

3180970  
55CG00  
0

과수  
화상병  
유전자  
변이형

분석기술  
개발  
및  
현장실증

최종  
보고서

2023

농림식품기술기획평가원  
농림축산식품부

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( O ), 비공개( )발간등록번호( O )

농생명산업기술개발사업 2023년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004535-01

# 과수화상병 유전자 변이형 분석기술 개발 및 현장 실증

2024.01.19

주관연구기관 / (주)제노믹베이스  
공동연구기관 / 농림축산검역본부  
위탁연구기관 / 단국대학교

농림축산식품부  
농림식품기술기획평가원

제출문

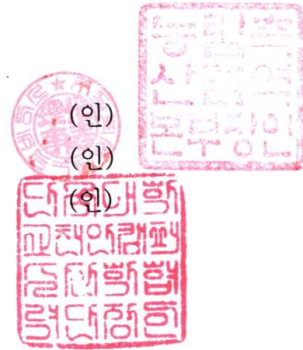
## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “과수화상병 유전자 변이형 분석기술 개발 및 현장 실증”(개발기간 : 2018. 12. 03 ~ 2023. 09. 02)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2024.01.19

주관연구기관명 : (주)제노믹베이스 (대표자) (인)  
공동연구기관명 : 농림축산검역본부 (대표자) (인)  
위탁연구기관명 : 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단 (대표자) (인)



주관연구책임자 : 남 문  
공동연구책임자 : 이 성 진  
위탁연구책임자 : 김 성 환

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



최종보고서				보안등급							
				일반[ <input checked="" type="checkbox"/> ], 보안[ <input type="checkbox"/> ]							
중앙행정기관명	농림축산식품부			사업명	농생명산업기술개발						
전문기관명 (해당 시 작성)	농림식품기술기획평가원			내역사업명 (해당 시 작성)	-						
공고번호	-			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)	318097055CG000						
				연구개발과제번호							
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB0304. 작물보호	50%	LB0207. 원예작물품질관리	20%	LB2002. 농림수산식품유통	10%				
	농림식품과학기술 분류	RA0401 농업생태계관리	60%	AA0203 원예작물재배 생산	10%	SA0105 농림식품국제통상 및 무역	10%				
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문	과수화상병 유전자 변이형 분석기술 개발 및 현장 실증									
	영문	Development of high-throughput genotyping system on genetic diversity of <i>Erwinia amylovora</i>									
연구개발과제명	국문	과수화상병균 genome-wide SNP를 활용한 역학조사 시스템 구축									
	영문	Establishment of an epidemiological investigation system using the genome-wide SNP of <i>Erwinia amylovora</i>									
주관연구개발기관	기관명	㈜제노믹베이스		사업자등록번호	204-86-02735						
	주소	경기도 남양주시 다산중앙로 19번길 25-23		법인등록번호	110111-3660100						
연구책임자	성명	남문		직위	이사						
	연락처	직장전화	02-2215-4925		휴대전화	[REDACTED]					
		전자우편	[REDACTED]		국가연구자번호	[REDACTED]					
			nomicbase.com								
연구개발기간	전체	2018. 12. 03 - 2023. 09. 02 (57개월)									
	단계 (해당 시 작성)	1단계	2018. 12. 03 - 2020. 09. 02 (21개월)								
		2단계	2020. 09. 03 - 2023. 09. 02 (36개월)								
연구개발비 (단위: 천원)	정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비	그 외 기관 등의 지원금				연구개발비 외 지원금				
	현금	현금	현물	지방자치단체	기타( )	합계					
총계	475,000	7,900	90,700	-	-	-	482,900	90,700	573,600	-	
1단계	1년차	75,000	1,500	13,500	-	-	-	76,500	13,500	90,000	-
	2년차	100,000	2,200	19,500	-	-	-	102,200	19,500	121,700	-
2단계	3년차	100,000	2,200	19,500	-	-	-	102,200	19,500	121,700	-
	4년차	100,000	-	21,700	-	-	-	100,000	21,700	121,700	-
	5년차	100,000	2,000	16,500	-	-	-	102,000	16,500	118,500	-
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고					
						역할	기관유형				
공동연구개발기관	농림축산검역 본부	이성진	농업 연구관	054-912- 0655	[REDACTED] @korea.kr	공동	국가기관				
위탁연구개발기관	단국 대학교	김성환	교수	041-550- 3454	[REDACTED] ook.ac.kr	위탁	대학				
연구개발기관 외 기관	-	-	-	-	-	-	-				
연구개발담당자 실무담당자	성명	송선경		직위	과장						
	연락처	직장전화	02-2215-4925		휴대전화	[REDACTED]					
		전자우편	[REDACTED]		국가연구자번호	[REDACTED]					
		cbase									

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

2023년 11월 01일

연구책임자: 남문 (인)

주관연구개발기관의 장: (주)제노믹베이스 (직인)  
 공동연구개발기관의 장: 농림축산검역본부 (직인)  
 위탁연구개발기관의 장: 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

## < 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		농생명산업기술개발			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		318097055CG000	
내역사업명 (해당 시 작성)		-			연구개발과제번호		-	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB0304. 작물보호	50%	LB0207. 원예작물품질관리	20%	LB2002. 농림수산식품유통		10%
	농림식품 과학기술분류	RA0401 농업생태계관리	60%	AA0203 원예작물재배·생산	10%	SA0105 농림식품국제통상 및 무역		10%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		과수화상병 유전자 변이형 분석기술 개발 및 현장 실증						
연구개발과제명		과수화상병균 genome-wide SNP를 활용한 역학조사 시스템 구축						
전체 연구개발기간		2018.12.03 - 2023.09.02						
총 연구개발비		총 573,600천원 (정부지원연구개발비: 475,000천원, 기관부담연구개발비 : 98,600천원, 지방자치단체: -천원, 그 외 지원금: -천원)						
연구개발단계		기초[ ] 응용[ ] 개발[O] 기타			기술성숙도 (해당 시 작성)		착수시점 기준( ) 종료시점 목표( O )	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)		-						
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)		-						
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	국내외 화상병균의 확산 경로 추적을 위한 유전자 변이형 분석 기술 개발 및 데이터베이스 구축						
	전체 내용	<p><b>*제1차년도</b></p> <주관연구기관(제노믹베이스)>: - 국내외 화상병균 40개 분리주의 유전체 data 생산 및 SNP 마커 후보 선발 - 화상병균 유전체 분석 및 분리 지역별 polymorphic SNP 마커 후보 선발 - 분자유전학적 추적기술 도입 - 선발된 Genome-wide SNP를 이용한 역학조사 simulation 실시 - Genome-wide SNP를 이용한 국내 확산 경로 추적을 위한 분석 기술 구축                 <제1 협동연구기관(농림축산검역본부)>: - 국내 과수화상병균의 발생 조사 및 균주 확보                 <위탁연구기관(단국대학교)>: - VNTR 유전 type 형 별로 화상병 세균의 증식력, 생물막 형성 능력, VBNC(Viable but non culturable) 특성 조사 <p><b>*제2차년도</b></p> <주관연구기관(제노믹베이스)>: - 지노타입핑용 형광 SNP 마커를 40-48개 내외로 개발 - 개발된 형광 SNP 마커를 활용한 역학조사 실시						

<제1 협동연구기관(농림축산검역본부)>:

- 국내 과수화상병균의 발생 조사 및 균주 확보
- 항생제 내성을 유발하는 유전자 분석 기술 개발

<위탁연구기관(단국대학교)> :

- VNTR 유전 type형 별 화상병 세균의 다양한 영양 기질 이용 능력 및 세포 외 효소 분비 특성 조사

**\*제3차년도**

<주관연구기관(제노믹베이스)>:

- 형광 SNP 마커를 이용한 genome-wide SNP 분석기술 확립
- 화상병균 유전체 database 구축 및 분석 자동화 구축
- 화상병균의 국내 지역별, 연도별 분리주들의 유전체 정보 수집
- Phylogenetic tree, Principal Component Analysis(PCA), Genetic Structure 와 같은 분석 시스템의 자동화

<제1 협동연구기관(농림축산검역본부)>:

- 국내 과수화상병균의 발생 조사 및 균주 확보
- 항생제 내성을 유발하는 유전자 분석 기술 개발
- 개발된 기술의 역학조사 현장 적용·평가검증

<위탁연구기관(단국대학교)>:

- Genome-wide SNP 유전 type 형별로 화상병 세균의 다양한 영양 기질 이용 능력 및 세포외 효소 분비 특성 조사

**\*제4차년도**

<주관연구기관(제노믹베이스)>:

- 형광 SNP 마커를 이용한 지역별, 시기별 분리 균주의 SNP 정보 수집
- 형광 SNP 마커를 이용한 genome-wide SNP 분석기술 고도화
- 화상병균 유전체 database 구축 및 분석 자동화 구축
- 화상병균의 국내 지역별, 연도별 분리주들의 유전체 정보 수집
- Phylogenetic tree, Principal Component Analysis(PCA), Genetic Structure 와 같은 분석 시스템의 자동화

<제1 협동연구기관(농림축산검역본부)>:

- 국내 과수화상병균의 발생 조사 및 균주 확보
- 개발된 기술의 역학조사 현장 적용·평가검증

<위탁연구기관(단국대학교)>:

- Genome-wide SNP 유전 type 형 별로 화상병 세균의 다양한 영양 기질 이용 능력 및 세포외 효소 분비 특성 조사

**\*제5차년도**

<주관연구기관(제노믹베이스)>:

		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 형광 SNP 마커를 이용한 genome-wide 정보 수집</li> <li>- Genome-wide SNP 지노타입핑을 이용한 역학조사 시스템의 현장 활용 및 보완</li> </ul> <p>&lt;제1 협동연구기관(농림축산검역본부)&gt;:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내 과수화상병균의 발생 조사 및 균주 확보</li> <li>- 개발된 기술의 역학조사 현장 적용·평가검증</li> </ul> <p>&lt;위탁연구기관(단국대학교)&gt;:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 가지검은마름병 세균의 증식력, 생물막 형성 능력, VBNC (viable but non culturable), 다양한 영양 기질 이용 능력 및 세포외 효소 분비 특성 조사</li> </ul>
--	--	---

연구개발성과		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 과수화상병 유전자 변이형 분석기술 개발을 위해 2015년부터 2022년까지 국내외에서 분리한 과수화상병 554개 분리주를 대상으로 유전체 분석을 수행하였으며, SNP 마커를 이용한 유연관계 분석을 이용하여 분자 역학조사를 수행하였음</li> <li>- 분석에 사용한 과수화상병 분리주는 국내 분리주 535개와 국외 분리주 19개 총 554개 분리주를 대상으로 수행하였으며, 이를 이용하여 genome-wide SNP 마커를 선별하여 유연관계 분석을 이용한 역학조사를 수행하였음.</li> <li>- 국내 다양한 지역에서 발생한 과수화상병 분리주를 대상으로 전체 게놈 정보를 DB화 함으로써 지속적으로 과수화상병 역학조사를 위한 기초 데이터로 활용이 가능함.</li> <li>- 과수화상병 genome-wide SNP를 이용한 역학조사는 대량의 유전체 정보를 기반으로한 분석기술이기 때문에 보다 효과적인 분석기술 개발을 위해 high-throughput genotyping 기술을 이용한 targeted sequencing을 이용한 지노타입핑 체계를 구축하였음.</li> <li>- 과수화상병균의 생물학적 특성들, 생물막 형성 능력, VBNC, 다양한 영양 기질 이용 능력 및 세포외 효소 분비 특성 조사에 대한 기초 데이터 축적을 통해 향후 과수화상병균의 생물학적 특성 변화 연구를 위한 기초 데이터로 활용이 가능함.</li> </ul>
--------	--	---

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과		<p>○ 기술적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 병해충 역학조사에 주로 사용하던 microsatellite 기반의 분석 기술에 비해 보다 해상도 높고 분석 자동화 시스템 구축에 용의한 genome-wide SNP 기반의 분석 시스템 구축은 기술적으로 매우 도전적인 영역임</li> <li>- 국내에서 가장 중요한 병해충 중의 하나인 화상병균을 이용하여 국내 확산 경로 추적이 가능한 역학 조사 시스템의 구축은 다른 주요한 병해충들의 역학조사에 필요한 기술 구축에 폭넓게 활용이 가능</li> </ul> <p>○ 경제적·산업적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 과수 화상병균의 국내 확산 경로 추적 기술 개발을 통해 보다 정확한 감염 경로 정보 제공 및 국내 확산 방지를 위한 정보 제공을 통해 과수 농가의 경제적 피해를 최소화하고 과수 수출 정상화에 기여할 수 있음.</li> </ul>
---------------------	--	---

연구개발성과의 비공개여부 및 사유												
연구개발성과의 등록 ·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 ·장비	기술 요약 정보	소프 트 웨 어	표준	생명자원		화 합 물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정 보	실 물
	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구 시설 ·장 비명	규격 (모델명)		수량	구입 연월 일	구입 가격 (천 원)	구입처 (전화)	비고 (설치장 소)	ZEUS 등록번호		
	-	-	-		-	-	-	-	-	-		
국문핵심어 (5개 이내)	과수화상병		단일염기다형성		유전자변이분석		역학조사		데이터베이스			
영문핵심어 (5개 이내)	fire blight		Single Nucleotide Polymorphism		gene mutation analysis		epidemiologic survey		Database			

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....	1
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용 .....	7
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도 .....	98
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성) .....	106
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여정도 .....	107
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획 .....	107
별첨 자료 (참고 문헌 등) .....	110

# 1. 연구개발과제의 개요

## 가. 현황 및 문제점

### 1. 전 세계적 화상병 발병 분포 및 피해

- 화상병의 원인 병원균은 *Erwinia amylovora* 라고 하는 세균으로서 미국에서 1780년경 처음 발견 된 이래, 1957년 영국, 1971년 독일 등 유럽에 전파, 북아프리카, 중동 등으로 확산된 것으로 알려짐
- 화상병에 의한 피해는 미국과 유럽 등지에서 매년 발생하며, 경제적 피해 규모는 2000년대 초반 미국에서 1억 달러에 상응하는 것으로 추산됨. 특히 이 시기에 미시건주에서만 한해 400,000 주의 사과나무를 제거하여 약 4천2백만 달러의 경제적 손실을 초래하였음.
- 최근 일본과 한국에서 화상병과 유사한 가지검은마름병(원인균: *Erwinia pyrifoliae*)이 발견 되었으나, 화상병은 동북아시아 등 주변 국가에서 발견된 보고는 없었음.

### 2. 국내 과수화상병 발생 및 피해현황

- 한국에서는 2015년에 안성·천안(42농가) 및 제천(1농가)지역 배·사과나무 과수원에서 처음으로 화상병 발병 보고 및 원인균 *E. amylovora*가 분리되어 확인되었고, 2016년 안성·천안(17농가), 2017년 안성·천안(33농가), 2018년 8월 기준으로 제천(31농가), 평창(5농가), 충주(3농가)에서 지속적 또는 추가로 발생이 확인됨(그림 1).

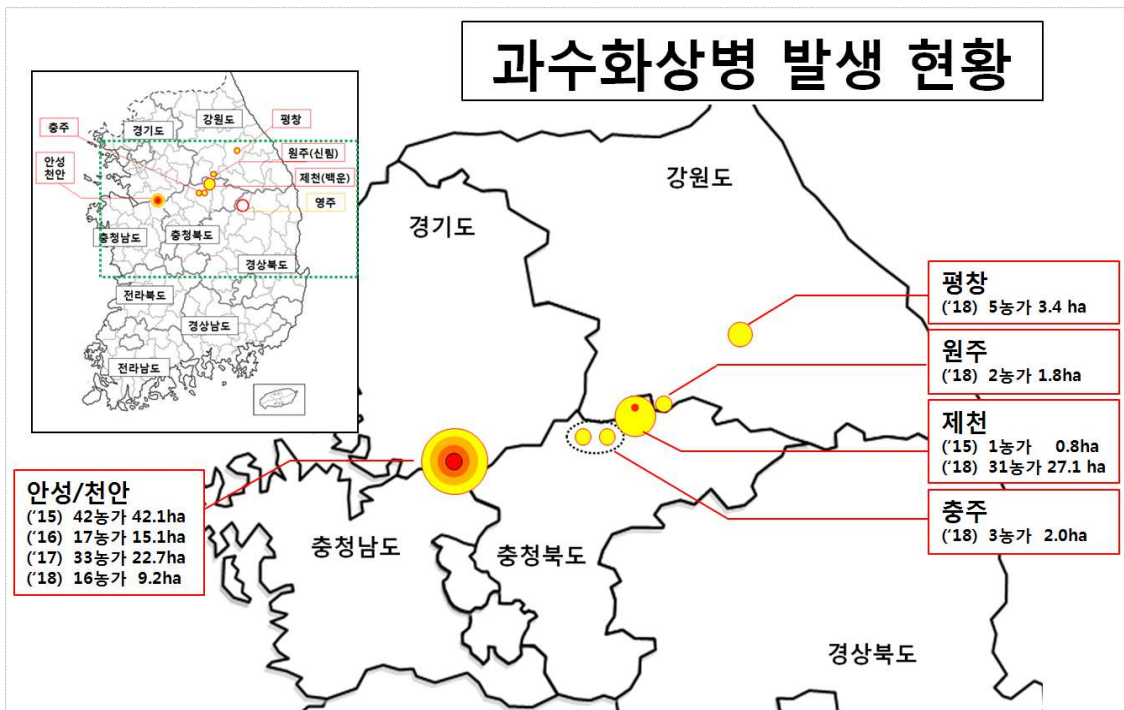


그림 3 과수화상병 발생 상황('15~'18)



### 3. 유입경로 및 확산경로 분석을 위한 그간 기술개발 현황

- '15~'18년 국내 발생이 확인된 화상병균 유전자 분석(CRISPR, VNTR) 결과 모두 동일하게 북미 동부지역산(캐나다, 미시간주 등) 화상병균과 상동성이 가장 높았음

⇒ 발생지역간 확산방향(선후관계) 규명이 필요함

※ 미국·유럽에서 개발된 CRISPR(3개 마커), VNTR(6개 마커) 분석기술은 검역본부 용역과제(단국대, '15-'16)를 통해 개발·확보하여 국가단위 원산지 분석에 활용중임(그림 2,3). 하지만, 국내 지역단위 변이 분석을 위해서는 VNTR 마커를 추가(3개 이상)로 개발하여 분석에 활용 필요(그림 4)

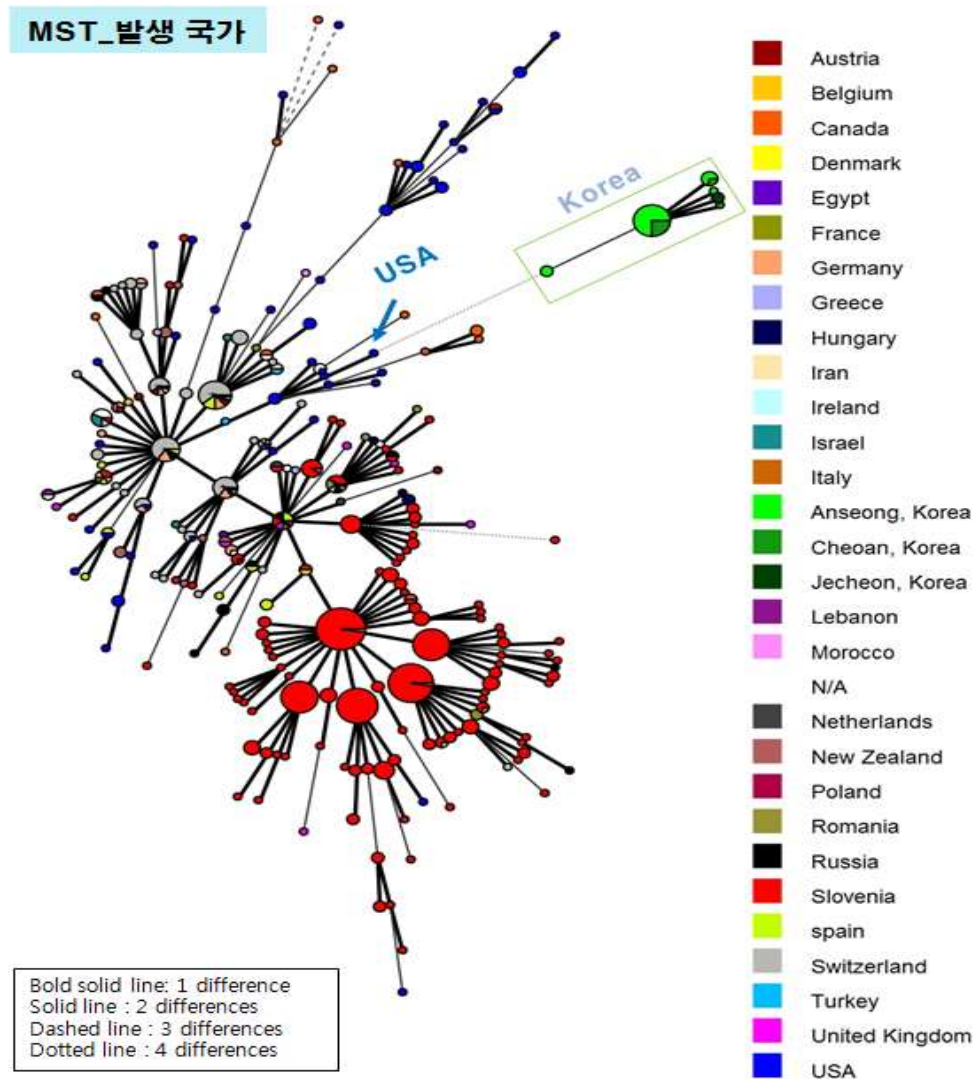


그림 2. 국내외 과수화상병균의 VNTR 변이형 분석 결과(본 연구팀)  
 ('15~'16년 국내 발생균주는 북미 동부지역에 분포하는 유전자형과 일치함)



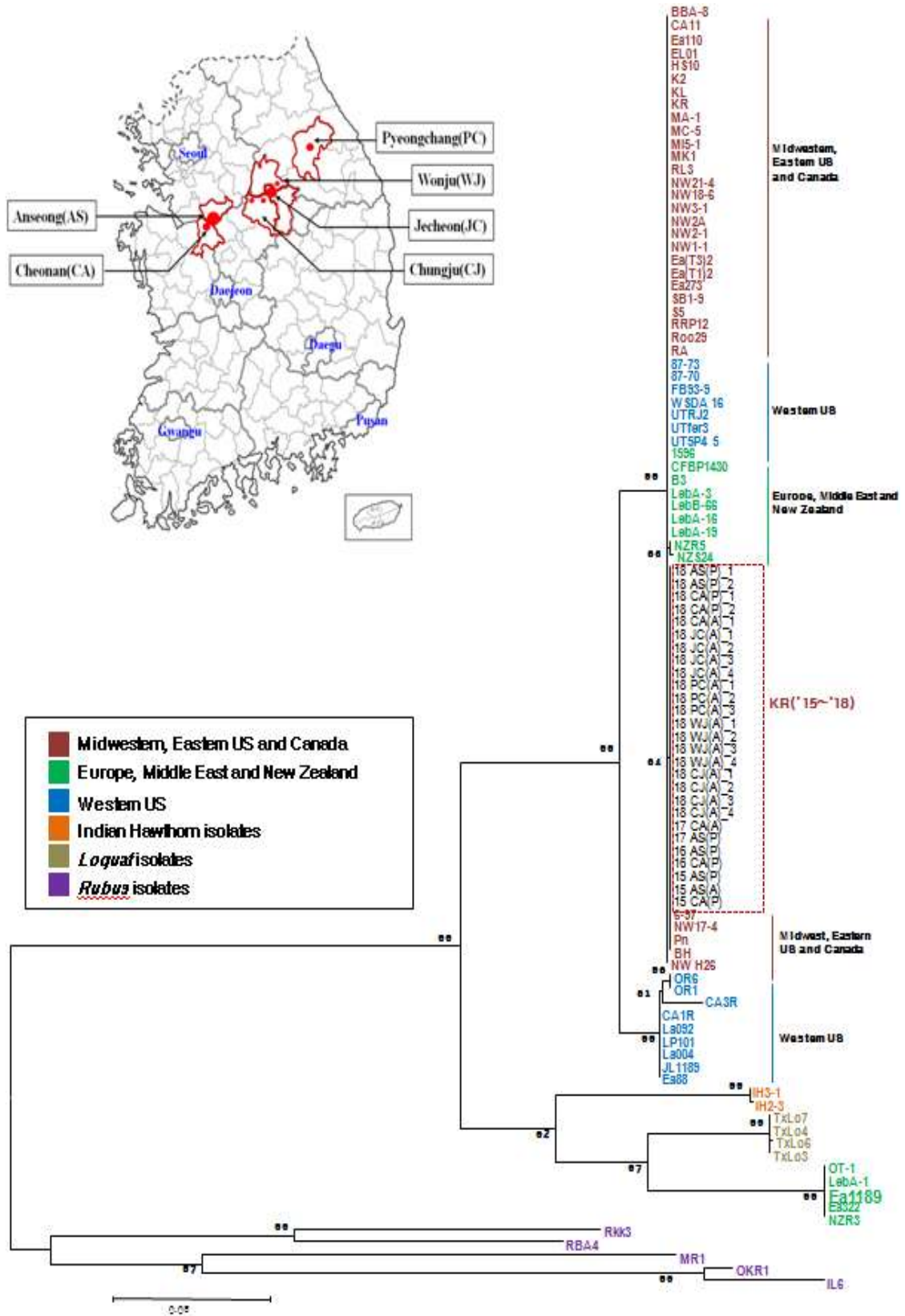


그림 3. 국내외 과수화상병균의 CRISPR 유전형 분석 결과(본 연구팀) ('15~'18년 국내 발생균주는 북미 동부지역에 분포하는 유전자형과 일치함)

## 나. 기술개발의 필요성

### 1. 지역단위 유전자 변이형 분석기술 개발 필요

- 신속한 확산경로(방향) 분석을 위한 유전자 변이형 분석기술 필요
- 농민탐문·기록을 통해 묘목·작업자의 이동경로를 추적해야 하나, 오래 전에 확산된 경우 정확한 정보를 확보하는데 어려움이 있음
- 지역 집단의 유전자 변이형 정보(local population DNA)를 이용한 **집단유전학적 분석은 해당 집단의 원산지 정보와 이동하였던 시간 정보를 추정하는데 활용될 수 있음**
- 과수화상병균의 국내 확산 경로 분석을 위해선 기존 국가단위 원산지 분석에 활용하고 있는 CRISPR 및 VNTR(6개 마커, 스위스 개발) 분석 보다 해상력이 높은 새로운 분석 기법이 요구됨(VNTR의 경우 추가 마커 보완 및 필요시 신규 개발이 필요함(그림 4)).
- 또한, 계통 내에서 가장 빈번하게 발생하는 SNP(single nucleotide polymorphism)를 이용하여 각 집단 간 유전 변이를 보다 고해상도를 구현하고 효율적으로 분석할 수 있는 시스템 개발이 필요하며 기존 VNTR 분석결과와 연계하여 해석이 필요함(그림 5).
- NGS의 발달과 계통 분석 기술의 향상 그리고 형광 probe를 이용한 High-throughput genotyping 기술의 발전은 위와 같이 Genome-wide SNP를 이용한 역학조사 시스템 개발을 가능하게 할 것으로 여겨짐.

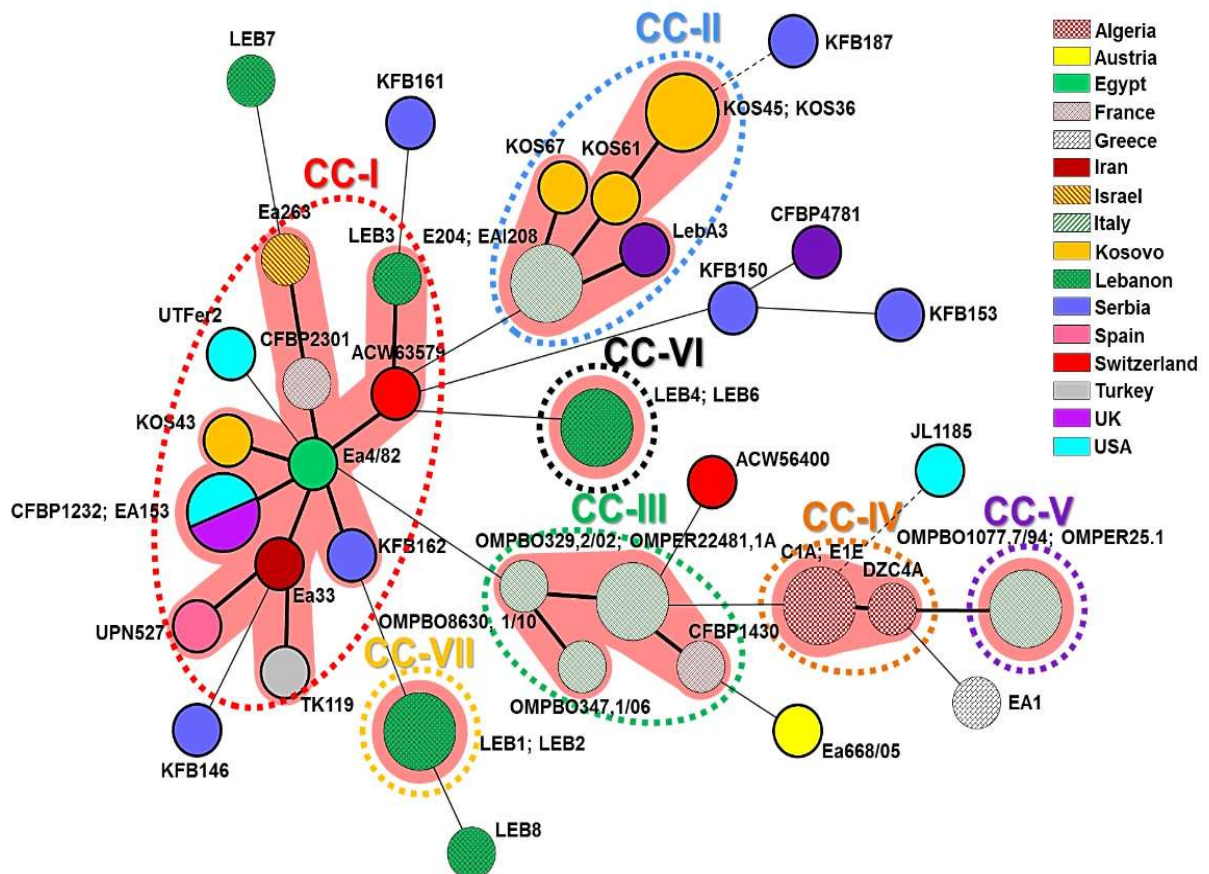


그림 4. 화상병균 유전자 변이형 분석(VNTR 마커 기존 6개 → 9개, 이탈리아 사례, 2017)

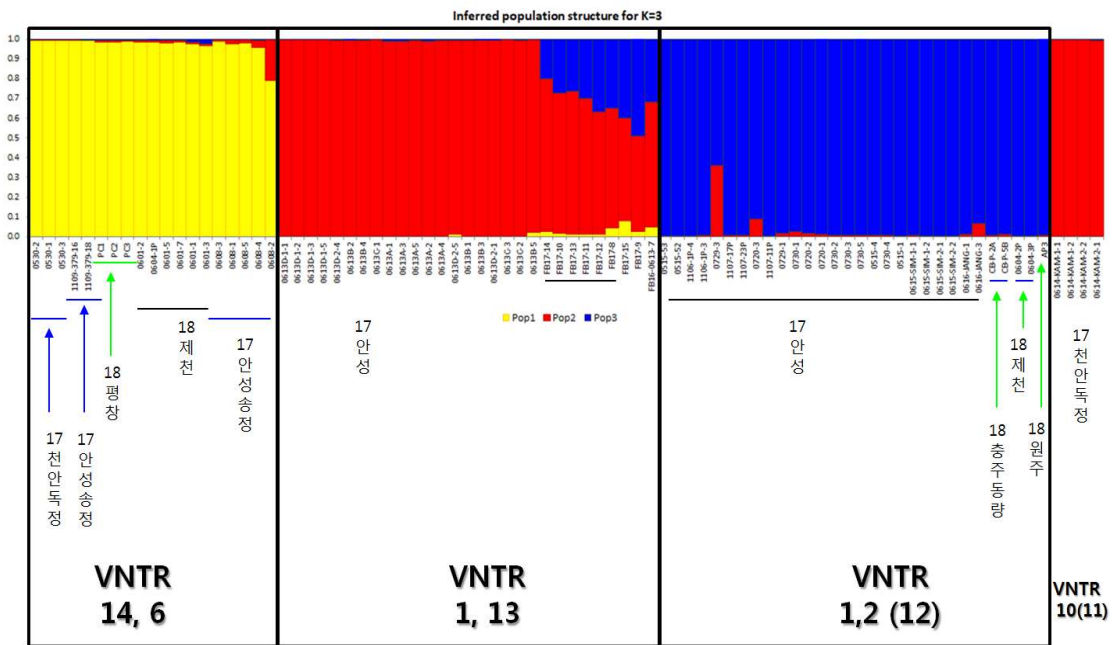
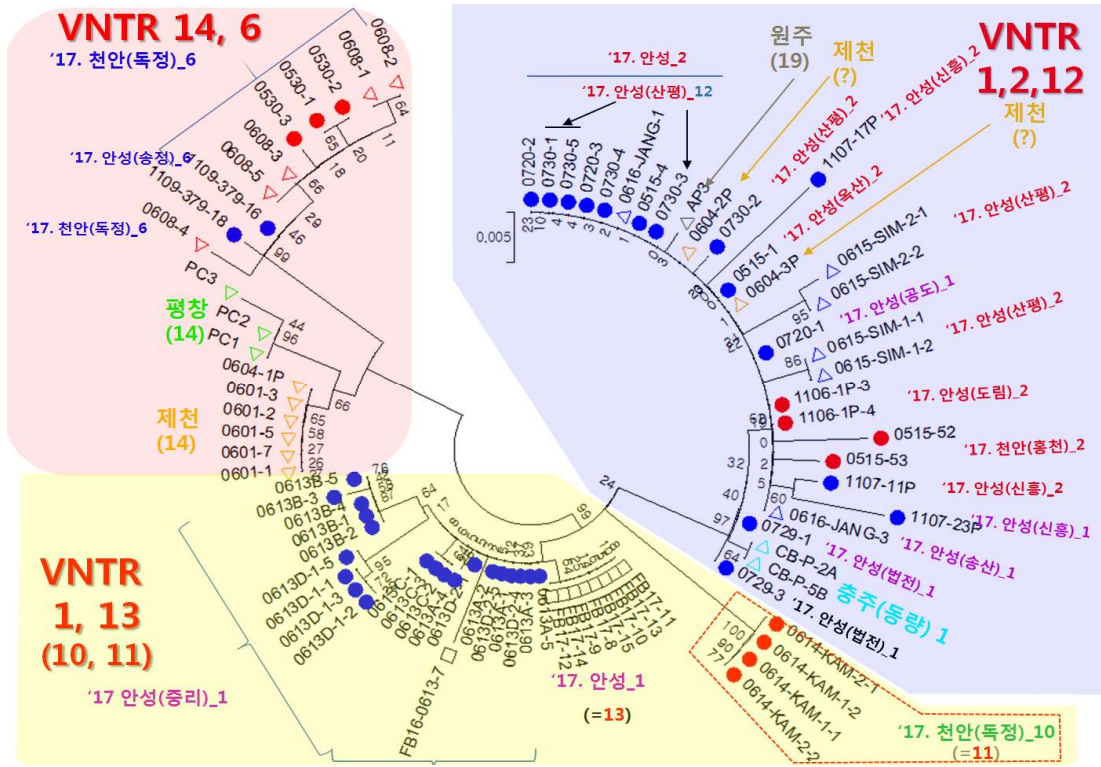


그림 5. 화상병균 유전자 변이형 분석  
(현행 VNTR 분석과 gSNP 분석결과 연계분석, 예비시험 결과)

#### 다. 기술개발 개요

과수화상병균의 변이형 분석기술 개발 및 역학조사시스템(플랫폼)을 구축하여 변이형의 국내 확산지도를 작성, 실시간 모니터링 체계 구축  
 → 역학조사 및 방제대책 활용

#### 1. 과수화상병균 조사 및 균주 수집 (1단계)

- '15~'18년 국내 발생균주 및 추가 발생이 확인되는 균주 분리
- 해외 발생 화상병균 수집 및 DB 확보

2. 과수화상병균의 변이형 마커 선별(2단계)

- 세계적 균주 및 국내 발생 균주의 SNP 정보 확보 및 분석
- 변이형 분석마커 선발(SNP, VNTR, 항생제 내성 유전자 등)

3. 과수화상병균의 변이형 분석기술 개발 및 DB 구축(3단계)

- 변이형 분석마커를 활용한 국내외 화상병균의 변이형 DB 구축
- 실시간 분석이 가능한 분석기술 개발 (PNA 기반 RT-PCR)

4. 역학조사용 과수화상병균의 변이형 분석 플랫폼 구축(4단계)

- 실시간 분석결과를 지역변이형 그룹으로 변화하는 호환용 정보 변환 알고리즘 개발 및 탑재
- 실시간 지역변이형, 항생제 내성균 등 실시간 진단이 가능한 역학조사 시스템 구축

5. 예찰·역학조사 현장 적용·검토·평가 실시(5단계)

- 예찰·역학조사 현장 적용, 항생제 내성균 모니터링
- 변이형별 병원성, 항생제 내성, 생리·화학적 특성 분석

화상병균 변이형 분석 플랫폼 개발 및 역학조사 시스템 구축

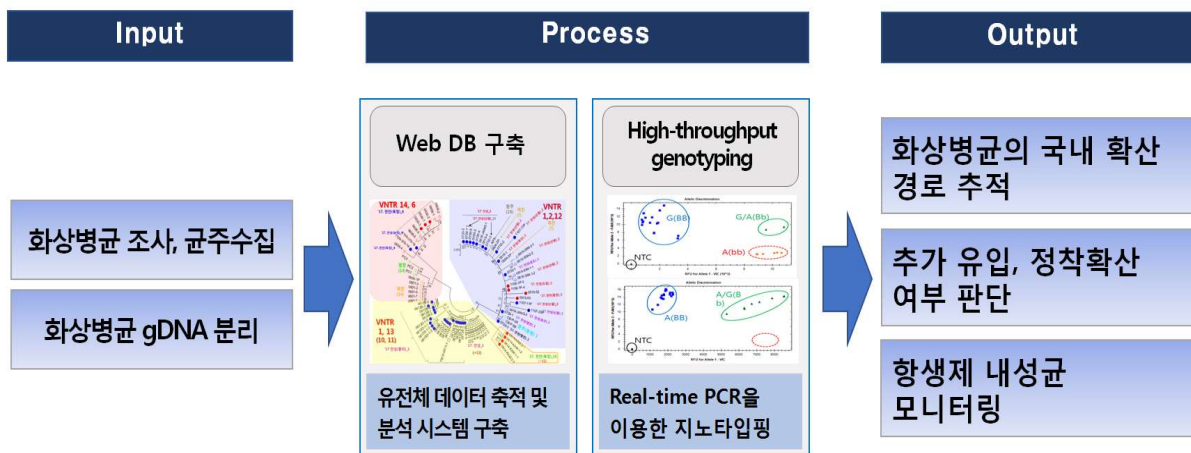


그림 6. 기술개발 개요(모식도)

## 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

<주관연구기관 : (주)제노믹베이스>

### 가. 과수화상병균 유전체 분석에 사용한 분리주

1. 2016년 발생 균주부터 2019년 발생 균주까지 국내·외에서 분리한 과수화상병 분리주 360개를 대상으로 유전체 분석을 진행하였으며 본 용역과제 3차년도에는 94개 분리주를 추가로 유전체 분석을 추가하였음.
2. 4차년도에는 주로 2021년도에 분리한 과수화상병 분리주 61개 분리주를 추가로 WGS를 진행하여 국내 과수화상병 분리주 총 404개에 대한 분석을 수행하였음
3. 해외균주 19개 분리주를 포함하여 총 423개 분리주를 대상으로 유전체 분석을 수행하였음.

표 1. 유전체 분석에 사용한 과수화상병 분리주(총 423 균주)

분리년도	도	시 (city)	약자	수 (Number)
2017년 (64ea)	경기도	안성	AS	50
	충청남도	천안	CA	14
2018년 (18ea)	경기도	안성	AS	2
	충청북도	제천	JC	8
		충주	CJ	2
	충청남도	천안	CA	2
	강원도	원주	WJ	1
		평창	PC	3
2019년 (265ea)	경기도	안성	AS	6
		연천	YC	9
		이천	IC	5
		파주	PJ	4
	충청북도	음성	ES	13
		제천	JC	62
		충주	CJ	119
	충청남도	천안	CA	32
	강원도	원주	WJ	8
		평창	PC	6
2020년 (16ea)	경기도	광주	GJ	2
		평택	PT	4
		양주	YJGG	2
	충청북도	진천	JCCB	4
	충청남도	아산	ASCN	2
	전라북도	익산	IS	2



2021년 (45ea)	경기도	남양주	NYJ	2
		여주	YJ	2
		용인	YI	1
		이천	IC	1
	강원도	영월	YW	2
		원주	WJ	4
	충청남도	당진	DG	6
		예산	YS	4
	충청북도	단양	DY	4
		괴산	GS	4
		음성	EJ	4
	경상북도	영주	YJGB	2
		안동	AD	9
해외균주 (미국, 터키, 독일, 덴마크, 벨기에폴란드, 멕시코, 이스라엘, 스웨덴, 프랑스, 캐나다)				19
합계				423

표 2. 4차년도 유전체 분석에 사용한 과수화상병 분리주 샘플 목록(총 423 균주)

샘플명	기주	분리지역	샘플명	기주	분리지역	샘플명	기주	분리지역
PQ18AS001	배나무	경기	PQ17CA014	배나무	충남	PQ19CJ048	사과나무	충북
PQ18AS002	배나무	경기	PQ17CA015	배나무	충남	PQ19CJ049	사과나무	충북
PQ18CA001	배나무	충남	PQ17AS037	배나무	경기	PQ19CJ050	사과나무	충북
PQ18CA002	배나무	충남	PQ17AS038	배나무	경기	PQ19CJ052	사과나무	충북
PQ17CA001	배나무	충남	PQ17AS039	배나무	경기	PQ19CJ054	사과나무	충북
PQ17CA002	배나무	충남	PQ17AS040	배나무	경기	PQ19CJ057	사과나무	충북
PQ17CA003	배나무	충남	PQ17AS041	배나무	경기	PQ19CJ060	사과나무	충북
PQ18JC001	사과나무	충북	PQ18WJ001	사과나무	강원	PQ19CJ062	사과나무	충북
PQ18JC002	사과나무	충북	PQ18CJ001	사과나무	충북	PQ19CJ068	사과나무	충북
PQ18JC003	사과나무	충북	PQ18CJ002	사과나무	충북	PQ19CJ069	사과나무	충북
PQ18JC004	사과나무	충북	PQ18PC001	사과나무	강원	PQ19CJ072	사과나무	충북
PQ18JC005	사과나무	충북	PQ18PC002	사과나무	강원	PQ19CJ073	사과나무	충북
PQ18JC006	사과나무	충북	PQ18PC003	사과나무	강원	PQ19CJ077	사과나무	충북
PQ18JC007	사과나무	충북	PQ17XX001	-	경기	PQ19CJ079	사과나무	충북
PQ18JC008	사과나무	충북	PQ17XX004	-	경기	PQ19CJ081	사과나무	충북
PQ17CA004	사과나무	충남	PQ17XX005	-	경기	PQ19CJ082	배나무	충북
PQ17CA005	사과나무	충남	PQ17XX006	-	경기	PQ19CJ083	사과나무	충북
PQ17CA006	사과나무	충남	PQ17XX007	-	경기	PQ19CJ084	사과나무	충북
PQ17CA007	사과나무	충남	PQ17XX008	-	경기	PQ19ES005	사과나무	충북
PQ17CA008	사과나무	충남	PQ17XX009	-	경기	PQ19ES006	사과나무	충북
PQ17AS001	배나무	경기	PQ17XX002	-	경기	PQ19JC001	사과나무	충북
PQ17AS002	배나무	경기	PQ17XX003	-	경기	PQ19JC003	사과나무	충북
PQ17AS003	배나무	경기	PQ19CA001	배나무(신고)	충남	PQ19JC004	사과나무	충북
PQ17AS004	배나무	경기	PQ19CA002	배나무(신고)	충남	PQ19JC006	사과나무	충북
PQ17AS005	배나무	경기	PQ19CA008	배나무	충남	PQ19JC008	사과나무	충북
PQ17AS006	배나무	경기	PQ19CA003	배나무	충남	PQ19JC009	사과나무	충북
PQ17AS007	배나무	경기	PQ19CA004	배나무	충남	PQ19JC010	사과나무	충북
PQ17AS008	배나무	경기	PQ19CA005	배나무	충남	PQ19JC011	사과나무	충북
PQ17AS009	배나무	경기	PQ19CA009	배나무	충남	PQ19JC012	사과나무	충북
PQ17AS010	배나무	경기	PQ19CA010	배나무	충남	PQ19JC013	사과나무	충북
PQ17AS011	배나무	경기	PQ19CA012	배나무	충남	PQ19JC015	사과나무	충북
PQ17AS012	배나무	경기	PQ19CA015	배나무	충남	PQ19JC017	사과나무	충북
PQ17AS013	배나무	경기	PQ19CA016	배나무	충남	PQ19JC020	사과나무	충북
PQ17AS014	배나무	경기	PQ19CA017	배나무	충남	PQ19JC021	사과나무	충북
PQ17AS015	배나무	경기	PQ19CA018	배나무	충남	PQ19JC022	사과나무	충북

PQ17AS016	배나무	경기	PQ19CA019	배나무	충남	PQ19JC0223	사과나무	충북
PQ17AS017	배나무	경기	PQ19CA021	배나무	충남	PQ19JC025	사과나무	충북
PQ17AS018	배나무	경기	PQ19CA023	배나무	충남	PQ19JC026	사과나무	충북
PQ17AS019	배나무	경기	PQ19CJ001	배나무	충북	PQ19JC029	사과나무	충북
PQ17AS020	배나무	경기	PQ19CJ004	사과나무	충북	PQ19JC032	사과나무	충북
PQ17CA009	배나무	충남	PQ19CJ006	사과나무	충북	PQ19JC034	사과나무	충북
PQ17CA010	배나무	충남	PQ19CJ008	사과나무	충북	PQ19YC003	사과나무	경기
PQ17CA012	배나무	충남	PQ19CJ009	배나무	충북	PQ19YC004	사과나무	경기
PQ17CA013	배나무	충남	PQ19CJ010	배나무	충북	PQ19YC005	사과나무	경기
PQ17AS021	사과나무	경기	PQ19CJ011	배나무	충북	PQ19YC008	사과나무	경기
PQ17AS022	사과나무	경기	PQ19CJ012	사과나무	충북	PQ19CJ053	사과나무	충북
PQ17AS023	사과나무	경기	PQ19CJ013	사과나무	충북	PQ19JC030	사과나무	충북
PQ17AS024	사과나무	경기	PQ19CJ018	사과나무	충북	PQ19JC037	사과나무	충북
PQ17AS025	사과나무	경기	PQ19CJ022	사과나무	충북	PQ19ES001	사과나무	충북
PQ17AS026	사과나무	경기	PQ19CJ024	사과나무	충북	PQ19ES002	사과나무	충북
PQ17AS027	배나무	경기	PQ19CJ026	사과나무	충북	PQ19CJ064	사과나무	충북
PQ17AS028	배나무	경기	PQ19CJ028	사과나무	충북	PQ19CJ065	사과나무	충북
PQ17AS029	배나무	경기	PQ19CJ030	사과나무	충북	PQ19CJ067	사과나무	충북
PQ17AS030	배나무	경기	PQ19CJ033	사과나무	충북	PQ19CJ074	사과나무	충북
PQ17AS031	배나무	경기	PQ19CJ035	사과나무	충북	PQ19CJ075	사과나무	충북
PQ17AS032	배나무	경기	PQ19CJ036	사과나무	충북	PQ19CJ076	사과나무	충북
PQ17AS033	배나무	경기	PQ19CJ038	사과나무	충북	PQ19CA006	배나무	충남
PQ17AS034	배나무	경기	PQ19CJ040	사과나무	충북	PQ19CA007	배나무	충남
PQ17AS035	배나무	경기	PQ19CJ041	사과나무	충북	PQ19CA011	배나무	충남
PQ17AS036	배나무	경기	PQ19CJ046	사과나무	충북	PQ19CA013	배나무	충남
<b>샘플명</b>	<b>기주</b>	<b>분리지역</b>	<b>샘플명</b>	<b>기주</b>	<b>분리지역</b>	<b>샘플명</b>	<b>기주</b>	<b>분리지역</b>
PQ19CA014	배나무	충남	PQ19ES011	사과나무	충북	PQ19YC007	사과나무	경기
PQ19CA022	배나무	충남	PQ19ES012	사과나무	충북	PQ19WJ001	사과나무	강원
PQ19CJ002	사과나무	충북	PQ19CA024	배나무	충남	PQ19YC009	사과나무	경기
PQ19CJ003	사과나무	충북	PQ19CA025	배나무	충남	PQ19PJ001	사과나무	경기
PQ19CJ005	사과나무	충북	PQ19JC040	사과나무	충북	PQ19PJ002	사과나무	경기
PQ19CJ007	사과나무	충북	PQ19JC041	사과나무	충북	PQ19PJ003	사과나무	경기
PQ19CJ014	배나무	충북	PQ19JC042	사과나무	충북	PQ19PJ004	사과나무	경기
PQ19CJ015	배나무	충북	PQ19JC043	사과나무	충북	PQ19CJ112	사과나무	충북
PQ19CJ002	사과(후지 등)	충북	PQ19CJ085	사과나무	충북	PQ19CJ113	사과나무	충북
PQ19CJ016	사과나무	충북	PQ19CJ086	사과나무	충북	PQ19CJ114	사과나무	충북
PQ19CJ017	사과나무	충북	PQ19CJ087	사과나무	충북	PQ19CJ115	사과나무	충북
PQ19CJ019	사과나무	충북	PQ19CJ088	사과나무	충북	PQ19CJ116	사과나무	충북
PQ19CJ020	사과나무	충북	PQ19JC044	사과나무	충북	PQ19CJ117	사과나무	충북
PQ19CJ021	사과나무	충북	PQ19JC045	사과나무	충북	PQ19CJ118	사과나무	충북
PQ19CJ023	사과나무	충북	PQ19JC046	사과나무	충북	PQ19CJ119	사과나무	충북
PQ19CJ025	사과나무	충북	PQ19JC047	사과나무	충북	PQ19WJ002	사과나무	강원
PQ19CJ027	사과나무	충북	PQ19JC048	사과나무	충북	PQ19WJ003	사과나무	강원
PQ19JC005	사과나무	충북	PQ19JC049	사과나무	충북	PQ19JC059	사과나무	충북
PQ19CJ029	사과나무	충북	PQ19JC050	사과나무	충북	PQ19JC060	사과나무	충북
PQ19JC007	사과나무	충북	PQ19JC051	사과나무	충북	PQ19CA028	배나무	충남
PQ19CJ031	사과나무	충북	PQ19CJ089	사과나무	충북	PQ19CA029	배나무	충남
PQ19CJ032	사과나무	충북	PQ19JC052	사과나무	충북	PQ19IC001	배나무	경기
PQ19CJ034	사과나무	충북	PQ19CJ090	사과나무	충북	PQ19IC002	배나무	경기
PQ19ES003	사과나무	충북	PQ19CJ091	사과나무	충북	PQ19IC003	배나무	경기
PQ19ES004	사과나무	충북	PQ19CJ093	사과나무	충북	PQ19IC004	배나무	경기
PQ19CJ037	사과나무	충북	PQ19CJ094	사과나무	충북	PQ19IC005	배나무	경기
PQ19CJ039	사과나무	충북	PQ19CJ095	사과나무	충북	PQ19CA030	사과나무	충남
PQ19CJ042	사과나무	충북	PQ19CJ096	사과나무	충북	PQ19CA031	사과나무	충남
PQ19CJ043	사과나무	충북	PQ19CJ097	사과나무	충북	PQ19JC061	사과나무	충북
PQ19CJ044	사과나무	충북	PQ19CJ098	사과나무	충북	PQ19JC062	사과나무	충북
PQ19CJ045	사과나무	충북	PQ19CJ099	사과나무	충북	PQ19CA032	배나무	충남
PQ19CJ047	사과나무	충북	PQ19CJ101	사과나무	충북	PQ19CA033	배나무	충남
PQ19CJ051	사과나무	충북	PQ19CJ102	사과나무	충북	PQ18PC004	사과나무	강원
PQ19CJ055	사과나무	충북	PQ19JC053	사과나무	충북	PQ18PC005	사과나무	강원
PQ19CJ056	사과나무	충북	PQ19JC054	사과나무	충북	PQ18PC006	사과나무	강원
PQ19CJ059	사과나무	충북	PQ19JC055	사과나무	충북	PQ18PC007	사과나무	강원
PQ19CJ061	사과나무	충북	PQ19JC056	사과나무	충북	PQ18PC008	사과나무	강원
PQ19CJ063	사과나무	충북	PQ19JC057	사과나무	충북	PQ18PC009	사과나무	강원
PQ19CJ066	사과나무	충북	PQ19JC058	사과나무	충북	PQ18WJ002	사과나무	강원
PQ19JC014	사과나무	충북	PQ19ES013	-	충북	PQ18WJ003	사과나무	강원
PQ19JC016	사과나무	충북	PQ19CJ103	사과나무	충북	PQ18WJ004	사과나무	강원
PQ19JC018	사과나무	충북	PQ19CJ104	사과나무	충북	PQ18WJ005	사과나무	강원
PQ19JC019	사과나무	충북	PQ19CJ105	사과나무	충북	PQ18WJ006	사과나무	강원

PQ19JC024	사과나무	충북	PQ19CJ106	사과나무	충북	PQ20JCCB001	사과나무	충북
PQ19JC027	사과나무	충북	PQ19CJ107	사과나무	충북	PQ20JCCB002	사과나무	충북
PQ19JC028	사과나무	충북	PQ19CJ108	사과나무	충북	PQ20JCCB003	사과나무	충북
PQ19JC031	사과나무	충북	PQ19CJ109	사과나무	충북	PQ20JCCB004	사과나무	충북
PQ19CJ070	사과나무	충북	PQ19CJ110	사과나무	충북	PQ21DY001	-	충북
PQ19CJ071	사과나무	충북	PQ19CJ111	사과나무	충북	PQ21DY002	-	충북
PQ19CJ078	사과나무	충북	PQ19AS001	배나무	경기	PQ21DY003	-	충북
PQ19CJ080	사과나무	충북	PQ19AS002	배나무	경기	PQ21DY004	-	충북
PQ19CJ033	사과나무	충북	PQ19CA026	배나무	충남	PQ21GS001	사과나무	충북
PQ19CJ035	사과나무	충북	PQ19CA027	배나무	충남	PQ21GS002	사과나무	충북
PQ19CJ036	사과나무	충북	PQ19AS003	배나무	경기	PQ21DJ001	사과나무	충남
PQ19CJ038	사과나무	충북	PQ19AS004	배나무	경기	PQ21DJ002	사과나무	충남
PQ19CJ039	사과나무	충북	PQ19AS005	배나무	경기	PQ21DJ003	-	충남
PQ19ES007	사과나무	충북	PQ19AS006	배나무	경기	PQ21DJ004	-	충남
PQ19ES008	사과나무	충북	PQ19YC001	사과나무	경기	PQ21YS001	-	충남
PQ19ES009	사과나무	충북	PQ19YC002	사과나무	경기	PQ21YS002	-	충남
PQ19ES010	사과나무	충북	PQ19YC006	사과나무	경기	PQ21YS003	사과나무	충남
샘플명	기주	분리지역	샘플명	기주	분리지역	샘플명	기주	분리지역
PQ21YS004	사과나무	충남	PQ21YJGB001	사과나무	경북	PQ21YI001	팔배나무	경기
PQ20ASCN001	사과나무	충남	PQ21YJGB002	사과나무	경북	PQ21YI002	꽃사과	경기
PQ20ASCN002	사과나무	충남	PQ20IS001	사과나무	전북	Ca11	-	USA
PQ21YW001	-	강원	PQ20IS002	사과나무	전북	Ea88	-	USA
PQ21YW002	-	강원	PQ21AD006	사과나무	경북	CND-63	-	Canada
PQ21YJ001	사과나무	경기	PQ21AD007	사과나무	경북	FR-86	모과나무	France
PQ21YJ002	사과나무	경기	PQ21AD008	사과나무	경북	SE-81	배나무	Sweden
PQ20GJ001	사과나무	경기	PQ21AD009	사과나무	경북	US-48	배나무	US
PQ20GJ002	사과나무	경기	PQ21AD005	사과나무	경북	IL-91	비파나무	Israel
PQ20YJGG001	사과나무	경기	PQ21WJ001	사과나무	강원	TR-68	배나무	Turkey
PQ20YJGG002	사과나무	경기	PQ21WJ002	사과나무	강원	MA-30	배나무	Morocco
PQ20PT001	배나무	경기	PQ21WJ003	사과나무	강원	US-03	-	US
PQ20PT002	배나무	경기	PQ21WJ004	사과나무	강원	1219	배나무	Poland
PQ20PT003	배나무	경기	PQ21DJ005	사과나무	충남	1376	섬개아광나무(장미과)	Belgium
PQ20PT004	배나무	경기	PQ21DJ006	사과나무	충남	1397	장미	Denmark
PQ21NYJ001	-	경기	PQ21GS003	사과나무	충북	3054	배	Germany
PQ21NYJ002	-	경기	PQ21GS004	사과나무	충북	IH3-1	-	US
PQ21AD001	사과나무	경북	PQ21ES001	배나무	충북	UTRJ2	-	US
PQ21AD002	사과나무	경북	PQ21ES002	팔배나무	충북	3470	사과나무	Turkey
PQ21AD003	-	경북	PQ21ES003	사과나무	충북	MR-1	-	US
PQ21AD004	-	경북	PQ21ES004	사과나무	충북	3745	배나무	-

- 각 과수화상병 분리주의 gDNA는 농림축산검역본부에서 분리하여 주관기관에 전달하였음. 각각의 gDNA는 shearing 작업을 통해 약 150bp 크기로 절단 한 후, Illumina 시퀀싱 장비에 사용가능한 바코드 어댑터를 결합하고 PCR 증폭을 통해 genomic library를 제작함.
- 분석에 사용된 모든 과수화상병 분리주는 각 샘플당 약 2Gb 정도를 시퀀싱하여 분석에 사용하였으며, 모든 시료는 Illumina 시퀀서인 Hiseq X 장비로 시퀀싱을 진행하였음.

