

11-1543
000-004
371-01

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업
2022년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004371-01

국내육성 프리지아, 글라디올러스, 칼라의 바이러스 감염표시자와 유전체 검출용 RT-PCR 키트 개발

감염표시자와 유전체 검출용 RT-PCR 키트 개발
국내육성 프리지아 글라디올러스 칼라의 바이러스

2022

2023.06.05.

서울대학교산학협력단
(주) 바이오큐브시스템

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

<첨부1>

평가의견에 대한 조치 및 개인정보 삭제 확인서

평가의견에 대한 조치

평가의견	조치내용	비고
○ 제품화한 진단용 키트의 결과 결함을 이용한 확진용 판정 기준 제시 필요	○ 바이러스 진단을 위한 표지유전자 기반 바이러스 진단 키트의 SOP 확립에 대한 내용을 조치하였음 (최종보고서 64 쪽에 제시함)	
○ 추후 본 연구에서 부족한 부분에 대한 보완을 진행하고자 하는 계획 보완이 필요할 것으로 예상됨.	○ 표지유전자 활용 키트에 대한 보완조치 내용과 전략적인 성과에 대한 보완 내용을 조치하였음 (최종보고서 64 쪽에 제시함)	
○ 협동연구개발기관이 기보유하고 바이오큐브 기술에 대한 상세한 설명과, 바이오큐브 기술이 다른 추출 기술 대비 식물 바이러스 핵산 추출에 어떤 점에서 우월한지에 대한 구체적인 기술이 필요함.	○ 바이오큐브에 대한 기초설명과 이를 활용한 시료확보의 과정, 기존 핵산추출방법 대비 우월한 점 및 활용에 대한 설명을 보완 조치 하였음 (최종보고서 9 쪽에 제시함)	
○ 개발제품이 농업현장 혹은 수요현장에 광범위하게 적용되기 위한 사업화 계획 및 매출계획에 대한 수정보완이 필요함.	○ 기개발된 제품을 활용한 사업과 계획 및 상업과 전략을 보완 조치하였음 (최종보고서 66 쪽에 제시함)	

개인정보 삭제 확인

본인은 연구과제 최종보고서의 개인정보(주민등록번호 등)를 삭제하여 제출함을 확인합니다.

2023. 2. 6.

주관연구책임자 : 최 * * *Cui*

최종보고서										보안등급		
										일반[√], 보안[]		
중앙행정기관명		농림축산식품부			사업명		사업명			작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업		
전문기관명 (해당 시 작성)		농림식품기술기획평가원			내역사업명 (해당 시 작성)		내역사업명			진단기술 산업화		
공고번호		농축2021-55호			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		총괄연구개발 식별번호			121055-2		
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB	100%	LB03		100%	LB0301		100%			
	농림식품과학기술분류	RA	100%	RA03		100%	RA0301		100%			
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문	국내육성 프리지아, 글라디올러스, 칼라의 바이러스 감염표시자와 유전체 검출용 RT-PCR 키트 개발									
		영문	Development of RT-PCR kits for detecting viral biomarkers and genomes in Korean bulbs of freesia, gladiolus, and calla									
연구개발과제명		국문	국내육성 프리지아, 글라디올러스, 칼라의 바이러스 감염표시자와 유전체 검출용 RT-PCR 키트 개발									
		영문	Development of RT-PCR kits for detecting viral biomarkers and genomes in Korean bulbs of freesia, gladiolus, and calla									
주관연구개발기관		기관명	서울대학교산학협력단			사업자등록번호		119-82-03684				
		주소	(08826) 서울 관악구 관악로1			법인등록번호		114371-0009224				
연구책임자		성명	최**			직위		책임연구원				
		연락처	직장전화				휴대전화					
			전자우편				국가연구자번호					
연구개발기간		전체	2021. 04. 01 - 2022. 12. 31(1년 9개월)									
		단계 (해당 시 작성)	1단계									
			n단계									
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비	그 외 기관 등의 지원금 지방자치단체 기타()				합계			연구개발비 외 지원금	
		현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계	
총계		525,000	84,600					525,000	84,600	609,600		
1단계		1년차	225,000	42,000				225,000	42,000	267,000		
		n년차	300,000	42,600				300,000	42,600	342,600		
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고					
		주식회사 바이오큐브시스 템	신**	대표			역할		중소기업			
연구개발담당자 실무담당자		성명	최**			직위		책임연구원				
		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 2 월 6 일

연구책임자: 최 * * *Cui*

주관연구개발기관의 장: 서울대학교산학협력단 (직인)

공동연구개발기관의 장: (주) 바이오큐브시스템 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		작물바이러스 및 병해충대응 산업 화 기술개발사업		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
내역사업명 (해당 시 작성)		진단기술 산업화		연구개발과제번호		121055-2	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB	10 0%	LB03	10 0%	LB0301	100 %
	농림식품 과학기술분류	RA	10 0%	RA03	10 0%	RA0301	100 %
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국내육성 프리지아, 글라디올러스, 칼라의 바이러스 감염표시자와 유전체 검출 용 RT-PCR 키트 개발					
연구개발과제명		국내육성 프리지아, 글라디올러스, 칼라의 바이러스 감염표시자와 유전체 검출 용 RT-PCR 키트 개발					
전체 연구개발기간		2021. 04. 01 - 2022. 12. 31					
총 연구개발비		총 609,600 천원 (정부지원연구개발비: 525,000 천원, 기관부담연구개발비 : 84,600 천원)					
연구개발단계		기초[O] 응용[] 개발[] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준() 종료시점 목표()	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표		바이오큐브기반 바이러스 감염표시자와 유전체 검출키트 개발				
	전체 내용		- 구근별 전사체 비교를 통한 공통 또는 특이 발현 바이러스감염 표지자 선별 * CMV와 BYMV 2종 - 선별 표시자와 바이러스 유전체 서열 기반 진단조건 확립 - 세라믹 큐브 기반 현장현시 진단키트 개발 * 8종				
	1단계 (해당 시 작성)	목표 내용					
	n단계 (해당 시 작성)	목표 내용					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 바이러스 무감염 프리지아, 칼라 구근대상 CMV, BYMV 감염조건 확립 및 전사체 분석을 통한 유전자 기능 분석 완료 ○ 해당 구근의 CMV와 BYMV 감염에 따른 공통 발현 유전자 및 각 바이러스 특이적 발현 유전자 발굴 ○ 각 바이러스 감염에 따라 특이적으로 발현하는 후보유전자(각 3개)를 이용한 Realtime RT-PCR 수행 및 해당 유전자의 진단 조건 최적화 수행 ○ 전사체 분석을 통한 프리지아, 칼라, 글라디올러스 품종별 감염 바이러스 진단 완료 및 유전자 전장 서열 정보 확보 ○ 구근 감염 바이러스 전장 유전체 서열 기반 진단 프라이머 제작 및 진단을 위한 조건 확립 ○ 바이오큐브 결합을 통한 바이러스 진단용 각 바이러스 특이적 primer 기반 진단 키트 시제품 개발 완료 ○ 감염 바이러스 계통판별용 키트 완제품 개발 완료 						
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 전사체를 식물바이러스 감염표지자로 활용할 수 있는 가능성을 제시, 표지자 기반 진단기술체계 구축에 기여. ○ 바이오큐브로 RNA주형 정량기술을 확보, 전사체 기반 POC 진단체계 확립에 기여. 						

- QC 제어가 가능하도록 바이러스 감염표지자와 유전체 기반 진단키트 개발함으로써 진단 결과의 신뢰성 확보에 기여.
- 바이러스 감염시 공통으로 발현되는 표지자를 활용한 진단법은 Multiplex PCR이나 동일 속(genus)내 바이러스를 동시에 진단하는 universal primer를 이용한 PCR법이 갖는 장점을 상회하는 기술이 될 것으로 예측됨.
- 전사체 분석을 통해 바이러스 감염시 공통 또는 특이적으로 발현되는 기주 인자에 대한 정보를 제공함으로써 다양한 식물과 바이러스에 대한 효율적인 진단법 개발에 적극 활용이 가능함.
- 전사체비교 분석에서 나오는 표지자 중에는 바이러스가 감염이나 복제과정에서 필요로 하는 기주인자에 대한 정보는 Cas9 등을 활용한 유전자가위교정기술의 재료로 활용되어 새로운 형태의 바이러스병 저항성작물 획득에 기여할 것으로 기대.
- 표지자를 활용한 진단법은 식물바이러스 검정 절차와 비용을 획기적으로 단축시킬 수 있어 시간이나 경제적 이익을 가져올 것임.
- 새로운 형태의 진단 제품은 식물바이러스 진단시장의 잠재력 증가와 부가가치 촉진으로 새로운 수익모델 창출 기대.
- 식물에서의 바이러스 감염표지자 발굴은 새로운 시도로 진단기술과 관련된 지식 재산권 획득이 가능하며, 이를 통한 국내개발제품의 대외 경쟁력 강화에 기여할 것으로 기대됨.
- 표지자를 이용한 바이러스 사전진단과 유전체를 이용한 확진용 진단키트는 국내 육성 구근 3인방의 바이러스 무감염체계구축에 활용될 수 있고, 이를 통해 구근류 재배와 수출을 통한 농가의 신소득 창출에 기여할 것으로 기대됨.

연구개발성과의 비공개여부 및 사유

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
	3	3		1				2				
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	프리시아		칼라		글라디올러스		바이러스		피씨알			
영문핵심어 (5개 이내)	Freesia		Calla		Gladiolus		Virus		PCR			

< 목 차 >

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

별첨 자료 (참고 문헌 등)

1. 연구개발과제의 개요

□ 국내 육성 구근 3인방

- 프리지아, 글라디올러스, 칼라는 구근류 화훼 가운데 국산화율이 높은 장래가 촉망되는 품목이다.
- 프리지아는 2003년 '샤이니골드'(2013 대한민국 우수품종 국무총리상)를 시작으로 45종 이상의 품종이 육성되었고, 2018년 국산화율이 60.4%를 기록하였다(2019. 농어민신문 등).
- 국내 육성 '화이트앤쿨' 글라디올러스 품종은 한국농수산식품유통공사 화훼공판장에서 글라디올러스 중 최고가를 기록하였고(2020년 7월), 약 55 품종이 개발되어 있으며, 2020.8.4.일 기준 국산 품종 보급률 30.2%에 이른다(2020, 농촌진흥청 보도자료).
- 칼라는 강원도농업기술원에서 2009년에 유색 칼라 2품종('골든하트' , '모닝라이트')을 등록하였으며, 이후 국산 품종 보급률은 2015년에 9%를 기록하였다. 또한 작년에는 칼라 2만구(총 1억원 상당)를 중국에 수출하기도 하였다(2020 연합뉴스).
- 이들 구근류는 수입대체뿐만 아니라 수출 품목으로서도 가능성이 높는데, 대외경쟁력을 확보를 위해선 대량증식조건, 보급체계구축 등과 함께 고품질 구근 생산에 필요한 바이러스 무병묘 생산체계 마련이 중요하다.
- 프리지아, 글라디올러스, 칼라를 감염하는 바이러스는 각각 6종, 14종, 15종이며(표1), 국내에서는 Bean yellow mosaic virus(BYMV), cucumber mosaic virus(CMV), Freesia sneak virus, Freesia mosaic virus(FreMV)가 글라디올러스와 프리지아에서 보고되었다(Korean J. Plant Pathol. 14(1):74-82, 1998, Res. Plant Dis. 19(4) : 313-318, 2013).
- 이들 구근은 성장점 배양 단계에서부터 바이러스 검정을 통한 무병주 생산과정을 거치지만, 양구나 재배과정에서 다양한 바이러스 감염에 의해 해를 거듭 할수록 식물체 퇴화로 품질저하와 수확량이 감소하여 3~5년마다 무병종구를 생산, 보급해야 한다고 한다.
- 프리지아의 경우, 바이러스 등의 피해로 종구 퇴화율이 높고, 지속적 관리가 어려워 해마다 정식한 구근의 30% 정도를 제거하게 되어 생산량 및 농가 소득이 감소했다는 보고가 있다(Kor. J. Hort. Sci. Technol. 31, (SUPPL 1), 2013).

표1. 프리지아, 글라디올러스, 칼라에서 보고된 바이러스

바이러스 명	약자	감염 기주		
Alfalfa mosaic virus	AMV			Calla
Arabis mosaic virus	ArMV		Gladiolus	Calla
Bean yellow mosaic virus	BYMV	Freesia	Gladiolus	Calla
Calla lily chlorotic spotted virus	CCSV			Calla
Calla latent virus	CLLV			Calla
Carnation mottle virus	CarMV			Calla
Cucumber mosaic virus	CMV	Freesia	Gladiolus	Calla
Dasheen mosaic virus	DsMV			Calla
Impatiens necrotic spot virus	INSV			Calla
Konjak mosaic virus	KoMV			Calla
Potato virus X	PVX			Calla
Tobacco rattle virus	TRV	Freesia	Gladiolus	Calla
Tomato spotted wilt virus	TSWV		Gladiolus	Calla
Turnip mosaic virus	TuMV			Calla
Zantedeschia mosaic virus	ZaMV			Calla
Zantedeschia mild mosaic virus	ZaMMV			Calla
Freesia mosaic virus	FreMV	Freesia		
Freesia sneak virus(Ophiovirus)	FreSV	Freesia		
Clover yellow vein virus	CIYV		Gladiolus	
Narcissus atent virus			Gladiolus	
Strawberry latent ringspot virus			Gladiolus	
Tobacco mosaic virus	TMV		Gladiolus	
Tobacco streak virus			Gladiolus	
Tomato ringspot virus			Gladiolus	
Tobacco necrosis virus	TNV		Gladiolus	
Broad bean wilt virus	BBWV		Gladiolus	

1-2. 연구개발 대상 기술의 국내외 현황

□ 구근류 바이러스 진단

- **국내의 경우**, 국가 간 물류량의 증가로 새로운 바이러스 유입 가능성 증가로 바이러스 확산억제를 위해 현지검역을 하는 네덜란드 이외의 화훼구근류는 격리재배검사를 실시하고 있다.
- 바이러스 검사에 주요 사용되는 진단법은 크게 항체를 이용하는 효소면역항체법과 PCR 검사법이 있으며, PCR법은 효소면역항체법에 비해 민감도가 뛰어나고, 바이러스 특이 primer 합성이 비교적 간단하기 때문에 돌발병해충 검정에 매우 유용하다.
- monoplex PCR 검사법은 1회 반응으로 한 종류의 바이러스를 정밀하게 진단하는데 유용하며, multiplex법은 monoplex법에 비해 바이러스 검출 감도가 떨어지나 여러 종류의 바이러스를 한 번에 진단할 수 있는 이점이 있다.
- 국내의 경우, 1998년에 TRV가 처음 보고되었고, 2002년에는 글라디올러스에서도 발생함이 확인되었다(Res. Plant Dis. 8(3): 207-214). 2013년에는 BYMV의 전장 서열이 해독되었고(Res. Plant Dis. 19(2): 77-83), 2014에는 Freesia sneak virus가 처음 보고되었다(Acta Horticulturae 1072:173-178). 이들 바이러스에 대한 진단법은 원예특작과학원 등 일부 연구자에 의해서 보고되기는 했으나, 바이러스 전반에 대한 진단법 식물검역기술개발센터에서 개발되었다.
- 식물검역기술개발센터에서는 PCR법을 이용해 TNV (Tobacco necrosis virus), TBV (Tulip breaking virus), NMV (Narcissus mosaic virus), NYSV (Narcissus yellow stripe virus), NeLV (Nerine latent carlavirus), INSV (Impatiens necrotic spot virus), DMV (Dahlia mosaic virus), SLV (Shallot latent virus), AILV(Artichoke italian latent virus) 등 39종 이상의 검역바이러스 표준 검사법을 개발하여 바이러스 감염 유무 확인에 활용하고 있다.
- **국외의 경우**, 바이러스 발생에 대한 연구는 많이 되어 있으나, 진단법 자체에 대한 연구는 거의 보고가 되어 있지 않은데, 이는 진단법 자체는 학문적인 큰 의미를 갖지 못하기 때문인 것으로 생각된다.
- 각 구근별로 바이러스 진단과 관련된 논문을 조사해 보았을 때, 프리지아에서는 2007년 남아프리카공화국에서 FreSV 진단조건에 대한 연구결과가 보고되었고(Vaira et al., 2007, Plant Disease 91:770), 2010년 호주에서는 BYMV, DsMV, FreMV, TuMV 등 포티바이바이러스 검정용 universal primer를 보고하였다(Plant Pathology 59, 211-220). 2013년에는 중국에서 BYMV, FreMV, CMV multiplex법이 보고되었고(Plant

Diseases and Pests, 4(1):33-35). 2014년에는 일본에서 BYMV, FreMV multiplex법을 보고하였다.

- 글라디올러스의 경우, 1991년에 이스라엘에서 BYMV 검정을 보고하였고(Ann. appl. Biol. 119,289-294), 2005년에는 아르헨티나에서 BYMV와 CMV 검정법을 보고하였으며 (AGRISCIENTIA, VOL. XXII (2): 87-89), 2009년과 2011년에는 체코에서 글라디올러스 모구와 자구에서 BYMV 검정 조건을 보고하였다(Journal of Plant Diseases and Protection, 118(1): 2-6).
- 칼라의 경우, 2004년 대만에서 CLLV(Plant Dis. 88(9):1046)와 2007년 ZaMMV(Plant Pathology 56:183-189) monoplex법을, 2010년에는 DsMV, TuMV, KoMV, ZaMMV multiplex 검정법을 보고하였다(Eur J Plant Pathol 126:43-52).

○ 바이오큐브(Biocube) 관련 제품 개발 및 활용

바이오큐브는 다공성 세라믹 칩으로 칩을 식물체 잎이나 구근 등에 찌르면, 세포가 찢어지면서 기공의 흡수력과 표면 특성에 의해 핵산(DNA & RNA)이 칩에 흡수되고, 이를 RT/PCR 주형으로 사용할 수 있다. 바이오큐브를 사용시에는 기존 column 방식과 비교하였을시 단순한 실험절차, 빠른 주형획득시간 (3초)의 장점을 가지고 있으며 핵산추출을 위한 용매의 불필요, 실험 기구의 불필요와 같은 이유로 현장적용이 가능하다. 또한 1인 1일 기준 1,000-2,000개의 시료 채취가 가능하여 작업자의 작업 피로도가 낮은 장점을 가지고 있다. 바이오큐브 활용 시판 제품으로는 BCS Folder1(조직에 직접 눌러 핵산을 바이오큐브로 흡수시켜 이를 주형으로 사용), BCS Folder2(즙액이 부족한 시료(곤충, 벼 등)에 활용), Biocubes (바이오큐브를 시료에 직접 떨어뜨린 후 핀셋 뒷면으로 눌러 핵산을 흡수), BCS FP kit (조직내 농도가 낮은 바이러스를 농축시킨 다음 핵산을 추출하는 방식), 병원체 package kit (RT/PCR 진단 키트에 BCS Folder나 Biocubes를 결합한 제품)이 있으며 이를 활용하여 고구마와 멜론 발생 바이러스 진단용 주형 준비, 고추 등 분자표지 분석, 진균이나 세균 진단 등에 활용되며, 다양한 식물과 동물의 RT/PCR 진단에 적용 가능하다.

1-3. 연구개발의 중요성

□ 전사체 발현분석과 표지자(marker)

- 전사체는 병원균 감염, 건조 등 여러 가지 스트레스 상황에 식물이 놓였을 때 세포내에서 발현된다. 특히 식물바이러스 감염시 특이적으로 발생하는 전사체는 표지자로서 활용될 가능성이 매우 높는데, 식물바이러스 감염시 발현되는 특이전사체를 분석하여 바이러스 감염 유무를 폭 넓게 확인한 방법은 아직까지 보고된 예가 없다.

- 성격은 다르지만 **의학분야에서** 병발생을 파악하는 방법 가운데 하나로 종양표지자 또는 생체표지자(biomarker)를 이용하는데, 최초의 종양표지자는 1846년 “Mollities osseum” (현재 진단명 다발골수종) 환자의 소변에서 얻은 열 침전물인 Bence-Jones 단백이며, 이후 **다양한 종양을 진단할 수 있는 표지자들이 개발되었다**. 현재 수 백 종류가 넘는 종양표지자가 알려져 있으며, 세포질 단백질, 효소, 호르몬, 수용체, 유전자에 이르기까지 매우 다양하다(표2, 오소연. 종양표지자, 2018년 대한내과학회 춘계학술대회).
- 구근을 재배하는 농민은 어떤 바이러스가 감염되었나 보다는 단지 바이러스 감염 유무를 **확인하고 싶어 한다**. 구근에 발생하는 모든 바이러스를 다 검사해 보는 것은 시간과 비용이 매우 많이 드는 일이다.

표2. 대표적인 악성종양별 혈청 종양표지자와 그 역할

Malignancy	Tumor marker(s)	Screening	Diagnosis	Monitoring
Adrenal carcinoma	Steroids		○	
Breast	CA 15-3			○
Carcinoid	5-HIAA		○	
GI tract Pancreas	CEA, CA 19-9			○
Choriocarcinoma	β -hCG		○	○
Germ cell tumors	AFP, β -hCG		○	○
HCC	AFP	○	○	○
Lymphoma	LDH		○	
Myeloma	Immunoglobulins		○	
Ovarian	CA125		○	○
Prostate	PSA, PAP	○	○	○
Thyroid	Thyroglobulin			○

약자: CEA, Carcinoembryonic antigen; β -hCG, Human chorionic gonadotropin; AFP, α -Fetoprotein; LDH, Lactate dehydrogenase; PSA, Prostate-specific antigen; PAP, Prostatic acid phosphatase

- 식물에서 **바이러스 감염유무를 확인하는 방법**에 표지자를 이용한다면 이러한 불편을 들 수 있겠지만, 아쉽게도 바이러스감염 표지자에 대한 연구는 없다. 다만, 바이러스나 기주 종류에 따라 특이적으로 발현되는 **전사체 연구**는 다수 보고되어 있다.
- 최근에 발표된 연구논문을 위주로 그 예를 살펴보면, qRT-PCR을 이용해서 무병징 감염과 병징이 심한 개체사이에는 housekeeping genes의 발현량에 현저한 차이가 있음을 보고하였고(Pesti 등, 2019, PLoS ONE 14(5): e0216618). FreMV에 중간저항성을 갖는

‘Shiny Bell’ 과 감수성 품종인 ‘Shiny Gold’ 식물체에서는 isoflavone 2’ -hydroxylase-like와 Bowman-Birk type proteinase inhibitor-like 유전자가 바이러스 접종 0, 6, 24시간 후 공통적으로 발현이 높았으며, uncharacterized protein 및 putative wall-associated receptor kinase-like 16 유전자는 공통적으로 발현이 감소했다는 보고가 있었다(국립원예특작과학원, 2017).

- 바이러스 감염표지자를 개발한다면, 다수의 바이러스에 대해 앞서 기술한 포티바이러스 universal primer처럼 동시에 여러 종류의 바이러스 감염 유무를 파악하는데 이용될 가능성 높을 것으로 판단되었다.

1-4. 연구개발의 목표 및 내용

1) 연구개발과제의 최종 목표

구분	내용
최종목표	바이오큐브기반 바이러스 감염표지자와 유전체 검출키트 개발
세부목표	1. CMV와 BYMV 감염표지자 선발(2종) 2. 감염표지자와 유전체 검출키트 개발(10종)

2) 연구개발과제의 단계별 목표

연차	목표
1차년도 (2021)	<p>1세부과제:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 바이러스 무감염 구근 기반 Cucumber mosaic virus(CMV) 감염 기주 전사체 분석 2. 프리지아, 글라디올러스, 칼라 품종별 CMV 감염 공통 발현 및 특이 전사체 선발 3. 공통 또는 특이 발현 전사체를 이용한 진단조건 최적화(1종)
	<p>1협동과제:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 전사체 분석을 통한 프리지아, 글라디올러스, 칼라 품종별 바이러스 감염 양상 분석 2. 바이러스 유전체 특이 진단 조건 확립 및 바이러스 무감염 시료 선발 3. 바이러스 유전체 특이 primer와 바이오큐브를 이용한 진단 키트 시제품 개발(4종)
2차년도 (2022)	<p>1세부과제:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 바이러스 무감염 Bean yellow mosaic virus(BYMV) 감염 기주 전사체 분석 2. 프리지아, 글라디올러스, 칼라 품종별 BYMV 감염 공통 발현 및 특이 전사체 선발 3. 공통발현 또는 특이 전사체를 이용한 진단조건 최적화(1종)
	<p>1협동과제:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 바이러스 유전체 특이 primer와 바이오큐브를 이용한 진단 키트 시제품 개발(4종) 2. 공통 또는 특이 발현 전사체 primer와 바이오큐브를 이용한 진단 키트 개발(2종) 3. 진단조건 최적화 및 진단 키트 완제품 개발(10종)
최종	바이오큐브기반 바이러스 감염표지자와 유전체 검출키트 개발

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

○ 시료 수집 및 유지

2021년 3월 중순에서 5월 초에 양재동과 남서울 꽃시장에서 재료를 구매하였다. 시중에 유통되는 프리지아는 노란색과 붉은색 품종으로 불리어 정확한 품종명 확인이 어려웠으나 생리장해가 심한 개체 위주로 구매하였고 6월 이후 수확한 구근은 총 42개였다.

실험에 사용할 재료는 주로 충청남도농업기술원 화훼연구소로부터 분양받았는데, 5월에는 절화용 프리지아 15품종(골드문, 웨딩퍼플, 솔레일, 골드리치, 레드스타, 레드썬, 사이니골드, 아빌라, 이본느, 핑크지아, 실버비치, 모닝글로리, 분본, 블루오션, 레드벨)을 품종별로 2~5개체씩 분양받았다. 잎은 동결하고, 구근은 그물망에 넣어 여름을 난 후 9월 17일부터 27일까지 화분에 각각 하나씩 이식하였다. 이식한 구근은 25도씨 이하의 비닐하우스에 재배하면서 구근 구매 직후 채집하여 동결한 잎과 새로 나온 잎을 실험재료로 사용하였다. 10월 말에는 육성중인 4종류의 F1(솔레일x레드스타 등)을 어린 식물체로 분양받았고 이듬해(22년) 6월까지 재배하면서 잎과 구근을 실험재료로 사용하였다.

칼라는 6월경까지 시판되고 있는 노란색 품종을 구매하여 실험재료로 우선 이용하였다. 6월 중순에는 강원도농업기술원으로부터 자체 육성 절화용 칼라 10품종(각시, 고우니, 립글로, 립스마일, 블레싱, 수려한, 스타웨이브, 아씨, GH, ML)의 조직배양묘(캘러스 형태) 각 1병, 절화용 개체 각 2개체씩을 분양받았다. 또한 종은 다르지만 칼라 백색 2품종(스완과 몽블랑)은 원예특작과학원 화훼과로부터 구근으로 분양받았다.

강원도농업기술원에서 분양받은 칼라 식물체는 화분에 이식하였으나 재배과정 중 세균성 무름병 등으로 인해 모두 고사하였고 이로부터 정상적인 구근을 회수할 수 없었다. 조직배양묘 상태로 분양받은 칼라는 1/2 MS배지에 이식하여 식물체로 유기한 다음 11월 초에 화분에 이식하여 순화하였고, 스완과 몽블랑도 동일 시기에 구근별로 한 개의 화분에 이식하였다.

글라디올러스는 11월 이전까지는 시중에서 구하기가 매우 어려웠다. 11월 말경 우리화훼종묘로부터 정확한 품종명을 모르나 11종을 구매하였고, 충청남도농업기술원 화훼연구소 카르마 등 11종의 구근을 분양받아 구근별로 화분에 이식한 다음 2월 말경에 잎을 수확하여 실험재료로 사용하였다(그림 1).



프리지아 자원



순화중인
칼라배양묘



몽블랑



글라디올러스

그림 1. 온실에서 재배중인 구근 자원.

○ 수집한 프리지아 시료의 바이러스 감염 유형 조사

기존의 연구 논문을 참고하여 프리지아 바이러스 진단에 적합한 RT-PCR 진단용 primer 조합을 선발하였다(표3). 레드벨을 제외한 14개 품종들 가운데 1번 개체를 대상으로 바이러스 감염 유무를 확인한 결과, BYMV와 FreMV 감염이 확인되었고, CMV의 경우 계통에 따라 검출 특이도 다른 시판 진단 kit 한 종을 추가로 하여 감염여부를 다시 조사한 결과 모든 시료가 감염되지 않은 것으로 나타났다(그림 2).

표3. 프리지아, 칼라, 글라디올러스 주요 바이러스 진단용 primer

Virus name (Abr.)	Virus name (Full)	BCS Name	Forward primer seq	BCS Name	Reverse primer seq	Product size (bp)	출처
AMV	Alfalfa mosaic virus		5'-ATCATGAGTTCACAAAAGAA-3'		5'-TCAATGACGATCAAGATCGTC-3'	669	Bandzo et al., 2017.
ArMV	Arabis mosaic virus		5'-TTG GTT AGT GAA TGG AAC GG-3'		5'-CAA GCT ATC ATG TGG GCA AA-3'	427	Naderpour et al., 2014.
BYMV	Bean yellow mosaic virus	P247	5'-GCAGAAAAGCTTGGTATC-3'	P248	5'-TTAAGAACTATTTTCCACCA-3'	781	농과원
CarMV	Carnation mottle virus	P651	5'-TGG GCC TCT CTG AGT AC-3'	P652	5'-AGT CTT CAA AGC TTG GGA TA-3'	220	강원도원
CMV	Cucumber mosaic virus	P491	5'-CGTCGGTTCGCCGCTCCG-3'	P492	5'-AGCGCGCATCGCCGAAAGAT-3'	473	농과원
DsMV	Dasheen mosaic virus		5'-GTGTG AATTCGCAAGCAGATGACAC-3'		5'-GTGTGAGCTCAACCCGTGCACGAA-3'	1,200	Kim et al., 2004.
INSV	Impatiens necrotic spot virus	P553	5'-AAATCAATAGTAGCATT-3'	P554	5'-CTTCCTCAAGAATAGGCA-3'		농과원
TRV	Tobacco rattle virus	P919	5'-ATGGTTGTGTACACGTAG-3'	P920	5'-AACAGTCTATACACAGAAACA-3'	363	Xu, H. and Nie, J. 2006.
TSWV	Tomato spotted wilt virus	P147	5'-GACAGCCTGGAACATAAAAAG-3'	P148	5'-GAAAATGTGGAACACAAGGT-3'	673	BCS
BYMV	Bean yellow mosaic virus	P917	5'-TTGAATCTGAACTGAAGTATT-3'	P918	5'-CTCCTTCTACAAAATGGACA-3'	750	Vunsh et al., 1990.
CMV	Cucumber mosaic virus	P135		P136		392	BCS
FreMV	Freesia mosaic virus	P921	5'-GCAAACCAGCGCACCAGCAACTTG-3'	P922	5'-TTACATGTGACGTACCCCAACAG-3'	833	Yoon et al., 2013.
FreSV	Freesia sneak virus	P923	5'-ATGTCTGGAAAATACTCTGTCAAG-3'	P924	5'-TTAGATAGTGAATCCATAAGCTGCT-3'	1,305	Yoon et al., 2013.

