서 Loading 처리까지는 생존하였으나, Dehydration 처리 후 대부분 세포 활력이 떨어졌으며, 해동 및 unloading후 TTC검정에서 진율미의 경우 발색이 되지않아 생존한 세포가 없었으며, 호감미의 경우 PVS2 60분 처리한 캘러스는 생존함(그림 81, 82)

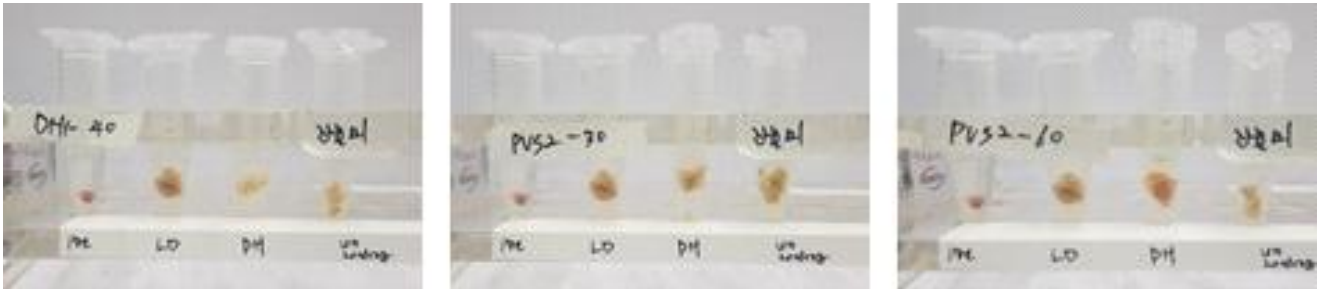


그림 82. 진율미 동결보존에서 각 처리 단계별 TTC 염색 결과



그림 83. 호감미 동결보존에서 각 처리 단계별 TTC 염색 결과

- 마늘 동결보존 기본조건 확립

- 마늘 캘러스를 전처리와 loading 처리 후 dehydraton과정에서 4가지 처리 (DH1용액에서 40분, PVS2용액에 30분, 60분, PVS3용액 80분)하여 동결보존을 실시함(그림 83)
- 마늘의 경우 동결보존 각 단계별 처리 후 TTC 검정시 모두 발색되어 액체질소 보관 전까지 모든 처리구에서 세포가 생존하였으며, 액체질소 꺼내어 해동과 unloading 후 TTC 검정에서 가담마늘은 DH1, PVS2 60분처리구에서, 홍산마늘은 DH1, PVS2 60분, PVS3 80분 동결보존에 성공하였다. 추가 실험을 통해 마늘에 최적 동결보존 조건을 확립할 계획임(그림 84)

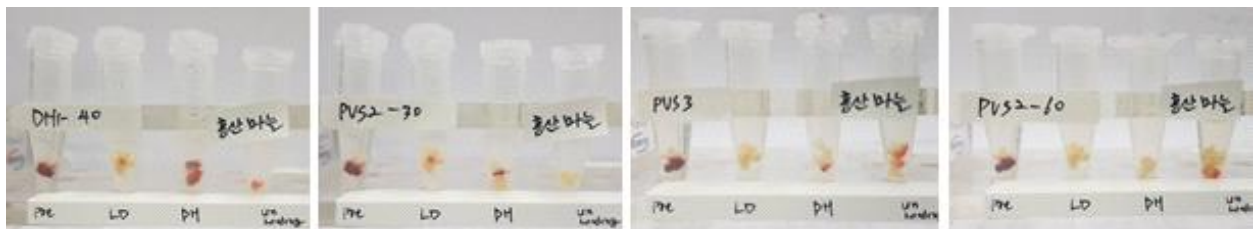


그림 84. 홍산마늘 동결보존에서 각 처리 단계별 TTC 염색 결과

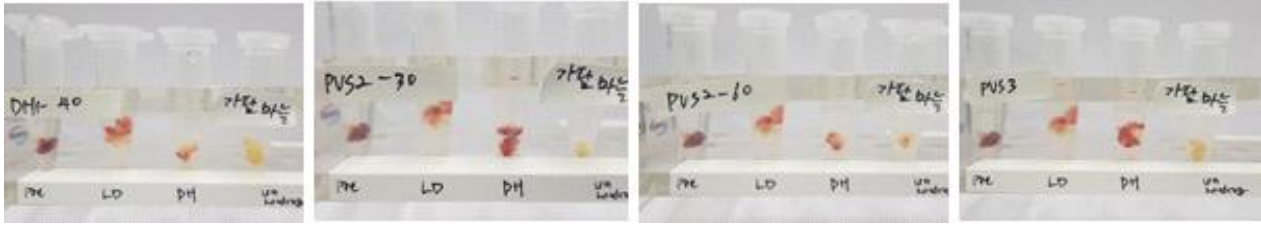


그림 85. 가담마늘 동결보존에서 각 처리 단계별 TTC 염색 결과
호

- 딸기 동결보존 기본조건 확립

- 딸기 캘러스를 전처리와 loading 처리 후 dehydration과정에서 3가지 처리 (DH1용액에서 40분, PVS2용액에 30분, 60분)하여 동결보존을 실시함
- 딸기에서 Loading 처리까지는 생존하였으나, Dehydration 처리 후 대부분의 캘러스에서 발색이 되지 않았으며 매향 PVS2 60분 처리구에서 약간의 발색이 되었으며, 해동 및 unloading후 TTC 검정에서 모든 처리구에서 생존한 캘러스는 없음(그림 85, 86)
- 매향의 경우 PVS2에서 일부 생존한 것으로 보아 전처리, loading 처리에 조건을 다양화하여 추가 실험을 진행할 계획임

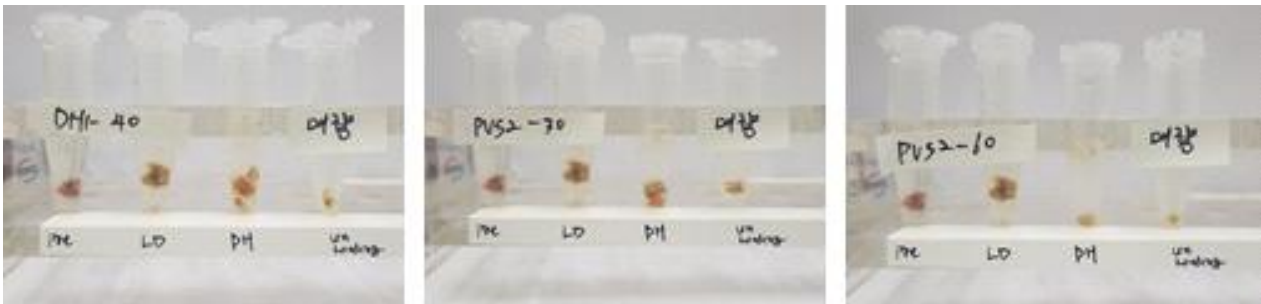


그림 86. 매향 동결보존에서 각 처리 단계별 TTC 염색 결과

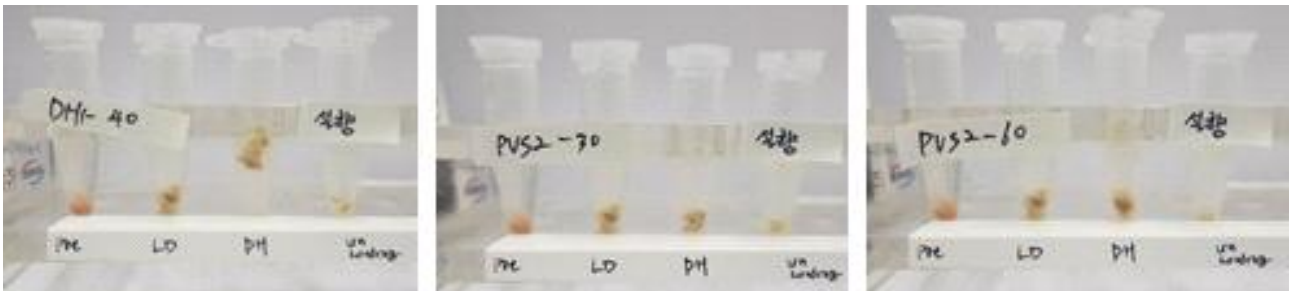


그림 87. 설향 동결보존에서 각 처리 단계별 TTC 염색 결과

- 품종별 동결보존 조건 요약

-196°C 액체질소에서 식물세포를 장기보존을 위한 동결보존 방법에는 간편법 (simple method), 유리화법 (Vitrification method), 캡슐 건조법 (encapsulation dehydration method), 캡슐 유리화법 (Encapsulation vitrification method) 등이 있음

본 연구에서 사용한 방법은 가장 많이 사용되고 있는 유리화법을 이용하여 동결보존 조건 확립하였음.

유리화법은 캘러스를 Pre-culture 후 삼투스트레스를 줄이기 위한 Loading 처리 후 액체 질소에 동결보존 전 세포내 수분제거를 위한 탈수과정(dehydration)을 거친 후 액체 질소에 보관하고 해동과정을 거쳐 TTC염색을 통해 생존을 확인 또는 고체배지로 계대하여 배양하였음.

유리화법을 이용한 동결보존에서는 탈수처리에서 동결보존액의 종류와 처리시간이 가장 중요한 조건이며 본 실험에서는 3종의 동결보존액 (PVS2, PVS3, DH1)에서 60분, 80분, 120분 처리하여 품종별 최적 생존 조건을 확인하였음.

- 마늘 (가담재래, 홍산)

10% sucrose가 포함된 MS배지에서 3시간이상 상온에서 pre-culture 후 2M glycerol과 0.4M sucrose가 포함된 Loading solution에서 20분간 처리 후 PVS2 용액에서 60분간 탈수 (dehydration) 처리시 가담재래종과 홍산 두품종 모두 캘러스 생존을 확인하여 액체질소를 이용한 초저온 동결보존을 통한 장기 보존이 가능함을 확인함.

- 고구마 (진율미, 호감미)

10% sucrose가 포함된 MS배지에서 3시간이상 상온에서 배양 후 2M glycerol과 0.4M sucrose가 포함된 Loading solution에서 20분간 처리 후 호감미 캘러스는 PVS2 용액에서 60분간 탈수 (dehydration) 처리시 진율미는 PVS3 용액에서 80분간 탈수시 캘러스 생존을 확인하였음.

- 딸기 (설향, 매향)

10% sucrose가 포함된 MS배지에서 3시간이상 상온에서 배양 후 2M glycerol과 0.4M sucrose가 포함된 Loading solution에서 20분간 처리 후 설향품종은 PVS3 용액에서 80분간 탈수처리시 매향 품종은 DH1 용액에 60분가 처리시 캘러스 생존을 확인하여 초저온 동결보존조건을 확립하였음.

3차년도 공동연구기관 연구결과((주)바이오에프디엔씨)

표 56. 3차년도 연구개발 목표 및 결과 요약((주)바이오에프디엔씨)

| 구분 (연도) | 세부과제명 | 세부연구목표 | 연구개발 수행내용 | 연구결과 |
|--------------------|---|---|--|--|
| 3차 년도 (2022) | 식물 세포 바이오리액 터를 활용한 무병묘 스탁 생산 기술 개발 | 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 프리 캘러스 및 식물체 확보 | - 바이러스 검정을 통한 virus free line 확보 - 마늘 재분화 기초 조건 확인 - 항바이러스제 처리를 통한 Virus free 스탁 확보 | - 호감미 바이러스 프리 라인 확보는 못하였지만 SPSMV 단일감염 라인확보 - 진울미, 설향, 매향에서 Virus에 감염되지 않은 free라인을 확보 - 가담재래마늘과 홍산마늘 callus 재분화 실험에서 두품종 모두 BA 3mg/L와 IAA 0.3mg/L가 첨가된 배지에서 신초 재분화 확인 - SPSMV가 단일감염된 호감미 callus를 항바이러스제인 Ribavirin을 농도별 처리시 100mg/L 처리구에서 감소하는 경향을 보였으나, 생육도 저하됨 |
| | | 작물별 동결보존 기초 조건 규명 | - 3개 작물 6품종에 대한 동결보존 조건 확립 | Dehydration용액으로 PVS3 solution 80분 처리구에서 TTC검정시 생존한 캘러스 확인 |
| | | 바이오리액터 를 이용한 대량 생산기술 개발 | - 고구마 virus free line 바이오리액터를 이용한 대량 배양 조건 확립 | - 확보된 virus free 진울미 캘러스를 2,4-D 0.5mg/L가 첨가된 MS액체배지에 현탁배양 후 3L 바이오리액터에 접종 배양조건 확립. 5L 바이오리액터로 scale up하여 대량 배양. |
| | | 무병묘 상업화 | -확보된 바이러스 프리묘 대량증식 및 공급을 통한 사업화 | 고구마, 딸기 바이러스 프리 기내 식물체를 대량 증식하여 기내 프리묘를 유니플랜트에 공급하여 상업화 |

3차년도 공동연구기관 연구결과 ((주)바이오에프디엔씨)

1. 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 프리 캘러스 및 식물체 확보

1) 바이러스 검정을 통한 virus free line 확보)

○ 고구마 바이러스 프리 캘러스 및 식물체 확보

·고구마 성장점 배양을 통해 확보된 호감미, 진울미 캘러스 및 기내식물체를 RT-PCR을 이용한 바이러스 검정을 실시하였다.

·호감미의 경우는 기내식물체 6개 line과 callus 11개 line에 대해 감염된 4종의 고구마 virus(SPSMV, SPVC, SPVG, SPVE)에 대해 RT-PCR 검정 수행 하였다. 기내식물체, 캘러스 모두 에서 SPVC, SPVG, SPVE 바이러스는 검출되지 않았으나, SPSMV 1종에 감염된 것을 확인하였다(그림 87, 88). 확보된 저감염 line은 NGS기반 바이러스 검정에서 SPSMV가 검출되지 않아 식물체를 대량 증식하였다.



그림 88. 호감미 기내식물체 RT-PCR 결과. M : dyne 1kb plus ladder, 1~6:호감미 기내식물체 line #1 ~ #6

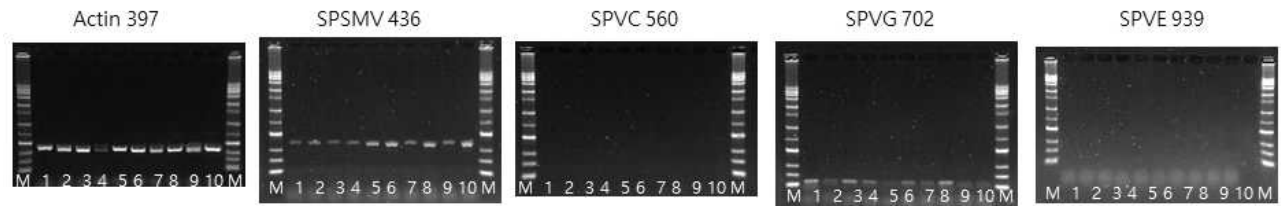


그림 89. 호감미 캘러스 RT-PCR 결과. M : dyne 1kb plus ladder, 1~6:호감미 callus line #1 ~ #10

· 진울미 생장점으로부터 확보된 기내식물체 5개 line과 callus 6개 line에서도 주요 4종 virus(SPSMV, SPVC, SPVG, SPVE)에 대해 RT-PCR 검정 수행 결과 기내식물체, 캘러스 모두 Virus free로 나와 확보된 기내식물체를 대량 증식하였다(그림 89, 90, 91).

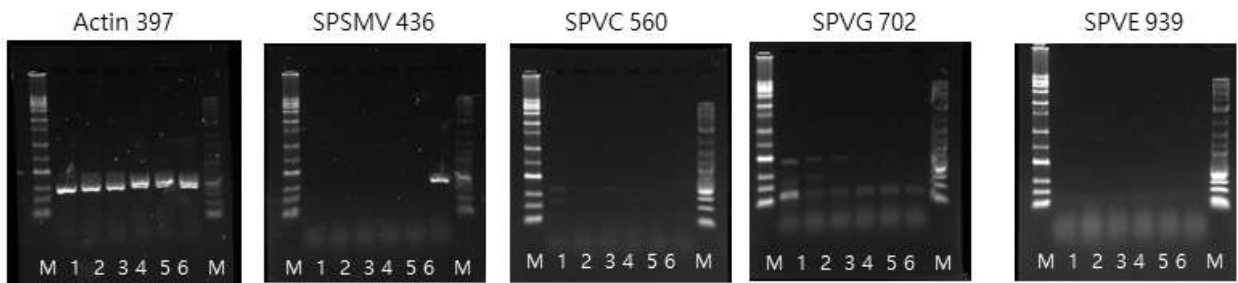


그림 90. 진울미 기내식물체 RT-PCR 결과. M : dyne 1kb plus ladder, 1~5:진울미 기내식물체 line #1 ~ #5, 6:호감미 기내식물체

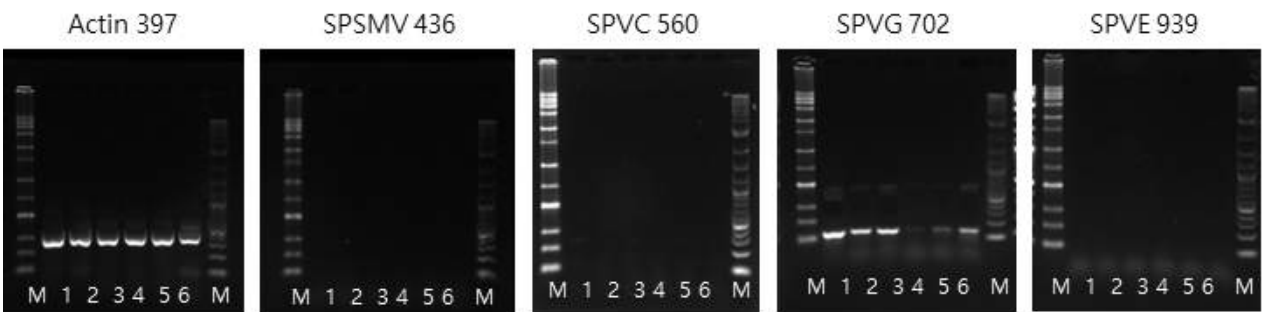


그림 91. 진울미 캘러스 RT-PCR 결과. M : dyne 1kb plus ladder, 1~6:진울미 line #1 ~ #6



그림 92. 선발된 고구마 바이러스 프리 기내식물체 (좌. 호감미, 우 진율미)

○ 딸기 바이러스 프리 캘러스 및 식물체 확보

· 매향 성장점으로부터 확보된 기내식물체 6개 line을 주요 4종 virus(SVBV, SMoV, SCV, SMYEV)에 대해 RT-PCR 검정 수행한 결과 SMYEV가 감염된 것으로 확인된 2개 line을 제거하고 감염되지 않은 4개 virus-free 라인에 대해 대량 증식하였다.

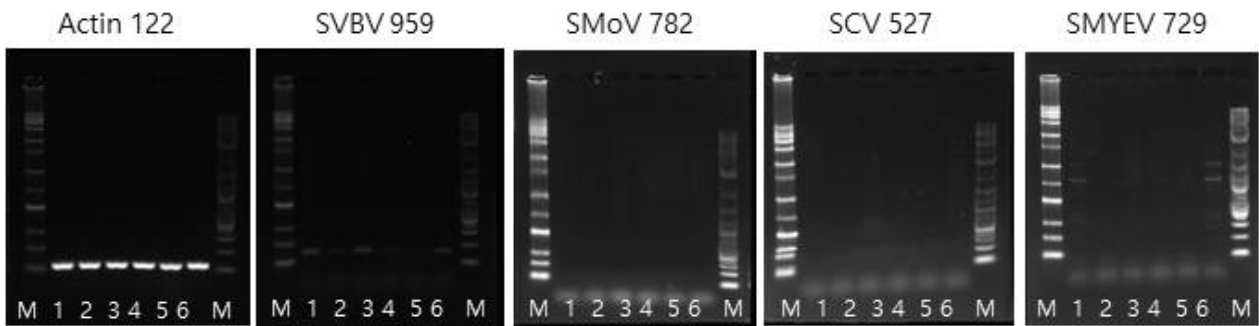


그림 93. 매향 기내식물체 RT-PCR 결과 M : dyne 1kb plus ladder, 1~6:매향 기내식물체 line #1 ~ #6,

· 설향 성장점 배양에서 확보된 기내식물체 4개 line을 주요 4종 virus(SVBV, SMoV, SCV, SMYEV)에 대해 RT-PCR 검정 수행하였으며, 4개 line 모두 virus free 확인되어 대량 증식 하였다 (그림 92, 93, 94).