표 3. 유전체 분석에 사용한 과수화상병 시료들의 NGS 전처리 통계치

샘플명	File name	No. of reads	Total Length	Genome cov.	샘플명	File name	No. of reads	Total Length	Genome cov.
PQ18AS001	0515-1_1.fastq	9,199,783	929,178,083	484.73	PQ19CJ045	CJ-212_1.fastq	8,974,091	1,355,087,741	706.91
	0515-1_2.fastq	9,199,783	929,178,083			CJ-212_2.fastq	8,974,091	1,355,087,741	
PQ18AS002	0515-4_1.fastq	9,371,418	946,513,218	493.77	PQ19CJ047	CJ-220_1.fastq	10,016,713	1,512,523,663	789.04
	0515-4_2.fastq	9,371,418	946,513,218			CJ-220_2.fastq	10,016,713	1,512,523,663	



PQ18CA001	0515-52_1.fastq	8,505,679	859,073,579	448.15	PQ19CJ051	CJ-244_1.fastq	8,821,679	1,332,073,529	694.90
	0515-52_2.fastq	8,505,679	859,073,579			CJ-244_2.fastq	8,821,679	1,332,073,529	
PQ18CA002	0515-53_1.fastq	8,109,760	819,085,760	427.29	PQ19CJ053	CJ249_1.fastq	7,933,369	1,197,938,719	624.93
	0515-53_2.fastq	8,109,760	819,085,760			CJ249_2.fastq	7,933,369	1,197,938,719	
PQ17CA001	0530-1_1.fastq	8,525,522	861,077,722	449.20	PQ19CJ055	CJ-254_1.fastq	7,609,388	1,149,017,588	599.41
	0530-1_2.fastq	8,525,522	861,077,722			CJ-254_2.fastq	7,609,388	1,149,017,588	
PQ17CA002	0530-2_1.fastq	8,538,806	862,419,406	449.90	PQ19CJ056	CJ-255_1.fastq	8,885,037	1,341,640,587	699.90
	0530-2_2.fastq	8,538,806	862,419,406			CJ-255_2.fastq	8,885,037	1,341,640,587	
PQ17CA003	0530-3_1.fastq	7,579,078	765,486,878	399.33	PQ19CJ058	CJ-260_1.fastq	8,472,746	1,279,384,646	667.42
	0530-3_2.fastq	7,579,078	765,486,878			CJ-260_2.fastq	8,472,746	1,279,384,646	
PQ18JC001	0601-1_1.fastq	9,509,268	960,436,068	501.03	PQ19CJ059	CJ-261_1.fastq	8,583,835	1,296,159,085	676.17
	0601-1_2.fastq	9,509,268	960,436,068			CJ-261_2.fastq	8,583,835	1,296,159,085	
PQ18JC002	0601-2_1.fastq	8,188,359	827,024,259	431.43	PQ19CJ061	CJ-269_1.fastq	8,167,561	1,233,301,711	643.38
	0601-2_2.fastq	8,188,359	827,024,259			CJ-269_2.fastq	8,167,561	1,233,301,711	
PQ18JC003	0601-3_1.fastq	9,437,940	953,231,940	497.27	PQ19CJ063	CJ-272_1.fastq	8,172,409	1,234,033,759	643.76
	0601-3_2.fastq	9,437,940	953,231,940			CJ-272_2.fastq	8,172,409	1,234,033,759	
PQ18JC004	0601-5_1.fastq	9,298,279	939,126,179	489.92	PQ19CJ064	CJ273_1.fastq	9,753,650	1,472,801,150	768.32
	0601-5_2.fastq	9,298,279	939,126,179			CJ273_2.fastq	9,753,650	1,472,801,150	
PQ18JC005	0601-7_1.fastq	9,090,305	918,120,805	478.96	PQ19CJ065	CJ274_1.fastq	9,489,558	1,432,923,258	747.51
	0601-7_2.fastq	9,090,305	918,120,805			CJ274_2.fastq	9,489,558	1,432,923,258	
PQ18JC006	0604-1P_1.fastq	9,464,012	955,865,212	498.65	PQ19CJ066	CJ-275_1.fastq	6,980,338	1,054,031,038	549.86
	0604-1P_2.fastq	9,464,012	955,865,212			CJ-275_2.fastq	6,980,338	1,054,031,038	
PQ18JC007	0604-2P_1.fastq	8,613,391	869,952,491	453.83	PQ19CJ067	CJ279_1.fastq	9,206,795	1,390,226,045	725.24
	0604-2P_2.fastq	8,613,391	869,952,491			CJ279_2.fastq	9,206,795	1,390,226,045	
PQ18JC008	0604-3P_1.fastq	9,574,808	967,055,608	504.49	PQ19CJ070	CJ-293_1.fastq	7,479,681	1,129,431,831	589.19
	0604-3P_2.fastq	9,574,808	967,055,608			CJ-293_2.fastq	7,479,681	1,129,431,831	
PQ17CA004	0608-1_1.fastq	8,188,340	827,022,340	431.43	PQ19CJ071	CJ-294_1.fastq	7,818,404	1,180,579,004	615.87
	0608-1_2.fastq	8,188,340	827,022,340			CJ-294_2.fastq	7,818,404	1,180,579,004	
PQ17CA005	0608-2_1.fastq	8,671,120	875,783,120	456.87	PQ19CJ005	CJ-31_1.fastq	10,969,961	1,656,464,111	864.13
	0608-2_2.fastq	8,671,120	875,783,120			CJ-31_2.fastq	10,969,961	1,656,464,111	
PQ17CA006	0608-3_1.fastq	9,542,604	963,803,004	502.79	PQ19CJ074	CJ312_1.fastq	7,476,177	1,128,902,727	588.92
	0608-3_2.fastq	9,542,604	963,803,004			CJ312_2.fastq	7,476,177	1,128,902,727	
PQ17CA007	0608-4_1.fastq	7,311,073	738,418,373	385.21	PQ19CJ075	CJ314_1.fastq	7,595,440	1,146,911,440	598.31
	0608-4_2.fastq	7,311,073	738,418,373			CJ314_2.fastq	7,595,440	1,146,911,440	
PQ17CA008	0608-5_1.fastq	8,103,338	818,437,138	426.96	PQ19CJ076	CJ315_1.fastq	8,450,102	1,275,965,402	665.63
	0608-5_2.fastq	8,103,338	818,437,138			CJ315_2.fastq	8,450,102	1,275,965,402	
PQ17AS001	0613A-1_1.fastq	8,796,139	888,410,039	463.46	PQ19CJ078	CJ-319_1.fastq	2,857,914	431,545,014	225.12
	0613A-1_2.fastq	8,796,139	888,410,039			CJ-319_2.fastq	2,857,914	431,545,014	
PQ17AS002	0613A-2_1.fastq	9,285,287	937,813,987	489.23	PQ19CJ080	CJ-324_1.fastq	8,553,823	1,291,627,273	673.80
	0613A-2_2.fastq	9,285,287	937,813,987			CJ-324_2.fastq	8,553,823	1,291,627,273	
PQ17AS003	0613A-3_1.fastq	7,314,005	738,714,505	385.37	PQ19CJ007	CJ-33_1.fastq	7,180,128	1,084,199,328	565.60
	0613A-3_2.fastq	7,314,005	738,714,505			CJ-33_2.fastq	7,180,128	1,084,199,328	
PQ17AS004	0613A-4_1.fastq	8,828,085	891,636,585	465.14	PQ19CJ085	CJ-347_1.fastq	8,745,735	1,320,605,985	688.92
	0613A-4_2.fastq	8,828,085	891,636,585			CJ-347_2.fastq	8,745,735	1,320,605,985	
PQ17AS005	0613A-5_1.fastq	7,315,092	738,824,292	385.42	PQ19CJ086	CJ-348_1.fastq	11,089,074	1,674,450,174	873.51
	0613A-5_2.fastq	7,315,092	738,824,292			CJ-348_2.fastq	11,089,074	1,674,450,174	
PQ17AS006	0613B-1_1.fastq	9,241,489	933,390,389	486.92	PQ19CJ087	CJ-355_1.fastq	8,288,313	1,251,535,263	652.89
	0613B-1_2.fastq	9,241,489	933,390,389			CJ-355_2.fastq	8,288,313	1,251,535,263	
PQ17AS007	0613B-2_1.fastq	8,935,953	902,531,253	470.82	PQ19CJ088	CJ-356_1.fastq	8,722,723	1,317,131,173	687.11
	0613B-2_2.fastq	8,935,953	902,531,253			CJ-356_2.fastq	8,722,723	1,317,131,173	
PQ17AS008	0613B-3_1.fastq	9,062,538	915,316,338	477.49	PQ19CJ089	CJ-359_1.fastq	12,490,136	1,886,010,536	983.88
	0613B-3_2.fastq	9,062,538	915,316,338			CJ-359_2.fastq	12,490,136	1,886,010,536	
PQ17AS009	0613B-4_1.fastq	8,853,385	894,191,885	466.47	PQ19CJ090	CJ-362_1.fastq	15,142,943	2,286,584,393	1192.85
	0613B-4_2.fastq	8,853,385	894,191,885			CJ-362_2.fastq	15,142,943	2,286,584,393	
PQ17AS010	0613B-5_1.fastq	6,756,465	682,402,965	355.99	PQ19CJ091	CJ-363_1.fastq	14,292,907	2,158,228,957	1125.89
	0613B-5_2.fastq	6,756,465	682,402,965			CJ-363_2.fastq	14,292,907	2,158,228,957	
PQ17AS011	0613C-1_1.fastq	10,226,897	1,032,916,597	538.84	PQ19CJ092	CJ-366_1.fastq	11,672,082	1,762,484,382	919.44
	0613C-1_2.fastq	10,226,897	1,032,916,597			CJ-366_2.fastq	11,672,082	1,762,484,382	
PQ17AS012	0613C-2_1.fastq	10,026,182	1,012,644,382	528.27	PQ19CJ093	CJ-367_1.fastq	12,732,332	1,922,582,132	1002.96
	0613C-2_2.fastq	10,026,182	1,012,644,382			CJ-367_2.fastq	12,732,332	1,922,582,132	
PQ17AS013	0613C-3_1.fastq	9,943,504	1,004,293,904	523.91	PQ19CJ094	CJ-370_1.fastq	13,247,547	2,000,379,597	1043.54
	0613C-3_2.fastq	9,943,504	1,004,293,904			CJ-370_2.fastq	13,247,547	2,000,379,597	
PQ17AS014	0613D-1-1_1.fastq	8,610,861	869,696,961	453.70	PQ19CJ095	CJ-371_1.fastq	13,933,941	2,104,025,091	1097.61
	0613D-1-1_2.fastq	8,610,861	869,696,961			CJ-371_2.fastq	13,933,941	2,104,025,091	
PQ17AS015	0613D-1-2_1.fastq	7,588,867	766,475,567	399.85	PQ19CJ096	CJ-372_1.fastq	14,316,005	2,161,716,755	1127.71
	0613D-1-2_2.fastq	7,588,867	766,475,567			CJ-372_2.fastq	14,316,005	2,161,716,755	
PQ17AS016	0613D-1-3_1.fastq	8,454,221	853,876,321	445.44	PQ19CJ097	CJ-375_1.fastq	13,756,306	2,077,202,206	1083.62

	0613D-1-3_2.fastq	8,454,221	853,876,321			CJ-375_2.fastq	13,756,306	2,077,202,206	
PQ17AS017	0613D-1-5_1.fastq	9,050,094	914,059,494	476.84	PQ19CJ098	CJ-379_1.fastq	5,931,666	895,681,566	467.25
	0613D-1-5_2.fastq	9,050,094	914,059,494			CJ-379_2.fastq	5,931,666	895,681,566	
PQ17AS018	0613D-2-1_1.fastq	8,856,302	894,486,502	466.63	PQ19CJ099	CJ-381_1.fastq	6,825,282	1,030,617,582	537.64
	0613D-2-1_2.fastq	8,856,302	894,486,502			CJ-381_2.fastq	6,825,282	1,030,617,582	
PQ17AS019	0613D-2-4_1.fastq	9,718,933	981,612,233	512.08	PQ19CJ100	CJ-382_1.fastq	6,101,160	921,275,160	480.60
	0613D-2-4_2.fastq	9,718,933	981,612,233			CJ-382_2.fastq	6,101,160	921,275,160	
PQ17AS020	0613D-2-5_1.fastq	8,926,906	901,617,506	470.35	PQ19CJ101	CJ-392_1.fastq	7,311,587	1,104,049,637	575.95
	0613D-2-5_2.fastq	8,926,906	901,617,506			CJ-392_2.fastq	7,311,587	1,104,049,637	
PQ17CA009	0614-KAM-1-1_1.fastq	8,835,197	892,354,897	465.52	PQ19CJ102	CJ-396_1.fastq	4,932,035	744,737,285	388.51
	0614-KAM-1-1_2.fastq	8,835,197	892,354,897			CJ-396_2.fastq	4,932,035	744,737,285	
PQ17CA010	0614-KAM-1-2_1.fastq	9,818,774	991,696,174	517.34	PQ19CJ002	CJ-4_1.fastq	7,094,431	1,071,259,081	558.85
	0614-KAM-1-2_2.fastq	9,818,774	991,696,174			CJ-4_2.fastq	7,094,431	1,071,259,081	
PQ17CA012	0614-KAM-2-1_1.fastq	9,901,562	1,000,057,762	521.70	PQ19CJ103	CJ-410_1.fastq	8,487,968	1,281,683,168	668.62
	0614-KAM-2-1_2.fastq	9,901,562	1,000,057,762			CJ-410_2.fastq	8,487,968	1,281,683,168	
PQ17CA013	0614-KAM-2-2_1.fastq	9,380,666	947,447,266	494.26	PQ19CJ104	CJ-414_1.fastq	6,977,396	1,053,586,796	549.63
	0614-KAM-2-2_2.fastq	9,380,666	947,447,266			CJ-414_2.fastq	6,977,396	1,053,586,796	
PQ17AS022	0615S1-2_1.fastq	9,590,976	968,688,576	505.34	PQ19CJ105	CJ-415_1.fastq	7,529,774	1,136,995,874	593.14
	0615S1-2_2.fastq	9,590,976	968,688,576			CJ-415_2.fastq	7,529,774	1,136,995,874	
PQ17AS023	0615S2-1_1.fastq	8,609,481	869,557,581	453.62	PQ19CJ106	CJ-421_1.fastq	6,402,139	966,722,989	504.31
	0615S2-1_2.fastq	8,609,481	869,557,581			CJ-421_2.fastq	6,402,139	966,722,989	
PQ17AS024	0615S2-2_1.fastq	8,783,360	887,119,360	462.78	PQ19CJ107	CJ-422_1.fastq	1,817,937	274,508,487	143.20
	0615S2-2_2.fastq	8,783,360	887,119,360			CJ-422_2.fastq	1,817,937	274,508,487	
PQ17AS021	0615-SIM-1-1_1.fastq	8,721,562	880,877,762	459.53	PQ19CJ108	CJ-426_1.fastq	1,469,925	221,958,675	115.79
	0615-SIM-1-1_2.fastq	8,721,562	880,877,762			CJ-426_2.fastq	1,469,925	221,958,675	
PQ17AS025	0616-JANG-1_1.fastq	12,245,925	1,236,838,425	645.22	PQ19CJ109	CJ-427_1.fastq	2,220,224	335,253,824	174.89
	0616-JANG-1_2.fastq	12,245,925	1,236,838,425			CJ-427_2.fastq	2,220,224	335,253,824	
PQ17AS026	0616-JANG-3_1.fastq	10,269,055	1,037,174,555	541.06	PQ19CJ110	CJ-442_1.fastq	2,174,268	328,314,468	171.27
	0616-JANG-3_2.fastq	10,269,055	1,037,174,555			CJ-442_2.fastq	2,174,268	328,314,468	
PQ17AS027	0720-1_1.fastq	11,030,795	1,114,110,295	581.20	PQ19CJ111	CJ-451_1.fastq	4,817,979	727,514,829	379.52
	0720-1_2.fastq	11,030,795	1,114,110,295			CJ-451_2.fastq	4,817,979	727,514,829	
PQ17AS028	0720-2_1.fastq	10,401,950	1,050,596,950	548.07	PQ19CJ112	CJ-453_1.fastq	10,057,063	1,518,616,513	792.22
	0720-2_2.fastq	10,401,950	1,050,596,950			CJ-453_2.fastq	10,057,063	1,518,616,513	
PQ17AS029	0720-3_1.fastq	10,725,119	1,083,237,019	565.09	PQ19CJ113	CJ-454_1.fastq	4,128,380	623,385,380	325.20
	0720-3_2.fastq	10,725,119	1,083,237,019			CJ-454_2.fastq	4,128,380	623,385,380	
PQ17AS030	0729-1_1.fastq	11,906,216	1,202,527,816	627.32	PQ19CJ114	CJ-456_1.fastq	6,662,020	1,005,965,020	524.78
	0729-1_2.fastq	11,906,216	1,202,527,816			CJ-456_2.fastq	6,662,020	1,005,965,020	
PQ17AS031	0729-3_1.fastq	10,249,957	1,035,245,657	540.06	PQ19CJ115	CJ-457_1.fastq	7,214,541	1,089,395,691	568.31
	0729-3_2.fastq	10,249,957	1,035,245,657			CJ-457_2.fastq	7,214,541	1,089,395,691	
PQ17AS032	0730-1_1.fastq	9,290,580	938,348,580	489.51	PQ19CJ116	CJ-460_1.fastq	5,179,370	782,084,870	407.99
	0730-1_2.fastq	9,290,580	938,348,580			CJ-460_2.fastq	5,179,370	782,084,870	
PQ17AS033	0730-2_1.fastq	8,616,272	870,243,472	453.98	PQ19CJ117	CJ-461_1.fastq	10,132,736	1,530,043,136	798.18
	0730-2_2.fastq	8,616,272	870,243,472			CJ-461_2.fastq	10,132,736	1,530,043,136	
PQ17AS034	0730-3_1.fastq	8,204,355	828,639,855	432.28	PQ19CJ118	CJ-469_1.fastq	5,720,312	863,767,112	450.60
	0730-3_2.fastq	8,204,355	828,639,855			CJ-469_2.fastq	5,720,312	863,767,112	
PQ17AS035	0730-4_1.fastq	10,101,064	1,020,207,464	532.21	PQ19CJ119	CJ-470_1.fastq	4,259,368	643,164,568	335.52
	0730-4_2.fastq	10,101,064	1,020,207,464			CJ-470_2.fastq	4,259,368	643,164,568	
PQ17AS036	0730-5_1.fastq	9,963,474	1,006,310,874	524.96	PQ19CJ014	CJ-81_1.fastq	8,498,325	1,283,247,075	669.43
	0730-5_2.fastq	9,963,474	1,006,310,874			CJ-81_2.fastq	8,498,325	1,283,247,075	
PQ17CA014	1106-1P-3_1.fastq	9,477,416	957,219,016	499.35	PQ19CJ015	CJ-85_1.fastq	8,455,172	1,276,730,972	666.03
	1106-1P-3_2.fastq	9,477,416	957,219,016			CJ-85_2.fastq	8,455,172	1,276,730,972	
PQ17CA015	1106-1P-4_1.fastq	9,884,325	998,316,825	520.79	PQ19CJ016	CJ-98_1.fastq	8,685,232	1,311,470,032	684.16
	1106-1P-4_2.fastq	9,884,325	998,316,825			CJ-98_2.fastq	8,685,232	1,311,470,032	
PQ17AS037	1107-11P_1.fastq	9,817,034	991,520,434	517.25	PQ19CJ017	CJ-99_1.fastq	7,385,610	1,115,227,110	581.78
	1107-11P_2.fastq	9,817,034	991,520,434			CJ-99_2.fastq	7,385,610	1,115,227,110	
PQ17AS038	1107-17P_1.fastq	8,971,862	906,158,062	472.72	PQ19ES001	ES1_1.fastq	9,680,716	1,461,788,116	762.57
	1107-17P_2.fastq	8,971,862	906,158,062			ES1_2.fastq	9,680,716	1,461,788,116	

PQ17AS039	1107-23P_1.fastq	10,967,439	1,107,711,339	577.86	PQ19ES002	ES2_1.fastq	12,720,774	1,920,836,874	1002.05
	1107-23P_2.fastq	10,967,439	1,107,711,339			ES2_2.fastq	12,720,774	1,920,836,874	
PQ17AS040	1109-379-16_1.fastq	9,937,359	1,003,673,259	523.59	PQ19ES007	ES-32_1.fastq	3,484,315	526,131,565	274.47
	1109-379-16_2.fastq	9,937,359	1,003,673,259			ES-32_2.fastq	3,484,315	526,131,565	
PQ17AS041	1109-379-18_1.fastq	8,440,801	852,520,901	444.74	PQ19ES008	ES-33_1.fastq	3,265,799	493,135,649	257.25
	1109-379-18_2.fastq	8,440,801	852,520,901			ES-33_2.fastq	3,265,799	493,135,649	
PQ18WJ001	AP3_1.fastq	9,022,473	911,269,773	475.38	PQ19ES009	ES-34_1.fastq	3,861,813	583,133,763	304.20
	AP3_2.fastq	9,022,473	911,269,773			ES-34_2.fastq	3,861,813	583,133,763	
PQ18CJ001	CB-P-2A_1.fastq	7,342,046	741,546,646	386.84	PQ19ES010	ES-35_1.fastq	3,289,938	496,780,638	259.16
	CB-P-2A_2.fastq	7,342,046	741,546,646			ES-35_2.fastq	3,289,938	496,780,638	
PQ18CJ002	CB-P-5B_1.fastq	7,680,687	775,749,387	404.69	PQ19ES011	ES-36_1.fastq	3,866,228	583,800,428	304.55
	CB-P-5B_2.fastq	7,680,687	775,749,387			ES-36_2.fastq	3,866,228	583,800,428	
PQ17XX001	FB16-0613-7_1.fastq	5,426,160	548,042,160	285.90	PQ19ES012	ES-44_1.fastq	11,095,778	1,675,462,478	874.04
	FB16-0613-7_2.fastq	5,426,160	548,042,160			ES-44_2.fastq	11,095,778	1,675,462,478	
PQ17XX004	FB17-10_1.fastq	8,317,314	840,048,714	438.23	PQ19ES013	ES-45_1.fastq	6,270,740	946,881,740	493.96
	FB17-10_2.fastq	8,317,314	840,048,714			ES-45_2.fastq	6,270,740	946,881,740	
PQ17XX005	FB17-11_1.fastq	8,860,389	894,899,289	466.84	PQ19ES003	ES-6_1.fastq	15,953,674	2,409,004,774	1256.71
	FB17-11_2.fastq	8,860,389	894,899,289			ES-6_2.fastq	15,953,674	2,409,004,774	
PQ17XX006	FB17-12_1.fastq	7,803,456	788,149,056	411.15	PQ19ES004	ES-8_1.fastq	16,810,890	2,538,444,390	1324.23
	FB17-12_2.fastq	7,803,456	788,149,056			ES-8_2.fastq	16,810,890	2,538,444,390	
PQ17XX007	FB17-13_1.fastq	9,343,548	943,698,348	492.30	PQ19IC004	IC-11_1.fastq	10,892,539	1,644,773,389	858.03
	FB17-13_2.fastq	9,343,548	943,698,348			IC-11_2.fastq	10,892,539	1,644,773,389	
PQ17XX008	FB17-14_1.fastq	9,009,911	910,001,011	474.72	PQ19IC005	IC-12_1.fastq	5,142,999	776,592,849	405.13
	FB17-14_2.fastq	9,009,911	910,001,011			IC-12_2.fastq	5,142,999	776,592,849	
PQ17XX009	FB17-15_1.fastq	9,263,488	935,612,288	488.08	PQ19IC001	IC-2_1.fastq	3,592,932	542,532,732	283.02
	FB17-15_2.fastq	9,263,488	935,612,288			IC-2_2.fastq	3,592,932	542,532,732	
PQ17XX002	FB17-8_1.fastq	9,428,353	952,263,653	496.77	PQ19IC002	IC-4_1.fastq	4,923,075	743,384,325	387.80
	FB17-8_2.fastq	9,428,353	952,263,653			IC-4_2.fastq	4,923,075	743,384,325	
PQ17XX003	FB17-9_1.fastq	8,957,789	904,736,689	471.98	PQ19IC003	IC-7_1.fastq	4,355,072	657,615,872	343.06
	FB17-9_2.fastq	8,957,789	904,736,689			IC-7_2.fastq	4,355,072	657,615,872	
PQ18PC001	PC1_1.fastq	8,152,238	823,376,038	429.53	PQ19JC030	JC100_1.fastq	5,626,357	849,579,907	443.20
	PC1_2.fastq	8,152,238	823,376,038			JC100_2.fastq	5,626,357	849,579,907	
PQ18PC002	PC2_1.fastq	6,892,000	696,092,000	363.13	PQ19JC031	JC-101_1.fastq	4,257,118	642,824,818	335.34
	PC2_2.fastq	6,892,000	696,092,000			JC-101_2.fastq	4,257,118	642,824,818	
PQ18PC003	PC3_1.fastq	8,738,666	882,605,266	460.43	PQ19JC033	JC-103_1.fastq	4,036,883	609,569,333	317.99
	PC3_2.fastq	8,738,666	882,605,266			JC-103_2.fastq	4,036,883	609,569,333	
PQ19CA001	1-1_1.fastq	9,557,580	1,443,194,580	752.87	PQ19JC005	JC-12_1.fastq	7,476,907	1,129,012,957	588.97
	1-1_2.fastq	9,557,580	1,443,194,580			JC-12_2.fastq	7,476,907	1,129,012,957	
PQ19CA002	1-2_1.fastq	9,786,125	1,477,704,875	770.88	PQ19JC035	JC-120_1.fastq	5,415,502	817,740,802	426.59
	1-2_2.fastq	9,786,125	1,477,704,875			JC-120_2.fastq	5,415,502	817,740,802	
PQ19CA009	1-3_1.fastq	10,592,539	1,599,473,389	834.40	PQ19JC036	JC-123_1.fastq	5,460,561	824,544,711	430.14
	1-3_2.fastq	10,592,539	1,599,473,389			JC-123_2.fastq	5,460,561	824,544,711	
PQ19CA010	1-4_1.fastq	9,957,361	1,503,561,511	784.36	PQ19JC037	JC134_1.fastq	5,428,120	819,646,120	427.59
	1-4_2.fastq	9,957,361	1,503,561,511			JC134_2.fastq	5,428,120	819,646,120	
PQ19CA015	1-5_1.fastq	11,992,187	1,810,820,237	944.65	PQ19JC038	JC-138_1.fastq	2,704,938	408,445,638	213.07
	1-5_2.fastq	11,992,187	1,810,820,237			JC-138_2.fastq	2,704,938	408,445,638	
PQ19CA016	1-6_1.fastq	11,084,922	1,673,823,222	873.19	PQ19JC039	JC-139_1.fastq	5,075,081	766,337,231	399.78
	1-6_2.fastq	11,084,922	1,673,823,222			JC-139_2.fastq	5,075,081	766,337,231	
PQ19CA017	1-7_1.fastq	10,795,334	1,630,095,434	850.37	PQ19JC040	JC-142_1.fastq	8,199,145	1,238,070,895	645.87
	1-7_2.fastq	10,795,334	1,630,095,434			JC-142_2.fastq	8,199,145	1,238,070,895	
PQ19CA018	1-8_1.fastq	10,493,831	1,584,568,481	826.62	PQ19JC041	JC-143_1.fastq	12,891,899	1,946,676,749	1015.53
	1-8_2.fastq	10,493,831	1,584,568,481			JC-143_2.fastq	12,891,899	1,946,676,749	
PQ19CJ001	2-1_1.fastq	11,174,456	1,687,342,856	880.24	PQ19JC042	JC-161_1.fastq	14,062,269	2,123,402,619	1107.72
	2-1_2.fastq	11,174,456	1,687,342,856			JC-161_2.fastq	14,062,269	2,123,402,619	
PQ19CJ004	2-2_1.fastq	10,303,562	1,555,837,862	811.64	PQ19JC043	JC-162_1.fastq	14,036,271	2,119,476,921	1105.67
	2-2_2.fastq	10,303,562	1,555,837,862			JC-162_2.fastq	14,036,271	2,119,476,921	
PQ19CJ006	2-3_1.fastq	11,057,439	1,669,673,289	871.02	PQ19JC044	JC-165_1.fastq	9,812,089	1,481,625,439	772.92
	2-3_2.fastq	11,057,439	1,669,673,289			JC-165_2.fastq	9,812,089	1,481,625,439	
PQ19JC001	2-4_1.fastq	10,316,877	1,557,848,427	812.68	PQ19JC045	JC-166_1.fastq	10,790,769	1,629,406,119	850.01
	2-4_2.fastq	10,316,877	1,557,848,427			JC-166_2.fastq	10,790,769	1,629,406,119	
PQ19JC003	2-5_1.fastq	11,889,145	1,795,260,895	936.54	PQ19JC046	JC-177_1.fastq	10,779,130	1,627,648,630	849.10
	2-5_2.fastq	11,889,145	1,795,260,895			JC-177_2.fastq	10,779,130	1,627,648,630	
PQ19JC004	2-6_1.fastq	11,078,042	1,672,784,342	872.64	PQ19JC047	JC-178_1.fastq	12,595,902	1,901,981,202	992.21
	2-6_2.fastq	11,078,042	1,672,784,342			JC-178_2.fastq	12,595,902	1,901,981,202	
PQ19JC006	2-7_1.fastq	10,154,530	1,533,334,030	799.90	PQ19JC048	JC-179_1.fastq	9,134,109	1,379,250,459	719.52
	2-7_2.fastq	10,154,530	1,533,334,030			JC-179_2.fastq	9,134,109	1,379,250,459	

PQ19CJ030	2-8_1.fastq	11,059,343	1,669,960,793	871.17	PQ19CJ049	JC-183_1.fastq	9,012,005	1,360,812,755	709.90
	2-8_2.fastq	11,059,343	1,669,960,793			JC-183_2.fastq	9,012,005	1,360,812,755	
PQ19CJ033	3-1_1.fastq	9,830,669	1,484,431,019	774.39	PQ19CJ050	JC-190_1.fastq	16,161,632	2,440,406,432	1273.09
	3-1_2.fastq	9,830,669	1,484,431,019			JC-190_2.fastq	16,161,632	2,440,406,432	
PQ19CJ035	3-2_1.fastq	13,720,089	2,071,733,439	1080.76	PQ19CJ051	JC-191_1.fastq	10,030,029	1,514,534,379	790.09
	3-2_2.fastq	13,720,089	2,071,733,439			JC-191_2.fastq	10,030,029	1,514,534,379	
PQ19CJ036	3-3_1.fastq	12,270,586	1,852,858,486	966.58	PQ19CJ052	JC-225_1.fastq	13,386,055	2,021,294,305	1054.45
	3-3_2.fastq	12,270,586	1,852,858,486			JC-225_2.fastq	13,386,055	2,021,294,305	
PQ19CJ038	3-4_1.fastq	11,874,085	1,792,986,835	935.35	PQ19CJ053	JC-233_1.fastq	7,382,906	1,114,818,806	581.57
	3-4_2.fastq	11,874,085	1,792,986,835			JC-233_2.fastq	7,382,906	1,114,818,806	
PQ19ES005	3-5_1.fastq	9,895,369	1,494,200,719	779.48	PQ19CJ054	JC-234_1.fastq	7,101,283	1,072,293,733	559.38
	3-5_2.fastq	9,895,369	1,494,200,719			JC-234_2.fastq	7,101,283	1,072,293,733	
PQ19ES006	3-6_1.fastq	11,709,321	1,768,107,471	922.37	PQ19CJ055	JC-241_1.fastq	4,099,786	619,067,686	322.95
	3-6_2.fastq	11,709,321	1,768,107,471			JC-241_2.fastq	4,099,786	619,067,686	
PQ19CJ060	3-7_1.fastq	11,345,488	1,713,168,688	893.71	PQ19CJ056	JC-246_1.fastq	4,596,632	694,091,432	362.09
	3-7_2.fastq	11,345,488	1,713,168,688			JC-246_2.fastq	4,596,632	694,091,432	
PQ19JC010	3-8_1.fastq	8,947,235	1,351,032,485	704.79	PQ19CJ057	JC-248_1.fastq	7,312,986	1,104,260,886	576.06
	3-8_2.fastq	8,947,235	1,351,032,485			JC-248_2.fastq	7,312,986	1,104,260,886	
PQ19JC011	4-1_1.fastq	9,928,676	1,499,230,076	782.11	PQ19CJ058	JC-251_1.fastq	6,510,251	983,047,901	512.83
	4-1_2.fastq	9,928,676	1,499,230,076			JC-251_2.fastq	6,510,251	983,047,901	
PQ19JC012	4-2_1.fastq	11,349,275	1,713,740,525	894.01	PQ19CJ059	JC-267_1.fastq	9,596,313	1,449,043,263	755.92
	4-2_2.fastq	11,349,275	1,713,740,525			JC-267_2.fastq	9,596,313	1,449,043,263	
PQ19JC013	4-3_1.fastq	8,733,374	1,318,739,474	687.95	PQ19CJ060	JC-272_1.fastq	18,965,520	2,863,793,520	1493.96
	4-3_2.fastq	8,733,374	1,318,739,474			JC-272_2.fastq	18,965,520	2,863,793,520	
PQ19JC015	4-4_1.fastq	8,636,544	1,304,118,144	680.32	PQ19CJ061	JC-276_1.fastq	11,309,104	1,707,674,704	890.84
	4-4_2.fastq	8,636,544	1,304,118,144			JC-276_2.fastq	11,309,104	1,707,674,704	
PQ19JC017	4-5_1.fastq	9,212,408	1,391,073,608	725.68	PQ19CJ062	JC-277_1.fastq	10,586,741	1,598,597,891	833.94
	4-5_2.fastq	9,212,408	1,391,073,608			JC-277_2.fastq	10,586,741	1,598,597,891	
PQ19JC020	4-6_1.fastq	9,253,568	1,397,288,768	728.93	PQ19CJ002	JC-3_1.fastq	8,618,830	1,301,443,330	678.93
	4-6_2.fastq	9,253,568	1,397,288,768			JC-3_2.fastq	8,618,830	1,301,443,330	
PQ19JC021	4-7_1.fastq	10,571,856	1,596,350,256	832.77	PQ19CJ007	JC-35_1.fastq	6,441,376	972,647,776	507.40
	4-7_2.fastq	10,571,856	1,596,350,256			JC-35_2.fastq	6,441,376	972,647,776	
PQ19JC029	4-8_1.fastq	9,225,547	1,393,057,597	726.72	PQ19CJ014	JC-56_1.fastq	6,394,132	965,513,932	503.68
	4-8_2.fastq	9,225,547	1,393,057,597			JC-56_2.fastq	6,394,132	965,513,932	
PQ19CJ082	5-1_1.fastq	10,489,363	1,583,893,813	826.27	PQ19CJ016	JC-64_1.fastq	6,607,691	997,761,341	520.50
	5-1_2.fastq	10,489,363	1,583,893,813			JC-64_2.fastq	6,607,691	997,761,341	
PQ19CJ083	5-2_1.fastq	8,767,276	1,323,858,676	690.62	PQ19CJ018	JC-66_1.fastq	9,622,280	1,452,964,280	757.97
	5-2_2.fastq	8,767,276	1,323,858,676			JC-66_2.fastq	9,622,280	1,452,964,280	
PQ19YC003	5-3_1.fastq	12,997,445	1,962,614,195	1023.84	PQ19CJ019	JC-68_1.fastq	3,473,458	524,492,158	273.61
	5-3_2.fastq	12,997,445	1,962,614,195			JC-68_2.fastq	3,473,458	524,492,158	
PQ19YC004	5-4_1.fastq	11,688,807	1,765,009,857	920.75	PQ19CJ024	JC-76_1.fastq	3,084,340	465,735,340	242.96
	5-4_2.fastq	11,688,807	1,765,009,857			JC-76_2.fastq	3,084,340	465,735,340	
PQ19YC005	5-5_1.fastq	10,566,974	1,595,613,074	832.39	PQ19CJ027	JC-83_1.fastq	3,142,724	474,551,324	247.56
	5-5_2.fastq	10,566,974	1,595,613,074			JC-83_2.fastq	3,142,724	474,551,324	
PQ19YC008	5-6_1.fastq	10,528,307	1,589,774,357	829.34	PQ19CJ028	JC-85_1.fastq	5,189,840	783,665,840	408.82
	5-6_2.fastq	10,528,307	1,589,774,357			JC-85_2.fastq	5,189,840	783,665,840	
PQ19CA012	Fireblight1_1.fastq	16,992,801	2,565,912,951	1338.56	PQ18PC004	PC13_1.fastq	8,095,372	1,222,401,172	637.69
	Fireblight1_2.fastq	16,992,801	2,565,912,951			PC13_2.fastq	8,095,372	1,222,401,172	
PQ19CJ018	Fireblight2_1.fastq	27,114,511	4,094,291,161	2135.87	PQ18PC005	PC15_1.fastq	10,445,945	1,577,337,695	822.85
	Fireblight2_2.fastq	27,114,511	4,094,291,161			PC15_2.fastq	10,445,945	1,577,337,695	
PQ19CA003	1_1.fastq	7,253,985	1,095,351,735	571.41	PQ18PC006	PC16_1.fastq	9,232,718	1,394,140,418	727.28
	1_2.fastq	7,253,985	1,095,351,735			PC16_2.fastq	9,232,718	1,394,140,418	
PQ19CA004	2_1.fastq	6,940,979	1,048,087,829	546.76	PQ18PC007	PC28_1.fastq	3,935,510	594,262,010	310.01
	2_2.fastq	6,940,979	1,048,087,829			PC28_2.fastq	3,935,510	594,262,010	
PQ19CA005	3_1.fastq	6,574,203	992,704,653	517.87	PQ18PC008	PC29_1.fastq	4,675,848	706,053,048	368.33
	3_2.fastq	6,574,203	992,704,653			PC29_2.fastq	4,675,848	706,053,048	
PQ19CA008	4_1.fastq	7,290,775	1,100,907,025	574.31	PQ18PC009	PC30_1.fastq	6,368,136	961,588,536	501.63
	4_2.fastq	7,290,775	1,100,907,025			PC30_2.fastq	6,368,136	961,588,536	
PQ19CA019	6_1.fastq	7,260,513	1,096,337,463	571.93	PQ19PJ004	PJ-12_1.fastq	8,582,072	1,295,892,872	676.03
	6_2.fastq	7,260,513	1,096,337,463			PJ-12_2.fastq	8,582,072	1,295,892,872	
PQ19CA021	7_1.fastq	7,507,965	1,133,702,715	591.42	PQ19PJ001	PJ-6_1.fastq	9,139,998	1,380,139,698	719.98
	7_2.fastq	7,507,965	1,133,702,715			PJ-6_2.fastq	9,139,998	1,380,139,698	
PQ19CA023	8_1.fastq	7,052,222	1,064,885,522	555.52	PQ19PJ002	PJ-7_1.fastq	11,562,709	1,745,969,059	910.82
	8_2.fastq	7,052,222	1,064,885,522			PJ-7_2.fastq	11,562,709	1,745,969,059	
PQ19CJ008	9_1.fastq	7,639,617	1,153,582,167	601.79	PQ19PJ003	PJ-9_1.fastq	9,830,872	1,484,461,672	774.40
	9_2.fastq	7,639,617	1,153,582,167			PJ-9_2.fastq	9,830,872	1,484,461,672	
PQ19CJ009	10_1.fastq	8,586,821	1,296,609,971	676.40	PQ19WJ001	WJ-1_1.fastq	15,289,927	2,308,778,977	1204.42
	10_2.fastq	8,586,821	1,296,609,971			WJ-1_2.fastq	15,289,927	2,308,778,977	
PQ19CJ010	11_1.fastq	7,696,006	1,162,096,906	606.23	PQ19WJ002	WJ-5_1.fastq	7,664,893	1,157,398,843	603.78
	11_2.fastq	7,696,006	1,162,096,906			WJ-5_2.fastq	7,664,893	1,157,398,843	

PQ19CJ011	12_1.fastq	6,958,727	1,050,767,777	548.16	PQ19WJ003	WJ-6_1.fastq	9,132,793	1,379,051,743	719.41
	12_2.fastq	6,958,727	1,050,767,777			WJ-6_2.fastq	9,132,793	1,379,051,743	
PQ19CJ012	13_1.fastq	8,132,949	1,228,075,299	640.65	PQ18WJ002	WJ-BP-5_1.fastq	4,073,600	615,113,600	320.89
	13_2.fastq	8,132,949	1,228,075,299			WJ-BP-5_2.fastq	4,073,600	615,113,600	
PQ19CJ013	14_1.fastq	7,841,094	1,184,005,194	617.66	PQ18WJ003	WJ-CP-3_1.fastq	22,912,122	3,459,730,422	1804.84
	14_2.fastq	7,841,094	1,184,005,194			WJ-CP-3_2.fastq	22,912,122	3,459,730,422	
PQ19CJ022	15_1.fastq	9,272,045	1,400,078,795	730.38	PQ18WJ004	WJ-GH200-P1_1.fastq	17,155,791	2,590,524,441	1351.40
	15_2.fastq	9,272,045	1,400,078,795			WJ-GH200-P1_2.fastq	17,155,791	2,590,524,441	
PQ19CJ024	16_1.fastq	8,063,400	1,217,573,400	635.17	PQ18WJ005	WJ-GH227-P2_1.fastq	10,883,655	1,643,431,905	857.33
	16_2.fastq	8,063,400	1,217,573,400			WJ-GH227-P2_2.fastq	10,883,655	1,643,431,905	
PQ19CJ054	17_1.fastq	6,613,763	998,678,213	520.98	PQ18WJ006	WJ-GH227-P4_1.fastq	11,492,471	1,735,363,121	905.29
	17_2.fastq	6,613,763	998,678,213			WJ-GH227-P4_2.fastq	11,492,471	1,735,363,121	
PQ19CJ057	18_1.fastq	6,692,895	1,010,627,145	527.22	PQ19YC002	YC-13_1.fastq	4,863,725	734,422,475	383.13
	18_2.fastq	6,692,895	1,010,627,145			YC-13_2.fastq	4,863,725	734,422,475	
PQ19JC008	19_1.fastq	6,984,020	1,054,587,020	550.15	PQ19YC006	YC-36_1.fastq	4,913,727	741,972,777	387.07
	19_2.fastq	6,984,020	1,054,587,020			YC-36_2.fastq	4,913,727	741,972,777	
PQ19JC009	20_1.fastq	6,726,037	1,015,631,587	529.83	PQ19YC007	YC-38_1.fastq	9,593,327	1,448,592,377	755.69
	20_2.fastq	6,726,037	1,015,631,587			YC-38_2.fastq	9,593,327	1,448,592,377	
PQ19CJ068	21_1.fastq	7,366,890	1,112,400,390	580.31	PQ19YC009	YC-47_1.fastq	8,590,093	1,297,104,043	676.66
	21_2.fastq	7,366,890	1,112,400,390			YC-47_2.fastq	8,590,093	1,297,104,043	
PQ19CJ069	22_1.fastq	8,474,301	1,279,619,451	667.54	PQ19YC001	YC-5_1.fastq	4,724,199	713,354,049	372.14
	22_2.fastq	8,474,301	1,279,619,451			YC-5_2.fastq	4,724,199	713,354,049	
PQ19CJ072	23_1.fastq	8,980,113	1,355,997,063	707.38	PQ21YS001	101-1_1.fastq	9,331,354	1,409,034,454	735.05
	23_2.fastq	8,980,113	1,355,997,063			101-1_2.fastq	9,331,354	1,409,034,454	
PQ19CJ073	24_1.fastq	9,405,217	1,420,187,767	740.87	PQ21YS002	101-2_1.fastq	9,012,718	1,360,920,418	709.95
	24_2.fastq	9,405,217	1,420,187,767			101-2_2.fastq	9,012,718	1,360,920,418	
PQ19CJ077	25_1.fastq	8,178,189	1,234,906,539	644.22	PQ21DJ003	111-1_1.fastq	8,324,819	1,257,047,669	655.77
	25_2.fastq	8,178,189	1,234,906,539			111-1_2.fastq	8,324,819	1,257,047,669	
PQ19CJ079	26_1.fastq	8,431,723	1,273,190,173	664.19	PQ21DJ004	111-2_1.fastq	7,409,348	1,118,811,548	583.65
	26_2.fastq	8,431,723	1,273,190,173			111-2_2.fastq	7,409,348	1,118,811,548	
PQ19CJ081	27_1.fastq	6,775,383	1,023,082,833	533.71	PQ21YJ001	133-1_1.fastq	8,379,322	1,265,277,622	660.06
	27_2.fastq	6,775,383	1,023,082,833			133-1_2.fastq	8,379,322	1,265,277,622	
PQ19CJ032	28_1.fastq	7,512,421	1,134,375,571	591.77	PQ21YJ002	133-2_1.fastq	8,056,153	1,216,479,103	634.60
	28_2.fastq	7,512,421	1,134,375,571			133-2_2.fastq	8,056,153	1,216,479,103	
PQ19CJ034	29_1.fastq	6,690,104	1,010,205,704	527.00	PQ21AD001	138-1_1.fastq	9,057,374	1,367,663,474	713.47
	29_2.fastq	6,690,104	1,010,205,704			138-1_2.fastq	9,057,374	1,367,663,474	
PQ19CJ084	31_1.fastq	8,992,875	1,357,924,125	708.39	PQ21AD002	138-2_1.fastq	11,204,876	1,691,936,276	882.63
	31_2.fastq	8,992,875	1,357,924,125			138-2_2.fastq	11,204,876	1,691,936,276	
PQ19CJ026	32_1.fastq	10,085,146	1,522,857,046	794.43	PQ21YS003	174-1_1.fastq	10,213,405	1,542,224,155	804.53
	32_2.fastq	10,085,146	1,522,857,046			174-1_2.fastq	10,213,405	1,542,224,155	
PQ19CJ028	33_1.fastq	9,202,457	1,389,571,007	724.90	PQ21YS004	174-4_1.fastq	10,534,375	1,590,690,625	829.82
	33_2.fastq	9,202,457	1,389,571,007			174-4_2.fastq	10,534,375	1,590,690,625	
PQ19CJ040	34_1.fastq	8,260,025	1,247,263,775	650.66	PQ21YJGB002	189-10_1.fastq	9,079,119	1,370,946,969	715.18
	34_2.fastq	8,260,025	1,247,263,775			189-10_2.fastq	9,079,119	1,370,946,969	
PQ19CJ041	35_1.fastq	12,834,690	1,938,038,190	1011.02	PQ21YJGB001	189-9_1.fastq	9,037,114	1,364,604,214	711.87
	35_2.fastq	12,834,690	1,938,038,190			189-9_2.fastq	9,037,114	1,364,604,214	
PQ19CJ046	36_1.fastq	11,134,379	1,681,291,229	877.08	PQ21GS001	205-1_1.fastq	8,796,014	1,328,198,114	692.88
	36_2.fastq	11,134,379	1,681,291,229			205-1_2.fastq	8,796,014	1,328,198,114	
PQ19CJ048	37_1.fastq	11,180,097	1,688,194,647	880.68	PQ21GS002	205-2_1.fastq	7,211,092	1,088,874,892	568.03
	37_2.fastq	11,180,097	1,688,194,647			205-2_2.fastq	7,211,092	1,088,874,892	
PQ19CJ049	38_1.fastq	9,327,375	1,408,433,625	734.74	PQ21AD003	241-1_1.fastq	9,106,046	1,375,012,946	717.30
	38_2.fastq	9,327,375	1,408,433,625			241-1_2.fastq	9,106,046	1,375,012,946	
PQ19CJ050	39_1.fastq	10,445,814	1,577,317,914	822.84	PQ21AD004	241-2_1.fastq	8,434,175	1,273,560,425	664.38
	39_2.fastq	10,445,814	1,577,317,914			241-2_2.fastq	8,434,175	1,273,560,425	
PQ19CJ052	40_1.fastq	7,753,282	1,170,745,582	610.74	PQ20GJ001	297-1_1.fastq	8,508,770	1,284,824,270	670.26
	40_2.fastq	7,753,282	1,170,745,582			297-1_2.fastq	8,508,770	1,284,824,270	
PQ19CJ062	42_1.fastq	10,079,348	1,521,981,548	793.97	PQ20GJ002	297-2_1.fastq	7,869,613	1,188,311,563	619.91
	42_2.fastq	10,079,348	1,521,981,548			297-2_2.fastq	7,869,613	1,188,311,563	
PQ19JC022	43_1.fastq	10,252,541	1,548,133,691	807.62	PQ20ASCN001	390-5_1.fastq	7,697,487	1,162,320,537	606.35
	43_2.fastq	10,252,541	1,548,133,691			390-5_2.fastq	7,697,487	1,162,320,537	
PQ19JC0223	44_1.fastq	8,595,828	1,297,970,028	677.11	PQ20ASCN002	392-2_1.fastq	7,168,987	1,082,517,037	564.72
	44_2.fastq	8,595,828	1,297,970,028			392-2_2.fastq	7,168,987	1,082,517,037	
PQ19JC025	45_1.fastq	8,370,682	1,263,972,982	659.38	PQ20YJGG001	418-3_1.fastq	7,669,799	1,158,139,649	604.17
	45_2.fastq	8,370,682	1,263,972,982			418-3_2.fastq	7,669,799	1,158,139,649	
PQ19JC026	46_1.fastq	10,182,485	1,537,555,235	802.10	PQ20YJGG002	418-5_1.fastq	9,081,821	1,371,354,971	715.40
	46_2.fastq	10,182,485	1,537,555,235			418-5_2.fastq	9,081,821	1,371,354,971	

PQ19AS003	AS-14_1.fastq	1,860,875	280,992,125	146.59	PQ20JCCB003	430-1_1.fastq	13,114,429	1,980,278,779	1033.05
	AS-14_2.fastq	1,860,875	280,992,125			430-1_2.fastq	13,114,429	1,980,278,779	
PQ19AS004	AS-15_1.fastq	1,813,332	273,813,132	142.84	PQ20JCCB004	430-2_1.fastq	10,247,533	1,547,377,483	807.22
	AS-15_2.fastq	1,813,332	273,813,132			430-2_2.fastq	10,247,533	1,547,377,483	
PQ19AS005	AS-18_1.fastq	2,177,260	328,766,260	171.51	PQ20PT001	436-5_1.fastq	9,237,077	1,394,798,627	727.63
	AS-18_2.fastq	2,177,260	328,766,260			436-5_2.fastq	9,237,077	1,394,798,627	
PQ19AS006	AS-19_1.fastq	5,435,374	820,741,474	428.16	PQ20PT002	436-8_1.fastq	11,524,067	1,740,134,117	907.78
	AS-19_2.fastq	5,435,374	820,741,474			436-8_2.fastq	11,524,067	1,740,134,117	
PQ19AS001	AS-3_1.fastq	2,327,685	351,480,435	183.36	PQ20PT003	437-1_1.fastq	12,293,486	1,856,316,386	968.39
	AS-3_2.fastq	2,327,685	351,480,435			437-1_2.fastq	12,293,486	1,856,316,386	
PQ19AS002	AS-7_1.fastq	1,708,590	257,997,090	134.59	PQ20PT004	437-2_1.fastq	12,916,259	1,950,355,109	1017.44
	AS-7_2.fastq	1,708,590	257,997,090			437-2_2.fastq	12,916,259	1,950,355,109	
PQ19CA030	CA-102_1.fastq	5,581,222	842,764,522	439.65	PQ21NYJ001	52-5_1.fastq	7,162,095	1,081,476,345	564.18
	CA-102_2.fastq	5,581,222	842,764,522			52-5_2.fastq	7,162,095	1,081,476,345	
PQ19CA031	CA-103_1.fastq	11,910,755	1,798,524,005	938.24	PQ21NYJ002	52-6_1.fastq	7,596,190	1,147,024,690	598.37
	CA-103_2.fastq	11,910,755	1,798,524,005			52-6_2.fastq	7,596,190	1,147,024,690	
PQ19CA006	CA-11_1.fastq	8,817,022	1,331,370,322	694.54	PQ21DY001	73-1_1.fastq	7,265,246	1,097,052,146	572.30
	CA-11_2.fastq	8,817,022	1,331,370,322			73-1_2.fastq	7,265,246	1,097,052,146	
PQ19CA032	CA-139_1.fastq	9,453,806	1,427,524,706	744.70	PQ21DY002	73-3_1.fastq	6,487,652	979,635,452	511.05
	CA-139_2.fastq	9,453,806	1,427,524,706			73-3_2.fastq	6,487,652	979,635,452	
PQ19CA033	CA-140_1.fastq	9,111,584	1,375,849,184	717.74	PQ21DY003	74-7_1.fastq	8,056,631	1,216,551,281	634.64
	CA-140_2.fastq	9,111,584	1,375,849,184			74-7_2.fastq	8,056,631	1,216,551,281	
PQ19CA007	CA-17_1.fastq	9,680,264	1,461,719,864	762.54	PQ21DY004	74-8_1.fastq	7,729,113	1,167,096,063	608.84
	CA-17_2.fastq	9,680,264	1,461,719,864			74-8_2.fastq	7,729,113	1,167,096,063	
PQ19CA011	CA-44_1.fastq	7,453,738	1,125,514,438	587.15	PQ21YW001	75-1_1.fastq	10,362,790	1,564,781,290	816.30
	CA-44_2.fastq	7,453,738	1,125,514,438			75-1_2.fastq	10,362,790	1,564,781,290	
PQ19CA013	CA-47_1.fastq	9,190,001	1,387,690,151	723.92	PQ21YW002	75-2_1.fastq	10,964,188	1,655,592,388	863.67
	CA-47_2.fastq	9,190,001	1,387,690,151			75-2_2.fastq	10,964,188	1,655,592,388	
PQ19CA014	CA-51_1.fastq	9,976,278	1,506,417,978	785.85	PQ21DJ001	86-1_1.fastq	7,114,316	1,074,261,716	560.41
	CA-51_2.fastq	9,976,278	1,506,417,978			86-1_2.fastq	7,114,316	1,074,261,716	
PQ19CA020	CA-71_1.fastq	9,868,181	1,490,095,331	777.34	PQ21DJ002	86-2_1.fastq	7,630,360	1,152,184,360	601.06
	CA-71_2.fastq	9,868,181	1,490,095,331			86-2_2.fastq	7,630,360	1,152,184,360	
PQ19CA022	CA-75_1.fastq	9,421,174	1,422,597,274	742.13	PQ20IS001	lksan-1_1.fastq	10,603,178	1,601,079,878	835.24
	CA-75_2.fastq	9,421,174	1,422,597,274			lksan-1_2.fastq	10,603,178	1,601,079,878	
PQ19CA024	CA-79_1.fastq	11,662,603	1,761,053,053	918.69	PQ20IS002	lksan-2_1.fastq	8,784,250	1,326,421,750	691.96
	CA-79_2.fastq	11,662,603	1,761,053,053			lksan-2_2.fastq	8,784,250	1,326,421,750	
PQ19CA025	CA-80_1.fastq	6,819,621	1,029,762,771	537.20	PQ20JCCB001	Jincheon-1_1.fastq	10,090,992	1,523,739,792	794.89
	CA-80_2.fastq	6,819,621	1,029,762,771			Jincheon-1_2.fastq	10,090,992	1,523,739,792	
PQ19CA026	CA-87_1.fastq	2,274,558	343,458,258	179.17	PQ20JCCB002	Jincheon-2_1.fastq	10,116,290	1,527,559,790	796.88
	CA-87_2.fastq	2,274,558	343,458,258			Jincheon-2_2.fastq	10,116,290	1,527,559,790	
PQ19CA027	CA-88_1.fastq	1,997,846	301,674,746	157.38	CND-63	5-7_1.fastq	11,815,994	1,784,215,094	930.77
	CA-88_2.fastq	1,997,846	301,674,746			5-7_2.fastq	11,815,994	1,784,215,094	
PQ19CA028	CA-93_1.fastq	5,689,391	859,098,041	448.17	US-48	5-8_1.fastq	10,672,663	1,611,572,113	840.71
	CA-93_2.fastq	5,689,391	859,098,041			5-8_2.fastq	10,672,663	1,611,572,113	
PQ19CA029	CA-94_1.fastq	5,835,870	881,216,370	459.71	FR-86	48_1.fastq	9,096,641	1,373,592,791	716.56
	CA-94_2.fastq	5,835,870	881,216,370			48_2.fastq	9,096,641	1,373,592,791	
PQ19CJ019	CJ-112_1.fastq	7,162,020	1,081,465,020	564.17	SE-81	49_1.fastq	8,979,150	1,355,851,650	707.31
	CJ-112_2.fastq	7,162,020	1,081,465,020			49_2.fastq	8,979,150	1,355,851,650	
PQ19CJ020	CJ-115_1.fastq	7,982,796	1,205,402,196	628.82	IL-91	50_1.fastq	8,447,691	1,275,601,341	665.44
	CJ-115_2.fastq	7,982,796	1,205,402,196			50_2.fastq	8,447,691	1,275,601,341	
PQ19CJ021	CJ-116_1.fastq	7,866,721	1,187,874,871	619.68	TR-68	51_1.fastq	8,847,147	1,335,919,197	696.91
	CJ-116_2.fastq	7,866,721	1,187,874,871			51_2.fastq	8,847,147	1,335,919,197	
PQ19CJ023	CJ-125_1.fastq	9,702,468	1,465,072,668	764.29	MA-30	52_1.fastq	8,225,019	1,241,977,869	647.90
	CJ-125_2.fastq	9,702,468	1,465,072,668			52_2.fastq	8,225,019	1,241,977,869	
PQ19CJ025	CJ-137_1.fastq	8,786,736	1,326,797,136	692.15	US-03	53_1.fastq	8,769,028	1,324,123,228	690.76
	CJ-137_2.fastq	8,786,736	1,326,797,136			53_2.fastq	8,769,028	1,324,123,228	
PQ19CJ027	CJ-141_1.fastq	7,316,994	1,104,866,094	576.38	1219	1219_1.fastq	3,788,505	572,064,255	298.43
	CJ-141_2.fastq	7,316,994	1,104,866,094			1219_2.fastq	3,788,505	572,064,255	
PQ19CJ029	CJ-144_1.fastq	7,485,956	1,130,379,356	589.69	1376	1376_1.fastq	5,358,736	809,169,136	422.12
	CJ-144_2.fastq	7,485,956	1,130,379,356			1376_2.fastq	5,358,736	809,169,136	
PQ19CJ031	CJ-149_1.fastq	9,306,911	1,405,343,561	733.13	1397	1397_1.fastq	4,397,567	664,032,617	346.41
	CJ-149_2.fastq	9,306,911	1,405,343,561			1397_2.fastq	4,397,567	664,032,617	
PQ19CJ032	CJ-154_1.fastq	10,406,242	1,571,342,542	819.72	3054	3054_1.fastq	4,075,838	615,451,538	321.06
	CJ-154_2.fastq	10,406,242	1,571,342,542			3054_2.fastq	4,075,838	615,451,538	
PQ19CJ034	CJ-163_1.fastq	10,882,826	1,643,306,726	857.27	3470	3470_1.fastq	5,747,717	867,905,267	452.76
	CJ-163_2.fastq	10,882,826	1,643,306,726			3470_2.fastq	5,747,717	867,905,267	
PQ19CJ003	CJ-17_1.fastq	7,367,327	1,112,466,377	580.34	3745	3745_1.fastq	10,693,509	1,614,719,859	842.35
	CJ-17_2.fastq	7,367,327	1,112,466,377			3745_2.fastq	10,693,509	1,614,719,859	
PQ19CJ037	CJ-187_1.fastq	13,788,138	2,082,008,838	1086.12	IH3-1	IH3-1_1.fastq	3,556,324	537,004,924	280.14
	CJ-187_2.fastq	13,788,138	2,082,008,838			IH3-1_2.fastq	3,556,324	537,004,924	

PQ19CJ039	CJ-193_1.fastq	12,639,915	1,908,627,165	995.68	MR-1	MR1_1.fastq	5,825,572	879,661,372	458.89
	CJ-193_2.fastq	12,639,915	1,908,627,165			MR1_2.fastq	5,825,572	879,661,372	
PQ19CJ042	CJ-204_1.fastq	8,025,295	1,211,819,545	632.17	UTRJ-2	UTRJ2_1.fastq	5,924,976	894,671,376	466.72
	CJ-204_2.fastq	8,025,295	1,211,819,545			UTRJ2_2.fastq	5,924,976	894,671,376	
PQ19CJ043	CJ-206_1.fastq	7,858,520	1,186,636,520	619.03	Ca11	Ca11_1.fastq	11,813,896	1,783,898,296	930.61
	CJ-206_2.fastq	7,858,520	1,186,636,520			Ca11_2.fastq	11,813,896	1,783,898,296	
PQ19CJ044	CJ-210_1.fastq	7,676,145	1,159,097,895	604.67	Ea88	Ea88_1.fastq	11,198,826	1,691,022,726	882.16
	CJ-210_2.fastq	7,676,145	1,159,097,895			Ea88_2.fastq	11,198,826	1,691,022,726	

## 나. 과수화상병균의 whole genome 시퀀스 유전체 분석 방법

### 1. Sequence pre-processing

- Illumina Hiseq 장비를 사용하여 시퀀싱을 진행한 후 short reads의 전처리 과정을 위하여 SolexaQA(v.1.13) package의 Dynamic Trim과 Length Sort 프로그램을 사용함.
- Dynamic Trim은 phred score에 따라 short read의 양쪽 끝의 bad quality base를 잘라내고 양질의 cleaned read로 정제하는 과정을 수행하며, Length Sort는 Dynamic Trim에서 많은 base가 잘린 read를 제거하는 과정을 수행.
- Dynamic Trim의 phred score  $\geq 20$ 을, Length Sort 과정은 short read length  $\geq 25$ bp 사용.