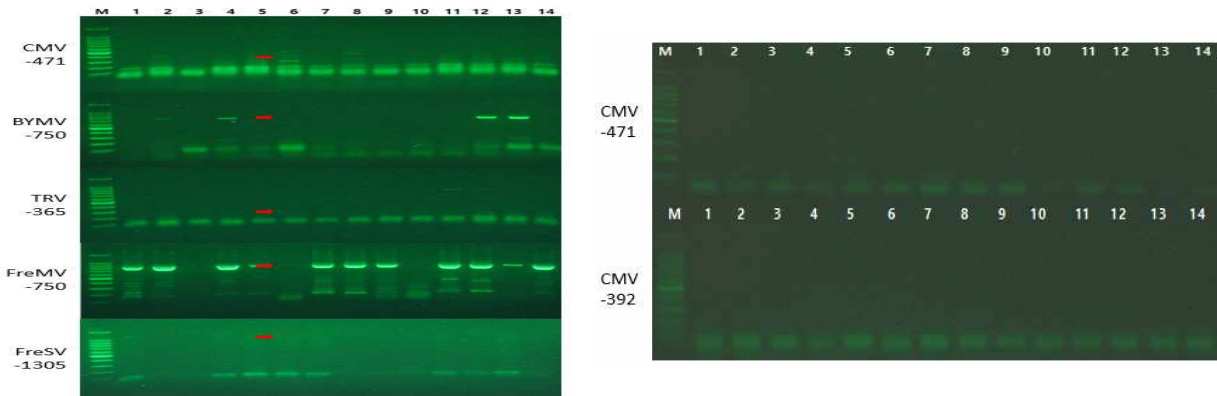


그림 2. 프리지아 바이러스 RT-PCR 진단 및 시판 CMV RT-PCR kit를 이용한 프리지아 시료 검정.

이러한 결과는 국내에서 FreMV와 BYMV가 주로 발생하였다는 타 연구 결과와 비슷하였으나, 바이러스 유전체 primer를 이용해 국내외에서 프리지아에 발생하는 것으로 보고된 모든 바이러스의 감염 유무를 확인하는 것은 사실상 불가능하였다.

때문에 1년차에는 표1의 프라이머로 바이러스 종류 및 감염유무를 확인한 시료 5종의 총 RNA 서열을 국내서비스업체에 분석의뢰하였다(그림 3). RNA 적합도 검사에 통과한 레드 썬 2(시료번호 15번), 핑크지아1(43), 핑크지아 3(45) 시료의 sequencing raw data는 총괄과제에서 분석하였는데, 3개 시료 모두에서 FreMV 전장서열이 확인되었고, BYMV 전장서열은 43과 45번 시료에서 확인되었다. 전사체 염기서열분석 결과는 앞서서 수행한 RT-PCR에 결과와 차이를 보였다. 프리지아 15번 시료는 FreMV-833 프라이머를 이용한 RT-PCR에서는 FreMV에 감염되지 않은 것으로 판단되었으나, 전사체 분석에서 양성으로 나왔으며, 크기가 다른 2종류의 바이러스 전장 서열이 확인되었다. 2개 서열을 비교했을 때, 서열 8067-8252(186bp) 지역만 부분적으로 차이가 있었다(그림 3).

Sample ID	Total read bases (bp)	Total reads	GC(%)	AT(%)	Q20(%)	Q30(%)
15	4,615,740,400	45,700,400	43.77	56.23	98.96	96.48
43	4,595,712,302	45,502,102	43.32	56.68	98.99	96.51
45	3,470,284,250	34,359,250	43.55	56.45	98.95	96.37
AS	3,397,662,018	33,640,218	49.65	50.35	98.41	95.48
GH	3,197,451,738	31,657,938	45.02	54.98	98.9	96.36
Gak	3,891,236,090	38,527,090	49.77	50.23	98.53	95.7
LG	3,662,043,658	36,257,858	45.64	54.36	98.87	96.34

- Sample ID : Sample name.
- Total read bases : Total number of bases sequenced.
- Total reads : Total number of reads. For Illumina paired-end sequencing, this value refers to the sum of read 1 and read 2.
- GC(%) : GC content.
- AT(%) : AT content.
- Q20(%) : Ratio of bases that have phred quality score of over 20.
- Q30(%) : Ratio of bases that have phred quality score of over 30.

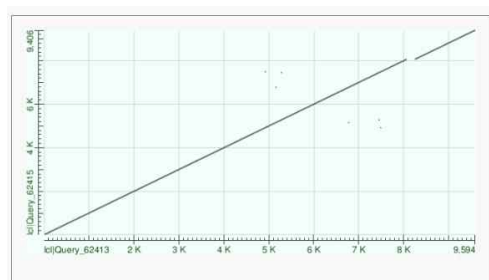


그림 3. 프리지아 전사체 해독 결과 및 de novo assemble 결과 2개의 freesia mosaic virus sequence 조립

○ FreMV 유전체 기반 진단 조건 확립

- 기존에 보고된 FreMV-833 프라이머와 프리지아 총 RNA 분석 결과를 기초로 국내에는 최소 2종 이상의 FreMV 계통이 존재할 것으로 예상되었다. 2021년 6월을 기준으로 NCBI에 등록된 FreMV 전장 서열은 총 4종이 확인되었다. 서열이 같은 1종을 제외하고 나머지 3종의 전장서열(Accession; GU214748.1, LC647195.1, FM206346.1)과 프리지아가 속한 Asparagaceae 서열 정보를 기반으로 증폭산물의 크기는 200~500 bp, 프라이머 Tm 값 오차는 3°C 이내로 조건으로 프라이머를 디자인하였다. 이 중에서 Helper component protein(HC-Pro), Nuclear inclusion protein b(Nib), Coat protein(CP) 유전자 부위에 해당하는 부분에서 각각 1개씩 선발하여 3가지 서열에서 총 9개의 프라이머 조합을 선발하였고, 9 조합 중 중복되는 조합을 제외하고 5쌍의 프라이머 조합을 제작하였다. 각각의 primer는 P번호로 표시하였고, 기존에 보고된 FreMV-833 primer는 각각 P921과 922로 표기하였다(표 4).

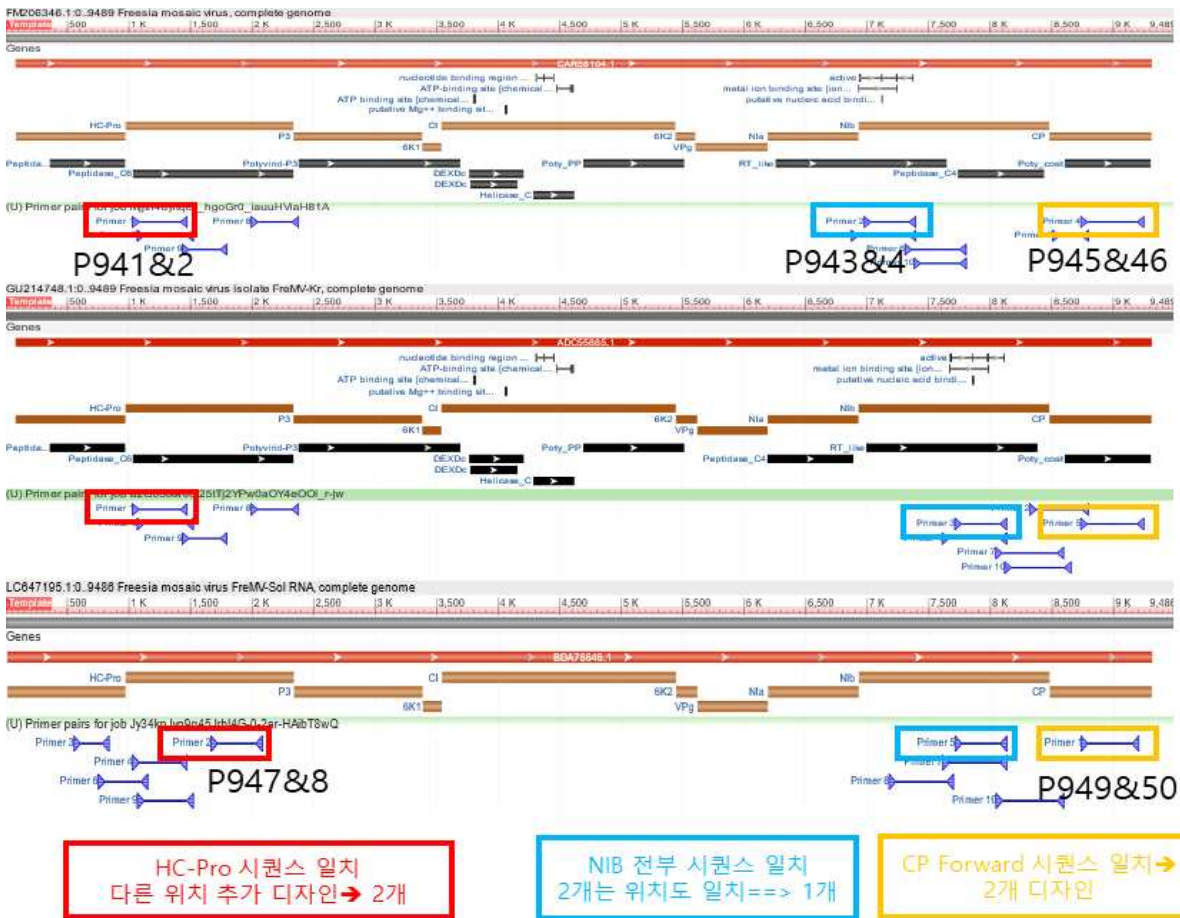


그림 4. FreMV primer 디자인 부위.

표 4. FreMV진단용 primer 조합 특성

번호	이름	서열(3'-->5')	크기	기원
P941	FreMV HC-Pro F	GAACGAAGCTTGTGGGGAGA	374	HC-Pro
P942	FreMV HC-Pro R	TTGCGCTTGCTTCACTCAAC	374	HC-Pro
P943	FreMV Nib F	GAGATGGGACTTGGGTTGGG	351	Nib
P944	FreMV Nib R	TGCCTATCGTGACATCGCTC	351	Nib
P945	FreMV CP F	GCAACAATTTGACGCCTGGT	444	CP
P946	FreMV CP R	AGACCAAACATCTTCGCCGT	444	CP
P947	FreMV-Sol HC-Pro F	CGAAAGCTTGCCGTTGAAA	349	HC-Pro
P948	FreMV-Sol HC-Pro R	TCGCATTGTCCTCGTTCACA	349	HC-Pro
P949	FreMV-Sol CP F	GCAACAATTTGACGCCTGGT	400	CP
P950	FreMV-Sol CP R	CATCTGCATGTGCGCTTCTC	400	CP
P921*	FreMV-KorI CP F	GCAAACCAGCGCACCAGCAACTTG	833	CP
P922*	FreMV-KorI CP R	TTACATGTGACGTACACCCAACAG	833	CP

*이전 연구자에 의해 보고된 FreMV-833 primer 조합

이전의 실험에서 프리지아 잎 보관 상태에 따라 RNA 분리 효율이나 안정성에 영향을 받는 것으로 판단되어, 하절기 휴면 이후에 새로 심은 구근에서 나온 새싹이나 30~40cm 자란 신선한 잎을 실험재료로 사용하였다. 37개 잎 시료에서 BCS Plant RNA prep kit를 이용하여 식물체 잎에서 RNA를 분리하였으며 종래 연구문헌(JY Yoon et al., Res. Plant Dis. 19(4) : 313-317, 2013)에 기록된 P921/2(FreMV-833 primer 조합)와 함께 새로 디자인한 프라이머 5세트 조합으로 분석을 수행하였다. 프라이머 조합에 따른 차이는 첫째, 기존의 P921/2 프라이머에서는 증폭산물이 없었으나(음성) 새로 디자인한 프라이머에서 원하는 크기의 PCR 산물이 증폭된 경우(그림 5의 3, 8, 12번 시료), 둘째, P945/6 프라이머 조합에서 2개의 PCR 산물이 증폭된 경우(그림 5의 6, 8, 10, 11, 12 시료), 셋째, PCR 산물이 약하게 증폭되어 바이러스 감염유무 판단이 어려움 경우로 대별 할 수 있었다(그림 6).

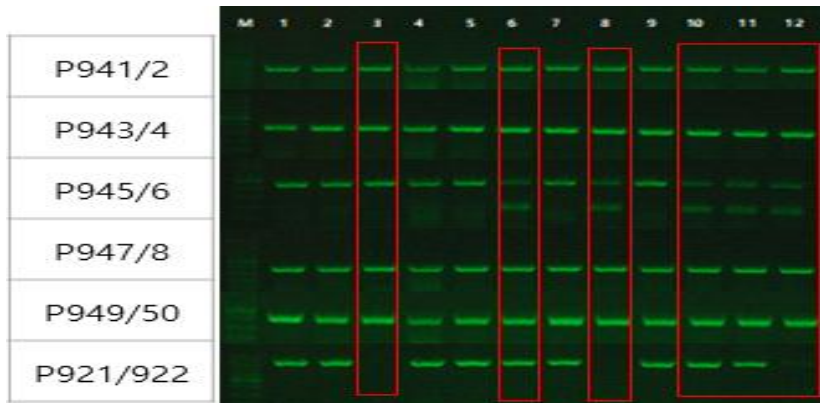


그림 5. 진단용 primer 조합에 따른 FreMV RT-PCR 증폭산물 패턴 대표도. P; 프라이머 조합, 붉은 박스: 증폭산물 유형이 자른 시료. M; 1kb DNA ladder, 1~12; 프리지아 시료.

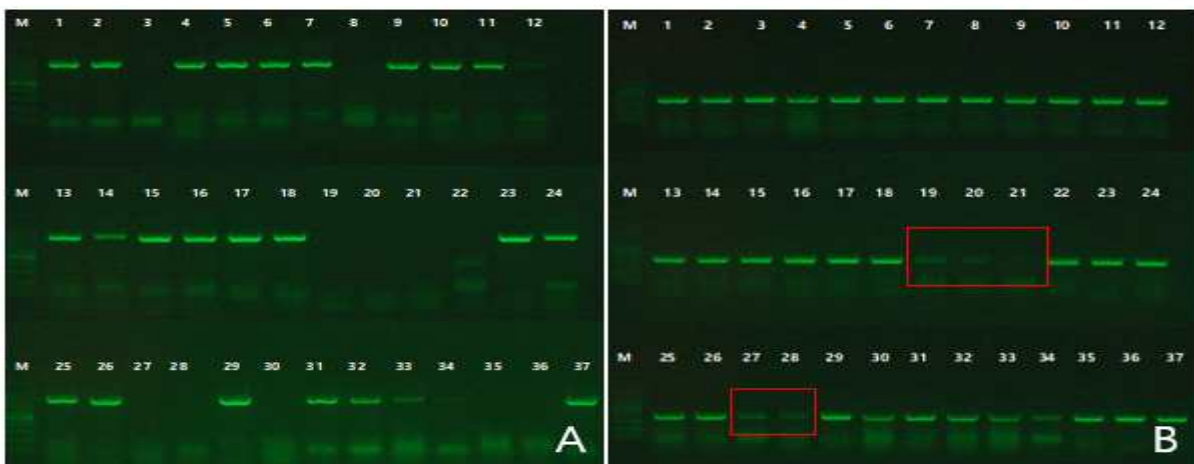


그림 6. P947/948과 P921/922 primer 조합의 FreMV RT-PCR 진단. M; 1kb DNA ladder, 1~37; 프리지아 시료.

각각의 경우에서 추정할 수 있는 사실은 조사한 프리지아 시료 내에 2가지 이상의 FreMV 계통이 존재할 가능성과 각 프라이머 조합에서 약하게 증폭된 산물은 FreMV 유전체 또는 식물체 유래일 가능성이 있다.

NCBI에 등록된 FreMV 전장 서열을 기준으로 FreMV 계통은 3종 이상이 존재할 가능성이 높으며, 국내에는 최소 2종 이상이 있을 것으로 생각된다. 특히, P945/6, P947/948, P921/922 primer 조합을 사용하면 FreMV 계통 구분이 가능하고, P945/6 프라이머 조합이 다른 조합에 비해 좀 더 효율적일 것으로 판단되었다. P945/6 프라이머 조합 43개 시료에 적용시 증폭산물이 2개인 시료는 16개였고, 이들 중 5개 시료를 다시 4개 프라이머조합 (P945/6-444, P947/8-349, P949/50-400, P921/2-833)로 증폭한 결과, P945/6-444 프라이머 조합에서 증폭산물이 2개인 것으로 나타났다.

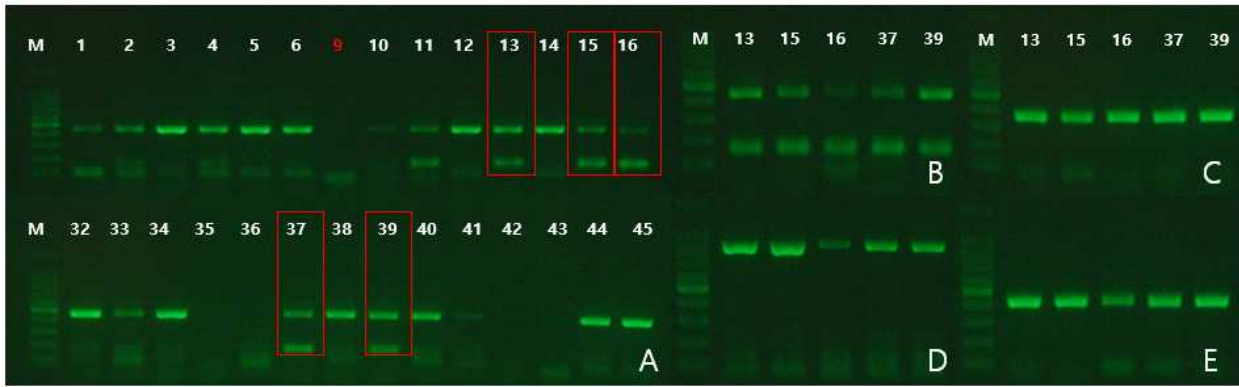


그림 7. 프리지아 시료별 P945/6-444 프라이머 조합 증폭 양상(A)과 선발 시료(붉은 박스)에서 FreMV 검정용 프라이머 조합 증폭 양상 비교(B~E). 사용한 프라이머 조합; A & B (P945/6-444), C (P947/8-349), D (P949/50-400), E (P921/2-833).

P945/6-444 프라이머 조합의 증폭산물이 바이러스 특이 서열인지 확인하기 위해, 15번 시료(레드션 2)를 반복해서 증폭하고, 증폭된 산물을 micropipette tip으로 찍은 다음 동일 프라이머로 재증폭하였다. 크기가 큰 증폭산물을 주형으로 사용했을 때 작은 크기의 PCR 산물이 약하게 증폭되었는데, 염기서열 분석결과 모두 FreMV-Kr 서열과 높은 상동성을 보였다(그림 8). 이상의 결과에 기초해 P945/6-444 프라이머는 바이러스 계통분석에 활용될 수 있을 것으로 보이며, 국내 프리지아의 FreMV 정밀 검정을 위해서는 전장서열 분석을 통한 계통분류에 대한 연구가 선행되어야 할 것으로 판단되었다.



그림 8. 레드션 2 시료의 P945/6-444 프라이머 증폭산물(A)과 염기서열. A의 RT-PCR 산물(L과 S)을 주형으로 재증폭함(B).

FreMV 감염시 특이적으로 발현되는 전사체를 탐색하기 위해서는 바이러스에 감염되지 않

은 개체와 감염된 개체를 정확하게 구분할 수 있어야 한다. 바이러스 감염유무를 정확하게 판단함에 있어 고려해야 할 점은 주형의 순도와 양, 사용하는 프라이머의 특이성, 역전사와 PCR 증폭 조건 등인데, 특히 프라이머의 특이성이 진단에 많은 영향을 주는 요인으로 사료된다. 본 과제에서는 충청남도농업기술원에서 분양받은 프리지아 유묘(종자 파종 후 16주가 지난 식물체)를 재료로 표 1의 P921/2-833 프라이머조합을 제외한 나머지 프라이머 조합의 특이성을 조사하였다. 프리자아 교배조합 S1에서는 3개체, S8에서는 2개로부터 각각 잎을 수확한 다음 BCS Plant RNA 정제 키트(Biocubesystem, Korea)를 사용하여 총 RNA(total RNA)를 분리하였다. 양성대조구로는 FreMV에 감염된 시판 프리지아 품종 핑크지아를 사용하였고, Nano-Drop을 이용하여 총 RNA 농도를 200ng/ μ l로 맞추고 이를 RT-PCR용 주형으로 사용하였다. RT-PCR 반응액 조성은 총 RNA 1 μ l, 포워드 및 리버스 프라이머(10 pmol) 0.5 μ l, 증류수 8 μ l 및 BCS 2 \times RT-PCR mix 10 μ l이며, RT-PCR 조건은 48 $^{\circ}$ C에서 10분간 RT, 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 변성(denaturation)한 다음, [95 $^{\circ}$ C에서 20초간 재변성 후 60 $^{\circ}$ C에서 20초간 어닐링(Annealing), 72 $^{\circ}$ C에서 30초간 확장(extension)]을 35회 반복하였고, 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 신장(elongation)을 수행한 후 증폭산물을 확인하였다.

위 반응조건을 이용하여 5개 시료의 FreMV 감염양상을 조사한 결과 프라이머 조합별로 예상 크기와 비슷한 지점에서 희미한 증폭산물이 나타났다(그림 9의 A). 이러한 결과는 크게 두 가지로 해석할 수 있는데 FreMV가 종자를 통해 유묘로 전반되거나, 식물체 RNA에서 유래한 비특이 산물일 가능성이 있다. 희미하게 증폭된 밴드가 FreMV 유래인지 비특이 산물이지를 확인하기 위하여 파종후 16주된 S8 조합의 1번 식물체 각각의 잎에서 총 RNA를 분리하고 이를 주형으로 위와 동일 조건으로 반응하였다. 그림 9의 A에서 P949/950 프라이머의 경우 S8 조합 4번과 5번개체에서는 희미한 밴드가 증폭되지 않았으나, 같은 조합의 1번개체내 6개 잎의 총 RNA에서는 희미한 밴드가 증폭되었고, 이들 가운데 증폭량이 많은 3 & 4번 잎 증폭산물의 염기서열을 분석한 결과 모두 식물체 유래 유전자인 것으로 판명되었다(그림 9의 B).

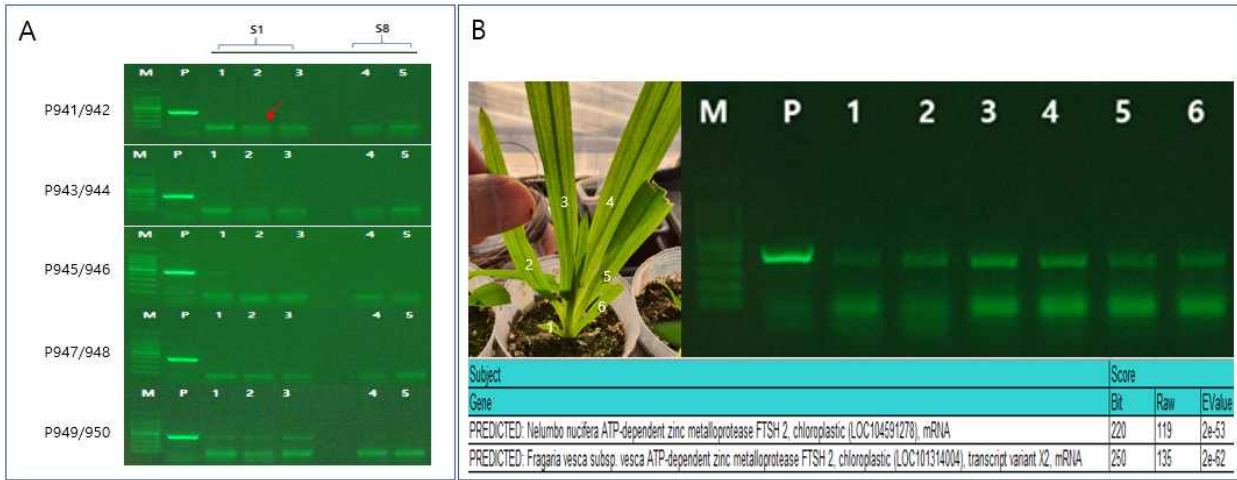


그림 9. 프라이머 조합별 비특이 증폭 양상비교. (A) M : 1kb DNA ladder, P: 핑크지아, line 1~3: S1 조합, line 4&5: S8 조합. (B) M: 1kb DNA ladder, P: 핑크지아, 잎 번호: 1~6. Primer 조합: P949/950. 3 & 4번 bands 염기서열 분석 결과.

비특이 증폭산물이 식물체 생육시기별로 어느 정도 발생하는지 경향을 파악하기 위하여 그림 10에서 사용한 동일 프라이머 조합을 4개 교배조합 15개체(S45, S8, S1 조합 각 3개체, S71조합 6개체)에 적용하였다. 총 15개체에 대해 파종 후 2, 4, 6, 16주 후에 잎을 채집하고 BCS Plant RNA 정제 키트(Biocubesystem, Korea)로 즉시 총 RNA를 분리하였으며, 최종 수확한 총 RNA 50 μ l 중 1 μ l를 주형으로 사용하였다. RT-PCR 반응은 그림 10의 경우와 동일한 조건으로 수행하였다. 비특이 산물은 프라이머 조합, 시료 종류, 시료 채집시기에 따라 달리 나타났다(그림 10).

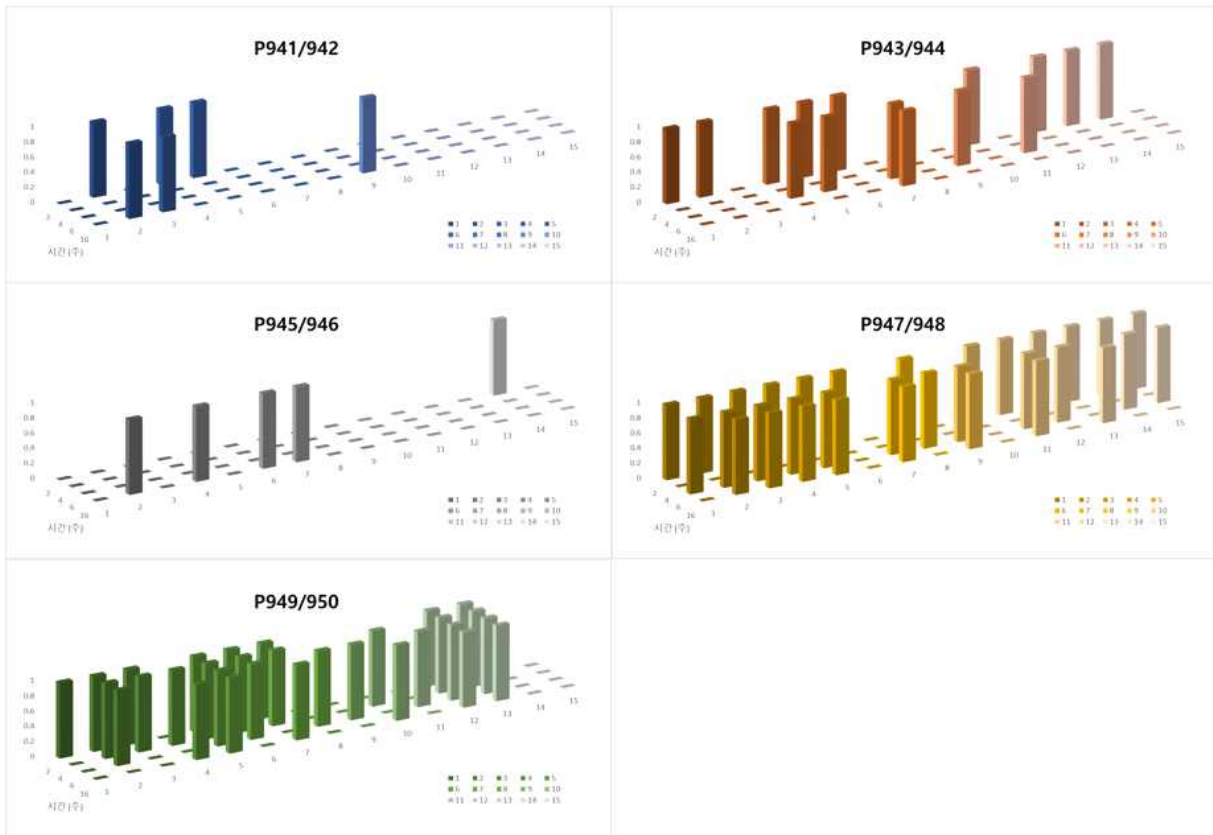


그림 10. 프리지아 식물체 생육시기와 프라이머별 비특이 증폭산물 발생 양상 비교.

이상의 결과에서 식물체 내에 바이러스 농도가 매우 낮을 경우 민감도를 높이기 위해서는 주형의 농도를 높일 수밖에 없는데, 주형의 농도가 높아지면 결과적으로 비특이산물이 증폭될 확률도 높아진다. FreMV의 경우 식물체 내에 바이러스 농도가 매우 낮을 경우 PCR product 생성 유무와 크기로 구분하는 Agarose gel 방법만으로는 정밀 진단이 어렵다고 판단되었다.