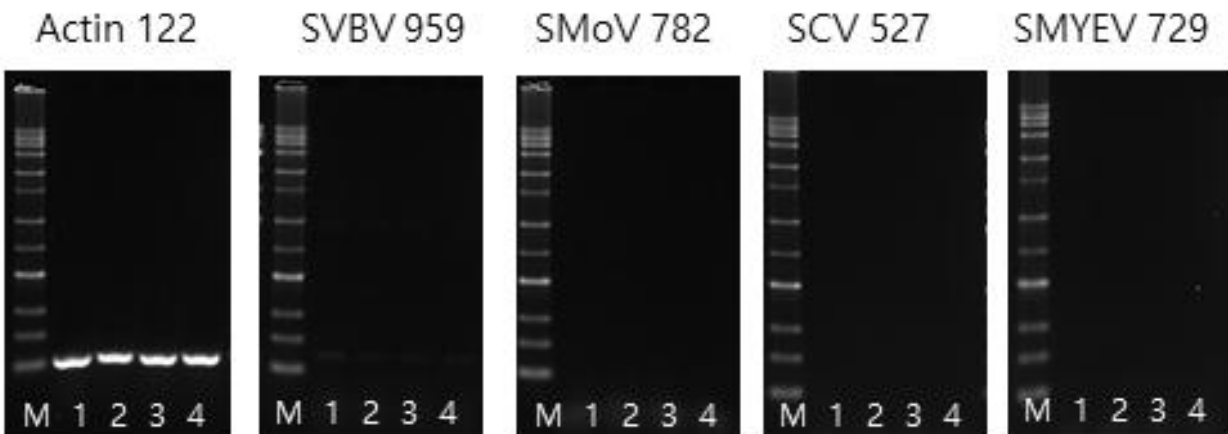


그림 94. 설향 기내식물체 RT-PCR 결과. M : dyne 1kb plus ladder, 1~4:설향 기내식물체 line #1 ~ #4,

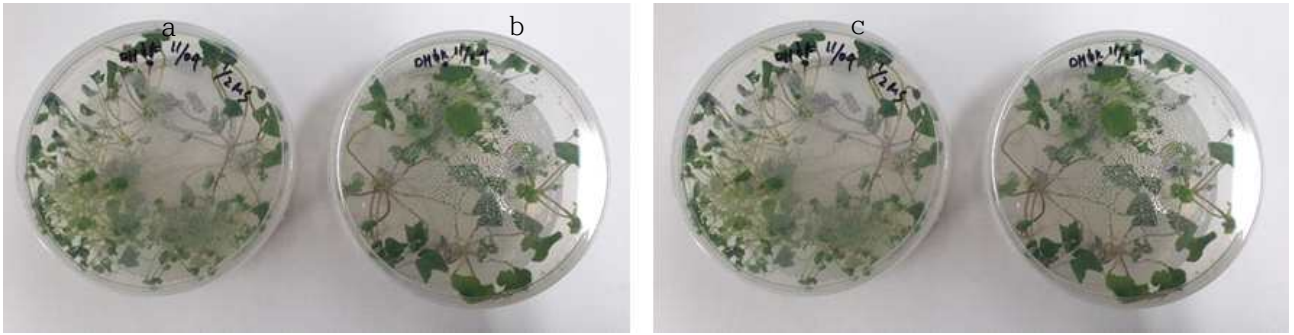


그림 95. 선발된 딸기 바이러스 프리 기내식물체 (좌: 매향, 우: 설향)

2) 마늘 재분화 기초 조건 확인

·마늘의 경우 바이러스 프리 캘러스로부터 재분화를 통해 Multishoot를 유도하여 대량증식하는 것이 유리하기에 가담재래마늘과 홍산마늘 callus에서 기내식물체 재분화를 위한 조건확립을 위해 식물 성장 조절 물질인 BA와 IAA, NAA, CPA와 조합 처리에서 재분화 실험을 진행하였다. 두 품종 모두 기본 MS배지에 BA 3mg/L와 IAA 0.3mg/L가 첨가된 고체배지에서 신태초가 재분화 되었으며, 재분화된 신태초는 마늘 Multi shoot 증식배지인 MS배지 + IAA 3mg/L + NAA 0.3mg/L가 첨가된 고체배지로 옮겨 증식배양 중이다(그림 95, 96).

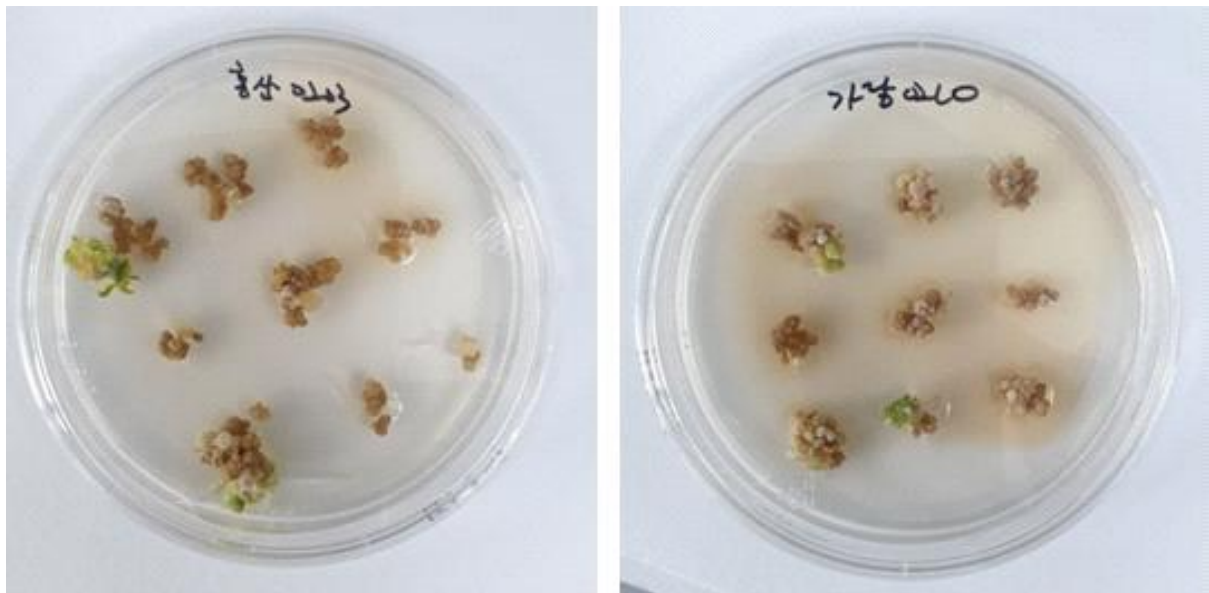


그림 96. 마늘 캘러스에서 신태초 재분화 된 모습 (좌. 홍산마늘, 우. 가담재래마늘)

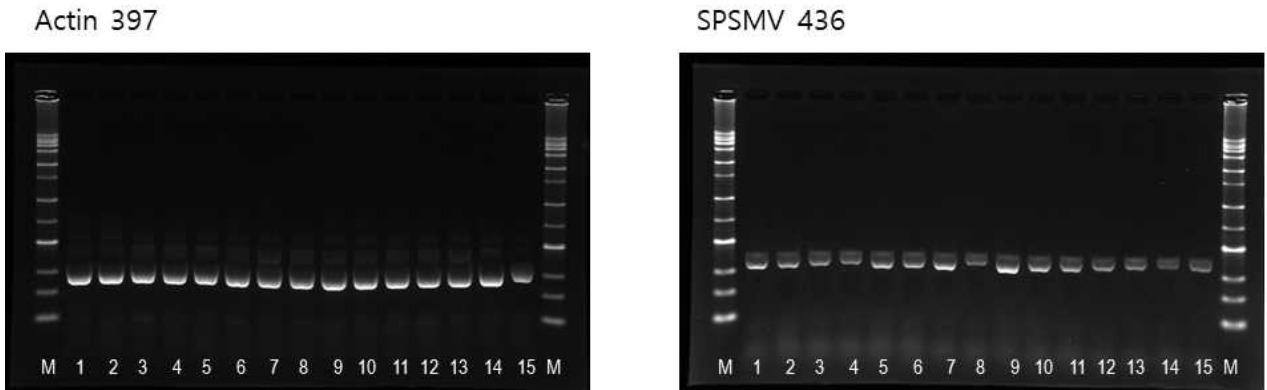


그림 96. 마늘 캘러스에서 재분화 된 Multishoot (a. 홍산마늘, b.c. 가담재래마늘)

3) 항바이러스제 처리를 통한 Virus free 스태크 확보

· 호감미 생장점배양으로 제거되지 않는 SPSMV 바이러스를 제거하기 위해 항바이러스제인 Ribavirin을 25mg/L, 50mg/L, 75mg/L, 100mg/L 농도별로 처리하여 배양 4주 후 RT-PCR로 바이러스 검정하였다. 바이러스 검정 결과 모든 농도의 처리구에서 SPSMV 바이러스가 확인되었으며, 100mg/L 처리구에서 감소하는 경향을 보였으나, callus 생육이 억제되어 항바이러스제에 의한 바이러스 제거 효과를 확인하지 못하였다(그림 97).

바이러스 프리 스태크 확보를 위해서는 열처리, 생장점 재배양 등이 병행하여야 완전한 바이러스 프리 스태크를 확보할 수 있을 것으로 기대된다.



M : dyne 1kb plus ladder, 1,2,3 : control, 4,5,6 : Ribavirin 25mg/L 처리, 7,8,9 : Ribavirin 50mg/L, 10,11,12 : Ribavirin 75mg/L, 13,14,15 : Ribavirin 100mg/L

그림 97. 항바이러스제 처리 후 바이러스 제거 여부 RT-PCR로 진단

2. 작물별 동결보존 기초 조건 규명

1) 3개 작물 6품종에 대한 동결보존 조건 확립

· 바이러스 검정에서 바이러스 프리로 확인된 고구마, 딸기, 마늘 캘러스를 장기 보존하기 위한 동결 보존 실험을 수행하였다. 2차년도에 가담재래마늘, 홍산마늘, 호감미에 대한 조건은 확립하였으며, 이번 실험은 조건이 확립되지 않은 진율미, 설향, 매향 품종을 이용하여 동결 보존 실험을 추가 수행하였다. 동결보존 방법으로는 dehydration vitrification법을 이용하여 실험을 수행하였고, 생존율은 TTC염색법을 이용하여 확인하였다.

Vitrification 법을 사용한 초저온 저장 과정

- Pre-culture : MS 배지 + 10% sucrose 용액에서 3시간 이상처리
- > Loading : MS 배지 + 2M glycerol + 0.4M sucrose 용액에서 30분간 처리
- > Dehydration : PVS2* 60분, PVS3** 80분간 처리
- > Rapid cooling : 액체질소에 담귀 신속히 동결 후 1일 이상 저장
- > Rapid warming : 40°C 수조에 1분간 담귀 신속히 해동 후 Vitrification 용액을 제거
- > Unloading : MS배지 + 30% sucrose 용액에 30분간 처리 후 용액을 제거
- > 2% TTC 용액으로 염색하여 생존율 확인

Vitrification 용액 조성

* PVS2(Preservation vitrification solution 2) : 30% Glycerol(w/v) + 15% DMSO(w/v) + 15% Ethylenglycol(w/v)

+ 22.5% Sucrose

**PVS3 (Preservation vitrification solution 3) : 50% Glycerol(w/v) + 50% Sucrose

·매향의 경우 DH1 용액에서 60분 처리구에서 가장 높은 생존율을 보였으며, 진율미, 매향, 설향 3품종 모두 PVS3용액에 80분간 처리한 실험구에서 TTC 염색결과 모두 생존한 것을 확인하였다. 전년도 결과에서도 가담재래마늘과 홍산마늘 모두 PVS3처리구에서 생존하여 고구마, 딸기, 마늘 모두 PVS3 80분 처리시 초저온 저장이 가능할 것으로 확인되었다.

표 57. 품종별, Vitrification 용액별 생존율

| Dehydration-vitrification solution | Survival rate | | | |
|--|---------------|--------------|------------|-------------|
| | Sweet potato | Sweet potato | Strawberry | Strawberry |
| | (Hogammi) | (Jinyulmi) | (Maehyang) | (Seolhyang) |
| DH1(Dehydration solution | - | - | ++ | - |
| PVS2 (Preservation vitrification solution 2) | - | - | - | + |
| PVS3 (Preservation vitrification solution 3) | - | + | + | + |

* - : non survival , + : less than 30% , ++ : less than 60% , +++ : more than 60%

3. 바이오리액터를 이용한 대량 생산기술 개발

1) 고구마 virus free callus 대량증식

· 바이오리액터를 이용한 대량배양 조건을 확보하기 위해 우선 진율미 바이러스 프리 캘러스를 2,4-D 0.5mg/L가 첨가된 MS액체배지에 플라스크에서 현탁배양 후 3L 바이오리액터에 접종하여 배양하였으며, 다시 5L 바이오리액터로 scale up하여 대량 배양을 수행하고 있다.

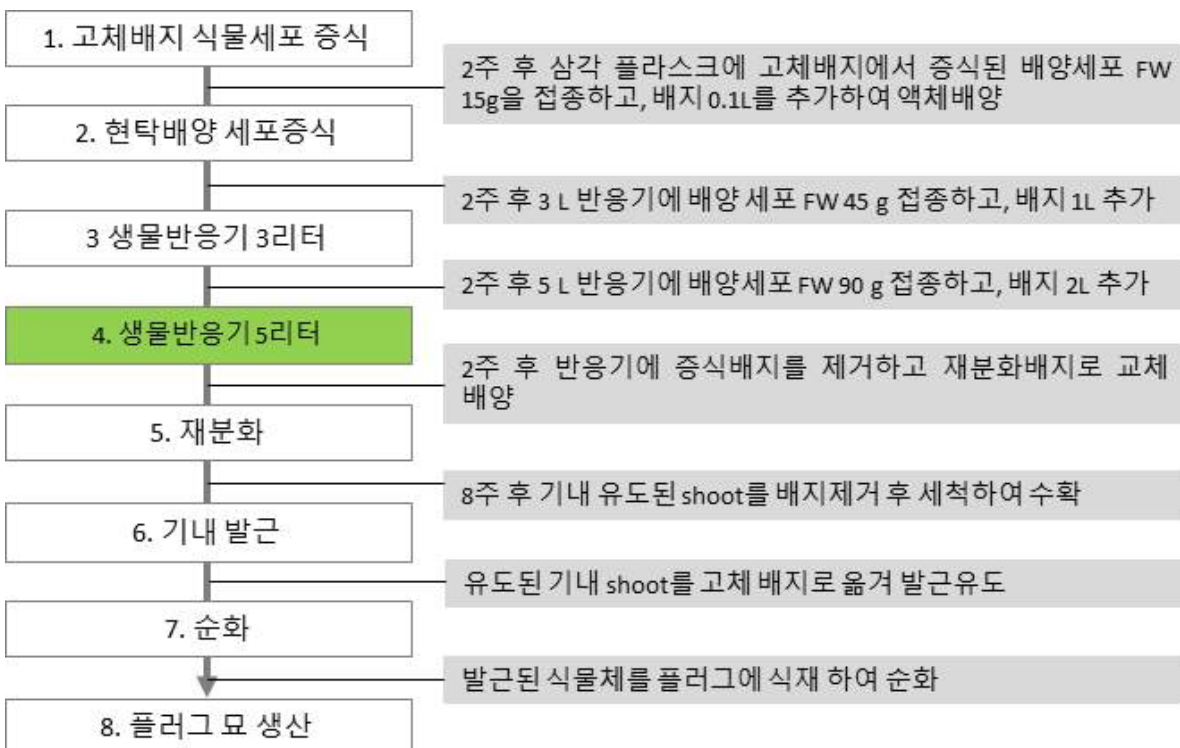


그림 98. 바이오리액터를 이용한 고구마 대량증식 공정도

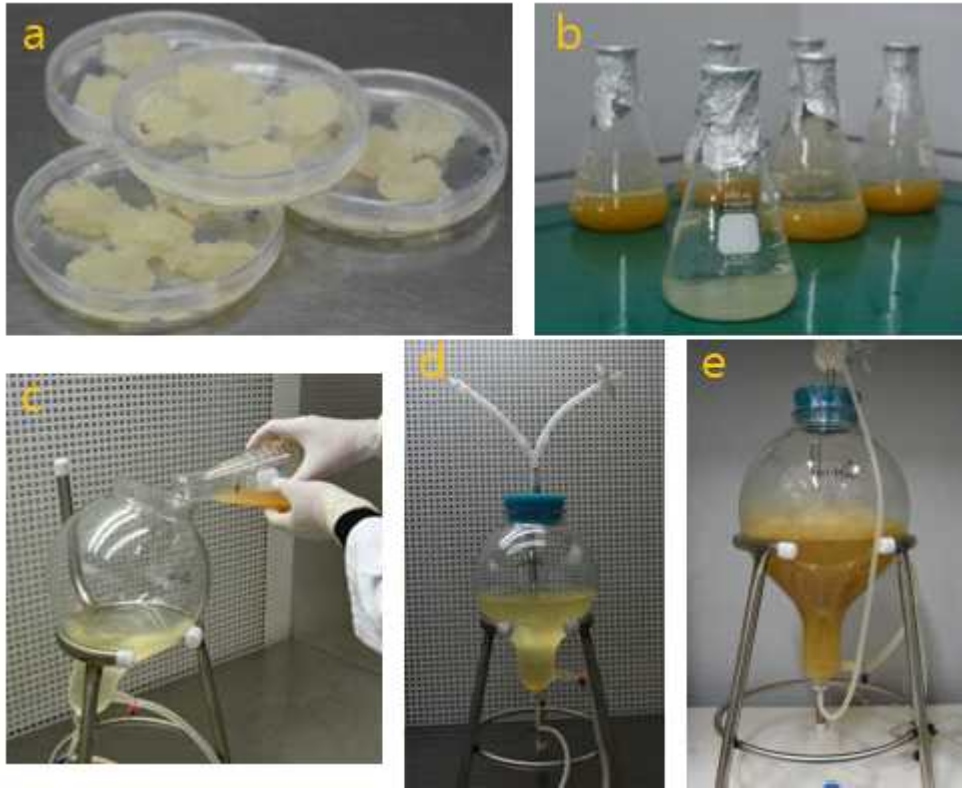


그림 99. 5L 바이옱렉트에서 고구마 켈러스 대량생산
 a. 고구마 켈러스, b. 켈러스 플라스크 현탁배양, c. 바이옱렉트에 접종,
 d. 5L 바이옱렉트에 접종 후 모습, e. 대량증식된 바이옱렉트 모습

4. 무병묘 상업화

1) 확보된 바이러스 프리묘 대량증식 및 공급

·무병묘 보급체계는 무병 기내 식물체를 확보하고 확보된 기내 식물체를 상업적 대량 생산하여 농가에 보급하는 일반적이다. 고구마, 딸기의 경우는 순화된 플러그 묘 상태로 농가에 보급 가능하지만 마늘의 경우는 기내묘를 식재시 1년차에 인편이 한 개인 단구가 생산되고 재배 2년차에 인편 수가 3~4쪽, 재배 3년차 이후 정상적인 마늘이 생산되므로 농가보급을 위해서는 3년 이상의 재배기간이 필요하여 씨마늘 생산 기간 중 바이러스 등 병해충 방제를 위해 망실재배 가능한 전문 농가를 통한 씨마늘 생산하는 과정이 추가로 필요하다.

·바이러스 검정을 통해 무병묘로 확인된 딸기 설향, 매향 품종, 고구마 호감미, 진율미 품종, 마늘 가담재래종 기내 증식을 통해 대량증식하여 기내 무병묘 상태로 농업회사 법인 (주)유니플랜텍 (딸기 바이러스 무병주, 매출액 16,500천원/고구마 바이러스 무병주, 매출액 5,500천원) 및 원경농원(마늘 바이러스 프리 무병주, 매출액 10,000천원)에 판매하여 사업화 진행함(그림 100-103).