### 2. Alignment to reference genome

- 전처리 과정을 통과한 cleaned reads를 BWA (0.6.1-r104) 프로그램을 사용하여 표준유전체에 mapping을 수행.
- Mapping은 reference genome 와 시퀀싱한 샘플간의 raw SNP을 detection하기 위한 선행 과정으로서 BAM format의 파일을 생성하며, 다음의 옵션 이외에는 기본값을 사용.
  - seed length (-l) = 30
  - maximum differences in the seed (-k) = 1
  - number of threads (-t) = 16
  - mismatch penalty (-M) = 6
  - gap open penalty (-O) = 15
  - gap extension penalty (-E) = 8

### 3. Raw SNP detection 및 Consensus sequence 추출

- Clean reads를 표준유전체에 mapping하여 생성된 BAM format의 파일을 SAMtools (0.1.16) 프로그램을 사용하여 raw SNP를 detection하고, consensus sequence를 추출.
- 이때, SNP detection하는 과정 전에 SEEDERS in-house script를 사용하여 SNP validation을 거친 후, raw SNP detection을 수행함. 다음의 옵션 이외에는 기본값을 사용.
  - minimum mapping quality for SNPs (-Q) = 30
  - minimum mapping quality for gaps (-q) = 15
  - minimum read depth (-d) = 3
  - maximum read depth (-D) = 597
  - min indel score for nearby SNP filtering (-G) = 30
  - SNP within INT bp around a gap to be filtered (-w) = 15
  - window size for filtering dense SNPs (-W) = 30

#### 4. Generate SNP matrix

- 분석대상 간의 SNP 비교분석을 수행하기 위해 샘플간 통합 SNP matrix를 작성.
- 각 샘플을 표준유전체와 비교하여 얻은 raw SNP position을 후보로 하여 합집합의 리스트를 구축하고, 이때 빈 영역(non-SNP loci)은 샘플의 consensus sequence로부터 채워 넣는 filtering 과정을 거쳐 matrix 작성.
- 이후 샘플 간의 SNP 비교를 통해 mis-calling SNP 좌를 필터하여 final SNP matrix를 작성함. 해당 좌를 기반으로 SNP를 유형 구분 기준에 따라 분류.

\*\*\* SNP 유형 구분 기준 \*\*\*

- ◆ **Homozygous:** read rate  $\geq 90\%$
- ◆ **Heterozygous:**  $40\% \leq \text{read rate} \leq 60\%$
- ◆ **Etc.:**  $20\% \leq \text{read rate} < 40\%$ , and  $60\% < \text{read rate} < 90\%$

\*\*\* Nucleotide N, n 의 차이 \*\*\*

- ◆ 소문자 'n'은 해당 SNP 좌에 read mapping이 안 되어 missing을 의미하며,
- ◆ 대문자 'N'은 read mapping은 되었지만 mapped read가 여러 염기서열로 혼재하게 mapping되어 해당 좌의 염기서열을 구분 지을 수 없는 경우를 의미함.

#### 5. SNP filtering

- 분석에 이용 가능한 수준의 SNP marker는 아래 기준으로 필터를 수행.

표 4. 유전체 분석에 사용한 genome-wide SNP 마커의 필터 과정

No.	필터 조건	SNP matrix loci
1	Total SNP (360 개체)	46,175
2	국내종 샘플 (343개체) Total SNP	644
3	<b>min. depth <math>\geq 100</math></b>	<b>621</b>
4	min. depth $\geq 100$ & $FST > 0.2$	25
5	min. depth $\geq 100$ & $FST > 0.1$	46
6	<b>min. depth <math>\geq 100</math> &amp; <math>FST &gt; 0.01</math></b>	<b>144</b>

#### 다. 과수화상병 genome-wide SNP 마커를 이용한 역학조사 분석

##### 1. 과수화상병 유전자변이형 분석을 위한 reference 샘플 선발

- 3차년도까지 분리한 과수화상병 360개 분리주의 전체염기서열분석(Whole genome sequencing) 결과를 이용하여 phylogenetic tree 분석을 수행(그림 7).
- Genome-wide SNP 마커 621개를 이용해서 국내외 과수화상병 분리주 360개의 phylogenetic tree를 제작하였으며(그림 7, 7-A), gwSNP 마커 144개를 이용해서 국외 분리주를 제외한 국내 분리주 343의 phylogenetic tree 분석을 수행함(그림 7-B)
- Phylogenetic tree 분석은 Neighbor-joining method를 이용하여 실시하였으며 bootstrap은 1000으로 수행함.
- 과수화상병균은 약 3.8Mb 정도의 게놈 크기를 가지고 있으며, 분석에 사용한 국내외 360개 분리주의 경우 약 46,000여개의 SNP를 확인확인 할 수 있었음(표 4)



- 국내외 분리주를 포함할 경우 약 1% 정도의 다양성을 확인할 수 있었으며 국내 분리주들은 약 600여개의 SNP만 확인 할 수 있었음.
- 이러한 결과는 국내에서 분리한 과수화상병 분리주의 경우 유전적으로 매우 가까운 관계를 가지고 있는 것을 확인 할 수 있으며 국내외 분리주를 대상으로 phylogenetic tree 분석을 통해서도 국내 분리주들이 하나의 clade로 묶이는 것을 확인할 수 있음(그림 7-A).
- 국내 과수화상병의 국내 발생 경로 분석을 위해서 Fst 필터링을 통해 SNP 마커 144개를 선발하였음(표 4).
- 144개의 SNP 마커를 이용하여 국내 분리주 343를 대상으로 phylogenetic tree 분석 결과 발생 지역별로 유전적인 차이를 잘 확인 할 수 있었음.
- 국내 분리주들의 유전적인 차이를 보다 효과적으로 분석하기 위해서 phylogenetic tree 결과의 각 clade 별 대표 분리주를 선발하여 역학조사를 위한 reference 분리주로 사용하였음(그림 7-D).
- 선발된 reference 분리주를 이용한 phylogenetic tree 결과를 보면 360개의 분리주의 결과와 유사한 패턴을 보이는 것을 확인할 수 있으며, 이렇게 선발된 reference 분리주를 이용해서 새로운 지역에서 발생한 과수화상병 분리주를 중심으로 역학조사를 수행하였음.

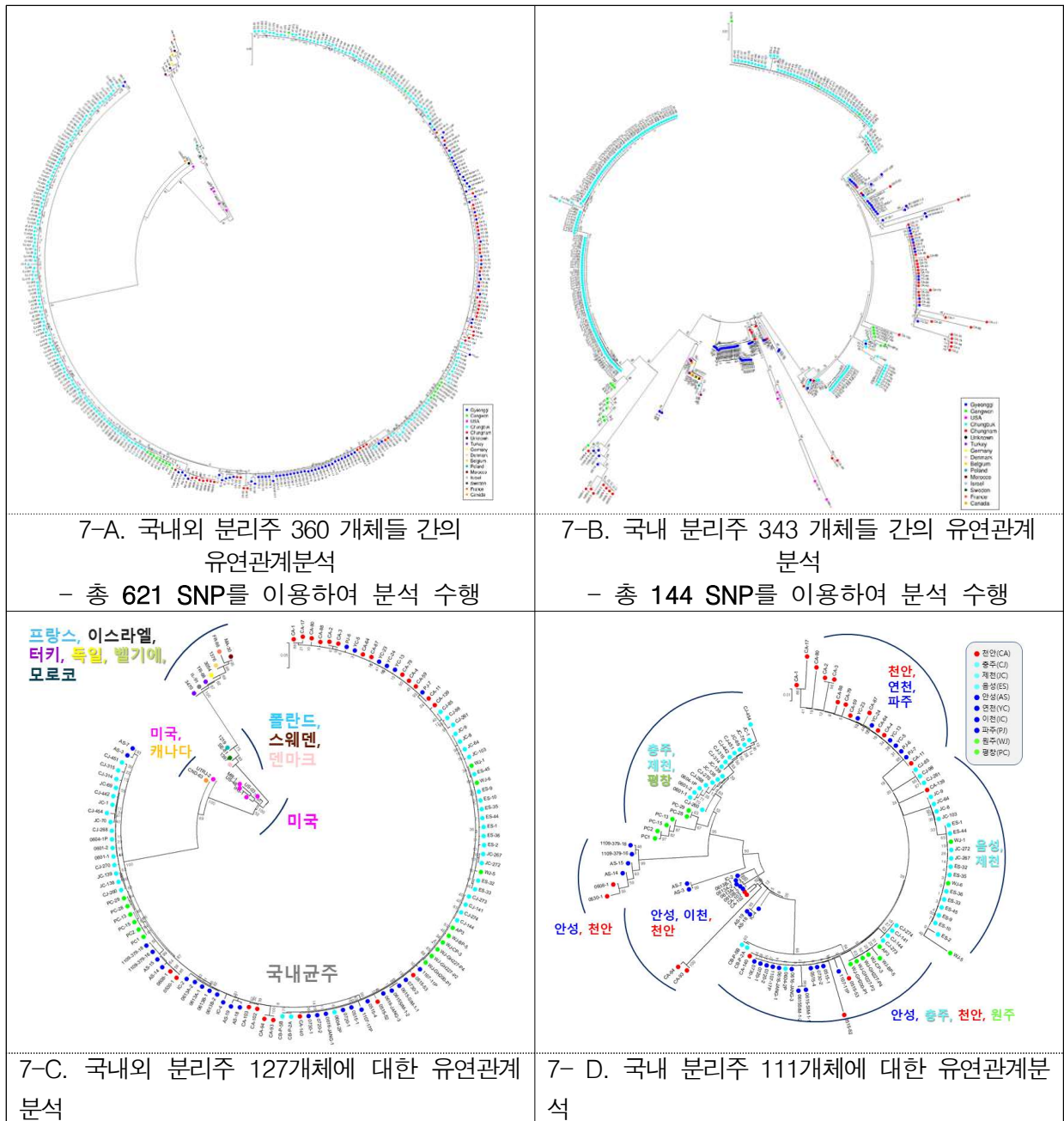


그림 7. 국내의 과수화상병상병 분리주의 유연관계분석

## 2. 국내의 과수화상병 분리주의 Genetic distance 분석

- 통계 프로그램 R의 Nei(1987) method를 이용하여 유전적 거리에 대한 heat map을 구축
- 분석에 사용된 국내외 과수화상병 분리주 360개를 이용하여 각 지역별 국가별 유전적인 거리를 확인함
- Phylogenetic tree 결과와 같이 국내 분리주들은 해외 균주들 중에서 캐나다 미국 분리주와 가장 가까운 것을 확인할 수 있으며 국내 분리주들 간에는 유전적으로 매우 가까운 것을 확인 할 수 있음(그림 8).

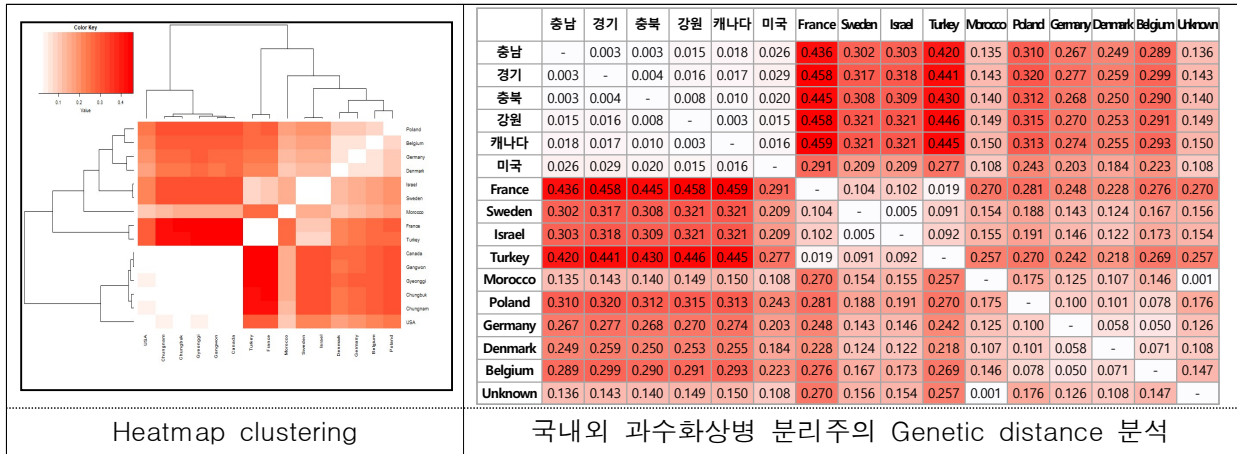


그림 8. 국내외 과수화상병 분리주 집단을 이용한 Genetic distance 분석

### 3. 국내외 과수화상병 분리주의 Genetic Structure 분석

- 선발된 SNP 마커 세트를 이용하여 STRUCTURE v2.3.4 프로그램으로 population structure 분석을 수행함(그림 9 A, B).
- 분석에 사용한 과수화상병균 분리주들의 유전적 background를 확인 할 수 있으며, Delta K 분석을 통해 몇 개의 population으로 유전적 background가 구성되어 있는지 확인 할 수 있음.
- 국내외 분리주 360 개체들의 분석의 경우 Delta K =2 값이 매우 크게 428로 나타난 것을 확인할 수 있으며 이는 해외균주와 국내분리균주와의 유전적인 차이가 크다는 것을 나타내며 K=4 값도 130으로 나타나 국내 분리주의 경우는 대략 3개의 population으로 나누어 지는 것을 알 수 있음.
- 국내 분리주 343 개체들의 분석의 경우 Delta K=3 값이 가장 크게 106이 나왔으며 작게는 K=9 값에서 8으로 나타나 세부적으로 9개의 population으로 나누어 지는 것을 확인할 수 있음.

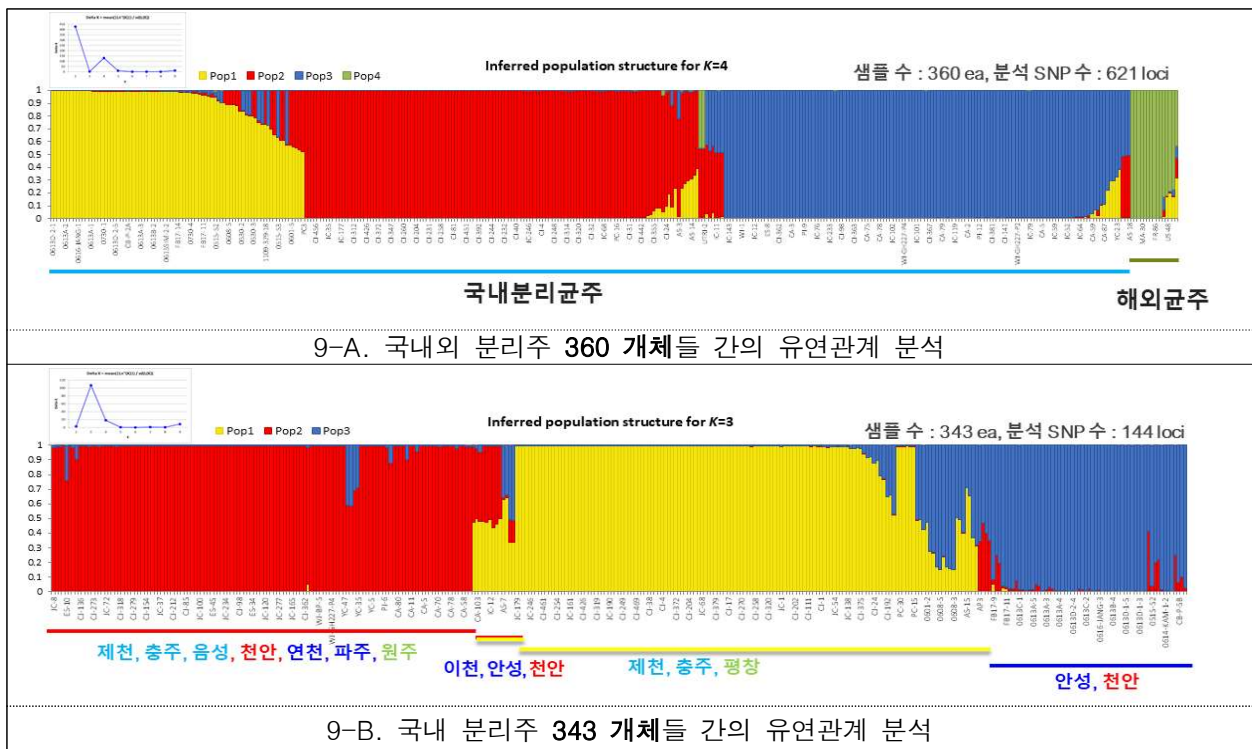
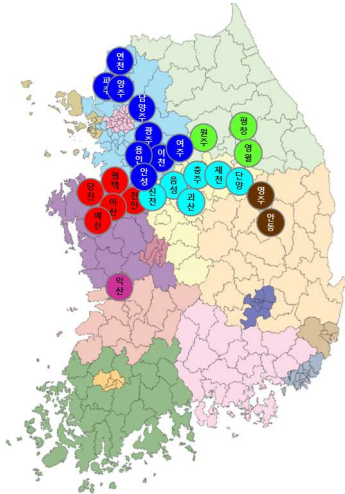


그림 9. 국내외 과수화상병 분리주 360개체를 이용한 Genetic Structure 분석

라. 과수화상병 genome-wide Haplotype 마커를 이용한 역학조사 분석

1. 국내 과수화상병 분리 지역



경기도: 안성, 연천, 파주, 양주, 남양주, 광주, 용인, 이천, 여주  
 충청북도: 진천, 음성, 충주, 제천, 단양, 괴산  
 충청남도: 당진, 평택, 예산, 아산, 천안  
 강원도: 원주, 평창, 영월  
 경상북도: 영주, 안동  
 전라북도: 익산

그림 10. 국내에서 과수화상병 분리 지역

- 과수화상병 분리주의 genome-wide SNP 마커를 이용하여 haplotype 마커 개발을 위해 과수화상병 발생지에서 추가로 분리주를 수집하여 총 404개 분리주를 대상으로 유전체 분석을 수행하였음.
- 기존 genome-wide SNP 마커를 이용한 분석 방법을 고도화를 위해, 1개의 유전자 내에 위치한 SNP 마커 조합을 하나의 haplotype 마커로 개발하여 SNP 기반의 haplotype 마커를 이용하여 역학 조사를 위한 분석 체계를 구축하였음.

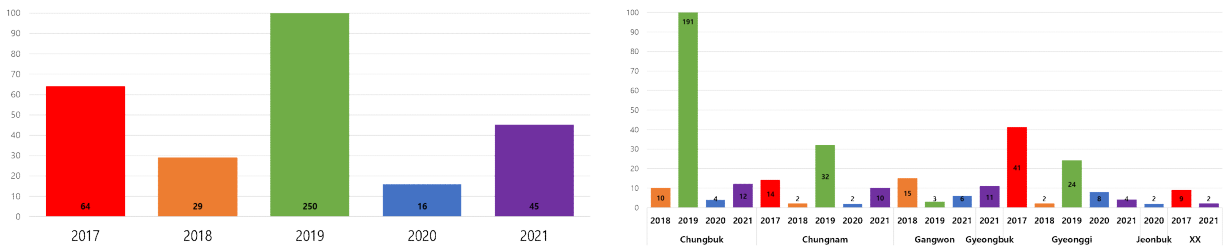
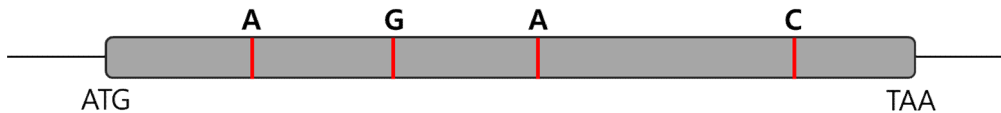


그림 11. 과수화상병 분리 연도별 샘플 현황 및 지역별 샘플 현황



필터 조건	SNP 수	
Total SNP (해외+국내 423개체)	46,991	
Total SNP (국내 404개체)	949	
Missing data = 0%	891	
Genic region	688	
No. of SNP in gene $\geq 2$ (hetero $\neq$ 100%, PIC > 0)	181	→ 64개 유전자
64개 유전자에 해당하는 SNP (423개체)	1,804	
Missing data = 0%	1,612	
Hetero SNP = 0%	1,356	
No. of SNP in gene $\geq 4$	1,335	→ 46개 유전자
46개 유전자에 해당하는 SNP (404개체)	132	
ALT != 100%, Hetero != 100%	125	→ 46개 유전자

해외+국내  
 국내

그림 12. SNP 기반의 Haplotype 마커 선발 기준

- 국내 화상병균에서 선발한 전체 SNP 중에서 유전자 부위에 위치하면서 유전자 내에 2개

이상의 SNP를 보유하고 있는 46개의 유전자 각각에 대해서 일차로 haplotype 마커로 선별 함.

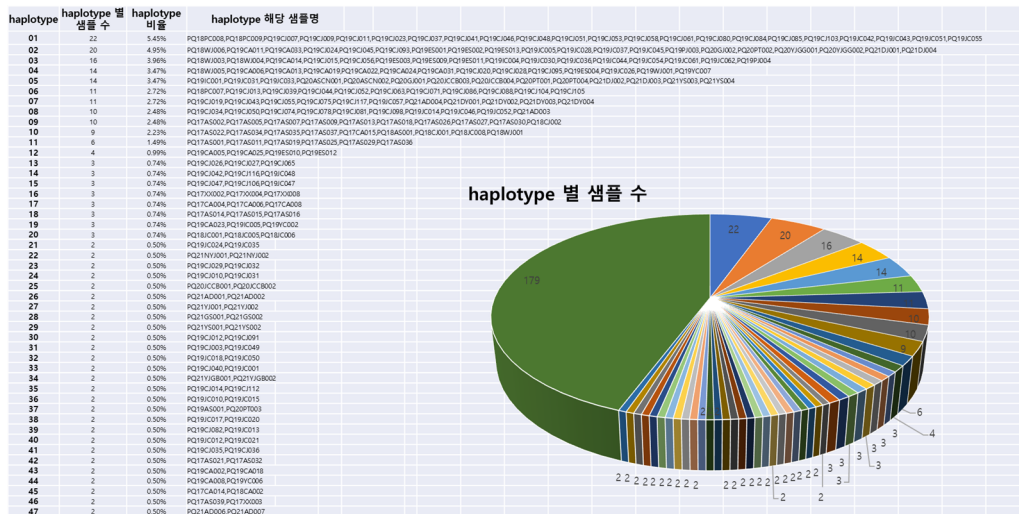


그림 13. 각 haplotype 마커 별 과수화상병 분리주 목록

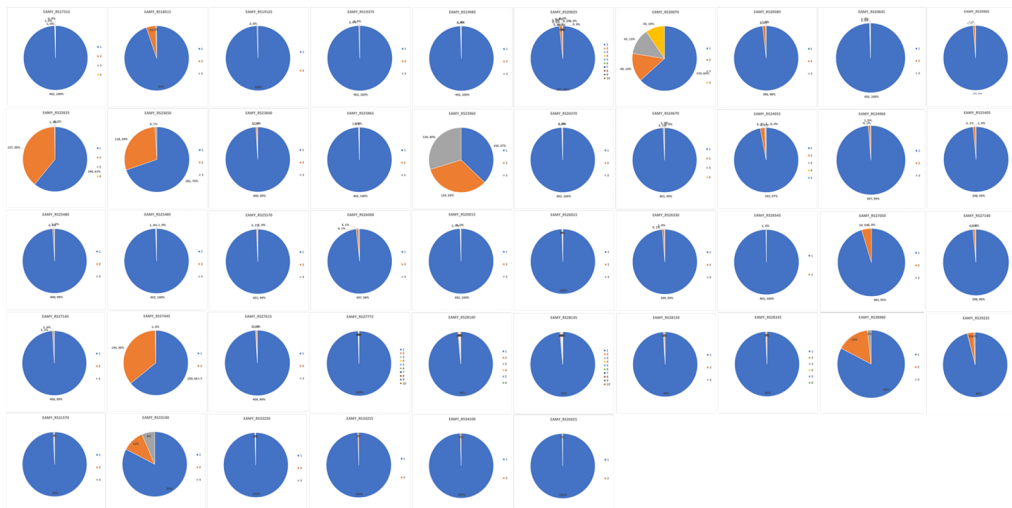
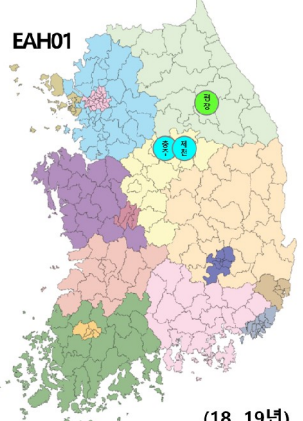
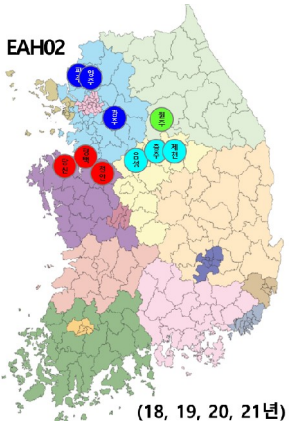
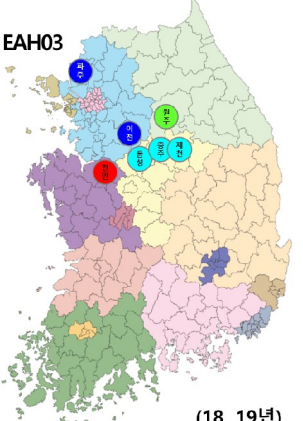
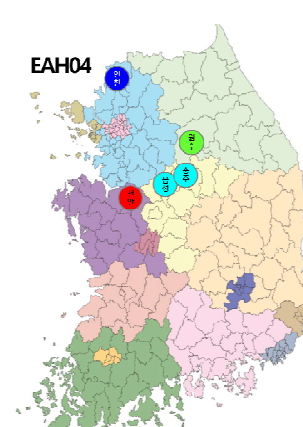
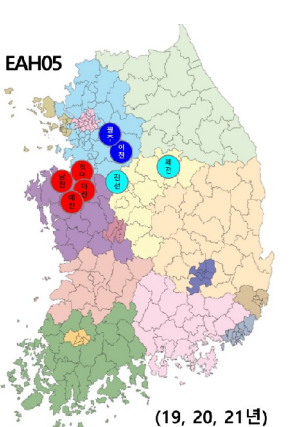
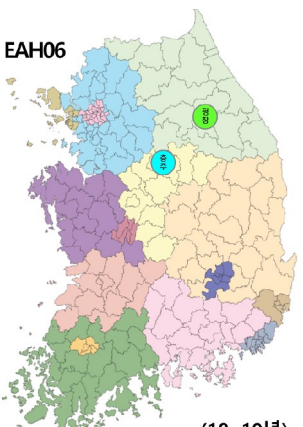
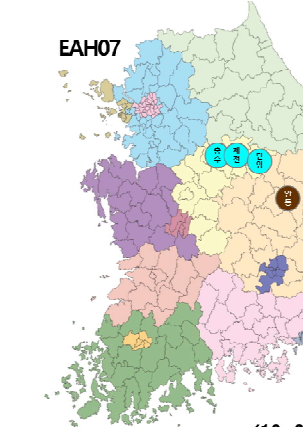
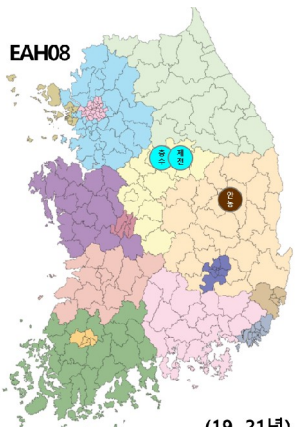
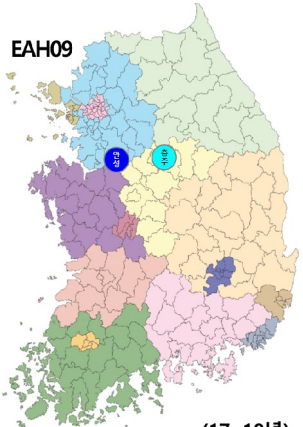
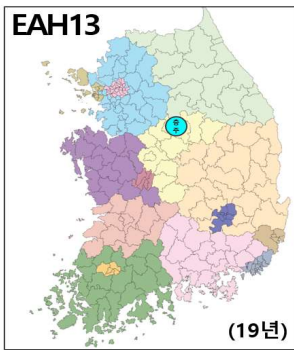
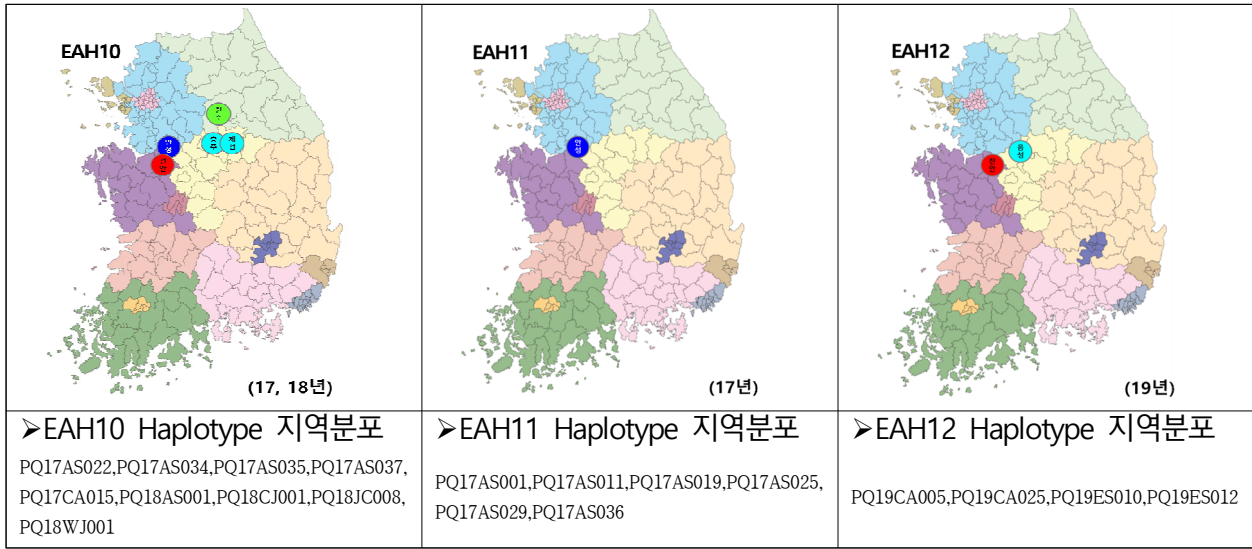


그림 14. 각 haplotype 마커에 대한 Allele frequencies

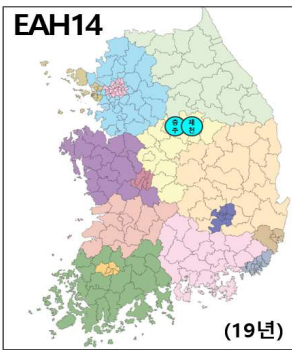


## 2. 국내 과수화상병 haplotype 마커별 분포 상황 및 분리주 목록

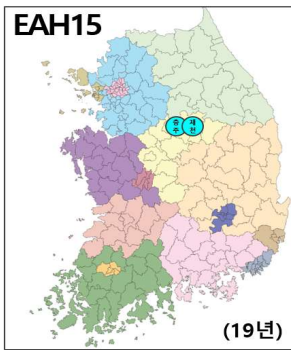
 <p style="text-align: center;"><b>EAH01</b></p> <p style="text-align: center;">(18, 19년)</p>	 <p style="text-align: center;"><b>EAH02</b></p> <p style="text-align: center;">(18, 19, 20, 21년)</p>	 <p style="text-align: center;"><b>EAH03</b></p> <p style="text-align: center;">(18, 19년)</p>
<p>➤EAH01 Haplotype 지역분포</p> <p>PQ18PC008,PQ18PC009,PQ19CJ007,PQ19CJ009, PQ19CJ011,PQ19CJ023,PQ19CJ037,PQ19CJ041, PQ19CJ046,PQ19CJ048,PQ19CJ051,PQ19CJ053, PQ19CJ058,PQ19CJ061,PQ19CJ080,PQ19CJ084, PQ19CJ085,PQ19CJ103,PQ19CJ042,PQ19CJ043, PQ19CJ051,PQ19CJ055</p>	<p>➤EAH02 Haplotype 지역분포</p> <p>PQ18WJ006,PQ19CA011,PQ19CA033,PQ19CJ02 4,PQ19CJ045,PQ19CJ093,PQ19ES001,PQ19ES00 2,PQ19ES013,PQ19JC005,PQ19JC028,PQ19JC03 7,PQ19JC045,PQ19PJ003,PQ20GJ002,PQ20PT00 2,PQ20YJGG001,PQ20YJGG002,PQ21DJ001,PQ2 1DJ004</p>	<p>➤EAH03 Haplotype 지역분포</p> <p>PQ18WJ003,PQ18WJ004,PQ19CA014,PQ19CJ01 5,PQ19CJ056,PQ19ES003,PQ19ES009,PQ19ES01 1,PQ19C004,PQ19JC030,PQ19JC036,PQ19JC044 ,PQ19JC054,PQ19JC061,PQ19JC062,PQ19PJ004</p>
 <p style="text-align: center;"><b>EAH04</b></p> <p style="text-align: center;">(18, 19년)</p>	 <p style="text-align: center;"><b>EAH05</b></p> <p style="text-align: center;">(19, 20, 21년)</p>	 <p style="text-align: center;"><b>EAH06</b></p> <p style="text-align: center;">(18, 19년)</p>
<p>➤EAH04 Haplotype 지역분포</p> <p>PQ18WJ005,PQ19CA006,PQ19CA013,PQ19CA01 9,PQ19CA022,PQ19CA024,PQ19CA031,PQ19CJ0 20,PQ19CJ028,PQ19CJ095,PQ19ES004,PQ19CJ0 26,PQ19WJ001,PQ19YC007</p>	<p>➤EAH05 Haplotype 지역분포</p> <p>PQ19IC001,PQ19JC031,PQ19JC033,PQ20ASCN0 01,PQ20ASCN002,PQ20GJ001,PQ20JCCB003,PQ 20JCCB004,PQ20PT001,PQ20PT004,PQ21DJ002, PQ21DJ003,PQ21YS003,PQ21YS004</p>	<p>➤EAH06 Haplotype 지역분포</p> <p>PQ18PC007,PQ19CJ013,PQ19CJ039,PQ19CJ044, PQ19CJ052,PQ19CJ063,PQ19CJ071,PQ19CJ086, PQ19CJ088,PQ19CJ104,PQ19CJ105</p>
 <p style="text-align: center;"><b>EAH07</b></p> <p style="text-align: center;">(19, 21년)</p>	 <p style="text-align: center;"><b>EAH08</b></p> <p style="text-align: center;">(19, 21년)</p>	 <p style="text-align: center;"><b>EAH09</b></p> <p style="text-align: center;">(17, 18년)</p>
<p>➤EAH07 Haplotype 지역분포</p> <p>PQ19CJ019,PQ19CJ043,PQ19CJ055,PQ19CJ075, PQ19CJ117,PQ19C057,PQ21AD004,PQ21DY001 ,PQ21DY002,PQ21DY003,PQ21DY004</p>	<p>➤EAH08 Haplotype 지역분포</p> <p>PQ19CJ034,PQ19CJ050,PQ19CJ074,PQ19CJ078, PQ19CJ081,PQ19CJ098,PQ19JC014,PQ19JC046, PQ19JC052,PQ21AD003</p>	<p>➤EAH09 Haplotype 지역분포</p> <p>PQ17AS002,PQ17AS005,PQ17AS007,PQ17AS009, PQ17AS013,PQ17AS018,PQ17AS026,PQ17AS027, PQ17AS030,PQ18CJ002</p>



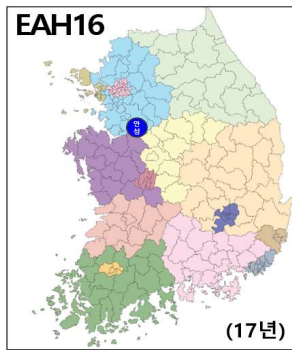
PQ19CJ026,PQ19CJ027,PQ19CJ065



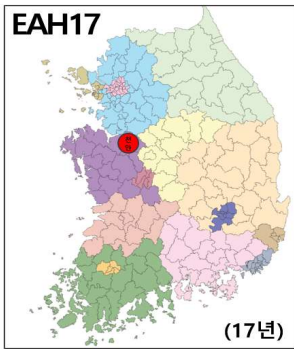
PQ19CJ042,PQ19CJ116,PQ19CJ048



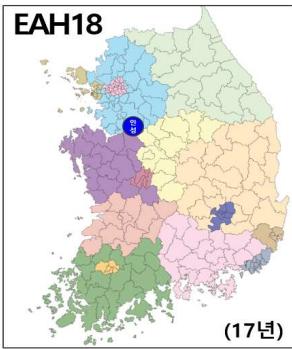
PQ19CJ047,PQ19CJ106,PQ19CJ047



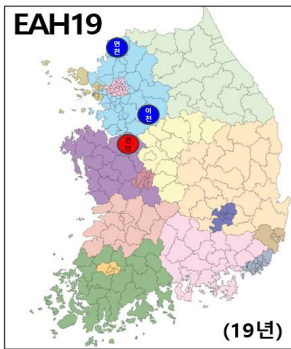
PQ17XX002,PQ17XX004,PQ17XX008



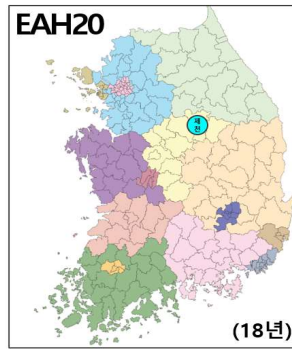
PQ17CA004,PQ17CA006,PQ17CA008



PQ17AS014,PQ17AS015,PQ17AS016



PQ19CA023,PQ19CJ005,PQ19YC002



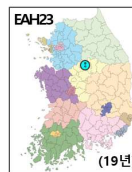
PQ18JC001,PQ18JC005,PQ18JC006



PQ19CJ024,PQ19CJ035



PQ21NYJ001,PQ21NYJ002



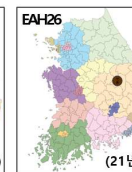
PQ19CJ029,PQ19CJ032



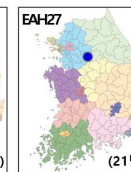
PQ19CJ010,PQ19CJ031



PQ20JCB001,PQ20JCB002



PQ21AD001,PQ21AD002



PQ21YJ001,PQ21YJ002



PQ21GS001,PQ21GS002



PQ21YS001,PQ21YS002



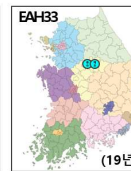
PQ19CJ012,PQ19CJ091



PQ19CJ003,PQ19CJ049



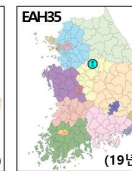
PQ19CJ018,PQ19CJ050



PQ19CJ040,PQ19CJ001



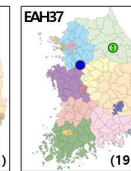
PQ21YIGB001,PQ21YIGB002



PQ19CJ014,PQ19CJ112



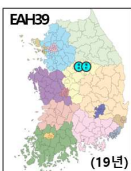
PQ19CJ010,PQ19CJ015



PQ19AS001,PQ20PT003



PQ19CJ017,PQ19CJ020



PQ19CJ082,PQ19CJ013



PQ19CJ012,PQ19CJ021



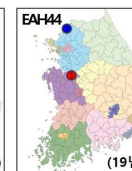
PQ19CJ035,PQ19CJ036



PQ17AS021,PQ17AS032



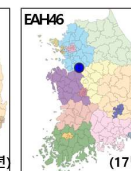
PQ19CA002,PQ19CA018



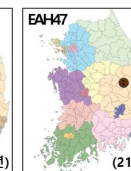
PQ19CA008,PQ19YC006



PQ17CA014,PQ18CA002



PQ17AS039,PQ17XX003



PQ21AD006,PQ21AD007

그림 15. 국내 과수화상병 haplotype 마커별 분포 상황 및 분리주 목록



- 각 haplotype 마커에 속하는 과수화상병 분리주 목록과 발생 지역을 표시하였음
- Haplotype 마커 번호는 가장 많은 분리주가 속해 있는 순으로 정리하였으며, EAH27번 이후의 haplotype 마커는 하나의 분리주들로 구성되어 있어서 H00 type으로 명명했으며, H00 type은 새롭게 분화된 타입으로 보임

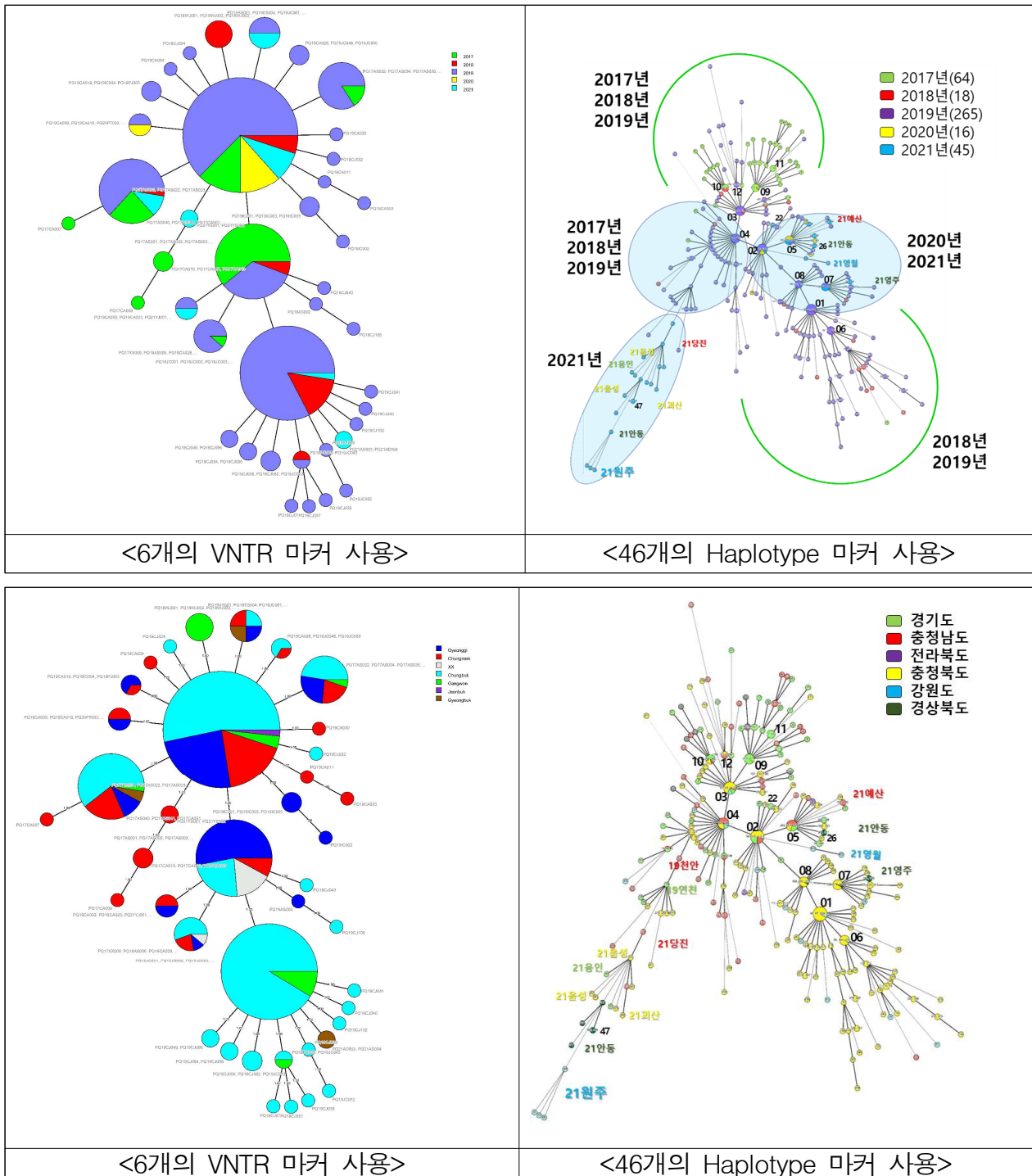


그림 16. 지역별, 년도별 과수화상병 404 분리주에 대한 MST 분석

- 과수화상병 역학조사에 많이 사용되는 VNTR 마커와 본 과제에서 새롭게 개발한 haplotype 마커를 이용하여 국내 과수화상병 분리주 404 개체에 대한 MST 분석을 수행함.
- 과수화상병 분리주를 대상으로 지역별, 년도별 MST 분석을 수행하였으며, VNTR 마커에 비해 haplotype 마커의 구분 능력이 좋은 것을 확인 할 수 있었음.
- 따라서 haplotype 마커를 이용하여 국내 과수화상병의 확산 경로에 대해 분석을 수행함.



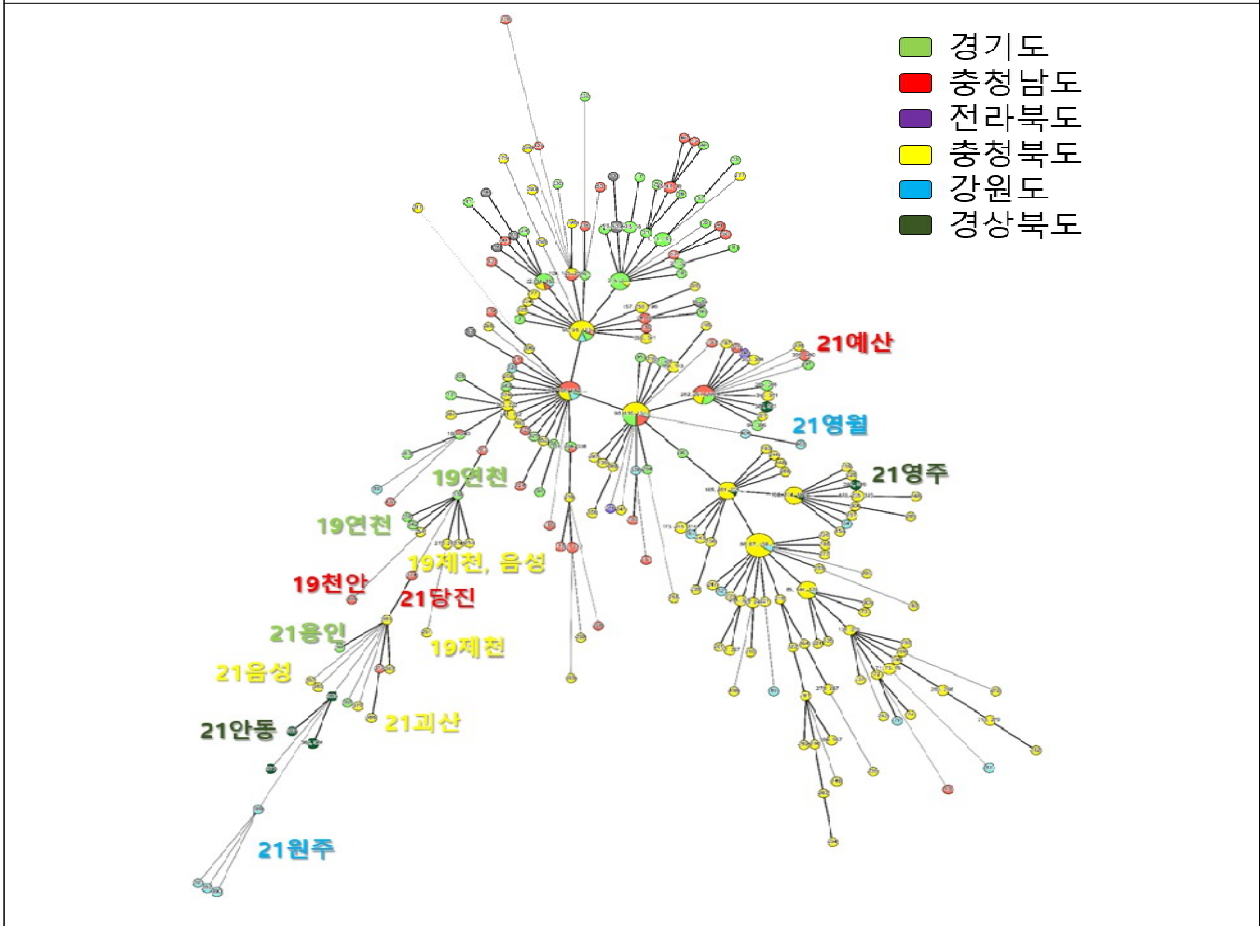
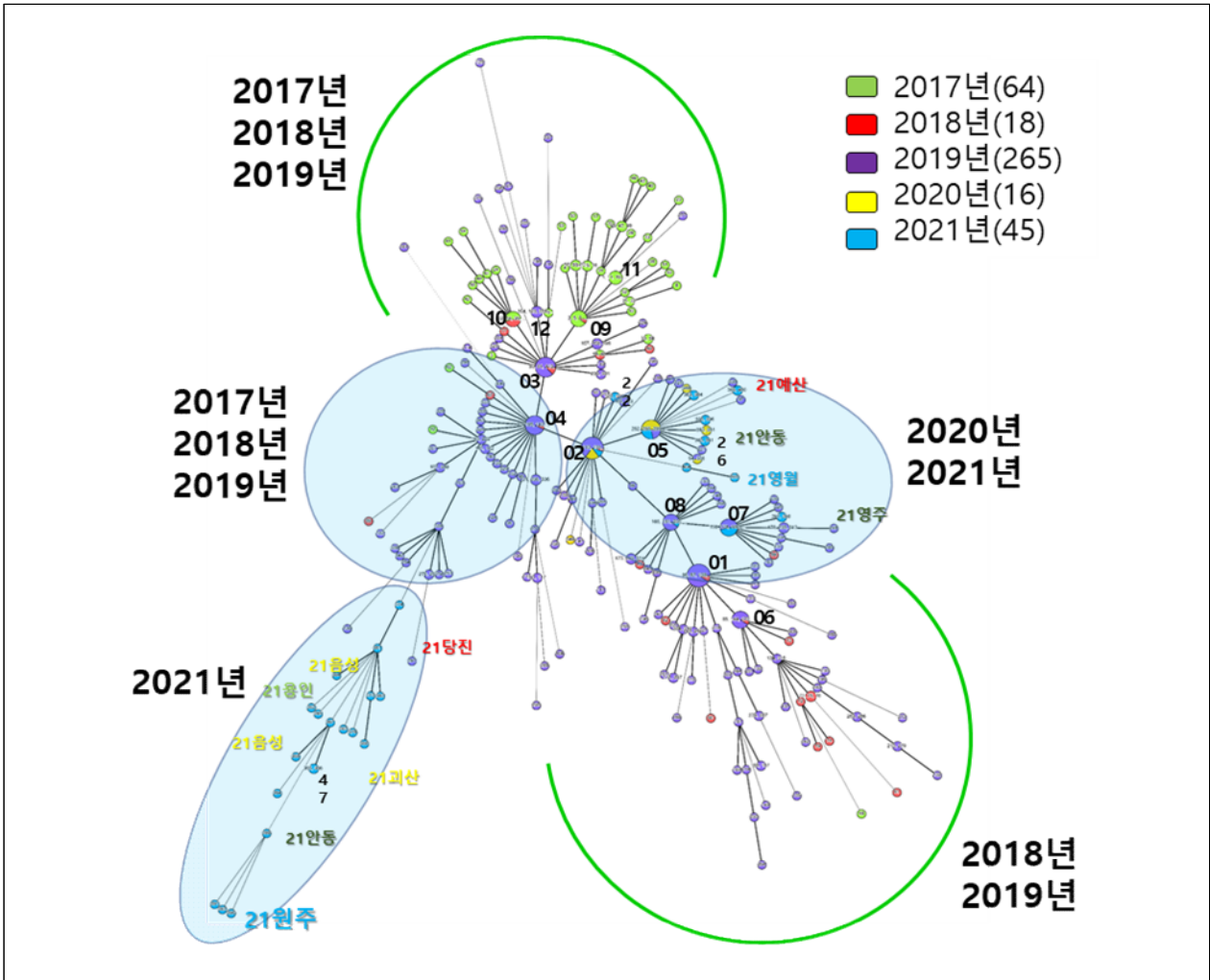
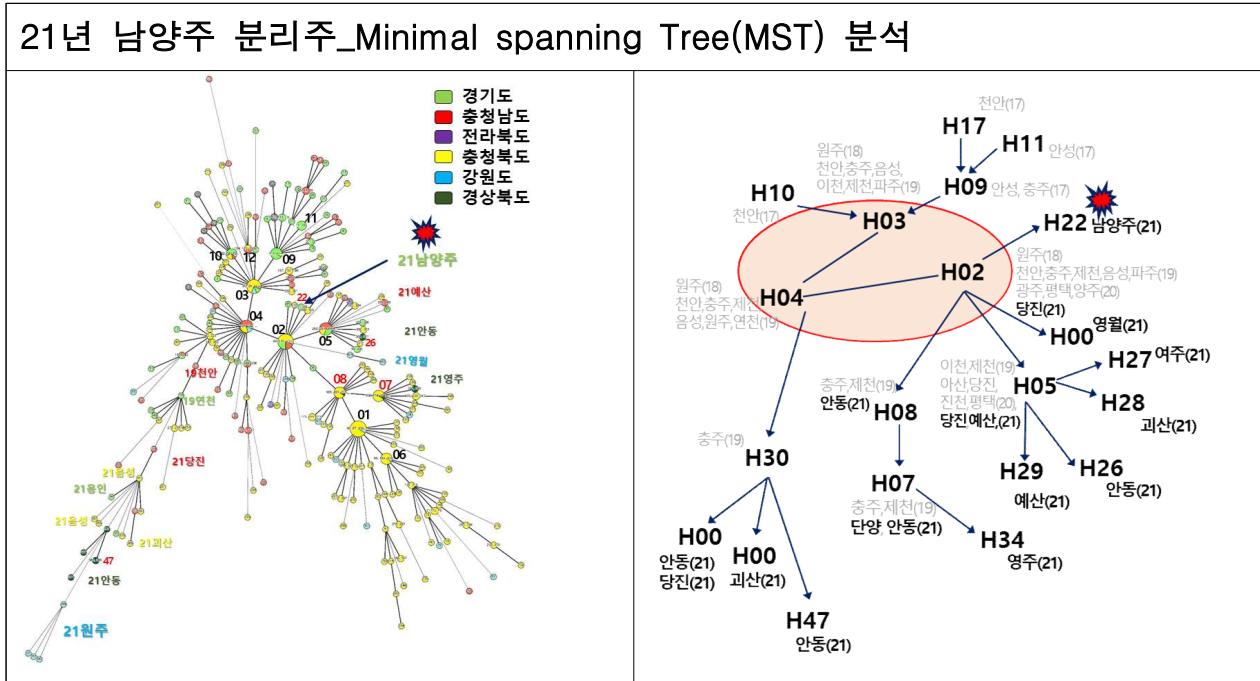
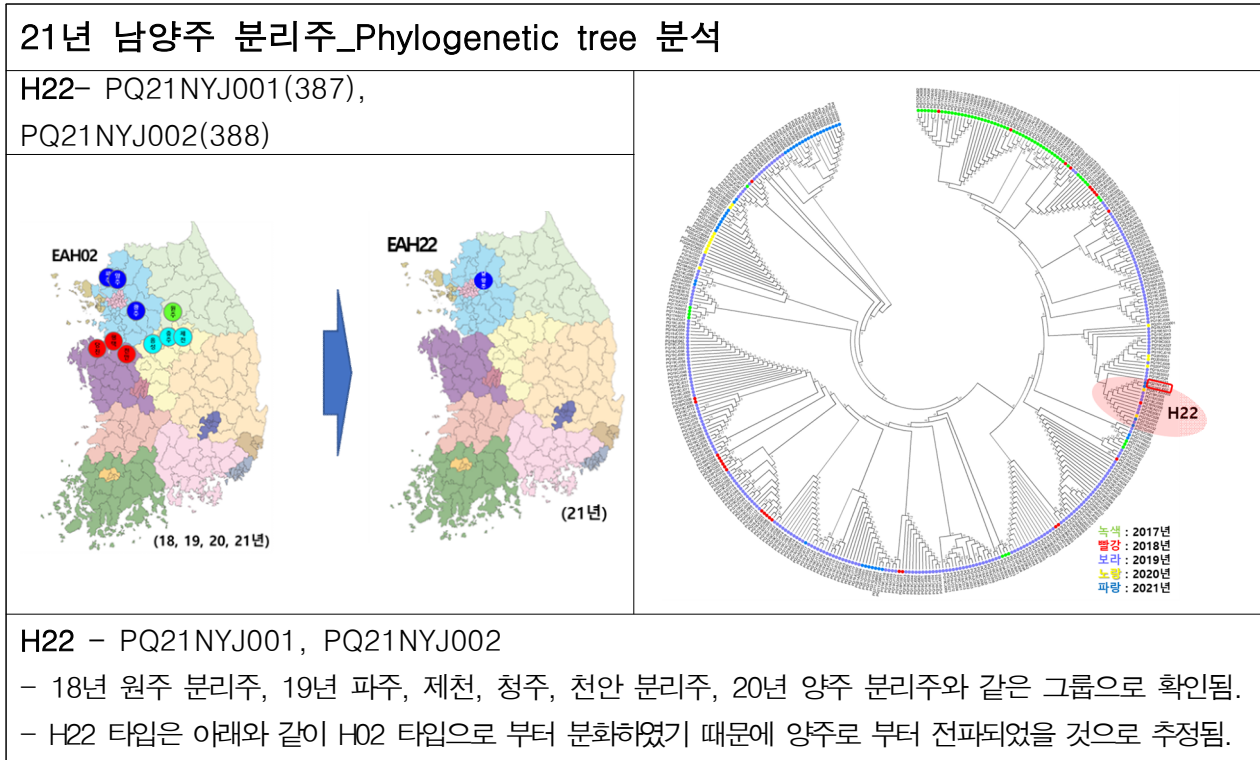


그림 17. 지역별, 년도별 과수화상병 404 분리주에 대한 MST 분석

#### 4. Haplotype 마커를 기반으로 2021년 신규로 발생한 지역에 대한 역학조사 분석

- 2021년에 과수화상병이 새롭게 발생한 지역을 중심으로 phylogenetic tree와 MST 분석 결과를 바탕으로 역학조사를 수행하였음

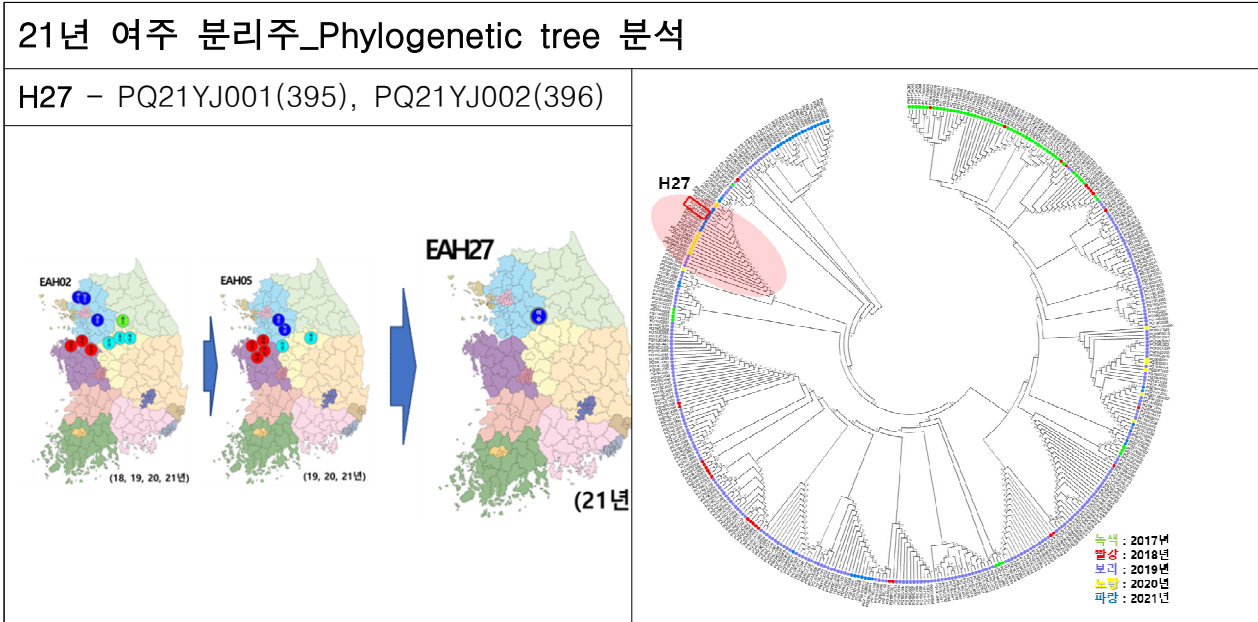
<2021년 경기도 남양주 분리주>



<농림축산검역본부 역학조사>

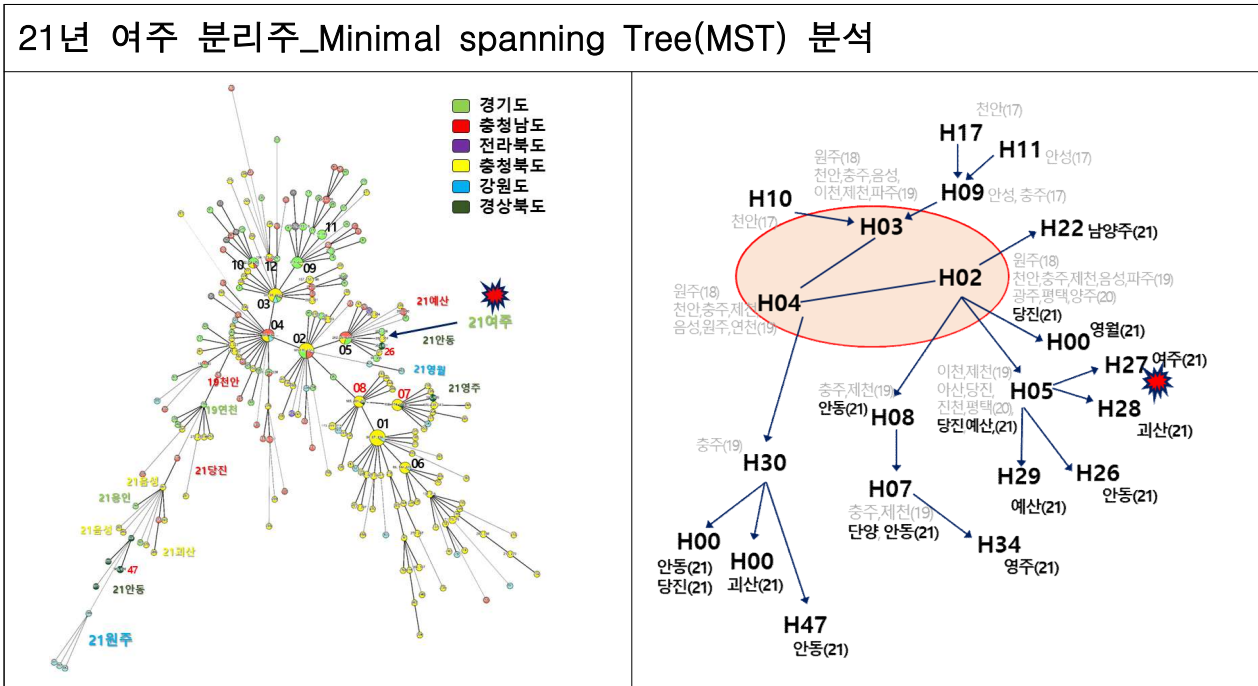
- 남양주는 경기·충남(안성·천안·아산·평택 등) 배나무 과수원 작업권으로 작업자에 의해 화상병균이 확산되었을 것으로 추정

<2021년 경기도 여주 분리주>



H27 - PQ21YJ001, PQ21YJ002

- 19년 이천, 제천 분리주, 20년 진천, 당진, 아산 분리주와 같은 그룹으로 나타남
- 21년 여주 분리주는 H05 타입의 이천 분리주와 유전적으로 매우 가까운 것으로 확인되어 이천 분리주로 부터 전파 되었을 가능성이 커 보임.