이러한 문제를 극복할 수 있는 방법으로는 특이 probe를 사용하거나, 증폭산물을 다시 동일 primer로 증폭(double PCR) 또는 1차 증폭 산물 안쪽을 다시 증폭하는 방식(nested PCR) 등이 있다.

본 과제에서는 실용성을 고려하여 double PCR과 nested PCR 혼용하여 저농도의 바이러스를 정밀하게 검사할 수 있는 방법 개발을 시도하였다.

프라이머 조합 중 특이도와 감도가 높다고 판단한 P941/942 프라이머 조합을 최종 선발하고, 서열 안쪽에 위치한 FreMV 유전체 서열과 Primer3 프로그램을 이용하여 Nested PCR용 프라이머를 디자인하였으며, 프라이머 적합도가 가장 좋았던 상위 3개 프라이머 조합을 추후 실험을 위해 선발하였다(표 5).

표 5. FreMV 진단용 네스티드 PCR 프라이머 정보

Primer 명	서열	T _m 온도	증폭산물 크기(bp)
Q38-F	CGCATCCGTTGATAGGGTGA	59.90	194
Q38-R	TTGCGCTTGCTTCACTCAAC	59.97	
Q39-F	TCGCATCCGTTGATAGGGTG	59.90	193
Q39-R	GCGCTTGCTTCACTCAACTC	60.11	
Q40-F	TGCGGAATTGACATCGCAA	59.12	173
Q40-R	TGGCCCTTTGATCTTGTGCT	59.89	

상기에서 디자인된 네스티드 PCR 프라이머를 이용하여 바이러스 검출 분석을 수행하였다. 먼저, 프리지아 품종(골드리치 1개체, 골드문 2개체, 솔레일 3개체)의 잎을 수확한 다음 BCS Plant RNA 정제 키트(Biocubesystem, Korea)를 사용하여 총 RNA를 분리하였다. 1차 RT-PCR 반응액 조성은 총 RNA 2 μ l, P941 프라이머 포워드 및 P942 리버스 프라이머 (10 pmol, 표3) 각 0.5 μ l, 증류수 7 μ l 및 BCS 2 \times RT-PCR mix 10 μ l이며, RT-PCR 조건은 48 $^{\circ}$ C에서 5분간 RT, 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 변성(denaturation)한 다음, 하기 사이클 [95 $^{\circ}$ C에서 20초간 재변성 후 58 $^{\circ}$ C~70 $^{\circ}$ C에서 20초간 어닐링(Annealing), 72 $^{\circ}$ C에서 30초간 확장(extension)]을 35회 반복하였다. 그 후, double PCR 반응에서 반응액 조성은 1차 RT-PCR 증폭 산물을 증류수로 50배 희석한 용액 2 μ l, Q38, Q39 및 Q40 프라이머(10 pmol) 각 1 μ l, 증류수 6 μ l 및 BCS 2 \times HRM-PCR mix 10 μ l이며, PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성(denaturation)한 다음, 하기 사이클 [95 $^{\circ}$ C에서 20초간 재변성 후 60 $^{\circ}$ C에서 20초간 어닐링(Annealing)]을 40회 반복 후 증폭산물을 확인하였다.

그 결과, 3개 프라이머 조합 가운데 Q39가 양호한 증폭을 나타내었고 3가지 조합 모두 단일대상을 증폭하는 것으로 확인됨에 따라 특이성에는 문제가 없는 것으로 판단되어 Q39를 선발하고 차후 실험에 사용하였다(그림 11).

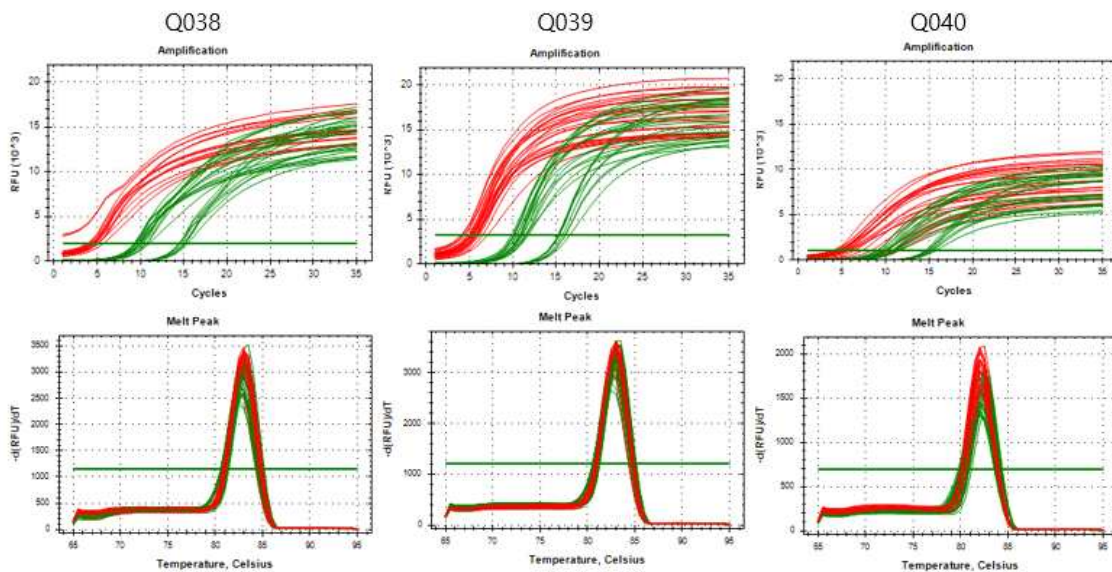


그림 11. 네스티드-double PCR 프라이머 조합별 FreMV 증폭 양상 비교.

선발한 Q39 프라이머의 최적 어닐링 온도를 결정하고자 프리지아 4종(S8-1, S8-3, 골드리치, 골드문)과 멸균수를 이용하여 온도에 따라 증폭량 변화를 조사하였고 다른 실험조건은 그림 12와 동일하게 수행하였다. 그 결과, 증폭량이 가장 높은 온도는 58°C였으나 멸균수에서 비특이 증폭이 관찰되었고, 65.6°C 이상일 때 증폭량이 감소하는 경향을 나타내었다.

이상의 결과를 기반으로 Q39 프라이머의 최적 어닐링 온도 범위는 58.8°C~62.7°C, 단일 온도는 60.0°C가 적합할 것으로 판단되었다(그림 12_왼쪽). Q39의 바이러스 분석 특이도를 조사하고자 주형을 제외한 나머지는 동일 조건으로 네스티드 RT-PCR을 수행하였다. 주형으로 여러 차례 실험에서 FreMV에 감염이 되지 않은 것으로 확인된 건전 시료 3점(S1-2-1, S1-2-2, 솔레일1)과 약하게 감염된 시료 1점(솔레일3) 및 심하게 감염된 시료 1점(핑크지아1)을 사용하였다. 그 결과, 감염시료에서는 단일 산물이 증폭되었고, 감염 정도에 따라 Cq 값의 차이도 분명하였으며, 건전시료에서는 비특이 증폭이 기준치 이하임을 확인하였다(그림 12_오른쪽).

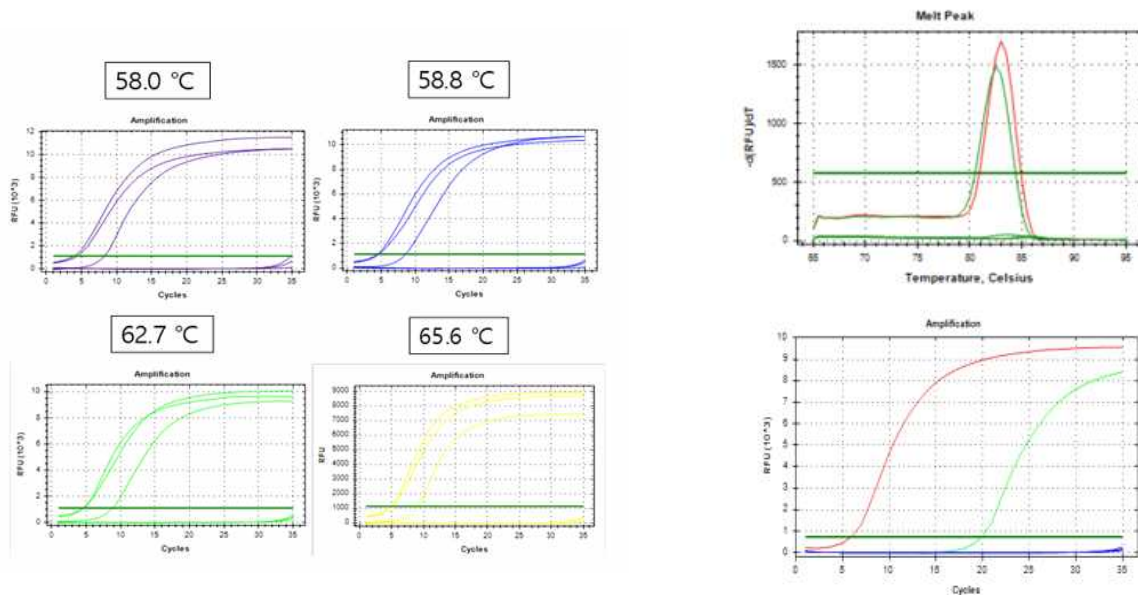


그림 12. 어닐링 온도에 따른 Q39 프라이머 조합의 증폭 양상(왼쪽)과 특이성(오른쪽)

○ BYMV 유전체 기반 진단 조건 확립

- RT-PCR을 이용한 BYMV 진단 관련 논문은 대략 6개 정도가 보고되어 있는데, 이중에서 글라디올러스에서 보고된 BYMV 진단용 primer(출처: Vunsh, R., Rosner, A., Stein, A., 1990. The use of the polymerase chain reaction (PCR) for detection of bean yellow mosaic virus in Gladiolus. Ann. Appl. Biol. 117 (3), 561-569)를 예비실험에 사용하였다. 충청남도농업기술원 화훼연구소로부터 분양받은 45개 프리지아 시료에 적용했을 때 RT-PCR 산물이 증폭되지 않아 반응에 적합한 역전사 시간과 프라이머 annealing 온도를 조사하였다. 역전사 시간과 annealing 온도는 각각 20분과 50도씨가 양호하였고, 45개 프리지아 시료에 적용했을 때 7개 시료에서 예상 크기의 RT-PCR 산물이 증폭되었다. 역전사 시간과 BYMV 검정에 사용된 시료는 동일함에도 불구하고 결과에는 차이가 있었는데, 이는 RNA 정제에 사용된 시료의 상태와 RNA 보관기간 등과 관련이 있는 것으로 판단되었다.

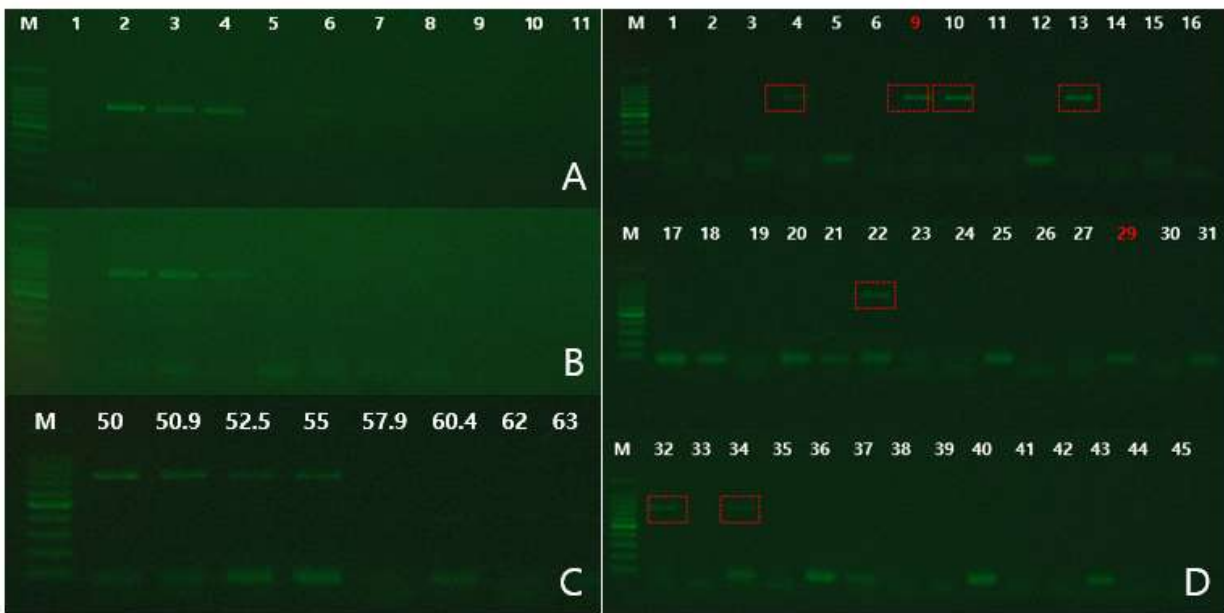


그림 13. BYMV RT-PCR 조건 최적화 및 진단. 역전사 시간(A; 10분, B; 20분), annealing 온도(C), 프리지아의 BYMV 검정(D).

반복실험을 통해 예비 실험에 사용한 primer는 진단 효율이 떨어지는 것으로 판단되어 NCBI에 등록된 BYMV 전장서열을 기초로 primer 3종(P969/970, P971/972, P973/974)을 새로 디자인하였다(그림 14).

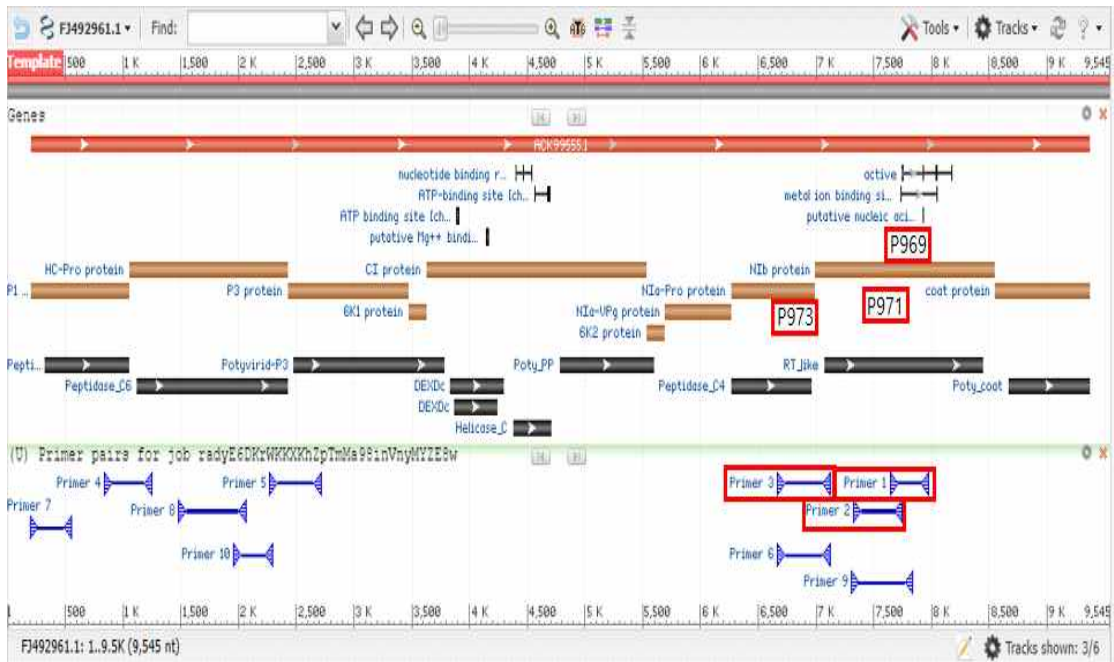


그림 14. BYMV primer 디자인 부위.

BYMV에 감염된 시료와 무감염 시료를 이용하여 RT-PCR 진단에 적합한 Annealing 온도를 조사하였다. P969/970 조합은 amplicon이 증폭되지 않았고, 나머지 조합에 반응에 적합한 온도 범위는 53.5~60.9°C 였다(그림 15).

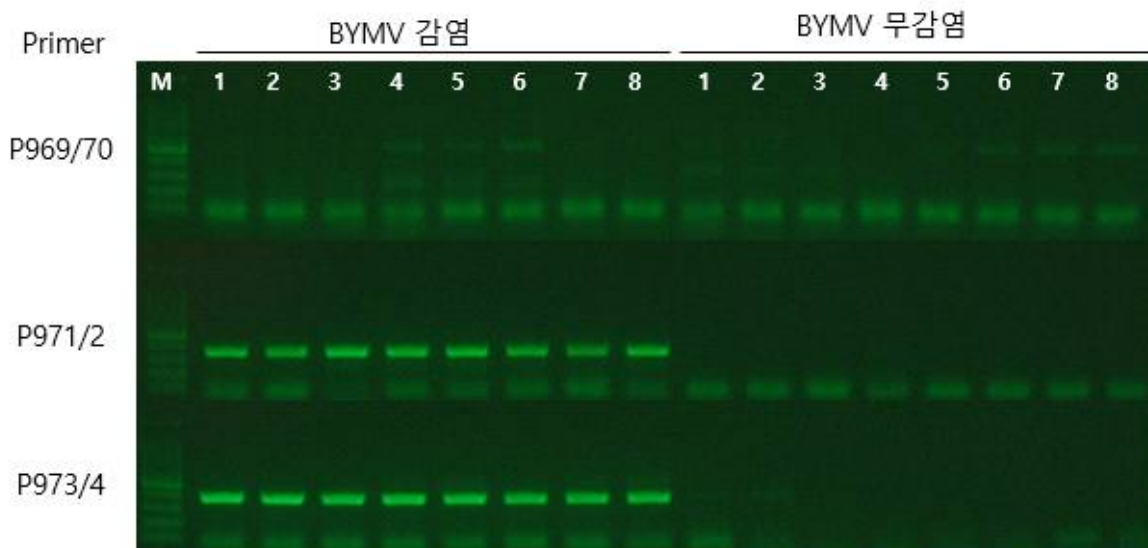


그림 15. BYMV 진단용 primer Tm값 별 증폭 양상. Tm(° C); 1(50), 2(51.3), 3(53.5), 4(56.8), 5(60.9), 6(64.3), 7(66.6), 8(68). M; 1kb DNA ladder.

Annealing 온도를 60도씨로 고정하고, primer 농도에 따른 바이러스 검출 감도를 비교하였다. BYMV 감염(핑크지아 1)과 무감염(F23) RNA 각 121과 126ng/ul를 출발액(1x)으로 5배씩 연속희석한 RNA 1ul를 주형으로 사용하였다. 검출감도와 무감염시료에서의 dimer 발생정도를 고려했을 때 P973/4 프라이머 5 pmol이 가장 양호하였다(그림 16).

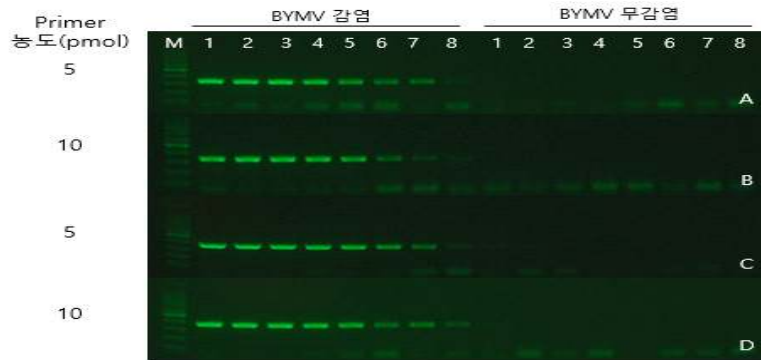


그림 16. primer 농도에 따른 BYMV 검출 감도 및 특이도 비교. M; 1kb DNA ladder. 1(원액), 2~8(5배 연속희석액): A & B(P971/2), C & D (P973/4).

위에서 선발된 primer와 표1의 BYMV-750 primer 조합을 사용하여 프리지아 37개체의 BYMV 감염 유무를 Annealing 온도 60°C에서 조사하였다. BYMV-750 primer 조합에 비해 새로 디자인한 프라이머의 amplicon 증폭효율이 좋은 것으로 나타났으며, 시료 33과 34 번 등에서 볼 수 있는 것처럼 P973/4 조합의 증폭력이 우수한 것으로 판단된다(그림 17).

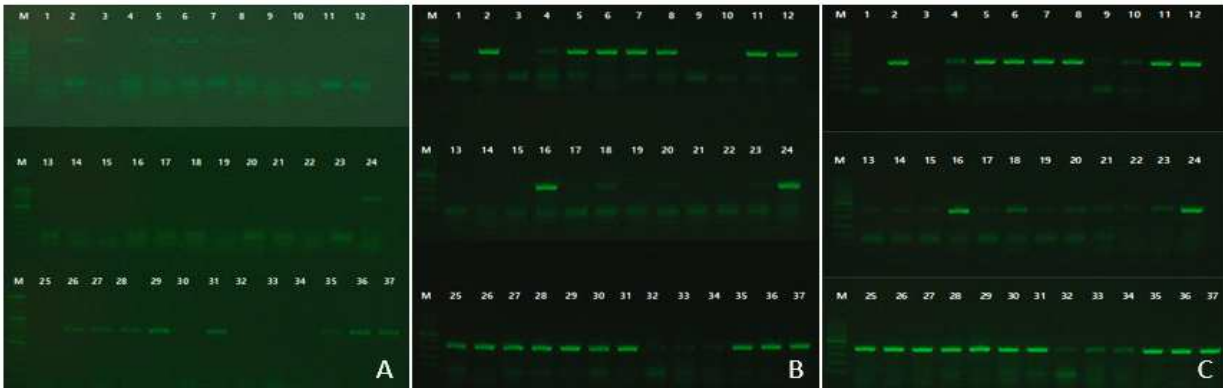


그림 17. 절화 프리지아 내 BYMV 검출용 프라이머 조합별 증폭 양상. primer 조합; BYMV-750(A), P971/972(B), P973/974(C), M; 1kb DNA ladder, 1~37; 프리지아 시료.

이전의 실험과 동일한 조건으로 프리지아 분화의 BYMV 감염 양상을 분석하였다. 분석결과 분화는 절화에 비해 BYMV 감염 정도가 덜한 것으로 보였는데, 특이한 것은 절화와는 다르게 BYMV-750 primer 조합에서 증폭이 더 잘되는 경향을 보였다. 이러한 차이는 BYMV 계통 차이에 의해 발생했을 것으로 추정하지만 정확한 결과 해석을 위해서는 보다 많은 실험이 필요할 것으로 판단되었다.

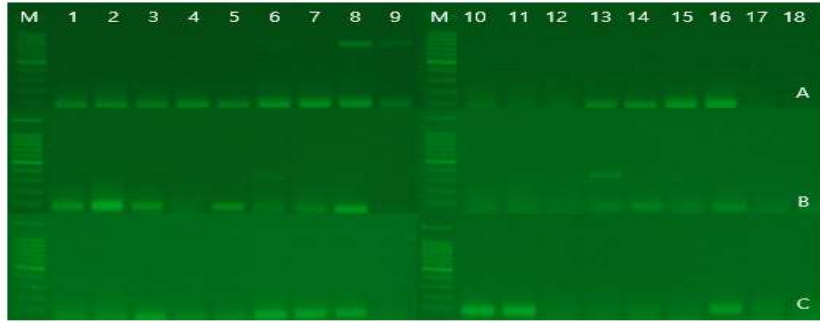


그림 18. 분화 프리지아 내 BYMV 검출용 프라이머 조합별 증폭 양상. primer 조합; BYMV-750(A), P971/972(B), P973/974(C), M; 1kb DNA ladder, 분화용 프리지아: 토티 (1~3), 피델리오(4~6), 트위터(7~9), 러블리블루(10~12), 고펜이(13~15), 러블리로 맨스(16~18).

프리지아에서 BYMV의 감염 경로에 대한 연구자료는 없지만 진딧물이 매개하거나 접촉에 의해 전염될 가능성이 높다. 콩에서는 품종에 따라 1~3% 내외로 종자전반하는 것으로 알려져 있지만, 프리지아에서는 이와 관련된 자료가 전혀 없는 실정이다. 그림 19의 경우처럼 상당한 개체가 BYMV에 감염되어 있는데 종자를 통해 BYMV 감염 가능성이 있는지 충남도기술원에서 분양받은 종자유래 식물체를 대상으로 BYMV 감염 여부를 확인하였다. 종자발아후 2, 4, 6, 16 주가 지난 시점에 잎시료를 채집하고 RNA를 분리한 다음 3종의 primer 조합으로 바이러스 감염유무를 확인하였는데, 적어도 16주 이전 시점에서는 모든 시료에서 RT-PCR 산물이 증폭되지 않았다(그림 19).

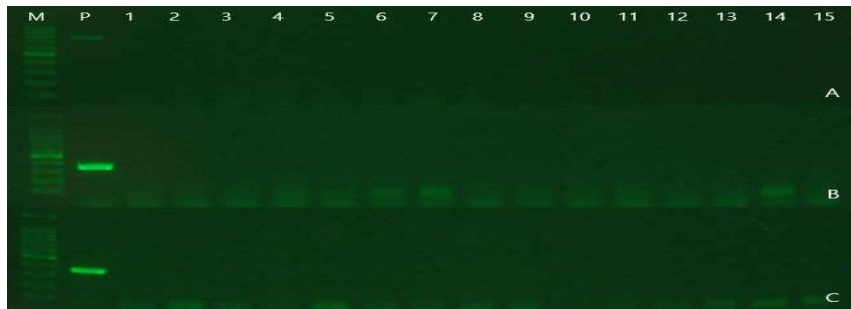


그림 19. 종자유래 프리지아 유묘의 BYMV 감염 확인. primer 조합; BYMV-750(A), P971/972(B), P973/974(C), M; 1kb DNA ladder, P; BYMV 감염 핑크지아1. 1~3; (솔레이x레드스타) F1, 4~6; 충남도원 F1, 7~9; (모닝글로리x핑크지아) F1, 10~15; (솔레이x모닝글로리) F1. 교배종자 발아 16주 후 채취한 잎에서 추출한 RNA를 주형으로 사용.

종자발아후 2, 4, 6, 16 주가 지난 4종류의 F1 식물체를 4개월간 더 재배하고 구근을 수확한 다음 3개월간 하면(夏眠)하고 2022년 9월 15일에 토양에 재식하였다. 흙 표면으로 싹이 출현한 후 21일에 잎 시료를 채취하고 P973/4 프라이머 조합으로 BYMV 감염유무를 확인하였다. 주형으로 사용할 RNA는 Nano drop으로 정량하여 각 시료의 농도를 100ng/ul로 조절하였고, 1차 RT-PCR 반응액 조성은 총 RNA 1 μ l, P973 프라이머 포워드 및 P974 리버스 프

라이머(10 pmol) 각 0.5 μ l, 증류수 8 μ l 및 BCS 2 \times RT-PCR mix 10 μ l이며, RT-PCR 조건은 48 $^{\circ}$ C에서 5분간 RT, 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 변성(denaturation)한 다음, 하기 사이클 [95 $^{\circ}$ C에서 20초간 재변성 후 60 $^{\circ}$ C에서 30초간 어닐링(Annealing), 72 $^{\circ}$ C에서 30초간 확장(extension)]을 35회 반복하고, 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응하였다. 그 후, double PCR 반응에서 반응액 조성은 1차 RT-PCR 증폭 산물을 증류수로 20배 희석한 용액 1 μ l, P973 프라이머 포워드 및 P974 리버스 프라이머(10 pmol) 각 0.5 μ l, 증류수 8 μ l 및 BCS 2 \times PCR mix 10 μ l이며, PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 변성(denaturation)한 다음, 하기 사이클 [95 $^{\circ}$ C에서 20초간 재변성 후 60 $^{\circ}$ C에서 30초간 어닐링(Annealing), 72 $^{\circ}$ C에서 30초간 확장(extension)]을 35회 반복하고, 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응하였다. 반응산물은 1% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

1차 RT-PCR의 경우 일부 시료에서는 예상 크기의 증폭산물을 확인할 수 있었고, 이들을 주형으로 double PCR하고 증폭산물의 염기서열을 분석한 결과 모두 BYMV 유전체 서열임을 확인하였다(그림 20). 이러한 결과는 크게 4가지 원인, 1) double PCR 시 주형 오염, 2) 매개충인 진딧물에 의한 전반, 3) 토양이나 식물체 이식과정에서의 오염, 4) BYMV가 종자전반에서 기인할 가능성이 높다고 판단된다. double PCR 시 주형 오염의 경우 반복 실험에서도 동일한 결과를 보였고, 식물체 재배기간 동안 진딧물 발생이 전혀 없었으며, 식물체 각각을 독립된 화분에서 재배한 점 등에 비추어 BYMV의 종자전반 가능성도 전혀 배제할 수 없었다. 다만, 1차 RT-PCR 만으로는 저농도의 BYMV를 정확하게 진단하는데 어려움이 있어 보이는데 이를 해결할 수 있는 추가연구가 더 필요할 것으로 생각된다.



그림 20. RT-PCR (A)과 Double PCR (B)법을 이용한 프리지아 유묘의 BYMV 검정. M; 1kb DNA ladder, 1~2; (모닝글로리x핑크지아) F1, 3~4; 충남도원 F1, 5~6; (솔레일x레드스타) F1, 7~8; (솔레일x모닝글로리) F1, 9: 음성대조구(솔레일 1). Double PCR 산물 염기서열 분석(C~F).

○ FreSV 유전체 기반 진단 조건 확립

국내에서 보고된 표1의 FreSV 진단 primer 조합을 사용하여 RT-PCR 진단을 하였다. 화훼연구소에서 분양받은 절화용과 분화용 프리지아 시료 63개체에서는 검출이 되지 않으나(자료 미제출), 시중에서 구입한 시료에서는 다수 감염이 확인되었고(그림 21), FreSV는 병징으로 감염여부를 쉽게 판단할 수 있었으며, 기존에 보고된 프라이머 조합과 진단 조건으로 바이러스 검출이 충분하다고 판단되어 별도의 유전체 프라이머를 개발하지 않았다.