그림 100. 대량 증식된 딸기(매향) 무병묘



그림 101. 대량 증식된 딸기(설향) 무병묘



그림 102. 대량 증식된 고구마 무병묘



그림 103. 대량 증식된 마늘 무병묘

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

○ 1차년도(2020)

주관 연구과제(서울대: NGS이용 고구마 바이러스 감염 현황 조사)

1. NGS이용 품종별, 조직별 고구마 바이러스 분석

- 호감미 5종, 진율미 2종, 밤고구마 2종, 꿀고구마 3종, 호박고구마 3종 바이러스에 복합감염 됨

- 5개 조직으로부터 총 7개 바이러스를 동정했으며, 5개 조직 중 fibrous root과 root stalk에 바이러스 양이 가장 많은 것으로 밝혀짐

2. 고구마 바이러스 진단 시스템 개발

- SPVG, SPVE, SPVC, SPSMV등 총 4종 대상 RT-PCR 기반 진단방법 개발

- SPLCV, SPCFV, SPVC, SPSMV1등 총 4종 대상 real time RT-PCR 기반 진단방법 개발

3. 고구마 2품종, 딸기 2품종, 마늘 2품종 NGS이용 바이러스 분석

- 바이러스 프리 무병묘 개발을 위해 NGS이용 바이러스 조사

- 고구마 호감미 3종, 고구마 진율미 2종, 마늘 가담 11종, 마늘 홍산 7종에 감염된 바이러스 동정

- 딸기 설향 및 매향은 바이러스에 감염되지 않았음

○ 2차년도(2021)

주관 연구과제(서울대: NGS이용 마늘 바이러스 감염 현황 조사)

1. NGS이용 품종별, 지역별 마늘 바이러스 분석

- 강원도에서 3개 샘플, 전남에서 5개 샘플, 경남 2개 샘플, 충남 1개 샘플, 제주 1개 샘플을 포함하여 총 12개 샘플 채취

- RNA-sequencing을 통해 총 12개 라이브러리로부터 최소 8종에서 많게는 10종 마늘 감염 바이러스 동정

- NGS이용 신종 마늘 바이러스 Garlic virus J 동정 및 유전체 조립

- 12개 마늘 샘플로부터 43개 allexivirus 유전체, 26개의 potyvirus 유전체, 18개 carlavirus 유전체를 포함해서 총 87개 마늘 바이러스 유전체를 조립 및 계통수 분석

2. 마늘 바이러스 진단 시스템 개발

- 7종 allexivirus 특이적 진단을 위한 RT-PCR 진단 방법 개발

- 4종 GarVA, GarVC, GarCLV, OYDV 4종 real time RT-PCR 진단 방법 개발

- 3. RT-PCR 이용 6개 품종 바이러스 프리 캘러스 선발

- 6개 품종에 감염되어 있는 바이러스 NGS를 통해 동정 및 유전체 조립

- 동정된 바이러스 대상 RT-PCR 진단 방법 개발 및 기술 (주)바이오에프디엔씨에 제공

- RT-PCR방법 이용 캘러스 바이러스 감염 여부 확인

○ 3차년도(2021)

주관 연구과제(성균관대: NGS이용 딸기 바이러스 감염 현황 조사)

1. NGS 이용 딸기 바이러스 동정

- RNA sequencing을 이용해 30개의 딸기 라이브러리에서 딸기 바이러스 동정
- 10개의 라이브러리에서 바이러스 서열 확인
- 국내 유통 딸기 품종 킹스베리, 설향, 매향에서 NGS를 이용해 딸기 바이러스 동정
- 국내 유통 딸기 설향과 매향에서 NGS 분석으로 Strawberry mottle virus 전체 서열 동정
- 딸기 킹스베리에서 바이러스 감염되지 않음을 확인

2. 딸기 바이러스 진단 방법 개발

- 딸기 설향과 매향에서 동정된 Strawberry mottle virus를 real time RT-PCR로 진단
- Strawberry mottle virus 진단 RT-PCR용 프라이머 디자인

3. 바이러스 프리 고구마, 마늘, 딸기 캘러스 라인 확인

- 고구마, 마늘, 딸기 캘러스 유도 시료에서 RNA sequencing을 이용해 바이러스 진단
- RT-PCR 방법 이용 캘러스 바이러스 감염 여부 확인
- 고구마 진을미에서 유도된 캘러스에서 바이러스 프리 라인 확인
- 마늘 가담 캘러스에서 바이러스 프리 라인 확인
- 딸기 설향, 딸기 매향에서 유도된 기내식물에서 바이러스 프리 라인 선별

4. 바이러스 진단 키트 개발

- 고구마 5종 바이러스 진단 프라이머 선별과 One Step RT-PCR 키트 및 매뉴얼 개발 완료
- 마늘 5종 바이러스 진단 프라이머 디자인과 One Step RT-PCR 키트 및 매뉴얼 개발 완료
- 딸기 2종 바이러스 진단 프라이머 선별과 One Step RT-PCR 키트 및 매뉴얼 개발 완료

○ 1차년도(2020)

공동 연구과제((주)바이오에프디엔씨: 식물 세포 바이오리액터를 활용한 무병묘 스탁 생산 기술 개발)

1. 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 프리 캘러스 유도

- 고구마의 잎과 엽병 조직 유래 캘러스 확보
- 마늘의 잎조직 유래 캘러스 확보
- 딸기의 엽병 조직 유래 캘러스 확보

2. 작물별, 품종별 세포 배양 배지 조성 개발

- 마늘과 고구마 딸기 식물체의 캘러스 유도 배지 선발
- 마늘과 고구마 캘러스 라인선발 및 증식
- 마늘과 고구마 딸기 기내 식물체 확보
- 딸기 생장점 소독 방법 및 배지조성 개선

○ 2차년도(2021)

공동 연구과제((주)바이오에프디엔씨: 식물 세포 바이오리액터를 활용한 무병묘 스탁 생산 기술 개발)

1. 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 프리 캘러스 및 식물체 확보
 - 고구마, 마늘, 딸기 캘러스를 증식하고 RT-PCR을 이용하여 바이러스를 검정함
 - 고구마 정단 생장점을 0,2~0.5mm 크기로 적출하여 2,4-D 처리 배재에서 캘러스 확보 및 BA와 NAA 조합에서 신초 및 캘러스를 유도
 - 마늘 1엽원기를 포함한 정단생장점 배양을 통해 캘러스 및 신초를 확보하였고, stem-disc배양을 통해 다수의 기내 신초를 확보
 - 딸기 런너 기부의 생장점 배양으로 기내 식물체 및 캘러스 확보
 - 조직배양 초기에 항바이러스 사용하여 식물체 확보
2. 작물별 동결보존 기초 조건 규명
 - 고구마 1품종(호감미)에서 액체질소 처리 후 TTC 검정을 통해 캘러스 생존한 조건 확보
 - 마늘 2품종(가담, 홍산)에서 액체질소 처리 후 TTC 검정을 통해 동결보존 기초 조건 확보
 - 딸기 2품종 모두 전처리, Loading 단계까지 캘러스 생존 확인

○ 3차년도(2022)

공동 연구과제((주)바이오에프디엔씨: 식물 세포 바이오리액터를 활용한 무병묘 스탁 생산 기술 개발)

1. RT-PCR을 통한 바이러스 프리 고구마, 마늘, 딸기 기내 식물체 확보 및 대량 증식
 - 생장점 배양을 통해 확보된 고구마, 마늘, 딸기 기내식물체를 RT-PCR로 바이러스 검정하여 바이러스 프리 라인 확보
 - 확보된 고구마, 딸기, 마늘 6품종의 바이러스 프리 기내묘를 기내 대량 증식
 - 마늘 캘러스로부터 BA 3mg/L + IAA 0.3mg/L에서 신초 재분화를 확인하여 마늘 재분화 기초 조건을 확립.
 - 고구마 캘러스에서 바이오리액터를 이용한 대량증식 조건 확립
 2. 작물별 동결보존 기초 조건 규명
 - 고구마 1품종(진율미)에서 액체질소 처리 후 TTC 검정을 통해 캘러스 생존한 조건 확보
 - 딸기 2품종(매향, 설향)에서 액체질소 처리 후 TTC 검정을 통해 동결보존 기초 조건 확보
 3. 바이러스 프리묘에 대한 상업화 완료
 - 기내 대량 증식된 바이러스 프리묘를 기내 묘 상태로 공급하여 3,200만원 매출 및 상업화 완료
-

(2) 정량적 연구개발성과

-정량적 성과로 SCIE논문 5건, 평균(IF) 2.719, 특허출원 2건, 학술발표 6건, 생명정보 44건, 기술실시 6건, 제품화 6건, 고용창출 8건, 홍보실적 3건, 매출액 3천2백만원을 달성하였습니다. 모든 목표치를 달성 또는 초과 달성하였습니다.

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

| 성과지표명 | 연도 | | 1단계 (2020~2022) | 계 | 가중치 (%) | |
|-------------------------------|-----------------------------|----------------|--------------------|---------------|------------|--|
| | 전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾ | 논문(SCIE) | 목표(단계별) | 3 | 3 | |
| 실적(누적) | | | 5 | 5 | | |
| 평균IF | | 목표(단계별) | 2 | 2 | | |
| | | 실적(누적) | 2.719 | 2.719 | | |
| 특허출원 | | 목표(단계별) | 2 | 2 | 30 | |
| | | 실적(누적) | 2 | 2 | 30 | |
| 학술발표 | | 목표(단계별) | 3 | 3 | 20 | |
| | | 실적(누적) | 6 | 6 | 20 | |
| 생명정보 | | 목표(단계별) | 0 | 0 | | |
| | | 실적(누적) | 44 | 44 | | |
| 연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾ | | 기술실시 | 목표(단계별) | 0 | 0 | |
| | | | 실적(누적) | 6 | 6 | |
| | 제품화 | 목표(단계별) | 1 | 1 | 15 | |
| | | 실적(누적) | 6 | 6 | 15 | |
| | 수상실적 | 목표(단계별) | 0 | 0 | | |
| | | 실적(누적) | 2 | 2 | | |
| | 고용창출 | 목표(단계별) | 0 | 0 | | |
| | | 실적(누적) | 8 | 8 | | |
| | 홍보실적 | 목표(단계별) | 2 | 2 | 20 | |
| | | 실적(누적) | 3 | 3 | 20 | |
| | 매출액 | 목표(단계별) | 30,000 | 30,000 | 15 | |
| | | 실적(누적) | 32,000 | 32,000 | 15 | |
| 계 | 목표(단계별) | 43 | 43 | 100 | | |
| | 실적(누적) | 116.719 | 116.719 | 100 | | |

* 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, 신품종 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, 설계 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).

| 평가 항목 (주요성능 ¹⁾) | 단위 | 전체 항목에서 차지하는 비중 ²⁾ (%) | 세계 최고 | | 연구개발 전 국내 성능수준 | 연구개발 목표치 | | 목표설정 근거 |
|--------------------------------|------------|---|----------|------|-------------------|--------------------|--------------------|------------|
| | | | 보유국/보유기관 | 성능수준 | 성능수준 | 1단계 (YYYY~YYYY) | n단계 (YYYY~YYYY) | |
| 1 | 해당사항 없음 | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | |

* 1) 정밀도, 인장강도, 내충격성, 작동전압, 응답시간 등 기술적 성능판단기준이 되는 것을 의미합니다.

* 2) 비중은 각 구성성능 사양의 최종목표에 대한 상대적 중요도를 말하며 합계는 100%이어야 합니다.

(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 | Identification of viruses infecting six plum cultivars in Korea by RNA-sequencing First | PeerJ | | 8 | U.S.A. | PeerJ | SCIE | 2020.07.29 | 2167-8359 | 40% |
| 2 | report of cucumber mosaic virus infecting garlic (Allium sativum L.) in Korea First | JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY | | 103 | Italy | The Italian Phytopathological Society | SCIE | 2021.06.09 | 2239-7264 | 50% |
| 3 | Report of Cherry Virus F Infecting Japanese Plum in Korea First | Plant disease | | 105 | U.S.A. | The American Phytopathological Society | SCIE | 2021.04.01 | 0191-2917 | 50% |
| 4 | report of bean common mosaic virus infecting common bean (Phaseolus vulgaris L.) in Korea Using | JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY | | 103 | Italy | The Italian Phytopathological Society | SCIE | 2021.06.09 | 2239-7264 | 30% |
| 5 | RNA-Sequencing Data to Examine Tissue-Specific Garlic Microbiomes | INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES | | 22 | Swiss | MDPI | SCIE | 2021.06.24 | 1422-0067 | 50% |



Identification of viruses infecting six plum cultivars in Korea by RNA-sequencing

ABSTRACT

Background: Plums are a kind of stone fruit, a category that includes peaches, cherries, apricots, and almonds. In Korea, Japanese plum trees are usually cultivated as they best suit the climate. To date, there have been few studies in Korea on viruses infecting plum trees compared to those infecting peach trees.

Methods: To identify viruses and viroids infecting plum trees, we collected leaf samples from six different plum cultivars and subjected them to RNA-sequencing (RNA-seq). Six different plum transcriptomes were de novo assembled using the Trinity assembler followed by BLAST searching against a viral reference database.

Results: We identified hop stunt viroid (HSVd) and six viruses, including apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV), little cherry virus-1 (LChV-1), peach virus D (PeVD), peach leaf pitting-associated virus (PLPaV), plum bark necrosis stem pitting-associated virus (PBNSPaV), and prunus necrotic ringspot virus (PNRSV), from six plum cultivars by RNA-seq. RT-PCR confirmed the infection of HSVd and three viruses—ACLSV, PBNSPaV, and PNRSV—in plum trees. However, RT-PCR demonstrated that plum trees in this study were not infected by LChV-1, PeVD, or PLPaV. It is likely that the three viruses LChV-1, PeVD, and PLPaV as identified by RNA-seq were contaminants from other peach libraries caused by index misassignment, which suggests that careful confirmation by other methods should be carried out in next-generation sequencing (NGS)-based virus identification. Taken together, we identified a viroid and three viruses infecting plum trees in Korea.

Subjects Agricultural Science, Microbiology, Plant Science, Virology

Keywords Plum, RNA-seq, Viroid, Virus, Korea

INTRODUCTION

Plums are a kind of stone fruit, a category that includes peaches, cherries, apricots, and almonds (Yilmaz *et al.*, 2009; Zhebentyayeva *et al.*, 2019). The plum is usually consumed as fresh fruit; however, it can also be canned, dried, or used to make jam and wine.

Submitted 13 August 2019
 Accepted 1 July 2020
 Published 29 July 2020
 Corresponding author

Academic editor
 Pedro Sávia

Additional Information and
 Declarations can be found on
 page 12

DOI 10.7717/peerj.9588

© Copyright
 2020 Jo *et al.*

Distributed under
 Creative Commons CC-BY 4.0

OPEN ACCESS



Yoon *et al.*, 2018), it seems that the proper selection of plant tissues and developmental stages could be important factors in increasing the proportion of virus-associated reads in the plant transcriptome.

CONCLUSIONS

Taken together, we identified three viruses ACLSV, PBNSPaV, and PNRSV and one viroid (HSVd) infecting plum trees by RNA-seq and RT-PCR. In addition, we confirmed that the three viruses identified by RNA-seq could have been contaminants caused by index misassignment. Therefore, we suggest that careful confirmation by other methods be carried out in NGS-based virus identification.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to express our deepest gratitude to Tae Jin Cho, Hyang Sook Kim, and Mi Kyong Kim for all their support and commitment associated with plum cultivation. This work is dedicated to the memory of my father, Tae Jin Cho (1946–2015).

ADDITIONAL INFORMATION AND DECLARATIONS

Funding

This work was supported by the Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, and Forestry (IPET) through the Agri-Bio Industry Technology Development Program, funded by the Ministry of Agriculture, Food, and Rural Affairs (MAFRA) (120085-3), a National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government Ministry of Education (No. NRF-2018R1D1A1B07043597), and the support of the “Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development” (No. PJ01320901) conducted by the Rural Development Administration, Republic of Korea. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.



First report of cucumber mosaic virus infecting garlic (*Allium sativum* L.) in Korea

Received: 24 April 2021 / Accepted: 28 May 2021
 © Società Italiana di Patologia Vegetale (S.I.Pa.V.) 2021

Keywords Cucumber mosaic virus · Garlic, Korea · *Allium sativum*

In June 2020, we collected garlic (*Allium sativum* L.) plants (cultivar Hongsan) showing severe viral disease symptoms, including stripes, mosaic, and distortion in leaves, grown in a field in Hoengseong, South Korea, to identify viruses. Three garlic cloves from a single plant were subjected to total RNA extraction using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Then, we prepared a ribosome-depleted library using TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plant kit following the manufacturer's instructions (Illumina, San Diego, California, USA). The library was paired-end sequenced (2 × 100 bp) by using Illumina's NovaSeq 6000 system. To identify viruses, raw sequence reads were subjected to de novo transcriptome assembly using the Trinity program with default parameters, followed by BLASTX search against NCBI's viral reference database (Jo et al. 2020). We identified garlic virus A (one contig and 131,023 reads), garlic virus B (one contig and 488,082 reads), garlic virus C (eight contigs and 449,416 reads), garlic virus D (four contigs and 304,876 reads), garlic virus E (five contigs and 54,635 reads), and cucumber mosaic virus (CMV) (ten contigs and 491 reads). The ten contigs were associated with RNA1 (five contigs, 145 reads), RNA2 (two contigs and 164 reads), and RNA3 (three contigs and 182 reads) of CMV. To confirm the infection of CMV in cultivar Hongsan, RT-PCR was conducted using CMV-specific primers based on the coat protein gene of CMV RNA3 (GenBank accession No. NC_001440.1), including 5'-ATGGACAAA TCTGAATCAAC-3' (position 1257–1276) and 5'-TCA GACTGGGAGCACTCCAG-3' (position 1894–1913). We amplified 657-bp CMV-specific amplicons that were cloned

and then performed Sanger sequencing. The partial sequence of CMV isolate Hongsan (MW417502) showed 100% nucleotide identity to CMV strain Y (D12499.1). Furthermore, we examined infection of CMV in other garlic plants from three different fields by RT-PCR using the primers and protocol described above. Of the nine garlic plants, CMV was detected in three plants. It is likely that the garlic plants coinfecting by different viruses were transmitted via clonal propagation. To our knowledge, this is the first report of CMV infecting garlic in Korea.

Funding This work was supported by the Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, and Forestry (IPET) through the Agri-Bio Industry Technology Development Program, funded by the Ministry of Agriculture, Food, and Rural Affairs (MAFRA) (120085-3) and a National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government Ministry of Education (No. NRF-2018R1D1A1B07043597).

Data availability The partial sequence of CMV isolate Hongsan (GenBank MW417502) is publicly available in NCBI's GenBank.

Declarations

Ethical approval All authors have approved the submission of this manuscript.

Research involving human and animal participants This research is not involved with any Human Participant or Animal.

Conflict of interests There are no potential conflicts of interest.

Disease Notes

Diseases Caused by Viruses

First Report of Cherry Virus F Infecting Japanese Plum in Korea

Funding: This work was supported by the Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, and Forestry (IPET) through the Agri-Bio Industry Technology Development Program, funded by the Ministry of Agriculture, Food, and Rural Affairs (MAFRA) (120085-3) and a National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government Ministry of Education (No. NRF-2018R1D1A1B07043597). *Plant Dis.* 105:1232, 2021; published online as <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-20-1725-PDN>. Accepted for publication 2 November 2020.

Cherry virus F (CVF) is a tentative member of the genus *Fabavirus* in the family *Secoviridae*, consisting of two RNA segments (Koloniuk et al. 2018). To date, CVF has been documented in only sweet cherry (*Prunus avium*) in the Czech Republic (Koloniuk et al. 2018), Canada, and Greece. In May 2014, we collected leaf samples from four symptomatic (leaf spots and dappled fruits) and two asymptomatic Japanese plum cultivars (Sun and Gadam) grown in an orchard in Hoengseong, South Korea, to identify viruses and viroids infecting plum trees. Total RNA from individual plum trees was extracted using two commercial kits: Fruit-mate for RNA Purification Kit (Takara, Shiga, Japan) and RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). We generated six mRNA libraries from the six different plum cultivars for RNA sequencing using the TruSeq RNA Library Preparation Kit v2 (Illumina, San Diego, CA) as described previously (Jo et al. 2017). The mRNA libraries were paired-end (2 × 100 bp) sequenced with a HiSeq 2000 system (Macrogen, Seoul, Korea). The raw sequence reads were de novo assembled by Trinity program v. 2.8.6, with default parameters (Haas et al. 2013). The assembled contigs were subjected to BLASTX search against the nonredundant protein database in NCBI. Of

the two asymptomatic cultivars, the transcriptome of asymptomatic plum cultivar Gadam contained five contigs specific to CVF. Two and three contigs were specific to CVF RNA1 (2,571 reads, coverage 42.15%) and RNA2 (2,025 reads, coverage 53.04%), respectively. The size of these five contigs ranged from 241 to 5,986 bp. Contigs of 5,986 and 3,867 bp in length, referred to as CVF isolate Gadam RNA1 (GenBank MN896996) and RNA2 (GenBank MN896995), respectively, were subjected to BLASTP search against NCBI's nonredundant protein database. The results showed that the polyprotein sequences of RNA1 and RNA2 shared 95.3 and 93.11% amino acid identities with isolates SwC-H_1a from the Czech Republic (GenBank AWB36326) and Stac-3B_c8 from Canada (AZZ10055), respectively. To confirm the infection of CVF in cultivar Gadam, RT-PCR was conducted using CVF RNA1-specific primers designed based on the CVF reference genome sequences (MH998210 and MH998216), including 5'-CCACCAAATAGGCAA-GAGGTCAC-3' (position 3,190 to 3,212) and 5'-CACAATCACCAT-CAATGGTCTCTGC-3' (position 3,742 to 3,766), and CVF RNA2-specific primers, including 5'-CTGCTTTATGATGCTAGACATCAAGATG-3' (position 1,015 to 1,042) and 5'-ACAATAGGCATGCT-CATCTCAACCTC-3' (position 1,594 to 1,619). We amplified 577-bp RNA1-specific and 605-bp RNA2-specific amplicons that were cloned and then performed Sanger sequencing. Sequencing of the cloned amplicons for isolate Gadam RNA1 (GenBank MN896993) and RNA2 (GenBank MN896994) revealed values of 99.48 and 99.17% nucleotide identity to that of RNA1 and RNA2 determined by high-throughput sequencing, respectively. Additionally, we tested five plants for each of the six plum cultivars grown in the same orchard. The detection of CVF was carried out through PCR using the primers and protocol described above. Of the 30 trees, CVF was detected in three trees of cultivar Gadam by both primer pairs. To our knowledge, this is the first report of CVF infecting Japanese plum and the first report of the virus in Korea. However, its prevalence in other *Prunus* species, including apricot, European plum, and peach, should be further elucidated.

References:

- ▶ Haas, B. J., et al. 2013. *Nat. Protoc.* 8:1494.
- Jo, Y., et al. 2017. *Plant Dis.* 101:1683.
- Koloniuk, I., et al. 2018. *Viruses* 10:204.

The author(s) declare no conflict of interest.