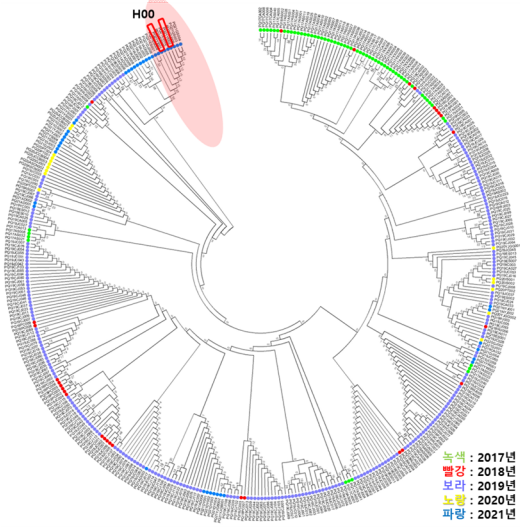
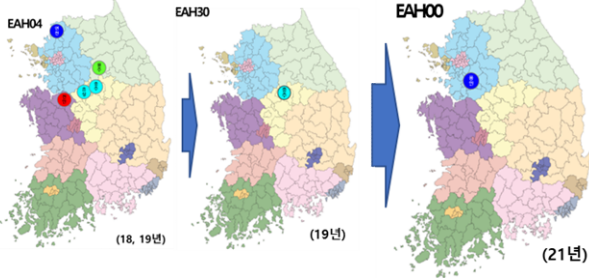


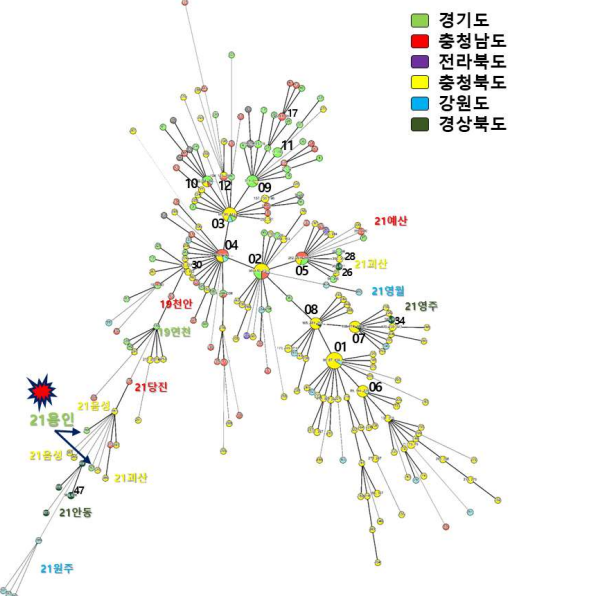
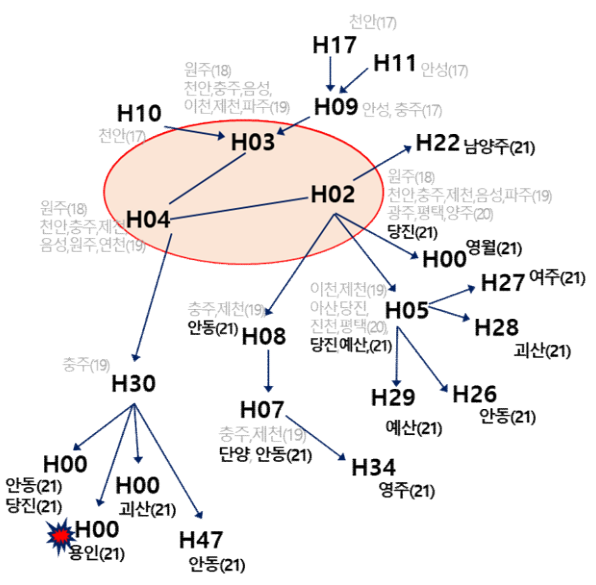
- 여주 분리주(H27타입)의 MST 분석 결과를 보면 H02→H05 타입으로 부터 H27 타입으로 분화 되어 진 것으로 보여짐
- H27타입의 여주 분리주는 천안, 평택, 충주, 제천 일대에서 이천으로 전파된 후 여주 일대로 확산되었을 것으로 추정함

<농림축산검역본부 역학조사>

- H05타입은 배 산지(일부 사과 포함)와 사과 산지에 모두 분포하는 타입으로 사과나무 작업단에 의해 경기 일부지역(이천, 여주, 평택), 충남 일부지역(아산, 당진, 예산) 및 경북(안동)으로 확산된 것으로 추정되며, 그 근원지는 충주·제천·음성 등 사과 산지인 것으로 판단됨

<2021년 경기도 용인 분리주>

21년 용인 분리주_Phylogenetic tree 분석	
H00- PQ21YI001(393), PQ21YI002(394)	
	<p>H00 - PQ21YI001, PQ21YI002</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 용인 분리주는 H30 타입으로 부터 새롭게 분화된 타입으로 확인되며, 분석결과를 보면 21년 음성 시료와 유전적으로 가장 가까운 것으로 확인됨</li> <li>- H30 타입의 충주 분리주는 H04 타입으로 부터 분화하여천안, 당진, 음성, 용인, 괴산, 안동, 원주 등 다양한 지역으로 전파된 것으로 확인됨</li> </ul>

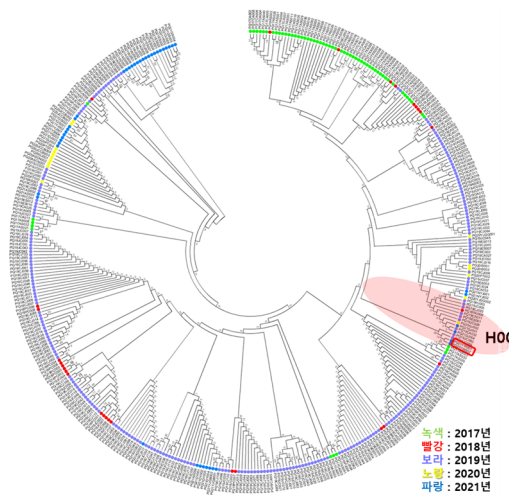
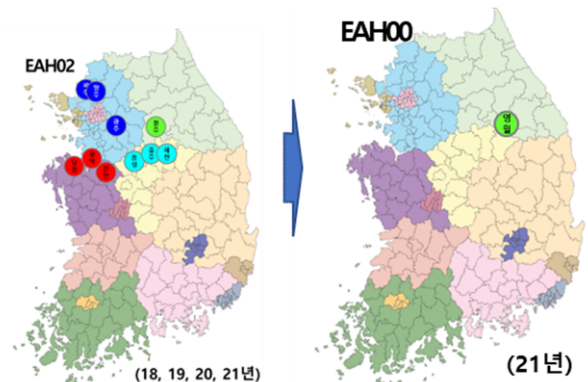
21년 용인 분리주_Minimal spanning Tree(MST) 분석	
	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 용인 분리주는 MST 분석 결과에서와같이 H04→H30 타입으로부터 분화되었으며, H30 타입에서부터 다양한 지역으로 전파되어진 것을 확인할 수 있음</li> <li>- H30 타입의 충주 분리주를 시작으로 안동, 당진, 용인, 괴산, 원주 등 다양한 지역으로 전파되는 것으로 추정됨</li> </ul>	

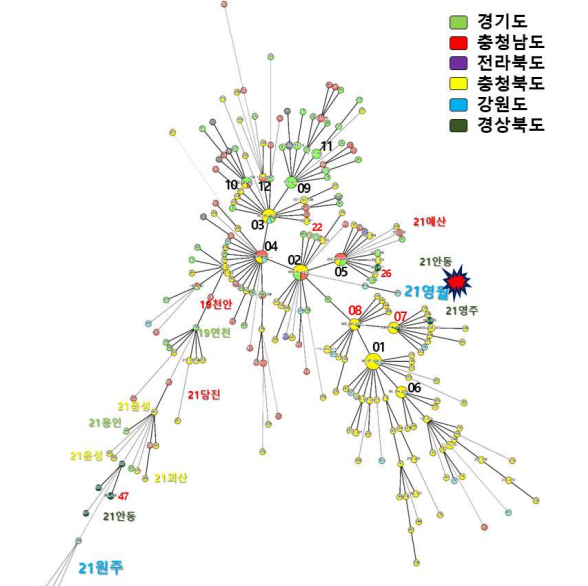
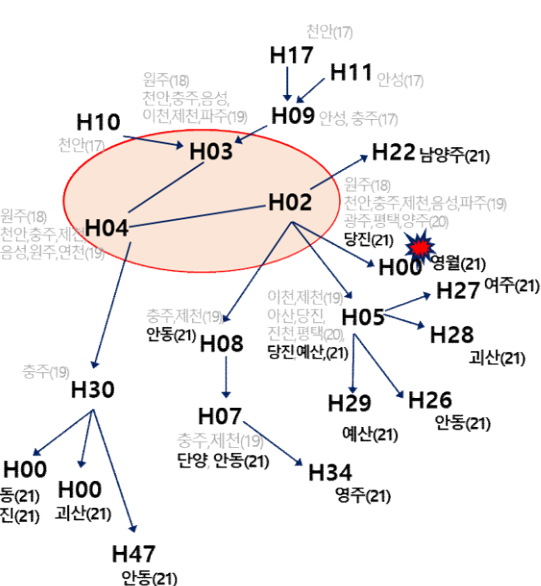
<농림축산검역본부 역학조사>

H30 타입은 사과 산지인 충주에서 발견되는 타입으로 경기 일부(용인), 충남 일부(당진), 충북 일부(괴산), 경북 일부(안동) 지역으로 사과 작업단 등에 의해 확산된 것으로 추정



<2021년 강원도 영월 분리주>

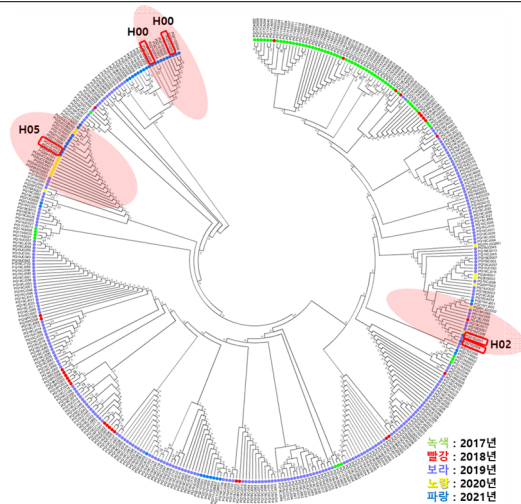
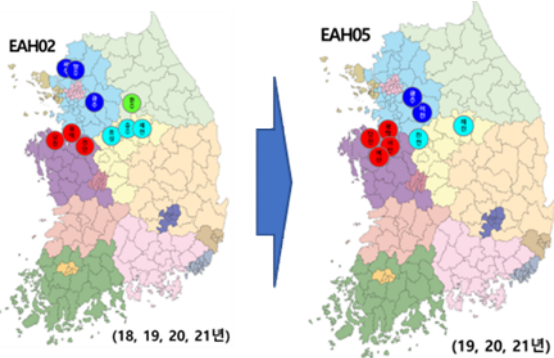
21년 영월 분리주_Phylogenetic tree 분석	
H00- PQ21YW001(403), PQ21YW002(404)	
	<p>H00 - PQ21YW001, PQ21YW002</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 21년 영월 분리주들은 phylogenetic tree 결과 19년 제천 분리주들과 같은 clade로 묶이는 것을 확인할 수 있었음</li> <li>-영월 분리주들은 인접 지역에 위치한 제천으로부터 전파되었을 것으로 추정함</li> </ul>

21년 영월 분리주_Minimal spanning Tree(MST) 분석	
	
<p>- H00타입의 영월 분리주의 MST 분석 결과를 보면 H02→H00로 분화되어진 것으로 보여 짐</p> <p>- H02 타입의 분리주들은 18년 원주, 19년 천안, 충주, 음성, 제천, 파주, 20년 광주, 평택, 양주 분리주에서 확인되는 타입으로, 영월 분리주들은 인근 지역인 제천으로 부터 전파되었을 것으로 추정함</p>	
<p>&lt;농림축산검역본부 역학조사&gt;</p> <p>- 강원도 영월은 인근 충주·제천 등의 사과나무 과수원 작업자 등에 의해 확산되었을 가능성이 높음</p>	

<2021년 충청남도 당진 분리주>

21년 당진 분리주\_Phylogenetic tree 분석

H02 - PQ21DJ001(369), PQ21DJ004(372)  
 H05 - PQ21DJ002(370), PQ21DJ003(371)  
 H00 - PQ21DJ005(373), PQ21DJ006(374)

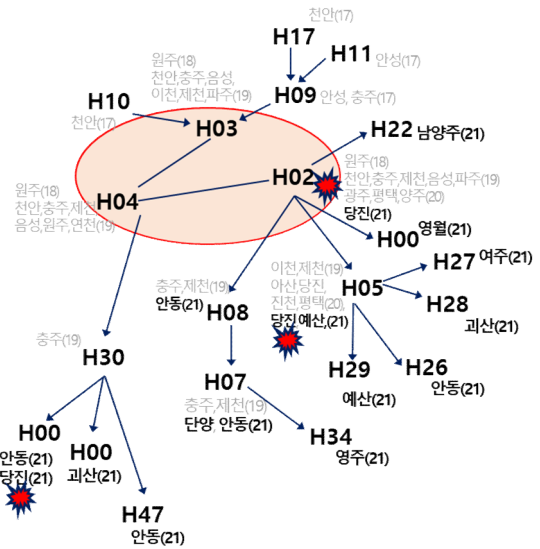
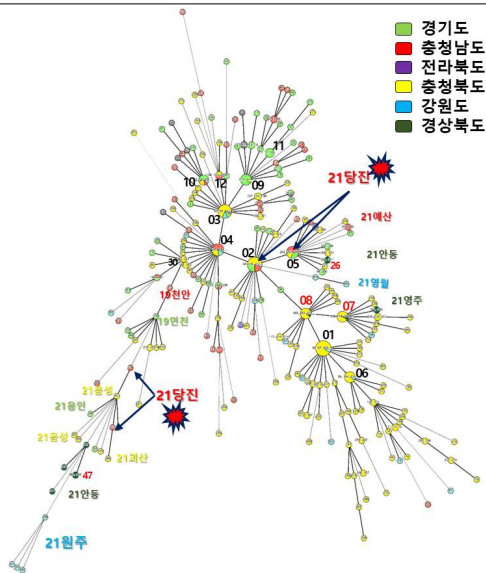


H02 - PQ21DJ001, PQ21DJ004  
 - H02 타입의 분리주 들은 가장 많은 분리주들이 속한 타입 중에 하나로 충청남북도과 경기도 일대에서 주로 발견되는 타입임. 당진 분리주의 경우 20년 광주 분리주와 유전적으로 가장 가깝게 확인됨

H05 - PQ21DJ002, PQ21DJ003  
 - H05 타입은 H02 타입으로부터 분리되어졌으며 H02 타입 인근으로 확산되는 양상을 확인할 수 있음. H05 타입의 당진 분리주들은 유전적으로 20년 평택 분리주와 가장 가깝게 확인됨

H00 - PQ21DJ005, PQ21DJ006  
 - 19년 충주 분리주와 같은 그룹으로 확인되며, 새롭게 분화된 타입으로 비교적 최근에 전파된 것으로 추정

21년 당진 분리주\_Minimal spanning Tree(MST) 분석



- 당진 분리주들의 경우 다양한 haplotype 분리주가 발견되는 것으로 보아 여러 차례 여러 경로로 전파 되어지는 것으로 추정

- H05타입의 분리주들은 H02타입으로부터 분리되어 나온 타입으로 천안, 충주, 제천 등으로 부터 충청남도 평택, 당진, 예산 등으로 전파 되어지는 것으로 추정

- H00 타입은 H04타입으로 부터 분리되어 나온 타입으로 또 다른 경로로부터 비교적 최근에 당진으로 전파 되어진 것으로 추정

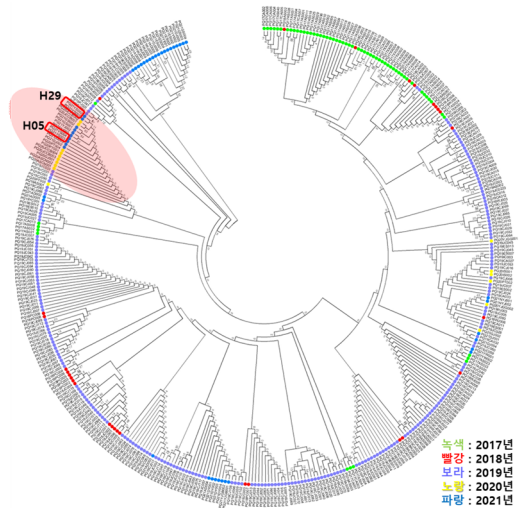
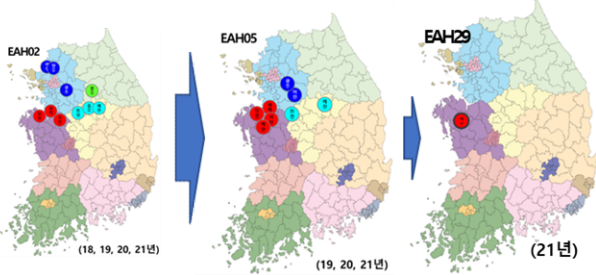
<농림축산검역본부 역학조사>

- 충남 당진의 경우 경기도(안성·평택 등) 및 충남(천안, 안성 등)의 배나무 및 사과나무 과원의 작업단에 의해 여러 차례에 걸쳐 여러 타입의 유전자형이 확산된 것으로 추정

<2021년 충청남도 예산 분리주>

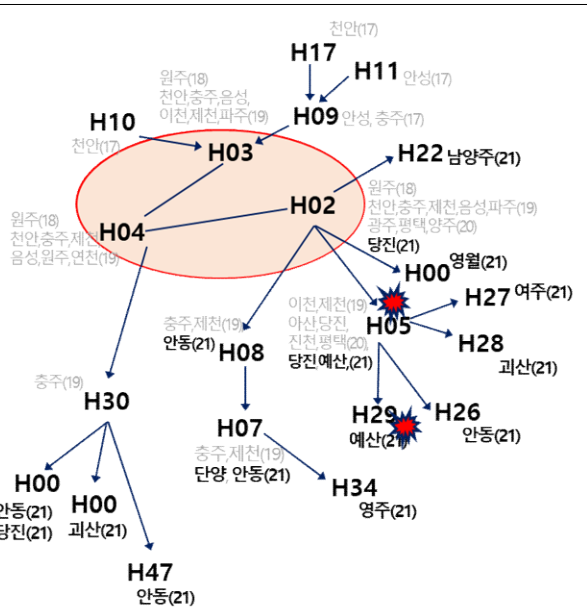
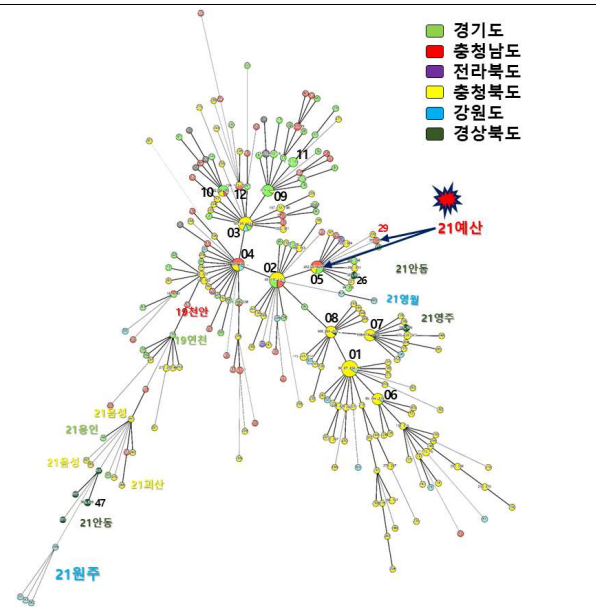
21년 예산 분리주\_Phylogenetic tree 분석

H05 - PQ21YS003(401), PQ21YS004(402)  
 H29 - PQ21YS001(399), PQ21YS002(400)



H05 - PQ21YS003, PQ21YS004, H29 - PQ21YS001, PQ21YS002  
 - 예산 분리주는 H05와 H29타입으로 이루어져 있으며, phylogenetic tree 결과 모두 하나의 clade로 묶이는 것을 볼 수 있음.  
 - 예산 분리주는 20년 진천 분리주와 유연관계가 가장 가까웠으며, 20년 평택, 당진, 아산 분리주와도 매우 가까워 비슷한 시기에 진천으로부터 예산 인근 지역으로 전파되었을 것으로 추정

21년 예산 분리주\_Minimal spanning Tree(MST) 분석



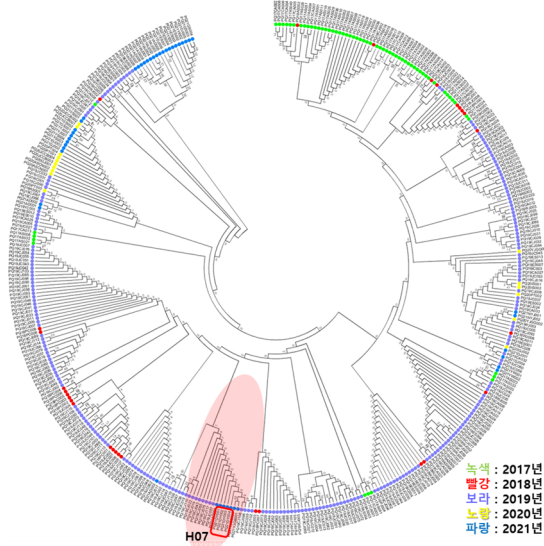
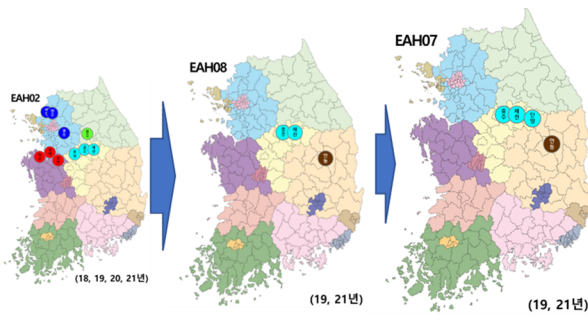
- 예산 분리주들의 Haplotype마커를 통한 MST 분석 결과를 보면 H05타입과 H29타입의 분리주들로 확인되며 H29 타입은 H05 타입으로부터 분리되어 나온 타입으로 확인됨  
 - H05타입의 분리주들은 H02타입으로부터 분리되어 나온 타입으로 천안, 충주, 제천 등으로 부터 충청남도 일대로 전파 되어지는 것으로 추정됨  
 - H29타입의 분리주들은 H05타입으로부터 분리되어 나온 타입으로 비슷한 시기에 진천으로부터 충남 일대 평택, 당진, 아산 등으로 전파된 것으로 추정됨

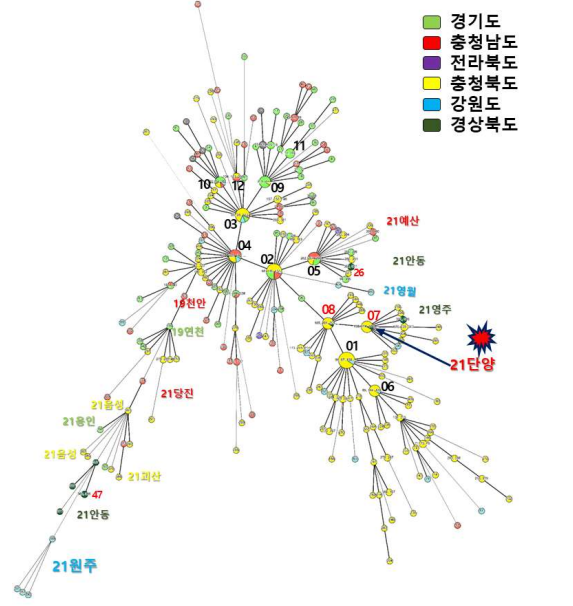
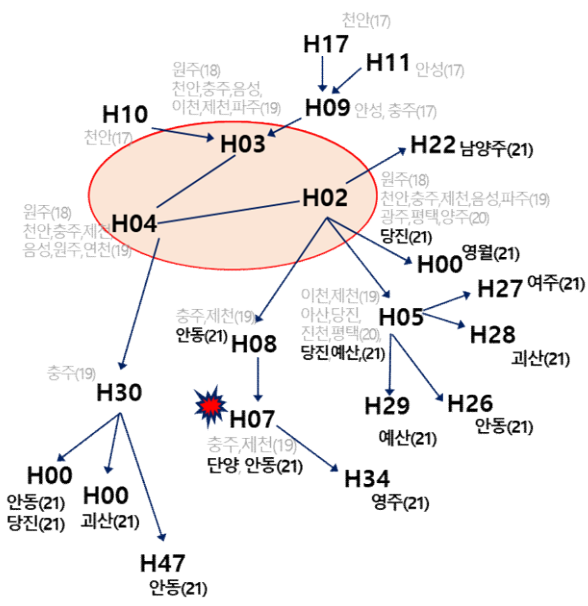
<농림축산검역본부 역학조사>

- 충남 예산의 경우 경기(안성, 평택 등) 및 충남(천안 등)의 사과나무 작업단에 의해 확산된 것으로 추정



<2021년 충청북도 단양 분리주>

21년 단양 분리주_Phylogenetic tree 분석	
<p>H07 - PQ21DY001(375), PQ21DY002(376), PQ21DY003(377), PQ21DY004(378)</p>	
	<p>H07 - PQ21DY001, PQ21DY002, PQ21DY003, PQ21DY004</p> <p>- H07 타입의 단양 분리주들은 충주, 제천, 안동에서 발견되는 H08 타입의 분리주들과 유연 관계가 매우 가까운 것으로 확인되어 제천 일대에서 전파되었을 것으로 추정하며, 21년 안동 분리주와 같은 그룹으로 나타나기 때문에 비슷한 시기에 안동으로도 전파되었을 것으로 추정</p>

21년 단양 분리주_Minimal spanning Tree(MST) 분석	
	
<p>- 당진 분리주들의 Haplo_type마커를 통한 MST 분석 결과를 보면 H07타입의 분리주로 확인되며, H02→H08 →H07 로 분화되어 지는 것으로 보임</p> <p>- H02타입의 분리주들이 주로 충주, 제천으로 부터 주변으로 확산되고 있는 타입으로, H08 타입으로 21년도에 안동으로 전파된 것으로 보이며, H07타입으로 분화되면서 안동 및 단양, 영주 일대로 확산되고 있는 것으로 보여짐</p>	

<농림축산검역본부 역학조사>

- H02, H08, H07, H34 유전자형은 주로 충주·제천 및 주변 사과 산지인 단양, 영주, 안동지역과 동일한 작업 권역으로 작업단에 의해 확산되고 있는 것으로 추정됨



<2021년 충청북도 괴산 분리주>

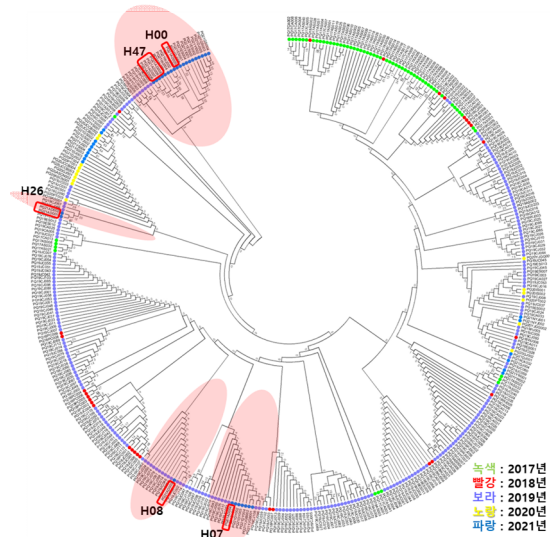
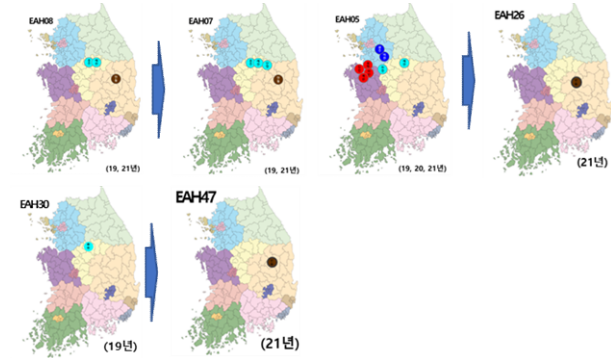
21년 괴산 분리주_Phylogenetic tree 분석	
<p>H28 - PQ21GS001(383),PQ21GS002(384) H00- PQ21GS003(385),PQ21GS004(386)</p>	
<p>H28 - PQ21GS001,PQ21GS002 - H28 타입의 괴산 분리주들은 H05타입의 20년 진천 분리주들로 부터 분화된 것으로 보이며 유전적으로도 가장 가까운 것으로 확인됨. H00 - PQ21GS003,PQ21GS004 - H00 타입의 괴산 분리주들은 19년 충주 분리주와 같은 그룹으로 확인되며, 새롭게 분화된 타입으로 비교적 최근에 전파된 것으로 추정</p>	

21년 괴산 분리주_Minimal spanning Tree(MST) 분석	
<p>- H28 타입의 괴산 분리주들은 충북 진천, 제천 등지에서 나타나는 타입인 H05 타입으로 부터 분리되어 나온 타입으로 괴산, 여주, 안동, 예산 등으로 전파 되어진 것으로 추정 - H00 타입의 괴산 분리주들은 H30 타입의 충주 분리주를 시작으로 전파 된 것으로 추정되며, 안동, 당진, 용인, 괴산, 원주 등 다양한 지역으로 전파되어진 것으로 추정됨 - 괴산에 발생하는 과수화상병균의 haplo-type이 비교적 새로운 타입으로 확인되어, 최근 다양한 경로로 부터 확산 되어진 것으로 추정됨</p>	
<p>&lt;농림축산검역본부 역학조사&gt; - 충북 괴산은 충주와 인접한 지역으로 작업단 등에 의해 충주(H30)에서 괴산(H00)으로 확산된 것으로 분석됨</p>	

<2021년 경상북도 안동 분리주>

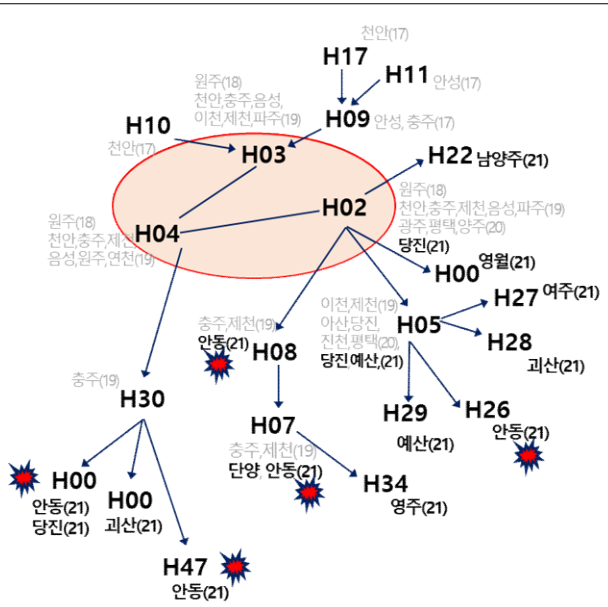
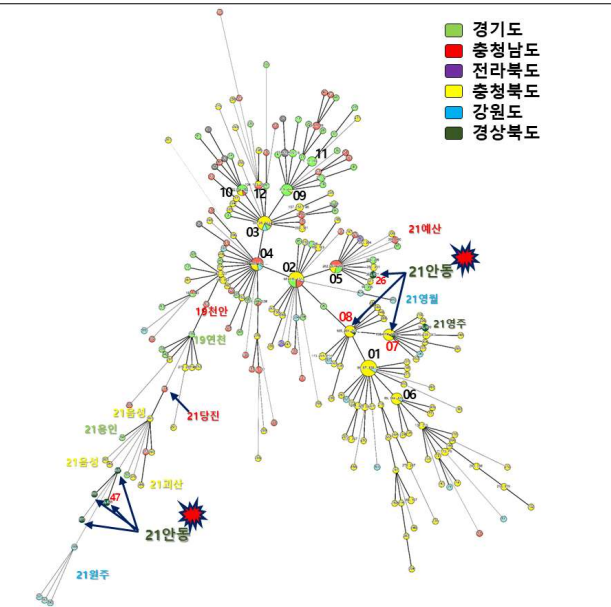
21년 안동 분리주\_Phylogenetic tree 분석

H07 - PQ21AD004(363)  
 H08 - PQ21AD003(362)  
 H26 - PQ21AD001(360), PQ21AD002(361)  
 H47 - PQ21AD006(365), PQ21AD007(366)  
 H00 - PQ21AD005(364), PQ21AD008(367),  
 PQ21AD009(368)



H26 - PQ21AD001(360), PQ21AD002(361)  
 - 19년 충주 분리주와 같은 그룹으로 나타남  
 H47 - PQ21AD006(365), PQ21AD007(366)  
 H00 - PQ21AD005(364), PQ21AD008(367), PQ21AD009(368)  
 - 19년 음성, 연천, 천안 분리주와 같은 그룹으로 나타남  
 - 21년 괴산, 당진, 용인, 음성, 원주 분리주와 같은 그룹으로 나타남

21년 안동 분리주\_Minimal spanning Tree(MST) 분석



- 다양한 haplotype 분리주가 발견되는 것으로 보아 여러 차례 다양한 경로로 전파 되어지는 것으로 추정  
 - H08, H07 타입의 분리주들은 대부분 충주 제천 등지에서 주로 나타나는 타입으로 안동 역시 충주, 제천 등에서 전파 되어지는 것으로 추정  
 - H47, H00 타입은 H04타입으로 부터 분리되어 나온 타입으로 비교적 여러 경로를 거쳐 안동으로 전파 되어지는 것으로 추정

<농림축산검역본부 역학조사>

- 경북 안동지역은 충주·제천 지역과 동일 작업 권역으로 작업단에 의해 안동지역으로 확산된 것으로 추정

21년 영주 분리주_Phylogenetic tree 분석	
<p>H34- PQ21YJGB001(397), PQ21YJGB002(398)</p>	
	<p>H34 - PQ21YJGB001(397), PQ21YJGB002(398)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- H07 타입의 안동 분리주와 같은 clade로 묶이는 것을 확인할 수 있음</li> <li>- H07 타입의 경우 19년 충주, 제천 분리주로 부터 분리되어 나온 타입으로 영주 분리주도 안동 분리주와 비슷한 시기에 전파되어 진 것으로 추정함</li> </ul>
21년 영주 분리주_Minimal spanning Tree(MST) 분석	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- H34 타입의 분리주들은 충주 제천 등지에서 주로 나타나는 타입인 H07 타입으로 부터 분리되어 나온 타입으로 영주 분리주역시 충주, 제천 등에서 전파 되어진 것으로 추정</li> <li>- H34 타입은 H02 타입을 시작으로 H08 → H07 타입으로 분리되어 나온 타입으로 충북 일대를 기점으로 안동, 영주 등으로 확산 되는 모습을 확인 할 수 있음</li> </ul>	
<p>&lt;농림축산검역본부 역학조사&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 경북 영주는 충주·제천·단양·안동과 인접하거나 동일한 작업권역으로 이들 지역에서 작업자에 의해 확산된 것으로 추정</li> </ul>	

### 5. 과수화상병균 2022년 분리주를 포함한 유전체 분석

- 2022년에 발생한 과수화상병 분리주를 추가하여 최종적으로 총 535개 분리주를 이용하여 유전체 분석을 수행하였음
- 4차년도까지 분석에 사용한 과수화상병 분리주는 총 404개이며, 5차년도에 2022년 분리주를 추가로 포함하여, 총 30개 분리주를 대상으로 whole genome sequencing(WGS) 분석을 수행하였으며, high-throughput genotyping을 위한 targeted sequencing 분석을 위해 총 96개 분리주를 추가로 분석에 사용하였음.
- 또한, NCBI DB에서 2015년 과수화상병 5 분리주의 whole genome sequencing data를 다운 받아서 추가로 분석에 사용하였음.
- Targeted sequencing에 사용한 96개 분리주는 2018년부터 2022년까지의 분리주를 대상으로 분석에 사용하였으며, 지역적으로 고르게 선발하여 분석에 사용하였음.

표 5. 유전체 분석에 사용한 과수화상병 분리주(총 554 균주)

분리년도	도	시 (city)	약자	수 (Number)	
2015년 (5ea)	경기도	안성	AS	2	
		충청남도	천안	CA	2
		충청북도	제천	JC	1
2017년 (64ea)	경기도	안성	AS	50	
		충청남도	천안	CA	14
2018년 (42ea)	경기도	안성	AS	6	
		충청북도	제천	JC	11
		충주	CJ	5	
	충청남도	천안	CA	6	
		강원도	원주	WJ	6
평창	PC	8			
2019년 (261ea)	경기도	안성	AS	6	
		연천	YC	9	
		이천	IC	5	
		파주	PJ	4	
	충청북도	음성	ES	13	
		제천	JC	62	
		충주	CJ	116	
	충청남도	천안	CA	32	
		강원도	원주	WJ	8
평창	PC		6		
2020년 (31ea)	경기도	광주	GJ	2	
		평택	PT	8	
		양주	YJGG	2	
	충청북도	진천	JCCB	8	
	충청남도	아산	ASCN	5	
	전라북도	익산	IS	6	
2021년 (72ea)	경기도	남양주	NYJ	5	
		여주	YJ	5	
		용인	YI	1	
		이천	IC	1	
	강원도	영월	YW	5	
		원주	WJ	4	
	충청남도	당진	DG	10	
예산		YS	5		

	충청북도	단양	DY	8
		괴산	GS	7
		음성	EJ	4
	경상북도	영주	YJGB	5
		안동	AD	12
		안성	AS	6
2022년 (60ea)	경기도	이천	IC	4
		광주	GJ	2
		화성	HS	6
		충주	CJ	7
	충청북도	제천	JC	4
		음성	EJ	2
		진천	JCCB	2
		괴산	GS	1
	충청남도	천안	CA	11
		아산	ASCN	2
		논산	NS	4
		평창	PC	1
	강원도	홍천	HC	4
		해외균주 (미국, 터키, 독일, 덴마크, 벨기에폴란드, 멕시코, 이스라엘, 스웨덴, 프랑스, 캐나다)		
	<b>합계</b>			

표 6. 과수화상병 2022년도 분리 균주 포함 추가 분석 목록 (WGS 분석)

분리 년도	도	시, 군	동, 읍, 면	샘플명	분리 년도	도	시, 군	동, 읍, 면	샘플명
2022	충남	논산시	광석면	NS001-1	2020	충남	천안시	직산읍	479-1
2022	충남	논산시	광석면	NS001-6	2021	충남	천안시	직산읍	57-2-(1)
2022	경기	화성시	양감면	HS001-1	2021	충남	천안시	성거읍	59-1
2022	경기	화성시	양감면	HS001-2	2021	충남	천안시	동면	195-1
2022	경기	화성시	양감면	HS001-5	2022	충남	천안시	직산읍	CA007-1
2022	경기	화성시	향남읍	HS002-4	2022	충남	천안시	성환읍	CA008-3
2022	강원	홍천군	서면	HC001-2	2020	충북	충주시	안림동	174-1
2022	강원	홍천군	서면	HC002-1	2020	충북	충주시	금가면	221-1
2020	경기	안성시	삼죽면	386-2	2021	충북	충주시	안림동	154-2
2020	경기	안성시	금광면	439-4	2021	충북	충주시	신니면	240-1
2021	경기	안성시	원곡면	48-3	2022	충북	충주시	소태면	CJ006-7
2021	경기	안성시	도기동	216-1	2020	충북	제천시	백운면	289-1
2022	경기	안성시	양성면	AS008-1	2020	충북	제천시	신월동	462-1
2022	경기	안성시	일죽면	AS009-1	2021	충북	제천시	청풍면	153-1
2020	충남	천안시	구룡동	443-3	2021	충북	제천시	청풍면	228-2

- 5차년도에 추가로 분석한 30개의 분리주들은 2022년 분리주를 포함하면서, 지금까지 분석에 사용한 과수화상병 분리주 중에서 년도별 혹은 지역별로 개체수가 적은 분리주들을 추가로 분석에 사용하였음.

표 7. 과수화상병 2022년도 분리 균주 포함 추가 분석 목록 (WGS 분석)

Sample	No. of total read	No. of mapped read	(%)	Mapped region	(%)
153-1	35,558,720	28,059,474	78.91%	3,833,204	99.98%
154-2	32,726,338	28,046,117	85.70%	3,833,221	99.98%
174-1	31,761,060	24,496,307	77.13%	3,833,118	99.98%
17593	25,093,718	19,218,893	76.59%	3,831,639	99.94%
195-1	31,474,788	25,785,972	81.93%	3,833,170	99.98%
21551	29,779,964	25,890,088	86.94%	3,833,249	99.98%
216-1	24,298,688	21,137,453	86.99%	3,833,163	99.98%
221-1	32,466,926	27,524,268	84.78%	3,833,152	99.98%
228-2	28,716,472	18,480,720	64.36%	3,833,013	99.98%
240-1	25,893,902	19,563,247	75.55%	3,833,062	99.98%
289-1	34,263,016	26,288,670	76.73%	3,833,211	99.98%
386-2	24,471,972	20,062,558	81.98%	3,831,487	99.94%
439-4	24,625,792	21,504,962	87.33%	3,833,207	99.98%
443-3	25,682,032	20,491,649	79.79%	3,833,150	99.98%
462-1	28,559,466	21,569,635	75.53%	3,833,153	99.98%
479-1	26,013,486	18,788,489	72.23%	3,833,046	99.98%
57-2-1	28,244,034	24,520,370	86.82%	3,833,195	99.98%
AS008-1	26,028,910	22,276,473	85.58%	3,833,187	99.98%
AS009-1	22,883,868	19,809,570	86.57%	3,833,057	99.98%
CA007-1	43,992,542	40,504,198	92.07%	3,833,281	99.99%
CA008-3	30,261,644	27,187,214	89.84%	3,833,237	99.98%
CJ006-7	30,252,994	26,514,149	87.64%	3,833,147	99.98%
HC001-2	25,453,608	22,394,782	87.98%	3,832,985	99.98%
HC002-1	25,236,250	21,937,165	86.93%	3,833,064	99.98%
HS001-1	22,863,462	19,071,226	83.41%	3,833,173	99.98%
HS001-2	26,486,724	22,693,114	85.68%	3,833,200	99.98%
HS001-5	24,736,594	18,569,624	75.07%	3,833,072	99.98%
HS002-4	27,916,198	23,004,905	82.41%	3,833,180	99.98%
NS001-1	27,322,314	24,604,116	90.05%	3,833,121	99.98%
NS001-6	29,234,228	24,560,778	84.01%	3,833,167	99.98%

- 과수화상병 30개 분리주들은 WGS 분석을 위해 각각 2Gb 정도씩 NGS 시퀀싱을 진행하였으며, 각각의 raw data들은 이전의 분석과 동일하게 WGS 분석을 수행하였음.



<과수화상병 2022년 분리주\_WGS(whole genome sequencing) 분석>

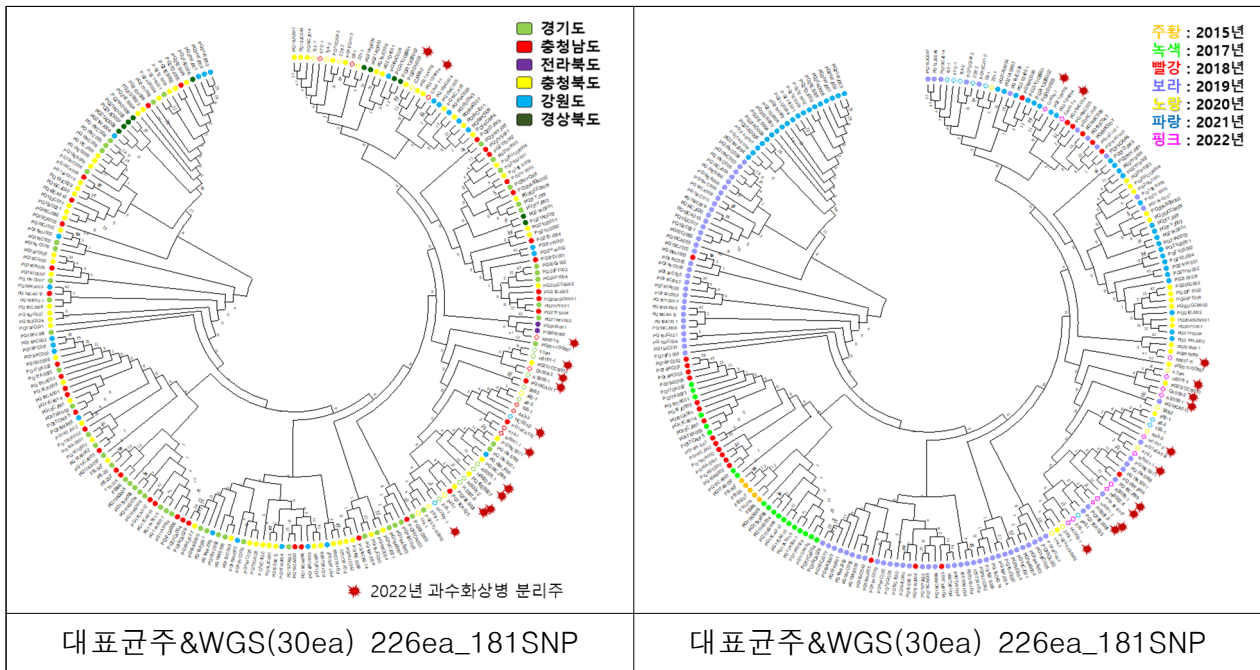


그림 18. 과수화상병 2022년 분리주 포함한 phylogenetic tree 분석

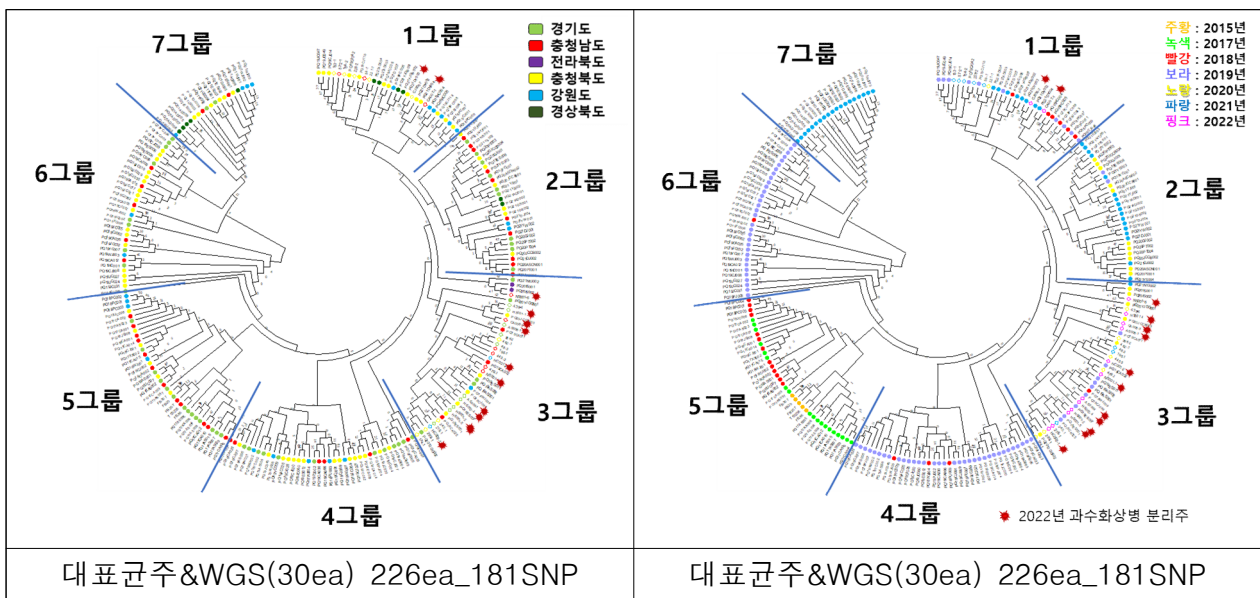
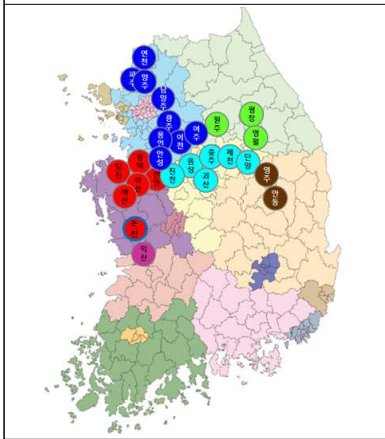
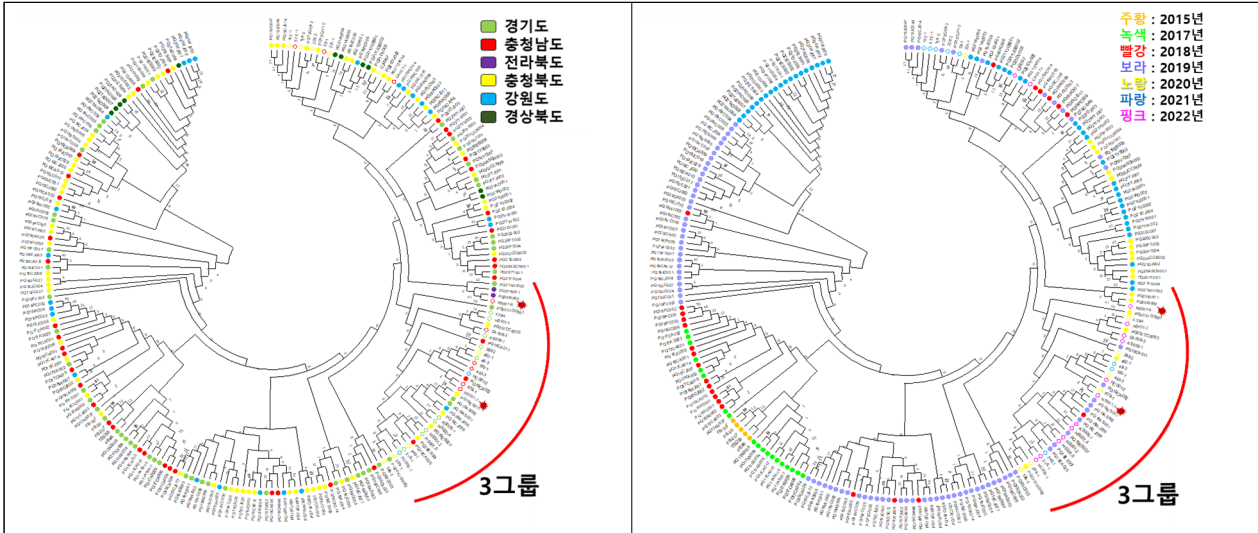
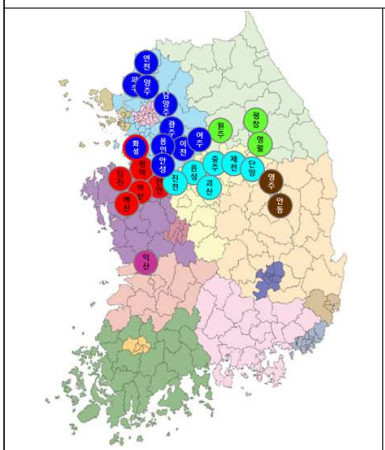
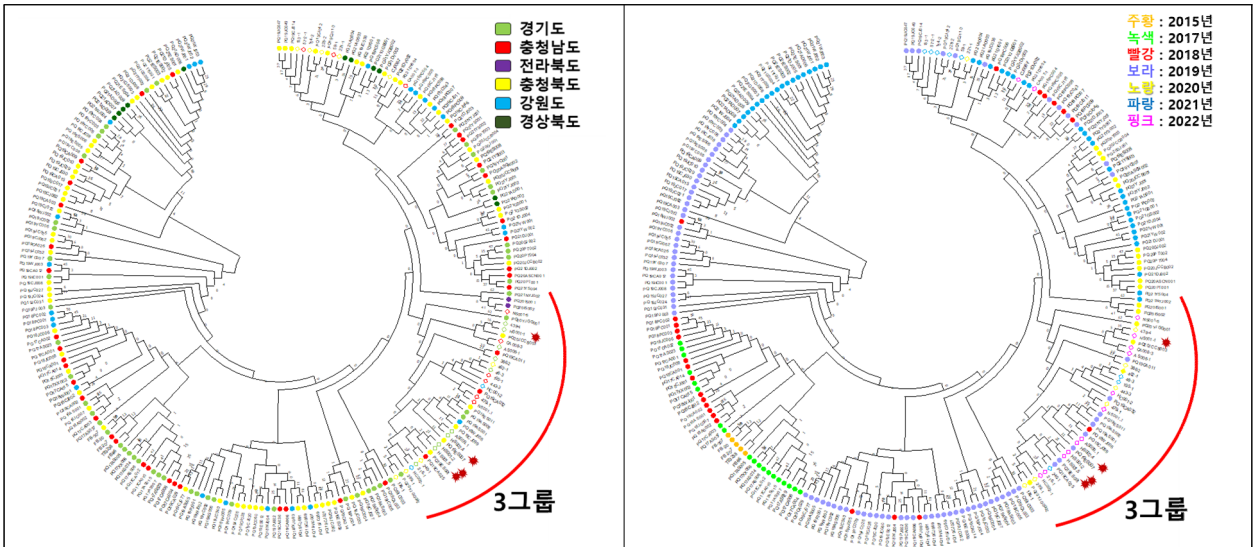


그림 19. 과수화상병 분리주들의 phylogenetic tree를 기반으로 한 그룹

- 2022년까지 국내에서 분리한 과수화상병균 535개 분리주를 대상으로 phylogenetic tree를 그린 후에 tree에 표시되는 샘플의 수를 줄이기 위해 각각의 clade를 중심으로 대표 균주를 선발하였음.
- 대표균주와 추가로 분석한 30개의 분리주를 대상으로 분석한 결과 크게 7개의 clade로 구분되는 것을 확인하였고, 이를 바탕으로 2022년 분리주의 역학조사를 수행하였음.