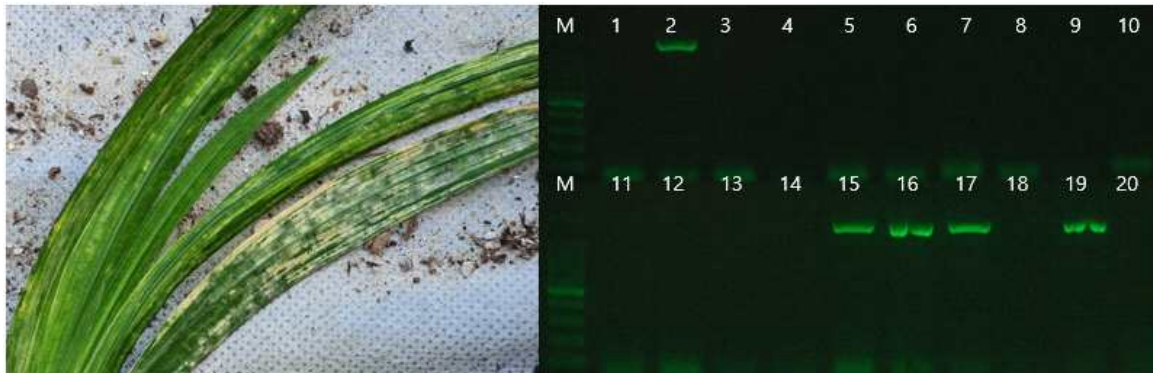


그림 21. FreSV 병징과 RT-PCR 검정. M; 1kb DNA ladder, 1~20; 프리지아 시료.

○ 기타 프리지아 발생 바이러스 검정

표 1에 공시한 CMV(P491/492 & P135/136)와 TRV(P919/920) 진단용 프라이머로 절화용 프리지아 45개체 검정하였으나 바이러스는 검출되지 않았다. 구근을 수확한 다음 하면(夏眠) 후 1달간(11월 5일) 키운 개체(37개)의 잎에서 RNA를 새로 추출하고 재검했을 때에도 대상 바이러스가 검출되지 않았고(그림 22), 양재동에서 구매한 프리지아 시료 15개와 분양 받은 분화시료 18개체에서 모두 검정 안되어 본 과제에서 사용한 시료에는 CMV와 TRV가 없는 것으로 결론지어 추가 실험을 진행하지 않았다.

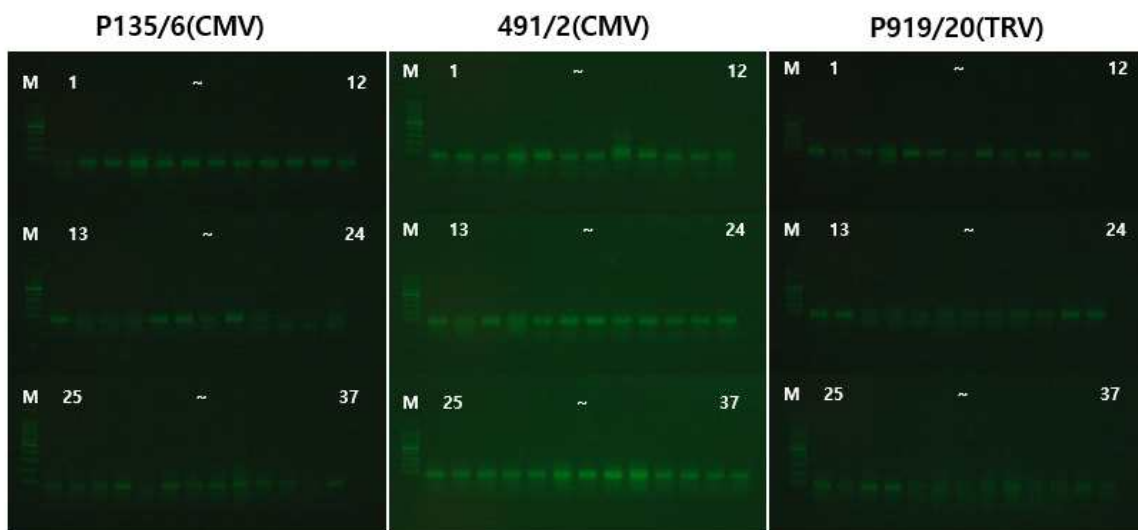


그림 22. 절화용 프리지아에서의 CMV 와 TRV 검정. M; 1kb DNA ladder, 1~37; 프리지아 시료.

○ 바이오큐브를 이용한 FreMV용 주형 준비

프리지아 육성현장에서 쉽게 활용이 가능하도록 바이오큐브를 이용한 주형 준비 조건을 검토하였다.

시중에서 구입한 시료를 잎과 구근으로 나누어 실험하였다. RT-PCR용 주형은 각 시료 별로 앞에서는 BCS Plant RNA Prep kit를 사용하여 분리한 total RNA 1 μ l와 구근의 정단 아래에 1cm 부위 눌러서 RNA를 흡즙한 바이오큐브 1립을 사용하였다. 표 1에 서술한 FreMV-833 primer 조합으로 RT-PCR을 수행했을 때 두 방법간에 결과 차이가 발생하였는데(그림 23), 이는 주형 준비에 사용한 시료가 다른 것에 그 원인이 있을 것으로 추정하였다.

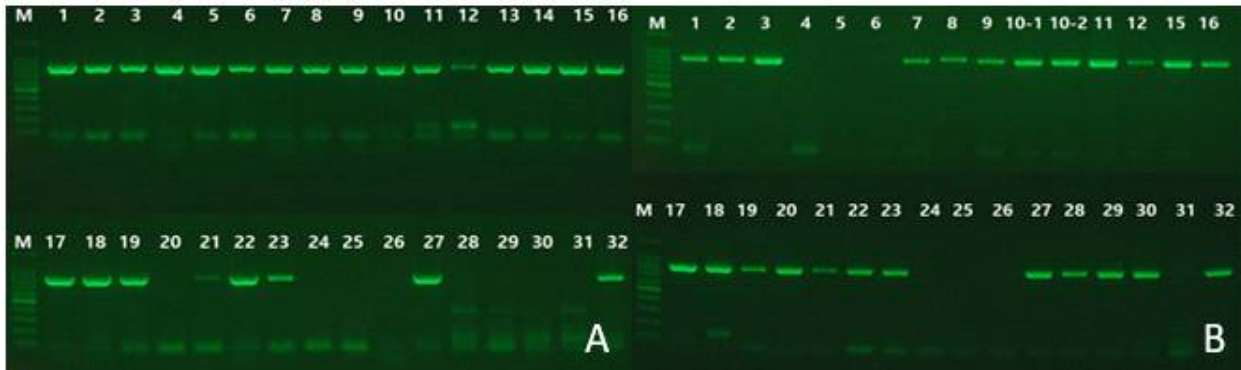


그림 23. 프리지아 RNA 준비법에 따른 FreMV 검출 유무 비교. 주형: silica membrane column을 이용해 앞에서 분리한 RNA(A), 구근 상단에 찌른 바이오큐브(B) M; 1kb DNA ladder, 1~32; 프리지아 시료. 10-2는 자구.

이러한 가능성을 확인하고자 프리지아 구근으로 재료를 통일하고 구근 조직 일부에서 얻은 RNA(RNA)와 바이오큐브를 구근의 붉은 동그라미 내부(Biocube 1)와 외부(Biocube 2)에 찢러 주형을 준비하였다. 각각의 주형으로 RT-PCR을 수행한 결과 이전 실험과 마찬가지로 결과에 차이가 발생하였는데(그림 24), 주형준비를 위해 어느 방법이 좋은지에 대한 명확한 결론을 내리기가 어려웠으나 두 방법을 함께 이용할 경우 좀 더 정확한 결과판독이 가능할 것으로 판단되었다.

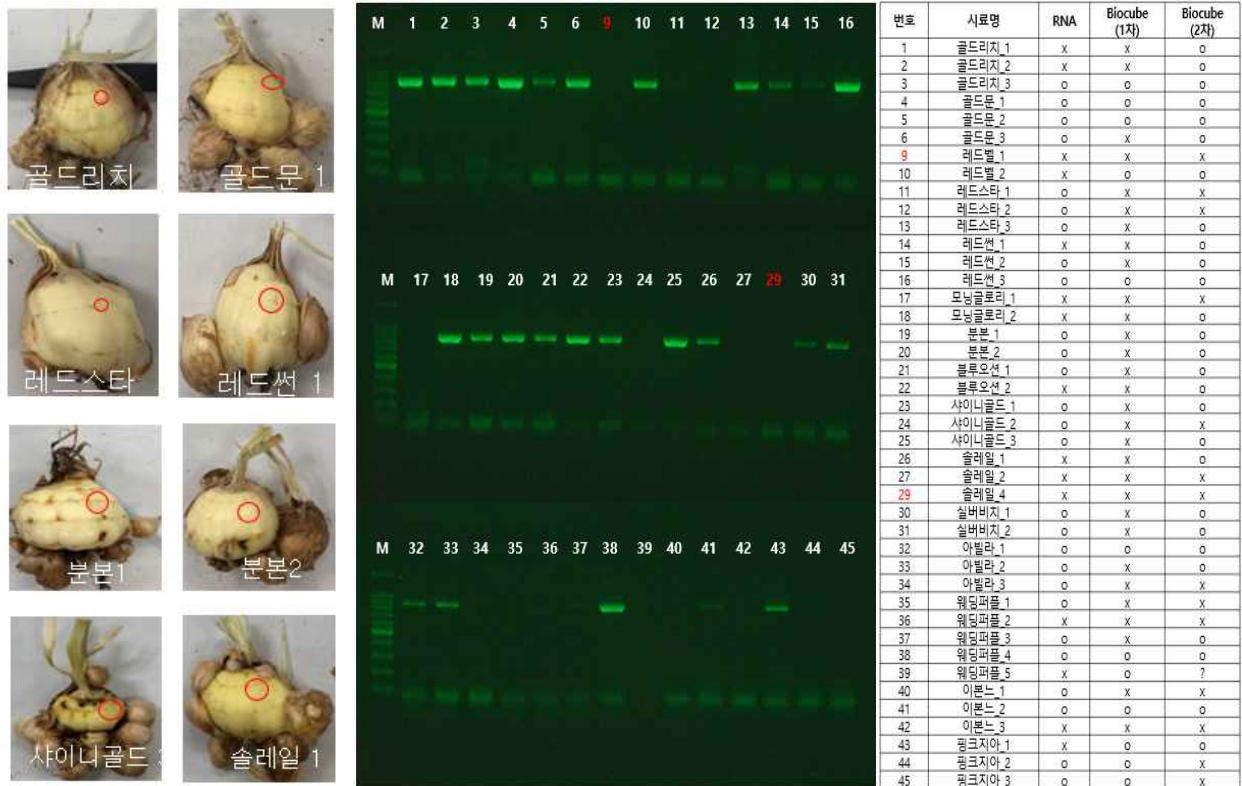


그림 24. 바이오큐브를 이용한 프리지아 구근의 FreMV 검정용 주형 준비. 구근 조직 일부에서 얻은 RNA(RNA)와 바이오큐브를 구근의 붉은 동그라미 내부(Biocube 1)와 외부(Biocube 2)에 찢어 주형을 준비. 젤 사진은 Biocube 2를 주형으로 사용한 결과.

○ 칼라 바이러스 검정

강원도 농업기술원에서 육성한 칼라 품종(수려한 등 조직배양묘 6종)과 국립원예특작과학원에서 육성한 흰색 칼라 품종인 몽블랑(모구)과 스완(모구)을 대상으로 바이러스 감염 유무를 조사하였다. 문헌 조사를 통해 바이러스 진단용으로 총 11종의 primer 조합을 선별하였고(표 1), 정제된 RNA는 50~150ng/μl로 조절하여 사용하였다. RT-PCR 반응액 조성은 총 RNA 1μl, 포워드 및 리버스 프라이머(10 pmol) 0.5μl, 증류수 8μl 및 BCS 2×RT-PCR mix 10μl이며, RT-PCR 조건은 48°C에서 10분간 RT, 95°C에서 10분간 변성(denaturation)한 다음, [95°C에서 20초간 재변성 후 55°C에서 20초간 어닐링(Annealing), 72°C에서 40초간 확장(extension)]을 35회 반복하였고, 72°C에서 5분간 신장(elongation)을 수행한 후 증폭산물을 확인하였다. 조사한 CMV를 제외한 나머지 바이러스에 대해서는 증폭산물이 관찰되지 않았고(그림 25), CMV의 경우 예상 크기(473 bp)와 비슷한 위치에서 약하게 증폭산물이 확인되어 원 논문에서 제시한 어닐링(Annealing) 온도(60°C)에서 재검한 결과 증폭산물을 확인할 수 없었다(그림 25의 L). 이상의 결과에서 조사한 시료는 모두 검사대상 바이러스에 감염되지 않은 것으로 판단되었다. 바이러스에 감염된 개체를 찾고자 온라인상에서 구입한 솔로, 레드창, 블루넬로 각 2점, 양재동 꽃시장에서 구입한 노란 꽃 칼라 5개체를 대상으로 바이러스 감염유무를 조사했으나 바이러스 감염된 개체를 찾지 못하였다(자료 미제출).

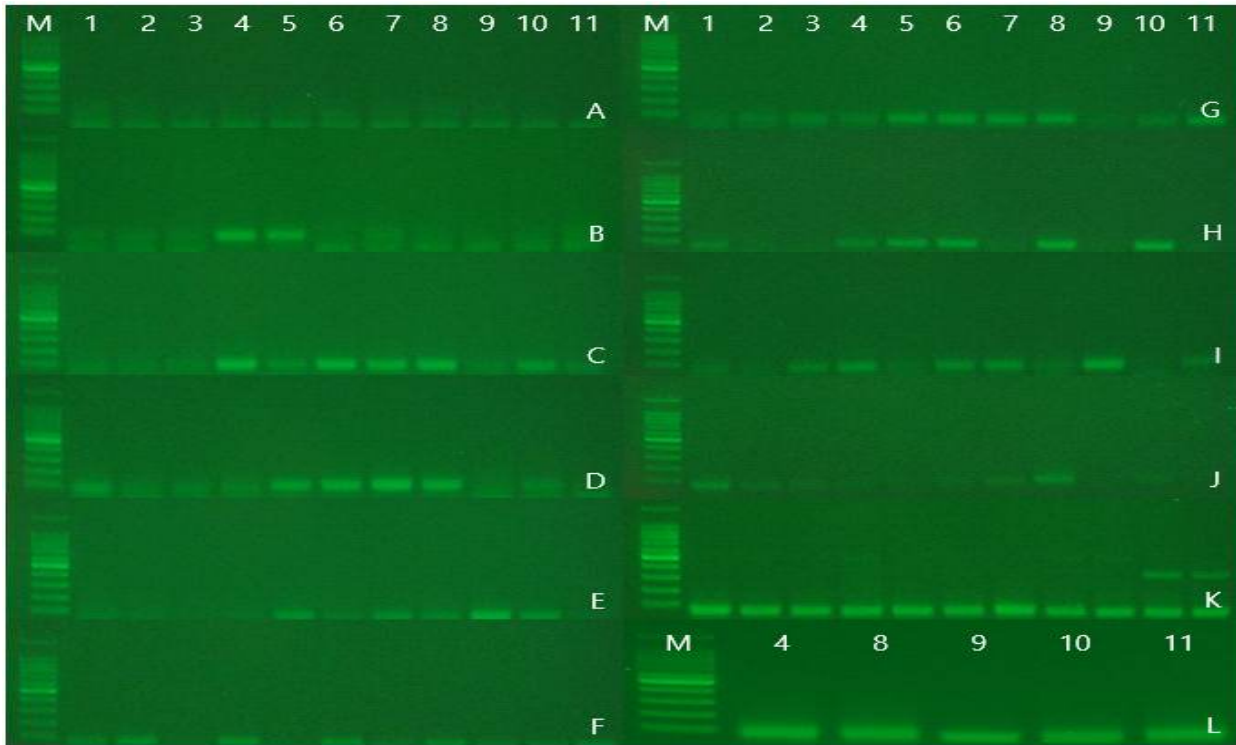


그림 25. 칼라 발생 바이러스 RT-PCR 검정. 검정 대상 바이러스; AMV(A), ArMV(B), BYMV(C), CarMV(D), DsMV(E), INSV(F), KoMV(G), TSWV(H), TuMV(I), ZaMV(J), CMV(K). CMV 재검정(L). M; 1kb DNA ladder, 1~7; 순서대로 Lip, MC, 스타웨이브, 수려한, 블레싱, 각시, 고우니 조직배양묘, 8~10; 몽블랑, 11; 스완.

○ 글라디올러스 바이러스 검정

온라인상에서 구매한 글라디올러스 구근 11개를 이식하고 3개월 이상 재배하였을 때 3~4 개체에서 육안으로 쉽게 판별할 수 있을 정도로 선명한 모자이크 병징을 관찰할 수 있었다(그림 26의 B). 11개 시료를 대상으로 칼라 바이러스 진단에 사용한 ArMV, CMV, TSWV 프라이머로 바이러스 감염 유무를 조사한 결과, 모든 시료에서 증폭산물이 관찰되지 않았다. 여름 장마기간에 살아 남은 개체를 대상으로 BYMV 감염유무를 확인 했을 때 병징유무와는 관계없이 조사한 개체 모두가 BYMV에 감염된 것으로 판명되었으며, 다른 바이러스 감염 여부를 확인하고자 대상 개체의 총 RNA를 분석하였는데 BYMV 서열만 존재하였다(그림 27).

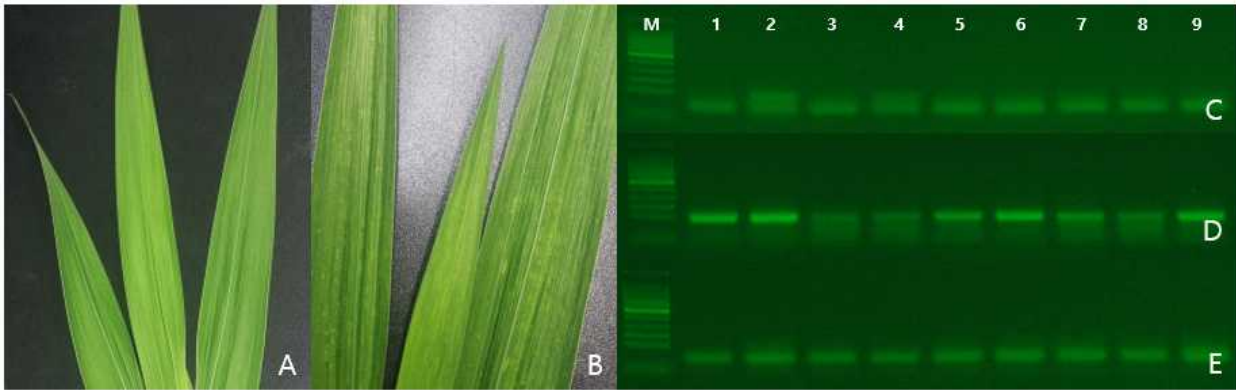


그림 26. 글라디올러스 잎과 바이러스 RT-PCR 검정. 무병징(A)과 모자이크 병징(B) 잎, 검정 대상 바이러스; ArMV(C), CMV(D), TSWV(E). M; 1kb DNA ladder, 1~9; 글라디올러스 시료.

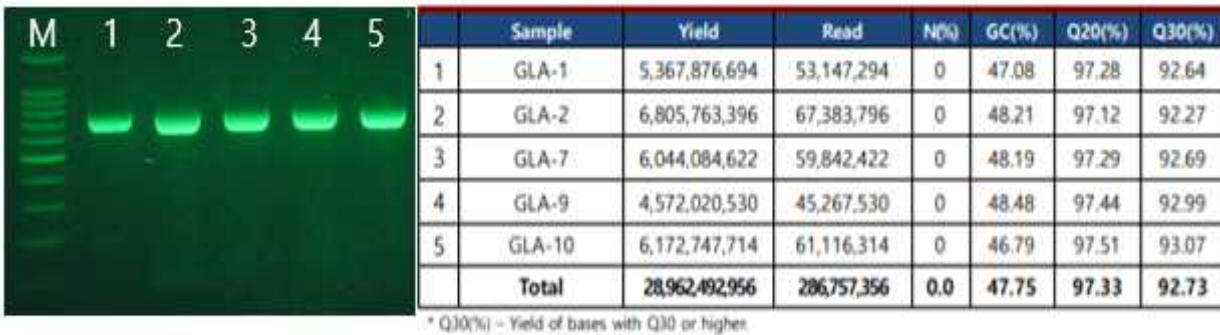


그림 27. 글라디올러스의 BYMV RT-PCR 검정 및 총 감염시료의 RNA 분석 특성. M; 1kb DNA ladder, 1~5; 글라디올러스 시료. P917/8 프라이머 조합으로 RT-PCR 수행.

총 RNA 염기서열 분석 결과 글라디올러스에는 주로 BYMV가 감염되어 있을 것으로 예상되었다. 충남도원에서 수집한 글라디올러스 7종(구근 32개)을 분양받아 구근을 정식하고 2~3개월 뒤에 잎을 채집하였다. BCS Plant RNA Prep Kit를 사용하여 잎 100mg에서 RNA를 분리하고 이를 주형으로 사용하였다. RT-PCR 반응액 조성은 총 RNA 1 μ l, 포워드 및 리버스 프라이머(10 pmol) 0.5 μ l, 증류수 8 μ l 및 BCS 2 \times RT-PCR mix 10 μ l이며, RT-PCR 조건은 48 $^{\circ}$ C에서 10분간 RT, 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 변성(denaturation)한 다음, [95 $^{\circ}$ C에서 20초간 재변성 후 53 $^{\circ}$ C(P917/8) 혹은 60 $^{\circ}$ C(P971/2와 P973/4)에서 30초간 어닐링(Annealing), 72 $^{\circ}$ C에서 45초(P917/8) 혹은 30초(P971/2와 P973/4)간 확장(extension)]을 35회 반복하였고, 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 신장(elongation)을 수행한 후 증폭산물을 확인하였다. 검정에 사용한 프라이머 따라 바이러스 검출 빈도는 다르게 나타났는데, BYMV 글라디올러스 계통에서 디자인한 프라이머로 알려진 P917/8를 사용했을 때 검출 빈도가 높게 나타났으며, P971/2이나 P973/4에서 특이적으로 검출되는 시료도 존재하였다. P917/8 프라이머는 이전의 실험에서 프리지아에서 발생하는 BYMV 증폭효율이 P971/2이나 P973/4에 낮았는데, 본 실험에서도 BYMV가 감염된 프리지아 RNA를 양성 대조구로 사용했을 때, P917/8에서는 증폭이 되지 않았다(그림 28).

BYMV 감염 표지자로 사용할 바이러스 무감염 개체를 찾고자 P917/8에서 증폭 산물이 없었던 5, 22, 27번 시료(그림 28의 붉은색 화살표)의 RNA를 다시 뽑고 이를 주형으로 검사한 결과 5와 22번 시료는 BYMV에 감염된 것으로 확인되었고(그림 29), 27번 시료의 경우 잎이 무름병으로 흐물거리려 정확한 결과판독이 불가능하였다.

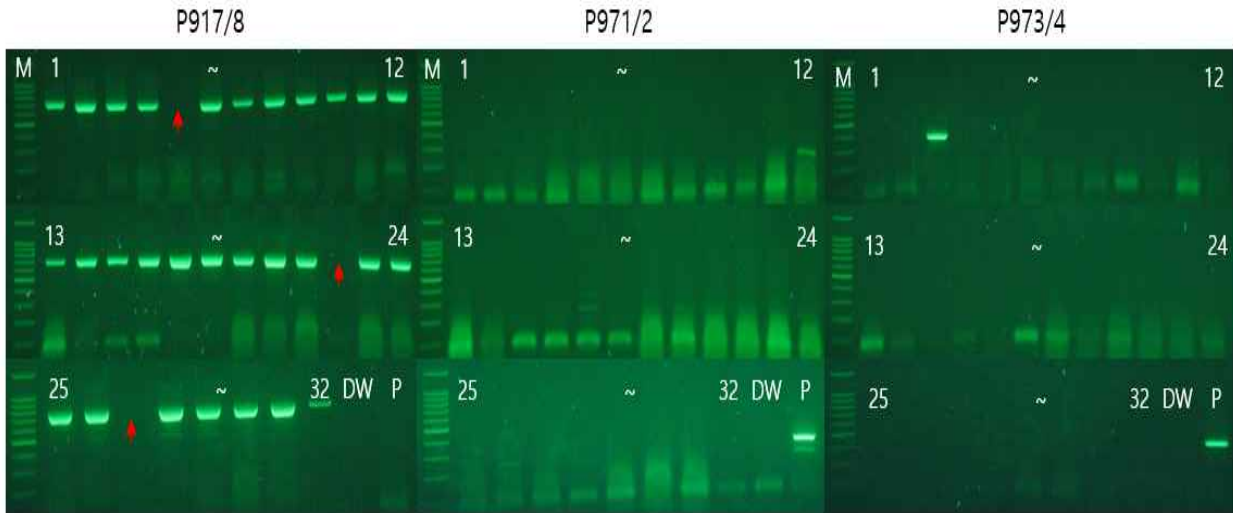


그림 28. 글라디올러스의 BYMV RT-PCR 검정. BYMV 검정용 primer 조합(P917/8, P971/2, P973/4. M; 1kb DNA ladder, 1~32; 글라디올러스 시료, DW; 증류수, P; BYMV에 감염된 프리지아 RNA.



그림 29. 글라디올러스의 BYMV RT-PCR 재검정. BYMV 검정용 primer 조합(P917/8, P971/2, P973/4. M; 1kb DNA ladder, 글라디올러스 재검정 시료(그림 28의 붉은색 화살표), DW; 증류수, P; BYMV에 감염된 프리지아 RNA.

○ 전사체 분석을 통한 프리지아, 글라디올러스, 칼라 품종별 바이러스 감염 양상 분석

1차년에는 FreMV에 감염되지 않았다고 생각되는 14(레드썸_1), 43(핑크지아_1)번 시료, 감염된 15(레드썸_2), 16(레드썸_3), 45(핑크지아_1)번 시료, 칼라는 분양 당시 온실에서 재배중이던 절화용 10품종(각시, 고우니, 립글로, 립스마일, 블레싱, 수려한, 스타웨이브, 아씨, GH, ML) 가운데 아씨(AS), 각시(GH), 립글로(LG), 립스마일(LS)을 국내업체에 전사체 분석을 의뢰하였다(그림 30).

RNA 적합도 검사에 통과한 프리지아 15, 43, 45번 시료와 칼라 4종의 sequencing raw data는 총괄과제에 의뢰하여 프리지아와 칼라에서 발생하는 바이러스 시퀀스 존재 유무를 확인하였다. 프리지아 시료에서는 모두 FreMV 전장서열이 확인되었고, BYMV 전장서열은 43과 45번 시료에서 확인되었다. 전사체 염기서열분석 결과는 앞서서 수행한 RT-PCR에 결과와 차이를 보였다. 프리지아 15번 시료는 FreMV-833 프라이머를 이용한 RT-PCR에서는 FreMV에 감염되지 않은 것으로 판단되었으나, 전사체 분석에서 양성으로 나왔으며, 다른 시료와는 다르게 크기가 다른 2종류의 바이러스 전장 서열이 확인되었다. 각각의 contig는 TRINITY_DN263_c1_g2_i4 = FreMV-1와 TRINITY_DN263_c1_g2_i5 = FreMV-2로 명명하였는데, 2개 sequence를 alignment했을 때, FreMV-1 sequence의 8067-8252(186bp) 부분이 FreMV-2에는 없는 것으로 확인되었으며, 나머지 부분은 일치하는 것으로 확인되었다 (그림 31). 이는 FreMV-833 프라이머에서 검출이 되지 않는 FreMV 계통이 존재할 가능성이 있음을 암시한다.

칼라 시료에서는 각시(GH)와 립글로(LG)에서 Konjac mosaic virus 서열이 검출되었고, 나머지 시료에서는 알려진 바이러스 서열이 확인되지 않았다(자료 미제출).

Sample ID	Total read bases (bp)	Total reads	GC(%)	AT(%)	Q20(%)	Q30(%)
15	4,615,740,400	45,700,400	43.77	56.23	98.96	96.48
43	4,595,712,302	45,502,102	43.32	56.68	98.99	96.51
45	3,470,284,250	34,359,250	43.55	56.45	98.95	96.37
AS	3,397,662,018	33,640,218	49.65	50.35	98.41	95.48
GH	3,197,451,738	31,657,938	45.02	54.98	98.9	96.36
Gak	3,891,236,090	38,527,090	49.77	50.23	98.53	95.7
LG	3,662,043,658	36,257,858	45.64	54.36	98.87	96.34

- Sample ID : Sample name.
- Total read bases : Total number of bases sequenced.
- Total reads : Total number of reads. For Illumina paired-end sequencing, this value refers to the sum of read 1 and read 2.
- GC(%) : GC content.
- AT(%) : AT content.
- Q20(%) : Ratio of bases that have phred quality score of over 20.
- Q30(%) : Ratio of bases that have phred quality score of over 30.

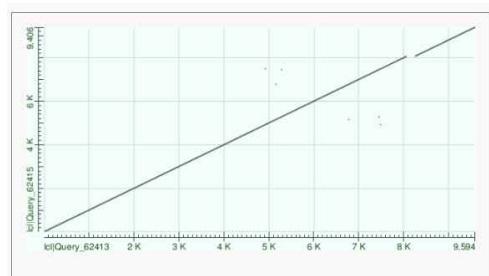


그림 31. de novo assemble 결과 2개의 freesia mosaic virus sequence 조립

그림 30. 프리지아와 칼라 전사체 해독 결과.

2차년에는 FreMV, BYMV, FresV 등 RT-PCR을 이용한 바이러스를 검정 결과와 1차년의 NGS 총 RNA 분석 결과를 바탕으로 10개 시료[S1-2(모닝글로리x핑크지아) F1, S71-5(솔레일x모닝글로리) F1, 핑크지아1, 핑크지아 2, 핑크지아 3, 모닝글로리 2, 솔레일 1, 솔레일 3, F2(양재동 구입 이름 모름), F31(양재동에서 구입 이름 모름)]를 최종 선발하고 총 RNA 염기서열을 해독하였다.