Keywords: Cherry virus F, Japanese plum, Korea, *Fabavirus*



First report of bean common mosaic virus infecting common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Korea

Received: 24 April 2021 / Accepted: 28 May 2021
 © Società Italiana di Patologia Vegetale (S.I.Pa.V.) 2021

Keywords Bean common mosaic virus · Common bean · Korea · *Phaseolus vulgaris*

In June 2020, five out of seven common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants of cultivar “Tigerskin” grown in Hoeongseong, South Korea, displayed severe viral disease symptoms such as light and dark mosaic, leaf distortion and leaf roll, and mottling in the leaves. To reveal the viral agent, we collected leaf samples from two different common bean plants showing disease symptoms. Total RNAs were extracted using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Two different ribosomal RNA-depleted libraries were prepared by using TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plant kit following the manufacturer’s instructions (Illumina, San Diego, California, USA). Two libraries were paired-end sequenced (2×100 bp) using Illumina’s NovaSeq 6000 system. Raw sequence reads were *de novo* assembled by Trinity program with default parameters. We conducted BLASTX search using the assembled contigs against NCBI’s viral reference database (Jo et al. 2020). We obtained complete genomes of two bean common mosaic virus (BCMV) isolates, referred to as BCMV isolate Tigerskin-A (10,039 nt) (GenBank accession No. MW019501) and isolate Tigerskin-B (10,047 nt) (MW019505) from two different libraries. The BLASTN result showed that the BCMV isolate Tigerskin-A and isolate Tigerskin-B shared 96.02% and 96.05% nucleotide identity with BCMV strain NL4 in Colombia (DQ666332.1). To confirm the presence of BCMV, RT-PCR was conducted with BCMV-specific primers, including 5’-CTG ATGGGTTTGGTTTCACCTTCA-3’ (position 2,873–2,896) and 5’-TGTCATTGTTGACATCATTTGAACTA-3’ (position 3,5673–3,593), based on the BCMV reference genome sequence (NC_003397.1). We amplified two 721-bp PCR products that were cloned, followed by Sanger sequenc-

ing. The sequence result confirmed that the partial sequences of BCMV isolate Tigerskin-A and Tigerskin-B were the same and shared 99.17% nucleotide identity with the complete genome of BCMV isolate Tigerskin-A. Moreover, we examined 12 common bean plants showing viral disease symptoms grown in six different regions for BCMV infection by RT-PCR using the same primers and protocol described above. All 12 were infected by BCMV. Taken together, this is the first report of BCMV infecting common bean in Korea.

Author contributions All authors have approved the submission of this manuscript.

Funding This work was supported by the support of the “Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development” (No. P901498301) conducted by the Rural Development Administration, Republic of Korea, the Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, and Forestry (IPET) through the Agri-Bio Industry Technology Development Program, funded by the Ministry of Agriculture, Food, and Rural Affairs (MAFRA) (120085-3), a National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government Ministry of Education (No. NRF-2018R1D1A1B07043597).

Declarations

Ethical Approval Genome sequences for BCMV isolate Tigerskin-A (GenBank MW019501) and isolate Tigerskin-B (10,047 nt) (GenBank MW019505) are publicly available in NCBI’s GenBank.

Research involving human and animal participants This research is not involved with any Human Participant or Animal.

Conflict of interest There are no potential conflicts of interest.



Article

Using RNA-Sequencing Data to Examine Tissue-Specific Garlic Microbiomes



Abstract: Garlic (*Allium sativum*) is a perennial bulbous plant. Due to its clonal propagation, various diseases threaten the yield and quality of garlic. In this study, we conducted in silico analysis to identify microorganisms, bacteria, fungi, and viruses in six different tissues using garlic RNA-sequencing data. The number of identified microbial species was the highest in inflorescences, followed by flowers and bulb cloves. With the Kraken2 tool, 57% of identified microbial reads were assigned to bacteria and 41% were assigned to viruses. Fungi only made up 1% of microbial reads. At the species level, *Streptomyces lividans* was the most dominant bacteria while *Fusarium pseudograminearum* was the most abundant fungi. Several alleciviruses were identified. Of them, the most abundant virus was garlic virus C followed by shallot virus X. We obtained a total of 14 viral genome sequences for four alleciviruses. As we expected, the microbial community varied depending on the tissue types, although there was a dominant microorganism in each tissue. In addition, we found that Kraken2 was a very powerful and efficient tool for the bacteria using RNA-sequencing data with some limitations for virome study.

Keywords: pepper; fruit; microbiome; bacteria; fungi; viruses; metagenomics; metatranscriptomics

Academic Editor: Valerio Pulci

Received: 27 May 2021

Accepted: 21 June 2021

Published: 24 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Garlic (*Allium sativum*) is a perennial bulbous plant that is famous for its flavorful bulbs. Garlic is a member of the genus *Allium* and is closely related to the chive, leek, shallot, onion, rakkyo, and scallion. Garlic cloves have an intense flavor and aroma and are frequently used for various cuisines and medicines around the world. In addition, garlic flower stalks, known as scapes, are also consumed as a vegetable. Garlic is usually propagated by planting individual cloves taken from entire garlic bulbs during the fall season (from October to November). Although garlic is regarded as very easy to grow, various diseases threaten the yield and quality of garlic. Bacteria such as *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, and *Xanthomonas* species cause flower stalk and leaf necrosis, leaf spot, slippery skin, and leaf blot symptoms in the infected garlic [1–3]. The well-known fungal diseases for garlic are white rot by *Sclerotium cepivorum*, vegetable rot by *Penicillium*, *Mucor* or *Rhizopus* species, fusarium bulb and basal rot by *Fusarium* species, botrytis neck rot caused by *Botrytis porri*, embellisia skin blotch by *Embellisia allii*, and rust by *Puccinia allii* [4–9]. Due to its clonal propagation, garlic is co-infected by diverse viruses causing mosaic, yellow spot, and dwarf symptoms [10,11]. The most common viruses infecting garlic are alleciviruses such as garlic virus A (GarVA), garlic virus B (GarVB), garlic virus C (GarVC), garlic virus D (GarVD), garlic virus E (GarVE), garlic virus X (GarVX), and shallot virus X (ShVX). In

Funding: This work was supported by the Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, and Forestry (IPET) through the Agri-Bio Industry Technology Development Program, funded by the Ministry of Agriculture, Food, and Rural Affairs (MAFRA) (120085-3) and a National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government Ministry of Education (No. NRF-2018R1D1A1B07043597). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Data Availability Statement: The 14 viral genome sequences obtained from this study were deposited in GenBank, NCBI, with respective accession numbers.

Acknowledgments: We would like to express our deepest gratitude to Jin Kyong Cho, Mi Kyong Kim, and Hyang Sook Kim for all their support and commitment associated with the garlic cultivation and harvest. This work is dedicated to the memory of my father, Tae Jin Cho (1946–2015).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

| 번호 | 회의 명칭 | 발표자 | 발표 일시 | 장소 | 국명 |
|----|---|-----|------------|-------------------------|---|
| 1 | 한국작물학회 임시총회 및 춘계 학술대회 | | 2020.06.25 | 국립식량과학원 3층 대회의실 | Identification of Viruses Infecting Sweet Potato in Yeosu, Korea by Next-generation Sequencing |
| 2 | 2021년 한국식물병리학회 춘계 온라인 학술대회 | | 2021.04.22 | 온라인 | Identification of garlic viruses from 14 different garlic samples |
| 3 | 2021년 한국식물병리학회 춘계 온라인 학술대회 | | 2021.04.22 | 온라인 | Identification of plant viruses from different sweet potato tissues |
| 4 | 2021 International Symposium and Annual Meeting of the KSABC | | 2021.08.23 | 라마다호텔, 제주, 대한민국 | Development of virus-free crop production technology |
| 5 | 2022 The KSPP 60th Annual Meeting & Fall International Conference | | 2021.10.19 | 순천대학교, 순천, 대한민국 | Identification of viruses infecting garlic using RNA sequencing data from six different tissues |
| 6 | 2022 International Symposium and Annual Meeting of the KSABC | | 2022.06.27 | 바르미 호텔인터볼고 호텔, 대구, 대한민국 | Generation of virus free callus for the three vegetatively propagated crops and cryopreservation of virus free callus |

국내 및 국제 학술회의 발표 증빙자료 1

포스터발표

PA

| | | |
|--------|---|----|
| PA-001 | 충북지역 고구마 논 재배 품종별 전분수량 및 저장성 비교 | 13 |
| PA-002 | 논 재배 참깨의 배수로 깊이별 생육 및 수량성 | 14 |
| PA-003 | The Effect of Crop Desiccation Treated on Italian Ryegrass (<i>Lolium multiflorum</i> L.) on Succeeding Crop-forage Rice | 15 |
| PA-004 | Deficit Soil Water Effects on the Growth, Yield and Water Use Efficiency of Soybean (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.) and Adzuki Bean (<i>Vigna angularis</i> L.) | 16 |
| PA-005 | 온도처리가 이탈리아라이그라스의 발아율에 미치는 영향 | 17 |
| PA-006 | 뜻거름작물 헤어리베치를 활용한 친환경 휴경지 관리 방법 | 18 |
| PA-007 | 고온 및 한발 복합스트레스에 따른 옥수수 품종별 피해 정도 분석 | 19 |
| PA-008 | Identification of Viruses Infecting Sweet Potato in Yeosu, Korea by Next-generation Sequencing | 20 |

Identification of Viruses Infecting Sweet Potato in Yeosu, Korea by Next-generation Sequencing

[Introduction]

Sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] is a dicotyledonous perennial plant belonging to the family Convolvulaceae. Sweet potato is one of important crops in tropical and temperate regions. Sweet potato contains a high amount of nutrients including carbohydrates, dietary fiber, beta carotene. In Korea, sweet potato is the third important crops and is consumed as diverse food materials. Due to clonal propagation, most sweet potato plants are infected by different viruses. In order to identify viruses infecting sweet potato, we conducted next-generation sequencing.

[Materials and methods]

Leaf samples were collected from sweet potato showing viral disease symptoms including leaf curling and yellowing in Yeosu, Korea. In addition, we collected leaf samples from two different sweet potato cultivars "Beni Haruka" and "Hogammi". We prepared three different libraries for RNA-Sequencing which were further paired-end sequenced using HiSeq2000 system. Raw sequences from each library were *de novo* assembled using Trinity program. Assembled contigs were subjected to BLAST search against the plant viral database.

[Results and discussion]

From three different libraries, we identified a total of 319 virus-associated contigs assigned to seven viruses infecting sweet potato. They are five RNA viruses including Sweet potato feathery mottle virus (SPFMV), Sweet potato latent virus (SPLV), Sweet potato virus 2 (SPV2), Sweet potato virus C (SPVC), and Sweet potato virus G (SPVG) as well as two DNA viruses including Sweet potato leaf curl virus (SPLCV) and Sweet potato symptomless mastrevirus 1 (SPSMV). Based on viral reads, SPFMV was the dominant virus followed by SPVC, SPLCV, and SPVG. The proportion of virus-associated reads in each library ranged from 0.13% to 0.29%. We also confirmed the identified viruses infecting sweet potato by RT-PCR with newly designed primers. Taken together, the next-generation sequencing based approach revealed comprehensive overview of viruses infecting sweet potato in Yeosu, in which is one of major sweet potato producing region in Korea.

[Acknowledgement]

This work was supported by the Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, and Forestry (IPET) through the Agri-Bio industry Technology Development Program, funded by the Ministry of Agriculture, Food, and Rural Affairs (MAFRA) (120085-3)

2021년
한국식물병리학회
춘계 온라인 학술대회

2021 Korean Society of Plant Pathology
Online Spring Conference

2021. 4. 22(목) ~ 23(금)

Protecting plant health in changing agricultural environments



주최



(사)한국식물병리학회
Korean Society of Plant Pathology

서울대학교 농업생명과학연구원

PIRC
Plant Industry Research Center



농촌진흥청
농생명유전체연구사업단

후원

KO-IT
한국과학기술정보연구원



O-4

Identification of plant viruses from different sweet potato tissues

Plant viruses can infect a host plant and disseminate systemically in their host plants. Tissue tropism is defined as the specific types of cells and tissues infected by a virus. To reveal tissue specific viromes, we selected sweet potato plants which were frequently co-infected by different viruses. We harvested eight different tissues such as leaf, stem, root, stalk, root body, initiative storage root, fibrous root, distal end of the root, and proximal end of the root with biological duplicates from same sweet potato cultivar. After trimming poor quality reads and reads from sweet potato plants, the remaining reads were used for the analysis of sweet potato virome study. We identified seven viruses infecting sweet potato such as sweet potato feathery mottle virus, sweet potato latent virus, sweet potato virus G, sweet potato virus 2, sweet potato badnavirus B, sweet potato virus C, and sweet potato symptomless mastrevirus 1. Interestingly, the abundance of viral RNA was dependent on the tissue type. For example, sweet potato feathery mottle virus was abundantly present in the fibrous root while the abundance of sweet potato badnavirus B was high in the leaf. In summary, this is the first study to reveal tissue specific viromes of sweet potato in the world.

O-5

Identification of garlic viruses from 14 different garlic samples

Garlic (*Allium sativum*) is a bulbous perennial flowering plant and is currently widely cultivated as an important spice in Korea. Garlic is vegetative propagated by a bulb. Therefore, most garlic plants are severely co-infected by different viruses. To identify viruses infecting garlic plants, we collected 14 different garlic samples from different regions. The collected samples were subjected to total RNA extraction followed by library preparation for RNA-seq. Using *de novo* transcriptome assembly followed by BLASTX search against viral database, we identified several viruses infecting garlic plants such as garlic virus X, garlic virus A, garlic virus C, shallot virus X, garlic virus L, garlic virus D, garlic common latent virus, garlic latent virus, and garlic virus B. Eight viruses were identified in the 14 samples while shallot virus X and garlic virus C were identified from nine and ten samples. Based on the number of viral reads, garlic virus X was dominant in four samples while garlic latent virus was dominant in other four samples. In addition, we assembled several viral genomes for garlic common latent virus, garlic latent virus, garlic virus A, and garlic virus B. Phylogenetic analyses showed that the newly assembled viral genomes were closely related with other. Taken together, we identified viruses infecting garlic plants by RNA-seq.

O-6

Identification of viruses from different flower tissues of soybean (*Glycine max*)

Soybean (*Glycine max*) is one of major important crop plants in Korea. A wide range of plant pathogens cause diseases in soybean resulting in the reduction of soybean yield. In this study, we analyzed viromes in different flower tissues of soybean by RNA-seq. We identified five viruses infecting soybean such as soybean mosaic virus, broad bean wilt virus 2, brassica yellows virus, beet western yellows virus, and cucumber mosaic virus. The proportion of virus-associated reads ranged from 0.003% (apical bud) to 14% (flower). In general, the viral abundance was very high in flower and flower bud tissues.

Of identified viruses infecting soybean, soybean mosaic virus was identified in all samples. Broad bean wilt virus 2 composed of two RNA fragments were identified in all different soybean cultivars. Based on the number of virus-associated reads, we compared the abundance of individual virus. In most samples, soybean mosaic virus was the dominant virus. Although most soybean cultivars were co-infected by different viruses, soybean mosaic virus should be a major virus in most samples. Taken together, we demonstrated that the viral abundance was different in different flower tissues and soybean mosaic virus was the major virus in the most co-infected soybean plants.



| | | |
|------|--|-----|
| P-11 | Rhizosphere and endosphere bacterial community of Alpine modest primrose, an endangered species of Korea | 215 |
| P-12 | Temporal fungal community structure in the rhizosphere of <i>Gastrodia elata</i> grown in greenhouse and symbiosis between the fungal isolates and <i>G. elata</i> | 215 |
| P-13 | Characterization of tomato seed endophytes | 216 |
| P-14 | Analysis of the effect of pollination on tomato seed bacterial communities | 216 |
| P-15 | Microbiome of the liverwort rhizosphere mitigated drought damage in <i>Arabidopsis thaliana</i> and in <i>Marchantia polymorpha</i> | 216 |

Q. Virology and Viral Diseases

| | | |
|-----|---|-----|
| Q-1 | Molecular characterization of pepper mild mottle virus infecting <i>Dracaena braunii</i> in Korea | 217 |
| Q-2 | Molecular characterization of pepper mild mottle virus infecting <i>Jatropha integerrima</i> in Korea | 217 |
| Q-3 | Identification of viruses infecting garlic using RNA sequencing data from six different tissues | 217 |
| Q-4 | Identification of viruses in 15 pepper cultivars in Korea by RNA sequencing | 218 |
| Q-5 | Deep sequencing and phylogenetic analysis of alstroemeria mosaic virus from <i>Alstroemeria</i> in Korea | 218 |
| Q-6 | Analyses of genetic diversity of soybean mosaic virus in seven provinces in Korea using coat protein gene sequences | 218 |
| Q-7 | Phylogenetic and recombination analyses of soybean mosaic virus using complete genome sequences | 219 |

Q-1

Molecular characterization of pepper mild mottle virus infecting *Dracaena braunii* in Korea

Lucky bamboo (*Dracaena zanderiana*) is one of the most popular indoor ornamental plants frequently imported to Korea from China and Taiwan and cultivated in commercial nurseries. In January 2022, virus-like symptoms, including mild mottling and chlorosis, were observed on the leaves of *D. zanderiana* in a greenhouse in Gwangju, Korea (approximately 10% disease incidence). Five symptomatic plants were analyzed by transmission electron microscopy and rigid-rod-shaped particles, approximately 300 nm × 18 nm in size and typical of the genus *Tobamovirus*, were observed in all samples. Total RNA was extracted from these positive samples and subjected to RT-PCR using PMMoV-specific primers. Amplicons with an expected size of approximately 682 bp were obtained from all samples, cloned into pGEM-T vectors, and sequenced. As the nucleotide sequences obtained from all samples were identical, a representative sample was deposited in GenBank (LC677090, PMMoV-GG1). BLASTn analyses revealed that the PMMoV-GG1 isolate shared over 99% nucleotide identity with PMMoV-Kr (AB126003) and PMMoV-Iw (AB254821). The pathogenicity of PMMoV-GG1 was tested using mechanical inoculation with sap from PMMoV-infected leaves on *Melastoma bontamianum* plants. These herbaceous plants displayed mild mottle symptoms 18 days post-inoculation. To the best of our knowledge, this is the first report of natural infection of PMMoV in *D. zanderiana* in Korea.

Q-3

Identification of viruses infecting garlic using RNA sequencing data from six different tissues

Garlic (*Allium sativum*) belongs to the genus *Allium*. Garlic is a popular vegetable and its bulbe providing flavor and aroma is widely used in diverse cuisines in the world. Due to clonal propagation of garlic bulbs, most garlic plants were severely infected by multiple viruses belonging to the three

Q-2

Molecular characterization of pepper mild mottle virus infecting *Jatropha integerrima* in Korea

Jatropha integerrima is a clabrous shrub to small tree with glossy leaves frequently imported to Korea from Southeast Asia countries and cultivated for commercial ornamental potted plant. In September 2021, approximately 10% of the plants (11 out of 120) showed virus infection-like symptoms, including mild mosaic and chlorosis in a green house in Gwangju, Korea. transmission electron microscopy was used to identify a causal virus on four symptomatic leaf samples. Rigid rod-shaped tobamovirus-like particles (about 300 × 18 nm) were observed in all samples. Total RNA was isolated from these plants and tested by RT-PCR using PMMoV-specific primers to amplify a regions of the coat protein gene. Amplicons of the expected size (682-bp) were generated in symptomatic samples but not in healthy samples. The identities of the amplicons were confirmed by Sanger sequencing, and the sequence of PMMoV-JI-1, as a representative sample, was deposited in GenBank (LC677091). BLASTn analyses revealed that PMMoV-JI-1 had 93.1 to 99.26% similarity in nucleotide sequence with other PMMoV isolates. Mechanical inoculation assays were performed with sap from PMMoV-JI-1 infected leaves on *Melastoma bontamianum* plants. These plants exhibited mild mottle symptoms at 10 days post-inoculation. This is the first report of the natural occurrence of PMMoV on *J. integerrima* in Korea.

genera, *Alliumvirus*, *Garivirus*, and *Polyvirus*. Here, we examined viromes in six different garlic tissues. Bioinformatic analyses identified a total of 1,669 virus associated contigs. Most common viruses were alliumviruses such as garlic virus A, B, C, D, E, and X (GarVA, GarVB, GarVC, GarVD, and GarVX). We examined the proportion of virus-associated reads in each transcriptome. Leaves (35.3%) showed the highest proportion of virus-associated reads followed by basal plates (29%), roots (21.9%), and bulb cloves (15.1%); however, two tissues such as inflorescences (4.5%) and flowers (3%) showed the lowest number of reads. After combining all virus-associated reads, GarVC was the prevalent virus followed by shallot virus X, GarVA, GarVB, and GarVD. Phylogenetic analyses using obtained 14 viral genomes in this study showed that most garlic virus species in this study were clustered together with known garlic viruses derived from China. In summary, our study revealed tissue specific garlic virome suggesting that the proper selection of garlic tissues is important for virus diagnostics and virome study.