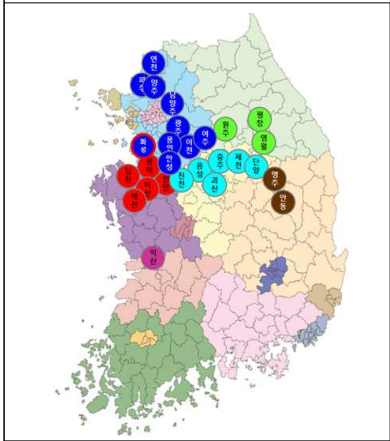
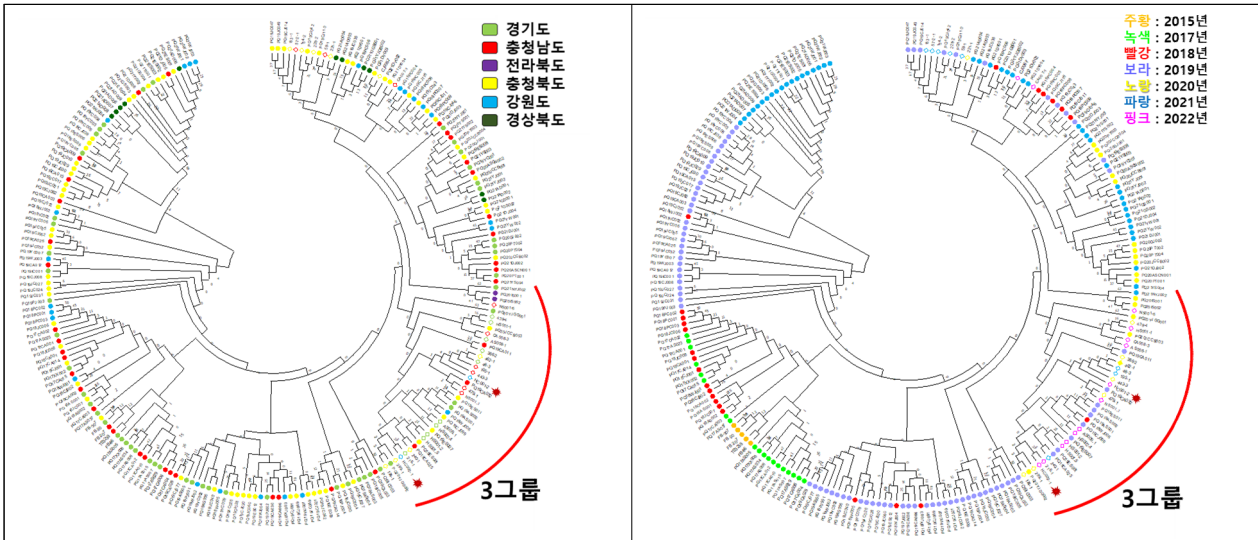


- 분리주 : NS001-1, NS001-6
- 분리지역 : 충청 남산시
- 분리년도 : 2022년
- NS001-1과 NS001-6 분리주는 2022년 충청 남산에서 분리하였음. 유연관계분석 결과 그룹3에 속하여, 그룹3의 경우 대부분의 2022년 분리주가 속해 있는 그룹으로, 2019년과 2020년 분리주들이 대부분 속해 있는 그룹으로 확인됨. 지역적으로는 충청남북도와 경기도 분리주가 주로 포함되어 있는 것으로 확인되어 충남 인근 지역에서 과수화상병이 감염된 것으로 추정됨.

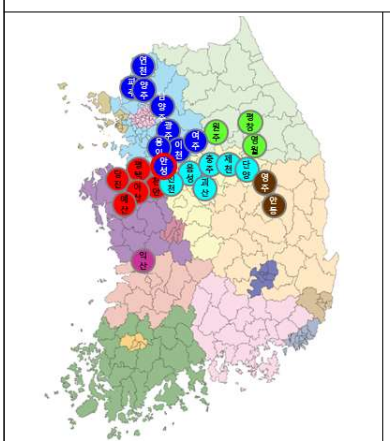
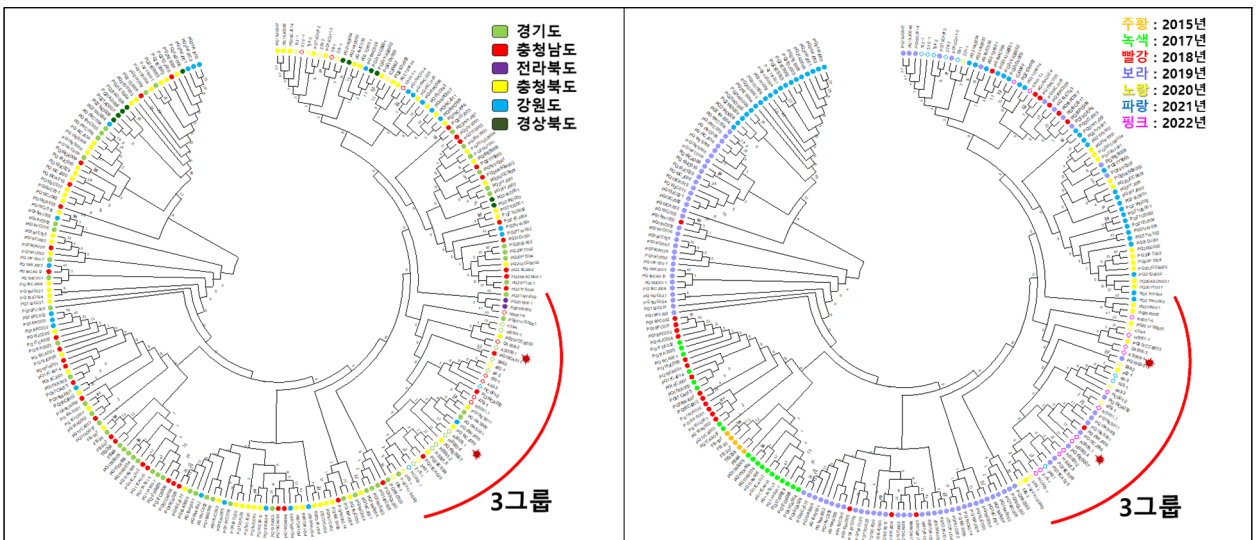


- 분리주 : HS001-1, HS001-2, HS001-5, HS002-4
- 분리지역 : 경기 화성시
- 분리년도 : 2022년
- HS001-1, HS001-2, HS001-5, HS002-4 분리주는 2022년 경기 화성에서 분리하였음. 유연관계분석 결과 그룹3에 속하여, 그룹3의 경우 대부분의 2022년 분리주가 속해 있는 그룹으로, 2019년과 2020년 분리주들이 대부분 속해 있는 그룹으로 확인됨. 지역적으로는 충청남북도와 경기도 분리주가 주로 포함되어 있는 것으로 확인되어 경기도 인근 지역에서 과수화상병이 감염된 것으로 추정됨

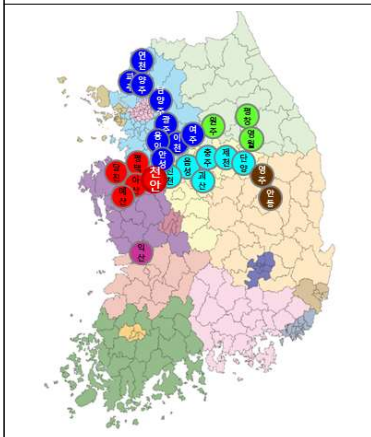
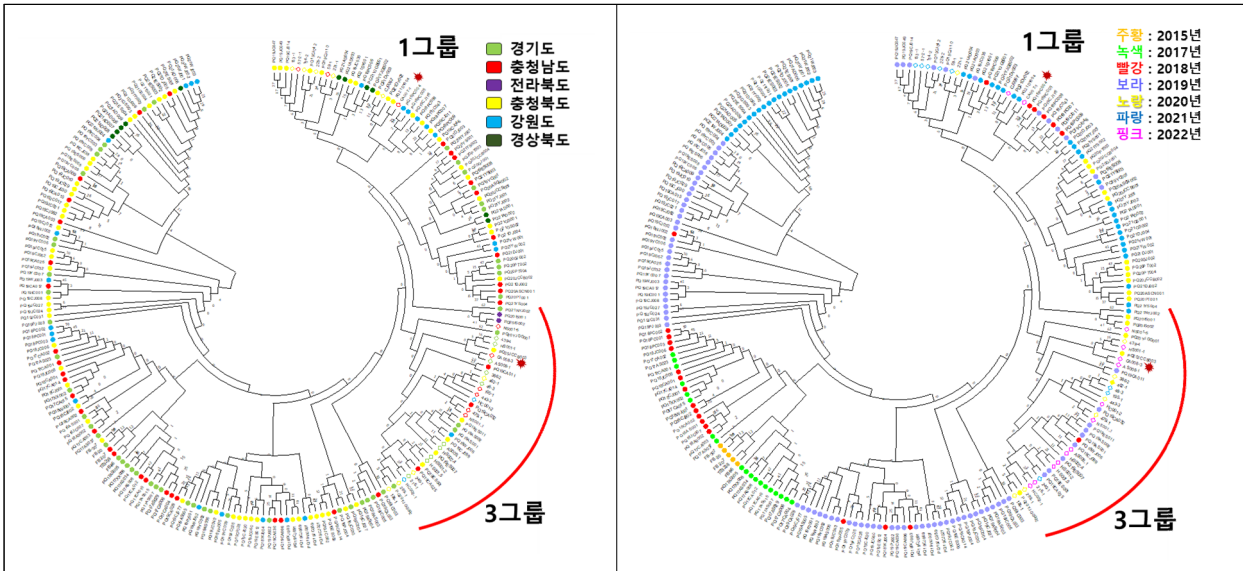




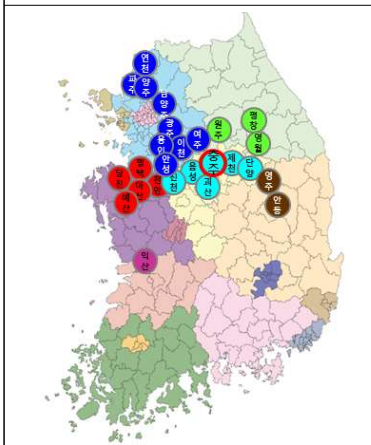
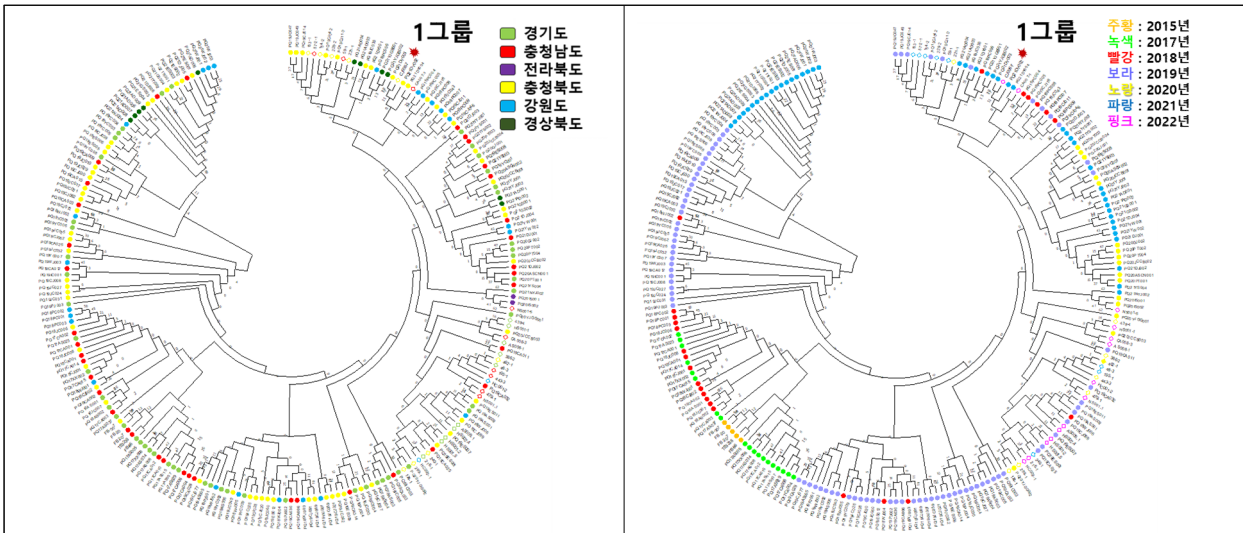
- 분리주 : HC001-2, HC002-1  
 - 분리지역 : 충남 홍천시  
 - 분리년도 : 2022년  
 - HC001-2, HC002-1 분리주는 2022년 강원 홍천에서 분리하였음. 유연관계분석 결과 그룹3에 속하여, 그룹3의 경우 대부분의 2022년 분리주가 속해 있는 그룹으로, 2019년과 2020년 분리주들이 대부분 속해 있는 그룹으로 확인됨. 지역적으로는 충청남북도와 경기도 분리주가 주로 포함되어 있는 것으로 확인되고, 일부 원주 분리주도 포함되어 있어 인근 원주지역에서 과수화상병이 감염된 것으로 추정됨



- 분리주 : AS001-1과 AS009-6  
 - 분리지역 : 경기 안성시  
 - 분리년도 : 2022년  
 - AS001-1과 AS009-6 샘플은 2022년 경기 안성에서 분리하였음. 유연관계분석 결과 그룹3에 속하여, 그룹3의 경우 대부분의 2022년 분리주가 속해 있는 그룹으로, 2019년과 2020년 분리주들이 대부분 속해 있는 그룹으로 확인됨. 지역적으로는 충청남북도와 경기도 분리주가 주로 포함되어 있는 것으로 확인되어 인근 경기지역에서 과수화상병이 감염된 것으로 추정됨



- 분리주 : CA007-1과 CA008-1
- 분리지역 : 충남 천안시
- 분리년도 : 2022년
- CA007-1과 CA008-1 샘플은 2022년 충남 천안에서 분리하였음. 유연관계분석 결과 그룹 1과 그룹3에 각각 속함. Ø그룹1의 경우 2018-2021년 분리주들이 주로 포함되어 있고, 그룹3의 경우 대부분의 2022년 분리주가 속해 있는 그룹으로, 2019-2020년 분리주들이 대부분 속해 있는 그룹으로 확인됨. 지역적으로는 충청남북도와 강원도 분리주가 주로 포함되어 있는 것으로 확인되어 충남 인근 지역에서 과수화상병이 감염된 것으로 추정됨



- 분리주 : CA007-1과 CA008-1
- 분리지역 : 충북 충주시
- 분리년도 : 2022년
- CA007-1과 CA008-1 샘플은 2022년 충남 천안에서 분리하였음. 유연관계분석 결과 그룹 1과 그룹3에 각각 속함. Ø그룹1의 경우 2018-2021년 분리주들이 주로 포함되어 있고, 그룹3의 경우 대부분의 2022년 분리주가 속해 있는 그룹으로, 2019-2020년 분리주들이 대부분 속해 있는 그룹으로 확인됨. 지역적으로는 충청남북도와 강원도 분리주가 주로 포함되어 있는 것으로 확인되어 충남 인근 지역에서 과수화상병이 감염된 것으로 추정됨

- 2022년도에 분리한 과수화상병 분리주들을 대상으로 유연관계분석을 기반으로한 역학 조사를 실시한 결과 모든 분리주들이 인근 지역에서 확산되어 감염된 것으로 추정됨.
- 국내에서 분리한 과수화상병 약 500여 분리주를 대상으로 유전체 분석을 수행한 결과 국내 분리주 집단간에는 유전적인 차이가 매우 적은 것으로 확인되었음
- 이러한 유전적 차이를 바탕으로 최근 발생하는 과수화상병은 대부분 감염 지역으로부터 인근으로 확산되는 것으로 추정함.
- 국외 분리주들과 국내 분리주들을 함께 유연관계 분석을 하면 이전에 확인한 것과 같이 2015년 이전에 북미 혹은 캐나다로부터 국내에 유입되어 발생한 것으로 추정되며, 한차례 국내에 유입된 분리주를 중심에서 인근 지역으로 확산되는 것으로 추정함.
- Genetic structure 분석 결과 크게 4개의 population으로 구분되며 각 population에 속하는 분리주 목록을 아래에 정리하였음(그림 20, 표 8).

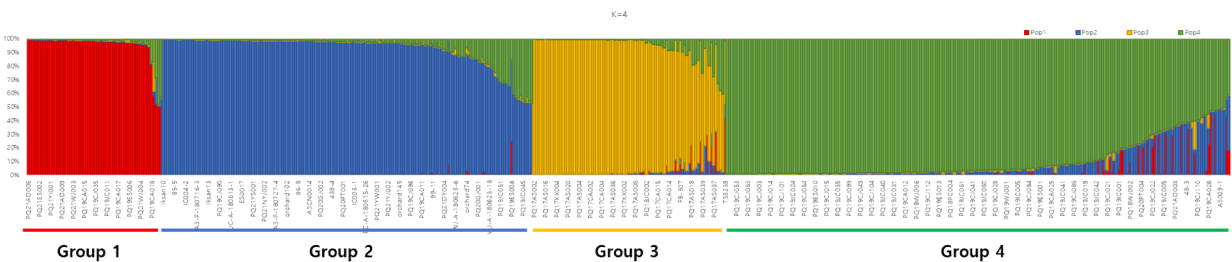


그림 20. 과수화상병 분리주들의 Genetic Structure 분석

표 8. Genetic structure 분석에 따른 각 그룹에 속하는 과수화상병 분리주 목록

Name	Region	Year	Name	Region	Year	Name	Region	Year	Name	Region	Year
<b>Group 1</b>			<b>Group 2</b>			<b>Group 3</b>			<b>Group 4</b>		
PQ21AD006	AD	2021	lksan10	IS	2020	PQ17AS002	AS	2017	PQ19JC047	JC	2019
PQ21DJ005	DJ	2021	JCCB003-2	JCCB	2022	PQ17AS001	AS	2017	PQ19AS005	AS	2019
PQ21WJ002	WJ	2021	CJ-A-180627-6	CJ	2018	PQ17AS029	AS	2017	PQ19CJ023	CJ	2019
PQ21DJ006	DJ	2021	lksan5	IS	2020	PQ17AS014	AS	2017	PQ19CJ077	CJ	2019
PQ21ES001	ES	2021	NS001-5	NS	2022	PQ17AS015	AS	2017	PQ19CJ053	CJ	2019
PQ21ES002	ES	2021	85-5	DJ	2021	PQ17AS016	AS	2017	PQ19JC055	JC	2019
PQ21ES004	ES	2021	AS003-4	AS	2022	PQ17AS025	AS	2017	PQ19AS006	AS	2019
PQ21WJ001	WJ	2021	AS008-3	AS	2022	PQ17AS026	AS	2017	PQ19CJ046	CJ	2019
PQ19CJ006	CJ	2019	farm410-2	ASCN	2020	PQ17AS027	AS	2017	PQ19CJ048	CJ	2019
PQ21GS003	GS	2021	farm515-3	PT	2020	PQ17AS030	AS	2017	PQ19CJ063	CJ	2019
PQ21YI001	YI	2021	IC004-2	IC	2022	PQ17XX004	XX	2017	PQ19CJ102	CJ	2019
PQ21YI002	YI	2021	Jincheon4	JCCB	2020	PQ17AS032	AS	2017	PQ19ES011	ES	2019
PQ19JC013	JC	2019	orchard176	DY	2021	PQ17CA006	CA	2017	PQ19JC039	JC	2019
PQ21AD005	AD	2021	orchard66	NYJ	2021	PQ17AS008	AS	2017	PQ19CJ002	CJ	2019
PQ21AD008	AD	2021	AS-P-180516-8	AS	2018	PQ17AS019	AS	2017	PQ19CJ003	CJ	2019
PQ21AD009	AD	2021	AS-P-180716-3	AS	2018	PQ17AS020	AS	2017	PQ19CJ042	CJ	2019
PQ21ES003	ES	2021	farm511	PT	2020	PQ17AS024	AS	2017	PQ19CJ078	CJ	2019
PQ21GS004	GS	2021	farm515-4	PT	2020	PQ17AS028	AS	2017	PQ19CJ107	CJ	2019
PQ19CJ082	CJ	2019	GJ002-2	GJ	2022	PQ17CA007	CA	2017	PQ19CA005	CA	2019
PQ19CJ029	JC	2019	lksan11	IS	2020	PQ17CA008	CA	2017	PQ19CJ014	CJ	2019
PQ21WJ003	WJ	2021	lksan13	IS	2020	PQ17AS004	AS	2017	PQ19CJ045	CJ	2019
PQ19CA016	CA	2019	CA-P-180525-1	CA	2018	PQ17AS009	AS	2017	PQ19CJ058	CJ	2019
PQ19CJ036	CJ	2019	farm430-4	ASCN	2020	PQ17XX008	XX	2017	PQ19CJ065	CJ	2019
PQ19CJ015	JC	2019	HS002-1	HS	2022	PQ17AS023	AS	2017	PQ19CJ071	CJ	2019
PQ19CJ021	JC	2019	JC-A-180621-10	JC	2018	PQ17AS031	AS	2017	PQ19CJ101	CJ	2019
PQ19CA015	CA	2019	PQ19CJ090	CJ	2019	PQ17CA002	CA	2017	PQ19CJ114	CJ	2019
PQ19CJ003	JC	2019	84-7	DJ	2021	PQ17XX006	XX	2017	PQ19CJ119	CJ	2019
PQ19CJ017	JC	2019	75-7	YW	2021	PQ17XX009	XX	2017	PQ19ES003	ES	2019
PQ21AD007	AD	2021	AS003-5	AS	2022	PQ18PC001	PC	2018	PQ19ES009	ES	2019
PQ19CA001	CA	2019	CA-A-180727-2	CA	2018	PQ17AS034	AS	2017	PQ19JC024	JC	2019
PQ19CJ035	CJ	2019	JC-A-180613-1	JC	2018	PQ17CA004	CA	2017	PQ18PC007	PC	2018
PQ19CJ001	JC	2019	PC001-3	PC	2022	PQ18JC004	JC	2018	PQ18PC008	PC	2018
PQ19CA002	CA	2019	87-3	YW	2021	PQ17CA012	CA	2017	PQ19CA032	CA	2019
PQ19CA010	CA	2019	CA008-4	CA	2022	PQ17XX005	XX	2017	PQ19CJ051	CJ	2019
PQ19CJ001	CJ	2019	CA-A-180621-1	CA	2018	PQ17AS017	AS	2017	PQ19CJ054	CJ	2019

			2									
PQ19JC011	JC	2019	ES0017	ES	2022	PQ17AS036	AS	2017	PQ19CJ061	CJ	2019	
PQ19YC004	YC	2019	IC004-1	IC	2022	PQ18PC003	PC	2018	PQ19CJ076	CJ	2019	
PQ19YC005	YC	2019	JC-A-180616-11	JC	2018	PQ17AS007	AS	2017	PQ19CJ080	CJ	2019	
PQ19ES005	ES	2019	orchard134	YJ	2021	PQ17AS035	AS	2017	PQ19CJ116	CJ	2019	
PQ19YC008	YC	2019	NS001-3	NS	2022	PQ17CA005	CA	2017	PQ19ES010	ES	2019	
PQ19CA017	CA	2019	PQ21YS001	YS	2021	PQ17XX002	XX	2017	PQ19PJ003	PJ	2019	
PQ19CJ083	CJ	2019	67-2	NYJ	2021	PQ18JC001	JC	2018	PQ19WJ002	WJ	2019	
PQ19CJ030	CJ	2019	73-12	DY	2021	PQ17CA009	CA	2017	PQ18WJ005	WJ	2018	
PQ19CJ038	CJ	2019	AS008-1	AS	2022	PQ17AS003	AS	2017	PQ19CJ009	CJ	2019	
PQ19YC003	YC	2019	WJ-A-180622-7	WJ	2018	PQ17AS021	AS	2017	PQ19CJ015	CJ	2019	
PQ19ES006	ES	2019	PQ21NYJ002	NYJ	2021	PQ17AS006	AS	2017	PQ19CJ026	CJ	2019	
PQ19CJ033	CJ	2019	74-15	DY	2021	PQ17AS038	AS	2017	PQ19CJ039	CJ	2019	
PQ19CJ004	JC	2019	87-2	YW	2021	PQ17XX007	XX	2017	PQ19CJ047	CJ	2019	
PQ19JC012	JC	2019	JCCB004-2	JCCB	2022	PQ17AS005	AS	2017	PQ19CJ085	CJ	2019	
PQ19JC010	JC	2019	PQ20JCCB003	JCCB	2020	PQ17AS011	AS	2017	PQ19JC035	JC	2019	
PQ21WJ004	WJ	2021	AS-P-180727-4	AS	2018	PQ18JC002	JC	2018	PQ19CA006	CA	2019	
PQ19CJ004	CJ	2019	farm392-3	ASCN	2020	PQ17AS012	AS	2017	PQ19CJ032	CJ	2019	
PQ19JC020	JC	2019	farm392-4	ASCN	2020	PQ17AS022	AS	2017	PQ19CJ044	CJ	2019	
PQ19CJ060	CJ	2019	farm430-3	ASCN	2020	PQ18JC006	JC	2018	PQ19CJ081	CJ	2019	
PQ19CA009	CA	2019	GJ002-1	GJ	2022	PQ17XX003	XX	2017	PQ19CJ099	CJ	2019	
PQ19CA018	CA	2019	orchard102	YS	2021	PQ17CA015	CA	2017	PQ19JC054	JC	2019	
FB-86	-	-	PQ21YS003	YS	2021	PQ18JC008	JC	2018	PQ19JC062	JC	2019	
PQ19CA003	CA	2019	HC003-2	HC	2022	PQ18CA001	CA	2018	PQ19YC007	YC	2019	
PQ19CJ073	CJ	2019	orchard226	YJ	2021	PQ18JC005	JC	2018	PQ19CJ013	CJ	2019	
PQ19CJ079	CJ	2019	PC-A-180615-1 7	PC	2018	PQ17AS013	AS	2017	PQ19CJ049	CJ	2019	
			86-8	DJ	2021	PQ17CA014	CA	2017	PQ19JC007	JC	2019	
			CA008-3	CA	2022	PQ18PC002	PC	2018	PQ19CA013	CA	2019	
			CA-A-180621-6	CA	2018	PQ18AS001	AS	2018	PQ19CA014	CA	2019	
			farm512	PT	2020	PQ17CA010	CA	2017	PQ19CJ007	CJ	2019	
			PQ21YS004	YS	2021	PQ17XX001	XX	2017	PQ19CJ104	CJ	2019	
			ASCN0014	ASCN	2022	FB-307	-	-	PQ19JC014	JC	2019	
			AS-P-181126-6	AS	2018	PQ18CJ001	CJ	2018	PQ19YC002	YC	2019	
			GS007-2	GS	2022	PQ18CJ002	CJ	2018	PQ18PC005	PC	2018	
			205-3	GS	2021	PQ17AS041	AS	2017	PQ18PC009	PC	2018	
			CJ-A-180718-4	CJ	2018	PQ18WJ001	WJ	2018	PQ19JC040	JC	2019	
			PQ20GJ002	GJ	2020	PQ17AS018	AS	2017	PQ19PJ004	PJ	2019	
			189-14	YJGB	2021	PQ17CA001	CA	2017	PQ19CA019	CA	2019	
			IC003-2	IC	2022	PQ18AS002	AS	2018	PQ19CJ010	CJ	2019	
			PQ20ASCN001	ASCN	2020	PQ17AS033	AS	2017	PQ19JC030	JC	2019	
			PQ20IS001	IS	2020	PQ17CA013	CA	2017	PQ19JC031	JC	2019	
			439-4	AS	2020	PQ17AS039	AS	2017	PQ19JC043	JC	2019	
			PQ21YS002	YS	2021	PQ18JC007	JC	2018	PQ19PJ002	PJ	2019	
			189-13	YJGB	2021	PQ17AS010	AS	2017	PQ19WJ003	WJ	2019	
			205-4	GS	2021	PQ18CA002	CA	2018	PQ19YC009	YC	2019	
			ASCN0013	ASCN	2022	FB-20	-	-	PQ19CA012	CA	2019	
			PQ20PT001	PT	2020	PQ17AS037	AS	2017	PQ19CA021	CA	2019	
			289-1	JC	2020	FB-207	-	-	PQ19CJ025	CJ	2019	
			282	GS	2021	PQ17AS040	AS	2017	PQ19JC037	JC	2019	
			PQ21AD001	AD	2021	PQ18JC003	JC	2018	PQ19CA031	CA	2019	
			PQ21YJ001	YJ	2021	PQ17CA003	CA	2017	PQ18WJ006	WJ	2018	
			IC003-1	IC	2022	TS3238	-	-	PQ19CA030	CA	2019	
			PQ20PT002	PT	2020				PQ19CJ005	CJ	2019	
			PC-A-180615-1 0	PC	2018				PQ19CJ012	CJ	2019	
			PQ20JCCB002	JCCB	2020				PQ19CJ067	CJ	2019	
			Jincheon3	JCCB	2020				PQ19CJ112	CJ	2019	
			PC-A-180615-2 6	PC	2018				PQ19CA024	CA	2019	
			386-2	AS	2020				PQ19CJ029	CJ	2019	
			CJ006-8	CJ	2022				PQ19CJ050	CJ	2019	
			189-15	YJGB	2021				PQ19CJ105	CJ	2019	
			PQ20JCCB001	JCCB	2020				PQ19ES013	ES	2019	
			PQ21YW001	YW	2021				PQ18PC006	PC	2018	
			63-4	NYJ	2021				PQ19CJ037	CJ	2019	
			HC003-4	HC	2022				PQ19CJ115	CJ	2019	
			PQ19JC053	JC	2019				PQ19CA022	CA	2019	
			PQ21YJGB001	YJGB	2021				PQ18PC004	PC	2018	
			PQ21YJ002	YJ	2021				PQ18WJ004	WJ	2018	
			143-22	AD	2021				PQ19CA028	CA	2019	
			CJ006-7	CJ	2022				PQ19CJ020	CJ	2019	
			CJ-A-180718-5	CJ	2018				PQ19IC004	IC	2019	
			PC-A-180615-8	PC	2018				PQ19JC061	JC	2019	
			orchard145	DJ	2021				PQ19CA029	CA	2019	
			PQ21AD002	AD	2021				PQ19CJ017	CJ	2019	
			PC-A-180615-2 3	PC	2018				PQ19CJ056	CJ	2019	



PQ19CA027	CA	2019
PQ19CJ093	CJ	2019
PQ19CJ096	CJ	2019
240-1	CJ	2021
PQ19JC038	JC	2019
NS001-1	NS	2022
PQ21DY002	DY	2021
PQ19CA011	CA	2019
HS002-2	HS	2022
HS001-1	HS	2022
59-1	CA	2021
PQ20IS002	IS	2020
99-11	AD	2021
PQ21YW002	YW	2021
ES0014	ES	2022
PQ21DJ002	DJ	2021
WJ-A-180622-3 8	WJ	2018
PQ21DY004	DY	2021
195-1	CA	2021
orchard163	YJ	2021
PQ21DJ003	DJ	2021
PQ19CJ091	CJ	2019
WJ-A-180623-6	WJ	2018
PQ21GS002	GS	2021
PQ20JCCB004	JCCB	2020
NS001-6	NS	2022
PQ19JC052	JC	2019
orchard74	DY	2021
PQ19JC016	JC	2019
PQ21NYJ001	NYJ	2021
HS002-4	HS	2022
PQ20ASCN002	ASCN	2020
PQ20GJ001	GJ	2020
orchard141	AD	2021
PQ19CJ095	CJ	2019
PQ21GS001	GS	2021
WJ-A-180622-2 9	WJ	2018
WJ-A-180623-1 8	WJ	2018
CA006-2	CA	2022
PQ21YJGB002	YJGB	2021
CA006-3	CA	2022
HS001-5	HS	2022
PQ19JC051	JC	2019
462-1	JC	2020
PQ19AS001	AS	2019
479-1	CA	2020
HS001-2	HS	2022
PQ19ES008	ES	2019
PQ21DY003	DY	2021
PQ21DJ001	DJ	2021
PQ19CJ055	CJ	2019
PQ19CJ094	CJ	2019
PQ19JC045	JC	2019
PQ21AD004	AD	2021
PQ18WJ003	WJ	2018
PQ19JC057	JC	2019
PQ21DY001	DY	2021

PQ19CA008	CA	2019
PQ19CJ041	CJ	2019
PQ19CJ043	CJ	2019
PQ19CJ103	CJ	2019
PQ19CJ108	CJ	2019
PQ19JC059	JC	2019
PQ19JC060	JC	2019
PQ19AS004	AS	2019
PQ19CJ031	CJ	2019
PQ19CJ106	CJ	2019
PQ19ES002	ES	2019
PQ19CJ028	CJ	2019
PQ19JC009	JC	2019
PQ19PJ001	PJ	2019
PQ19CJ118	CJ	2019
PQ19JC028	JC	2019
PQ19WJ001	WJ	2019
PQ19CJ011	CJ	2019
PQ19CJ016	CJ	2019
57-2-1	CA	2021
PQ19CJ070	CJ	2019
PQ19JC005	IC	2019
PQ19JC0223	JC	2019
PQ19CJ024	CJ	2019
PQ19CJ059	CJ	2019
PQ19YC006	YC	2019
PQ19CJ084	CJ	2019
PQ19JC026	JC	2019
PQ19CJ111	CJ	2019
174-1	CJ	2020
PQ19ES004	ES	2019
PQ19ES001	ES	2019
PQ19CJ019	CJ	2019
PQ19JC033	JC	2019
PQ19CJ064	CJ	2019
PQ19JC056	JC	2019
PQ19CA025	CA	2019
PQ19IC002	IC	2019
PQ19JC022	JC	2019
PQ19JC036	JC	2019
154-2	CJ	2021
PQ19JC041	JC	2019
PQ19JC048	JC	2019
CA007-1	CA	2022
PQ19CA033	CA	2019
CJ006-7_T	CJ	2022
PQ19CJ086	CJ	2019
PQ19CJ066	CJ	2019
PQ19CJ034	CJ	2019
PQ19AS003	AS	2019
PQ19CJ088	CJ	2019
PQ19JC018	JC	2019
153-1	JC	2021
PQ19JC049	JC	2019
221-1	CJ	2020
PQ19CJ074	CJ	2019
PQ19JC042	JC	2019
PQ19CJ068	CJ	2019
PQ19CJ098	CJ	2019
PQ19CJ057	CJ	2019
PQ19CA007	CA	2019
PQ19CJ021	CJ	2019
PQ19JC027	JC	2019
PQ19IC003	IC	2019
PQ19CJ052	CJ	2019
PQ19JC019	JC	2019
PQ19IC001	IC	2019
PQ19CJ008	CJ	2019
PQ19CJ109	CJ	2019
CA008-3_T	CA	2022
PQ19CJ117	CJ	2019
PQ18WJ002	WJ	2018
PQ19ES012	ES	2019
228-2	JC	2021
PQ19AS002	AS	2019

PQ19CJ062	CJ	2019
PQ20PT004	PT	2020
PQ19CA023	CA	2019
PQ19JC046	JC	2019
PQ19CA004	CA	2019
216-1	AS	2021
PQ19CJ022	CJ	2019
PQ19CJ069	CJ	2019
PQ19CJ089	CJ	2019
PQ19CJ040	CJ	2019
PQ19JC002	JC	2019
PQ19JC005	JC	2019
PQ19JC025	JC	2019
443-3	CA	2020
HC002-1	HC	2022
PQ19JC008	JC	2019
PQ21AD003	AD	2021
PQ20YJGG001	YJGG	2020
PQ19CJ027	CJ	2019
PQ19JC006	JC	2019
PQ20PT003	PT	2020
48-3	AS	2021
PQ19JC032	JC	2019
AS008-1_T	AS	2022
PQ19CJ087	CJ	2019
PQ19CJ113	CJ	2019
PQ19CJ110	CJ	2019
PQ19CJ075	CJ	2019
PQ19JC050	JC	2019
HC001-2	HC	2022
PQ19YC001	YC	2019
PQ19CA026	CA	2019
PQ19CJ072	CJ	2019
PQ20YJGG002	YJGG	2020
PQ19CJ018	CJ	2019
PQ21DJ004	DJ	2021
AS009-1	AS	2022
PQ19CJ097	CJ	2019
PQ19JC044	JC	2019
PQ19JC034	JC	2019
PQ19ES007	ES	2019

## 6. 과수화상병균 역학조사를 위한 targeted sequencing 분석법 구축

(High-throughput genotyping)

- 과수화상병 분리주 96개 분리주를 대상으로 high-throughput genotyping 시스템 구축을 위한 targeted sequencing 분석을 수행함
- 이전 유전체 분석에서 확보한 haplotype 기반의 181개 SNP 마커 정보를 이용하여 targeted bait를 제작하였음
- 181개의 SNP 마커는 haplotype 마커 개발을 위해 총 64개의 유전자 내에 있는 SNP 좌를 대상으로 선발하였음
- Targeted sequencing 분석법은 기 선발된 SNP 마커 정보를 이용해서 targeted bait 제작을 진행하고, 분석에 사용하는 과수화상병 분리주들을 대상으로 NGS library 제작 후 targeted bait를 library에 하이브리드 반응을 통해 targeted bait 서열을 가지고 있는 library 단편만 선택적으로 NGS 시퀀싱을 수행하는 방식임
- 따라서 대량의 과수화상병 분리주(96샘플을 대상으로함)를 대상으로 대량의 SNP 마커 (총 181개 마커 사용)를 빠르고 효과적으로 분석할 수 있음.
- 과수화상병 96개 분리주에 대한 NGS sequencing은 Illumina iseq100 장비를 이용하여 약 1.2Gb 서열을 확보한 후 각 샘플별 분석을 수행하였음.



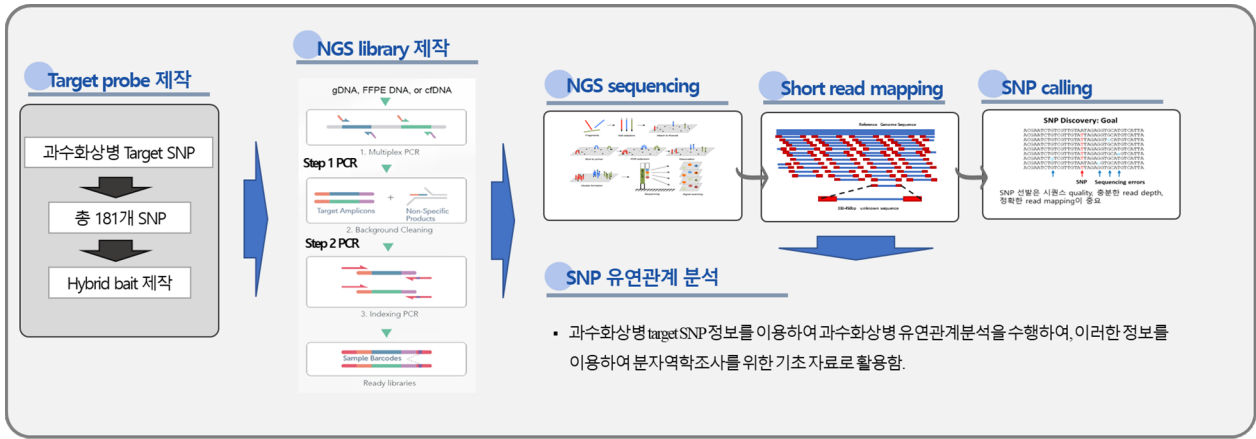


그림 14. 과수화상병 역학조사를 위한 target sequencing을 이용한 high-throughput genotyping 시스템

- 과수화상병 96개 분리주를 대상으로 targeted sequencing을 이용한 지노타입핑은 위 모식도에서 보여주는 것처럼 NGS 시퀀싱 후 read mapping와 SNP calling을 통해서 지노타입핑을 수행하였음

표 9. 과수화상병 2022년도 분리 균주 포함 추가 분석 목록 (Targeted sequencing 분석)

Sample	No. of total read	No. of mapped read	(%)	Mapped region	(%)
143-22_1	132,801	132,643	99.88%	1,409,637	36.77%
189-13_1	140,872	140,655	99.85%	1,424,696	37.16%
189-14_1	106,934	106,823	99.90%	1,326,499	34.60%
189-15_1	109,848	109,722	99.89%	1,273,062	33.21%
205-3_1	87,948	87,868	99.91%	1,149,613	29.99%
205-4_1	86,456	86,385	99.92%	1,157,144	30.18%
282_1	110,295	110,137	99.86%	1,170,730	30.54%
63-4_1	151,188	151,054	99.91%	1,358,045	35.42%
67-2_1	93,981	93,926	99.94%	1,130,652	29.49%
73-12_1	84,516	84,458	99.93%	1,003,212	26.17%
74-15_1	128,462	128,389	99.94%	1,278,067	33.34%
84-7_1	91,963	91,880	99.91%	1,224,454	31.94%
85-5_1	112,009	111,860	99.87%	1,161,626	30.30%
85-7_1	116,049	115,892	99.86%	1,193,541	31.13%
86-8_1	103,903	103,780	99.88%	1,308,634	34.13%
87-2_1	111,321	111,175	99.87%	1,229,691	32.07%
87-3_1	110,439	110,286	99.86%	1,223,214	31.91%
99-11_1	113,406	113,289	99.90%	1,362,180	35.53%
AS003-4_1	97,563	97,449	99.88%	1,126,987	29.40%
AS003-5_1	88,981	88,890	99.90%	1,139,540	29.72%
AS008-1_1	85,468	85,387	99.91%	1,085,287	28.31%
AS008-3_1	111,313	111,186	99.89%	1,250,981	32.63%
ASCN0013_1	89,081	89,021	99.93%	815,617	21.27%
ASCN0014_1	86,400	86,341	99.93%	830,931	21.67%
AS-P-180516-15_1	86,658	86,632	99.97%	471,797	12.31%
AS-P-180716-3_1	89,637	89,572	99.93%	500,014	13.04%
AS-P-180727-4_1	109,769	109,709	99.95%	588,735	15.36%

AS-P-181126-6_1	79,687	79,638	99.94%	453,032	11.82%
CA006-2_1	118,352	118,249	99.91%	1,065,163	27.78%
CA006-3_1	95,162	95,077	99.91%	883,059	23.03%
CA008-3_1	88,927	88,841	99.90%	820,774	21.41%
CA008-4_1	60,917	60,845	99.88%	588,436	15.35%
CA-A-180621-12_1	116,343	116,264	99.93%	943,954	24.62%
CA-A-180621-6_1	85,756	85,724	99.96%	513,467	13.39%
CA-A-180727-2_1	100,151	100,044	99.89%	783,248	20.43%
CA-P-180525-1_1	90,795	90,729	99.93%	494,206	12.89%
CJ006-7_1	97,619	97,499	99.88%	834,477	21.77%
CJ006-8_1	109,519	109,412	99.90%	870,313	22.70%
CJ-A-180627-6_1	82,406	82,367	99.95%	477,876	12.46%
CJ-A-180718-4_1	87,184	87,141	99.95%	499,665	13.03%
CJ-A-180718-5_1	80,139	80,099	99.95%	481,077	12.55%
ES0014_1	110,937	110,848	99.92%	845,355	22.05%
ES0017_1	130,255	130,142	99.91%	1,006,532	26.25%
farm392-3_1	97,235	97,170	99.93%	917,412	23.93%
farm392-4_1	89,513	89,451	99.93%	858,160	22.38%
farm410-2_1	93,736	93,663	99.92%	899,739	23.47%
farm430-3_1	111,340	111,244	99.91%	965,213	25.18%
farm430-4_1	95,695	95,605	99.91%	812,287	21.19%
farm511_1	139,738	139,622	99.92%	1,175,086	30.65%
farm512_1	103,392	103,309	99.92%	1,017,225	26.53%
farm515-3_1	101,437	101,375	99.94%	1,013,651	26.44%
farm515-4_1	73,266	73,203	99.91%	800,126	20.87%
GJ002-1_1	105,608	105,501	99.90%	755,653	19.71%
GJ002-2_1	71,456	71,395	99.91%	647,215	16.88%
GS007-2_1	102,545	102,475	99.93%	988,447	25.78%
HC003-2_1	74,470	74,403	99.91%	663,412	17.30%
HC003-4_1	80,103	80,047	99.93%	722,882	18.86%
HS002-1_1	102,529	102,439	99.91%	823,478	21.48%
HS002-2_1	93,302	93,219	99.91%	769,961	20.08%
IC003-1_1	103,618	103,503	99.89%	1,177,701	30.72%
IC003-2_1	119,892	119,795	99.92%	1,394,865	36.38%
IC004-1_1	103,354	103,251	99.90%	789,202	20.59%
IC004-2_1	101,674	101,568	99.90%	767,485	20.02%
lksan10_1	121,751	121,639	99.91%	1,135,762	29.62%
lksan11_1	96,681	96,603	99.92%	991,152	25.85%
lksan13_1	106,666	106,540	99.88%	1,072,883	27.98%
lksan5_1	106,035	105,918	99.89%	860,233	22.44%
JC-A-180613-1_1	98,597	98,531	99.93%	518,597	13.53%
JC-A-180616-11_1	102,919	102,866	99.95%	536,281	13.99%
JC-A-180621-10_1	74,767	74,732	99.95%	481,897	12.57%
JCCB003-2_1	105,140	105,056	99.92%	800,613	20.88%
JCCB004-2_1	95,132	95,027	99.89%	745,755	19.45%
Jincheon3_1	83,226	83,178	99.94%	868,095	22.64%
Jincheon4_1	84,319	84,260	99.93%	849,334	22.15%
NS001-3_1	101,321	101,234	99.91%	881,345	22.99%

NS001-5_1	113,526	113,437	99.92%	922,442	24.06%
orchard102_1	75,580	75,512	99.91%	1,079,517	28.16%
orchard134_1	95,660	95,566	99.90%	918,731	23.96%
orchard141_1	143,421	143,251	99.88%	1,610,662	42.01%
orchard145_1	127,056	126,965	99.93%	1,433,309	37.39%
orchard163_1	79,419	79,324	99.88%	784,010	20.45%
orchard176_1	95,625	95,514	99.88%	1,226,238	31.98%
orchard226_1	111,119	111,013	99.90%	1,063,744	27.75%
orchard66_1	113,023	112,908	99.90%	1,305,511	34.05%
orchard74_1	86,255	86,178	99.91%	1,053,061	27.47%
PC001-3_1	108,418	108,334	99.92%	950,011	24.78%
PC-A-180615-10_1	94,987	94,920	99.93%	763,438	19.91%
PC-A-180615-17_1	101,071	100,991	99.92%	893,499	23.31%
PC-A-180615-23_1	94,434	94,399	99.96%	824,652	21.51%
PC-A-180615-26_1	90,651	90,611	99.96%	828,550	21.61%
PC-A-180615-8_1	94,502	94,461	99.96%	850,993	22.20%
WJ-A-180622-29_1	102,728	102,665	99.94%	867,657	22.63%
WJ-A-180622-38_1	112,278	112,216	99.94%	921,956	24.05%
WJ-A-180622-7_1	29,915	29,486	98.57%	362,647	9.46%
WJ-A-180623-18_1	99,286	99,242	99.96%	907,309	23.67%
WJ-A-180623-6_1	92,403	92,186	99.77%	775,686	20.23%

표 5. Targeted genotyping에 사용한 SNP 마커 정보

Marker No.	pos	ref	Allele	Marker No.	pos	ref	Allele	Marker No.	pos	ref	Allele	Marker No.	pos	ref	Allele
1	19552	C	C/A	47	1688979	C	C/T	93	2404531	G	G/A	139	747652	G	G/A
2	20829	A	A/C	48	1688994	C	C/T	94	2404613	C	C/T	140	1954419	G	A/G
3	285805	C	C/T	49	1690181	A	A/T	95	2404661	G	G/A	141	1954450	C	C/T
4	288950	T	T/G	50	1690184	G	G/A	96	2404762	C	C/T	142	1954488	T	C/T
5	289206	T	T/C	51	1690197	G	G/A	97	2404765	G	G/A	143	1954659	A	G/A
6	424053	C	C/A	52	1691064	G	G/A	98	2405610	C	C/A	144	1954728	G	G/A
7	424616	G	G/T	53	1781541	A	G/A	99	2405757	C	C/A	145	1955164	T	C/T
8	480502	C	C/G	54	1783382	G	G/A	100	2405770	G	G/T	146	1955268	T	C/T
9	480506	C	C/T	55	1800761	T	T/G	101	2406252	G	G/A	147	1955301	T	T/C
10	505031	G	G/A	56	1801147	G	G/T	102	2406287	G	G/A	148	1955472	A	A/G
11	505267	G	G/T	57	1801793	C	C/A	103	2406426	G	G/C	149	1955966	C	C/T
12	633069	G	G/A	58	1802621	T	T/C	104	2406689	G	A/G	150	1956111	T	T/C
13	634070	T	T/C	59	1822262	G	G/T	105	2406754	G	G/C	151	2392440	T	T/A
14	643695	G	A/G	60	1822573	T	T/C	106	2407600	G	G/T	152	2392470	G	A/G
15	643996	T	C/T	61	1930902	C	C/T	107	2451582	T	T/A	153	2608233	G	A/G
16	644197	T	C/T	62	1931901	C	C/A	108	2453796	T	T/C	154	2608296	G	G/A
17	644332	G	A/G	63	1935302	G	G/A	109	2590196	G	A/G	155	2609820	A	A/G
18	645145	A	G/A	64	1935316	T	T/A	110	2593879	C	C/G	156	2609882	C	C/T
19	645241	C	C/T	65	1954168	C	C/T	111	2593887	C	C/G	157	2610371	T	T/G
20	645454	A	A/G	66	1954306	A	A/G	112	2599808	A	G/A	158	2610398	C	C/T
21	645505	A	G/A	67	1999993	G	G/T	113	2599882	C	C/T	159	2610431	C	C/G
22	654776	C	C/T	68	2000613	C	C/T	114	2658297	T	T/A	160	2868391	G	G/C

23	654777	C	C/T	69	2049671	C	C/T	115	2659088	G	G/A	161	2868451	A	C/A
24	751029	G	T/G	70	2050679	C	C/T	116	3187572	C	C/T	162	2938694	C	C/A
25	751062	T	G/T	71	2154220	T	T/G	117	3188080	T	T/C	163	2938714	C	C/T
26	751092	A	A/G	72	2154240	A	A/C	118	3517819	C	C/A	164	3151594	C	T/C
27	777522	C	C/T	73	2174544	G	G/A	119	3517821	G	G/A	165	3151714	C	C/T
28	777929	G	G/T	74	2177993	G	G/A	120	3532343	C	C/A	166	3151924	G	G/A
29	836870	C	C/A	75	2179265	C	C/A	121	3534003	A	A/T	167	3152003	G	G/A
30	838386	G	G/A	76	2179730	G	G/T	122	3541677	G	G/T	168	3152447	C	T/C
31	1180591	G	G/A	77	2235521	C	C/T	123	3542156	C	C/T	169	3152639	A	G/A
32	1180623	G	G/A	78	2236077	C	C/A	124	3743637	G	G/A	170	3296000	A	A/G
33	1404601	G	T/G	79	2269813	G	G/T	125	3744468	A	A/G	171	3296087	T	T/A
34	1404665	C	A/C	80	2270112	C	C/A	126	457254	A	A/T	172	3296640	A	A/G
35	1405622	C	C/T	81	2314822	C	C/T	127	457255	C	C/T	173	3296834	A	T/A
36	1453850	G	G/A	82	2314892	T	T/A	128	457311	C	C/T	174	3296864	G	G/A
37	1454006	C	C/T	83	2401891	G	G/A	129	615125	G	G/T	175	3296944	T	T/C
38	1461833	G	G/A	84	2401972	G	G/A	130	615337	C	C/T	176	3302769	G	G/A
39	1461929	A	A/T	85	2402332	A	A/C	131	639710	G	G/A	177	3302963	A	A/T
40	1481267	G	G/A	86	2402333	T	T/C	132	640011	T	C/T	178	3302993	G	A/G
41	1481269	C	C/A	87	2402454	G	G/T	133	640212	T	C/T	179	3303073	T	T/C
42	1561292	A	A/G	88	2402519	T	T/A	134	640347	G	A/G	180	3427230	A	A/T
43	1561381	C	C/T	89	2403511	G	G/A	135	641160	G	G/A	181	3427260	A	G/A
44	1622626	T	T/A	90	2403532	T	T/A	136	641256	T	C/T				
45	1624611	G	G/T	91	2403591	G	G/T	137	641520	G	A/G				
46	1688473	A	A/C	92	2404179	C	C/T	138	747589	G	G/T				

- 과수화상병 분리주 96샘플을 대상으로 high-throughput genotyping을 위한 targeted 시퀀싱을 진행하였음. Targeted 시퀀싱을 통해 확보한 181개 SNP 지노타입핑 데이터를 이용하여 phylogenetic tree, Genetic Structure 분석 등을 이용하여 유연관계 분석을 수행하였음.
- Targeted 시퀀싱을 통해 총 181개의 SNP 모두 100% 정상적으로 calling 된 것을 확인 할 수 있었으며, 아래 IGV 분석을 통해 read mapping 결과를 확인한 결과 target 부위에 raw read가 정상적으로 mapping 된 것을 확인할 수 있었음(그림 15).
- 전체 샘플 시료 중에서 3샘플(AS008-1, CA008-3, CJ006-7)은 WGS과 Targeted 시퀀싱 분석을 모두 수행하여 SNP calling의 정확도를 확인하였음(그림 16).

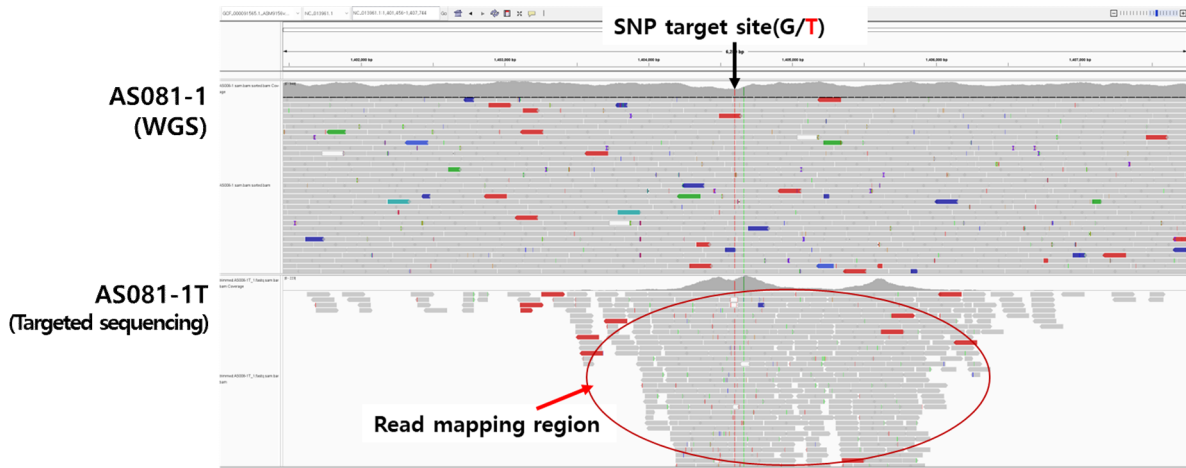


그림 21. IGV viewer를 이용한 과수화상병 target 영역에 대한 raw read mapping 패턴

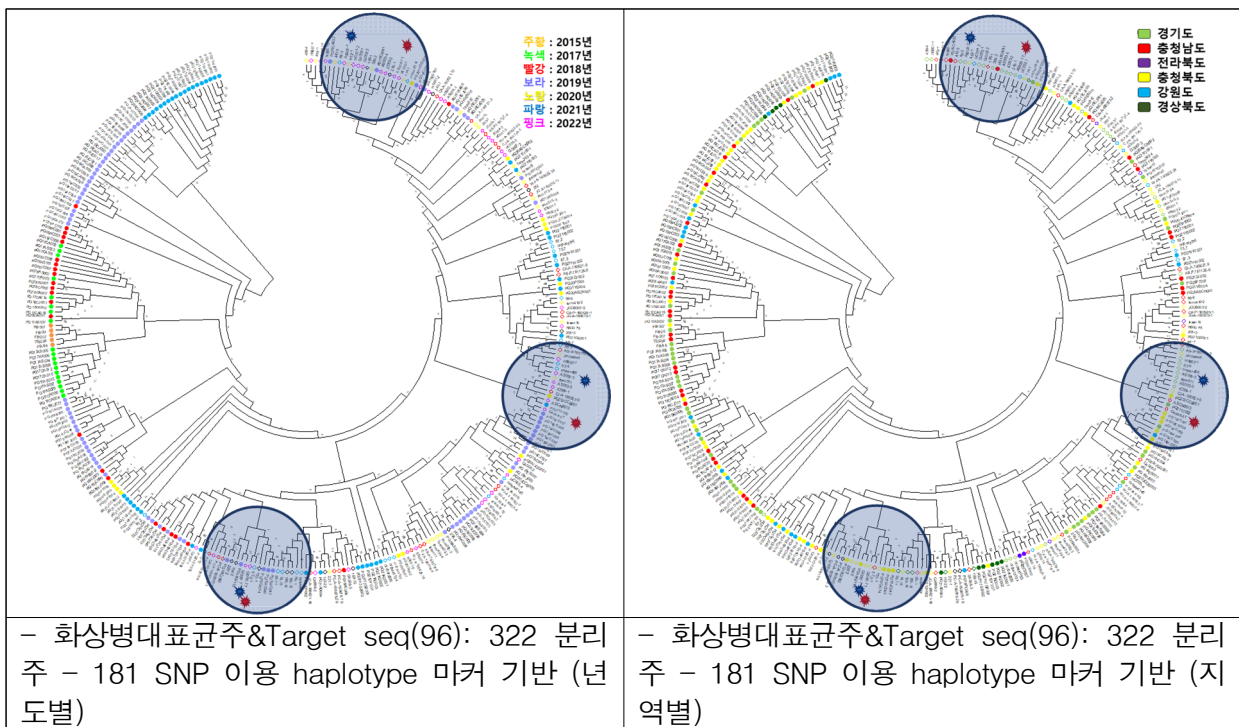


그림 22. 과수화상병 target 영역에 대한 raw read mapping 패턴 (Red star 표시는 targeted sequencing 샘플이며 blue star 표시는 WGS 샘플을 표시함)

- WGS 샘플(AS008-1, CA008-3, CJ006-7), Targeted sequencing 샘플(AS008-1T, CA008-3T, CJ006-7T) 각각 3샘플은 WGS과 Targeted sequencing 분석을 모두 수행하였으며 3샘플 모두 동일한 clade에 위치하는 것으로 확인되어 targeted sequencing 분석의 정확도를 확인하였음.