Map to reference(viral ref. NCBI 14,813 virus seq)와 De Novo 서열 분석을 통해 바이러스 서열을 확인한 결과, 43-핑크지아_1, 핑크지아1, 45-핑크지아_3, 핑크지아 3, 핑크지아 2, 모닝글로리 2 에

는 FreMV와 BYMV, F2, 솔레일 3에는 FreMV와 FreSV, 15-레드선_2에는 FreMV 단독감염, F31에는 FreSV 서열을 확인하였고, S1-2(모닝글로리x핑크지아) F1와 S71-5(솔레일x모닝글로리) 그리고 솔레일 1에서는 어떠한 바이러스 서열도 확인할 수 없었다(그림 32).

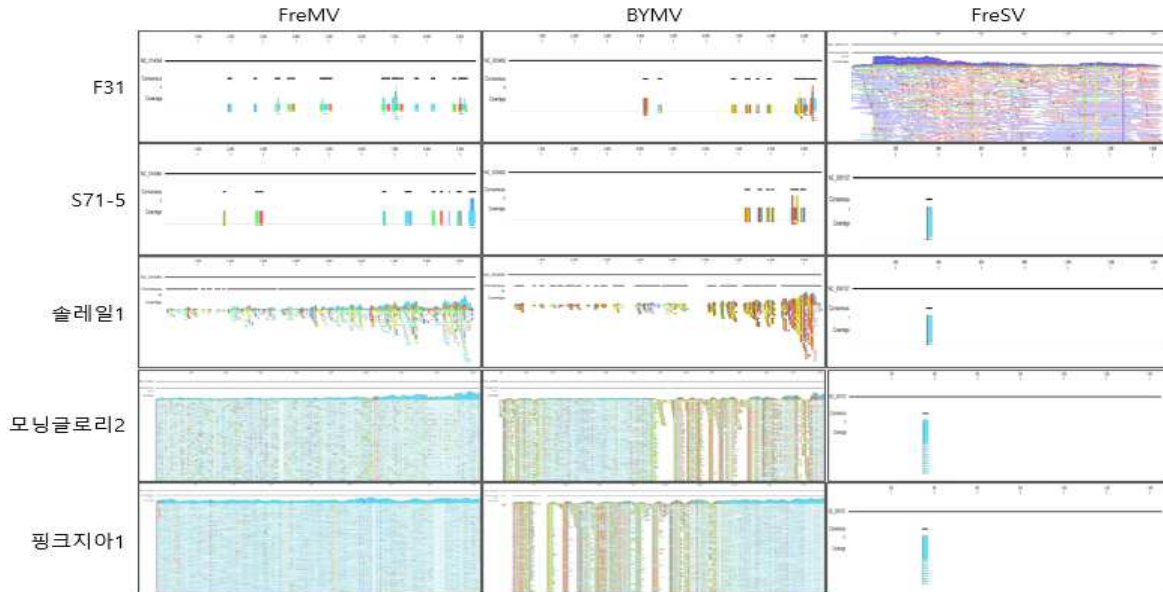


그림 32. Map to reference 분석 대표도. CLC Genomics Workbench 22.0.2 프로그램을 사용하여 각 시료(F31, S71-5, 솔레일1, 핑크지아, 모닝글로리)의 NGS 총 RNA 서열을 NCBI에 등록된 viral ref.(14,813 virus sequence)에 mapping함.

핑크지아 1과 2에서는 분석용 RNA 채집시기가 달랐음에도 동일한 바이러스 서열을 확인할 수 있었고, 솔레일 3에서는 예상과 달리 FreSV 서열도 확인되었는데, RT-PCR 결과에서는 음성으로 나온 개체였다. 이러한 차이는 개체 하면(夏眠) 후 재식하여 재배하는 과정에서 FreSV에 오염되었을 가능성에서 기인한 것으로 추정되었다. 결과적으로 RT-PCR이나 NGS 총 RNA 서열 분석에는 큰 차이가 없어 보였으며, 향후 바이러스 감염 판독에 NGS 기술의 활용성이 매우 높을 것으로 판단되었다.

글라디올러스의 경우, 2년차에 우리화훼종묘에서 구매한 5개체(이름 모름)를 분석하였는데, 5개 모두 BYMV 전장서열만 확인할 수 있었다(그림 33).

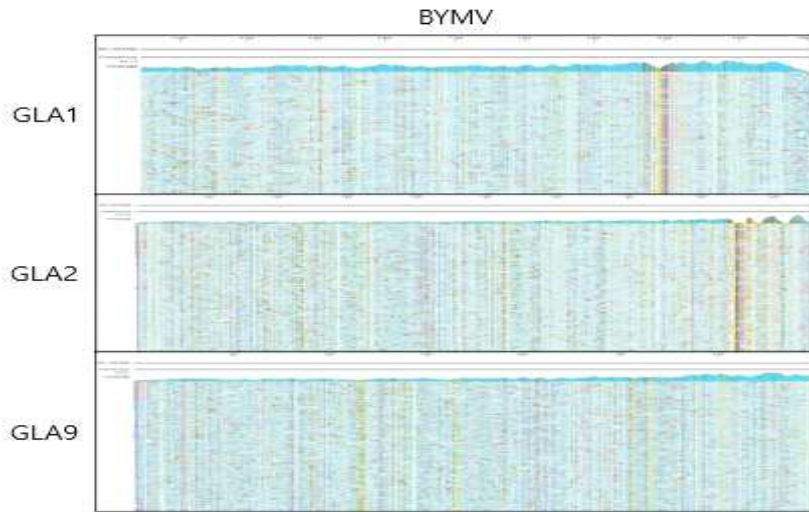


그림 33. Map to reference 분석 대표도. CLC Genomics Workbench 22.0.2 프로그램을 사용하여 각 시료(GL1, 2, 3)의 NGS 총 RNA 서열을 NCBI에 등록된 viral ref.(14,813 virus sequence)에 mapping함.

RT-PCR을 이용한 바이러스 진단에서 BYMV는 계통에 따라 유전체 서열이 다양할 것으로 예상되었는데, 유전체 서열이 어느 정도 다양한지 확인하기 위하여 총 RNA 분석시 얻은 BYMV 전장서열을 비교하였다. 서열 차이는 주로 5' 과 3' 쪽, 6,000 bp 주변에서 관찰되었고, GLA1과 9은 5' 쪽, GLA2와 GLA 9는 서열의 3' 쪽 의 상당부분이 존재하지 않았다(그림 34).

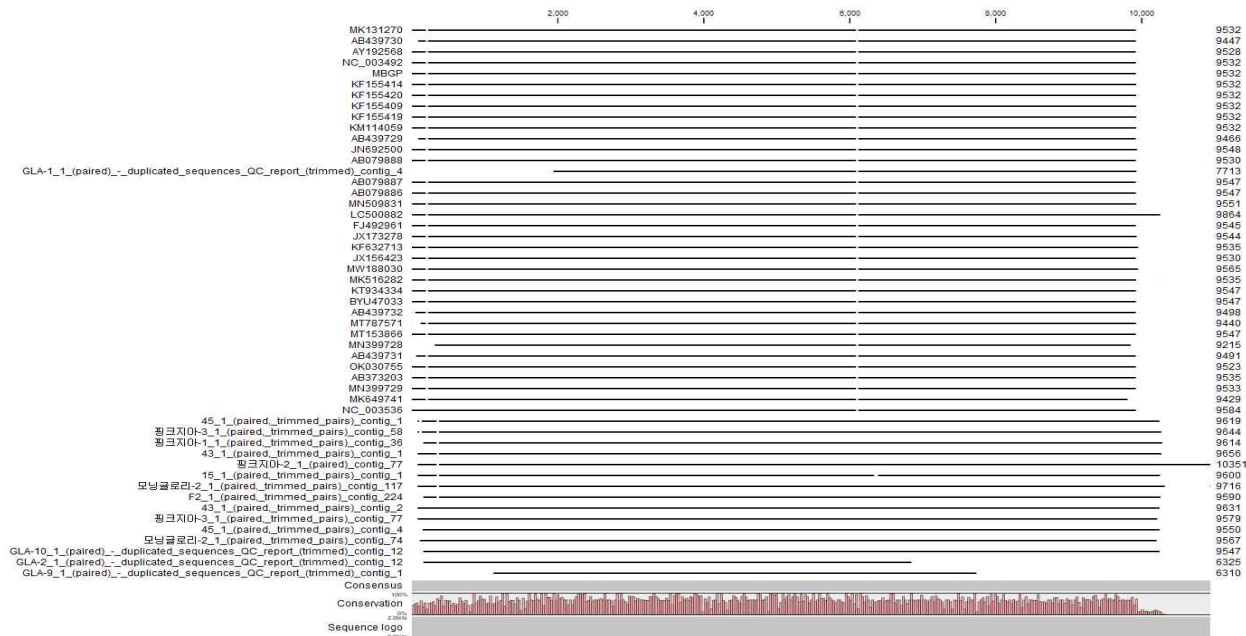


그림 34. BYMV 전장 contig 서열 비교.

이들에 대한 계통도를 분석한 결과, 프리지아와 글라디올러스는 각각 2개 그룹으로 나뉘었고, 이중 그룹 2과 3은 상당히 가까웠다(그림 35). 그러나 실험간에 반복이라고 할 수 있는 동일개체이나 RNA 추출시 식물 성장시기가 다른 43-핑크지아1(성묘)과 핑크지아(유묘), 45-핑크지아2(성묘)와 핑크지아 2(유묘)의 전장유전체서열 추정결과가 다르게 나와 현재 결과에서는 BYMV 계통을 크게 Group1과 나머지 Group으로 대별하는 것이 적합하다고 판단된다.

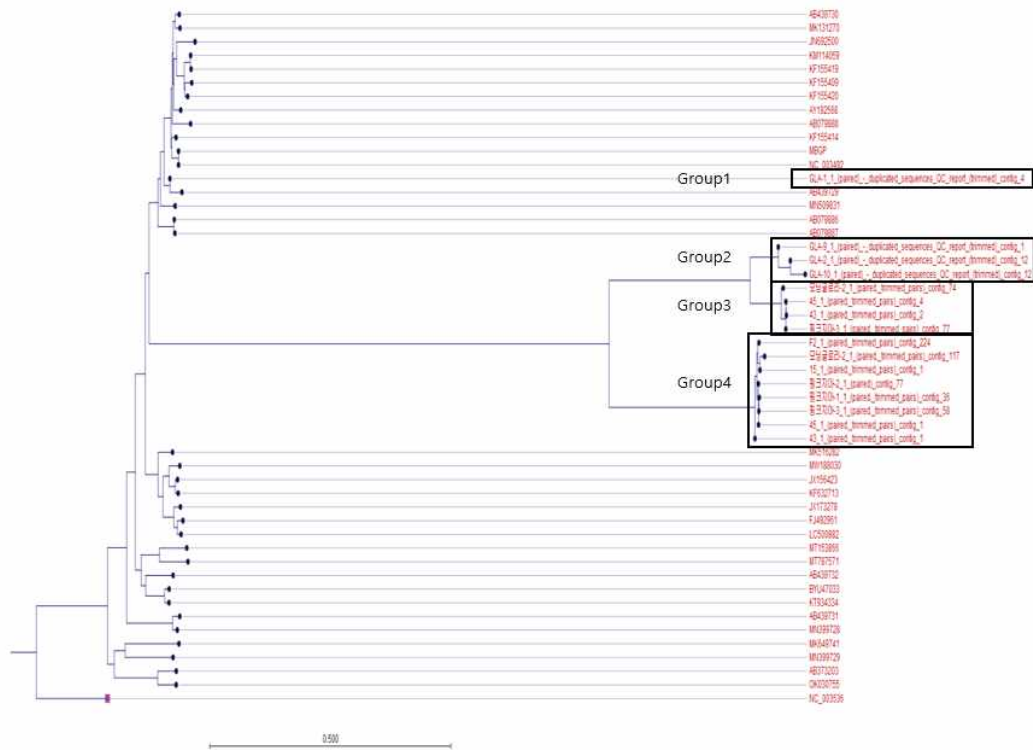


그림 35. BYMV 전장 contig 서열을 이용한 근연관계 분석.

○ 프리지아 시료를 이용한 전사체 분석

프리지아 식물을 이용하여 CMV와 BYMV의 감염에 따른 기주유전자 발현 변화 및 바이러스 감염 표지 유전자를 구명하기 위하여 프리지아 식물에 각각 CMV와 BYMV를 접종하고 이를 이용하여 total RNA를 추출, 전사체 분석을 위한 RNA-seq library를 제작하여 전사체 분석을 의뢰하였다. 전사체 분석은 NAVAsq6000 system을 이용하여 paired-end sequencing (2x101bp) 방법을 이용하여 수행하였으며 확보한 RNA-seq raw data file은 그림 36와 같은 pipeline을 이용하여 분석하였다.

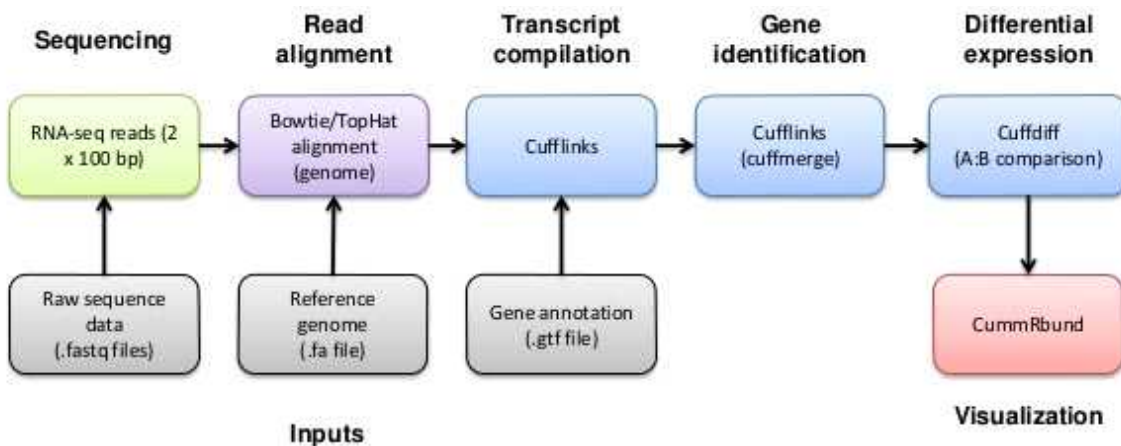


그림 36. Tuxedo pipeline을 이용한 전사체 분석 방법

Tuxedo pipeline을 이용한 분석 외에 교차 분석을 통해서 분석 결과의 신뢰성을 높이기 위한 BBmap과 DEbrowser를 이용한 추가 분석을 수행하여 각 바이러스 접종에 따른 프리지아 식물의 기주 유전자 RPKM값을 도출하였다. 도출한 RPKM값을 이용하여 각 바이러스 접종시 대조군과의 유전자 발현 차이를 분석하였으며 DEbrowser를 통해 유전자의 DEG값을 분석하였다. p-value 0.05 이하의 신뢰구간을 설

정하였고 log2FC 값을 이용하여 각 바이러스 감염에 따라 그 발현이 증가하는 유전자 및 발현이 감소하는 유전자를 선별하였다. 유전자 발현 증가 및 감소의 기준점은 log2FC=1 또는 -1 값을 기준으로 설정하였으며 1 이상의 log2FC 값을 보이는 유전자는 발현량이 증가하였으며 -1 이하의 log2FC 값을 보이는 유전자는 발현량이 감소하였다고 판단하였다. 그림37과 같이 CMV가 감염된 프리지아에서 135개의 유전자 발현이 증가하였고 117개의 유전자 발현이 감소하였다. BYMV 감염의 경우에는 CMV 감염과 비교시 다소 작은 개수의 유전자 (34개)가 발현이 증가하였으며 발현량이 감소한 유전자는 CMV 감염과 유사한 양상을 나타냈다 (125개 발현량 감소). 각각의 CMV와 BYMV 감염에 따라 발현양이 변화하는 기주유전자들 사이의 상관관계를 분석하기 위하여 공통적으로 발현되는 유전자를 분석하였다. 그림3의 B와 같이 각 바이러스 감염 조건에 따라 발현양이 변화하는 기주유전자 중 CMV와 BYMV에 각각 그 발현양이 감소하는 1개의 유전자 (TRINITY_DN790_c0_g1_i11)를 선별하였고 CMV 감염시 발현이 증가하지만 BYMV 감염시 발현이 감소하는 유전자 4개를 선별하였다. (TRINITY_DN2147_c0_g1_i1, TRINITY_DN2216_c0_g1_i10, TRINITY_DN24772_c0_g1_i1, TRINITY_DN26354_c0_g1_i1). 2차년도에는 1차년도에 선별한 5개의 기주유전자를 이용하여 바이러스 특이적 표지 유전자 검출 키트 개발 소재로 적용이 가능할 것으로 예상된다.

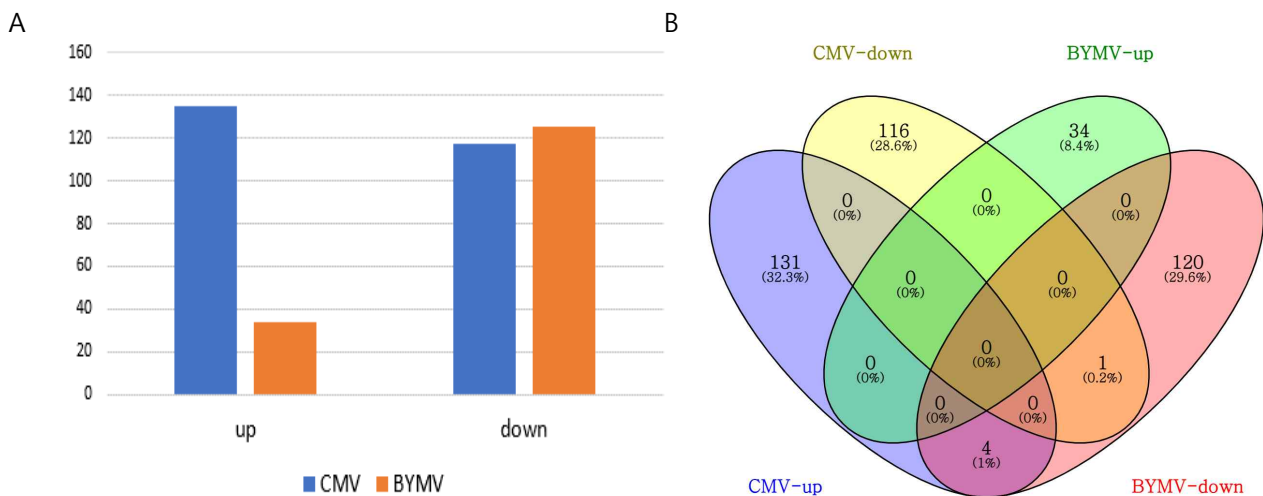


그림 37. CMV, BYMV 감염에 따른 기주 유전자 발현 변화

각 바이러스 감염에 따른 유전자 발현이 증가하거나 감소하는 기주유전자들의 세포내 기능을 파악하고자 Gene ontology analysis를 수행하였다. 프리지아 기주 유전자중 protein serine/threonine phosphatase complex 기능에 관여하고 있는 유전자들이 발현량이 CMV 감염에 따라서 증가하였으며 UDP-glycosyltransferase activity에 관여하는 유전자 발현도 증가하였다. CMV 감염에 따라 발현이 감소하는 유전자는 cytoplasmic part와 structural constituent of ribosome 기능을 갖은 유전자들

이 대부분이었다 (그림 38, 그림 39, 그림 40).

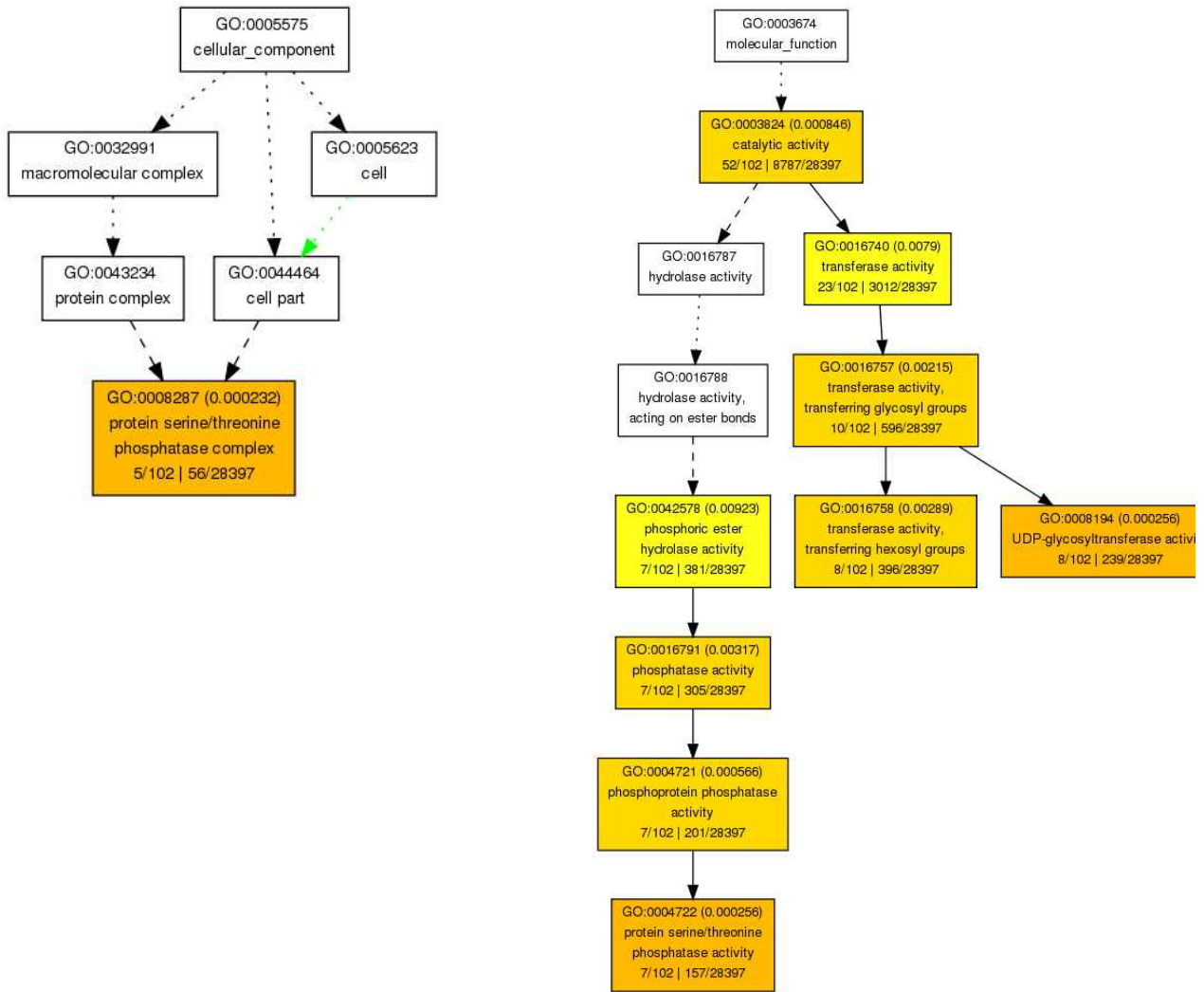


그림 38. CMV 감염에 따른 발현량 증가 기주유전자의 GO term analysis

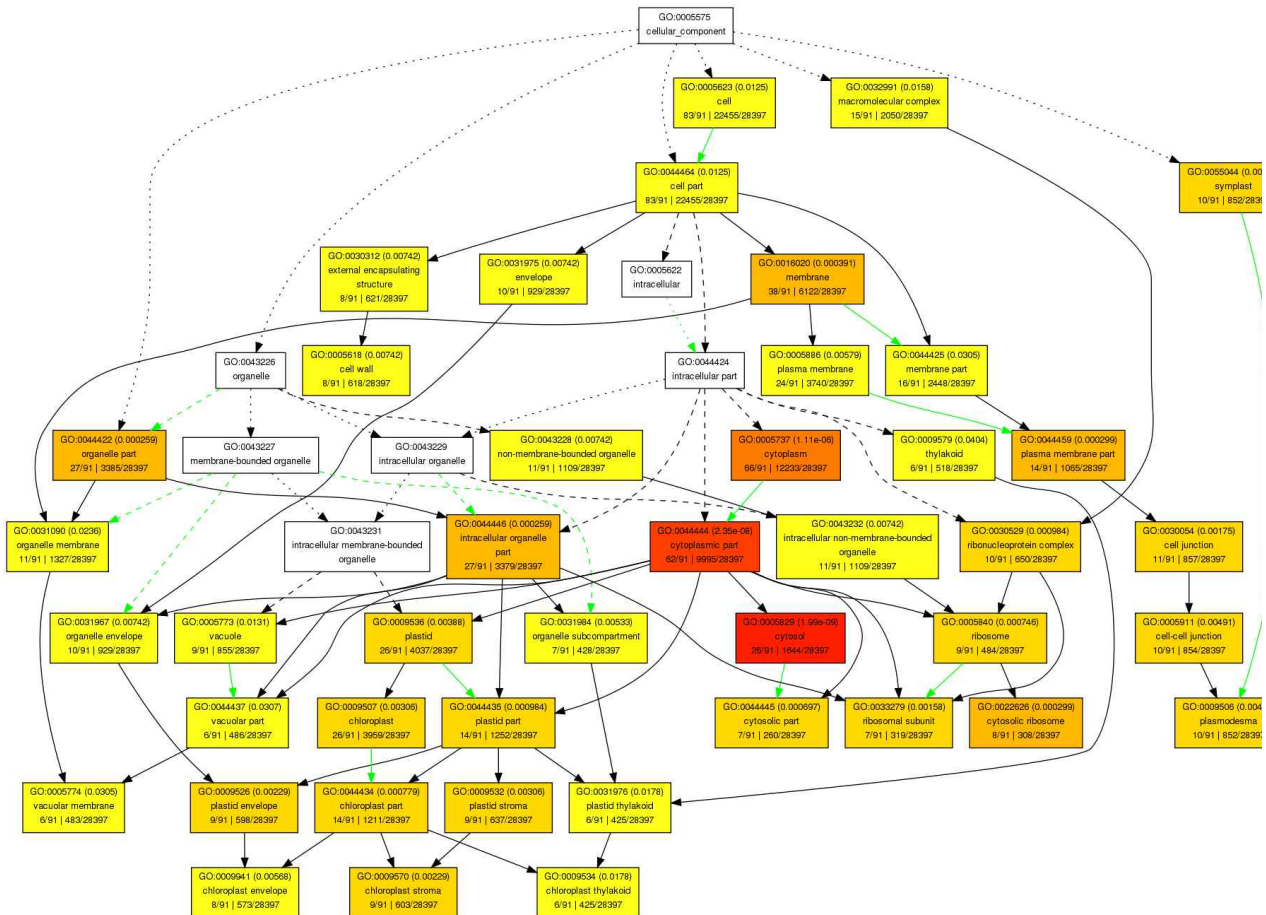


그림 39. CMV 감염에 따른 발현량 감소 기주유전자의 GO term analysis

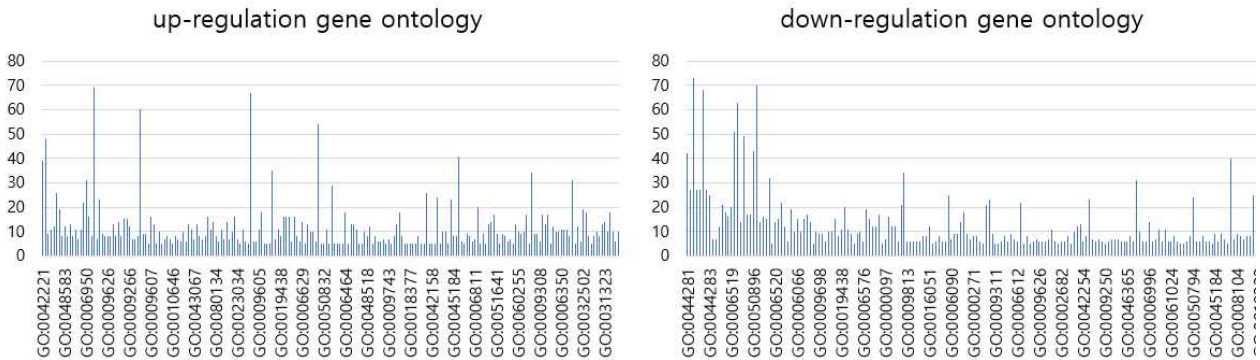


그림 40. CMV 감염시 발현량 변화가 나타나는 기주유전자의 GO term 분석 결과

BYMV 감염시에는 프리지아 기주 유전자 중 immune system process와 innate immune response에 관여하는 유전자들의 발현이 증가하는 것으로 GO term 분석결과 확인되었다. 이와 같은 결과는 BYMV 감염시 프리지아 기주식물 자체의 primary defense system을 이용하여 바이러스 감염에 대비하는 1차적인 방어기작이 활성화 되어 관련 기주 유전자들의 발현 또는 증가한다고 판단할수 있다 (그림 41).