PNB-44 Study on Extraction Method for Purifying Porphyra 334 from Laver (*Porphyra yezoensis*)

PNB-45 Generation of virus free callus for the three vegetatively propagated crops and cryopreservation of virus free callus

PNB-46 Effect of anti-aging material in embryonic callus derived the domestic rose roots

PNB-47 Alterations and prediction of functional profiles of gut microbiota after fecal microbiota transplantation for Iranian recurrent *Clostridioides difficile* infection with underlying inflammatory bowel disease: A pilot study

PNB-48 Synthesis and Evaluation of Novel Histone Deacetylase Inhibitors containing N-(2-Aminophenyl)benzamide Moiety and Fluorine

□ 보고서 원문

| | | | |
|-------|--------|------|-------|
| 연도 | 보고서 구분 | 발간일 | 등록 번호 |
| 2023년 | 최종보고서 | 2023 | |

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

| 번호 | 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명 | 등록/기탁 번호 | 등록/기탁 기관 | 발생 연도 |
|----|----------------------------------|----------------------|----------------|-------|
| 1 | SPFMV_GS 바이러스 유전체 서열 | KBRS20201020_0000053 | 국가생명연구자원정보센... | 2020 |
| 2 | SPFMV_IC 바이러스 유전체 서열 | KBRS20201020_0000054 | 국가생명연구자원정보센... | 2020 |
| 3 | SPFMV_IS 바이러스 유전체 서열 | KBRS20201020_0000055 | 국가생명연구자원정보센... | 2020 |
| 4 | SPFMV_YJ-B 바이러스 유전체 서열 | KBRS20201020_0000056 | 국가생명연구자원정보센... | 2020 |
| 5 | SPFMV_YJ-H 바이러스 유전체 서열 | KBRS20201020_0000057 | 국가생명연구자원정보센... | 2020 |
| 6 | SPVG_YJ 바이러스 유전체 서열 | KBRS20201020_0000058 | 국가생명연구자원정보센... | 2020 |
| 7 | SPVG_IS 바이러스 유전체 서열 | KBRS20201020_0000059 | 국가생명연구자원정보센... | 2020 |
| 8 | SPVE_YJ-B 바이러스 유전체 서열 | KBRS20201020_0000060 | 국가생명연구자원정보센... | 2020 |
| 9 | SPVE_GS 바이러스 유전체 서열 | KBRS20201020_0000061 | 국가생명연구자원정보센... | 2020 |
| 10 | SPVD_IC 바이러스 유전체 서열 | KBRS20201020_0000062 | 국가생명연구자원정보센... | 2020 |
| 11 | SPFMV_YJ 바이러스 유전체 서열 | KBRS20201020_0000063 | 국가생명연구자원정보센... | 2020 |
| 12 | SPLCV-A_GS 바이러스 유전체 서열 | KBRS20201020_0000064 | 국가생명연구자원정보센... | 2020 |
| 13 | SPLCV-A_IC 바이러스 유전체 서열 | KBRS20201020_0000065 | 국가생명연구자원정보센... | 2020 |
| 14 | SPLCV-A_YJ-B 바이러스 유전체 서열 | KBRS20201020_0000066 | 국가생명연구자원정보센... | 2020 |
| 15 | SPLCV-A_YJ 바이러스 유전체 서열 | KBRS20201020_0000067 | 국가생명연구자원정보센... | 2020 |
| 16 | SPLV_GS 바이러스 유전체 서열 | KBRS20201020_0000068 | 국가생명연구자원정보센... | 2020 |
| 17 | SPLV_IC 바이러스 유전체 서열 | KBRS20201020_0000069 | 국가생명연구자원정보센... | 2020 |
| 18 | SPLV_YJ-B 바이러스 유전체 서열 | KBRS20201020_0000070 | 국가생명연구자원정보센... | 2020 |
| 19 | SPV2_GS 바이러스 유전체 서열 | KBRS20201020_0000071 | 국가생명연구자원정보센... | 2020 |
| 20 | SPV2_IC 바이러스 유전체 서열 | KBRS20201020_0000072 | 국가생명연구자원정보센... | 2020 |
| 21 | SPV2_YJ-B 바이러스 유전체 서열 | KBRS20201020_0000073 | 국가생명연구자원정보센... | 2020 |
| 22 | SPV2_YJ-H 바이러스 유전체 서열 | KBRS20201020_0000074 | 국가생명연구자원정보센... | 2020 |
| 23 | SPVC_GJ 바이러스 유전체 서열 | KBRS20201020_0000075 | 국가생명연구자원정보센... | 2020 |
| 24 | SPVC_GS 바이러스 유전체 서열 | KBRS20201020_0000076 | 국가생명연구자원정보센... | 2020 |
| 25 | SPVC_IC 바이러스 유전체 서열 | KBRS20201020_0000077 | 국가생명연구자원정보센... | 2020 |
| 26 | SPVC_IS 바이러스 유전체 서열 | KBRS20201020_0000078 | 국가생명연구자원정보센... | 2020 |
| 27 | SPVC_YJ-B 바이러스 유전체 서열 | KBRS20201020_0000079 | 국가생명연구자원정보센... | 2020 |
| 28 | SPVC_YJ-H 바이러스 유전체 서열 | KBRS20201020_0000080 | 국가생명연구자원정보센... | 2020 |
| 29 | SPVC_YJ 바이러스 유전체 서열 | KBRS20201020_0000081 | 국가생명연구자원정보센... | 2020 |
| 30 | SPVD_GS 바이러스 유전체 서열 | KBRS20201020_0000082 | 국가생명연구자원정보센... | 2020 |
| 31 | Garlic virus B isolate BC1 유전체서열 | KBRS20211021_0000016 | 국가생명연구자원정보센... | 2021 |
| 32 | Garlic virus B isolate BC2 유전체서열 | KBRS20211021_0000017 | 국가생명연구자원정보센... | 2021 |
| 33 | Garlic virus B isolate BC3 유전체서열 | KBRS20211021_0000018 | 국가생명연구자원정보센... | 2021 |
| 34 | Garlic virus C isolate GL1 유전체서열 | KBRS20211021_0000019 | 국가생명연구자원정보센... | 2021 |
| 35 | Garlic virus C isolate GL2 유전체서열 | KBRS20211021_0000020 | 국가생명연구자원정보센... | 2021 |
| 36 | Garlic virus C isolate GL3 유전체서열 | KBRS20211021_0000021 | 국가생명연구자원정보센... | 2021 |
| 37 | Garlic virus C isolate GL4 유전체서열 | KBRS20211021_0000022 | 국가생명연구자원정보센... | 2021 |
| 38 | Garlic virus X isolate BC 유전체서열 | KBRS20211021_0000023 | 국가생명연구자원정보센... | 2021 |
| 39 | Garlic virus X isolate BP 유전체서열 | KBRS20211021_0000024 | 국가생명연구자원정보센... | 2021 |
| 40 | Garlic virus X isolate FL1 유전체서열 | KBRS20211021_0000025 | 국가생명연구자원정보센... | 2021 |
| 41 | Garlic virus A isolate GL 유전체서열 | KBRS20211021_0000026 | 국가생명연구자원정보센... | 2021 |
| 42 | Garlic virus A isolate BC 유전체서열 | KBRS20211021_0000027 | 국가생명연구자원정보센... | 2021 |
| 43 | Garlic virus X isolate FL2 유전체서열 | KBRS20211021_0000028 | 국가생명연구자원정보센... | 2021 |
| 44 | Garlic virus B isolate IF 유전체서열 | KBRS20211021_0000029 | 국가생명연구자원정보센... | 2021 |

생명정보 증빙자료 1번-30번

국가생명연구자원정보센터 (KOBIC)
Korean BioInformation Center

연구성과물(생명정보) 등록 확인서

1. 세부과제번호 : 120085031SB010
2. 과제고유번호 : 1545022052
3. 세부 과제명 : NGS이용 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 감염 현황 조사
4. 주관연구기관명 : 서울대학교 산학협력단
5. 과제책임자 : 조원경
6. 기준년도 : 2020년
7. 과제수행기간 : 2020년 04월 29일 ~ 2020년 12월 31일

「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제25조 제22항에 의거하여 “국가연구개발사업 연구성과의 등록·기탁 기준 및 절차”에 따라 아래와 같이 연구성과물(생명정보) 등록을 확인합니다.

- 연구성과물 등록·기탁 전담기관 : 한국생명공학연구원 국가생명연구자원정보센터
- 연구성과물 등록·기탁 필증번호 : KBR20201020_0000053-KBR20201020_0000062
- 연구성과물 등록 건수 : 30건
- 연구성과물 등록·기탁 날짜 : 2020년 10월 19일
- 대표 생명정보형태 : Sweet potato feathery mottle virus의 Simple Sequencing 데이터
- 공개여부 : 공개
- 공개예정날짜 : 2021-10-19

2020년 10월 20일

한국생명공학연구원
국가생명연구자원정보센터



국가생명연구자원정보센터 (KOBIC)
Korean BioInformation Center

연구성과물(생명정보) 등록 확인서

1. 세부과제번호 : L20085032SB010
2. 과제고유번호 : 1545022930
3. 세부 과제명 : NGS이용 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 감염 현황 조사
4. 주관연구기관명 : 서울대학교 산학협력단
5. 과제책임자 : 조원경
6. 기준년도 : 2021년
7. 과제수행기간 : 2021년 01월 01일 ~ 2021년 12월 31일

「국가연구개발혁신법 시행령」 제33조 “연구개발성과의 관리” 에 의거하여 아래와 같이 연구성과물(생명정보) 등록을 확인합니다.

- 연구성과물 등록·기탁 전담기관 : 한국생명공학연구원 국가생명연구자원정보센터
- 연구성과물 등록·기탁 필증번호 : KBR20211021_0000014-KBR20211021_0000027
- 연구성과물 등록 건수 : 14건
- 연구성과물 등록·기탁 날짜 : 2021년 10월 05일
- 대표 생명정보형태 : Garlic virus A의 Simple Sequencing 데이터
- 공개여부 : 공개
- 공개예정날짜 : 2022-10-05

2021년 10월 21일

한국생명공학연구원
국가생명연구자원정보센터장



[기술적 성과]

□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 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 | 신종 마늘 바이러스의 진단을 위한 프라이머 세트 및 진단 방법 | 대한민국 | | 2021.10.05 | 10-2021-0131576 | | | | | 100% | 마늘 무병묘 바이러스 진단에 활용함 |
| 2 | 알렉시바이러스 특이적 프라이머 세트 및 이를 이용한 바이러스 검출 방법 | 대한민국 | | 2022.08.09 | 10-2022-0099457 | | | | | 100% | 마늘 무병묘 바이러스 진단에 활용함 |

지식재산권 증빙자료 1

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2021.10.05
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(1)
 출원번호 10-2021-0131576 (접수번호 1-1-2021-1138434-90)
 (DAS접근코드B991)
 출원인 명칭
 대리인 성명
 발명자 성명
 발명의 명칭 신종 마늘 바이러스의 진단을 위한 프라이머 세트 및 진단 방법

특 허 청 장

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2022.08.09
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2022-0099457 (접수번호 1-1-2022-0833447-52)
 (DAS접근코드FB38)
 출원인명칭
 대리인성명
 발명자성명
 발명의명칭 알렉시바이러스 특이적 프라이머 세트 및 이를 이용한 바이러스 검출 방법

특 허 청 장


[경제적 성과]

□ 시제품 제작

| 번호 | 시제품명 | 출시/제작일 | 제작 업체명 | 설치 장소 | 이용 분야 | 사업화 소요 기간 | 인증기관 (해당 시) | 인증일 (해당 시) |
|----|-------------------------------------|------------|-------------|-------------|-------------------------------------|-----------|-------------|------------|
| 1 | NGS을 이용한 바이러스 프리 딸기 무병주 | 2022.08.22 | (주)바이오에프디엔씨 | (주)바이오에프디엔씨 | 바이러스 프리 무병주 라인 | 사업화 완료 | | |
| 2 | NGS을 이용한 바이러스 프리 고구마 무병주 | 2022.09.30 | (주)바이오에프디엔씨 | (주)바이오에프디엔씨 | 바이러스 프리 무병주 라인 | 사업화 완료 | | |
| 3 | NGS을 이용한 바이러스 프리 마늘 무병주 | 2022.11.01 | (주)바이오에프디엔씨 | (주)바이오에프디엔씨 | 바이러스 프리 무병주 라인 | 사업화 완료 | | |
| 4 | 고구마 감염 바이러스 진단을 위한 원스텝 RT-PCR 진단 키트 | 2022.11.18 | (주)바이오에프디엔씨 | (주)바이오에프디엔씨 | 고구마 감염 바이러스 진단을 위한 원스텝 RT-PCR 진단 키트 | 사업화 예정 | | |
| 5 | 딸기 감염 바이러스 진단을 위한 원스텝 RT-PCR 진단 키트 | 2022.11.18 | (주)바이오에프디엔씨 | (주)바이오에프디엔씨 | 딸기 감염 바이러스 진단을 위한 원스텝 RT-PCR 진단 키트 | 사업화 예정 | | |
| 6 | 마늘 감염 바이러스 진단을 위한 원스텝 RT-PCR 진단 키트 | 2022.11.18 | (주)바이오에프디엔씨 | (주)바이오에프디엔씨 | 마늘 감염 바이러스 진단을 위한 원스텝 RT-PCR 진단 키트 | 사업화 예정 | | |

<첨부3>

농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서

| 과제명 | NGS 이용 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 감염 현황 조사 및 식물 세포 바이오횜터를 활용한 무병묘 스탁 생산 기술 개발 | | | |
|--|---|-------------------|---------------------------|--------------------|
| 주관연구기관 | 성균관대학교 | 참여기관 | (주)바이오에프디엔씨 | |
| 연구책임자 | 조원경 | 연구기간 | 20년 04월 ~ 22년 12월(총 2.9년) | |
| 총 정부출연금 | 807,000,000 원 | | | |
| 해당 기술의 제품출시 유형 | | | | |
| 시제품(제품출시 예정) | () | 기존 제품 공정개선 | () | |
| 신제품(제품출시 완료) | (O) | 기 타 | () | |
| 제품 출시 실적 | | | | |
| 제품명 | 제품사진 | 제품용도 | 제품 출시일 | 해당 기술의 제품출시 기여율(%) |
| 딸기 바이러스 프리 무병묘 |  | 딸기 바이러스 프리 무병묘 라인 | 2022.08.22 | 10 |
| <p>* 첨부 : 당해연도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등) **식품R&D는 품목제조보고서 제출 필수</p> <p style="text-align: center;">상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.</p> | | | | |


2022년 11월 23일

연구책임자 : 조원경 (서명 또는 직인)

제품화(사업화) 증빙자료 2

<첨부3>

농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서


| 과제명 | NGS 이용 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 감염 현황 조사 및 식물 세포 바이오횜터를 활용한 무병묘 스탁 생산 기술 개발 | | | |
|--|---|--------------------|---------------------------|--------------------|
| 주관연구기관 | 성균관대학교 | 참여기관 | (주)바이오에프디엔씨 | |
| 연구책임자 | 조원경 | 연구기간 | 20년 04월 ~ 22년 12월(총 2.9년) | |
| 총 정부출연금 | 807,000,000 원 | | | |
| 해당 기술의 제품출시 유형 | | | | |
| 시제품(제품출시 예정) | () | 기존 제품 공정개선 | () | |
| 신제품(제품출시 완료) | (O) | 기 타 | () | |
| 제품 출시 실적 | | | | |
| 제품명 | 제품사진 | 제품용도 | 제품 출시일 | 해당 기술의 제품출시 기여율(%) |
| 고구마 바이러스 프리 무병주 |  | 고구마 바이러스 프리 무병주 라인 | 2022.09.30 | 10 |
| <p>* 첨부 : 당해연도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등) **식품R&D는 품목제조보고서 제출 필수</p> <p style="text-align: center;">상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.</p> | | | | |

2022년 11월 23일

연구책임자 : 조원경 (서명 포함) *Jo Won Kyung*

<첨부3>

농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서

| | | | | |
|--|---|-------------------|---------------------------|---------------------------|
| 과제명 | NGS 이용 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 감염 현황 조사 및 식물 세포 바이오파이렉터를 활용한 무병묘 스탁 생산 기술 개발 | | | |
| 주관연구기관 | 성균관대학교 | 참여기관 | (주)바이오에프디엔씨 | |
| 연구책임자 | 조원경 | 연구기간 | 20년 04월 ~ 22년 12월(총 2.9년) | |
| 총 정부출연금 | 807,000,000 원 | | | |
| 해당 기술의 제품출시 유형 | | | | |
| 시제품(제품출시 예정) | () | 기존 제품 공정개선 | () | |
| 신제품(제품출시 완료) | (○) | 기타 | () | |
| 제품 출시 실적 | | | | |
| 제품명 | 제품사진 | 제품용도 | 제품 출시일 | 해당 기술의 제품출시 기여율(%) |
| 마늘 바이러스 프리 무병주 |  | 마늘 바이러스 프리 무병주 라인 | 2022.11.01 | 10 |
| <p>* 첨부 : 당해연도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등) **식품R&D는 품목제조보고서 제출 필수</p> <p style="text-align: center;">상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.</p> | | | | |

2022년 11월 23일


연구책임자 : 조원경 (서명 또는 위)ing

제품화(사업화) 증빙자료 4

<첨부3>

농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서

| | | | |
|-----------------------|--|------------|-------------------------|
| 과제명 | NGS이용 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 감염 현황 조사 및 식물 세포 바이오횜터를 활용한 무병묘 스탁 생산 기술 개발 | | |
| 주관연구기관 | 성균관대학교산학협력단 | 참여기관 | (주)바이오에프디앤씨 |
| 연구책임자 | 조원경 | 연구기간 | 20년 04월 ~ 22년 12월(총 3년) |
| 총 정부출연금 | 807,000,000원 | | |
| 해당 기술의 제품출시 유형 | | | |
| 시제품(제품출시 예정) | (○) | 기존 제품 공정개선 | () |
| 신제품(제품출시 완료) | () | 기 타 | () |
| 제품 출시 실적 | | | |

| 제품명 | 제품사진 | 제품용도 | 제품 출시일 | 해당 기술의 제품출시 기여율(%) |
|---|--|---|-----------|--------------------|
| 고구마 감염 바이러스 진단을 위한 원스텝 RT-PCR 진단 키트 |  | 고구마 감염 바이러스 진단을 위한 원스텝 RT-PCR 진단 키트 (Lot. OC241018E) 5종 바이러스 SPFMV SPVC SPLV SPV2 SPLCV | 2022년 11월 | 100% |
| * 첨부 : 당해연도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등) **식품R&D는 품목제 조보고서 제출 필수 <p style="text-align: center;">상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.</p> | | | | |

2022년 11월 19일




연구책임자 : 조원경 (서명 또는 인) *Jo Won-gyeong*

제품화(사업화) 증빙자료 5

<첨부3>

농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서

| | | | |
|-----------------------|---|------------|-------------------------|
| 과제명 | NGS이용 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 감염 현황 조사 및 식물 세포 바이오리액터를 활용한 무병묘 스탁 생산 기술 개발 | | |
| 주관연구기관 | 성균관대학교산학협력단 | 참여기관 | (주)바이오에프디엔씨 |
| 연구책임자 | 조원경 | 연구기간 | 20년 04월 ~ 22년 12월(총 3년) |
| 총 정부출연금 | 807,000,000원 | | |
| 해당 기술의 제품출시 유형 | | | |
| 시제품(제품출시 예정) | (○) | 기존 제품 공정개선 | () |
| 신제품(제품출시 완료) | () | 기 타 | () |
| 제품 출시 실적 | | | |

| 제품명 | 제품사진 | 제품용도 | 제품 출시일 | 해당 기술의 제품출시 기여율(%) |
|---|--|--|-----------|--------------------|
| 딸기 감염 바이러스 진단을 위한 원스텝 RT-PCR 진단 키트 |    | 딸기 감염 바이러스 진단을 위한 원스텝 RT-PCR 진단 키트 (Lot. OC241018D) 2종 바이러스 SMoV SMYEV | 2022년 11월 | 100% |
| <p>* 첨부 : 당해연도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등) **식품R&D는 품목제 조보고서 제출 필수</p> <p style="text-align: center;">상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.</p> | | | | |

2022년 11월 19일



연구책임자 : 조원경 (서명) *Jo Won-gyeong*

제품화(사업화) 증빙자료 6

<첨부3>

농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서

| | | | |
|-----------------------|---|------------|-------------------------|
| 과제명 | NGS이용 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 감염 현황 조사 및 식물 세포 바이오리액터를 활용한 무병묘 스탁 생산 기술 개발 | | |
| 주관연구기관 | 성균관대학교산학협력단 | 참여기관 | (주)바이오에프디엔씨 |
| 연구책임자 | 조원경 | 연구기간 | 20년 04월 ~ 22년 12월(총 3년) |
| 총 정부출연금 | 807,000,000원 | | |
| 해당 기술의 제품출시 유형 | | | |
| 시제품(제품출시 예정) | (0) | 기존 제품 공정개선 | () |
| 신제품(제품출시 완료) | () | 기 타 | () |
| 제품 출시 실적 | | | |

| 제품명 | 제품사진 | 제품용도 | 제품 출시일 | 해당 기술의 제품출시 기여율(%) |
|---|--|--|-----------|--------------------|
| 마늘 감염 바이러스 진단을 위한 원스텝 RT-PCR 진단 키트 |   | 마늘 감염 바이러스 진단을 위한 원스텝 RT-PCR 진단 키트 (Lot. OC241018A) 5종 바이러스 GVA GVC GVD GLV LYSV | 2022년 11월 | 100% |
| * 첨부 : 당해연도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등) **식품R&D는 품목제 조보고서 제출 필수 상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다. | | | | |