#### 마. 과수화상병 유전자 변이형 분석기술 개발 및 현장 실증

1. 최종적으로 2015년부터 2022년까지 국내외에서 분리한 과수화상병 554개 분리주를 대상으로 유전체 분석을 수행하였으며, SNP 마커를 이용한 유연관계 분석을 이용하여 분자 역학조사를 수행하였음
2. 분석에 사용한 과수화상병 분리주는 국내 분리주 535개와 국외 분리주 19개 총 554개 분리주를 대상으로 수행하였으며, 이를 이용하여 genome-wide SNP 마커를 선별하여 유연관계 분석을 수행하였음.



3. 유전체 분석을 통해 선발한 genome-wide SNP는 단백질 코딩 영역(CDS)에 있는 SNP로 선발하였으며, 이를 이용하여 haplotype 마커 개념을 도입하여 유전체 분석에 활용하였음.
4. 총 181개의 genome-wide SNP를 이용하여 64개의 haplotype 마커를 사용하였고, 지노타입핑 결과를 이용하여 유연관계분석을 이용한 과수화상병 분리주의 역학조사 체계를 구축하였음
5. 최종적으로 선발한 181개 genome-wide SNP 마커 세트는 high-throughput genotyping을 위한 targeted sequencing 분석을 위해 hybrid bate로 제작하였음.
6. 181개의 hybrid bate를 이용하여 targeted sequencing 분석 결과 WGS 분석과 같은 결과를 확인하였으며, 이에 따라 빠르고 저렴하게 과수화상병의 SNP 지노타입핑을 통해 역학조사를 할 수 있는 기반을 구축하였음.
7. Hybrid bate를 이용한 targeted sequencing은 과수화상병 분리주의 전체 게놈을 시퀀싱하지 않고 선발된 181개 SNP만 선택적으로 지노타입핑 함으로써 WGS에 비해 효과적인 분석 결과를 제공함
8. 현재까지 과수화상병 국내 분리주 535개를 분석한 결과 국외 분리주에 비해 매우 좁은 유전적 다양성을 가지고 있었으며, 이는 국외에서 지속적으로 국내에 유입되는 것이 아닌 2015년 이전에 우연한 계기로 국내에 유입된 이후 인근지역으로 조금씩 확산된 것으로 보여짐(그림 17).

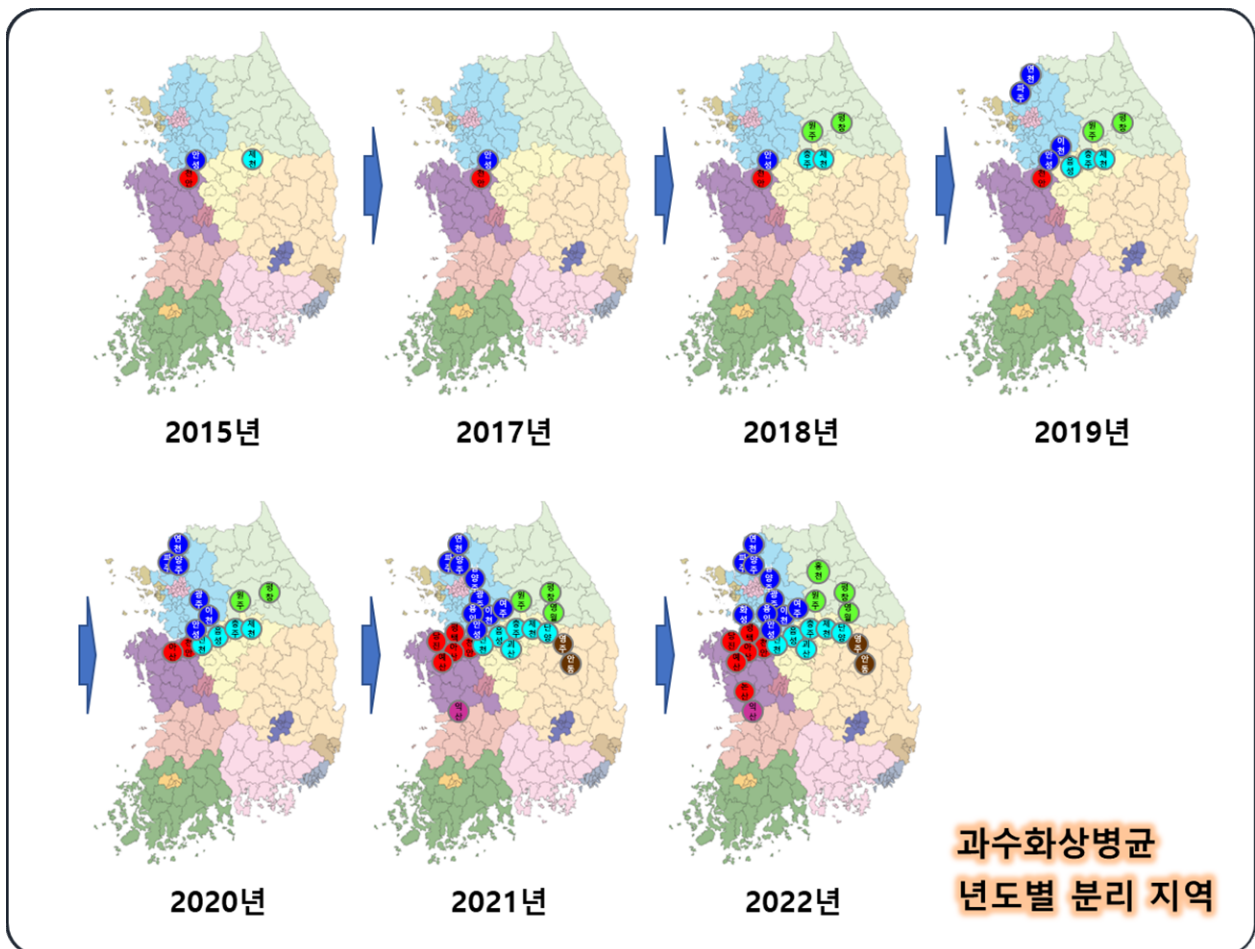


그림 23. 국내 과수화상병의 년도별 분리 지역 추세

<제1협동연구기관 : 농림축산검역본부>

가. 화상병균 수집 및 유전자 변이형(VNTR) 분석

1. '23년 이전 수집된 시료에서 균을 분리('15~'22)

- (균 분리) 충북·충남·경기·강원·경북·전북 등 화상병균 2,472점 분리

2. '23년 국내 발생이 확인된 화상병 시료를 수집하여 균을 분리

- (시료수집) 충북·충남·경기·강원·경북 등 사과·배나무 등 시료 566점

- (균 분리) 화상병균 566점 분리 완료

구분	수집된 균(개)	비고
'18. 이전	502	
'19.	730	
'20.	688	
'21.	552	
'22.	210	
'23.	566	
계	3,248	

3. 분리된 화상병균의 변이형(VNTR) 및 유연관계 분석

1) (MLVA) 화상병균의 VNTR 변이형 확인을 위해 6개의 VNTR 유전자위를 동시 분석, 각 패턴에 따라 순서대로 번호(V1, V2, ...) 등으로 임시적으로 변이형의 이름을 부여

2) (MST) VNTR 변이형의 유연관계를 규명하기 위하여 국내외 수집균주의 단순반복염기서열(TR; Tandem Repeat)의 반복 값을 수치화하여 BioNumerics 8.0 프로그램을 이용하여 최소신장트리(MST; Minimum Spanning Tree)를 작성

\* VNTR(MLVA; Multiple-Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis): 화상병균 유전자 내 다양한 부위의 염기서열 패턴(repeat motif)이 반복되는 수에 의해 결정되는 변이형. 지역 내, 과원 간, 과원 내 나무간 분포하는 화상병균의 차이 즉, 단기간의 변이를 보여주는 분자시계의 역할을 할 수 있는 일종의 소위성체(mini-satellite)임.

3) 현재 6종류의 프라이머를 이용 VNTR 유전자 서열을 분석하여 VNTR 유전형 분석

	A	B	C	D	F	H	type
CJ4	6(6.5)	2	12	13(13.8)	6(6.6)	9	1

표 10. VNTR 분석을 위한 프라이머 정보 및 PCR 조건

Primer	Sequence (5'-3')
VNTRaf	TATCCCTAAAAACCTCAGTGC
VNTRar	GCAACCTTGTGCCCTTTA
VNTRbf	AGCTGTGGATGTTGTCACGTAAGC
VNTRbr	GGGTCCGACTTGACGGCAGACCAC
VNTRcf	GTGAGCTATTAGCTTTCCGAGCAG
VNTRcr	TTCATACTATCACTAAGTATCGGA
VNTRdf	CTGCCTCAAAGCAAGGGTTTGTCT
VNTRdr	CGTGCTTAAGATTACATTATCAAC
VNTRff	AAGCTCATTACCAGGCTATTGGCA
VNTRfr	TCAGCGGCAGAGAACGGCATCGTG
VNTRhf	TCACCGACGGTCTGGGTGGTATCG
VNTRhr	ATGTTAATCATCCGCCATTGGCTC
TR01_F	TGTGGATCGCACATTTTCAT
TR01_R	ATTGACGGTAGCGTTCAGGT
TR09_F	GAGAAAGCCATTGCCGATAA
TR09_R	CTCTTTCCAGTGCGGTTTTT
TR41_F	CGGTCACGTCCTTCATTTTC
TR41_R	CCTGTGCTAGTTTCTGCCTGA

	Temperature	Time	Cycle
Denaturation	95	5min	1
Denaturation	95	30sec	
Annealing	56	30sec	35
Extention	72	30sec	
Extention	72	5min	1

CJ4-a

TCAGTGCGATTACAGAATTACAGAATTACAGAATTACAGAATTACAGAATTACAGAATTATCAAAC  
 AGGCTGCATTTAAATACAGTTAATCTTAACACAGAATGGGACAGAACAAGAATAGATCTCACGAA  
 AGGAAAGACATCCGGCTTCTGAAATACGCCTGAAAAAATCAAGAGATACTAATCATTAAATCCGG  
 T G  
 AAATTATTTACTGATACTGATGACGGTATCTTGTCATCCCGTAATCCCGGGATGACCGTTTAATC  
 ACTCCAGGGGTAATTTCCGGCAACAAA

CJ4-b

GGCGGGGCGGTGTGCGGCATGCCCTCGCGGCAGGTATCTTCAGCGGTTATCAAGATACGAGTC  
 TTCCTACGCCAGTATCAGCTGGGTGAGTTCTAAGGGTCGCTAAGCCGCGAAAATCGCTATCAG  
 CCTCTCAGTCTCTCTGGCGAGACTCCCCTGACAGGAAGTAGTTGTATTTTACCCGGTGGTCTGC  
 CG

CJ4-c

GAGTTACTTTTCGATCAGTAGTGTTATTTTATCAGAAATATCAATTATTTGCTGTAACAACCTCTTTAT  
CATGGGTGTCAAGCACATTGTTATTGTTATTGTTATTGTTATTGTTATTGTTATTGTTATTGTTATTGTTATTG  
TTATTGTTATTGTTATTGTTACTTTGTATTAAGTAGCGTAAGGCTCGGAAGTATTTTCCTTCGGATC  
TAAGTTTTTCTTTTCTTTCAATGCAAAGTGGCTATATATTATTCTTGACTCTTCTAATAATGAATTA  
AAAGGCCCATAGAATTTTTCTATTTTTCTTTGCATTATTTGCGAAAGTAATTTTTCTCTCTCGTA  
ACTCTATTTGTTGTTGTTGCTGCCTATCTTTCCGATACTT

CJ4-d

ATGGTGCTTTATATTTTCATAGCCAACCATTAGTTGATGAATAAGTTTAATACTCATCTGGCAATG  
GCAATGGCAATGGCAATGGCAATGGCAATGGCAATGGCAATGGCAATGGCAATGGCAATGGCAATGGCA  
ATGGCAATGGCAATGGCAATATAAATAATGCGTATTATTATGCTCAGTGACAGGAAATGTCCGTCC  
AGTAAATCGACATCGGTGATGTGCAGCATGCAGTAACAGGTTAAAGTGAAAACGTGATATTAAT  
ACAAAAAATCTTTGGAGTTCCATTGTGGAATAATCAATAACGGCGTTGATAA

CJ4-f

GGCGCTGCCGGTAGGCAGCTCACCAGCAGCAGCCGGTGCCTGCGACGGGGTGATGGCAACCA  
GCTGCGCAGTATCAGACGCTGCGGGCGCGGCAGCGTTGGCGCCAGTAGCAGCGTTAGCGTTA  
GTAGCAGCGTTAGCGTTAGTAGCAGCGTTAGCGTTAGTAGCAGCGTTAGTGCTAGTGGCAGCGT  
TAGTGCTAGTAGCAGCGTTAGCAGCGTTAGTAGCAGCGTTAGTAGCAGCGTTAGTGCTAGTGGCAGCGT  
GCTGCTGTTGTTTGGCGCTGCATCAGGCACGATGCC

CJ4-h

CAGCCCGCTTTCCGGTATCCAGTGCGCCGCCCGCAGCACAGACGTGCGGCTGTGGCGTGATAT  
GCGTGATATGCGTGATATGCGTGATATGCGTGATATGCGTGATATGCGTGATATGCGTGATATGCGTGATATGC  
GTGATATGCGTGATTTTACCTTAATGGATCGCAACCTGCCGAAGCCCTTACACCCGGGCAAAC  
GGAGCTGATTGATCCATTTAAATTCTGGCTGCACACGCCCCCTACGTTATAAATACGATGCTCT  
GTTGTTCTGGCCTGGATCGCGGGAGCCAATGGCGG

4. VNTR 변이형 분석 결과

- 1) 화상병균의 변이형(VNTR) 분석 현황
  - ※ ('15~'22 발생) 2,680균주, ('23 발생) 566균주
- 2) 국내외 화상병균 변이형의 MST 분석 결과 캐나다 사과나무에서 분리된 변이형과 일치하는 V2가 국내 우점하는 유형으로 분석
  - 국내 화상병균은 북미 북동부지역에서 주로 발생하였던 변이형이 유입된 것으로 추정

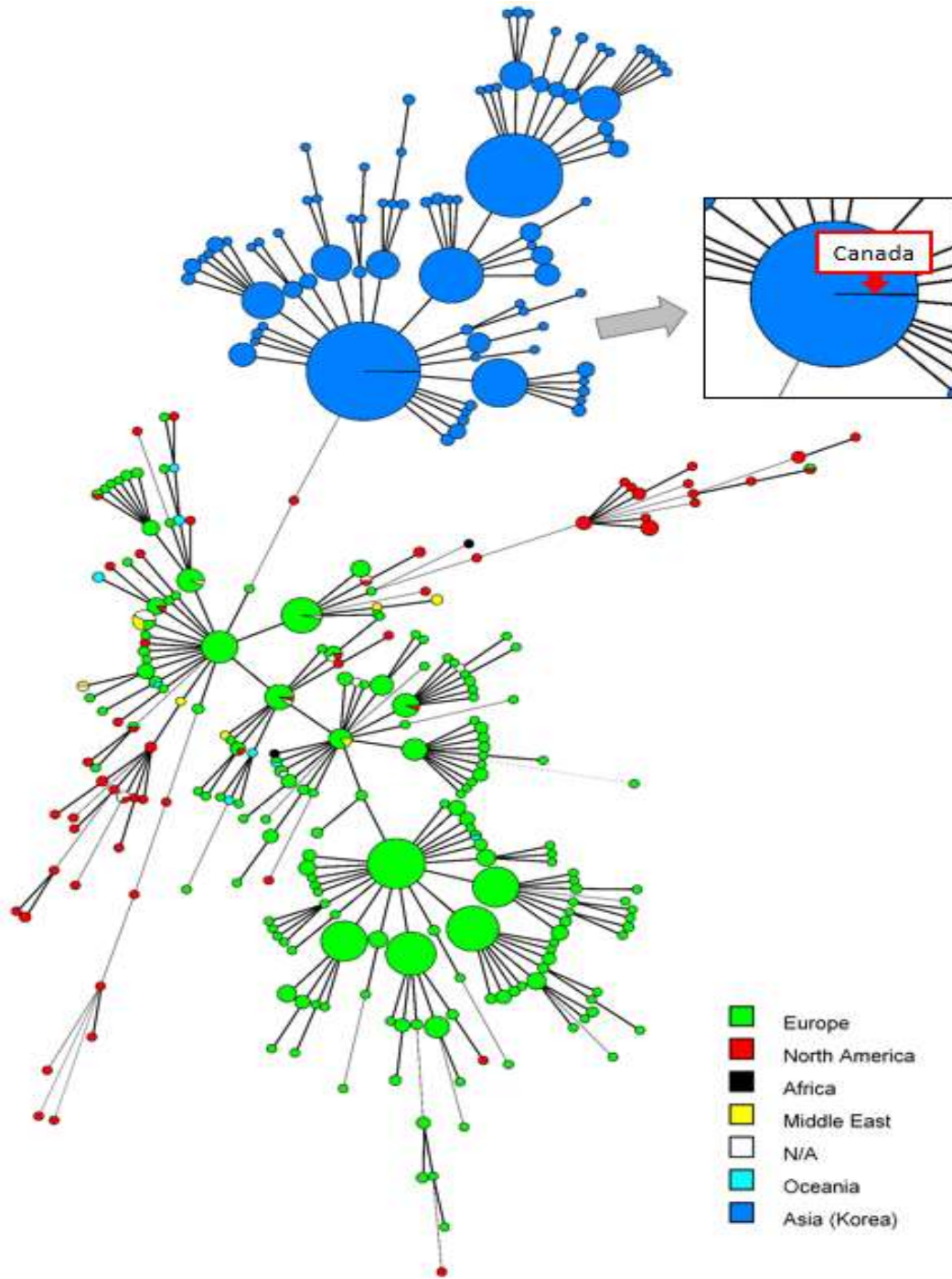


그림 24. 국내외 화상병균의 VNTR 변이형 MST 분석 결과(균주: 해외 842개, 국내 1034개)

- 3) 국내 '15~'23. 기간 수집된 화상병균 3,248개의 VNTR 변이형의 MST 분석 결과 약 100여개의 다양한 변이형(VNTR 1~98)이 확인, 다소 오래 전에 유입된 것으로 추정
- V2의 분화형인 V1, V14 등이 형성된 후, 각각 V1과 V14의 분화형들이 생긴 것으로 추정
  - 배 산지에서는 V2, V1 유형이 우점, 사과 산지에서는 V14 유형이 우점



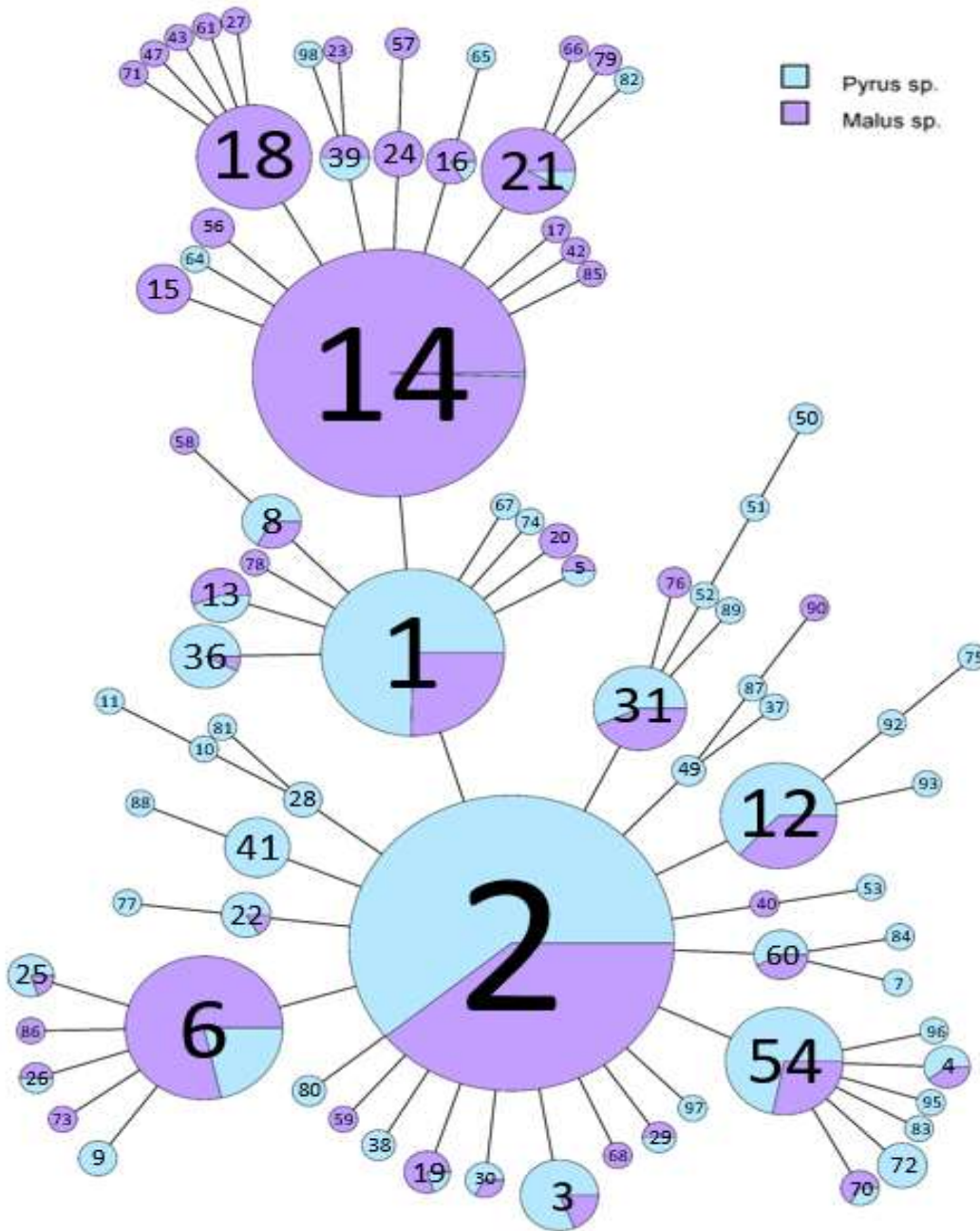


그림 25. 국내 화상병균의 VNTR 변이형 MST 분석 결과(균주: 국내 1034개)

#### 나. 화상병균의 항생제 내성 유전자 분석

##### 1. 화상병균 항생제(streptomycin) 내성 유전자 진단을 위한 PCR검사법 구축

1) strA, strB, rpsL 프라이머 정보

프라이머 이름	방향	서열	크기(bp)
strA	F	TGA CTG GTT GCC TGT CAG AG	406
strA	R	CGG TAA GAA GTC GGG ATT GA	
strB	F	ATC GCTTTG CAG CTT TGT TT	403
strB	R	CGT TGC TCC TCT TCT CCA TC	
rpsL	F	CGT ACG CAA AGT TGC AAA AA	212
rpsL	R	GGA TCA GGA TCA CGG AGT GT	

2) Streptomycin 내성을 갖는 화상병균 유전자를 해외에서 분양받아 strA, strB, rpsL primer 유효성을 PCR 실험을 통해 확인 (그림 26)

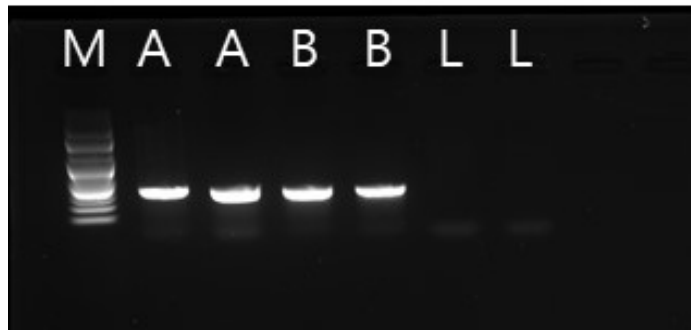


그림 26. 양성균 strA, strB, rpsL PCR 프라이머 유효성 확인

표 11. 국내 화상병균의 항생제 내성 유전자 분석을 위한 PCR 조건

strA	Temperature	Time	Cycle
Denaturation	94	5min	1
Denaturation	94	30sec	
Annealing	56	30sec	35
Extention	72	30sec	
Extention	72	7min	1
strB, rpsL	Temperature	Time	Cycle
Denaturation	94	5min	1
Denaturation	94	30sec	
Annealing	53	30sec	35
Extention	72	30sec	
Extention	72	7min	1

\* PCR은 DW 22 $\mu$ l, strA-F 1 $\mu$ l, strA-R 1 $\mu$ l, 시료 DNA 1 $\mu$ l 총 볼륨 25 $\mu$ l로 맞춘 후 premix에 넣어 수행

## 2. 분석 결과

1) (분석균주) 국내 수집된 화상병균 605개 분석

2) 분석결과

- 총 605개의 균주 PCR검사 결과 스트렙토마이신 내성 유전자는 진단되지 않음

3) 세부 분석 자료

- strA 프라이머 양성대조균은 400bp에서 band가 확인되었고, 내성 유전자가 없으면 600bp에서 band가 확인됨 (그림 27).

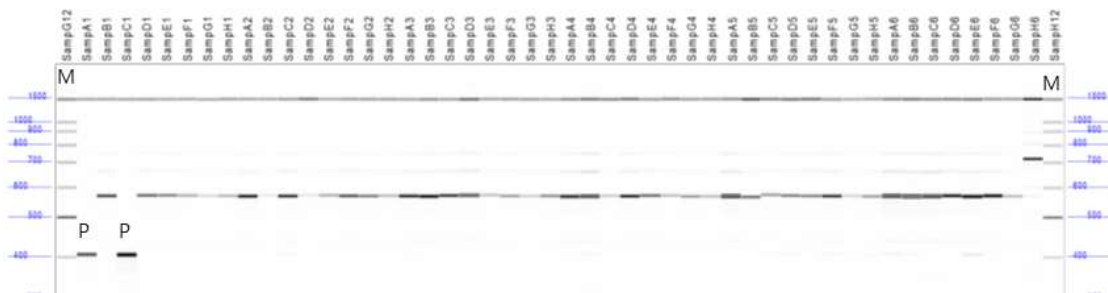


그림 27. strA 프라이머를 이용한 스트렙토마이신 내성 화상병균 탐색

- strB 프라이머 양성대조균은 400bp에서 band가 확인되었고, 내성 유전자가 없을 시 band가 확인됨 (그림 28).



그림 28. strB 프라이머를 이용한 스트렙토마이신 내성 과수화상병 균 탐색

- rpsL 프라이머 모든 시료에서 band를 확인되어, 다음 PCR에서 사용하지 않음 (그림 29).

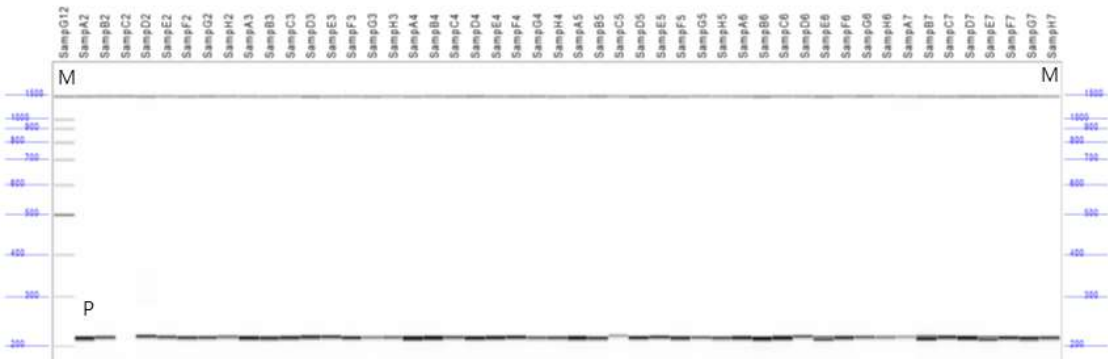


그림 29. rpsL 프라이머를 이용한 스트렙토마이신 내성 과수화상병 균 탐색

## 다. 유전자 변이형(VNTR) Type 변화 모니터링

### 1. 국내 균주 중 10 개의 균주를 100회 계대 배양

A	36-1	36-2	36-3	36-4	36-5	36-6	36-7	36-8	36-9	36-10	A	43-1	43-2	43-3	43-4	43-5	43-6	43-7	43-8	43-9	43-10	A	48-1	48-2	48-3	48-4	48-5	48-6	48-7	48-8	48-9	48-10	
B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
C	12	12	12	11	11	12	12	12	14	12	C	12	12	12	11	11	12	12	12	14	12	C	12	12	12	11	11	12	12	12	14	12	
D	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	D	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	D	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
F	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	F	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	F	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
H	10	10	9	9	10	9	10	9	10	9	H	10	9	9	9	10	9	10	9	9	10	H	10	9	9	9	10	9	10	9	9	10	
TYPE	21	3	2	54	94	2	14	12	20	6	TYPE	21	3	2	54	94	2	14	12	20	6	TYPE	21	3	2	54	94	2	14	12	20	6	
A	39-1	39-2	39-3	39-4	39-5	39-6	39-7	39-8	39-9	39-10	A	44-1	44-2	44-3	44-4	44-5	44-6	44-7	44-8	44-9	44-10	A	49-1	49-2	49-3	49-4	49-5	49-6	49-7	49-8	49-9	49-10	
B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
C	12	12	12	11	11	12	12	12	14	12	C	12	12	12	11	11	12	12	12	14	12	C	12	12	12	11	11	12	12	12	14	12	
D	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	D	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	D	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
F	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	F	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	F	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
H	10	9	9	9	10	9	10	9	10	9	H	10	9	9	9	10	9	10	9	9	10	H	10	9	9	9	10	9	10	9	9	10	
TYPE	21	3	2	54	94	2	14	12	20	6	TYPE	21	3	2	54	94	2	14	12	20	6	TYPE	21	3	2	54	94	2	14	12	20	6	
A	40-1	40-2	40-3	40-4	40-5	40-6	40-7	40-8	40-9	40-10	A	45-1	45-2	45-3	45-4	45-5	45-6	45-7	45-8	45-9	45-10	A	50-1	50-2	50-3	50-4	50-5	50-6	50-7	50-8	50-9	50-10	
B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
C	12	12	12	11	11	12	12	12	14	12	C	12	12	12	11	11	12	12	12	14	12	C	12	12	12	11	11	12	12	12	14	12	
D	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	D	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	D	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
F	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	F	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	F	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
H	10	9	9	9	10	9	10	9	10	9	H	10	9	9	9	10	9	10	9	9	10	H	10	9	9	9	10	9	10	9	9	10	
TYPE	21	3	2	54	94	2	14	12	20	6	TYPE	21	3	2	54	94	2	14	12	20	6	TYPE	21	3	2	54	94	2	14	12	20	6	
A	41-1	41-2	41-3	41-4	41-5	41-6	41-7	41-8	41-9	41-10	A	46-1	46-2	46-3	46-4	46-5	46-6	46-7	46-8	46-9	46-10	A	51-1	51-2	51-3	51-4	51-5	51-6	51-7	51-8	51-9	51-10	
B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
C	12	12	12	11	11	12	12	12	14	12	C	12	12	12	11	11	12	12	12	14	12	C	12	12	12	11	11	12	12	12	14	12	
D	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	D	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	D	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
F	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	F	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	F	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
H	10	9	9	9	10	9	10	9	10	9	H	10	9	9	9	10	9	10	9	9	10	H	10	9	9	9	10	9	10	9	9	10	
TYPE	21	3	2	54	94	2	14	12	20	6	TYPE	21	3	2	54	94	2	14	12	20	6	TYPE	21	3	2	54	94	2	14	12	20	6	
A	42-1	42-2	42-3	42-4	42-5	42-6	42-7	42-8	42-9	42-10	A	47-1	47-2	47-3	47-4	47-5	47-6	47-7	47-8	47-9	47-10	A	52-1	52-2	52-3	52-4	52-5	52-6	52-7	52-8	52-9	52-10	
B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
C	12	12	12	11	11	12	12	12	14	12	C	12	12	12	11	11	12	12	12	14	12	C	12	12	12	11	11	12	12	12	14	12	
D	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	D	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	D	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
F	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	F	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	F	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
H	10	9	9	9	10	9	10	9	10	9	H	10	9	9	9	10	9	10	9	9	10	H	10	9	9	9	10	9	10	9	9	10	
TYPE	21	3	2	54	94	2	14	12	20	6	TYPE	21	3	2	54	94	2	14	12	20	6	TYPE	21	3	2	54	94	2	14	12	20	6	

### 2. 분석 결과

	균주1	균주2	균주3	균주4	균주5	균주6	균주7	균주8	균주9	균주10
1~44회	21	3	2	54	94	2	14	12	20	6
45~67	21	3	2	54	99	2	14	12	20	6
68~84	21	3	2	2	99	2	14	12	20	6
85	21	3	2	2	99	31	14	12	20	6
86~100	21	3	2	2	101	31	14	12	20	6
Type 변화	-	-	-	54->2	94->99->10	2->3	-	-	-	-
					1	1				

<위탁연구기관 : 단국대학교>

가. Chromogenic medium (발색 배지)를 이용한 세포외효소 활성 차이 조사

○ VNTR type 형 증식 특성 조사(1년차)

■ 온도별 성장 차이 조사

- 조사된 균주 목록은 (표 12).
- 분양받은 균주들을 Luria-Bertani (LB) 액체 배지에 접종하여 25℃, 30℃, 37℃에서 24 시간 배양함. 배양된 균은 96well에 200μl씩 분주하여 O.D(A<sub>600</sub>)로 흡광도를 측정함. 3 반복으로 시험이 진행됨.
- 30 균주 모두 25℃, 30℃, 37℃의 다양한 환경에서도 증식이 가능한 것을 확인함. 25℃와 30℃에서 균주 들이 비슷한 성장을 보인 반면, 37℃에서는 22번 균주(Genotype 26)와 23번 균주(Genotype 27)가 다른 균주들에 비해 생장이 느린 것을 볼 수 있음. 반면 7, 8, 9, 15 균주(Genotype 11, 12, 13, 19)들은 최적 성장 온도인 25℃와 비슷하게 생장이 원활한 것을 볼 수 있음. (그림 30, 31, 32).
- 따라서 결과적으로 VNTR 유전형이 다른 30 균주의 배화상병균이 가장 잘 자라는 최적 성장 온도는 25℃임을 다시금 확인함. 일부 균주에 성장 차이가 보이는 것은 변이형에 따라 차이가 있는 것으로 볼 수 있음.

표 12. 조사된 *E. amylovora* 균주 목록

VNTR유전형	번호	균주명	과원 소재지	과종	발생년도
1	1	19-18	충북 제천시 백운면 도곡리	사과	2015
2	2	19-4.	충북 제천시 백운면 도곡리	사과	2015
5-1	3	8-1-1.	영주	사과	2015
6	4	A3-3P	충북 제천시 방학리	사과	2016
9	5	0515-18	경기도 안성시 서운면 북산리	배	2016
10	6	0614감-1-2	충남 천안시 입장면 독정리	배	2017
11	7	0614감-1-1	충남 천안시 입장면 독정리	배	2017
12	8	0730-1	경기도 안성시 서운면 산평리	배	2017
13	9	FB17-15	제천		2018
14	10	0601-1	충북 제천시 백운면 방학리	사과	2018
15	11	0601-6	충북 제천시 백운면 방학리	사과	2018
16	12	평창22	강원도 평창군 평창읍 종부리	사과	2018
17	13	평창8	강원도 평창군 평창읍 종부리	사과	2018
18	14	평창27	강원도 평창군 평창읍 종부리 가로수	사과	2018
19	15	원주 AP-3	강원도 원주시 구학리	사과	2018
20	16	원주 BP-3	강원도 원주시 구학리	사과	2018
21	17	0515-16	경기도 안성시 서운면 북산리	배	2018
22	18	0515-13	경기도 안성시 서운면 북산리	배	2018
23	19	중리2 1-P	강원도 평창군 평창읍 중리	사과	2018
24	20	B2-2P	충북 제천시 백운면 방학리	사과	2018
25	21	1P	충북 제천시 도곡리	사과	2018
26	22	P-5	천안시 서북구 입장면 독정리	배	2018
27	23	중리2-posi의심	강원도 평창군 평창읍 중리	사과	2018
28	24	신촌2-1	경기 안성시 서운면 신촌리	사과	2018
29	25	신촌2-2	경기 안성시 서운면 신촌리	사과	2018
30	26	지당4_8-P1	충북 충주시 앙성면 지당리	사과	2018
31	27	도곡8	충북 제천시 백운면 도곡리	사과	2018
32	28	도곡7	충북 제천시 백운면 도곡리	사과	2018

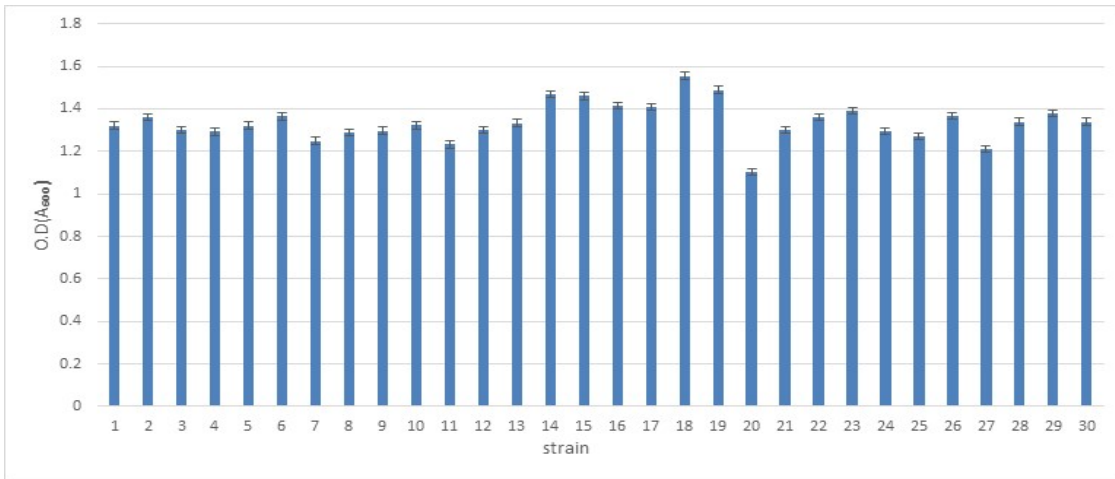


그림 30. 30°C에서 24시간 배양한 뒤 측정된 화상병균 VNTR 형 유전자 그룹의 생육 특성.

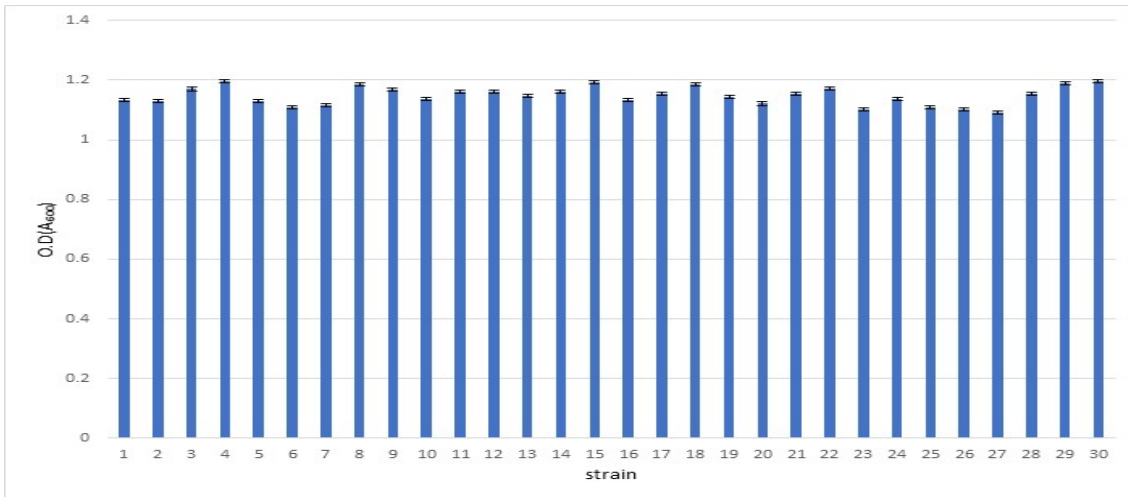


그림 31. pH7, 25°C에서 24시간 배양한 뒤 측정된 화상병균 VNTR 형 유전자 그룹의 생육 특성.

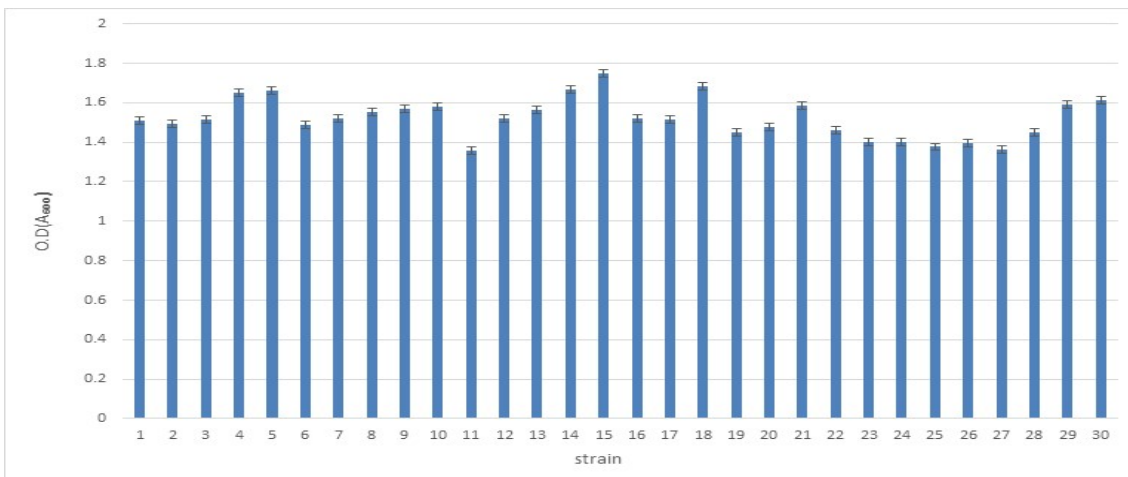


그림 32. 25°C에서 24시간 배양한 뒤 측정된 화상병균 VNTR 형 유전자 그룹의 생육 특성



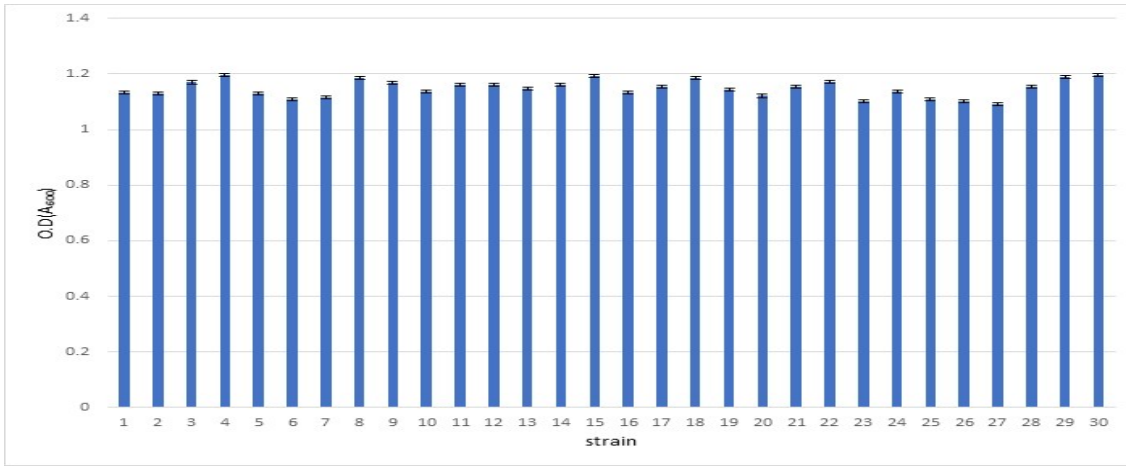


그림 33. pH7, 25°C에서 24시간 배양한 뒤 측정된 화상병균 VNTR 형 유전자 그룹의 생육 특성.

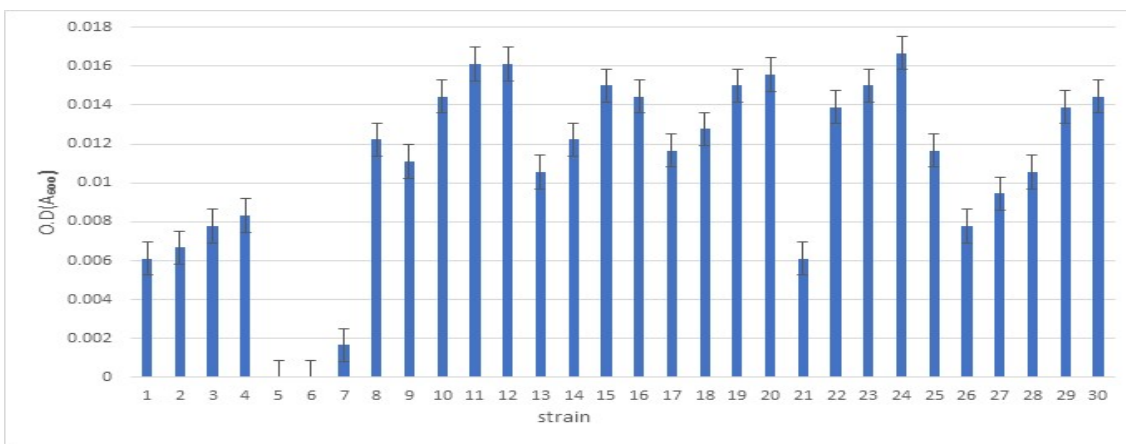


그림 34. pH10, 25°C에서 24시간 배양한 뒤 측정된 화상병균 VNTR 형 유전자 그룹의 생육 특성.

### ○ 항생제 농도별 감수성 조사

- 항생제 농도별 감수성을 검정하기 위해 디스크 확산법을 이용하여 항생제 디스크에 Clear zone의 형성 유무 및 직경을 확인함.
- 항생제로 사용된 Streptomycin의 농도는 10 mcg, 25 mcg, 300 mcg로 총 3 가지를 사용함.
- 조사 결과 30 균주 모두 항생제에 내성이 보이지 않으며 감수성으로 확인됨(그림 6).

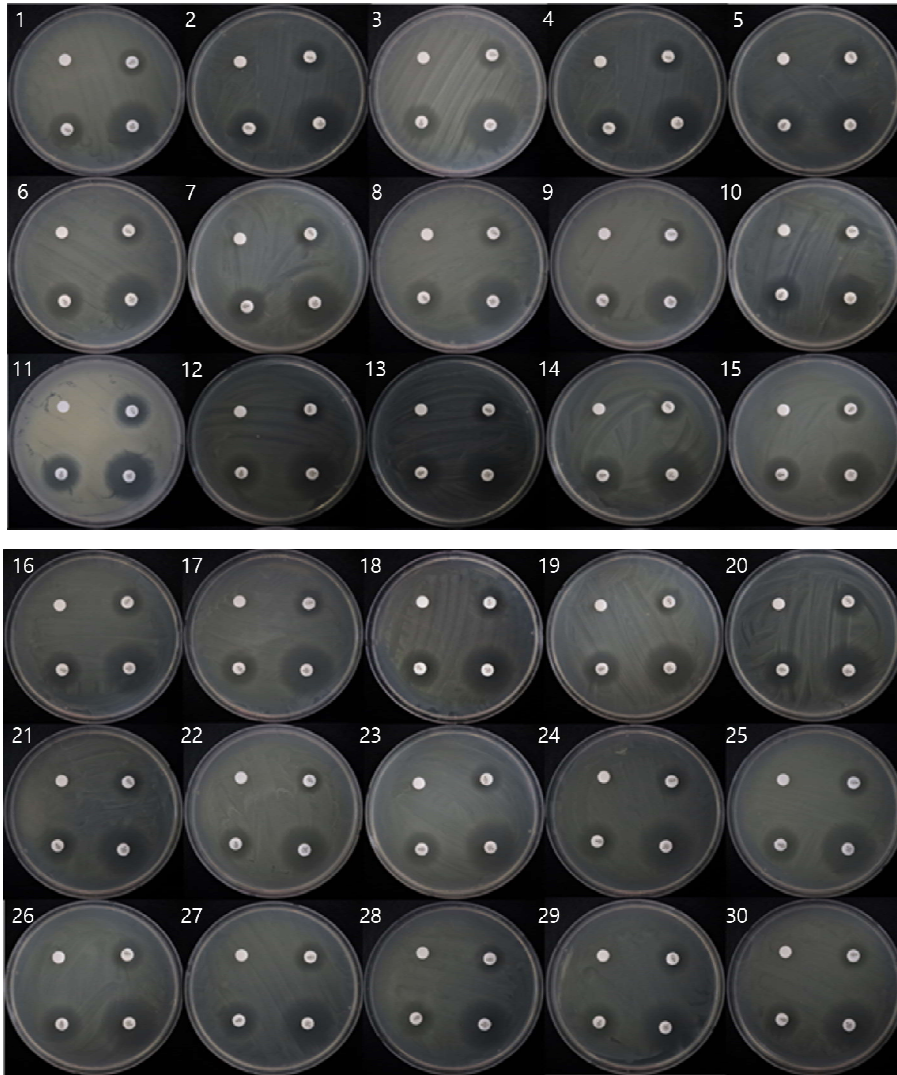


그림 124 . Streptomycin에 대한 감수성 결과 사진.

표 13 . Streptomycin에 대한 배화상병균의 clear zone의 직경 (단위: cm)

농도 \ 균주	1	2	3	4	5
10mcg	0.59±0.00	0.50±0.07	0.64±0.06	0.46±0.05	0.54±0.06
25mcg	0.80±0.00	0.66±0.04	0.80±0.11	0.63±0.06	0.71±0.06
300mcg	1.10±0.00	0.93±0.05	1.00±0.00	0.93±0.02	1.01±0.02
농도 \ 균주	11	12	13	14	15
10mcg	0.70±0.00	0.45±0.19	0.37±0.09	0.45±0.07	0.48±0.02
25mcg	0.83±0.06	0.54±0.03	0.51±0.07	0.70±0.06	0.71±0.06
300mcg	1.10±0.00	0.99±0.05	1.01±0.03	0.96±0.06	1.02±0.01
농도 \ 균주	21	22	23	24	25
10mcg	0.47±0.00	0.49±0.09	0.57±0.04	0.67±0.07	0.47±0.07
25mcg	0.63±0.07	0.65±0.16	0.73±0.05	0.83±0.07	0.68±0.06
300mcg	0.90±0.09	1.01±0.11	1.03±0.03	1.07±0.06	1.05±0.06

농도 \ 균주	6	7	8	9	10
10mcg	0.60±0.00	0.47±0.04	0.67±0.07	0.60±0.00	0.42±0.04
25mcg	0.83±0.06	0.60±0.02	0.83±0.06	0.83±0.06	0.59±0.09
300mcg	0.97±0.12	0.94±0.05	1.03±0.06	1.27±0.11	0.93±0.03
농도 \ 균주	16	17	18	19	20
10mcg	0.63±0.07	0.60±0.00	0.53±0.08	0.46±0.08	0.49±0.01
25mcg	0.77±0.06	0.73±0.06	0.73±0.07	0.67±0.03	0.66±0.05
300mcg	1.03±0.06	0.97±0.11	0.93±0.13	0.83±0.02	0.87±0.06
농도 \ 균주	26	27	28	29	30
10mcg	0.51±0.03	0.43±0.03	0.53±0.09	0.63±0.15	0.60±0.07
25mcg	0.70±0.03	0.63±0.11	0.73±0.07	0.87±0.13	0.73±0.06
300mcg	1.00±0.08	0.87±0.03	0.90±0.06	1.10±0.10	1.10±0.09

### ○ 생물 막(Biofilm) 형성능력 조사

#### ■ Crystal Violet assay

- 생물 막 형성능력 조사하기 위해 crystal violet assay로 실험을 진행함.
- 24시간 배양한 균주들을 O.D 1.14 에 맞춰서 100 $\mu$ l씩 분주함. 그대로 25 $^{\circ}$ C에서 48시간 정치 배양함. 배양 후 균을 버리고 D.W로 2회 세척 한 뒤 0.1% crystal violet 125 $\mu$ l씩 분주 후 10-15 min 반응시킴. D.W로 3회 세척 한 뒤 물기를 충분히 제거 후 실온에서 자연 건조함. 건조 시킨 well에 30% Acetic acid 125 $\mu$ l씩 분주하고 10-15 min 반응시킴. 새로운 well로 옮긴 뒤 흡광도 측정함(595nm)(그림 35).
- 결과적으로 VNTR 유전형 간의 생물 막 형성 능력에는 차이가 없다는 것을 알 수 있음(표 13)

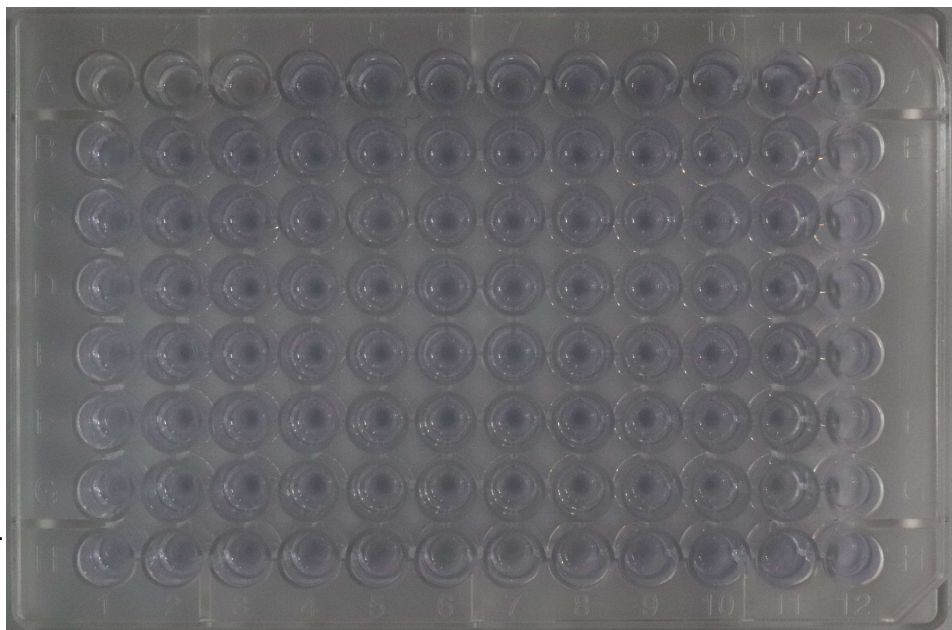


그림 35. 생물막 형성 정도 비교를 위한 Crystal violet 염색 결과 사진.

표 13 . 생물막 형성 정도의 추정을 위한 흡광도 측정

strain	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
O.D	0.12	0.13	0.14	0.15	0.14	0.17	0.15	0.17	0.15	0.16
strain	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
O.D	0.17	0.14	0.15	0.15	0.15	0.15	0.16	0.15	0.16	0.14
strain	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
O.D	0.15	0.17	0.15	0.14	0.13	0.13	0.14	0.15	0.15	0.14

○ VBNC 특성 조사

■ 균주의 strain에 따른 저온 및 고온 스트레스에 대한 성장특성 실험

- 스트레스 조건에서 성장 차이를 보기 위해 4℃, 45℃ 두 조건에서 24시간 처리 후 control 조건인 25℃로 옮겨 24시간 추가로 배양함.
- 결과적으로 4℃, 45℃에서 24시간 배양 후 25℃로 옮긴 균들도 자라는 것을 확인함(그림 36. 표 13).
- 따라서 배화상병균은 4℃, 45℃에서도 생존이 가능함. 아직 학문적으로 VBNC 특성에 대한 정의가 뚜렷하지 않아 좀 더 스트레스 조건하에서의 추가 연구가 필요함.

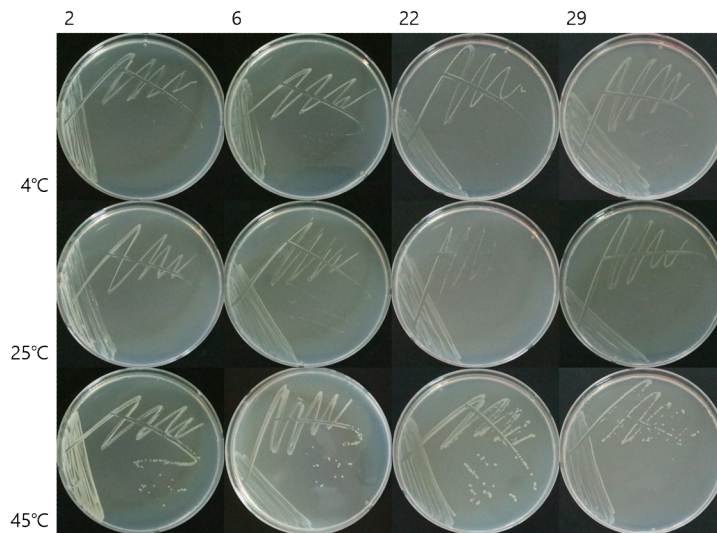


그림 36. 저온 고온 실험 결과 예시 사진. Genotype 2, 6, 22, 29의 온도별(4℃, 25℃, 45℃) 배지 사진.