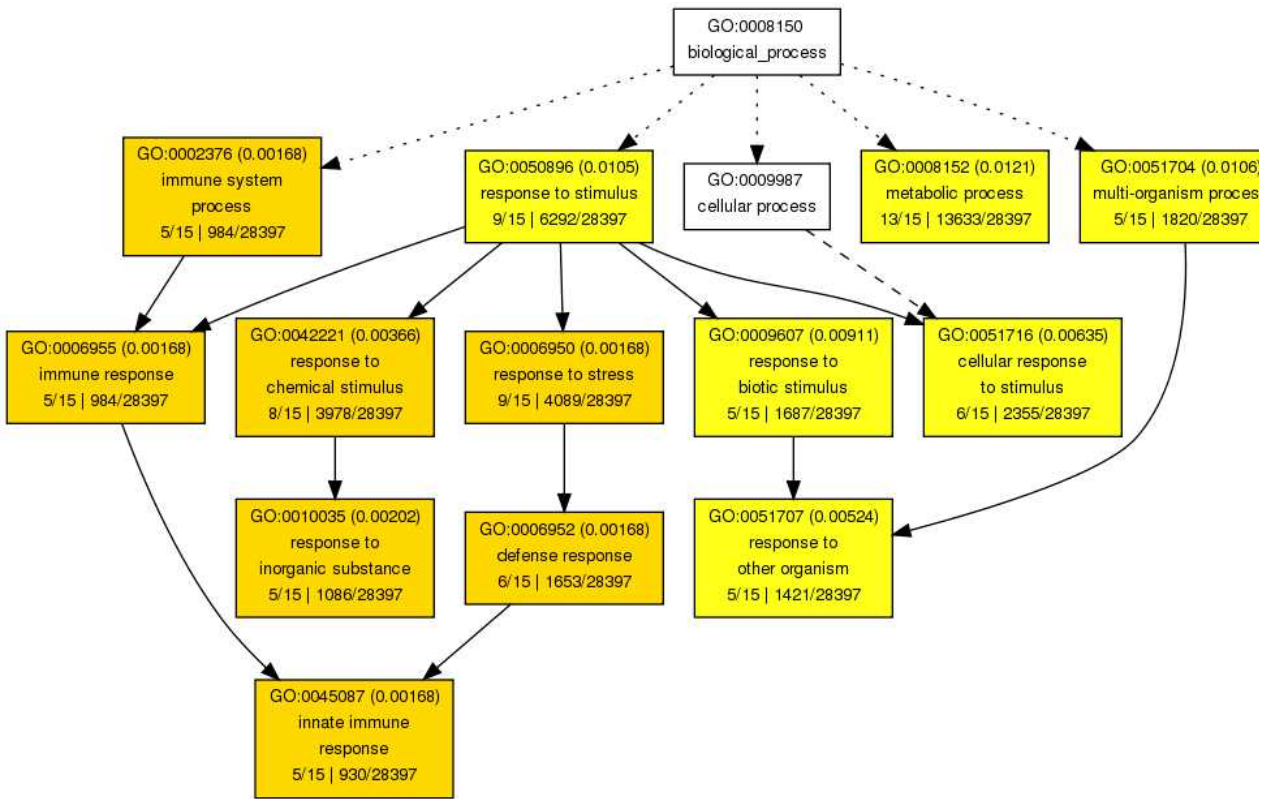


그림 41. BYMV 감염에 따라 발현이 증가하는 프리지아 유전자 gene ontology (biological process)

BYMV 감염에 따라 발현량이 감소하는 유전자들은 response to light intensity, cation transport, flavonoid biosynthetic process, regulation of flavonoid biosynthetic process에 관여하는 유전자로 나타났으며 특히 secondary metabolite와 연관된 flavonoid 관련 유전자들의 발현이 감소하는 것으로 파악되었다 (그림 42, 그림 43, 그림 44).

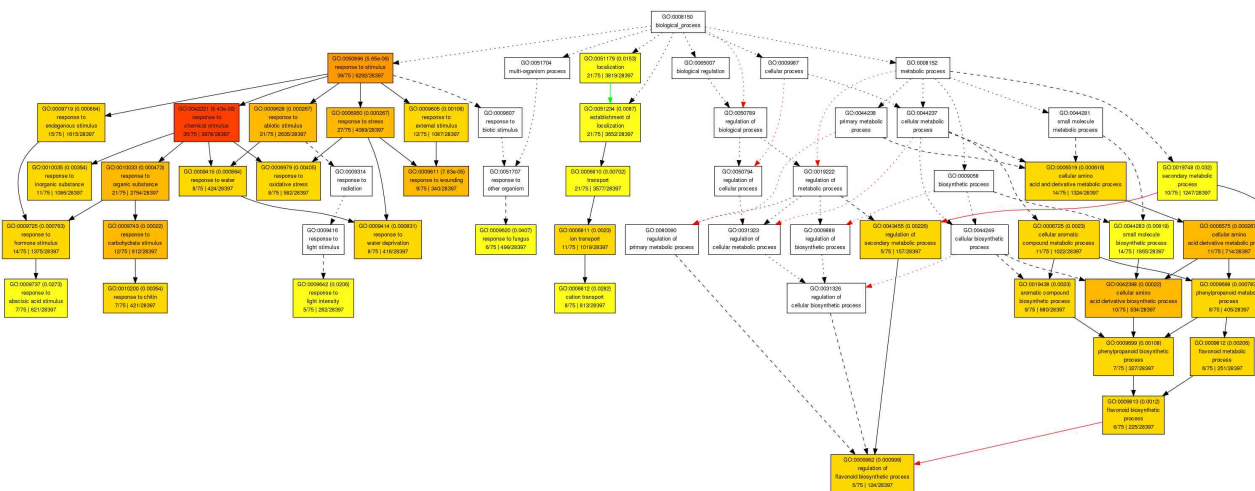


그림 42. BYMV 감염에 따라 발현이 감소하는 프리지아 유전자 gene ontology (biological process)

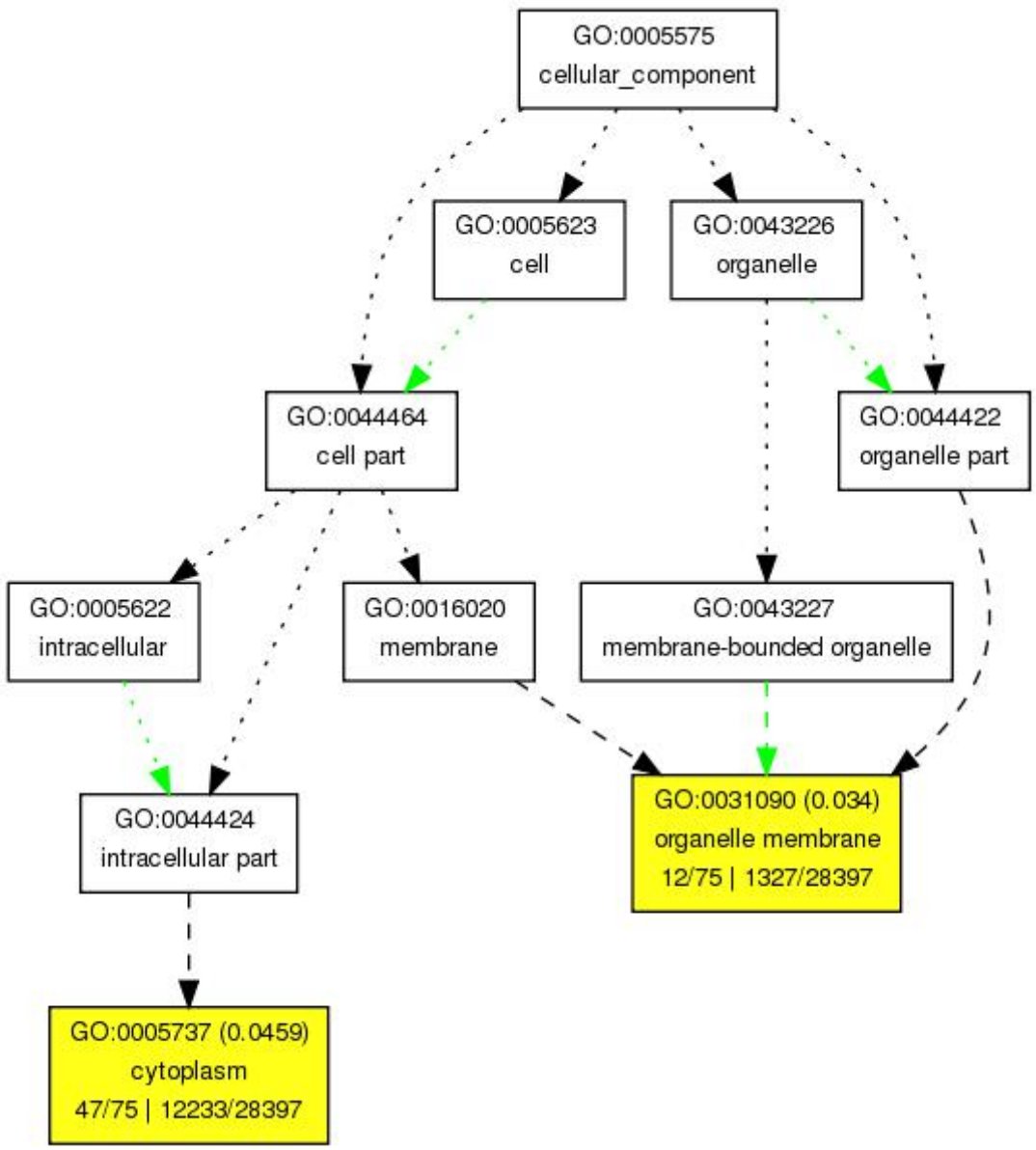


그림 43. BYMV 감염에 따라 발현이 감소하는 프리지아 유전자 gene ontology

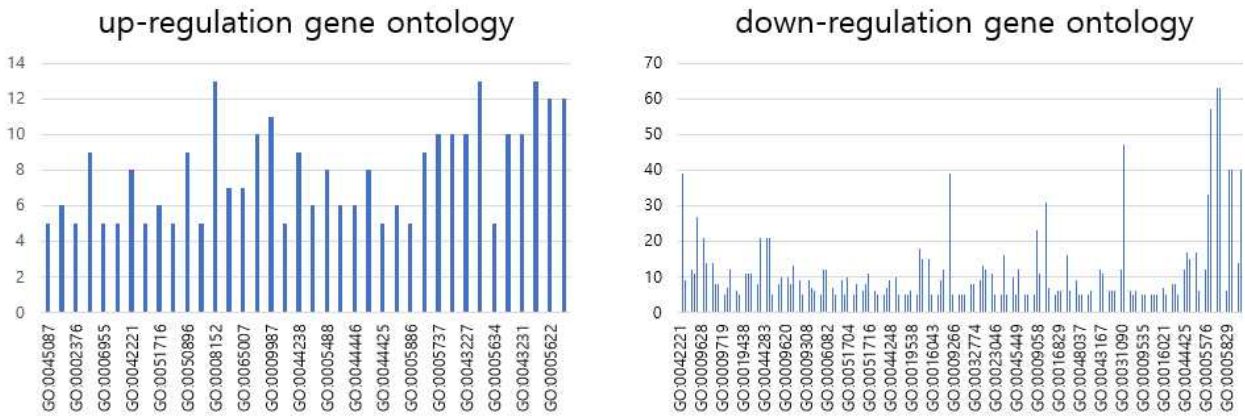


그림 44. BYMV 감염시 발현량 변화가 나타나는 기주유전자의 GO term 분석 결과

○ 칼라 시료를 이용한 전사체 분석

칼라 품종 중 립스마일 품종을 선별하여 CMV와 BYMV의 자연감염여부를 각 바이러스 특이 primer를 이용하여 진단한 결과 립스마일 품종의 CMV와 BYMV에 대한 감염은 확인되지 않았다. CMV와 BYMV를 각각 즙액 접종하고 이틀 후에 접종엽에서 total RNA를 추출, 전사체분석을 수행하였다. 전사체 분석은 NAVAsq6000 system을 이용하여 paired-end sequencing (2x101bp) 방법을 이용하여 수행하였으며 확보한 RNA-seq raw data file은 De novo assemble을 이용하여 칼라 transcriptome database를 구축하고 raw file을 이용한 mapping을 통해 DEG 값을 확보하였다. 기주유전자 발현의 증감 여부를 log2FC의 1 이상을 유전자 발현의 증가로 판별하고 log2FC값이 -1이하일때는 해당 유전자 발현이 감소한 것으로 간주하였다. CMV 감염시 183개의 유전자 발현이 증가하였으며 129개 유전자 발현이 유의미하게 감소하였다. BYMV 감염시에는 133개의 유전자 발현이 증가하였고 14개 유전자의 발현이 감소하였다. CMV와 BYMV 감염시 30개의 유전자가 공통적으로 발현 변화가 관찰되었으며 282개의 유전자는 CMV 감염에 의해서 유전자 발현 변화가 나타났고 117개의 유전자는 BYMV 감염에만 유전자 발현 변화가 나타났다 (그림 45).

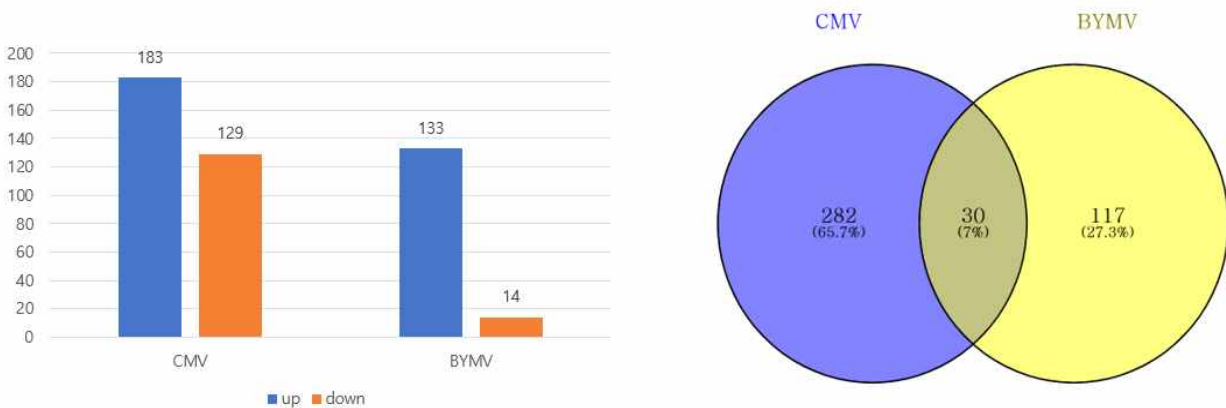


그림 45. CMV와 BYMV에 감염된 칼라의 기주유전자 발현 양상

발현양의 변화가 관찰된 유전자들의 각각 기능적인 부분에서 분석한 결과 CMV 감염시에는 ribosome assembly에 관한 유전자들의 발현변화가 강하게 나타났고 이들 유전자는 세포내에서 polysomal ribosome, polysome에 위치하는 유전자임이 확인이 되었다. 이들 유전자는 세포내에서 inositol 3-alpha-galactosyl transferase activity, cytochrome-c oxidase activity 등의 기능을 수행하는 유전자로 확인이 되었다(그림 46).

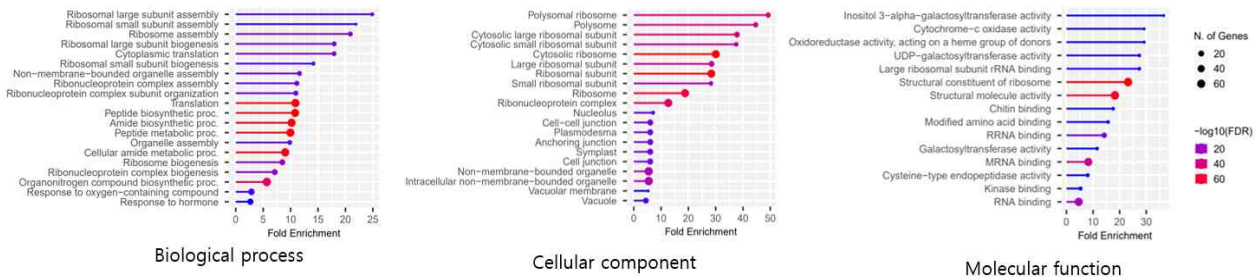


그림 46. CMV 감염에 따른 발현양 변화 유전자의 GO term 분석

BYMV가 감염되었을시 발현양이 변화하는 유전자들의 세포내 기능에 대한 분석을 수행하였다. BYMV 감염시에 발현이 억제되거나 증가하는 유전자는 photosystem II에 속해있는 photosynthesis에 관여하는 유전자, reactive oxygen species biocynthesis에 관여, water homeostasis에 관여하는 유전자들이었으며, 해당 유전자들의 세포소기관내 위치는 thylakoid light-harvesting complex, PSII complex에 위치하는 유전자들로 확인이 되었다. BYMV 감염시 발현 증감이 나타나는 유전자들은 세포 내에서 chitin binding, chitinase activity를 갖는 유전자들로 밝혀졌다(그림 47).

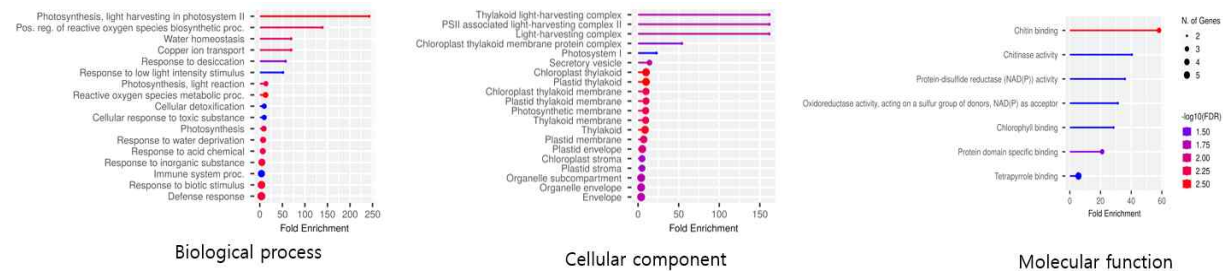


그림 47. BYMV 감염에 따른 발현양 변화 유전자의 GO term 분석

○ FreMV, BYMV, CMV, FreSV DEG 분석 및 표지자 개발

바이러스 유전체 검정결과를 토대로 각각의 바이러스에 감염 또는 무감염 개체를 선발하고(표 6),

표 6. NGS 총 RNA 서열 분석에 사용한 시료와 대상 바이러스 감염 유무

Sample Name	Cultivar	Plant	Seq date	FreMV	BYMV	FreSV	Virus
15	레드션	Freesia	2021-08-04	P*	N	N	P
43	핑크지아	Freesia	2021-08-04	P	P	N	P
45	핑크지아	Freesia	2021-08-04	P	P	N	P
F2	unknown	Freesia	2022-03-02	P	U	P	P
F31	unknown	Freesia	2022-03-02	N	U	P	P
S1-2	모닝글로리*핑크지아	Freesia	2022-03-02	N	N	N	N
S71-5	솔레일*모닝글로리	Freesia	2022-03-02	N	N	N	N
모닝글로리-2	모닝글로리	Freesia	2022-03-02	P	P	N	P
솔레일-1	솔레일	Freesia	2022-03-02	N	N	N	N
솔레일-3	솔레일	Freesia	2022-03-02	N	U	N	P
핑크지아-1	핑크지아	Freesia	2022-03-02	P	P	N	P
핑크지아-2	핑크지아	Freesia	2022-03-02	P	P	N	P
핑크지아-3	핑크지아	Freesia	2022-03-02	P	P	N	P

*감염(P), 무감염(N), 모호(U)

NGS로 총 RNA 서열을 해독하였다. 바이러스 무감염 시료인 솔레일1, S1-2, S71-5의 NGS reads 201,018,008개 를 De Novo assembly 해서 얻은 151,878의 contig를 표준서열로 사용하여, 나머지 13 개 시료의 RNA 시퀀스를 분석하였다. 바이러스 감염 표지자 개발에 사용할 contig를 선별하기 위해 첫 번째는 read count값을 기준으로 시료별 발현량 차이를 비교하였는데, 건전한 개체는 10보다 낮은 것, 감염된 개체는 최소값이 0이 아니면서 평균값이 100 이상으로 했을 때 발현량에 유의한 차이를 보이는 contig는 13개 였다. 이들 가운데 count 값의 차이가 가장 큰 것 3개 contig(솔레일 contig 56439, 솔레일 contig 95722, 솔레일 contig 135115)를 선별하였다(그림 48).

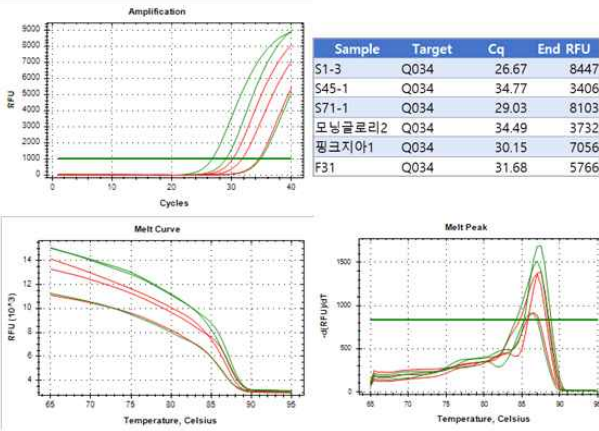
Name	Identifier	N				Match any			
		S1-2.1 (GE)	S71-5.1 (GE)	솔레일-1.1 (G...)	Mean	43.1 (GE)	45.1 (GE)	15.1 (GE)	F2.1 (GE)
솔레일-1.1.(paired_trimmed_pairs)...contig_52221		7.00	10.00	13.00	10.00	17.00	73.00	1.00	643.00
솔레일-1.1.(paired_trimmed_pairs)...contig_111115		4.00	4.00	2.00	3.33	3.00	1.00	2.00	922.00
솔레일-1.1.(paired_trimmed_pairs)...contig_104145		22.00	1.00	4.00	9.00	1.00	5.00	12.00	1.00
솔레일-1.1.(paired_trimmed_pairs)...contig_74900		8.00	3.00	3.00	4.67	59.00	142.00	10.00	1,094.00
솔레일-1.1.(paired_trimmed_pairs)...contig_140412		5.00	0.00	0.00	1.67	3.00	4.00	6.00	258.00
솔레일-1.1.(paired_trimmed_pairs)...contig_79897		1.00	0.00	4.00	1.67	5.00	41.00	17.00	4.00
솔레일-1.1.(paired_trimmed_pairs)...contig_132820		1.00	15.00	3.00	6.33	4.00	47.00	33.00	3.00
솔레일-1.1.(paired_trimmed_pairs)...contig_92898		17.00	2.00	2.00	7.00	15.00	46.00	31.00	1.00
솔레일-1.1.(paired_trimmed_pairs)...contig_135115		1.00	8.00	1.00	3.33	2.00	4.00	32.00	246.00
솔레일-1.1.(paired_trimmed_pairs)...contig_56439		3.00	0.00	22.00	8.33	20.00	232.00	186.00	35.00

그림 48. 바이러스 감염과 무감염 시료의 read count값 비교.

선별한 contig 서열을 기반으로 PCR product의 크기는 157~188 bp, 프라이머별 Tm값은 60도가 되는 조건으로 각각 2조합씩 PT-PCR용 프라이머를 제작하였다. 시료는 S1-3(무감염), S45_01(무감염), S71_01(무감염), 모닝글로리 2(FreMV & BYMV 감염), 핑크지아(FreMV & BYMV 감염), F31(FreSV 감염) 를 사용하여 바이러스 감염 유무와 contig별 PCR 산물의 증폭량으로 둘 간의 연관관계를 분석하였다. 바이러스 감염 유무와 PCR 산물 증폭량이 양 또는 음의 상관관계 중 하나로 완전히 일치하는 경우는

없었다(그림 49).

Q034



Q035

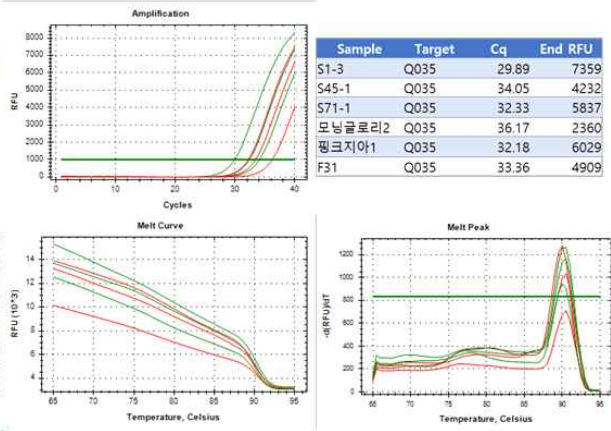


그림 49. read count값을 기준으로 선발한 contig 유래 프라이머를 이용한 시료별 발현량 차이를 비교.

두 번째는 새로운 전사체 후보를 선발하기 위해 이전 분석과는 다르게 13개의 총 RNA 서열 가지고 de novo assembly를 수행하였으며 총 250,113개의 contig가 맵핑되었다. log2 fold change 값을 기준으로 건전과 감염 개체별 공통으로 발현량이 늘어나거나 줄어드는 contig를 탐색한 결과, log2 fold change 값이 10 이상 차이나는 contig 수는 244개였는데, 이중에서 37개는 FreMV, BYMV, FreSV 서열 가운데 하나였고, 바이러스 contig를 제외한 것 가운데 건전과 감염 개체간에 log2 fold change 이 가장 큰 상위 2개 contig(4077 & 981)를 선발(그림 50)하였다. 선발한 contig 서열을 기반으로 contig 당 각 3조합씩 프라이머를 제작하였고, 검정 시료는 그림 37의 경우와 동일하게 사용하였다.

Name	Region	Max group mean	Log2 fold change	Fold change	P-value	FDR p-value	Bonfer roni	blastn ID	blastn description
F2_1(paired_trimmed_pairs)_contig_338	1..731	732.8972	13.2507197	9746.846	8.64906E-08	0.0002	0.02	FJ669488	Musa AAB Group catalase 2 gene, partial cds
F2_1(paired_trimmed_pairs)_contig_14296	1..916	43.794783	10.08043259	1082.7111	3.85797E-07	0.00067	0.0871	XM_01090	PREDICTED: Elaeis guineensis protein NRT1/ PTR FAMILY 3.1 (LOC105
F2_1(paired_trimmed_pairs)_contig_148673	1..1073	21.816796	10.2910947	1252.934	9.05568E-06	0.00988	1	AY504966	Iris hollandica putative cysteine protease 1 (CYS1) mRNA, complete cc
F2_1(paired_trimmed_pairs)_contig_3277	1..344	104.97895	10.0074296	1029.287	1.46797E-05	0.01352	1	XM_00942	PREDICTED: Musa acuminata subsp. malaccensis ABC transporter F fa
F2_1(paired_trimmed_pairs)_contig_2130	1..1448	69.268946	10.77255681	1749.2937	7.58543E-05	0.04177	1	XM_01094	PREDICTED: Elaeis guineensis basic 7S globulin (LOC105057778), mRN
F2_1(paired_trimmed_pairs)_contig_981	1..2403	52.11151	14.8931971	30429.8	0.00038752	0.0976	1	XR_0021	PREDICTED: Elaeis guineensis uncharacterized LOC105055937 (LOC
F2_1(paired_trimmed_pairs)_contig_4077	1..3034	91.44632	15.6115489	50066.19	0.000400825	0.0996	1	LR81252	Danio kyathit genome assembly, chromosome: 6

그림 50. 바이러스 감염과 무감염 시료에서 log2 fold change 값에 차이를 보이는 상위 contig.

조사한 프라이머 조합 모두 바이러스 감염 유무와 PCR 산물 증폭량이 양 또는 음의 상관관계 중 하나로 완전히 일치하는 경우는 없었다(그림 51).

Target	Sample	Cq	End RFU
Q043	S1-3	31.08	8581
Q043	S45-1	37.15	2128
Q043	S71-1	26.07	10644
Q043	모닝글로리2	28.12	9590
Q043	핑크지아1	34.83	4782
Q043	F31	29.08	9100

Target	Sample	Cq	End RFU
Q044	S1-3	31.92	7504
Q044	S45-1	38.03	1317
Q044	S71-1	32.88	6998
Q044	모닝글로리2	35.7	3337
Q044	핑크지아1	35.31	3737
Q044	F31	36.22	2834

Target	Sample	Cq	End RFU
Q045	S1-3	32.39	6794
Q045	S45-1		1.16
Q045	S71-1	34.86	4448
Q045	모닝글로리2	35.69	3403
Q045	핑크지아1	35.99	3211
Q045	F31	38.89	953

그림 51. log2 fold change 값을 기준으로 선발한 contig 유래 프라이머를 이용한 시료별 발현량 차이를 비교.

세 번째는 read count 값과 log2 fold change 값 이외에 총 contig 발현량(TPM)을 기준으로 선발한 후보 contig의 qRT-PCR 산물 증폭량은 바이러스 감염 유무와 상관관계를 보이지 않았다. 이는 발현량 분석에 이용되는 reference 서열 선택이나 Bonferoni 수치 등 발현량 분석 조건 오류와 qRT-PCR을 적용한 시료의 표현형 오류에 기인했을 가능성이 있을 것으로 판단하였다. 특히 분석에 사용한 시료는 동일개체라 할지라도 6~7개월의 재배기간 동안 바이러스 감염 상태가 다를 수 있다. 예로써 S1-3의 경우 종자에서 파종 후 1달 경에 채취한 앞 시료는 바이러스 무감염이었으나, 6~7개월 재배하는 동안 바이러스에 오염되었을 가능성도 있고, 만약 재배기간 동안 바이러스에 오염되었다면 S1-3의 바이러스 감염 표현형에 오류가 생길 수 있을 것이다. 이러한 가능성을 확인하고자 하면(夏眠) 후 수확한 FreMV 건전 구근 후보(S01_02, S08_01, S08_02, S45_01, S45_02, S71_01, S71_02, 솔레일_1)와 감염 후보(F02, F15, F19, 골드문_4, 레드썬_1, 레드썬_2, 레드썬_3, 블루오션_1, 블루오션_2) 구근을 재식하고 화분 위로 싹이 난 후 7일과 23일 앞을 채취해 RNA를 분리하였다.