2022년 11월 19일

연구책임자 : 조원경 *(Signature)*

□ 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 | 직접실시 | 딸기 바이러스 프리 무병주 | (주)바이오에프 디엔씨 | 2022-08-22 | 0원 | 0원 |
| 2 | 직접실시 | 고구마 바이러스 프리 무병주 | (주)바이오에프 디엔씨 | 2022-09-30 | 0원 | 0원 |
| 3 | 직접실시 | 마늘 바이러스 프리 무병주 | (주)바이오에프 디엔씨 | 2022-11-01 | 0원 | 0원 |
| 4 | 직접실시 | 고구마 감염 바이러스 진단을 위한 원스텝 RT-PCR 진단 키트 | (주)바이오에프 디엔씨 | 2022-11-01 | 0원 | 0원 |
| 5 | 직접실시 | 딸기 감염 바이러스 진단을 위한 원스텝 RT-PCR 진단 키트 | (주)바이오에프 디엔씨 | 2022-11-01 | 0원 | 0원 |
| 6 | 직접실시 | 마늘 감염 바이러스 진단을 위한 원스텝 RT-PCR 진단 키트 | (주)바이오에프 디엔씨 | 2022-11-01 | 0원 | 0원 |

| 기술실시보고서 | | | | | | | |
|---|----------------------|--|---------------------------|--------------------------------------|-------------------|-------------|--|
| (단위 : 원) | | | | | | | |
| 연구개발과제 현황 | 사업명 | 작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업 | | 연구과제번호 | 120085-3 | | |
| | 연구과제명 | NGS이용 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 감염 현황 조사 및 식물 세포 바이오횜터를 활용한 무병묘 스탁 생산 기술 개발 | | | | | |
| | 연구개발기관명 | 성균관대학교 산학협력단 | 연구책임자 | 조원경 | 참여기업명 | (주)바이오에프디엔씨 | |
| | 연구협약일 | 2020. 04. 29 | 연구기간 | 2020. 04. 29 - 2022. 12. 31 (2년 9개월) | | | |
| | 연구개발비 | 정부지원연구개발비 807,000,000원 | 기관부담연구개발비 140,001,000원 | 기타 () | 계 947,001,000원 | | |
| 기술실시계약 및 성과활용 현황 | 계약(활용)명 | 고구마 바이러스 프리 무병주 | | | | | |
| | 계약(활용)일 | 2022년 09월 30일 | 실시(활용)기간 | 2022년 09월~2027년 09월 | | | |
| | 지재권 종류 | 고구마 바이러스 프리 무병주 | 실시권 유형 | 직접실시 | | | |
| | * 지재권이 특허(출원,등록)인 경우 | 명 칭 | | | | | |
| | | 번호 | | | 일 자 | | |
| | 실시(활용)기관 | 기관명 | (주)바이오에프디엔씨 | | 기관유형 | 중소기업 | |
| | | 주 소 | | | 대 표 자 | | |
| 사업자번호 | | | | 전화번호 | | | |
| 부서(담당자) | | | | e-mail | | | |
| 기 술 료 | 정액기술료 | | 경상기술료 | | | 기타 조건 | |
| | 징수(예정)일 | 징수(예정)금액 | 착수기본료 | 징수(예정)일 | 징수(예정)금액 | | |
| | | | 매출에 따른 기술료 | 징수시작(예정)일 | 결산월 | | |
| | | | | 2023년 1월 | 7월 | | |
| | | | | 징수종료(예정)일 | 기술기여도 | | |
| | 계 | | | 2028년 1월 | 75% | | |
| 기타특기사항 | | | | | | | |
| <p>「농림축산식품 연구개발사업 관리기준」 제 35조제3항에 따라 위와 같이 기술실시 내용을 보고합니다.</p> <p>붙임 1. 기술실시계약서 사본 1부(타기관으로 기술이전시). 2. 지식재산권을 포함하는 기술이전인 경우 해당 증빙자료(특허 등록증, 출원증 등) 1부 (타기관으로 기술이전시). 3. 연구개발과제협약서 사본 1부(직접실시시).</p> | | | | | | | |
| <p>2023년 03월 22일</p> <p>연구개발기관 (주)바이오에프디엔씨의 대표 [직인]</p> <p>농림식품기술기획평가원장 귀하</p> | | | | | | | |

| 기술실시보고서 | | | | | | | |
|---|-----------------------------|--|---------------------------|--------------------------------------|-------------------|---|----------|
| (단위 : 원) | | | | | | | |
| 연구개발과제 현황 | 사업명 | 작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업 | | 연구과제번호 | 120085-3 | | |
| | 연구과제명 | NGS이용 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 감염 현황 조사 및 식물 세포 바이오리액터를 활용한 무병묘 스탁 생산 기술 개발 | | | | | |
| | 연구개발기관명 | 성균관대학교산학협력 단 | 연구책임자 | 조원경 | 참여기업명 | (주)바이오에프디엔씨 | |
| | 연구협약일 | 2020. 04. 29 | 연구기간 | 2020. 04. 29 - 2022. 12. 31 (2년 9개월) | | | |
| | 연구개발비 | 정부지원연구개발비 807,000,000원 | 기관부담연구개발비 140,001,000원 | 기타 () | 계 947,001,000원 | | |
| 기술실시계약 및 성과활용 현황 | 계약(활용)명 | 딸기 바이러스 프리 무병주 | | | | | |
| | 계약(활용)일 | 2022년 08월 22일 | 실시(활용)기간 | 2022년 08월~2027년 08월 | | | |
| | 지재권 종류 | 딸기 바이러스 프리 무병주 | 실시권 유형 | 직접실시 | | | |
| | * 지재권이 특허(출원,등록) 인 경우 | 명 칭 | | | 일 자 | | |
| | | 번 호 | | | | | |
| | 실시(활용)기관 | 기관명 | (주)바이오에프디엔씨 | | 기관유형 | 중소기업 | |
| | | 주 소 | | | 대 표 자 | | |
| 사업자번호 | | | | 전화번호 | | | |
| 부서(담당자) | | | | e-mail | | | |
| 기 술 료 | 정액기술료 | | 경상기술료 | | 기타 조건 | | |
| | 징수(예정)일 | 징수(예정)금액 | 착수기본료 | 징수(예정)일 | | | 징수(예정)금액 |
| | | | 매출에 따른 기술료 | 징수시작(예정)일 | 결산월 | | |
| | | | | 2023년 1월 | 7월 | | |
| | | | | 징수종료(예정)일 | 기술기여도 | | |
| 계 | | | 2028년 1월 | 75% | | | |
| 기타특기사항 | | | | | | | |
| <p>「농림축산식품 연구개발사업 관리기준」 제 35조제3항에 따라 위와 같이 기술실시 내용을 보고합니다.</p> <p>붙임 1. 기술실시계약서 사본 1부(타기관으로 기술이전시). 2. 지식재산권을 포함하는 기술이전인 경우 해당 증빙자료(특허 등록증, 출원증 등) 1부 (타기관으로 기술이전시). 3. 연구개발과제협약서 사본 1부(직접실시시).</p> | | | | | | | |
| 2023년 03월 22일 연구개발기관 (주)바이오에프디엔씨의 대표 농림식품기술기획평가원장 귀하 | | | | | | | |
| | | | | | |  | |

| 기술실시보고서 | | | | | | |
|---|-----------------------------|--|---------------|--------------------------------------|----------|-----------|
| (단위 : 원) | | | | | | |
| 연구개발과제 현황 | 사업명 | 작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업 | | 연구과제번호 | 120085-3 | |
| | 연구과제명 | NGS이용 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 감염 현황 조사 및 식물 세포 바이오리액터를 활용한 무병묘 스탁 생산 기술 개발 | | | | |
| | 연구개발기관명 | 성균관대학교산학협력 단 | 연구책임자 | 조원경 | 참여기업명 | ㈜바이오에프디엔씨 |
| | 연구협약일 | 2020. 04. 29 | 연구기간 | 2020. 04. 29 - 2022. 12. 31 (2년 9개월) | | |
| | 연구개발비 | 정부지원연구개발비 | 기관부담연구개발비 | 기타 () | 계 | |
| 807,000,000원 | | 140,001,000원 | - | 947,001,000원 | | |
| 기술실시계약 및 성과활용 현황 | 계약(활용)명 | 마늘 바이러스 프리 무병주 | | | | |
| | 계약(활용)일 | 2022년 11월 01일 | 실시(활용)기간 | 2022년 11월~2027년 11월 | | |
| | 지재권 종류 | 마늘 바이러스 프리 무병주 | 실시권 유형 | 직접실시 | | |
| | * 지재권이 특허(출원,등록) 인 경우 | 명 칭 | | | | |
| | | 번 호 | | | 일 자 | |
| | 실시(활용)기관 | 기관명 | ㈜바이오에프디엔씨 | | 기관유형 | 중소기업 |
| | | 주 소 | | | 대 표 자 | |
| | | 사업자번호 | | | 전화번호 | |
| 부서(담당자) | | | | e-mail | | |
| 기 술 료 | 정액기술료 | | 경상기술료 | | 기타 조건 | |
| | 징수(예정)일 | 징수(예정)금액 | 착수기본료 | 징수(예정)일 | | |
| | | | 매출에 따른 기술료 | 징수시작(예정)일 | 결산월 | |
| | | | | 2023년 1월 | 7월 | |
| | | | | 징수종료(예정)일 | 기술기여도 | |
| 계 | | | 2028년 1월 | 75% | | |
| 기타특기사항 | | | | | | |
| <p>「농림축산식품 연구개발사업 관리기준」 제 35조제3항에 따라 위와 같이 기술실시 내용을 보고합니다.</p> <p>붙임 1. 기술실시계약서 사본 1부(타기관으로 기술이전시). 2. 지식재산권을 포함하는 기술이전인 경우 해당 증빙자료(특허 등록증, 출원증 등) 1부 (타기관으로 기술이전시). 3. 연구개발과제협약서 사본 1부(직접실시시).</p> | | | | | | |
| 2023년 03월 22일 연구개발기관 (주)바이오에프디엔씨의 대표 [직인] 농림식품기술기획평가원장 귀하 | | | | | | |

| 기술실시보고서 | | | | | | | |
|---|-----------------------|--|---------------|--------------------------------------|----------|-------------|--|
| (단위 : 원) | | | | | | | |
| 연구개발과제 현황 | 사업명 | 작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업 | | 연구과제번호 | 120085-3 | | |
| | 연구과제명 | NGS이용 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 감염 현황 조사 및 식물 세포 바이오횜터를 활용한 무병묘 스탁 생산 기술 개발 | | | | | |
| | 연구개발기관명 | 성균관대학교 산학협력단 | 연구책임자 | 조원경 | 참여기업명 | (주)바이오에프디엔씨 | |
| | 연구협약일 | 2020. 04. 29 | 연구기간 | 2020. 04. 29 - 2022. 12. 31 (2년 9개월) | | | |
| | 연구개발비 | 정부지원연구개발비 | 기관부담연구개발비 | 기타 () | 계 | | |
| 807,000,000원 | | 140,001,000원 | - | 947,001,000원 | | | |
| 기술실시계약 및 성과활용 현황 | 계약(활용)명 | 고구마 감염 바이러스 진단을 위한 원스텝 RT-PCR 진단 키트 | | | | | |
| | 계약(활용)일 | 2022년 11월 01일 | 실시(활용)기간 | 2022년 11월~2027년 11월 | | | |
| | 지재권 종류 | 바이러스 진단 방법 | 실시권 유형 | 직접실시 | | | |
| | * 지재권이 특허(출원, 등록)인 경우 | 명 칭 | | | | | |
| | | 번호 | | 일자 | | | |
| | 실시(활용)기관 | 기관명 | (주)바이오에프디엔씨 | | 기관유형 | 중소기업 | |
| | | 주소 | | | 대표자 | | |
| | | 사업자번호 | | | 전화번호 | | |
| 부서(담당자) | | | | e-mail | | | |
| 기술료 | 정액기술료 | | 경상기술료 | | | 기타 조건 | |
| | 징수(예정)일 | 징수(예정)금액 | 착수기본료 | 징수(예정)일 | 징수(예정)금액 | | |
| | | | 매출에 따른 기술료 | 징수시작(예정)일 | 결산월 | | |
| | | | | 2023년 1월 | 7월 | | |
| | | | | 징수종료(예정)일 | 기술기여도 | | |
| | 계 | | | 2028년 1월 | 75% | | |
| 기타특기사항 | | | | | | | |
| <p>「농림축산식품 연구개발사업 관리기준」 제 35조제3항에 따라 위와 같이 기술실시 내용을 보고합니다.</p> <p>붙임 1. 기술실시계약서 사본 1부(타기관으로 기술이전시). 2. 지식재산권을 포함하는 기술이전인 경우 해당 증빙자료(특허 등록증, 출원증 등) 1부 (타기관으로 기술이전시). 3. 연구개발과제협약서 사본 1부(직접실시시).</p> | | | | | | | |
| 2023년 03월 22일 연구개발기관 (주)바이오에프디엔씨의 대표 [직인] 농림식품기술기획평가원장 귀하 | | | | | | | |



| 기술실시보고서 | | | | | | |
|---|-----------------------|--|---------------------------|--------------------------------------|-------------------|-------------|
| (단위 : 원) | | | | | | |
| 연구개발과제 현황 | 사업명 | 작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업 | | 연구과제번호 | 120085-3 | |
| | 연구과제명 | NGS이용 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 감염 현황 조사 및 식물 세포 바이오표현을 활용한 무병묘 스택 생산 기술 개발 | | | | |
| | 연구개발기관명 | 성균관대학교 산학협력단 | 연구책임자 | 조원경 | 참여기업명 | (주)바이오에프디엔씨 |
| | 연구협약일 | 2020. 04. 29 | 연구기간 | 2020. 04. 29 - 2022. 12. 31 (2년 9개월) | | |
| | 연구개발비 | 정부지원연구개발비 807,000,000원 | 기관부담연구개발비 140,001,000원 | 기타 () | 계 947,001,000원 | |
| 기술실시계약 및 성과활용 현황 | 계약(활용)명 | 딸기 감염 바이러스 진단을 위한 원스텝 RT-PCR 진단 키트 | | | | |
| | 계약(활용)일 | 2022년 11월 01일 | 실시(활용)기간 | 2022년 11월~2027년 11월 | | |
| | 지재권 종류 | 바이러스 진단 방법 | 실시권 유형 | 직접실시 | | |
| | * 지재권이 특허(출원, 등록)인 경우 | 명 칭 | | | | |
| | | 번호 | 일 자 | | | |
| | 실시(활용)기관 | 기관명 | (주)바이오에프디엔씨 | | 기관유형 | 중소기업 |
| | | 주 소 | | | 대 표 자 | |
| | 사업자번호 | | | 전화번호 | | |
| | 부서(담당자) | | | e-mail | | |
| 기 술 료 | 정액기술료 | | 경상기술료 | | | 기타 조건 |
| | 징수(예정)일 | 징수(예정)금액 | 착수기본료 | 징수(예정)일 | 징수(예정)금액 | |
| | | | 매출에 따른 기술료 | 징수시작(예정)일 | 결산월 | |
| | | | | 2023년 1월 | 7월 | |
| | | | | 징수종료(예정)일 | 기술기여도 | |
| 계 | | | 2028년 1월 | 75% | | |
| 기타특기사항 | | | | | | |
| <p>「농림축산식품 연구개발사업 관리기준」 제 35조제3항에 따라 위와 같이 기술실시 내용을 보고합니다.</p> <p>붙임 1. 기술실시계약서 사본 1부(타기관으로 기술이전시). 2. 지식재산권을 포함하는 기술이전인 경우 해당 증빙자료(특허 등록증, 출원증 등) 1부 (타기관으로 기술이전시). 3. 연구개발과제협약서 사본 1부(직접실시시).</p> | | | | | | |
| 2023년 03월 22일 연구개발기관 (주)바이오에프디엔씨의 대표 [직인] 농림식품기술기획평가원장 귀하 | | | | | | |

| 기술실시보고서 | | | | | | | | |
|---|-----------------------------|---|---------------|--------------------------------------|----------|-------------|--|--|
| (단위 : 원) | | | | | | | | |
| 연구개발과제 현황 | 사업명 | 작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업 | | 연구과제번호 | 120085-3 | | | |
| | 연구과제명 | NGS이용 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 감염 현황 조사 및 식물 세포 바이오효터를 활용한 무병묘 스탁 생산 기술 개발 | | | | | | |
| | 연구개발기관명 | 성균관대학교 산학협력단 | 연구책임자 | 조원경 | 참여기업명 | (주)바이오에프디엔씨 | | |
| | 연구협약일 | 2020. 04. 29 | 연구기간 | 2020. 04. 29 - 2022. 12. 31 (2년 9개월) | | | | |
| | 연구개발비 | 정부지원연구개발비 | 기관부담연구개발비 | 기타 () | 계 | | | |
| 807,000,000원 | | 140,001,000원 | - | 947,001,000원 | | | | |
| 기술실시계약 및 성과활용 현황 | 계약(활용)명 | 마늘 감염 바이러스 진단을 위한 원스텝 RT-PCR 진단 키트 | | | | | | |
| | 계약(활용)일 | 2022년 11월 01일 | 실시(활용)기간 | 2022년 11월~2027년 11월 | | | | |
| | 지재권 종류 | 바이러스 진단 방법 | 실시권 유형 | 직접실시 | | | | |
| | * 지재권이 특허(출원,등록) 인 경우 | 명 칭 | | | | | | |
| | | 번호 | | | 일자 | | | |
| | 실시(활용)기관 | 기관명 | (주)바이오에프디엔씨 | | 기관유형 | 중소기업 | | |
| | | 주소 | | | | 대표자 | | |
| | | 사업자번호 | | | | 전화번호 | | |
| 부서(담당자) | | | | | e-mail | | | |
| 기술료 | 정액기술료 | | 경상기술료 | | | 기타 조건 | | |
| | 징수(예정)일 | 징수(예정)금액 | 착수기본료 | 징수(예정)일 | 징수(예정)금액 | | | |
| | | | 매출에 따른 기술료 | 징수시작(예정)일 | 결산월 | | | |
| | | | | 2023년 1월 | 7월 | | | |
| | | | | 징수종료(예정)일 | 기술기여도 | | | |
| | 계 | | | 2028년 1월 | 75% | | | |
| 기타특기사항 | | | | | | | | |
| <p>「농림축산식품 연구개발사업 관리기준」 제 35조제3항에 따라 위와 같이 기술실시 내용을 보고합니다.</p> <p>붙임 1. 기술실시계약서 사본 1부(타기관으로 기술이전시). 2. 지식재산권을 포함하는 기술이전인 경우 해당 증빙자료(특허 등록증, 출원증 등) 1부 (타기관으로 기술이전시). 3. 연구개발과제협약서 사본 1부(직접실시시).</p> | | | | | | | | |
| 2023년 03월 22일 연구개발기관 (주)바이오에프디엔씨의 대표 [직인] 농림식품기술기획평가원장 귀하 | | | | | | | | |

□ 사업화 현황

| 번호 | 사업화 방식 ¹⁾ | 사업화 형태 ²⁾ | 지역 ³⁾ | 사업화 명 | 내용 | 업체명 | 매출액 | | 매출 발생 연도 | 기술 수명 |
|----|----------------------|----------------------|------------------|---------------|--|-------------------------|---------|---------|----------|-------|
| | | | | | | | 국내 (천원) | 국외 (달러) | | |
| 1 | 자기실시 | 신제품 개발 | 국내 | 바이러스 프리 무병주 | 1) 딸기 바이러스 프리 무병주 2) 고구마 바이러스 프리 무병주 3) 마늘 바이러스 프리 무병주 | 농업회사법인 (유)유니플랜텍 외 2개 업체 | 32,000 | | 2022 | 10년 |
| 2 | 자기실시 | 신제품 개발 | 국내 | 식물 바이러스 진단 키트 | 1) 고구마 감염 바이러스 진단을 위한 원스텝 RT-PCR 진단 키트 2) 딸기 감염 바이러스 진단을 위한 원스텝 RT-PCR 진단 키트 3) 마늘 감염 바이러스 진단을 위한 원스텝 RT-PCR 진단 키트 | (주)바이오에프디앤씨 | 0 | | | 20년 |

- * 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) | | |
| 1) 고구마 바이러스 프리 무병주 | 2022 | 5,500 | | 5,500 | 세금계산서 발행 |
| 2) 딸기 바이러스 프리 무병주 | 2022 | 8,800 | | 8,800 | 세금계산서 발행 |
| 3) 딸기 바이러스 프리 무병주 | 2022 | 7,700 | | 7,700 | 세금계산서 발행 |
| 4) 마늘 바이러스 프리 무병주 | 2022 | 10,000 | | 10,000 | 세금계산서 발행 |
| 합계 | | 32,000 | | 32,000 | 세금계산서 발행 |

매출 실적 증빙자료 1

| 전자세금계산서 | | | | 승인번호 | 20220930-10221004-33472757 | | | | |
|-------------|-----------------|--------------|------|-------------------|----------------------------|-----------------|--------------|----|------|
| 과 목 지 | 등록번호 | 중사업장번호 | | 과 목 지 | 등록번호 | 중사업장번호 | | | |
| | 상호 (법인명) | {주} 바이오에프디앤씨 | 성명 | | 상호 (법인명) | 농업회사법인 (주)유니플랜텍 | 성명 | | |
| | 사업장 주소 | | | | 사업장 주소 | | | | |
| | 업태 | 제조 | 종목 | | 화장품원료 | 업태 | 임업 외 | 종목 | 종요 외 |
| | 이메일 | | | | 이메일 | | | | |
| 작성일자 | 공급가액 | 세액 | 수정사유 | 비고 | | | | | |
| 2022-09-30 | 5,000,000 | 500,000 | 해당없음 | 신한)100-021-661465 | | | | | |
| 월 일 | 품목 | 규격 | 수량 | 단가 | 공급가액 | 세액 | 비고 | | |
| 09 30 | 고구마 바이러스 프리 무병주 | | | | 5,000,000 | 500,000 | | | |
| 합계금액 | | 현금 | 수표 | 여음 | 외상미수금 | | 이 금액을 (정구) 함 | | |
| 5,500,000 | | | | | | | | | |

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급, 또는 홈택스로 전송된 전자(세금)계산서입니다.