표 14 . 저온 증온 고온 실험 결과.

온도\균주	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
4℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
온도\균주	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
4℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : Live , - : Death

나. VNTR형 생화학적 특성 조사(2년차)

○ 세포외 분비 효소, 분비 다당체 형성 조사 비교.

- 1차년도와 같은 균주에 대해 조사함(표 15).
- 균주들은 PDB(Potato Dextrose Broth)액체 배지에 접종하여 25℃ 진탕 배양기에서 3일간 배양함.
- 세포외 분비 효소에 따른 기질 이용 능력 차이를 조사하기 위해 Amylose, Xylan, Pectin, Skim milk, CM(CarboxyMethyl) cellulose, Cellobiose, Abicel의 기질이 들어간 배지를 만들어서 비교 실험을 진행함.
- 분비 다당체 형성 능력을 비교하기 위해서는 Levan, PDA 배지를 만들어서 총 9가지 배지를 가지고 비교 실험을 진행함.
- 전체적으로 PDB 액체 배지에 전 배양 한 29개의 VNTR 균주를 9개의 배지에 2ul씩 접종하여 25℃ 배양기에서 5일간 배양하고 비교를 진행함.

표 15 . 분양 받은 *E. amylovora* 균주 목록

VNTR 유전형	번호	균주명	과원 소재지	과종	발생년도
1	1	19-18	충북 제천시 백운면 도곡리	사과	2015
2	2	19-4.	충북 제천시 백운면 도곡리	사과	2015
4	3	TS3160-1	경기도 안성시 서운면 현매리	배	2015
5	4	8-1-1.	영주	사과	2015
6	5	A3-3P	충북 제천시 방학리	사과	2016
9	6	0515-18	경기도 안성시 서운면 북산리	배	2016
10	7	0614감-1-2	충남 천안시 입장면 독정리	배	2017
11	8	0614감-1-1	충남 천안시 입장면 독정리	배	2017
12	9	0730-1	경기도 안성시 서운면 산평리	배	2017
13	10	FB17-15	제천		2018
14	11	0601-1	충북 제천시 백운면 방학리	사과	2018
15	12	0601-6	충북 제천시 백운면 방학리	사과	2018
16	13	평창22	강원도 평창군 평창읍 종부리	사과	2018
17	14	평창8	강원도 평창군 평창읍 종부리	사과	2018
18	15	평창27	강원도 평창군 평창읍 종부리 가로수	사과	2018
19	16	원주 AP-3	강원도 원주시 구학리	사과	2018
20	17	원주 BP-3	강원도 원주시 구학리	사과	2018
21	18	0515-16	경기도 안성시 서운면 북산리	배	2018
22	19	0515-13	경기도 안성시 서운면 북산리	배	2018
23	20	중리2 1-P	강원도 평창군 평창읍 중리	사과	2018
24	21	B2-2P	충북 제천시 백운면 방학리	사과	2018
25	22	1P	충북 제천시 도곡리	사과	2018
26	23	P-5	천안시 서북구 입장면 독정리	배	2018
27	24	중리2-posi 의심	강원도 평창군 평창읍 중리	사과	2018
28	25	신촌2-1	경기 안성시 서운면 신촌리	사과	2018
29	26	신촌2-2	경기 안성시 서운면 신촌리	사과	2018
30	27	지당4_8-P1	충북 충주시 양성면 지당리	사과	2018
31	28	도곡8	충북 제천시 백운면 도곡리	사과	2018
32	29	도곡7	충북 제천시 백운면 도곡리	사과	2018



1). 세포외 분비 다당체 형성 능력 비교

- 화상병균의 증식에 필요한 세포외 분비 다당체인 Levan ( $\beta$ -2,6-d-fructofuranan)의 형성 능력을 간단히 비교하고자 Levan 배지에 접종하여 자라난 VNTR 유전 type 균주들 간의 colony의 크기를 비교해 본 결과, type 4, 10, 11, 13, 27이 다른 균주들에 비해 크기가 작은 것을 관찰하였고 또한 type 12, 28은 다른 균주들에 비해 큰 colony를 형성하였다 (그림 37). 이는 VNTR 유전형이 다른 균주간에 Levan 형성 능력에 차이가 있음을 시사한다. Levan 은 levansucrase 라는 효소에 의해 합성되기 때문에 이러한 Levan 배지에서 크기가 다른 윤택성의 다당체를 형성하는 colony 크기의 차이는 효소 생화학적 특성 차이에서 나오는 결과로 사료된다.



그림 37. Levan media에 배양한 화상병균 VNTR 유전 type 균주들의 colony 형성 비교 결과.

2). PDA 에서의 colony 형성 크기 비교

세포외 분비 다당체 형성 배지와 더불어 PDA 배지에서의 생육특성 관련 비교하였다. PDA 배지도 colony의 크기를 비교했을 때, type 11, 13이 다른 균주들에 비해 작은 것을 관찰할 수 있고, type 19, 22, 28, 31은 비교적 큰 colony를 형성한 것을 볼 수 있다 (그림37). 이 또한 VNTR 유전형이 다른 균주 간에 PDA 고체배지에서 colony 형성 능력에 차이가 있음을 시사한다.



그림37. PDA media에 배양한 화상병균 VNTR 유전 type 균주들의 colony 형성 비교 결과.

### 3). Chromagenic media 에서의 다양한 기질 분해에 의한 세포외 효소 분비 능력 비교

- Amylose, Xylan, Pectin, CM(CarboxyMethyl) cellulose, Cellobiose, Abicel 등의 탄소원으로 영양 성분을 단일 성분으로 조성한 배지에서 이들 고분자 영양소를 분해하는 효소의 활성 정도를 비교하고자 수행한 결과 6개의 배지에서는 29개의 화상병균 VNTR 유전형 균주 모두 미미한 생장을 보이거나 아예 성장하지 못하였다 (그림 38). Skim milk가 들어간 배지에서는 생장을 보이긴 하였지만, 다른 6개 기질과 마찬가지로 기질을 지속적으로 사용하지 못한 것을 관찰하였다. 이는 VNTR 유전형 균주간 식물의 고분자성 구조물질을 분해하는 능력이 강한 균주가 없음을 보여주는 동시에 균주간 이러한 고분자 분해능력을 지니는 세포외 효소군 (celluase, cellobiase, avicelase, pectinase, protease, xylase )에는 차이가 없음을 보여준다.

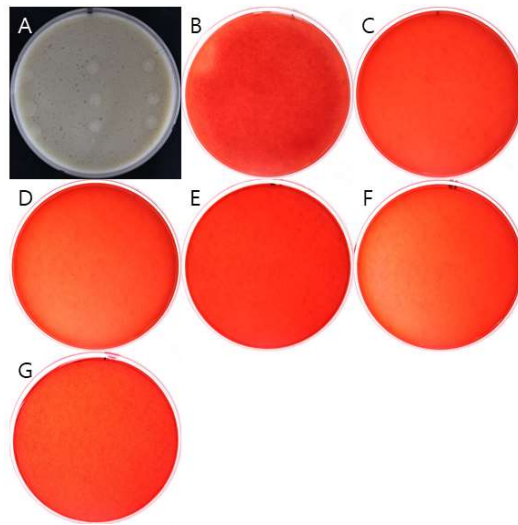


그림 38. 화상병균 VNTR 유전 type 균주들을 Chromogenic medium에 배양한 결과 사진 예 (A: Skim milk, B: Avicel, C: Xylene, D: CB, E: Pectin, F: Starch, G: CM).

### 4). API kit를 이용한 다양한 기질 사용 능력 조사

Chromogenic medium에 의한 고분자 영양원 이용 특성에 차이가 없는 바 소분자 물질 분해 능력에 차이가 있는지를 비교하고자 총 20가지의 서로 다른 기질(표 16)이 kit에 있는 API 20NE kit(Biomerieux)를 이용하여 VNTR 유전형별로 기질을 사용하는 데에 차이가 있는지 관찰하였다. API NaCl 0.85% Medium 앰플을 이용하여 O.D(A<sub>600</sub>) 0.13(McFarland 0.5) 탁도로 맞췄고 API kit에 29개의 균을 접종하고 30℃ 배양기에서 배양하고, 24시간 후, 48시간 후 2 번 결과를 측정하였다. 측정 결과 화상병균 VNTR 유전 type 11을 제외한 다른 28개의 type 균주는 동일한 기질을 사용한 것을 관찰하였다 (그림 39)(표 17). 29개의 균주 모두 20개 기질 중에 GLU, ARA, MAN, NAG, GNT, MLT를 동일하게 사용한 것을 관찰하였고, type 11은 추가적으로 TRP, ESC, GEL을 사용한 것을 관찰하였다. 이는 D-glucose, D-maltose, D-mannitol, L-arabinose, N-acetyl-glucosamine, potassium gluconate, malic acid 등을 공통으로 이용하는 것으로 기본적으로 glucose를 기반 하는 물질계통의 당류 (D-glucose, D-maltose, N-acetyl-glucosamine, potassium gluconate), 단당류 L-arabinose, 당알콜 (D-mannitol), 유기산(malic acid)을 이용하는 특성을 보였다. 흥미롭게도 L-tryptophan, escilin ferric citrate, gelatin을 이용하는 특성을 보인 균주는 매우 색다른 것으로 이 균주에 대해서는 genome 분석 수준에서 좀 더 깊은 조사가 필요하다고 사료된다.

표 16. API kit에 사용된 20가지 기질내역

기질 약자	기질 이름
NO <sub>3</sub>	NO <sub>3</sub>
TRP	L-tryptophan
GLU(oil)	D-glucose
ADH	L-arginine
URE	urea
ESC	escilin ferric citrate
GEL	gelatin
PNPG	4-nitrophenyl-beta D-galactopyanoside
GLU	D-glucose
ARA	L-arabinose
MNE	D-mannose
MAN	D-mannitol
NAG	N-acetyl-glucosamine
MAL	D-maltose
GNT	potassium gluconate
CAP	capric acid
ADI	adipic acid
MLT	malic acid
CIT	trisodium citrate
PAC	phenylacetic acid



그림 39. VNTR 유전 type 균주의 20개 기질 API kit에 접종 후 24시간이 지난 결과 사진 예. (상 : type 20, 하 : type 11).

표 17. API kit 측정 결과

VNTR유전형	기질	기질																			
		NO <sub>3</sub>	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC
1		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
2		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
4		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
5		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
6		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
9		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
10		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
11		-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
12		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
13		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-

14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-

5). 접종 실험을 통한 VNTR 유전형 type 균주간 병원성 능력 차이 관찰

어린배(신고), 어린사과(부사)를 가지고 접종 실험을 진행하였다. 29개균을 PDB에 48시간 배양후 O.D(A<sub>600</sub>) 0.1로 맞춘 다음 배와 사과에 살균한 blade로 상처를 내고 균을 2ul씩 세 군데에 접종하였다 (그림 40). 접종한 배와 사과는 25℃ 배양기에서 배양하고 배양후 5일째와, 7일째에 병 진행 정도를 관찰하였다 (그림 41, 42).

7일째 관찰 결과, 배에서 가장 병징이 심해보인 것은 29개 균주 중에 type 11, 12, 17, 18, 23, 26, 28, 29, 30이었다. 이 결과로 볼 때 29개 균주 간에 배에 대해 침입능력이 다르게 나타난 것으로 보여 진다.

배에 비하여 사과에서는 병징이 심하지는 않았다. 그러나 type 1, 2, 4, 11, 15, 25, 30이 다른 사과에 비해 병징이 심하게 유발하였다. 흥미롭게도 배와 사과에 공통으로 병징을 심하게 유발 시킨 균주는 type 11, 30 균주뿐이었다. 이 결과로 볼 때 화상병균 변이 형 중에는 사과와 배에 병을 일으키는 능력에 다소 차이가 있다고 사료된다. 향후 역학조사를 통해 균주 능력에 대한 검토는 좀 더 심도 있는 연구가 필요하다고 사료된다.



그림 40. 어린 배에 VNTR type 균을 접종하는 모습.





그림 41. VNTR 유전형별 29개 균주를 어린 배 과실에 접종한 결과 사진. 1번 대조구. 좌에서 우로 2번째부터 VNTR type 균주 1 부터 시작하여 29번까지 순서적으로 나열됨.





그림 42. VNTR 유전형별 29개 균주를 어린 사과 과실에 접종한 결과 사진. 1번 대조구. 좌에서 우로 2번째부터 VNTR type 균주 1 부터 시작하여 29번까지 순서적으로 나열됨.

○ 해외 화상병균 reference 균주 확보

국외의 연구자와 균주 보유 기관으로부터 확보한 균주 목록은 아래와 같다 표 18과 같다. 9개국으로부터 9개 균주를 확보하였다.

표 18. 해외 확보 화상병 균주 목록

	Species	Country of isolation	year of isolation
1	<i>Erwinia amylovora</i>	United States	N/A
2	<i>Erwinia amylovora</i>	United Kingdom	1958
3	<i>Erwinia amylovora</i>	Poland	N/A
4	<i>Erwinia amylovora</i>	Poland	N/A
5	<i>Erwinia amylovora</i>	New Zealand	1955
6	<i>Erwinia amylovora</i>	France	1982
7	<i>Erwinia amylovora</i>	Iran	N/A
8	<i>Erwinia amylovora</i>	Lebanon	1998
9	<i>Erwinia amylovora</i>	Morocco	2007
10	<i>Erwinia amylovora</i>	Turkey	N/A

다. 과수화상병 해외 균주 증식 특성(3차년도)

1) 온도별 생장 차이 조사

- 본 연구에 사용한 해외 9개의 *Erwinia amylovora* 균주는 표 과 같음.
- 화상병 균주들을 Luria-Bertani(LB) 액체 배지에 접종하여 15°C, 25°C, 37°C에서 24시간 배양하였음(표 19).
- 배양한 균은 96 well plate에 200 $\mu$ l씩 분주하여, Microplate reader로 O.D(A<sub>600</sub>)에서 흡광도를 측정하였음.
- 세가지 조건의 온도 중 25°C에서 뚜렷하게 가장 생장이 잘 된 것을 관찰하였음(그림 43). strain 간에 생육차이는 약간씩 차이가 있었다.
- 저온인 15°C에서는 strain 3470이 가장 낮은 생장을 보였고, strain 1219, strain Ca11이 가장 높은 생장을 보였음(그림 43). strain간 차이가 뚜렷하였다.
- 37°C에서는 strain Ca11을 제외한 8개의 균주가 15°C보다 낮은 생장을 보였고, Ca11은 15°C보다 37°C에서 더 높은 생장을 보였음(그림 43).
- 결과적으로 9개의 균주 모두 25°C에서 최적 생장 온도임을 확인하였고, 균주 간 생장 차이가 나타나는 것을 관찰함.

표 19. 조사한 SNP type 유형별 *E. amylovora* 균주 목록

Sample	국가	특성
1219	Poland	-
1376	Belgium	-
1397	Denmark	-
3054	Germany	-
3470	Turkey	-
UTRJ-2	US	-
MRI-1	US	-
Ea88	US	항생제 내성 균주
Ca11	US	항생제 내성 균주

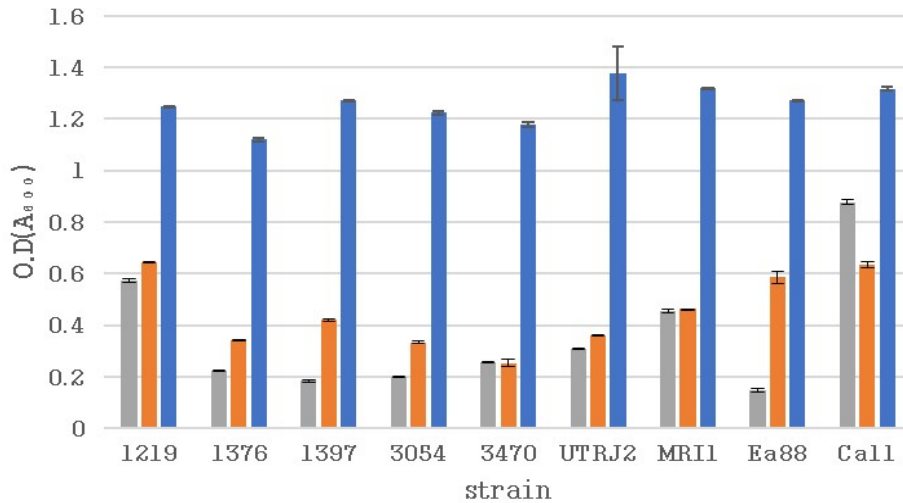


그림 43. 온도별 성장을 나타낸 그래프  
(주황색 bar. 15°C, 파랑색 bar. 25°C, 회색 bar. 37°C)

## 2) pH 농도별 성장 차이 조사

- pH 농도에 따른 성장 차이를 조사하기 위해 실험을 실시함.
- pH4, pH7, pH11농도 별로 LB 액체 배지를 만들고 9개 균주를 접종 하였음.
- 접종한 균주는 25°C에서 24시간 동안 배양한 뒤 O.D. 값을 측정함.
- 측정된 결과 pH7에서는 9개의 균주가 모두 생장이 잘 된 것을 관찰하였고, pH4는 모든 균주가 생장이 낮았지만 이중에 strain 1219와 strain MRI-1이 생장이 가장 낮았고, UTRJ-2가 가장 생장이 높았음(그림 44, 45).
- pH11은 Ca11만 성장을 보였지만, pH4와 pH7에 비해서는 전체적으로 낮은 성장을 보였음(그림 46).
- 결과적으로 해외 균주가 pH에 따라 생장의 차이가 나타나는 것을 확인함. 특히 그 차이는 산성과 알칼리 조건에서 뚜렷하였음. 이는 환경 조건에 견디는 능력에 커다란 차이가 있을 것임을 시사함.

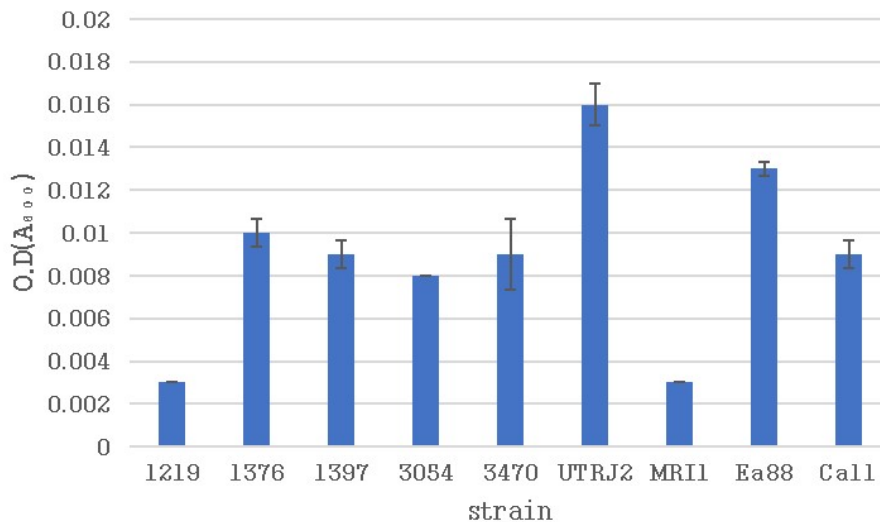


그림 44. pH4에서 24시간 배양한 균주별 성장 그래프.

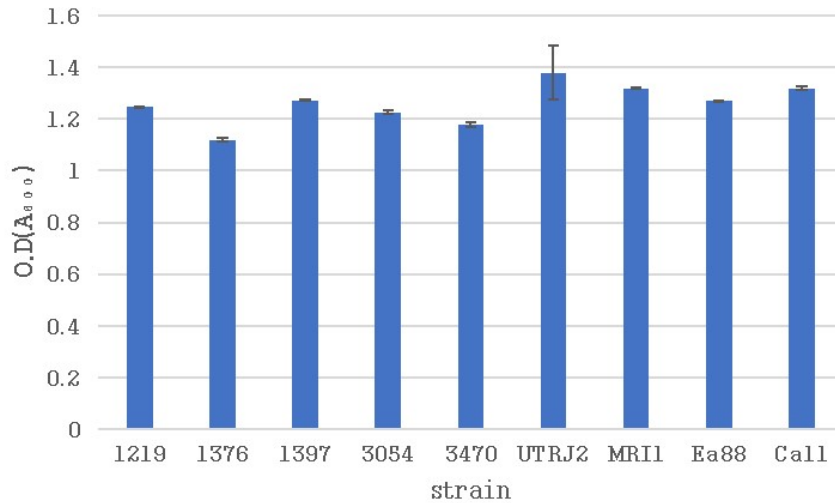


그림 45. pH7에서 24시간 배양한 균주별 성장 그래프.

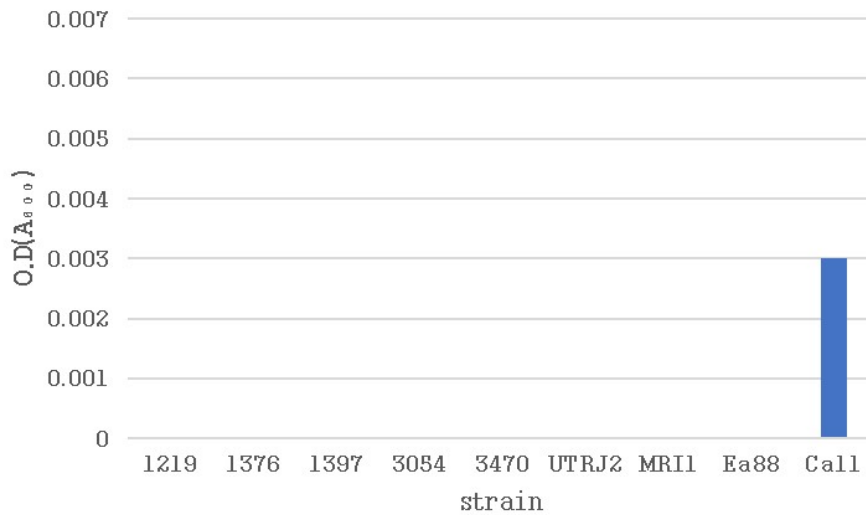


그림 46. pH11에서 24시간 배양한 균주별 성장 그래프.

### 3) 항생제 농도별 감수성 조사

- 항생제 농도별 감수성을 조사하기 위해 디스크 확산법을 통하여 Clear zone의 직경을 확인하였음.
- 항생제는 Streptomycin을 10mcg, 25mcg, 300mcg의 세가지 농도로 비교하였음.
- 실험 결과 UTRJ-2와 항생제 내성 균주인 Ea88, Ca11을 제외한 6개의 균주에서 Clear zone을 관찰하였음(그림 47, 표 20). 이들 6개 균주는 농도 의존적으로 항생제에 대한 감수성이 있음을 시사함.
- Clear zone의 직경을 비교하였을 때, strain 1397이 streptomycin 항생제에 감수성이 제일 큰 것으로 나타났음.

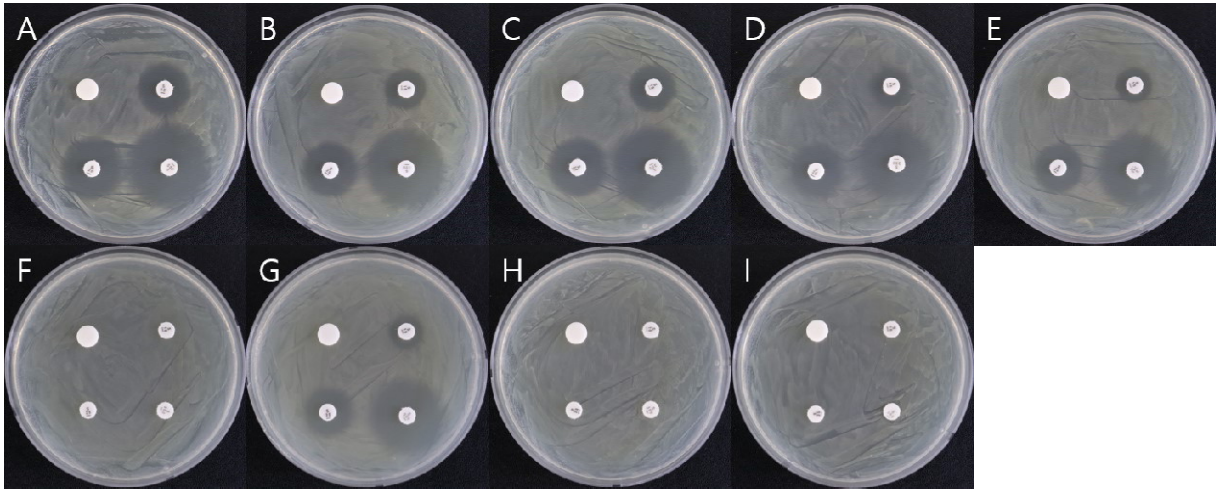


그림 47. 항생제 test 실험 결과

(A. 1219, B. 1376, C. 1397, D. 3054, E. 3470, F. UTRJ-2, G. MRI-1, H. Ea88, I. Ca11)

표 20. 항생제 농도에 대한 clear zone 직경 (단위: mm)

농도 \ 균주	1219	1376	1397	3054	3470	MRI-1
10mcg	16.99±0.13	14.84±0.08 7	17.32±0.37	14.01±0.26	13.66±0.31	12.54±0.4
25mcg	25.02±0.31	19.93±0.26	20.78±0.16	17.41±0.25	18.27±0.24	17.01±0.51
300mcg	26.29±0.83	27.66±0.42	28.85±0.56	25.17±0.49	26.39±0.28	24.96±0.03

#### 4). 해외 과수화상병균의 Biofilm(생물막) 형성능력 조사

- Biofilm 형성능력을 조사하기 위해 Crystal violet assay로 실험을 진행하였음.
- 96 well plate에 24시간 배양한 균주를 100 $\mu$ l씩 분주하고 새로운 LB 배지를 100 $\mu$ l 분주한 뒤 25 $^{\circ}$ C에서 48시간 정지 배양함. 배양 후 균을 제거하고 D.W에 2회 세척한 뒤, 0.1% Crystal violet 200 $\mu$ l 분주하여 10-15분 반응시킴. 그리고 D.W로 3회 세척하여 물기를 제거하고 24시간동안 실온에서 자연 건조함. 건조된 well plate에 30% Acetic acid를 200 $\mu$ l 분주하고 10-15분 반응시킴. 새로운 well에 옮기고 595nm에서 흡광도를 측정함 (그림 48, 표 21).
- 관찰한 결과, 육안으로는 strain UTRJ-2와 strain Ea88만 biofilm을 관찰하였지만 흡광도를 측정한 결과 strain 3470, strain UTRJ-2, strain Ea88이 다른 strain보다 높은 값을 보였음. 결과적으로 균주간 biofilm 형성능력이 다른 것을 관찰함.



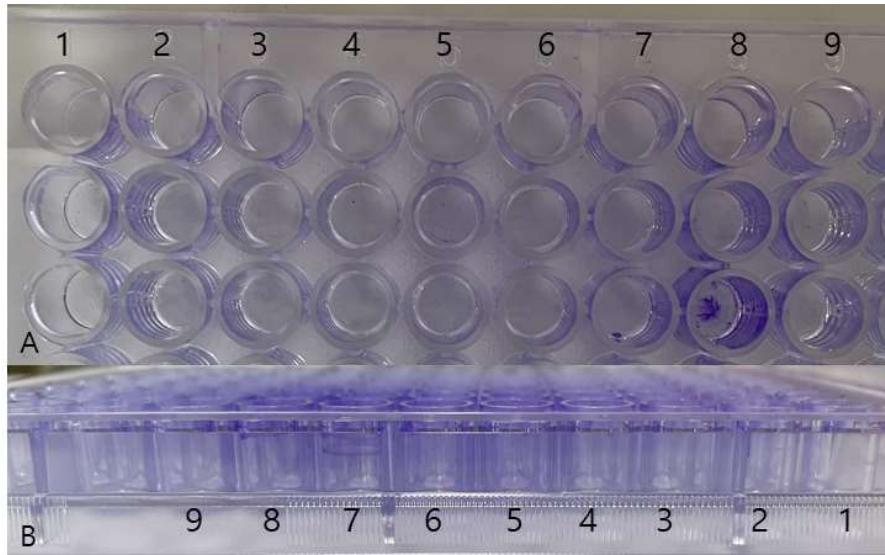


그림 48. Biofilm 형성 능력 조사 실험 결과 사진.

A. 96 well plate를 위에서 본 모습, B. 96 well plate를 옆에서 본 모습.

(1. 1219, 2. 1376, 3. 1397, 4. 3054, 5. 3470, 6. MRI-1, 7. UTRJ-2, 8. Ea88, 9. Ca11)

표 21. 흡광도 측정 결과.

(1. 1219, 2. 1376, 3. 1397, 4. 3054, 5. 3470, 6. MRI-1, 7. UTRJ-2, 8. Ea88, 9. Ca11)

strain	1	2	3	4	5	6	7	8	9
O.D	0.018	0.034	0.032	0.040	0.189	0.086	0.164	0.582	0.048

#### 5). 해외 과수화상병균의 VBNC 특성 조사

- 스트레스 조건에서 성장 차이를 관찰하기 위해 4°C, 25°C, 45°C 세 조건에서 24시간 처리 후 control 조건인 25°C로 옮겨 24시간 추가로 배양하였음.
- 결과적으로 4°C에서 24시간 배양 후 25°C로 옮긴 균들은 생장이 가능한 것을 확인했던 반면 45°C에서 24시간 배양 후 25°C로 옮긴 균들은 생장이 되지 않은 것을 확인함(그림 49).
- 따라서 9개의 균주 모두 높은 온도에서 스트레스를 받으면 생존이 불가능한 것을 관찰함.

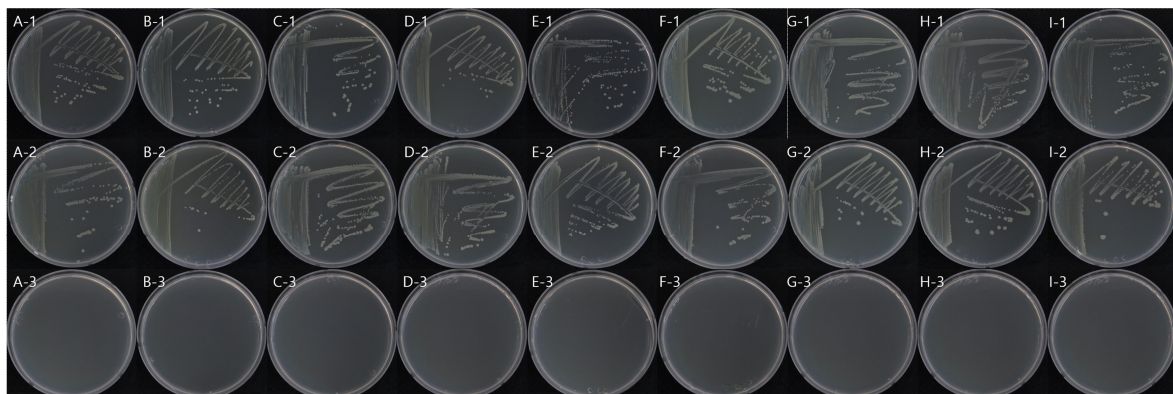


그림 49. VBNC 특성 조사 결과 사진. (1. 4°C, 2. 25°C, 3. 45°C)

(A. 1219, B. 1376, C. 1397, D. 3054, E. 3470, F. UTRJ-2, G. MRI-1, H. Ea88, I. Ca11)

라. 유전체 분석을 통해 선발한 과수화상병균의 생화학적 특성 분석

1). Chromogenic medium (발색 배지)를 이용한 세포외효소 활성 차이 조사(4차년도)

주관기관과 농림축산검역본부와의 회의를 통해 유전체 분석을 완료한 과수화상병균 균주 중에서 SNP 차이가 있는 SNP 유전형 10개 균주를 선발하여 분석을 수행함 (표 22). 이들 균주들은 PDA 배지에서 생장이 양호하였으며 배양된 콜로니들간에 특별히 구분되는 형태적 특징은 관찰되지 않았음. LB agar 에서도 유사한 성장 특성을 보였음 (data not shown). SNP 변이주의 성장 차이 비교는 생리조사를 통해 좀 더 다양한 조건에서 조사가 필요하다고 사료됨 (그림 50).

표 22. 선발된 SNP 유전형 *E. amylovora* 균주 목록

균주번호	균주명	Haplotype	MST number	MST 분석(별표_선발한 샘플)
1	17CA001	H00	42	
2	17AS039	H46	39	
3	19CA003	H00	102	
4	19CA021	H00	119	
5	19JC010	H36	276	
6	19CJ019	H07	150	
7	19CJ062	H00	193	
8	19CJ095	H04	225	
9	19CJ096	H00	226	
10	19PC004	H00	82	

\* 과수화상병 생화학적 특성 조사를 위해 선발된 분리주

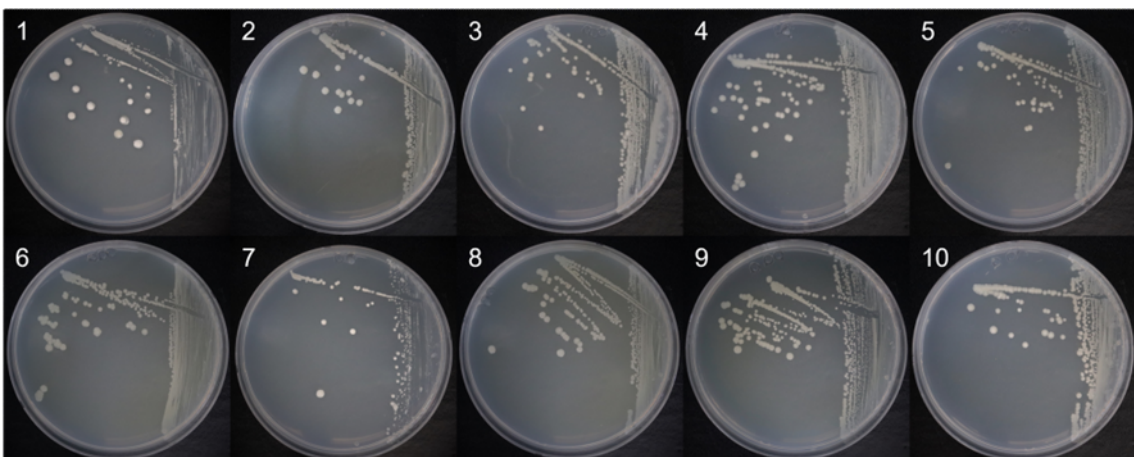


그림 50. 25°C PDA medium (균주번호 1-5) 과 LBA medium (균주번호 6-10)에서 5일 동안 배양한 SNP 유전 type 형 화상병균 균주의 균총 모습 예.

생화학적 특성 조사를 위해서는 PDA에 키운 선발한 균주들을 기본적으로 PDB(Potato Dextrose Broth) 액체 배지에 접종하여 25°C 진탕 배양기에서 3일간 배양한 후 사용하였음. Extracellular enzyme 분비에 의한 다양한 기질 이용 능력에 있어서 SNP 균주간 생화학적 특성 차이가 있는지 조사하기 위해서는 Amylose, Protein, Pectin, Skim milk, CM(CarboxyMethyl) cellulose, Cellobiose(CB), Abicel 등의 고분자 유기성 기질이 들어간 배지를 만들어서 실험을 진행함. 각 효소 기질이 첨가된 발색 배지에 10개의 균주( $10^5$  cells/mL)를 5ul씩 접종 하고, 25°C 배양기에서 7일간 배양함. 결과적으로 Skim milk와 CB 배지에서 균이 자라긴했지만 기질을 사용하여 배지 색이 변한 것은 관찰하지 못하였음. 이는 SNP 유전형 균주간 식물의 고분자성 구조물질을 분해하는 능력이 강한 균주가 없음을 보여주는 동시에 균주간에 이러한 고분자 분해능력을 지니는 세포외 효소군 (celluase, cellobiase, avicelase, pectinase, protease, xylase )에는 차이가 없음을 보여준다.

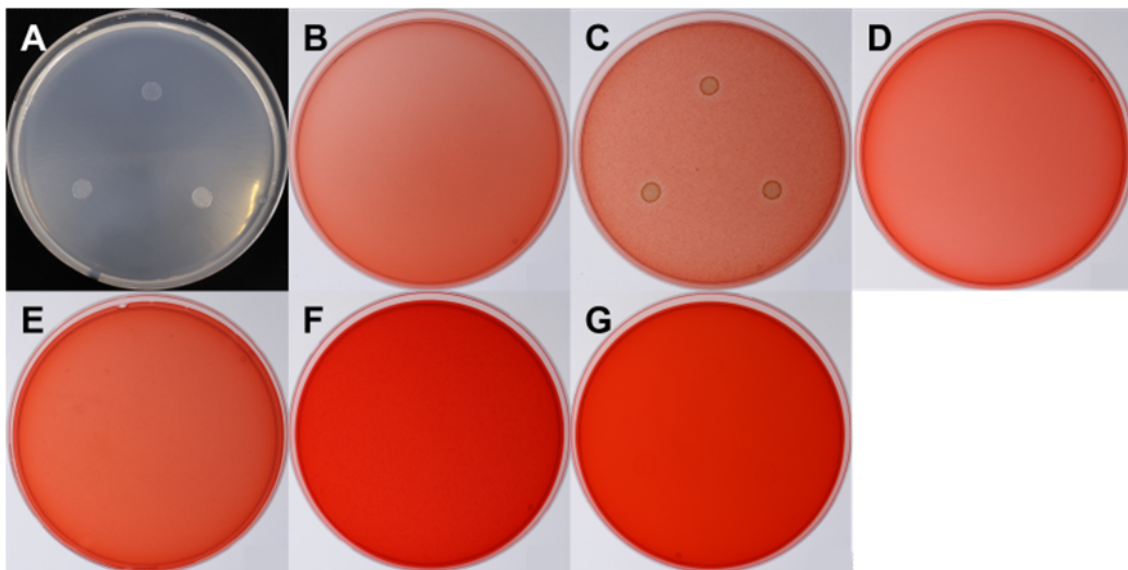


그림 51. 화상병균 SNP 유전 type 균주들을 Chromogenic medium에 배양한 결과 사진 예(A: Skim milk, B: Avicel, C: Xylan, D: CB, E: Pectin, F: Starch, G: CM).

## 2). API kit를 이용한 기질 사용 능력 조사

Chromogenic medium에 의한 고분자 영양원 이용 특성에 차이가 없는 바 소분자 물질 분해 능력에 차이가 있는지를 비교하고자 총 20가지의 서로 다른 기질(표 23)이 kit에 있는 API 20NE kit(Biomerieux)를 이용하여 SNP 유전형별로 기질을 사용하는 데에 차이가 있는지 관찰하였다. API NaCl 0.85% Medium 앰플을 이용하여 O.D( $A_{600}$ ) 0.13(McFarland 0.5) 탁도로 맞췄고 API kit에 10개의 균을 접종하고 30°C 배양기에서 배양하고, 24시간 후, 48시간 후 2 번 결과를 측정하였다.

SNP 유전 type 2, 4, 5, 6, 8번 균주를 제외하고 나머지 6개 균주는 동일한 기질이용 특성을 나타내었다 (표 24). 대부분 균주들이 사용하지 못한 GEL(젤라틴) 기질을 2, 4, 5, 6번 균주는 사용하였다. ARA(L-arabinose) 기질은 10개 균주 중 4, 6, 8번 등 3개 균주가 사용하지 못하는 것으로 나타났다. 이 결과는 SNP 유전형이 다른 균주간에 생화학적 특성에 차이가 있음을 보여준다.

표 23. API kit에 사용된 20가지 기질내역

기질 약자	기질 이름
NO <sub>3</sub>	NO <sub>3</sub>
TRP	L-tryptophan
GLU(oil)	D-glucose
ADH(oil)	L-arginine
URE(oil)	urea
ESC	escilin ferric citrate
GEL	gelatin
PNPG	4-nitrophenyl-beta D-galactopyanoside
GLU	D-glucose
ARA	L-arabinose
MNE	D-mannose
MAN	D-mannitol
NAG	N-acetyl-glucosamine
MAL	D-maltose
GNT	potassium gluconate
CAP	capric acid
ADI	adipic acid
MLT	malic acid
CIT	trisodium citrate
PAC	phenylacetic acid

표 24. API kit 측정 결과

Substrate SNP type E. amylovora	NO <sub>3</sub>	TR	GL	AD	UR	ES	GE	PN	GL	AR	M	M	NA	M	G	CA	AD	ML	CI	PA
		P	U	H	E	C	L	PG	U	A	NE	AN	G	AL	NT	P	I	T	T	C
1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
2	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
4	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
5	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
6	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-



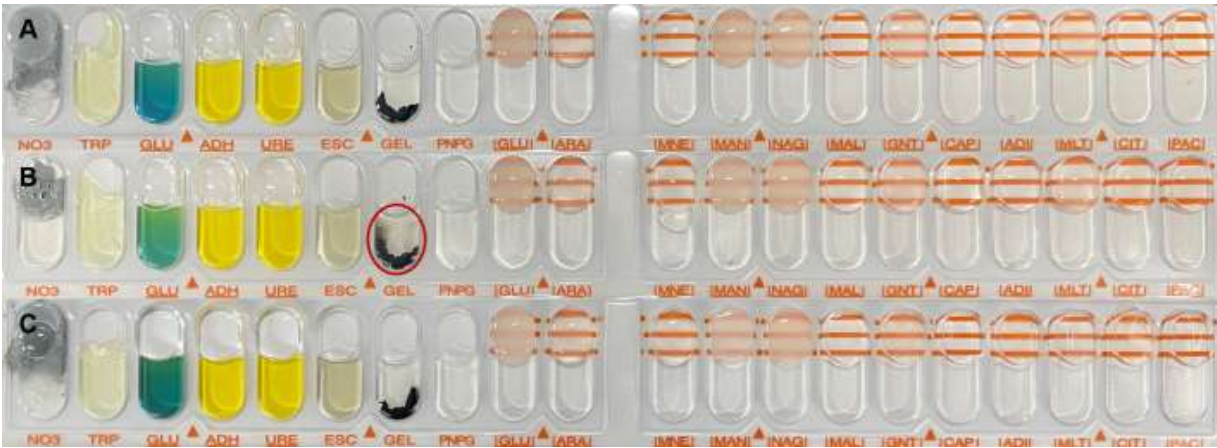


그림 52. SNP 유전 type 균주를 20개 기질이든 API kit에 접종 후 24시간이 지난 결과 예시 (A: 1번 균주, B: 2번 균주, C: 8번 균주).

### 3). 사과 접종 실험을 통한 병원성 능력 차이 여부 관찰

어린사과(부사)를 가지고 접종 실험을 진행하였다. 10개균을 PDB에 72시간 배양 후 O.D(A<sub>600</sub>) 0.13으로 맞춘 다음 사과에 살균한 blade로 상처를 내고 균을 2ul씩 접종하였다. 대조균은 멸균증류수를 종량 접종하였다. 접종한 사과는 25℃ 배양기에서 습식 처리하여 배양(그림 53)하고 배양직 후와 7일째에 병 진행 정도를 관찰하였다.



그림 53. 화상병균을 사과에 접종 후 배양기에서 배양 예.

배양 7일 후 사과를 관찰한 결과 접종 부위에 화상병 병징이 10개 균주를 접종 한 모든 사과에서 나타나지 않았다, 접종 직후와 비교하였을 때 표면이 다소 말랑해지고 쭈글해진 것을 제외하고는 크게 다른 차이가 나지 않았다 (그림 5, 6). 7일 배양한 사과를 블레이드를 사용하여 잘라 단면을 관찰하였지만 역시 단면에서도 균주간 차이 없이 병징이 보이지 않았다 (그림 7). 2차년도 연구 수행시 VNTR 변이주 접종 시험 때도 사과에서는 29개 균주 중 5개 균주만 병원성을 나타낸바 이번 SNP 유전형 변이주도 10개 균주 모두 차이 없이 사과에 대한 병원성은 뚜렷하게 나타내지 못하였다. 향 후 사과 품종을 바꾸어서 그리고 배에 대한 병원성 검정 수행을 통해 균주간 차이가 있는지 추가 조사를 수행할 예정이다.



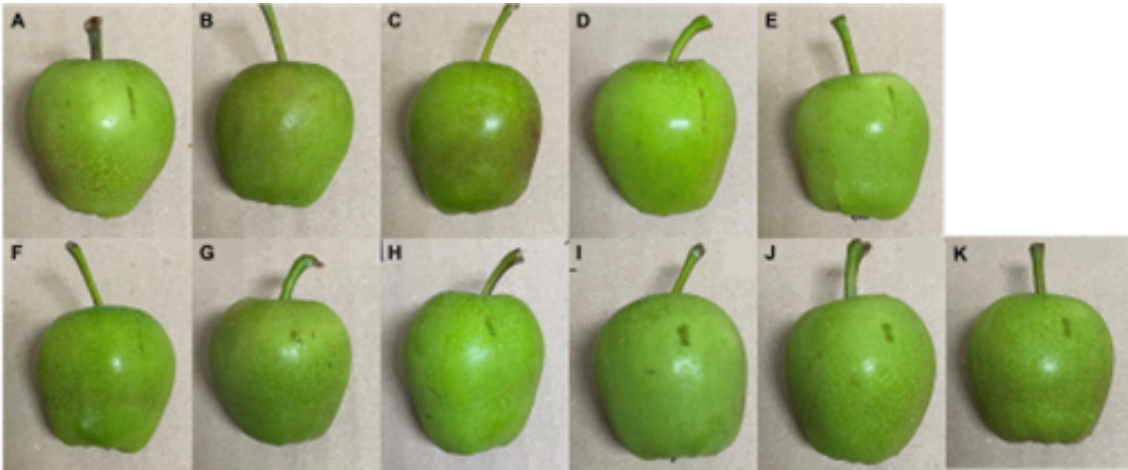


그림 54. SNP 유전형별 10개 균주를 어린 사과 과실에 접종 직후 사진 (A. D.W, B. 1번 균주, C. 2번 균주, D. 3번 균주, E. 4번 균주, F. 5번 균주, G. 6번 균주, H. 7번 균주, I. 8번 균주, J. 9번 균주, K. 10번 균주).

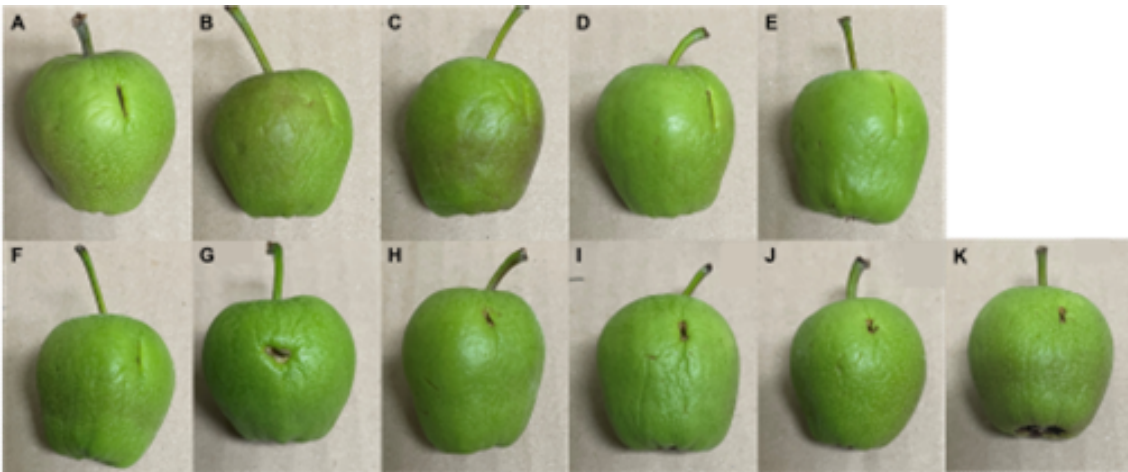


그림 55. SNP 유전형별 10개 균주를 어린 사과 과실에 접종하고 7일 후 결과 사진(A. D.W, B. 1번 균주, C. 2번 균주, D. 3번 균주, E. 4번 균주, F. 5번 균주, G. 6번 균주, H. 7번 균주, I. 8번 균주, J. 9번 균주, K. 10번 균주). SNP 유전형별 10개 균주를 어린 사과 과실에 접종한 결과 사진

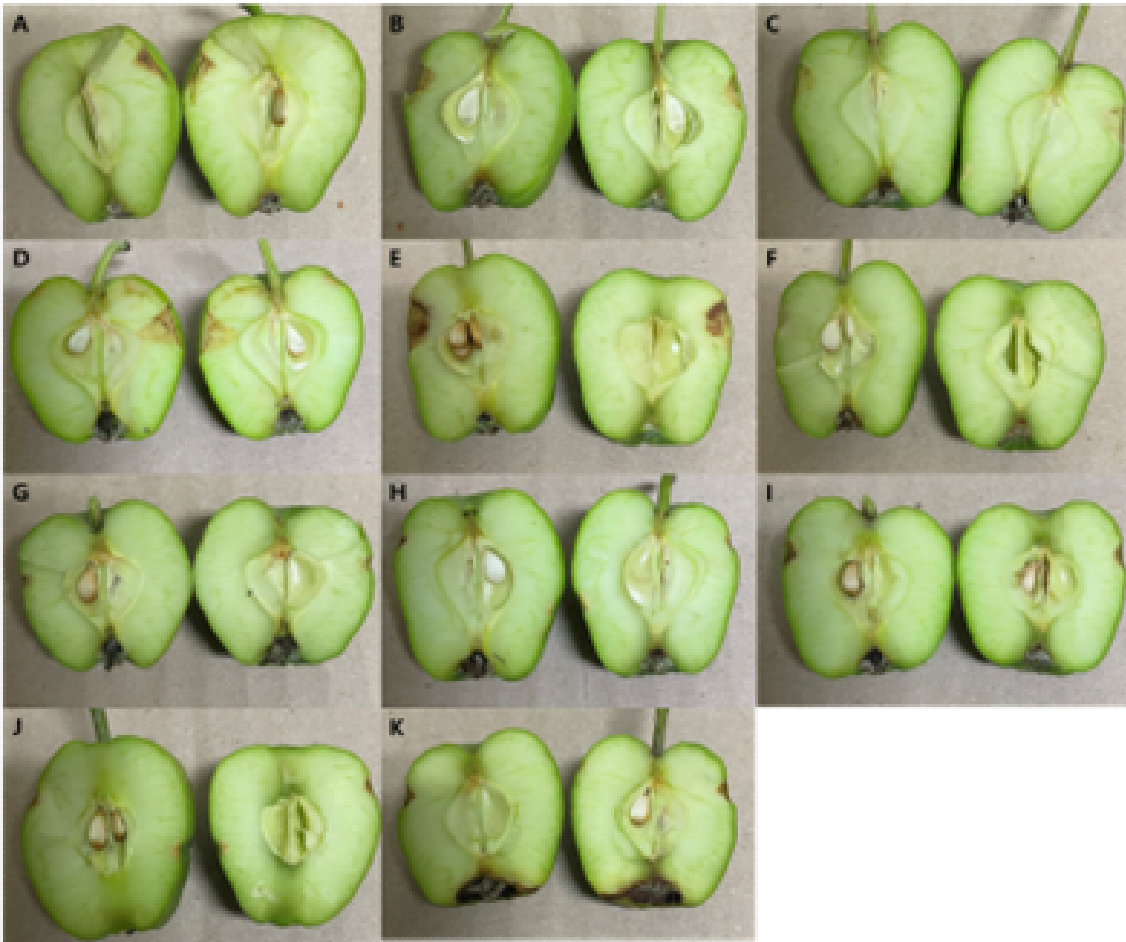


그림 56. SNP 유전형별 10개 균주를 어린 사과 과실에 접종하고 7일 후 과실을 반으로 자른 결과 사진(A. D.W, B. 1번 균주, C. 2번 균주, D. 3번 균주, E. 4번 균주, F. 5번 균주, G. 6번 균주, H. 7번 균주, I. 8번 균주, J. 9번 균주, K. 10번 균주).

#### 4). 온도와 pH에 따른 성장 조사

SNP 유전형 균주들을 PDB 액체 배지에 접종하여 72시간 배양후 O.D(A<sub>600</sub>) 0.13 농도를 맞춘 후 PDB 100ul씩 균을 200 ul 씩 96well microplate 에 접종하였음. 15°C, 25°C, 37°C에서 24시간 배양함. 배양된 균은 O.D(A<sub>600</sub>)로 흡광도를 측정하여 비교함. 3반복으로 시험이 진행됨.

온도별 성장 차이 조사 결과 1, 2, 6번 균주를 제외한 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10번 균주는 25°C 조건에서 가장 생장이 잘 일어남 (그림 57). 1, 6번 균주는 25°C보다 37°C에서 미세하지만 조금 더 생장이 잘 일어남. 10개 균주 모두 저온인 15°C에서는 생장이 저조하였음. 이는 화상병균의 최적 성장 조건인 25°C 조건에서 대체로 생육이 좋은 것을 알수 있지만 고온에서 억제되지 않고 생육이 일어나는 SNP 유전형 균주가 있음은 흥미로운 결과임.

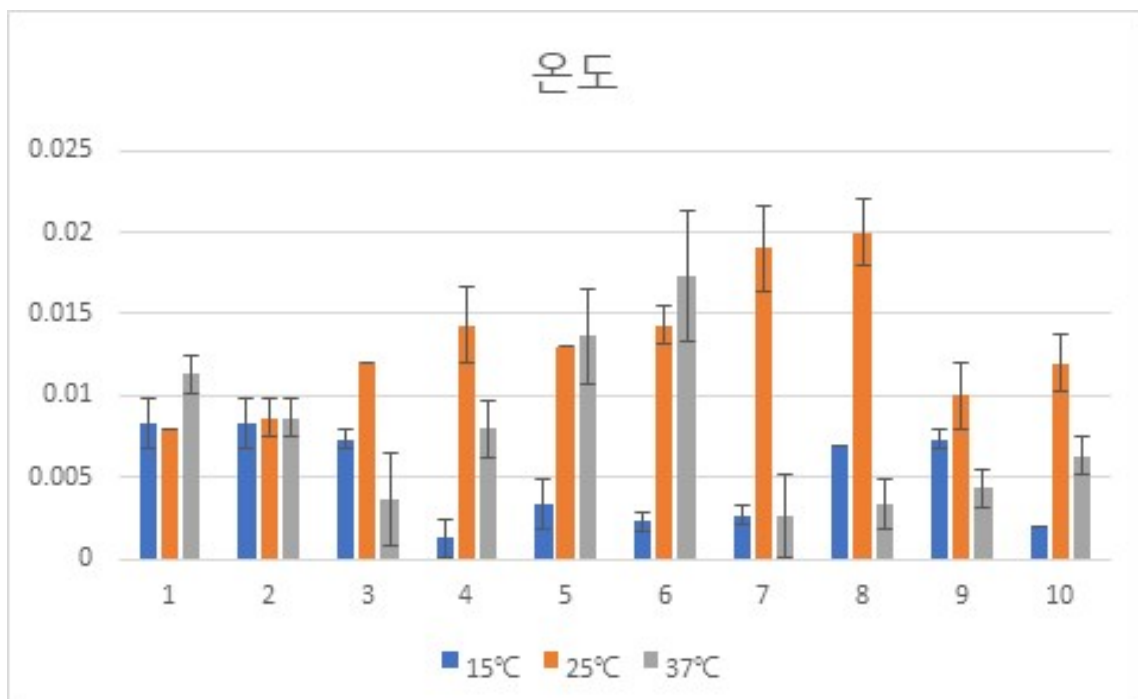


그림 57. 서로 다른 온도 (15°C, 25°C, 37°C)에서 24시간 배양한 뒤 측정된 10개 화상병균 SNP 유전형 균주간 성장 비교 그래프.

25°C 에서 생육이 좋은 바 이 온도에서 배지의 pH를 pH4, pH7, pH11 로 조정 후 온도 조건 실험과 같은 방법으로 접종하고 배양하여 비교하였다. pH는 전체적으로 pH7에서 SNP 유전형 균주들의 생장이 잘 일어남 (그림 58). 10개 균주중 1번과 2번 균주는 pH11 에서도 pH7만큼 생장이 일어났다. 3번 균주는 pH4와 pH11 모두에서 자라지 못하였다. 4, 5, 6번 균주는 pH4에서 자라지 못하였다. 대체적으로 산성 조건에서 화상병균은 자라지 못하거나 생육이 억제됨을 알 수 있었다. 이러한 차이는 SNP 균주간에 차이가 있음을 볼 수 있다.

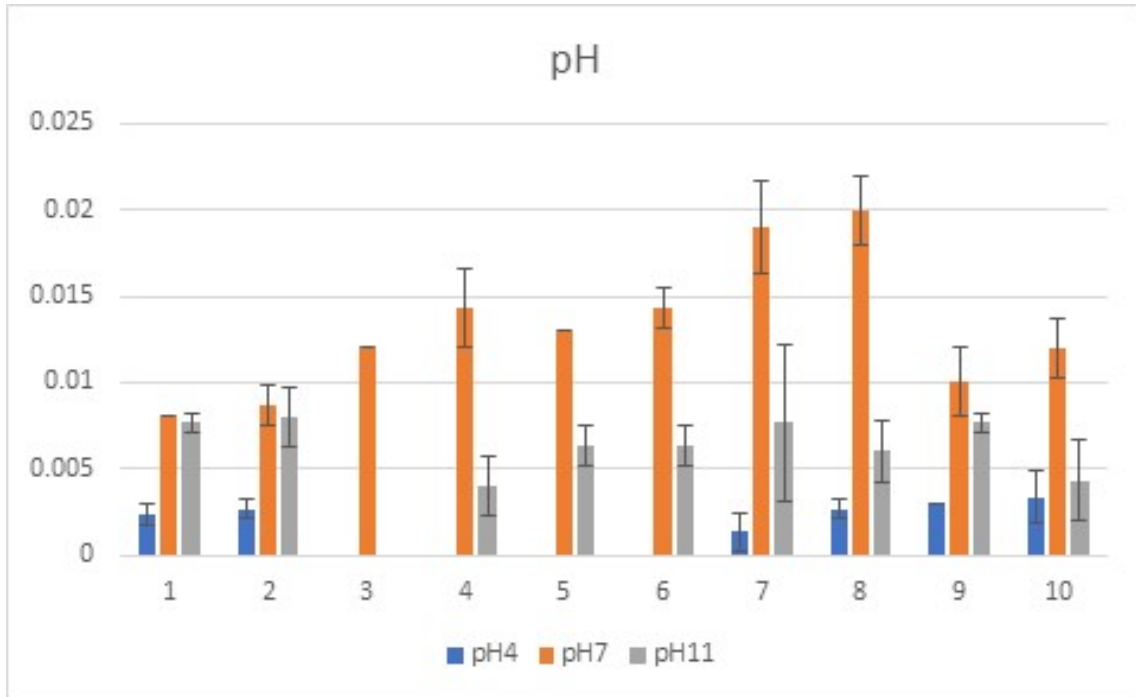


그림 58. 서로 다른 pH (4, 7, 11)에서 24시간 배양한 뒤 측정된 10개 화상병균 SNP 유전형 균주간 성장 비교 그래프.