바이러스 검정은 FreMV는 P941/942(374bp), BYMV는 P973/974(368bp), FreSV는 P923/924(1305bp) 프라이머로 검정하였다. RT-PCR을 위한 1차 반응액 조성은 총 RNA 2 μ l, 프라이머 포워드 및 리버스 프라이머(10 pmol, 표3) 각 0.5 μ l, 증류수 7 μ l 및 BCS 2 \times RT-PCR mix 10 μ l이며, RT-PCR 조건은 48 $^{\circ}$ C에서 5분간 RT, 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 변성(denaturation)한 다음, 하기 사이클 [95 $^{\circ}$ C에서 20초간 재변성 후 45(FreSV), 60(FreMV와 BYMV) $^{\circ}$ C~70 $^{\circ}$ C에서 20초간 어닐링(Annealing), 72 $^{\circ}$ C에서 45(FreSV)초 또는 30(FreMV와 BYMV)초간 확장(extension)]을 35회 반복하였다. 그 후, double PCR 반응에서 반응액 조성은 1차 RT-PCR 증폭 산물을 증류수로 50배 희석한 용액 2 μ l, 동일 프라이머(10 pmol) 각 1 μ l, 증류수 6 μ l 및 BCS 2 \times PCR mix 10 μ l이며, PCR 조건은 RT를 제외한 나머지는 동일하게 하였다. 1차 RT-PCR 검정에서 FreMV는 싹후 23일에 건전개체 후보 일부에서 증폭산물이 약하게 확인되었고, 이를 재증폭했을 때 예상 크기의 PCR 산물이 증폭됨을 확인하였다. BYMV의 경우 싹후 23일에 건전개체 후보 일부에서 증폭산물이 약하게 확인되었고, 이를 재증폭했을 때 예상 크기의 PCR 산물이 다수 개체에서 증폭됨을 확인하였다. 또한 감염 후보 식물체에서는 증폭산물이 확인되지 않은 개체도 있었다. 증폭된 산물의 염기서열을 분석한 결과 모두 BYMV 바이러스 유전체 서열로 확인되었다(자료 미제출). FreSV의 경우 건전

과 감염 후보 개체 모두에서 비슷한 결과를 보였다(그림 52).

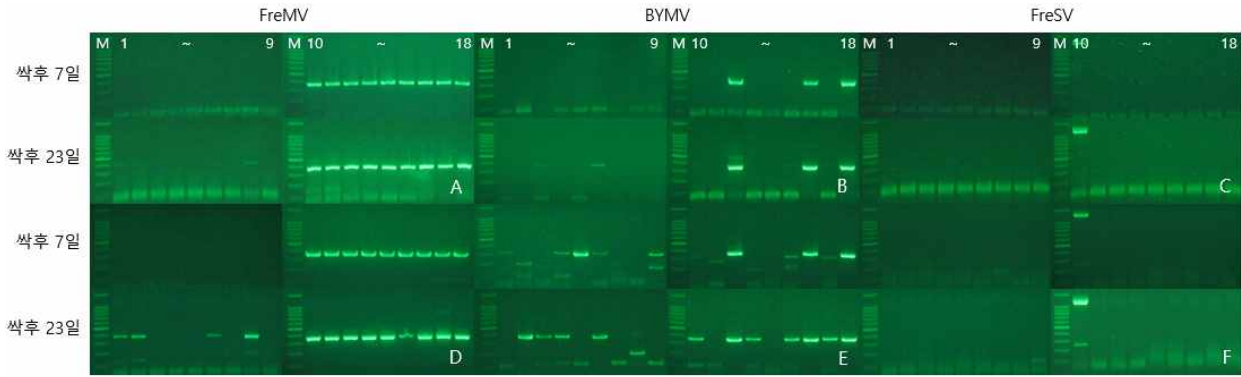


그림 52. 건전과 감염 후보 개체의 바이러스 검정. 건전후보(1~9), FreMV 감염 후보(10~18). 1차 RT-PCR 결과(A, B, C), double PCR(D, E, F).

이상의 결과를 기초로 식물체 재배과정 중 바이러스에 의한 오염이 생길 가능성이 있어, 시료가 바뀐(BYMV 일부 개체는 모구가 죽어 자구로 대체함) 경우도 표현형에 영향을 줄 수 있을 것으로 판단되어, 향후 실험에서는 시료를 분양받아 냉동고에 보관했던 잎을 사용하였다.

발현량 분석의 경우, fold change(FC) 값의 발현 변화량에 바이러스 서열이 간섭한다고 가정하고, de novo assembly 서열에서 바이러스 연관 contig를 제거하고 이를 참조서열로 하여 RNA-seq 분석을 다시 수행하였다. 바이러스 서열 제거는 3차에 걸쳐 수행하였는데, 이는 blast 검색 수행시 시스템 사양에 따라 많은 시간이 소요(수십시간) 되기 때문에 분석 시간을 줄이고자 가능성이 FC값을 사용하여 $\log_2FC \geq 10$ 을 기준으로 필터링하고 이를 blast 검색을 하였음. 바이러스 연관 서열로 판별된 서열을 3차에 걸쳐 제거하고 이후 분석을 실시하였는데 시료별 발현량 차이를 비교하여 유의성이 높은 3종류의 contig를 선별할 수 있었다(그림 53).

Name	Chromosome	Region	grou p mean	Log ₂ f old ch ange	Fold c hange	P-valu e	FDR p-value	Bonfer roni	blastn	blastx
F2_1_(paired_trimmed_pairs)_contig_338	F2_1_(paired_trimmed_pairs)_contig_338	1..731	834.2	13.095	8,748	4E-08	0.0008	0.009	Musa AAAB Group catalase 2 gene, partial cds	Catalase mono-functional hem-containing protein [Dioscorea alata]
F2_1_(paired_trimmed_pairs)_contig_108103	F2_1_(paired_trimmed_pairs)_contig_108103	1..342	3282.9	11.839	3,663	1E-06	0.0048	0.2315	Lotus japonicus B-129 DNA, chromosome 6, complete sequence	PREDICTED: receptor-like protein kinase HSL1 [Musa acuminata subsp. malaccensis] >emb[CAG1846333.1] unnamed protein product [Musa acuminata subsp. malaccensis]
F2_1_(paired_trimmed_pairs)_contig_11892	F2_1_(paired_trimmed_pairs)_contig_11892	1..671	248.51	10.584	1,535	3E-06	0.0093	0.6476	Crocus sativus NAC-like protein 11 (NAC11) mRNA, complete cds	NAC-like protein 11 [Crocus sativus]

그림 53. 바이러스 감염과 무감염 시료에서 발현량이 차이를 보이는 상위 contig.

특히 contig-338은 다른 분석에서도 지속적으로 관찰되어 이 서열을 기초로 프라이머 4종을 제작하였다. 이들 가운데 Q049 조합의 RFU 값이 FreMV 감염 유무와 밀접하게 관련되어 있었고(그림 54), 이는 FreMV 감염 특이 표지자로 활용할 수 있을 것으로 판단되었다.

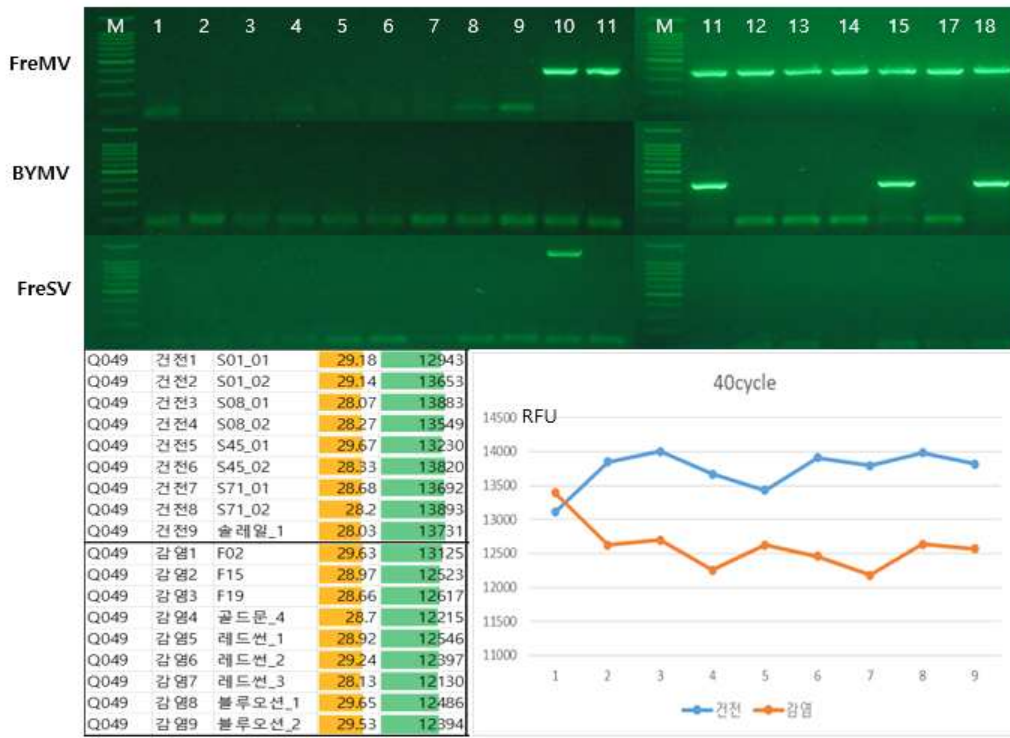


그림 54. 바이러스 유무와 Q49 프라이머 산물의 발현량과의 연관성. 프리지아 시료 (1~18) 및 FreMV 무감염(건전 1~9)과 감염(10~18) 시료.

FreMV 감염 특이 표지자 분석에 영향을 미칠 수 있는 요인 가운데 하나인 qRT-PCR을 위한 프라이머의 annealing 온도를 조사한 결과 적정 온도 범위는 55.7~60도였다(그림 55).

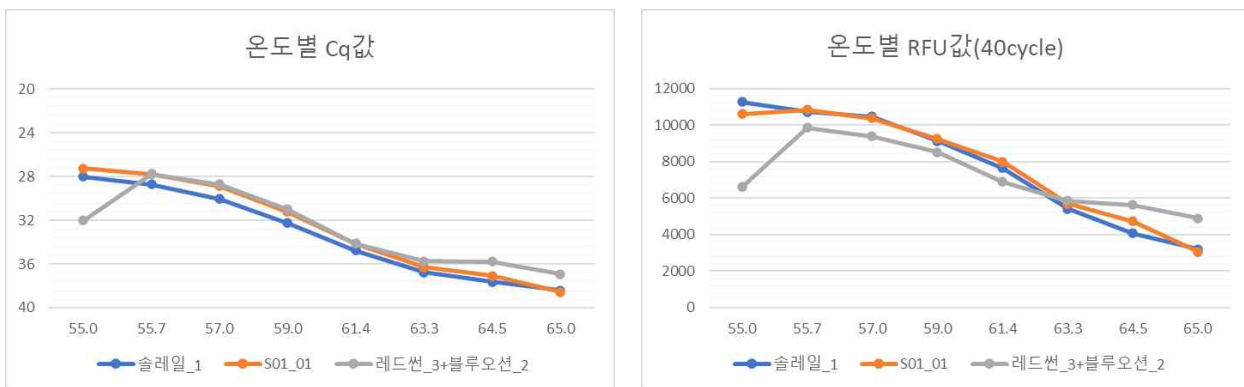


그림 55. FreMV 감염 특이 표지자의 qRT-PCR annealing 온도에 따른 증폭량 변화.

이상의 결과를 기초로 BYMV 특이 표지자용 후보 contig 분석을 수행하였는데, 분석 조건은 FreMV와 동일한 조건으로 수행하였다. BYMV N vs P 로 DE 분석후 발현량이 차이가 나는 45개 contig를 선발하였으며, 이들 가운데 상위 4개 contig 서열을 기반으로 각 2개씩의 프라이머(Q52~59)를 디자인하였다(그림 56).

Name	blast ID	description	HSP
F2_1_(paired_trimmed_pairs)_contig_207164	HM590	Freesia hybrid cultivar clone FH0001 UDP-glucose: anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase mRNA	615
F2_1_(paired_trimmed_pairs)_contig_76769	XM_02G PREDICTED:	Asparagus officinalis oil body-associated protein 1A-like (LOC109824589), mRNA	496
F2_1_(paired_trimmed_pairs)_contig_207492	MG816	Crocus sativus leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) mRNA, partial cds	484
F2_1_(paired_trimmed_pairs)_contig_202095	XM_02G PREDICTED:	Asparagus officinalis bidirectional sugar transporter SWEET13-like (LOC109837341)	402

그림 56. 바이러스 서열 제거 후 바이러스 감염과 무감염 시료에서 log2 fold change 값에 차이를 보이는 상위 contig.

이들 가운데 Q054와 Q056 프라이머 증폭산물은 바이러스 감염과 연관이 있는 것으로 확인되었다(그림 57).

Target	Sample	Cq	End RFU	Target	Sample	Cq	End RFU
Q054	S08_3	37.16	2242	Q056	S08_3	-0.178	
Q054	S45_1	37.46	1941	Q056	S45_1	96	
Q054	실버비치_1	32.2	6676	Q056	실버비치_1	39.15	868
Q054	아빌라_1	32.95	6821	Q056	아빌라_1	39.11	884
Q055	S08_3	30.36	7588	Q057	S08_3	35.56	3039
Q055	S45_1	30.43	6999	Q057	S45_1	37.24	1854
Q055	실버비치_1	31.11	6895	Q057	실버비치_1	36.07	2669
Q055	아빌라_1	29.7	8183	Q057	아빌라_1	35.35	3361

F2_1_(paired_trimmed_pairs)_contig_202095 F2_1_(paired_trimmed_pairs)_contig_207164

그림 57. 바이러스 서열 제거 후 log2 fold change 값을 기준으로 선발한 contig와 유래 프라이머를 이용한 시료별 발현량 차이를 비교.

실제 연관성이 어느 정도 높은지를 확인하고자 건전과 감염 후보 시료에 적용한 결과 모두 표현형과 연관성이 없는 것으로 확인되었다(그림 58).

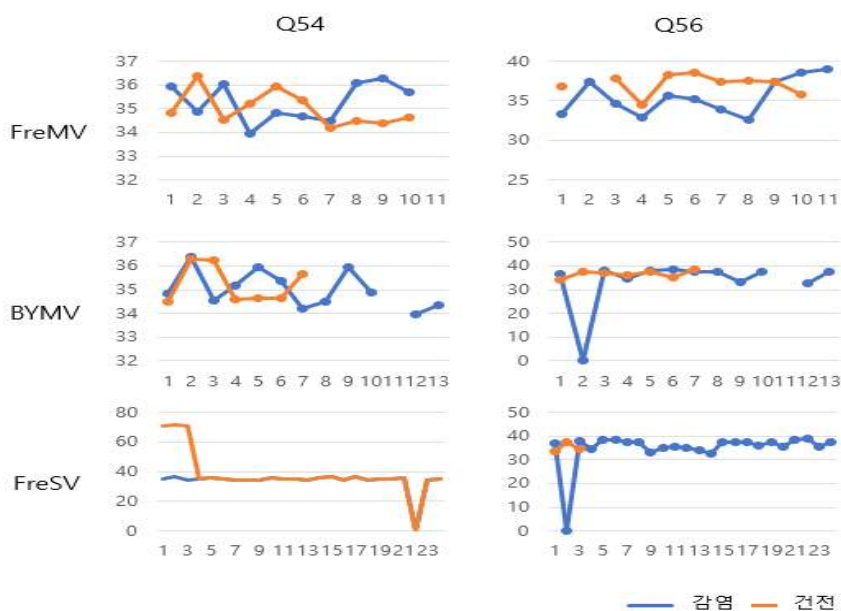
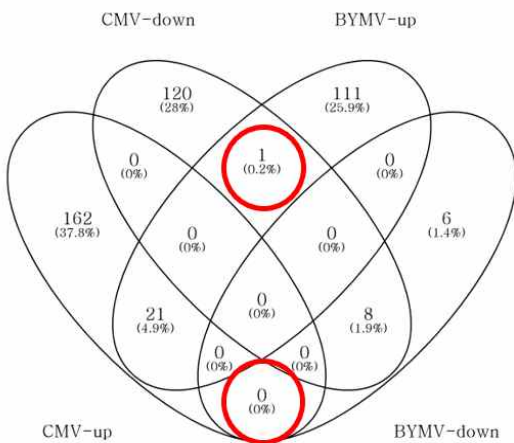


그림 58. Q54와 56 프라이머 산물의 발현량과 바이러스 유무 표현형 연관성 분석.

CMV과 BYMV 감염에 대한 추가적인 감염표지자를 선별하기 위하여 각 바이러스 감염시 바이러스 특이적으로 발현이 증가하거나 감소하는 유전자들을 각각 선별하였다. 선별결과 BYMV 감염시에는 발현이 증가하지만 CMV 감염시에는 발현이 억제되는 1개의 유전자를 선별할 수 있었다. 추가적인 표지유전자 선별을 위하여 CMV 감염시 발현이 증가하는 유전자 3개를 추가적으로 선별하였고 BYMV 감염시에만 특이적으로 강하게 발현하는 유전자 2개를 추가적으로 선별하였다. 각 바이러스에 특이적으로 반응하는 기주 유전자 3개에 대하여 Realtime RT-PCR을 통해 해당 유전자의 진위여부를 확인하였다(그림 59).



<Candidate markers for CMV>

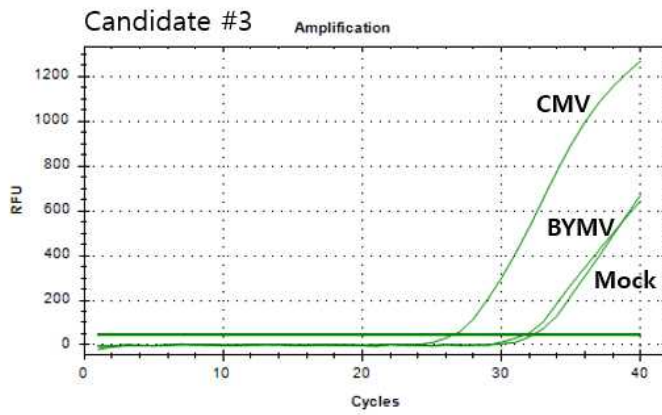
Gene	log2FC in CMV
TRINITY_DN1272_c0_g1_i1	3.266067
TRINITY_DN4688_c0_g1_i1	3.207604
TRINITY_DN1972_c0_g1_i16	2.793924

<Candidate markers for BYMV>

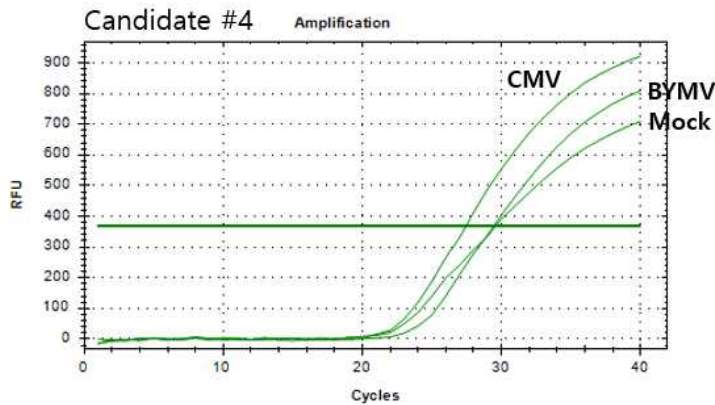
Gene	log2FC in BYMV
TRINITY_DN3553_c0_g4_i1	4.414763
TRINITY_DN5150_c0_g1_i1	4.003602
TRINITY_DN48904_c0_g1_i1	2.274724

그림 59. CMV와 BYMV 감염에 특이적으로 발현하는 표지 유전자 선별.

CMV 감염시에만 특이적으로 검출되는 CMV 감염 표지자를 확인하기 위하여 Realtime PCR을 통한 해당 유전자의 발현여부를 확인하였다. BIO-RAD사의 IQ SYBR supermix를 이용하여 total volume 10ul대상으로 random hexamer 기반으로 합성한 cDNA와 Forward primer, reverse primer를 각각 1ul씩 이용하였고 최종 40 cycles의 Realtime PCR을 수행하였다. 그림 X과 같이 바이러스가 감염되지 않는 Mock 샘플과 BYMV가 단독으로 감염된 칼라식물에서 각각 31.75와 32.3의 Cq값을 갖는 표지유전자 #3은 CMV 감염시 Mock과 BYMV 감염시료보다 상대적으로 낮은 Cq값(26.59)를 보였다. 또한 표지유전자 후보 #4도 Mock 시료와 BYMV 감염시료에서는 각각 29.54와 29.40의 Cq값을 나타내었지만 CMV가 감염되었을시에는 27.42의 Cq값을 나타내었다. 선별한 2개의 표지 유전자를 통해 Realtime PCR을 수행한 결과 해당 유전자의 발현은 CMV가 감염되었을 시 바이러스가 감염되지 않는 상태와 BYMV가 감염된 상태에서보다 빠른 발현양상을 보여주었고 해당 2개의 유전자 발현양 검정을 통해 CMV 감염에 대한 표지유전자로 활용이 가능하다는 결론에 도달하였다(그림 60).



Sample	Cq
Mock	31.75
CMV	26.59
BYMV	32.3



Sample	Cq
Mock	29.54
CMV	27.42
BYMV	29.40

그림 60. CMV 감염 특이 칼라 표지 유전자 검출을 위한 후보 표지 유전자 2종에 대한 Realtime PCR 결과.

BYMV 감염 표지유전자 발굴을 위하여 2개의 후보 표지유전자에 대한 Realtime PCR을 수행한 결과 후보유전자 #1의 경우에는 CMV 단독감염시에는 해당 유전자의 발현이 검출되지 않았고 BYMV 감염시에는 Mock 시료에서의 발현보다 그 발현값이 높게 나타났다. 후보유전자 #2는 Mock시료와 CMV 감염시에는 해당 유전자의 발현이 검출되었지만 BYMV 감염시에는 해당 유전자의 발현이 검정되지 않았다. Realtime PCR 결과를 통해 BYMV 표지유전자 #1를 이용시에는 BYMV 감염시 해당유전자의 높은 발현양을 통해 BYMV 표지유전자로의 활용이 가능하며 표지유전자 #2를 이용시에는 BYMV 감염시 해당유전자가 검출되지 않음을 이용하면 BYMV 감염에 특이적인 표지유전자로의 활용이 가능할 것으로 사료된다(그림 61).

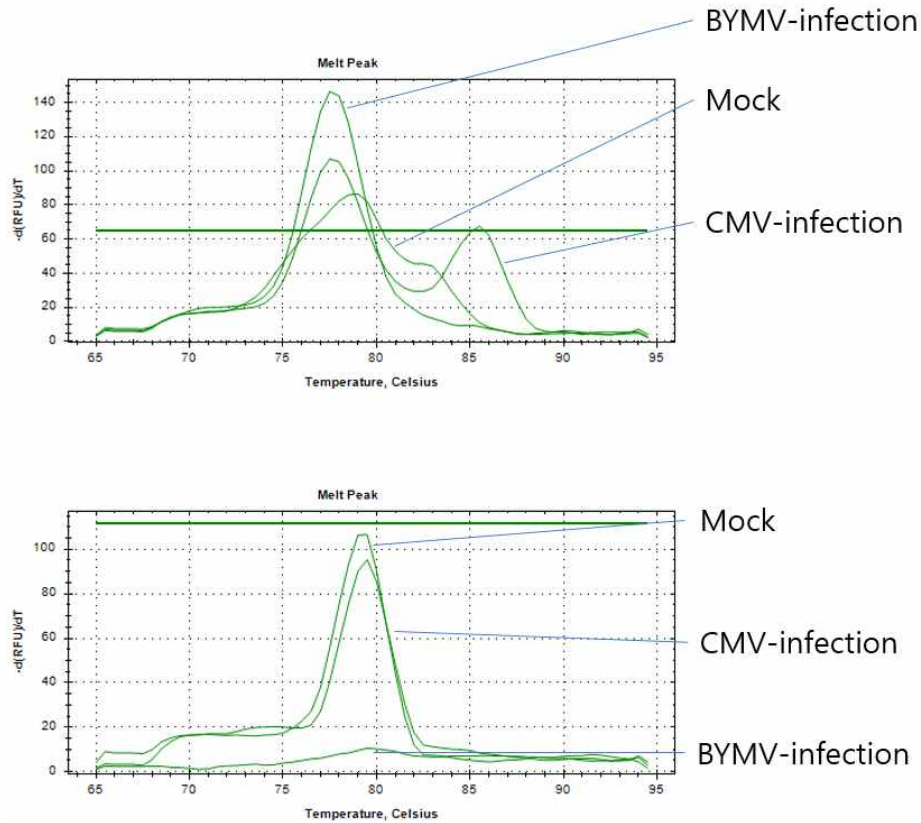


그림 61. BYMV 감염특이 칼라 표지 유전자 검출을 위한 후보 표지 유전자 2종에 대한 Realtime PCR 결과.

○ 바이러스 유전체 특이 primer와 바이오큐브를 이용한 진단 키트 시제품 개발

- 선발된 바이러스 유전체 특이 진단 프라이머를 활용한 진단키트 제품 개발

기존 보고된 바이러스 계통과 새로운 계통 모두 진단 가능한 진단프라이머를 활용한 제품과 본과제에서 연구된 계통을 구분할수 있는 프라이머를 활용한 진단 키트 제품을 개발하였다.

- 프리지아에 발생하는 BYMV 진단용 키트 개발

기존 해외에 보고된 진단용 프라이머보다 증폭력이 우수하고, 정확한 진단이 가능할 것으로 예상된다.

- 바이오큐브 결합패키지 개발

차년도 바이오큐브를 활용한 주형 최적화 실험을 완료하여, 바이오큐브와 바이러스 유전체 특이 프라이머 진단 키트가 결합된 패키지 제품을 개발할 예정이다(그림 62).

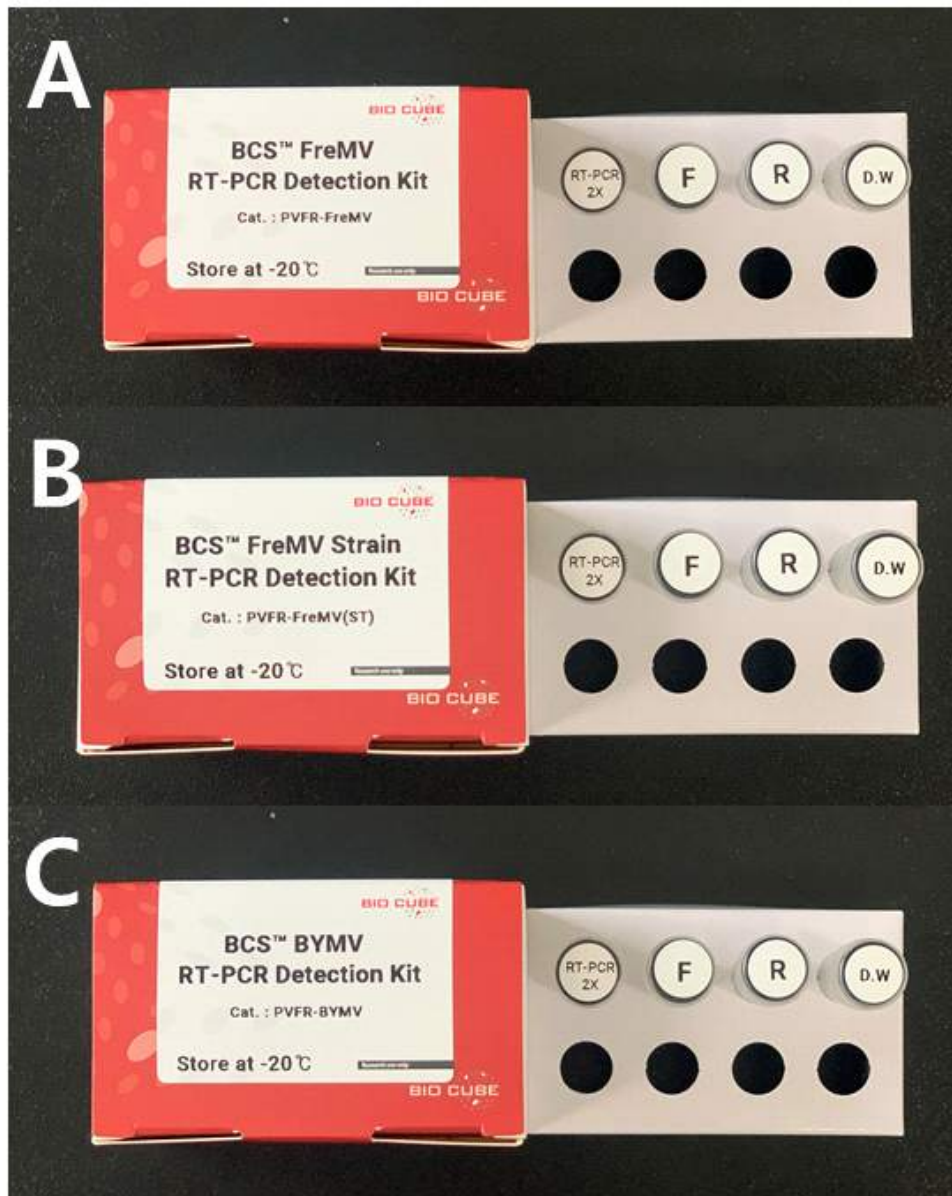


그림 62. 구근 바이러스 진단을 위한 진단용 및 계통판별용 키트
 (A: FreMV 진단용 키트, B: FreMV 계통판별용 키트, C: BYMV 진단용 키트)

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

- 구근류 시료를 이용한 감염 바이러스 검정 완료
 - 기존 보고에 의한 프리지아, 칼라, 글라디올러스 감염 바이러스 진단 완료
 - transcriptome 분석을 통한 프리지아, 칼라, 글라디올러스 virome 분석 완료

 - 바이러스 표지 유전자 선발을 위한 전사체 분석
 - 프리지아 대상 CMV 및 BYMV 감염에 따른 전사체 분석
 - 칼라 대상 CMV 및 BYMV 감염에 따른 전사체 분석
 - CMV 및 BYMV 감염에 따른 유전자 기능 분석 및 표지 유전자 발굴

 - 구근류 감염 바이러스 유전체 기반 진단 조건 확립
 - FreMV 전장 유전체 서열 분석 및 진단 조건 확립
 - BYMV 전장 유전체 서열 분석 및 진단 조건 확립
 - FreSV 전장 유전체 서열 분석 및 진단 조건 확립

 - 구근류 감염 바이러스 유전체 진단을 위한 진단 키트 시제품 개발
 - FreMV 진단용 키트 시제품 개발
 - FreMV 계통판별용 키트 시제품 개발
 - BYMV 진단용 키트 시제품 개발
-

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

본 연구과제를 통하여 도출된 결과를 활용하여 특허 등록 3건, 제품화 10건, 고용창출 3명, 생명자원등록 2건, 논문 3편 (SCI-2편, 비SCI-1편), 학술발표 3건, 매출액 13,515,000원의 정량적 연구개발성과가 발생하였다.