발급사실 확인은 상기 홈페이지의 "조회/발급" 전자세금계산서 > 제3자 발급사실 조회"를 이용하시기 바랍니다.

매출 실적 증빙자료 2

| 전자세금계산서 | | | | | 승인번호 | 20220822-10220823-87733763 | | | |
|-------------|-----------|----------------|---------|-------|-----------------------|----------------------------|----------------|--------|------|
| 공 급 자 | 등록번호 | | 중사업장번호 | | 공 급 받 는 자 | 등록번호 | | 중사업장번호 | |
| | 상호(법인명) | (주) 바이오에프디엔씨 | 성명 | | | 상호(법인명) | 농업회사법인(주)유니플랜텍 | 성명 | |
| | 사업장주소 | | | | | 사업장주소 | | | |
| | 업태 | 제조 | 종목 | 화장품제조 | | 업태 | 일반회 | 종목 | 중요 외 |
| | 이메일 | | | | | 이메일 | | | |
| 작성일자 | 공급가액 | | 세액 | | 수정사유 | 비고 | | | |
| 2022-08-22 | 8,000,000 | | 800,000 | | 해당없음 | | | | |
| 월 | 일 | 품목 | 규격 | 수량 | 단가 | 공급가액 | 세액 | 비고 | |
| 08 | 22 | 탈기 바이러스 프리 무병주 | | | | 8,000,000 | 800,000 | | |
| 합계금액 | | 현금 | 수표 | 어음 | 외상미수금 | 이 금액을 (청구) 함 | | | |
| 8,800,000 | | | | | | | | | |

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급, 또는 홈택스로 전송된 전자(세금)계산서입니다.

발급사실 확인은 상기 홈페이지의 "조회/발급" 전자세금계산서 > 제3자 발급사실 조회"를 이용하시기 바랍니다.

매출 실적 증빙자료 3

| 전자세금계산서 | | | | | 승인번호 | 20220916-10221004-33470289 | | | |
|-------------|-----------|----------------|---------|-------|-----------------------|----------------------------|----------------|--------|------|
| 공 급 자 | 등록번호 | | 중사업장번호 | | 공 급 받 는 자 | 등록번호 | | 중사업장번호 | |
| | 상호(법인명) | (주) 바이오에프디엔씨 | 성명 | | | 상호(법인명) | 농업회사법인(주)유니플랜텍 | 성명 | |
| | 사업장주소 | | | | | 사업장주소 | | | |
| | 업태 | 제조 | 종목 | 화장품제조 | | 업태 | 일반회 | 종목 | 중요 외 |
| | 이메일 | | | | | 이메일 | | | |
| 작성일자 | 공급가액 | | 세액 | | 수정사유 | 비고 | | | |
| 2022-09-16 | 7,000,000 | | 700,000 | | 해당없음 | 신한)100-021-661465 | | | |
| 월 | 일 | 품목 | 규격 | 수량 | 단가 | 공급가액 | 세액 | 비고 | |
| 09 | 16 | 탈기 바이러스 프리 무병주 | | | | 7,000,000 | 700,000 | | |
| 합계금액 | | 현금 | 수표 | 어음 | 외상미수금 | 이 금액을 (청구) 함 | | | |
| 7,700,000 | | | | | | | | | |

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급, 또는 홈택스로 전송된 전자(세금)계산서입니다.

발급사실 확인은 상기 홈페이지의 "조회/발급" 전자세금계산서 > 제3자 발급사실 조회"를 이용하시기 바랍니다.

매출 실적 증빙자료 4

| 전자세금계산서 | | | | 승인번호 | 20221101-10221101-60972961 | | | | |
|-------------|-------------|----------------|------------|-------------------|----------------------------|--------------|---------|------------|--------|
| 공 급 자 | 등록번호 | | 중사업장 번호 | | 공 급 받 는 자 | 등록번호 | | 중사업장 번호 | |
| | 상호 (법인명) | (주) 바이오에프디엔씨 | 성명 | | | 상호 (법인명) | | 성명 | |
| | 사업장 주소 | | | | | 사업장 주소 | | | |
| | 업태 | 제조 | 종목 | 화장품제조 | | 업태 | 소매업 외 | 종목 | 화초, 농산 |
| | 이메일 | | | | | 이메일 | | | |
| 작성일자 | 공급가액 | 세액 | 수량 | 수정사유 | 비고 | | | | |
| 2022-11-01 | 9,090,909 | 909,091 | 해당없음 | 신한)100-021-661465 | | | | | |
| 월 | 일 | 품목 | 규격 | 수량 | 단가 | 공급가액 | 세액 | 비고 | |
| 11 | 01 | 마늘 바이러스 프리 무병주 | | | | 9,090,909 | 909,091 | | |
| 합계금액 | | 현금 | 수표 | 어음 | 외상미수금 | 이 금액을 (총구) 함 | | | |
| 10,000,000 | | | | | | | | | |

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급, 또는 홈택스로 전송된 전자(세금)계산서입니다.

발급사실 확인은 상기 홈페이지의 "조회/발급" 전자세금계산서 > 제3자 발급사실 조회"를 이용하시기 바랍니다.

□ 고용 창출


| 순번 | 사업화명 | 사업화 업체 | 고용창출 인원(명) | | 합계 |
|----|---|-------------|------------|-------|----|
| | | | 2021년 | 2022년 | |
| 1 | NGS이용 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 감염 현황 조사 및 식물 세포 바이오리액터를 활용한 무병묘 스탁 생산 기술 개발 | (주)바이오에프디엔씨 | 3 | 5 | 8 |
| 합계 | | | 3 | 5 | 8 |



| 발급번호 : G202110200232915 | | | | |
|-------------------------|-------|-------------|------------|-------|
| 건강보험자격득실확인서 | | | | |
| 확인청구자 | 성명 | | 주민등록번호 | |
| | | | | |
| 자격득실확인내역 | | | | |
| No | 가입자구분 | 사업장명칭 | 자격취득일 | 자격상실일 |
| 1 | 직장가입자 | (주)바이오에프디엔씨 | 2021.09.01 | |
| | | 이하여백 | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

건강보험 자격득실내역을 위와 같이 확인 합니다.
2021.10.20

국민건강보험공단 이사장



- * 이 확인서의 취득일·상실일은 실제의 사업장 입사일·퇴직일과 다를 수 있습니다.
- * 이 확인서는 국민건강보험공단 인터넷 홈페이지(www.nhis.or.kr)에서 직접 발급이 가능합니다. (공인인증서 필요)
- * 이 확인서는 건강보험 자격확인용이므로 다른 용도(재직증명용, 경력증명용, 대출용 등)



고용 창출 증빙자료 2



문서확인번호 : 1634-6941-1705-3466



| 건강보험자격득실확인서 | | | | |
|-------------|--------|------------------|------------|------------|
| 가입자 | 성명 | | 주민등록번호 | |
| | 허 | | | |
| 자격득실확인내역 | | | | |
| NO | 가입자구분 | 사업장명칭 | 자격취득일 | 자격상실일 |
| 1 | 직장가입자 | (주)바이오에프디엔 씨 | 2021-08-01 | |
| 2 | 지역세대원 | | 2021-06-01 | 2021-08-01 |
| 3 | 직장가입자 | (주) 웰그린 | 2021-01-01 | 2021-06-01 |
| 4 | 직장가입자 | 충북대학교산학협력 단 | 2019-10-01 | 2021-01-01 |
| 5 | 직장가입자 | (주) 웰그린 | 2018-08-01 | 2019-10-01 |
| 6 | 지역세대원 | | 2017-12-01 | 2018-08-01 |
| 7 | 직장피부양자 | 주식회사 아이아이컴바인드 | 2017-09-02 | 2017-12-01 |
| 8 | 지역세대원 | | 2008-10-03 | 2017-09-02 |
| 9 | 직장피부양자 | 산내들육종농원 | 2008-07-10 | 2008-10-03 |
| 10 | 지역세대원 | | 2002-03-20 | 2008-07-10 |
| 11 | 지역세대원 | | 2001-02-19 | 2002-03-20 |
| 12 | 지역세대원 | | 1993-02-04 | 2001-02-19 |




1 / 1

| 발급번호 : G2021101902321824 | | | | |
|--------------------------|--------|---------------|------------|------------|
| 건강보험자격득실확인서 | | | | |
| 확인청구자 | 성명 | 주민등록번호 | | |
| | 윤 | | | |
| 자격득실확인내역 | | | | |
| No | 가입자구분 | 사업장명칭 | 자격취득일 | 자격상실일 |
| 1 | 직장가입자 | (주)바이오에프디엔씨 | 2021.05.01 | |
| 2 | 직장피부양자 | (주)에이치제이엔지니어링 | 2020.01.01 | 2021.05.01 |
| 3 | 직장피부양자 | 에이치제이글로벌(주) | 2017.05.31 | 2020.01.01 |
| 4 | 직장피부양자 | (주)에이치제이엔지니어링 | 2016.09.01 | 2017.05.31 |
| 5 | 직장피부양자 | 에이치제이글로벌(주) | 2013.11.20 | 2016.09.01 |
| 6 | 지역세대원 | | 2013.10.16 | 2013.11.20 |
| 7 | 직장피부양자 | 삼성전자주식회사 | 1993.04.01 | 2013.10.16 |
| | ----- | 이하여백 | ----- | ----- |

건강보험 자격득실내역을 위와 같이 확인 합니다.
2021.10.19

국민건강보험공단 이사장



- ※ 이 확인서의 취득일·상실일은 실제의 사업장 입사일·퇴직일과 다를 수 있습니다.
- ※ 이 확인서는 국민건강보험공단 인터넷 홈페이지(www.nhis.or.kr)에서 직접 발급이 가능합니다. (공인인증서 필요)
- ※ 이 확인서는 건강보험 자격확인용이므로 다른 용도(재직증명용, 경력증명용, 대출용 등)






1 / 1

| 발급번호 : G2023010602321258 | | | | |
|--------------------------|-------|-------------|------------|------------|
| 건강보험자격득실확인서 | | | | |
| 확인청구자 | 성명 | 주민등록번호 | | |
| | 백 | | | |
| 자격득실확인내역 | | | | |
| No | 가입자구분 | 사업장명칭 | 자격취득일 | 자격상실일 |
| 1 | 직장가입자 | (주)바이오에프디엔씨 | 2022.03.02 | |
| 2 | 직장가입자 | (주)지플러스생명과학 | 2022.01.03 | 2022.03.01 |
| 3 | 직장가입자 | 씨제이씨지브이(주) | 2015.07.01 | 2015.09.01 |
| | ----- | 이하여백 | ----- | ----- |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

건강보험 자격득실내역을 위와 같이 확인합니다.
2023.01.06

국민건강보험공단 이사장



- ※ 이 확인서의 취득일·상실일은 실제의 사업장 입사일·퇴직일과 다를 수 있습니다.
- ※ 이 확인서는 국민건강보험공단 인터넷 홈페이지(www.nhis.or.kr) 및 모바일앱(The건강보험)에서 직접 발급이 가능합니다.
- ※ 이 확인서는 건강보험 자격확인용이므로 다른 용도(재직증명용, 경력증명용, 대출용 등)로 사용 시 공단에 법적 책임이 없음을 알려드립니다.





1 / 1

| 발급번호 : G2023010602321252 | | | | |
|--------------------------|--------|-------------|------------|------------|
| 건강보험자격득실확인서 | | | | |
| 확인청구자 | 성명 | 주민등록번호 | | |
| | 권 | | | |
| 자격득실확인내역 | | | | |
| No | 가입자구분 | 사업장명칭 | 자격취득일 | 자격상실일 |
| 1 | 직장가입자 | (주)바이오에프디엔씨 | 2022.08.01 | |
| 2 | 직장피부양자 | 봉우중학교 | 2022.03.01 | 2022.08.01 |
| 3 | 직장피부양자 | 대전관저중학교 | 2016.03.01 | 2022.03.01 |
| 4 | 직장피부양자 | 충남중학교 | 2011.03.01 | 2016.03.01 |
| 5 | 직장피부양자 | 금산여자고등학교 | 2010.03.01 | 2011.03.01 |
| 6 | 직장피부양자 | 부여고등학교 | 2006.03.01 | 2010.03.01 |
| 7 | 직장피부양자 | 부여여자고등학교 | 2002.03.01 | 2006.03.01 |
| 8 | 직장피부양자 | 대천여자고등학교 | 2000.03.01 | 2002.03.01 |
| 9 | 직장피부양자 | 금산여자고등학교 | 1998.03.01 | 2000.03.01 |
| 10 | 직장피부양자 | 금산하이텍고등학교 | 1995.03.15 | 1998.03.01 |

건강보험 자격득실내역을 위와 같이 확인합니다.

2023.01.06

국민건강보험공단 이사장



- ※ 이 확인서의 취득일·상실일은 실제의 사업장 입사일·퇴직일과 다를 수 있습니다.
- ※ 이 확인서는 국민건강보험공단 인터넷 홈페이지(www.nhis.or.kr) 및 모바일앱(The건강보험)에서 직접 발급이 가능합니다.
- ※ 이 확인서는 건강보험 자격확인용이므로 다른 용도(재직증명용, 경력증명용, 대출용 등)로 사용 시 공단에 법적인 책임이 없음을 알려드립니다.





1 / 2

발급번호 : G2022101702321583

건강보험자격득실확인서

| | | | | |
|-------|----|--------|--|--|
| 확인청구자 | 성명 | 주민등록번호 | | |
| | 박 | | | |

자격득실확인내역

| No | 가입자구분 | 사업장명칭 | 자격취득일 | 자격상실일 |
|----|--------|-------------|------------|------------|
| 1 | 직장가입자 | (주)바이오에프디엔씨 | 2022.09.13 | |
| 2 | 지역세대주 | | 2022.08.27 | 2022.09.13 |
| 3 | 직장가입자 | (주)차바이오랩 | 2022.04.11 | 2022.08.27 |
| 4 | 지역세대주 | | 2022.04.01 | 2022.04.11 |
| 5 | 직장가입자 | (주)바이오코스텍 | 2020.02.12 | 2022.04.01 |
| 6 | 직장피부양자 | 현대자동차(주) | 2020.01.31 | 2020.02.12 |
| 7 | 직장가입자 | 에코랩 주식회사 | 2020.01.28 | 2020.01.31 |
| 8 | 직장피부양자 | 현대자동차(주) | 2020.01.01 | 2020.01.28 |
| 9 | 직장피부양자 | 현대자동차(주) | 2019.10.01 | 2020.01.01 |
| 10 | 직장가입자 | 삼성바이오로직스(주) | 2018.10.01 | 2019.10.01 |

건강보험 자격득실내역을 위와 같이 확인합니다.
2022.10.17

국민건강보험공단 이사장

- ※ 이 확인서의 취득일·상실일은 실제의 사업장 입사일·퇴직일과 다를 수 있습니다.
- ※ 이 확인서는 국민건강보험공단 인터넷 홈페이지(www.nhis.or.kr) 및 모바일앱(The건강보험)에서 직접 발급이 가능합니다.
- ※ 이 확인서는 건강보험 자격확인용이므로 다른 용도(재직증명용, 경력증명용, 대출용 등)로 사용 시 공단에 법적 책임이 없음을 알려드립니다.





1 / 1

| 발급번호 : G2023010602321262 | | | | |
|--------------------------|-------|-------------|------------|-------|
| 건강보험자격득실확인서 | | | | |
| 확인청구자 | 성명 | 주민등록번호 | | |
| | 김 | | | |
| 자 격 득 실 확 인 내 역 | | | | |
| No | 가입자구분 | 사업장명칭 | 자격취득일 | 자격상실일 |
| 1 | 직장가입자 | (주)바이오에프디엔씨 | 2022.09.13 | |
| | ----- | 이하이백 | ----- | ----- |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

건강보험 자격득실내역을 위와 같이 확인합니다.

2023.01.06

국민건강보험공단 이사장



- ※ 이 확인서의 취득일·상실일은 실제의 사업장 입사일·퇴직일과 다를 수 있습니다.
- ※ 이 확인서는 국민건강보험공단 인터넷 홈페이지(www.nhis.or.kr) 및 모바일앱(The건강보험)에서 직접 발급이 가능합니다.
- ※ 이 확인서는 건강보험 자격확인용이므로 다른 용도(재직증명용, 경력증명용, 대출용 등)로 사용 시 공단에 법적 책임이 없음을 알려드립니다.





1 / 1

발급번호 : G2022090102321058

건강보험자격득실확인서

| | | | | |
|-------|----|--------|--|--|
| 확인청구자 | 성명 | 주민등록번호 | | |
| | 이 | | | |

자격득실확인내역

| No | 가입자구분 | 사업장명칭 | 자격취득일 | 자격상실일 |
|----|--------|-------------|------------|------------|
| 1 | 직장가입자 | (주)바이오에프디엔씨 | 2022.05.02 | |
| 2 | 직장피부양자 | 대화상사 | 2019.12.01 | 2022.05.02 |
| 3 | 직장가입자 | 씨유천안봉명점 | 2019.07.01 | 2019.12.01 |
| 4 | 직장피부양자 | 대화상사 | 2005.07.01 | 2019.07.01 |
| 5 | 지역세대원 | | 1997.01.27 | 2005.07.01 |
| | | 이하역백 | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

건강보험 자격득실내역을 위와 같이 확인합니다.
2022.09.01

국민건강보험공단 이사장

- ※ 이 확인서의 취득일·상실일은 실제의 사업장 입사일·퇴직일과 다를 수 있습니다.
- ※ 이 확인서는 국민건강보험공단 인터넷 홈페이지(www.nhis.or.kr) 및 모바일앱(The건강보험)에서 직접 발급이 가능합니다.
- ※ 이 확인서는 건강보험 자격확인용이므로 다른 용도(제직증명용, 경력증명용, 대출용 등)로 사용 시 공단에 법적 책임이 없음을 알려드립니다.




□ 홍보 실적

| 번호 | 홍보 유형 | 매체명 | 제목 | 홍보일 |
|----|--------------|------------------------|-----------------------------------|------------|
| 1 | 기타 | 인-코스메틱스 코리아 2021 | 인-코스메틱스 코리아 2021 홍보부스 참가 | 2021.07.14 |
| 2 | 기타 | 2021년 한국응용생명화학회 국제학술대회 | 2021년 한국응용생명화학회 국제학술대회 홍보부스 참가 | 2021.08.23 |
| 3 | 인터넷신문(포털사이트) | 팜이데일리 | 바이오에프디엔씨, 상장 한달..향체신약·식량안보 해법 찾는다 | 2022.03.29 |

홍보 실적 증빙서류 1



홍보부스 참가

- 사 업 명: 유용농생명자원산업화기술개발사업
- 과 제 명: “NGS이용 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 감염 현황 조사 및 식물 세포 바이오 리액터를 활용한 무병묘 스탁 생산 기술 개발” (과제번호 120085-3)
- 총 연구기간: 2020. 04. 29 - 2022. 12. 31 (33 개월)
- 당해연도 연구기간: 2021. 01. 01 - 2021. 12. 31 (12 개월)
- 참여기업: (주)바이오에프디엔씨
- 참여기업 연구책임자: 이 정 훈 인 

- 홍보부스 참가 날짜: 2021년 7월 14일 ~ 16일
- 홍보부스 참가 장소: 서울, 코엑스 C홀
- 홍보부스 참가 행사명칭: 인-코스메틱스 코리아 2021 (in-cosmetics korea 2021)

국내 유일의 화장품 원료 전시회인 인-코스메틱스 코리아 2021에 부스참가하여 본 연구과제의 성과물인 virus free 무병주 고구마 식물세포, 딸기 식물세포, 마늘 식물세포 라인을 활용한 화장품 소재에 대하여 전시 및 방문 고객사들에게 컨셉적으로 적용가능한 부분에 대하여 설명드림.



○ 이데일리 홍보

‘바이오에프디엔씨, 상장 한달..항체신약·식량안보 해법 찾는다’

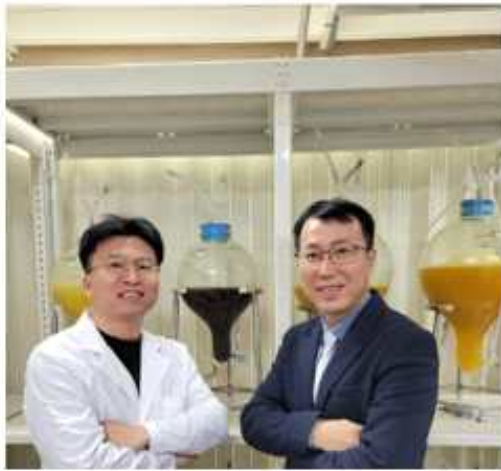
(이데일리 인터넷신문(포털사이트) 홍보, 22년 03월 29일)

바이오에프디엔씨, 상장 한달..항체신약·식량안보 해법 찾는다

바이오에프디엔씨의 면역항암제 개발 위한 MOU 체결. 면역항암제 PD-1에 관한 식물세포 기술 적용 사업과 유물 농량과 자원 산업화 기술개발사업도 속도전 돌릴 예정이다. “식량안보 바이오스 컨설팅이 사업 확장할 것”

3월 29일 09:29 4분 22초
3월 29일 09:29 4분 22초

이데일리가 실린 '가디언' 식물세포 플랫폼 기술 기업 바이오에프디엔씨(251120)가 면역항암제 개발과 식량안보 해법 찾기에 본격적으로 돌입한다. 이를 통해 미래 성장동력 확보에 사활까지 걸자는 '두 마리 토끼를 동시에 잡는다'는 방침이다. 차세대 바이오스 성장까지 수년간 핵심 투자 전략에 대해 수렴되는 것으로 기업가치 상승에도 기여할 것으로 기대된다.