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명		연도	1단계 (2021~2022)	계	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	특허출원	목표(단계별)	4	4	15
		실적(누적)	3	3	
	생명자원	목표(단계별)	-	-	-
		실적(누적)	2	2	
	논문	목표(단계별)	2	2	-
		실적(누적)	3	3	
	논문평균IF	목표(단계별)	3	3	15
		실적(누적)	4.3355	4.3355	
	학술발표	목표(단계별)	2	2	5
		실적(누적)	3	3	
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	기술실시	목표(단계별)	2	2	10
		실적(누적)	-	-	
	기술료	목표(단계별)	10,000	10,000	5
		실적(누적)	-	-	
	사업화 (제품화)	목표(단계별)	10	10	15
		실적(누적)	10	10	
	사업화 (매출액)	목표(단계별)	50,000	50,000	15
		실적(누적)	13,500	13,500	
	사업화 (고용창출)	목표(단계별)	1	1	20
		실적(누적)	3	3	
계	목표(단계별)			100	
	실적(누적)				

- * 1) 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[에스시아이 Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신물질 등을 말하며, 논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.
- * 2) 연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(투자실적, 제품화, 매출액, 수출액, 고용창출, 고용효과, 투자유치), 비용 절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도), 교육지도, 인력양성(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 실제 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다 (연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

< 연구개발성과 성능지표(예시) >

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								
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	Complete genome sequences of three isolates of Bean yellow mosaic virus identified from freesia (Freesia refracta Klatt.)	미생물학회지	최**	58(3)	대한민국	한국미생물학회	비SCIE	2022-04-23	2383-9902	100
2	First report of milk vetch dwarf virus infecting Capsicum annuum L. in Korea	Journal of Plant Pathology	최**	104:1573	이탈리아	Springer	SCIE	2022-08-15	2239-7264	100
3	Evolution and Phylogeny of Soybean Mosaic Virus Based on 143 Complete Genomes	International Journal of Molecular Sciences	최**	24(22)	스위스	MDPI	SCI	2022-12-20	1422-0067	100

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2021 korean society of plant pathology online fall international conference	신**	2021-11-10	온라인발표	대한민국
2	한국육종학회 공동학술발표회	신**	2022-06-30	제주	대한민국
3	The KSPP 60th annual meeting & fall international conference	최**	2022-10-18	순천대학교	대한민국

기술 요약 정보

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

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	BYMV-Pinksia-1	CV220915-1	국립농업과학원	2022
2	BYMV-Pinksia-2	CV220915-2	국립농업과학원	2022

[기술적 성과]

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

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	프리지아모자이크바이러스 검출용 프라이머 세트 및 이의 용도	한국	주식회사 바이오큐브시스템	2021.11.25	10-2021-016171				100	X	
2	프리지아 특이적 공황화모자이크바이러스 검출용 프라이머 세트 및 이의 용도	한국	주식회사 바이오큐브시스템	2022.11.03	10-2022-0145300				100	X	
3	프리지아모자이크바이러스 검출용 네스티드 PCR프라이머 세트 및 이의 용도	한국	주식회사 바이오큐브시스템	2022.11.30	10-2022-0163833				100	X	

○ 지식재산권 활용 유형

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

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

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

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

표준화

○ 국내표준

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

- * 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제표준

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

- * 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

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

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

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

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	자기실시	신제품개발	국내	프리지아 진단키트 제품화	프리지아 진단키트 및 패키지	주식회사 바이오큐브시스템	13,500		2021,2022	

* 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)		
FreMV, BYMV 진단키트	2021	3,795		3,795	
FreMV, BYMV 진단키트	2022	9,720		9,720	
합계		13,515		13,515	

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

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

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2021년	2022년	
1		주식회사 바이오큐브시스템	2	1	3
합계			2	1	3

고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	1
		생산인력	1
	개발 후	연구인력	3
		생산인력	1

비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

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

산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

기술 무역

(단위: 천원)

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

[사회적 성과]

법령 반영

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

정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

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

전문 연구 인력 양성

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

산업 기술 인력 양성

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

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일

포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)
바이오큐브 시스템	PCR기기	PCR TAdvance d (Twin 48/48g)2e a	X	X	X	2021.11.22	20,000	바이오큐브시 스템

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

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

해당없음

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

과제 수행중 도출한 결과를 바탕으로 칼라에 감염되어 있는 Bean yellow mosaic virus의 전장 서열을 분석하였고 이를 이용하여 국립농업과학원에 생명자원(생명정보)를 2건 등록 및 기탁하였다.

성과유형	첨부자료 예시
연구논문	논문 사본(저자, 초록, 사사표기)을 확인할 수 있는 부분 포함, 연구개발과제별 중복 첨부 불가)
지식재산권	산업재산권 등록증(또는 출원서) 사본(발명인, 발명의 명칭, 연구개발과제 출처 포함)
제품개발(시제품)	제품개발사진 등 시제품 개발 관련 증빙자료
기술이전	기술이전 계약서, 기술실시 계약서, 기술료 입금 내역서 등
사업화 (상품출시, 공정개발)	사업화된 제품사진, 매출액 증빙서류(세금계산서, 납품계약서 등 매출 확인가능 내부 회계자료) 등
품목허가	미국 식품의약국(FDA) / 식품의약품안전처(MFDS) 허가서
임상시험실시	임상시험계획(IND) 승인서

<참고 2> 국가연구개발혁신법 시행령 제33조제4항 및 별표 4에 따른 연구개발성과의 등록·기탁 대상과 범위

구분	대상	등록 및 기탁 범위
등록	논문	국내외 학술단체에서 발간하는 학술(대회)지에 수록된 학술 논문(전자원문 포함)
	특허	국내외에 출원 또는 등록된 특허정보
	보고서원문	연구개발 연차보고서, 단계보고서 및 최종보고서의 원문
	연구시설·장비	국가연구개발사업을 통하여 취득한 3천만 원 이상(부가가치세, 부대비용 포함) 연구시설·장비 또는 공동활용이 가능한 모든 연구시설·장비
	기술요약정보	연차보고, 단계보고 및 최종보고가 완료된 연구개발성과의 기술을 요약한 정보
	생명자원 중 생명정보	서열·발현정보 등 유전체정보, 서열·구조·상호작용 등 단백질체정보, 유전자(DNA)칩·단백질칩 등 발현체 정보 및 그 밖의 생명정보
	소프트웨어	창작된 소프트웨어 및 등록에 필요한 관련 정보
	표준	「국가표준기본법」 제3조에 따른 국가표준, 국제표준으로 채택된 공식 표준정보[소관 기술위원회를 포함한 공식 국제표준화기구(ISO, IEC, ITU)가 공인한 단체 또는 사실표준화기구에서 채택한 표준정보를 포함한다]
기탁	생명자원 중 생물자원	세균, 곰팡이, 바이러스 등 미생물자원, 인간 또는 동물의 세포·수정란 등 동물자원, 식물세포·종자 등 식물자원, DNA, RNA, 플라스미드 등 유전체자원 및 그 밖의 생물자원
	화합물	합성 또는 천연물에서 추출한 유기화합물 및 관련 정보
	신품종	생물자원 중 국내외에 출원 또는 등록된 농업용 신품종 및 관련 정보

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 바이러스 무감염 구근 기반 Cucumber mosaic virus(CMV), Bean yellow mosaic virus(BYMV) 감염 기주 전사체 분석 기주 전사체 분석	○ 바이러스 무감염 프리지아, 칼라 구근대상 CMV, BYMV 감염조건 확립 및 전사체 분석을 통한 유전자 기능 분석 완료	○ 100 %
○ 프리지아, 글라디올러스, 칼라 품종별 바이러스 감염 공통 발현 및 특이 전사체 선별	○ 해당 구근의 CMV와 BYMV 감염에 따른 공통 발현 유전자 및 각 바이러스 특이적 발현 유전자 발굴	○ 100 %
○ 공통 또는 특이 발현 전사체를 이용한 진단 조건 최적화	○ 각 바이러스 감염에 따라 특이적으로 발현하는 후보유전자(각 3개)를 이용한 Realtime RT-PCR 수행 및 해당 유전자의 진단 조건 최적화 수행	○ 100 %
○ 전사체 분석을 통한 프리지아, 글라디올러스, 칼라 품종별 바이러스 감염 양상 분석	○ 전사체 분석을 통한 프리지아, 칼라, 글라디올러스 품종별 감염 바이러스 진단 완료 및 유전자 전장 서열 정보 확보	○ 100 %
○ 바이러스 유전체 특이 진단 조건 확립 및 바이러스 무감염 시료 선별	○ 구근 감염 바이러스 전장 유전체 서열 기반 진단 프라이머 제작 및 진단을 위한 조건 확립	○ 100 %
○ 바이러스 유전체 특이 primer와 바이오큐브를 이용한 진단 키트 시제품 개발	○ 바이오큐브 결합을 통한 바이러스 진단용 각 바이러스 특이적 primer 기반 진단 키트 시제품 개발 완료	○ 100 %
○ 진단조건 최적화 및 진단 키트 완제품 개발 (10종)	○ 감염 바이러스 계통판별용 키트 완제품 개발 완료	○ 100 %

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

본 과제를 수행하는 동안 발생한 정량성과 중 계획하였던 특허출원 4건에 대한 정량성과중 3건에 대하여 특허출원을 진행하였다. 또한 기술이전 목표인 2건, 기술료 10,000,000원에 대한 성과는 달성하지 못하였다. 당초 계획하였던 연구내용중 국내육성중인 구근류중 글라디올러스에 대한 시료 확보에 대한 어려움이 발생하였고 이에 따른 충분한 연구결과가 도출되지 않아 1건의 특허출원에 대한 목표를 달성하지 못하였다.

2) 자체 보완활동

구근류 바이러스 진단을 위한 표지 유전자를 활용한 진단 키트에 대한 완제품을 제작하여 바이러스 계놈을 타겟으로 수행하는 바이러스 특이적인 진단 키트와의 교차 비교를 통하여 표지유전자 활용 진단키트의 정확성을 확보하여 이를 활용한 현장 적용형 바이러스 진단을 수행하고자 한다. 표지유전자 기반의 진단 키트를 이용하여 감염 바이러스를 진단할 시에는 바이러스가 감염되어 있는 다양한 시료, 바이러스의 감염 시간에 따른 바이러스 증식량과의 상호비교를 통하여 표지유전자의 발현량 상관관계를 도출하여 바이러스 진단에 대한 기준을 확립하여 각 바이러스 및 시료에 대한 진단 SOP를 확립하고자 한다. 또한 당초 계획을 달성하지 못한 정량성과를 달성하기 위하여 과제 종료 후 1년차 (2023년)에 특허출원 1건을 준비중이며 2건의 기술 실시(이전)를 준비중에 있다. 따라서 과제종료 1차년도에 목표미달되었던 정량성과는 달성할 것으로 예상된다.

3) 연구개발 과정의 성실성

본 과제의 연구개발과정동안 국내육성중인 구근류 (프리지아, 칼라, 글라디올러스)에 대한 바이러스 감염 여부를 전사체 분석 및 전통적인 바이러스 진단 방법을 이용하여 감염된 바이러스를 발굴하였고 각 바이러스 전장서열을 기반으로 바이러스 진단 방법을 최적화 하였다. 또한 바이러스 무감염 구근류 시료를 이용하여 CMV와 BYMV를 각각 접종한 뒤 확보한 시료를 이용하여 전사체 분석을 수행하였고 각 바이러스 감염에 따라 발현양이 변화하는 기주유전자를 선별하여 그들의 기능을 분석하고 해당 기주유전자를 통한 바이러스 표지유전자 적용 여부를 Realtime RT-PCR로 수행하여 최종적으로 CMV와 BYMV 감염을 진단할 수 있는 표지유전자로 선별하였다. 이러한 연구결과를 바탕으로 기존에 개발된 바이오큐브를 이용한 바이러스 진단용 진단 키트 시제품을 제작하였고 각 바이러스별 계통판별용 키트 완제품을 개발하여 향후 프리지아, 칼라, 글라디올러스에 감염되어 있는 바이러스에 대하여 빠르고 정확한 바이러스 진단이 가능하게 하였다.

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 전사체를 식물바이러스 감염표지자로 활용할 수 있는 가능성을 제시, 표지자 기반 진단기술 체계 구축에 기여.
- 바이오큐브로 RNA주형 정량기술을 확보, 전사체 기반 POC 진단체계 확립에 기여.
- QC 제어가 가능하도록 바이러스 감염표지자와 유전체 기반 진단키트 개발함으로써 진단 결과의 신뢰성 확보에 기여.
- 바이러스 감염시 공통으로 발현되는 표지자를 활용한 진단법은 Multiplex PCR이나 동일 속(genus)내 바이러스를 동시에 진단하는 universal primer를 이용한 PCR법이 갖는 장점을 상회하는 기술이 될 것으로 예측됨.
- 전사체 분석을 통해 바이러스 감염시 공통 또는 특이적으로 발현되는 기주 인자에 대한 정보를 제공함으로써 다양한 식물과 바이러스에 대한 효율적인 진단법 개발에 적극 활용이 가능함.
- 전사체비교 분석에서 나오는 표지자 중에는 바이러스가 감염이나 복제과정에서 필요로 하는 기주인자에 대한 정보는 Cas9 등을 활용한 유전자가위교정기술의 재료로 활용되어 새로운 형태의 바이러스병 저항성작물 획득에 기여할 것으로 기대.
- 표지자를 활용한 진단법은 식물바이러스 검정 절차와 비용을 획기적으로 단축시킬 수 있어 시간이나 경제적 이익을 가져올 것임.
- 새로운 형태의 진단 제품은 식물바이러스 진단시장의 잠재력 증가와 부가가치 촉진으로 새로운 수익모델 창출 기대.
- 식물에서의 바이러스 감염표지자 발굴은 새로운 시도로 진단기술과 관련된 지식재산권 획득이 가능하며, 이를 통한 국내개발제품의 대외 경쟁력 강화에 기여할 것으로 기대됨.
- 표지자를 이용한 바이러스 사전진단과 유전체를 이용한 확진용 진단키트는 국내육성 구근 3인방의 바이러스 무감염체계구축에 활용될 수 있고, 이를 통해 구근류 재배와 수출을 통한 농가의 신소득 창출에 기여할 것으로 기대됨.

* 기술기여도 산정 가이드라인 참고

- 혁신법 시행('21.1.) 이후 협약과제 또는 혁신법 시행 이전 협약과제 중 경상기술료 납부 희망 과제

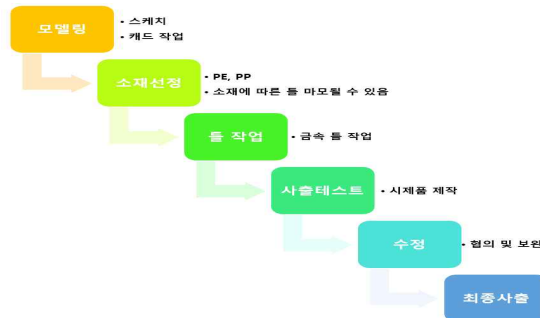
단, 혁신법 시행('21.1.) 이전 협약과제 중 정액기술료 납부를 희망하는 경우 기술기여도 작성 불필요

(단위 : 백만원, %)

총괄과제명	세부과제명	기관명	유형	총 연구개발비 (A)	정부지원 연구개발비 (B)	정부지원 연구개발비 비율 (C=B/A)	성과 유형	기술기여도	
								산정 근거	비율
국내육성 프리지아, 글라디올러스, 칼라의 바이러스 감염표지자와 유전체 검출용 RT-PCR 키트 개발	바이오큐브기반 바이러스 감염표지자와 유전체 검출키트 개발	주식회사 바이오큐브시스템	중소기업 (영리)	394	295	0.7487	신규제품 개발	1-①	74.87
계				잘못된 계산식	잘못된 계산식	-	-	-	-

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- FreMV double PCR 제품군 시제품 개발, nested PCR 제품군과 함께 정밀 진단에 활용
- 진단키트와 감염표시자를 이용한 프리지아 육묘 분석서비스 기반 마련 계획
- 프리지아 구근류 바이러스 진단/분석 서비스 체계 구축
- 사업화 전략 : 타겟 시장 및 개발제품 도출(2023년 7월)
 - direct PCR용 buffer 등 현장진단용 핵심 준비 제품군 현황 분석
 - 양산형 바이오큐브 기반 제품군 유형 및 생산비 절감 및 적정 시간 설정 등
- 제품 상용화(2023년 8월 ~ 2024년 8월)
 - 시제품 제작 및 자체 성능테스트를 완료 후 얼리 어답터를 활용한 제품 개선
 - * 농촌진흥청, 실용화재단 등 국가연구기관과 바이러스 무독묘 협력체계 구축
 - 포장지 디자인, 제품 기능 설명서 제조 등 제품의 차별성을 부각시킬 수 있는 방법 모색
 - 제품 생산 및 마케팅 예산 설정 등 시장 확대를 위한 사전 준비 완료
- 시장 확대 단계(2024년~2025년)
 - 기존 대리점과 해당 판매채널을 보유한 위탁판매 업체를 선정 추진
 - 자체 쇼핑몰, 전문 통신 판매자 업자와의 협업 등을 통해 온라인 마케팅 채널 확보
 - *유튜브를 통해 양산형 바이오큐브 활용 바이러스 및 식물병 진단 소개
 - 제품 수출에 필요한 사업모델 수립
 - * 제품 양산체계구축, 제품 품질검사 표준화, 제품 제조 협력업체 선정, 국내외 제품 대리점 탐색 및 유통체계 재정비, 해외시장 개척에 필요한 파트너 선정, 세계제약 바이오전시회 등 참석을 통해 제품 홍보 및 정보 수집 등 추진
 - 양산형 바이오큐브 생을 위해 아래 그림과 같은 과정으로 반복수행. 차수별 시제품 성능을 평가하고 개선과정을 거쳐 최종안이 마련.



제품생산 흐름도.

- 바이오큐브 특히 출원국을 중심으로 진출 예정이며, 중국시장을 우선적으로 공략하기 위해 현재 협의중인 투자자를 중심으로 투자설명회 개최 추진
- 아울러 식물병진단 업체인 독일의 BioCat GmbH와 LOEWE, 캐나다의 EPHYRA biosciences Inc.에 핵심 고흡수 바이오큐브 등 진단관련 제품 수출 협의 추진(AT 센터 수출 지원 수혜 방안 병행)

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내				
		2023	2024	2025	2026	2027
국외논문	SCIE	1				
	비SCIE					
국내논문	SCIE					
	비SCIE					
특허출원	국내	1				
	국외					
특허등록	국내					
	국외					
인력양성	학사					
	석사					
	박사					
사업화	시제품개발	1				
	상품출시	1	1			
	기술이전					
	공정개발					
	매출액(단위 : 천원)	15,000	30,000	50,000	50,000	50,000
	기술료(단위 : 천원)	562.5	1,125	1,875	1,875	1,875
비밀상시험 실시						
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상				
		2상				
		3상				
	의료기기					
진료지침개발						
신의료기술개발						
성과홍보						
포상 및 수상실적						
정성적 성과 주요 내용						

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서 2) 연구성과 활용계획서

[뒷면지]

주 의
1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술연구개발 사업 국내육성 프리지아, 글라디올러스, 칼라의 바이러스 감염표시자와 유전체 검출용 RT-PCR 키트 개발연구개발과제 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부(농림식품기술기획평가원전문기관)에서 시행한 작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술연구개발사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		121055-2	
사업구분	작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	진단기술 산업화				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	국내육성 프리지아, 글라디올러스, 칼라의 바이러스 감염표시자와 유전체 검출용 RT-PCR 키트 개발			과제유형	기초
연구개발기관	서울대학교산학협력단			연구책임자	최**
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2021.04.01.-20 21.12.31	225,000	42,000	267,000
	2차년도	2022.01.01.-20 22.12.31	300,000	42,600	342,600
	계	2021.04.01.-20 22.12.31	525,000	84,600	609,600
참여기업	(주) 바이오큐브시스템				
상대국			상대국연구개발기관		

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2023. 2. 6

3. 평가자(연구책임자) : 최**

소속	직위	성명
서울대학교	책임연구원	최**

4. 평가자(연구책임자) 확인 : 최**

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
----	--

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수

본 연구과제를 통해서 국내육성중인 구근류에 감염되어 있는 바이러스를 전사체분석 방법을 통하여 virome 수준 및 감염바이러스를 진단하였다. 분석 결과를 통해 확보한 바이러스 전장 서열 기반으로 바이러스 계통판별 시스템을 구축하고 활용을 위한 시제품 개발도 완료하였다. 또한 각 바이러스별 감염을 진단하기 위한 표지유전자를 선별하여 해당 유전자의 진위여부를 확인함으로써 이를 활용한 새로운 바이러스 진단방법의 개발이 기대된다.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

기존에 보고된 국내 구근류 감염 바이러스외에 전사체 분석 방법을 통해 새로운 바이러스 감염을 확인하였으며 이들의 전장 유전체 서열을 확보함으로써 향후 발생하는 바이러스 병에 대한 진단 정보를 구축하였고 진단 방법 최적화 및 키트 개발을 통하여 현장에서 신속하고 정확한 바이러스 진단이 가능할 것으로 사료된다.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

전사체 분석을 통해 확보한 구근류 감염 바이러스 염기서열 정보를 통하여 감염된 바이러스의 계통학적 분석을 통한 바이러스 계통 분석 및 바이러스 변이 분석에 대한 연구가 가능하며 표지유전자 발굴 기술을 이용하여 타 작물의 표지유전자 개발에 응용이 가능하다. 또한 개발된 바이러스 진단 키트 및 바이러스 계통판별용 키트를 이용하여 국내발생중인 바이러스에 대한 분석 결과를 통해 각 바이러스에 최적화 된 대응방법 수립에 기초 연구자료로 활용이 가능하다.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

기존에 수립하였던 과제 목표인 구근류 감염 바이러스 진단을 위하여 구근류 시료를 이용한 선행연구 바이러스 진단 및 전사체 분석을 통한 virome 수준의 바이러스 진단을 수행하였다. 또한 감염되어 있는 바이러스의 진단을 위한 바이러스 진단 프로토콜 최적화 및 키트 개발을 완료하였다. 표지유전자 개발을 위하여 바이러스 무병묘 프리지아, 칼라를 확보하여 해당 구근 작물에 각각의 바이러스를 접종한 뒤 RNA-seq을 통하여 표지유전자를 선별 및 유전자의 기능분석을 완료하였고 후보 표지유전자의 활용 여부를 Realtime RT-PCR을 통해 확인함으로써 향후 표지유전자를 이용한 바이러스 진단 방법 개발에 기초연구 결과로 활용이 가능하게 하였다.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수

연구과제 결과를 통해 특허 출원(3건), 논문(SCI-2건, 비SCI-1건), 학술발표(3건), 제품화(10건)에 대한 성과를 도출하였다. 해당성과를 통하여 국내에서 육성중인 구근류에 감염되어 있는 바이러스에 대한 심도 있는 지식 제공이 가능하며 구근류 바이러스 진단에 있어서 개발된 제품을 이용하여 신속하고 정확한 구근류 바이러스 진단이 가능할 것으로 기대된다.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
○ 바이러스 무감염 구근 기반 Cucumber mosaic virus(CMV), Bean yellow mosaic virus(BYMV) 감염 기주 전사체 분석 기주 전사체 분석	20	100	○ 바이러스 무감염 프리지아, 칼라 구근대상 CMV, BYMV 감염조건 확립 및 전사체 분석을 통한 유전자 기능 분석 완료
○ 프리지아, 글라디올러스, 칼라 품종별 바이러스 감염 공통 발현 및 특이 전사체 선발	10	100	○ 해당 구근의 CMV와 BYMV 감염에 따른 공통 발현 유전자 및 각 바이러스 특이적 발현 유전자 발굴
○ 공통 또는 특이 발현 전사체를 이용한 진단조건 최적화	10	100	○ 각 바이러스 감염에 따라 특이적으로 발현하는 후보유전자(각 3개)를 이용한 Realtime RT-PCR 수행 및 해당 유전자의 진단 조건 최적화 수행
○ 전사체 분석을 통한 프리지아, 글라디올러스, 칼라 품종별 바이러스 감염 양상 분석	20	100	○ 전사체 분석을 통한 프리지아, 칼라, 글라디올러스 품종별 감염 바이러스 진단 완료 및 유전자 전장 서열 정보 확보
○ 바이러스 유전체 특이 진단 조건 확립 및 바이러스 무감염 시료 선발	10	100	○ 구근 감염 바이러스 전장 유전체 서열 기반 진단 프라이머 제작 및 진단을 위한 조건 확립
○ 바이러스 유전체 특이 primer와 바이오큐브를 이용한 진단 키트 시제품 개발	10	100	○ 감염 바이러스 계통판별용 키트 완제품 개발 완료
○ 진단조건 최적화 및 진단 키트 완제품 개발(10종)	20	100	○ 바이오큐브 결합을 통한 바이러스 진단용 각 바이러스 특이적 primer 기반 진단 키트 시제품 개발 완료
합계	100점		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

국내 구근류 바이러스 진단 및 각 바이러스 감염에 따른 표지유전자 발굴을 이용하여 구근류 바이러스 진단에 대한 새로운 진단방법을 제시하였으며 구근류 재배 현장에서 발생하고 있는 다양한 바이러스에 대한 정확한 정보를 제시함으로써 구근류 감염 바이러스 진단에 대한 새로운 패러다임을 제시한 연구개발결과로 생각된다.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

본 연구과제를 수행함에 있어서 구근류 시료 확보의 어려움이 연구수행에 있어서 가장 큰 난관이었다. 하지만 본 과제를 통하여 기존에 육성중인 구근류에 감염되어 있는 새로운 바이러스 진단 및 기존 보고 바이러스에 대한 새로운 변이 정보, 진단 방법을 개발하였으며 연구팀의 노력으로 인하여 바이러스 무병묘 시료도 확보하였다. 해당 시료를 이용하여 구근류 전사체 분석을 수행하여 기존 database가 확보되지 않는 구근류 대상으로 de novo assemble을 이용한 구근류 genome database를 구축하여 본 연구과제를 수행하였다.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

연구과제에서 발생한 연구결과인 바이러스 진단 최적화 프로토콜 및 키트를 이용하여 기존 보고된 바이러스를 진단하는데 활용이 가능하며 바이러스 계통판별 키트를 이용하여 기존 보고된 바이러스와는 다른 계통의 바이러스 진단도 가능하다. 이를 이용하여 현장에서 발병하는 바이러스에 대한 정확한 진단이 가능하다. 표지유전자를 활용한 바이러스 진단시에는 바이러스 변이와는 무관하게 표지유전자를 직접 진단함으로써 바이러스 계통에 대한 가능성을 배제하고 감염된 바이러스에 대한 진단이 가능하다.

IV. 보안성 검토

해당없음

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

당초 계획한 연구목표를 달성하기 위한 충분한 연구결과를 도출하였으며 이를 활용한 특허, 논문, 학술 발표를 통하여 계획한 정량적 성과를 달성하였다. 본 연구과제 결과를 통하여 향후 구근류 바이러스 진단 및 타작물에 감염하는 바이러스를 진단함에 있어서 기초 자료로 활용이 기대된다.

2. 연구개발기관 자체의 검토결과

연구과제 수행에 있어서 당초 수립한 연구목표를 달성하였으며 이를 활용한 정량적 연구성과 달성을 통해 연구과제를 성실히 수행함으로 판단된다.

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	
연구과제명	국내육성 프리지아, 글라디올러스, 칼라의 바이러스 감염표시자와 유전체 검출용 RT-PCR 키트 개발			
주관연구개발기관	서울대학교산학협력단		주관연구책임자	최**
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	525,000,000	84,600,000		609,600,000
연구개발기간	2021. 04. 01 - 2022. 12. 31			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(논문) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 전사체 분석을 통한 프리지아, 글라디올러스, 칼라 품종별 바이러스 감염 양상 분석	전사체 분석을 통한 프리지아, 칼라, 글라디올러스 품종별 감염 바이러스 진단 완료 및 유전자 전장 서열 정보 확보
② 프리지아, 글라디올러스, 칼라 품종별 바이러스 감염 공통 발현 및 특이 전사체 선별	해당 구근의 CMV와 BYMV 감염에 따른 공통 발현 유전자 및 각 바이러스 특이적 발현 유전자 발굴
③ 진단조건 최적화 및 진단 키트 완제품 개발(10종)	바이오큐브 결함을 통한 바이러스 진단용 각 바이러스 특이적 primer 기반 진단 키트 시제품 개발 완료

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
											SCI		비SCI	논 문 평 균 I F						
단위	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	명	건	건				
가중치	15				10	5	15	15		20				15	5					
최종 목표	8	8			2	10	10	500		3				2	1	6	6			
당해 년도	목표	4			2	10	10	50		1				1	1	3	2			
	실적	3			-	-	10	13		3				2	1	4.3 355	3		2	

달성률 (%)	75					100	27		100			100	100	100	100				
---------	----	--	--	--	--	-----	----	--	-----	--	--	-----	-----	-----	-----	--	--	--	--

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	transcriptome 분석을 통한 프리지아, 칼라, 글라디올러스 virome 분석
②	CMV 및 BYMV 감염에 따른 유전자 기능 분석 및 표지 유전자 발굴
③	구근류 감염 바이러스 유전체 진단을 위한 진단 키트 시제품 개발

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술		v								v
②의 기술		v								v
③의 기술	v					v				

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	진단 바이러스 유전체 정보 기탁 및 계통 연구 활용
②의 기술	표지 유전자 발굴 기술 이용한 타 바이러스 진단 표지 유전자 발굴 가능
③의 기술	구근류 감염 바이러스 진단 키트를 활용한 현장 적용

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용액)
	특허출원	특허등록	품종등록	SMART	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출		투자유치	논문 SCI	논문 비SCI			논문 평균 IF	학술 발표	
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	15				10	5	15	15	20					15	5				
최종목표	8	8			2	10	10	500	3			2	1	6	6				
연구기간내 달성실적	3				-	-	10	13	3			2	1	4.3	3			2	
연구종료후 성과창출 계획	5	8						450	2			1		3	4				

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.