그럼 실재성을 확보 기업과 참여해서 합니다. 바이오에프디엔씨는 지난 2022 올해 상반기 제일 기업 바이오에프디엔씨와 연구개발비와 첫 사업에 대한 업무협약(MOU)을 체결했다.

바이오에프디엔씨는 1세대가 등장하기 전제로를 공격할 수 있도록 하는 구조인 면역항암제 플랫폼 '엔시스(ENSC)' 등을 개발 중인 여러 면역항암제 신약으로 실적을 보유하고 있다. 특히 자체 항체로 처음인 면역항암제 YEN-006은 올해 초 주미 FDA 등 해외 임상 2상 진입을 앞두고 있다.

바이오에프디엔씨는 바이오에프디엔씨의 현재 기술을 활용해 PD-1 면역항암제에 관한 식물세포 기술 적용 및 사업에 참여하게 된다. PD-1은 암세포가 면역시스템을 회피하기 위해 만들어내는 물질이다. PD-1 면역항암제는 PD-1을 무력화시켜 암세포의 생식 기능을 약화시킨다.

무엇보다 바이오에프디엔씨는 "면역항암제에 사용되는 단백질항체를 포함한 바이오의약품에 생산인 내보내 될 것 같은 새로운 제형이나 제조공정 등을 이해해야 하고 있다"며 "이 같은 방식은 연구개발경쟁력이 높고, 대규모 시설 투자 요구, 고가의 생산비용 등 문제점들을 극복하고 있는 산업"이라고 지적한다.

바이오에프디엔씨는 식물세포 배양시스템은 동물세포와 같은 약한 온도, 낮은 산소농도, 영양분과 영양제(단백질 등 성분)로 최근 급부상 해와 바이오 R&D 기업들이 주목하고 있다"며 "식물세포 플랫폼을 기반으로 어차피 경쟁력 있는 시장이 요구에 선 바이오스 대응함으로써 시장을 선점할 것"이라고 강조했다.

최근 러시아와 우크라이나 전쟁으로 다시 주목을 받는 식량안보 해결에도 요구하기 위해 더욱 힘을 쏟는다. 바이오스 성장 등을 통해 확보한 자금과 인력을 선제적으로 투자한다는 계획이다.

3세대 플랫폼사업부인 MOU 체결한 고구마, 마늘, 알기 바이오스 관련 현황 조사 및 식물 세포 바이오에프디엔씨를 활용한 유전자 변형기술 개발 사업의 내용도 언급했다. 바이오에프디엔씨가 3년간 연구개발과 생산공정까지 연구개발 플랫폼사업부 지원을 받아 진행 중인 유물 농량과 자원 산업화 기술개발사업이다.

바이오에프디엔씨는 이 사업에서 고구마, 마늘, 알기 작물에 대한 식물세포배양기반 및 식물세포 기술 기업으로 바이오스 플랫폼에 식물세포를 도입하고, 설명했다. 최종적으로 자체 보유된 식물세포 배양 바이오에프디엔씨를 이용해 대량 생산한다. 또한 연구진은 국내 주요 고구마, 마늘, 알기 작물에 관련된 바이오스 플랫폼에 컨설팅하고, PD-1을 기존 식물세포 바이오스 컨설팅 기술 개발하고 있다.

모 대표는 "식량안보의 상당 부분은 바이오스, 세균, 곰팡이에 감염될 경우 다음 해에도 같은 병이 발생하여 단점이 있다"며 "특히 바이오스 감염은 재배를 계속시키는 주요 원인으로 농민들을 위협하는 것이 중요하다"고 설명했다.

그는 또 "최근 지방 및 환경에 식물세포 배양 시장 수요가 증가하고 있어서, 무병을 재배는 산업적 가치도 고려해 '값으로 무병' 값을 재배와 식물 바이오스 컨설팅 관련 사업도, 더욱 확장할 것"이라고 덧붙였다.

뿐만 아니라 3월 29일 바이오에프디엔씨는 식물세포 배양 관련 해단 무병한 R&D 투자를 통해 현재까지 50억 원 규모의 투자를 받았고, 누적 수익도 100억 이상을 기록하고 있다. 세계 최초로 식물세포 농량 플랫폼 기술도 개발해 '식물세포 플랫폼' 시스템도 운영 중이다. 이를 바탕으로 무병한 농업이 가능해지고 있으며, 올해는 100억 원 이상이 목표다.

Plantomics 기반 식물세포 유래 유효물질 및 약리물질 개발 기술



[사진=바이오에프디엔씨]

□ 포상 및 수상 실적

| 번호 | 종류 | 포상명 | 포상 내용 | 포상 대상 | 포상일 | 포상 기관 |
|----|----|----------------|---|-------|------------|------------------------|
| 1 | 수상 | IR52 장영실상 | 고주파 파형 활용 식물세포 플랫폼 기술 (제22-05923호) | | 2022.11.21 | 한국산업기술진흥협회, 매일경제신문사 |
| 2 | 수상 | 농림축산식품부 장관 표창장 | 국내 고유식물종 소재를 활용한 식물세포 배양기술 실용화로 신소재 공급 및 글로벌 사업화 (농림축산식품 제124248호) | | 2022.11.28 | 농림축산식품 |

포상 및 수상 실적 증빙서류 1



IR52 장영실상
고주파 파형 활용 식물세포 플랫폼 기술 (제22-05923호)
포상일 2022.11.21

본 연구과제에서 개발 중인 식물세포 플랫폼 기술에 기여한 공로를 인정받아 과학기술정보통신부가 주최하고 한국산업기술진흥협회와 매일경제신문사가 공동주관하여 '91년부터 시행하고 있는 국내 최고의 산업기술상을 수상하였음.



제 22-05923 호

상 장

(주)바이오에프디엔씨
연구소장 모

귀하는 한국산업기술진흥협회와 매일경제신문사가
공동주관하는 IR52 장영실상의 2022년도 제19주
수상제품으로 선정된 Plant Cell Rx(식물세포
제품)를 개발하여 산업기술혁신에 기여한 공로가
크므로 상장과 메달을 드립니다.



2022년 11월 21일

과학기술정보통신부장관 이 증



포상 및 수상 실적 증빙서류 2

농림축산식품부장관 표창장



농림축산식품부장관 표창장
국내 고유식물종 소재를 활용한 식물세포 배양기술 실용화로
신소재 공급 및 글로벌 사업화 (농림축산식품 제124248호)
포상일 2022.11.28.

농림축산식품 제124248호



표 창 장

(주)바이오에프디엔씨

대표이사 모

귀하는 농림축산식품 과학기술 개발
및 보급을 통하여 농림축산식품 산업
발전에 이바지한 공로가 크므로 이에
표창합니다.

2022년 11월 28일



농림축산식품부장관 정 황



[그 밖의 성과] : 없음

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항 :

본 연구를 기술실시 6건, (주)바이오에프디엔씨는 8명을 신규 채용하여 고용창출 8건, 수상실적 2건을 성과로 등록하였습니다. 연구를 통해 동정 및 확보한 바이러스 유전체 정보 44건을 생명 정보 연구성과로 등록하였습니다.

2) 목표 달성 수준

| 추진 목표 | 달성 내용 | 달성도(%) |
|--|---|--------|
| ○ NGS이용 품종별, 조직별 고구마 바이러스 분석 | - 호감미 5종, 진율미 2종, 밤고구마 2종, 꿀고구마 3종, 호박고구마 3종 바이러스에 복합 감염됨 - 5개 조직으로부터 총 7개 바이러스를 동정했으며, 5개 조직 중 fibrous root과 root stalk에 바이러스 양이 가장 많은 것으로 밝혀짐 | 100 |
| ○ 고구마 바이러스 진단 시스템 개발 | SPVG, SPVE, SPVC, SPSMV등 총 4종 대상 RT-PCR 기반 진단방법 개발 SPLCV, SPCFV, SPVC, SPSMV1등 총 4종 대상 real time RT-PCR 기반 진단방법 개발 | 100 |
| ○ 바이러스 프리 무병묘 개발을 위해 고구마 2품종, 딸기 2품종, 마늘 2품종 NGS이용 바이러스 분석 | 고구마 호감미 3종, 고구마 진율미 2종, 마늘 가담 11종, 마늘 홍산 7종에 감염된 바이러스 동정 딸기 설향 및 매향은 바이러스에 감염되지 않았음 | 100 |
| ○ NGS이용 품종별, 지역별 마늘 바이러스 분석 | 강원도에서 3개 샘플, 전남에서 5개 샘플, 경남 2개 샘플, 충남 1개 샘플, 제주 1개 샘플을 포함하여 총 12개 샘플 채취 RNA-sequencing을 통해 총 12개 라이브러리로부터 최소 8종에서 많게는 10종 마늘 감염 바이러스 동정 -NGS이용 신종 마늘 바이러스 Garlic virus J 동정 및 유전체 조립 12개 마늘 샘플로부터 43개 allexivirus 유전체, 26개의 potyvirus 유전체, 18개 carlavirus 유전체를 포함해서 총 87개 마늘 바이러스 유전체를 조립 및 계통수 분석 | 100 |
| ○ 마늘 바이러스 진단 시스템 개발 | 7종 allexivirus 특이적 진단을 위한 RT-PCR 진단 방법 개발 4종 GarVA, GarVC, GarCLV, OYDV 4종 real time RT-PCR 진단 방법 개발 | 100 |
| ○ RT-PCR 이용 6개 품종 바이러스 프리 캘러스 선발 | 6개 품종에 감염되어 있는 바이러스 NGS를 통해 동정 및 유전체 조립 동정된 바이러스 대상 RT-PCR 진단 방법 개발 및 기술 (주)바이오에프디엔씨에 제공 RT-PCR방법 이용 캘러스 바이러스 감염 여부 확인 | 100 |
| ○ NGS 이용 딸기 바이러스 동정 | - RNA sequencing을 이용해 30개의 딸기 라이브러리에서 딸기 바이러스 동정 10개의 라이브러리에서 바이러스 서열 확인 - 국내 유통 딸기 품종 킹스베리, 설향, 매향에서 NGS를 이용해 딸기 바이러스 동정 - 국내 유통 딸기 설향과 매향에서 NGS 분석으로 Strawberry mottle virus 전체 서열 동정 - 딸기 킹스베리에서 바이러스 감염되지 않음을 확인 | 100 |
| ○ 딸기 바이러스 진단 방법 개발 | 딸기 설향과 매향에서 동정된 Strawberry mottle virus를 real time RT-PCR로 진단 - Strawberry mottle virus 진단 RT-PCR용 프라이머 디자인 | 100 |
| ○ 바이러스 프리 고구마, 마늘, | - 고구마, 마늘, 딸기 캘러스 유도 시료에서 RNA | 100 |

| | | |
|------------------------------------|--|-----|
| 딸기 캘러스 라인 확인 | sequencing을 이용해 바이러스 진단 - RT-PCR 방법 이용 캘러스 바이러스 감염 여부 확인 - 고구마 진율미에서 유도된 캘러스에서 바이러스 프리 라인 확인 - 마늘 가담 캘러스에서 바이러스 프리 라인 확인 - 딸기 설향, 딸기 매향에서 유도된 기내식물에서 바이러스 프리 라인 선별 | |
| ○ 바이러스 진단 키트 개발 | - 고구마 5종 바이러스 진단 프라이머 선별과 One Step RT-PCR 키트 및 매뉴얼 개발 완료 - 마늘 5종 바이러스 진단 프라이머 디자인과 One Step RT-PCR 키트 및 매뉴얼 개발 완료 - 딸기 2종 바이러스 진단 프라이머 선별과 One Step RT-PCR 키트 및 매뉴얼 개발 완료 | 100 |
| ○ 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 프리 캘러스 유도 | - 고구마의 잎과 엽병 조직 유래 캘러스 확보 - 마늘의 잎조직 유래 캘러스 확보 - 딸기의 엽병 조직 유래 캘러스 확보 | 100 |
| ○ 작물별, 품종별 세포 배양 배지 조성 개발 | - 마늘과 고구마 딸기 식물체의 캘러스 유도 배지 선별 - 마늘과 고구마 캘러스 라인선발 및 증식 - 마늘과 고구마 딸기 기내 식물체 확보 - 딸기 성장점 소독 방법 및 배지조성 개선 필요 | 100 |
| ○ 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 프리 캘러스 및 식물체 확보 | - 고구마, 마늘, 딸기 캘러스를 증식하고 RT-PCR을 이용하여 바이러스를 검정함 - 고구마 정단 성장점을 0,2~0.5mm 크기로 적출하여 2,4-D 처리 배재에서 캘러스 확보 및 BA와 NAA 조합에서 신초 및 캘러스를 - 마늘 1엽원기를 포함한 정단성장점 배양을 통해 캘러스 및 신초를 확보하였고, stem-disc배양을 통해 다수의 기내 신초를 확보 - 딸기 런너 기부의 성장점 배양으로 기내 식물체 및 캘러스 확보 | 100 |
| ○ 작물별 동결보존 기초 조건 규명 | - 고구마 1품종(호감미)에서 액체질소 처리 후 TTC 검정을 통해 캘러스 생존한 조건 확보 - 마늘 2품종(가담, 홍산)에서 액체질소 처리 후 TTC 검정을 통해 동결보존 기초 조건 확보 - 딸기 2품종 모두 전처리, Loading 단계까지 캘러스 생존 확인. | 100 |
| ○ 바이오리액터를 이용한 대량 생산기술 개발 | - 확보된 virus free 진율미 캘러스를 2,4-D 0.5mg/L가 첨가된 MS액체배지에 현탁배양 후 3L 바이오리액터에 접종 배양조건 확립. - 5L 바이오리액터로 scale up하여 대량 배양 | 100 |
| ○ 무병묘 상업화 | - 고구마, 딸기 바이러스 프리 기내 식물체를 대량 증식하여 기내 프리묘를 공급하여 3200만원 매출 및 상업화 성공 | 100 |

4. 목표 미달 시 원인분석 : 없음

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

해당사항 없음

2) 자체 보완활동

연구 기간 내내 대학과 회사가 매우 긴밀하게 협조하여 연구를 진행시켰으며, 상업화와 관련하여 바이러스 진단 키트 3종을 개발완료하였으며, 3개 작물에 대한 바이러스 무병묘를 개발하여 상업화하였습니다. 관련 특허도 대학이 아닌 기업 중심으로 특허 출원하여 개발된 연구 기술이 빠르게 실용화할 수 있도록 노력하였습니다.

3) 연구개발 과정의 성실성

비슷한 시기에 수행한 대부분의 바이러스 무병묘 연구 과제들이 하나의 작물에 초점을 두었다면, 본 연구는 고구마, 마늘, 딸기 주요 세 개 영양 작물에 대해 무병묘를 개발완료하였습니다. 또한 개발된 무병묘를 연구기간내에 공급하여 매출 성과와 상업화를 성공시켰습니다. 또한 연구 성과의 실용화를 위해 고구마, 마늘, 딸기 주요 바이러스를 진단할 수 있는 진단키트 시제품 3종을 관련 매뉴얼을 개발 완료하였습니다. 기존에 계획한 모든 연구 성과를 달성하거나 초과 달성했으며, 추가로 기존에 계획하지 않은 기술실시 6건, 수상실적 2건, 생명정보 44건과 고용 창출 8건을 달성하였습니다. 달성한 연구 성과도 공동연구팀의 특성에 맞게 대학과 기업이 고루게 달성하였습니다. 따라서 종합적으로 판단할 때 연구과제가 매우 성실하게 수행되었다고 할 수 있습니다.

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

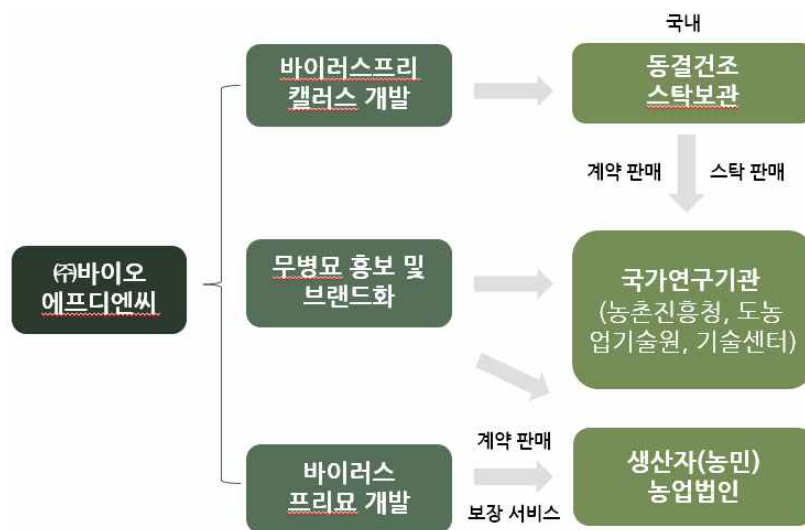
(단위 : 백만원, %)

| 총괄과제명 | 세부과제명 | 기관명 | 유형 | 총 연구개발비 (A) | 정부지원 연구개발비 (B) | 정부지원 연구개발비 비율 (C=B/A) | 성과 유형 | 기술기여도 | |
|---|---|--------------|------------|-------------|----------------|-----------------------|----------|----------|----------|
| | | | | | | | | 산정 근거 | 비율 |
| NGS이용 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 감염자 식별을 위한 식물 세균병 진단 키트 개발 | NGS이용 고구마, 마늘, 딸기 바이러스 감염자 식별을 위한 식물 세균병 진단 키트 개발 | 성균관대학교 산학협력단 | (대학) (비영리) | 387 | 387 | 1.000 | 신규 기술개발 | 해당없음 | - |
| 무병묘 생산 기술 개발 | 식물 세균병 바이러스를 활용한 무병묘 생산 기술 개발 | (주)바이오프디앤씨 | 중소기업 (영리) | 560 | 420 | 75 | 신규 기술개발 | 1-1 | 75 |
| 계 | | | | 947 | 807 | - | - | - | - |

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

○ 산업화 실용화 전략

- 식물 바이러스 분야는 동물 및 인간 바이러스 분야처럼 수요가 많지 않음
- 개발된 식물 바이러스 진단 키트는 국가 기관(농촌진흥청, 검역원, 종자원, 도농업기술원, 기술센터, 기타 관련 연구기관)에서 많이 필요로 함
- 생산자(농민)의 경우 진단 키트에는 관심이 없고, 진단 서비스를 받고자 함
- 무병묘 판매와 바이러스 진단 서비스가 동시에 이루어져야 함
- 진단 키트 시장에 비해 바이러스 무병묘 시장은 잠재성이 높은 큰 시장임
- 생산자(농민)의 경우 현재 바이러스 무병묘의 기대와 실망이 동시에 가지고 있음
- 이미 생산자의 무병묘에 대한 인식은 매우 높음
- 바이러스 무병묘 판매와 진단 서비스가 동시에 이루어져야 함
- 무병묘의 고급화, 명품화, 브랜드화 필요
- 시장 경제에 의한 공정한 무병묘 시장 경쟁 유도



< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

| 구분(정량 및 정성적 성과 항목) | | 연구개발 종료 후 5년 이내 | | | | |
|---------------------|--------------|-----------------|--------|--------|--------|--------|
| | | 2023 | 2024 | 2025 | 2026 | 2027 |
| 국외논문 | SCIE | | | | | |
| | 비SCIE | | | | | |
| 국내논문 | SCIE | | | | | |
| | 비SCIE | | | | | |
| 특허출원 | 국내 | | | | | |
| | 국외 | | | | | |
| 특허등록 | 국내 | | | | | |
| | 국외 | | | | | |
| 인력양성 | 학사 | | | | | |
| | 석사 | | | | | |
| | 박사 | | | | | |
| 사업화 | 시제품개발 | | | | | |
| | 상품출시 | | | | | |
| | 기술이전 | | | | | |
| | 공정개발 | | | | | |
| | 매출액(단위 : 천원) | 10,000 | 20,000 | 30,000 | 40,000 | 50,000 |
| | 기술료(단위 : 천원) | 380 | 760 | 1,140 | 1,520 | 1,900 |
| 비임상시험 실시 | | | | | | |
| 임상시험 실시 (IND 승인) | 의약품 | 1상 | | | | |
| | | 2상 | | | | |
| | | 3상 | | | | |
| | 의료기기 | | | | | |
| 진료지침개발 | | | | | | |
| 신의료기술개발 | | | | | | |
| 성과홍보 | | | | | | |
| 포상 및 수상실적 | | | | | | |
| 정성적 성과 주요 내용 | | | | | | |

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.