#### 5). 항생제 농도별 감수성 조사

10개 화상병균 SNP 유전형 균주간 항생제 농도별 감수성을 검정하기 위해 디스크 확산법을 이용하여 항생제 디스크에 Clear zone의 형성 유무 및 직경을 확인함. 항생제로 사용된 Streptomycin의 농도는 10, 25, 300 ug/mL로 총 3 가지를 사용함.

전체적으로 농도가 높을수록 clear 존이 커지는 것을 관찰함 (그림 59). 조사 결과 10 균주 모두 항생제에 내성이 보이지 않으며 감수성으로 확인됨. 균주간에는 민감도에 근소한 차이가 존재한 균주가 있었음 (표 25). 8번 SNP 균주가 고농도인 300 ug/mL에서 다른 SNP 균주들에 비해 가장 작은 clear 존( $20.68 \pm 4.18\text{mm}$ )을 형성하여 Streptomycin에 대한 민감도가 다소 낮음을 볼 수 있었음. 이에 반해 8번 SNP 균주는 가장 큰 clear ( $33.37 \pm 2.00\text{mm}$ )을 형성하여 민감도가 높은 차이를 보였다. 이는 항생제 민감성이 균주간에 존재함을 보여준다.

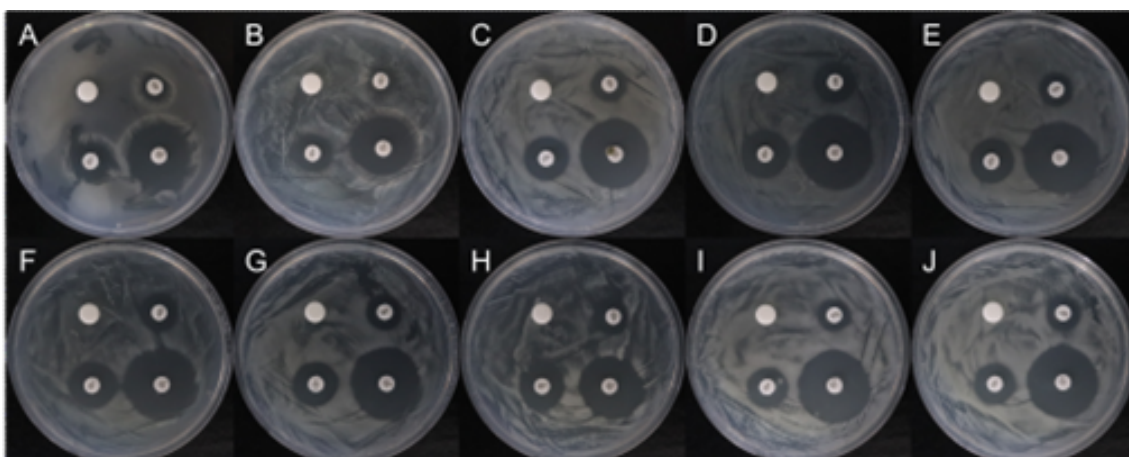


그림 59. Streptomycin항생제 test 실험 결과(A. 1번 균주, B. 2번 균주, C. 3번 균주, D. 4번 균주, E. 5번 균주, F. 6번 균주, G. 7번 균주, H. 8번 균주, I. 9번 균주, J. 10번 균주).

표 25. Clear존 직경 크기(mm)

no.	10ug	25ug	300ug
1	12.42±1.44	19.13±1.03	28.77±0.79
2	10.03±0.96	15.54±0.95	24.74±0.45
3	13.86±0.26	17.42±0.37	26.71±0.39
4	16.49±0.21	18.01±0.20	33.37±2.00
5	13.23±0.17	17.35±0.43	29.30±1.04
6	15.30±0.23	18.13±0.67	28.06±0.59
7	13.84±0.20	17.35±0.49	28.28±1.17
8	13.59±0.02	18.20±1.12	20.68±4.18
9	12.71±0.02	15.64±0.07	23.36±5.20
10	13.81±0.06	15.20±0.15	28.16±0.81

#### 6). 생물막(Biofilm) 형성 능력 조사

생물 막 형성능력 조사하기 위해 crystal violet assay로 실험을 진행함.

24시간 배양한 균주들을 O.D 1.14 에 맞춰서 100 $\mu$ l씩 분주함. 그대로 25 $^{\circ}$ C에서 48시간 정치 배양함. 배양 후 균을 버리고 D.W로 2회 세척 한 뒤 0.1% crystal violet 125 $\mu$ l씩 분주 후 10-15 min 반응시킴. D.W로 3회 세척 한 뒤 물기를 충분히 제거 후 실온에서 자연 건조함. 건조 시킨 well에 30% Acetic acid 125 $\mu$ l씩 분주하고 10-15 min 반응시킴. 새로운 well로 옮긴 뒤 흡광도 측정함(595nm)(그림 60).

결과적으로 균주별 생물막 형성 능력에 다소 차이가 존재하였다. 10번 SNP 유전형 균주가 가장 형성 능력이 좋았고 5번과 6번 SNP 유전형 균주가 낮은 생물막 형성 능력을 나타내었다 (그림 61).



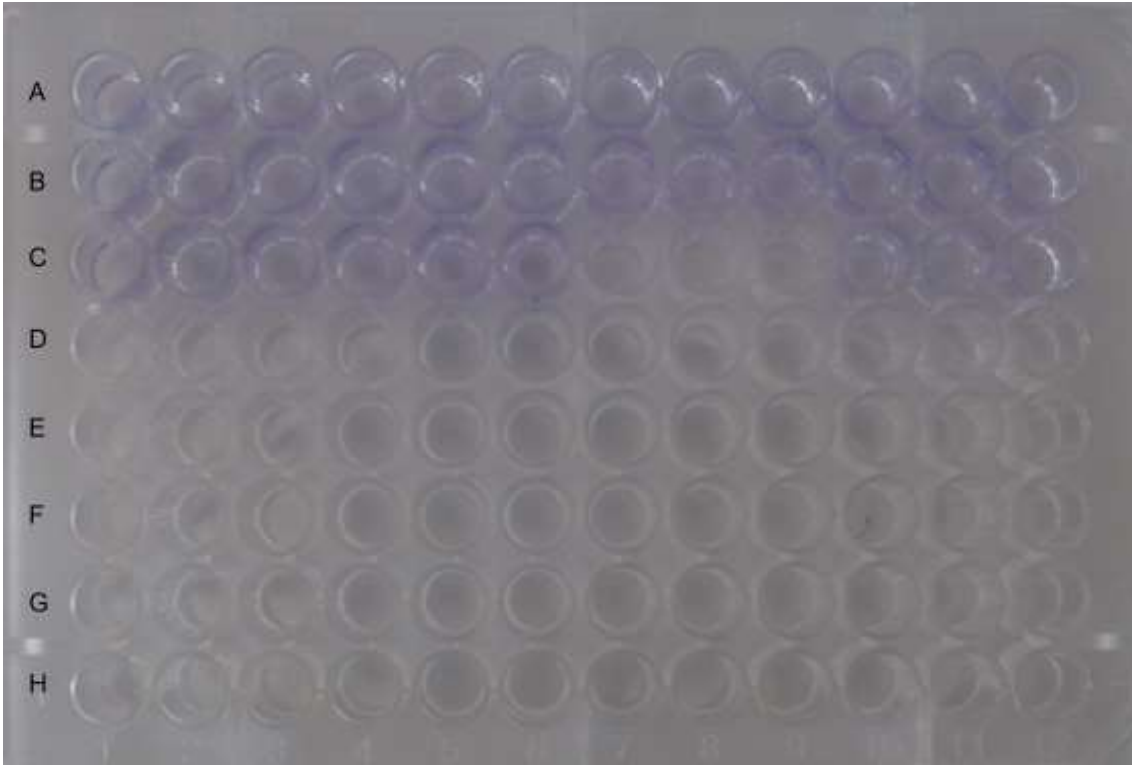


그림 60. 생물막 형성 정도 비교를 위해 Crystal violet 염색한 결과 사진 예.

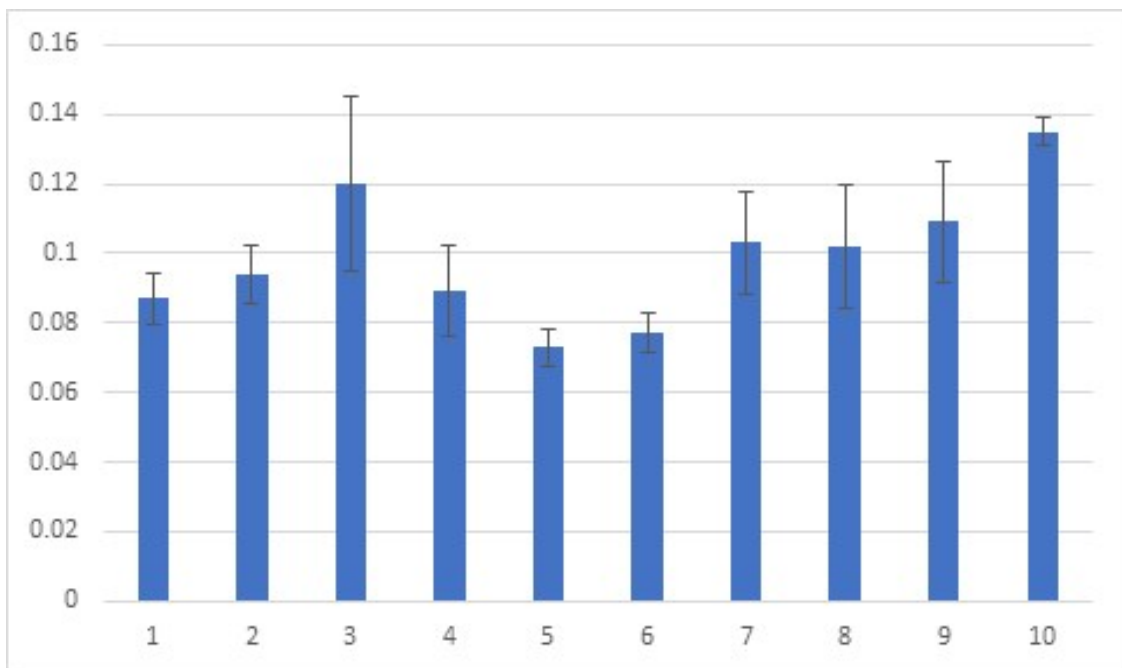


그림 61. 생물막 형성 정도 비교를 위해 Crystal violet 염색 정도를 흡광도로 측정한 결과.

#### 마. 가지검은마름병균 생화학적 특성 조사

##### 1). Chromogenic medium(세포 외 효소 활성)차이 조사

- 농림축산검역본부와 KACC(Korean Agricultural Culture Collection, 한국농업미생물자원센터)로부터 1 균주와 8 균주, 총 9균주를 분양받음(표 26), (그림 62).
- 분양받은 균주들은 LB(Lysogeny Broth)액체 배지에 접종하여 25°C 진탕 배양기에서 3일간 배양함.
- 기질 이용 차이를 조사하기 위해 Amylase, Xylanase, Pectinase, Skim milk, CM(CarboxyMethyl) cellulase,  $\beta$ -glucosidase, Avicelase의 기질이 들어간 배지를 만들어서

실험을 진행함.

- 각 효소 배지에 9개의 균주를 10ul씩 접종 하고, 25°C 배양기에서 7일간 배양함 (그림 62).
- 결과적으로 모든 배지에서 균이 자라긴 했지만, 대부분 기질을 사용하여 배지 색이 변한 것은 관찰하지 못하였음.
- 1번 균주가  $\beta$ -glucosidase( $20.56 \pm 0.3$ ), Pectinase( $14.23 \pm 0.15$ )기질을 이용하였음 (그림 63).
- 과수화상병균에 비하여 세포외 효소 활성이 낮음을 볼 수 있음.

표 26 . 분양 받은 *Erwinia pyrifoliae* 균주 목록

번호	균주명
1	7155
2	KACC 13913
3	KACC 13945
4	KACC 13946
5	KACC 13947
6	KACC 13948
7	KACC 13949
8	KACC 13951
9	KACC 13952

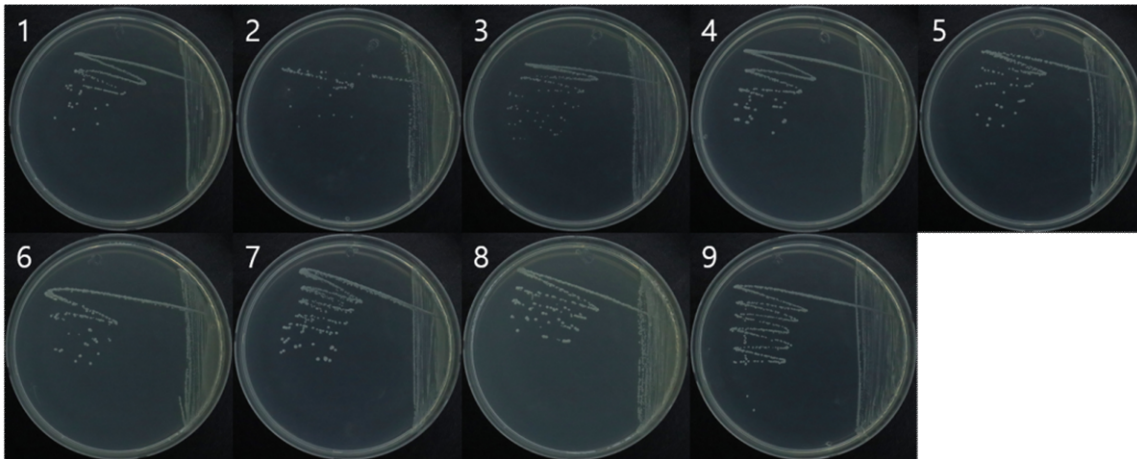


그림 62. 25°C 배양기에서 5일 동안 LBA medium에 배양한 균주 사진.

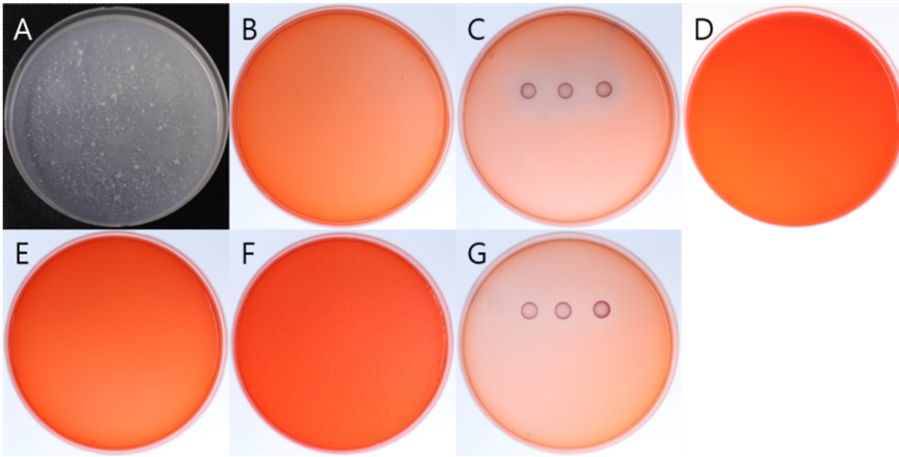


그림 63. Chromogenic medium에 배양한 결과 예시 사진(1번균주: A: Skim milk, B: Avicel, C: CB, D: Starch, E: Xylan, F: CM, G: Pectin).

## 2). API kit를 이용한 기질 사용 능력 조사

- API 20NE kit(Biomerieux)를 이용하여 균주별로 기질을 사용하는데에 차이가 있는지 관찰함.
- 총 20가지의 기질을 이용함(표 27).
- API NaCl 0.85% Medium 앰플을 이용하여 O.D(A<sub>600</sub>) 0.13(McFarland 0.5)탁도로 맞췄음.
- API kit에 9개의 균을 접종하고 25℃ 배양기에서 배양하고, 24시간 후, 48시간 후 2번 결과를 측정함 (그림 64).
- 2,3,9번 균주는 동일한 결과가 나타남.
- 대부분 균들이 사용하지 못한 ARA 기질을 1,5,8번 균주는 사용하였고, MLT 기질은 1,5,8번 균주가 사용한 것으로 나타남 (표 28).

표 27. API kit에 사용된 기질

기질 약자	기질 이름
NO <sub>3</sub>	NO <sub>3</sub>
TRP	L-tryptophan
GLU(oil)	D-glucose
ADH(oil)	L-arginine
URE(oil)	urea
ESC	escilin ferric citrate
GEL	gelatin
PNPG	4-nitrophenyl-beta D-galactopyanoside
GLU	D-glucose
ARA	L-arabinose
MNE	D-mannose
MAN	D-mannitol
NAG	N-acetyl-glucosamine
MAL	D-maltose
GNT	potassium gluconate
CAP	capric acid
ADI	adipic acid
MLT	malic acid
CIT	trisodium citrate
PAC	phenylacetic acid

표 28. API kit 측정 결과

VNTR 유전형	기질																			
	NO <sub>3</sub>	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	IGLU	IARA	IMNE	IMAN	INAG	IMAL	IGNT	ICAP	IADI	IMLT	ICIT	IPAC
1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+*	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	+*	-	-	+*	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+*	-	+	+	-	+*	-	-	+	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	+*	-	-	+*	+*	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	+*	-	-	+*	+*	-	+*	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	+*	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



그림 64. API kit에 접종 후 48시간이 지난 결과 예시(A: 1번 균주, B: 2번 균주, C: 3번 균주).

### 3). 접종 실험을 통한 병원성 능력 차이 관찰

- 어린사과(MB)를 가지고 접종 실험을 진행함.
- 9개 균을 LB에 72시간 배양함.
- 어린 사과에 blade로 상처를 내고 균을 10ul씩 원액을 접종하였음.
- 접종한 사과는 25℃ 배양기에서 배양하였고, 수분이 빠지지 않게 1차 D.W를 코니칼튜브에 담아 함께 배양하였음 (그림 65).
- 배양 14일째에 관찰함 (그림 66).
- 14일 후 사과를 관찰한 결과 병징이 나타나지 않았고, 직후와 비교하였을 때 표면이 말랑해지고 쭈글해진 것을 제외하고는 크게 차이가 나지 않았음 (그림 66).
- 14일 배양한 사과를 블레이드를 사용하여 잘라 단면을 관찰하였음.
- 단면에서도 병징은 보이지 않았음 (그림 67).



그림 65. 접종 후 배양기에 넣은 모습.

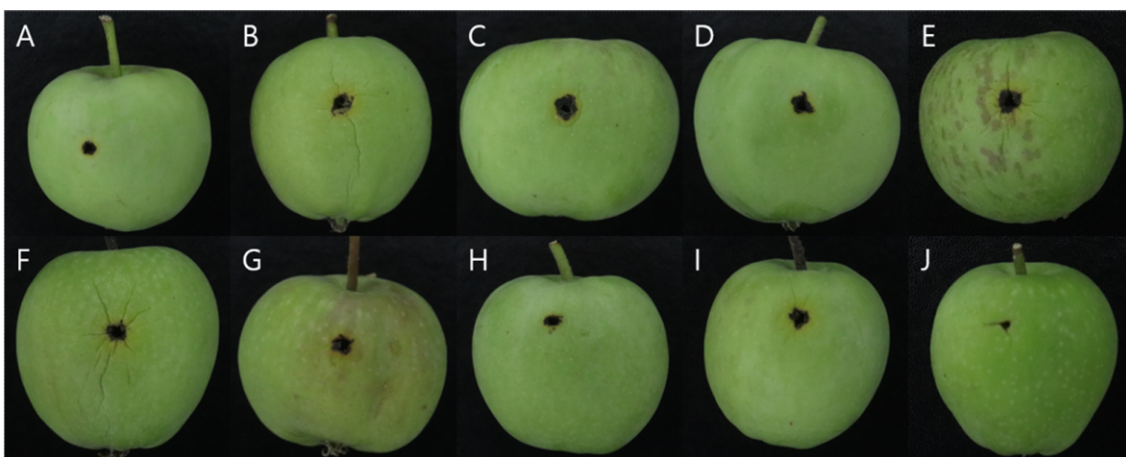


그림 66. 접종 14일 후 모습 (A. 1번 균주, B. 2번 균주, C. 3번 균주, D. 4번 균주, E. 5번 균주, F. 6번 균주, G. 7번 균주, H. 8번 균주, I. 9번 균주, J. D.W).



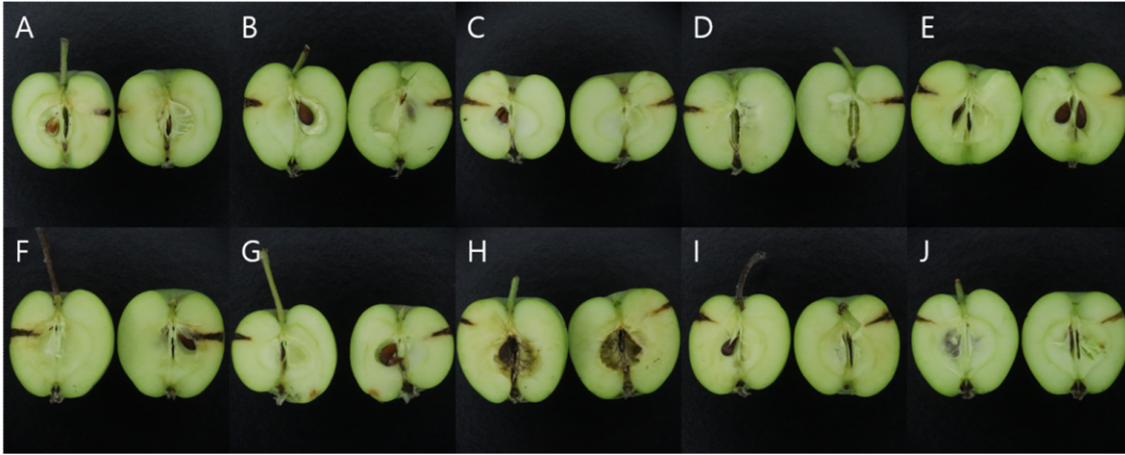


그림 67. 접종 14일 후 과실을 반으로 자른 모습 (A. 1번 균주, B. 2번 균주, C. 3번 균주, D. 4번 균주, E. 5번 균주, F. 6번 균주, G. 7번 균주, H. 8번 균주, I. 9번 균주, J. D.W).

#### 4). 온도와 pH별 생장 차이 조사

- 온도와 pH별 생장 차이를 조사하기 위해 15℃, 25℃, 37℃와 pH4, pH7, pH11 조건에서 배양하였음.
- 9개균을 LB에 72시간 배양후 O.D(A<sub>600</sub>) 0.13로 맞춤.
- 각 조건의 LB에 100ul씩 균을 접종하였음.
- 48시간 배양 후 O.D(A<sub>600</sub>)로 측정함.
- 온도별 생장 차이 조사 결과 전체적으로 25℃ 조건에서 가장 생장이 잘 일어남 (그림 68).
- 2번 균주가 15℃, 25℃ 조건에서 가장 생장이 잘 일어남.
- 전체적으로 37℃에서는 생장이 잘 일어나지 않음.
- pH는 전체적으로 pH7이 생장이 잘 일어남 (그림 69).
- 전체적으로 pH4, pH11에서는 생장이 잘 일어나지 않음.
- 결과적으로 37℃와 pH4, pH11에서는 생장이 잘 일어나지 않음.

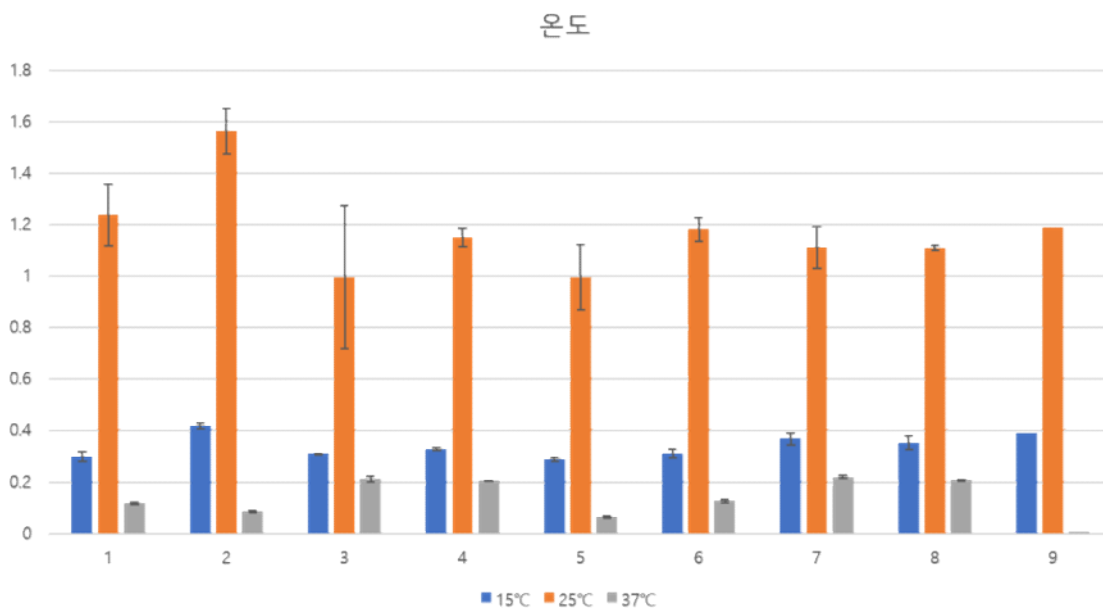


그림 68. 온도별 생장 그래프.

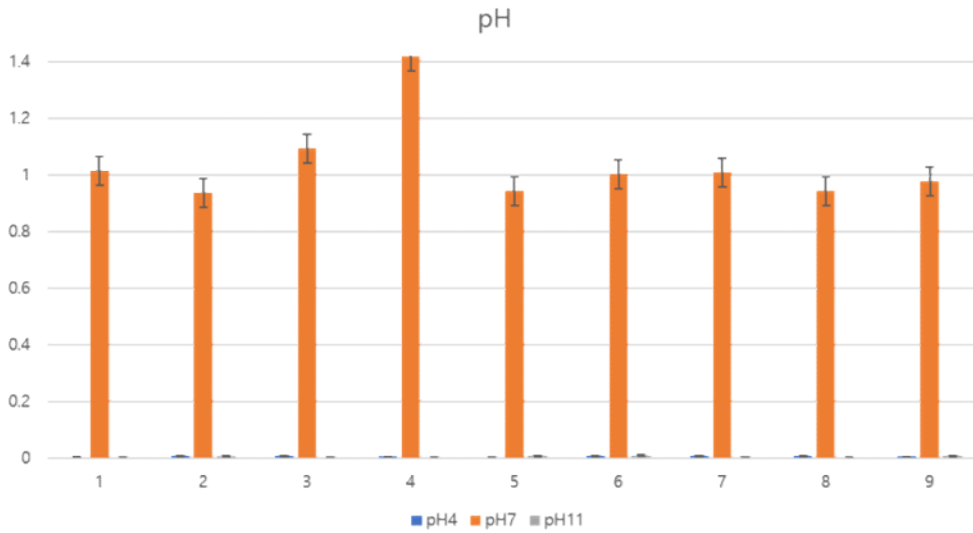


그림 69. pH별 성장 그래프.

### 5). 항생제 내성 조사

- 균주 별 항생제 내성 차이를 조사하기 위해 Streptomycin 10, 25, 300ug, Kanamycin 5, 30ug 디스크를 실험에 사용함.
- 전체적으로 농도가 높을수록 clear존이 커지는 것을 관찰함 (그림 70, 71).
- Streptomycin 디스크를 올린 배지에서는 1번 균주가 내성이 가장 낮았고, 4,7,8번 균주가 내성이 가장 높았음 (표 29).
- Kanamycin 디스크를 올린 배지에서는 1번 균주가 내성이 가장 낮았고, 4,6,7,8번 균주가 내성이 가장 높았음 (표 30).
- 두 항생제의 농도별 내성 조사한 결과를 다변량 분산분석을 통해 확인했을 때, 상관관계가 유의함으로 확인됨. (표 31, 32).

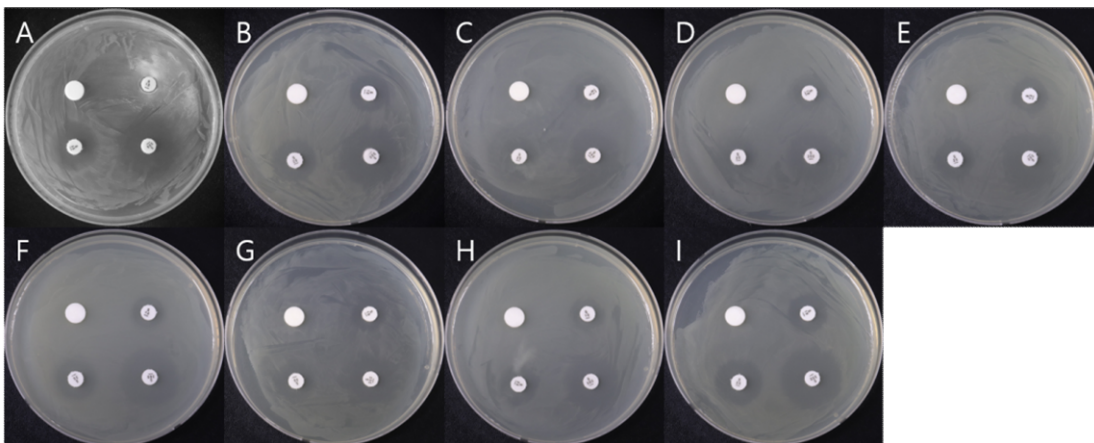


그림 70. 항생제 test 실험 결과(A. 1번 균주, B. 2번 균주, C. 3번 균주, D. 4번 균주, E. 5번 균주, F. 6번 균주, G. 7번 균주, H. 8번 균주, I. 9번 균주).

표 29. Clear존 직경 크기

no.	10 $\mu$ g	25 $\mu$ g	300 $\mu$ g
1	17.6 $\pm$ 0.26	19.59 $\pm$ 0.11	26.07 $\pm$ 0.64
2	14.79 $\pm$ 0.29	15.34 $\pm$ 0.86	20.79 $\pm$ 0.86

3	12.47±1.35	15.03±0.72	21.03±1.28
4	12.22±0.51	15.62±0.4	18.98±0.41
5	13.45±0.36	15.63±0.37	21.06±1.28
6	11.23±0.47	14.78±0.23	22.44±0.29
7	12.21±0.69	14.82±0.63	17.43±0.29
8	11.7±0.17	14.75±0.16	18.76±1.93
9	15.13±0.16	17.52±0.17	23.07±0.75

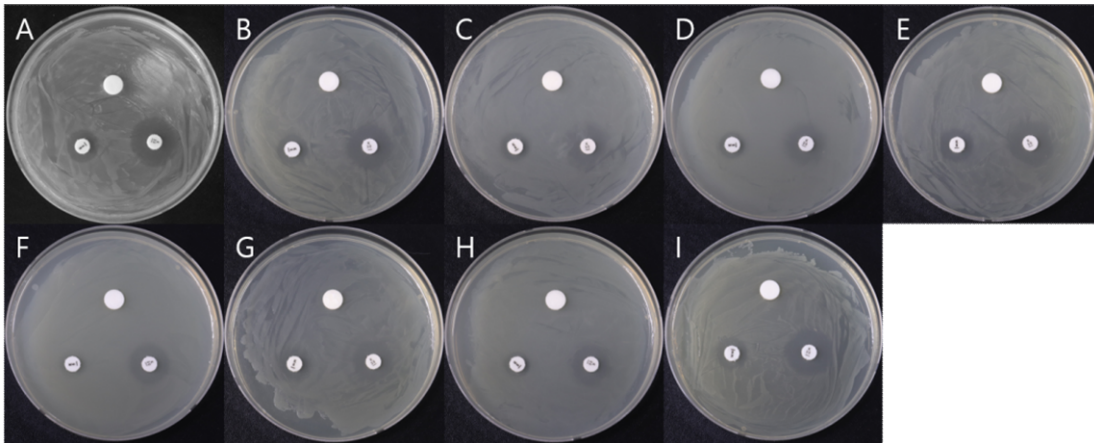


그림 71. Kanamycin 항생제 test 실험 결과(A. 1번 균주, B. 2번 균주, C. 3번 균주, D. 4번 균주, E. 5번 균주, F. 6번 균주, G. 7번 균주, H. 8번 균주, I. 9번 균주).

표 30. Clear존 직경 크기

균주 no.	5 $\mu$ g	30 $\mu$ g
1	14.37±0.15	19.77±0.15
2	11.08±0.21	16.36±0.4
3	10.7±0.42	18.02±0.17
4	9.5±0.34	15.5±0.2
5	12.41±0.42	16.84±0.13
6	9.26±0.2	14.83±0.22
7	10.45±0.36	14.82±0.31
8	9.6±0.22	14.82±0.28
9	11.6±0.05	17.24±0.39

표 31. Streptomycin 다변량 분산분석

		상관관계		
		25 $\mu$ g	10 $\mu$ g	300 $\mu$ g
25 $\mu$ g	Pearson 상관	1	.908**	.814**
	유의확률 (양측)		<.001	.008
	N	9	9	9
10 $\mu$ g	Pearson 상관	.908**	1	.746*
	유의확률 (양측)	<.001		.021
	N	9	9	9
300 $\mu$ g	Pearson 상관	.814**	.746*	1
	유의확률 (양측)	.008	.021	
	N	9	9	9

\*\* . 상관관계가 0.01 수준에서 유의합니다(양측).  
 \* . 상관관계가 0.05 수준에서 유의합니다(양측).

표 32. Kanamycin 다변량 분산분석

		상관관계	
		5 $\mu$ g	30 $\mu$ g
5 $\mu$ g	Pearson 상관	1	.863**
	유의확률 (양측)		.003
30 $\mu$ g	Pearson 상관	.863**	1
	유의확률 (양측)	.003	
N		9	9

\*\* . 상관관계가 0.01 수준에서 유의합니다(양측).

### 6). Biofilm 형성 능력 조사

- 균주 별 biofilm 형성 능력을 관찰하기 위해 crystal violet assay를 사용하였음.
- 24시간 배양한 균주들을 O.D 1.14 에 맞춰서 100 $\mu$ l씩 분주함. 그대로 25 $^{\circ}$ C에서 48시간 정지 배양함. 배양 후 균을 버리고 D.W로 2회 세척 한 뒤 0.1% crystal violet 125 $\mu$ l씩 분주 후 10-15 min 반응시킴. D.W로 3회 세척 한 뒤 물기를 충분히 제거 후 실온에서 자연 건조함. 건조 시킨 well에 30% Acetic acid 125 $\mu$ l씩 분주하고 10-15 min 반응시킴. 새로운 well로 옮긴 뒤 흡광도 측정함(600nm)(그림 72).
- 결과적으로 균주별 큰 차이는 없었지만, 2번 균주가 가장 형성 능력이 좋았음 (그림 73).



그림 72. Crystal violet 결과 사진.

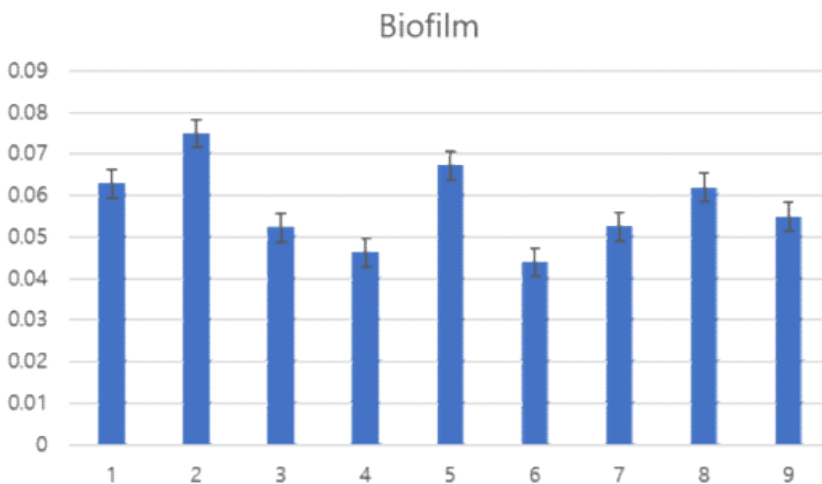


그림 73. Biofilm 형성 실험 결과 그래프.

### 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

#### 가. 연구수행 결과

##### (1) 정성적 연구개발성과

---

###### <제노믹베이스>

- 과수화상병 유전자 변이형 분석기술 개발을 위해 2015년부터 2022년까지 국내외에서 분리한 과수화상병 554개 분리주를 대상으로 유전체 분석을 수행하였으며, SNP 마커를 이용한 유연관계 분석을 이용하여 분자 역학조사를 수행하였음
- 분석에 사용한 과수화상병 분리주는 국내 분리주 535개와 국외 분리주 19개 총 554개 분리주를 대상으로 수행하였으며, 이를 이용하여 genome-wide SNP 마커를 선별하여 유연관계 분석을 이용한 역학조사를 수행하였음.
- 과수화상병 genome-wide SNP를 이용한 역학조사는 대량의 유전체 정보를 기반으로한 분석기술이기 때문에 보다 효과적인 분석기술 개발을 위해 high-throughput genotyping 기술을 이용한 targeted sequencing을 이용한 지노타입핑 체계를 구축하였음.

###### <단국대학교>

- 과수화상병균 VNTR 유전형 30 균주에 대하여 저온 중온 고온 및 산성 중성 알칼리성 pH조건, 7가지 세포외효소 활성여부, 20가지 기질 이용 능력, 생물막 형성 능력, 사과 배에 대한 병원성 정도, streptomycin 항생제 민감도 등 정보를 파악함.
- 과수화상병균 SNP 유전형 10 균주에 대하여 과수화상병균 SNP 유전형 30 균주에 대하여 온도, pH, 세포외효소 7가지, 생물막 형성 능력, 사과에 대한 병원성 정도, 항생제 민감도 등 정보를 파악함.
- 해외유래 과수화상병균 10 균주에 대하여 온도, pH, 세포외효소 7가지, 생물막 형성 능력, 사과 배 병원성 정도, 항생제 민감도 등 정보를 파악함.
- 가지검은마름병균 9 균주에 대하여 온도, pH, 세포외효소 7가지, 생물막 형성 능력, 사과에 병원성 정도, 항생제 민감도 등 정보를 파악함.

###### <농림축산검역본부>

- 국내 2015년부터 2022년까지 과수화상병 발생지역에서 분리주들을 분리 배양을 수행하였음.
  - 과수화상병 분리주를 대상으로 gDNA를 분리하고, 기존 과수화상병 역학조사에 많이 사용하고 있는 VNTR 마커를 이용한 역학조사 분석을 수행하였음.
  - 과수화상병의 항생제 저항성 마커(스트렙토마이신) 검출을 위한 프라이머를 제작하여 국내 발생한 과수화상병 분리주를 대상으로 항생제 저항성 유무를 확인하였음.
-



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

성과목표												연구기반지표							
	지식 재산권			기술 실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용도		기타(타연구활용등)
	특허출원	특허등록	표준특허	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정채활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	20	20				20							20		20				
최종목표	1	1				1					2	1	1.5	12	2	1			
달성	1	1				-					1	-	1.5	12	2	-			
종료 1차연도							50												
종료 2차연도							50												
종료 3차연도							100												
종료 4차연도							100												
종료 5차연도							200												
소계							500												
합계	1	1				-	-				1	-	1.5	12	2	-			

(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	Genomic fingerprinting of <i>Erwinia amylovora</i> strains responsible for a fire blight outbreak in Korea	Plant Disease	송주연	-	미국	American Phytopathological Society	SCI	2021년	-	30%

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2 <sup>nd</sup> ISFB 2019(International symposium on Fire Blight of Rosaceous plants)	남문 외 7명	2019.06.17.-21.	Traverse City	USA
2	2020한국환경생물학회 춘계학술대회	남문 외 4명	2020.07.10	대전	한국
3	2020한국환경생물학회 춘계학술대회	김성환 외 1명	2020.07.10	대전	한국
4	2021년 한국식물생명공학회 정기학술발표회 및 총회	남문 외 5명	2021.08.12.-14.	라마다 프라자 제주	대한민국
5	2021년 (사)한국균학회 춘계학술대회 및 임시총회	노형진 외 2명	2021.05.19.-21.	부산백스코	대한민국
6	2022년 한국식물병리학회 춘계학술대회	남문 외 3명	2022.04.20.-22.	변산 소노벨	대한민국
7	2022년 한국식물병리학회 춘계학술대회	이성진 외 6명	2022.04.20.-22.	변산 소노벨	대한민국
8	2021년 한국식물병리학회 추계학술대회	이성진 외 1명	2021.11.10.-12.	온라인	대한민국
9	2022년 한국균학회 창립50주년기념 춘계국제학술대회	김성환 외 4명	2022.04.27.-29.	제주 국제컨벤션센터	대한민국
10	2023 한국식물병리학회 춘계학술대회	남문 외 5명	2023.04.27.-28.	경주 라한셀렉트	대한민국
11	The Canadian Tri-Society Meeting	김성환 외 3명	2023.6.17.-21.	오타와	캐나다
12	2023년 한국식물병리학회 추계국제학술대회	김성환 외 4명	2023.10.17.-20.	제주휘닉스	대한민국

□ 기술 요약 정보

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

□ 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

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

[기술적 성과]

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

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	어위니아 아밀로보라와 어위니아 피리폴리아의 신속 동시 검출용 마커 조성물	대한민국	남문외 6명	2021.08.02.	10-2021-0101357	-	-	-	-	100	-
2	어위니아 아밀로보라와 어위니아 피리폴리아의 신속 동시 검출용 마커 조성물	대한민국	-	-	-	-	남문외 6명	2021.10.21	10-2318379	100	-

○ 지식재산권 활용 유형

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

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

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

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

표준화

○ 국내표준

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

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

\* 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.

\* 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제표준

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

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

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

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

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

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

□ 기술 실시(이전)

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

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

\* 1) 기술이전 또는 자기실시

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

\* 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

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

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과				
사업화 계획	사업화 소요기간(년)			
	소요예산(천원)			
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후
		단위(%)	현재까지	3년 후
	시장 점유율	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
			yyyy년	yyyy년	
합계					

□ 고용 효과

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

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

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

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

□ 기술 무역

(단위: 천원)

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

[사회적 성과]

□ 법령 반영

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

□ 정책활용 내용

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



설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

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

전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	-	2020		1				1		1			
2	-	2020	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
					1			1		1			

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)

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

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

-해당사항 없음

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

-해당사항 없음

<참고 1> 연구성과 실적 증빙자료 예시

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), <u>품종인 경우 품종보호권 등록증 또는 생산·판매 신고증명서</u>
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 단백질정보, 유전자(DNA)칩·단백질칩 등 발현체 정보 및 그 밖의 생명정보
	소프트웨어	창작된 소프트웨어 및 등록에 필요한 관련 정보
기탁	표준	「국가표준기본법」 제3조에 따른 국가표준, 국제표준으로 채택된 공식 표준정보[소관 기술위원회 를 포함한 공식 국제표준화기구(ISO, IEC, ITU)가 공인한 단체 또는 사실표준화기구에서 채택한 표준정보를 포함한다]
	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(%)
○ 과수화상병균 정밀 예찰 매뉴얼 개발 완료 및 지속적인 정밀 예찰 활동 진행	○ 과수화상병균 정밀 예찰을 위해 국내 과수화상병 분리주 535개와 국외 분리주 19개 총 554개 분리주를 대상으로 유전체 분석을 수행하였으며, 이를 기반으로 genome-wide SNP 마커를 선별하여 유연관계 분석을 기반으로 정밀 예찰 활동을 진행하였음. ○ 과수화상병의 SNP 마커 정보를 이용하여 국내 분리주들은 북미나 캐나다 분리주들과 유전적으로 매우 가까운 것을 확인하였으며, 국내 분리주들이 유전적으로 매우 가까운 것을 확	100%

	<p>인하여 국외에서 지속적으로 국내에 유입되는 것이 아닌 2015년 이전에 우연한 기회에 유입된 후 인근 지역으로 확산하는 경향을 확인하였음.</p>	
<p>○ 과수 화상병균의 국내 확산 경로 추적을 위한 Genome-wide SNP 마커를 이용한 유전자 변이형 추적 기술 개발</p>	<p>○ 과수화상병균 WGS(whole genome sequencing) 분석을 통해 선발한 genome-wide SNP 마커 세트를 이용하여 유전자 기반의 haplotype 마커를 제작하였으며, 최종 선발한 SNP 마커를 hybrid bate로 제작하여 targeted sequencing 을 이용한 유전자 변이형 추적 기술을 개발함</p>	100%
<p>○ 국내 발생 과수화상병원균 유전 type 형에 대한 생리생화학 정보 기반 마련</p>	<p>○ 과수화상병균 VNTR 유전형 30 균주에 대하여 저온 중온 고온 및 산성 중성 알카리성 pH조건, 7가지 세포외효소 활성여부, 20가지 기질 이용 능력, 생물막 형성 능력, 사과 배에 대한 병원성 정도, streptomycin 항생제 민감도 등 정보를 파악함.</p> <p>○ 과수화상병균 SNP 유전형 10 균주에 대하여 저온 중온 고온 및 산성 중성 알카리성 pH조건, 7가지 세포외효소 활성여부, 20가지 기질 이용 능력, 생물막 형성 능력, 사과 배에 대한 병원성 정도, streptomycin 항생제 민감도 등 정보를 파악함.</p> <p>○ 해외유래 과수화상병균 10 균주에 대하여 온도, pH, 세포외효소 7가지, 생물막 형성 능력, 사과 배 병원성 정도, 항생제 민감도 등 정보를 파악함.</p> <p>○ 가지검은마름병균 9 균주에 대하여 온도, pH, 세포외효소 7가지, 생물막 형성 능력, 사과에 병원성 정도, 항생제 민감도 등 정보를 파악함.</p>	100%

#### 4. 목표 미달 시 원인분석

##### 1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

---



---

##### 2) 자체 보완활동

---



---

### 3) 연구개발 과정의 성실성

---

## 5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

---

- 과수화상병은 세계적으로도 매우 중요한 병원균에 속하여 과수 농가에 막대한 피해를 유도함.
  - 따라서 과수화상병균의 발생 경로 추적에 대한 연구가 세계적으로 많이 이루어지고 있음.
  - 대부분 국가간 확산 경로에 대한 연구가 주로 이루어지고 있으며, 이는 대부분 과수화상병 게놈 내 존재하는 microsatellite 기반의 VNTR 마커 혹은 CRISPR 마커를 이용하여 유연관계 분석을 기반으로하는 역학조사를 위한 연구가 수행되고 있음.
  - Microsatellite 기반의 역학조사 분석은 분리주간 변이를 추적하기에는 분석 해상도가 낮아 국내 과수화상병 분리주의 확산 경로 추적에는 한계가 있음.
  - 따라서, 본 과제의 과수화상병 역학조사를 위한 genome-wide SNP 마커를 이용한 연구는 관련 분야에서 매우 중요한 시도이며 중요한 의미를 갖는다고 생각함.
- 

## 6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

---

- 과수화상병의 genome-wide SNP 마커 정보를 이용한 역학조사 분석 체계를 더욱 효과적으로 활용하기 위해 target SNP 마커 부위를 선택적으로 시퀀싱할 수 있는 hybrid bates를 제작하여 targeted 시퀀싱 방법을 구축하였음.
  - NGS를 이용한 시퀀싱 방법은 일반적으로 시간과 비용이 많이 들어가지만 targeted 시퀀싱 방법을 통해 과수화상병 분리주 전체 게놈을 시퀀싱 하지 않고 특정 마커 부위한 시퀀싱을 진행 함으로써 시간과 분석 비용을 낮출수 있음.
  - 최종적으로 구축한 과수화상병 역학조사를 위한 hybrid bates는 향후 지속적인 과수화상병 분리주의 모니터링에 활용성을 높일 수 있을 것으로 여겨짐.
  - 국내 발생 과수화상병원균 유전 type 형에 대하여 얻어진 생리 생화학 정보를 바탕으로 과수화상병과 가지검은마름병의 방제에 스트렙토마이신과 가스가마이신의 활용이 가능하여 향 후 약제저항성 균주의 모니터링에 활용하고자함.
  - 과수화상병원균 여러 유전형의 생리생학적 정보를 국내학술지의 논문 간행에 활용할 예정임.
-

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1. 공통 요구자료	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서
	3) 연구부정행위 예방 확인서

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발 연구개발사업 과수화상병 유전자 변이형 분석기술 개발 및 현장 실증 연구개발과제 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부(농림식품기술기획평가원 전문기관)에서 시행한 농생명산업기술개발 연구개발사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.



## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

		과제번호			
사업구분	농생명산업기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	농생명산업기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	과수화상병 유전자 변이형 분석기술 개발 및 현장 실증			과제유형	(개발)
연구개발기관	(주)제노믹베이스			연구책임자	남문
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2018. 12. 03. - 2019. 09. 02	75,000	15,000	90,000
	2차년도	2019. 09. 03. - 2020. 09. 02	100,000	21,700	121,700
	3차년도	2020. 09. 03. - 2021. 09. 02	100,000	21,700	121,700
	4차년도	2021. 09. 03. - 2022. 09. 02	100,000	21,700	121,700
	5차년도	2022. 09. 03. - 2023. 09. 02	100,000	18,500	118,500
	계	2018. 12. 03. - 2023. 09. 02	0	98,000	573,600
참여기업	(주)제노믹베이스				
상대국				상대국연구개발기관	

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2023.11.01

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)제노믹베이스	이사	남문

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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 과제는 2015년부터 2022년까지 국내외에서 분리한 554개의 과수 화상병균 분리주를 대상으로 게놈 정보를 이용하여 분자역학조사를 위한 분석 체계를 구축하였음.
- 전 세계적으로 과수화상병의 역학조사를 위해서 기본적으로 microsatellite 기반의 VNTR 마커를 주로 사용하고있음. 하지만 국내 분리주의 경우 유전적으로 매우 가까워 VNTR 마커를 이용한 분석에 한계가 있음.
- 본 과제는 genome-wide SNP를 이용하여 더욱 해상도(resolution)가 높은 마커를 사용함으로써 지역간, 그리고 연도별 유연관계분석을 통해 역학조사 분석 체계를 구축하였음
- 또한, 대량의 SNP 마커를 이용한 유연관계분석의 활용성을 높이기 위해 게놈 내 특정 부위만을 선택적으로 시퀀싱할 수 있는 targeted sequencing 기법을 이용하였으며 hybrid bate를 제작하여 대량의 SNP 마커를 빠르고 저렴하게 지노타입핑 할 수 있는 체계를 구축하였음.

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (우수)

- 2015년 국내 과수화상병이 과수 농가에 발생한 이후 최근까지도 지속해서 농가에 큰 피해를 주고 있음.
- 과수화상병 발생의 효과적인 관리를 위해서는 신속 정확한 진단과 분자역학조사 체계 구축이 무엇보다 필요함. 정확한 역학조사를 통해 과수화상병의 확산 경로를 추적함으로써 피해 확산을 억제할 수 있음.
- 
- 본 과제를 통해 2015년부터 2022년까지 국내에서 발생한 과수화상병균 분리주 535개에 대한 전체 염기서열 정보를 확인하였으며, 이러한 정보를 이용하여 지역간, 연도별 과수화상병균의 변이 정도를 추적할 수 있는 분석 체계를 구축하였음.
- 향후에도 지속적으로 과수화상병 분리주에 대한 유전체 정보를 축적 및 분석을 수행하면 과수화상병 분리주들의 확산 경로, 변이에 따른 다양한 생물학적 특성 변화 등에 대한 모니터링을 수행할 수 있을 것임.

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (우수)

- 과수화상병의 genome-wide SNP 마커 정보를 이용한 역학조사 분석 체계를 더욱 효과적으로 활용하기위해 target SNP 마커 부위를 선택적으로 시퀀싱할 수 있는 hybrid bate를 제작하여 targeted 시퀀싱 방법을 구축하였음.
- NGS를 이용한 시퀀싱 방법은 일반적으로 시간과 비용이 많이 들어가지만 targeted 시퀀싱 방법을 통해 과수화상병 분리주 전체 게놈을 시퀀싱 하지 않고 특정 마커 부위한 시퀀싱을 진행 함으로써 시간과 분석 비용을 낮출수 있음.
- 최종적으로 구축한 과수화상병 역학조사를 위한 hybrid bate는 향후 지속적인 과수화상병 분리주의 모니터링에 활용성을 높일수 있을것으로 여겨짐.

#### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (우수)

- 본 과제는 과수화상병 2015년 분리주(4개)를 포함하여 2017년 분리주 64개, 2018년 분리주 42개, 2019년 분리주 261개, 2020년 분리주 31개, 2021년 분리주 72개, 2022년 분리주 60개 등 매년 국내에서 발병하는 과수화상병균을 분리하게 WGS(whole genome sequencing)을 기반으로 전체염기서열정보를 축적하고, 이를 이용한 분석을 수행하였음.
- 총 554개의 과수화상병 분리주를 대상으로 게놈 염기서열을 데이터베이스화 하였고, 이러한 정보는 향후 과수화상병의 역학조사 뿐아니라 진단, 방제, 생물학적특성 분석 등 다양한 연구의 기초 데이터로 활용할수 있음.
- 또한 국내 발생 과수화상병원균 유전 type 형에 대하여 생리 생화학 정보 분석을 수행하여 이러한 정보를 바탕으로 과수화상병과 가지검은마름병의 방제에 스트렙토마이신과 가스가마이신의 활용이 가능하여 향 후 약제저항성 균주의 모니터링에 활용하고자함.

#### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (우수)

- 본 과제의 연구개발성과로 국내외 학회에 참석하여 총 12편의 포스터를 통해 국내외 전문가들과 연구결과를 공유하였으며, 2018년에는 3차례에 걸쳐 농식품부, 농진청, 검역본부, 농기평, 지노타입(주) 등이 참석한 ‘과수화상병 대응 R&D 기획 회의’에 참석하여 본 과제 진행상황을 발표하고 이를 이용한 향후 활용 방안에 대한 미팅을 참여하였음.
- 본 과제의 지적소유권 목표는 출원 1건, 등록 1건이 계획되어 있었으며, 특허 출원 후, 특허 등록 심사 결과에 따라 의견서 및 보정서를 제출하여 현재 다시 심사 단계에 있음. 심사의견을 대부분 반영하여 보정하였으므로 수개월 이내에 등록이 완료될 것으로 기대함.
- 본 과제의 논문 목표는 SCI 3편으로 계획되어 있었으며, 2편은 과수화상병균의 유전체 정보 분석을 내용으로 작성하고 1편은 과수화상병균의 진단 kit 개발 및 평가로 계획하였음. 하지만 화상병균 발병시기 특성상 2018년 균주들 수집, 유전체 분석과 진단 kit에 대한 평가가 늦어져 논문 작성이 함께 지연되었음. 현재 모두 작성 또는 투고 전에 있으므로 2019년 상반기 이내에 심사를 받을 예정임.

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
○ 과수화상병균 정밀 예찰 매뉴얼 개발 완료 및 지속적인 정밀 예찰 활동 진행	40	40	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 과수화상병균 정밀 예찰을 위해 국내 과수화상병 분리주 535개와 국외 분리주 19개 총 554개 분리주를 대상으로 유전체 분석을 수행하였으며, 이를 기반으로 genome-wide SNP 마커를 선별하여 유연관계 분석을 기반으로 정밀 예찰 활동을 진행하였음.</li> <li>○ 과수화상병의 SNP 마커 정보를 이용하여 국내 분리주들은 북미나 캐나다 분리주들과 유전적으로 매우 가까운 것을 확인하였으며, 국내 분리주들이 유전적으로 매우 가까운 것을 확인하여 국외에서 지속적으로 국내에 유입되는 것이 아닌 2015년 이전에 우연한 기회에 유입된 후 인근 지역으로 확산하는 경향을 확인하였음.</li> </ul>
○ 과수 화상병균의 국내 확산 경로 추적을 위한 Genome-wide SNP 마커를 이용한 유전자 변이형 추적 기술 개발	40	40	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 과수화상병균 WGS(whole genome sequencing) 분석을 통해 선별한 genome-wide SNP 마커 세트를 이용하여 유전자 기반의 haplotype 마커를 제작하였으며, 최종 선별한 SNP 마커를 hybrid bate로 제작하여 targeted sequencing을 이용한 유전자 변이형 추적 기술을 개발함</li> </ul>
○ 국내 발생 과수화상병원균 유전 type 형에 대한 생리생화학 정보 기반 마련	20	20	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 과수화상병균 VNTR 유전형 30 균주에 대하여 저온 증온 고온 및 산성 중성 알카리성 pH조건, 7가지 세포외효소 활성여부, 20가지 기질 이용능력, 생물막 형성 능력, 사과 배에 대한 병원성 정도, streptomycin 항생제 민감도 등 정보를 파악함.</li> <li>- 과수화상병균 SNP 유전형 10 균주에 대하여 저온 증온 고온 및 산성 중성 알카리성 pH조건, 7가지 세포외효소 활성여부, 20가지 기질 이용능력, 생물막 형성 능력, 사과 배에 대한 병원성 정도, streptomycin 항생제 민감도 등 정보를 파악함.</li> <li>- 해외유래 과수화상병균 10 균주에 대하여 온도, pH, 세포외효소 7가지, 생물막 형성 능력, 사과 배 병원성 정도, 항생제 민감도 등 정보를 파악함.</li> <li>- 가지검은마름병균 9 균주에 대하여 온도, pH, 세포외효소 7가지, 생물막 형성 능력, 사과에 병원성 정도, 항생제 민감도 등 정보를 파악함.</li> </ul>
합계	100점	100점	

### III. 종합의견

#### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 본 과제는 과수화상병 유전체 정보를 분석하여 분자역학 조사를 위한 마커 세트 개발을 완료하였음.
- 과수화상병 분리주를 대상으로 2015년 분리주(4개)를 포함하여 2017년 분리주 64개, 2018년 분리주 42개, 2019년 분리주 261개, 2020년 분리주 31개, 2021년 분리주 72개, 2022년 분리주 60개 등 매년 국내에서 발병하는 과수화상병균을 분리하게 WGS(whole genome sequencing)을 기반으로 전체염기서열정보를 추적하고, 이를 이용한 분석을 수행하였음.
- 국내외 총 554개의 과수화상병 분리주를 대상으로 게놈 염기서열을 데이터베이스화하였고, 최종 선발된 SNP 마커를 이용하여 신규로 과수화상병이 발생한 지역으로 역학조사를 수행하였음.
- 향후 지속적인 역학조사의 활용성을 높이기 위해 최종 선발된 SNP 마커를 targeted bate로 제작하여 targeted 시퀀싱을 이용한 역학조사 분석 체계를 확립하였음.
- 과수화상병 분리주들의 게놈 정보는 향후 과수화상병의 역학조사 뿐만아니라 진단, 방제, 생물학적특성 분석 등 다양한 연구의 기초 데이터로 활용할 수 있을 것으로 기대함.
- 또한, 국내 발생 과수화상병원균 유전 type 형에 대하여 생리 생화학 정보 분석을 수행하여 이러한 정보를 바탕으로 과수화상병과 가지검은마름병의 방제에 스트렙토마이신과 가스가마이신의 활용이 가능하여 향후 약제 저항성 균주의 모니터링에 활용 하고자함.

#### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 본 과제는 2018년 9월부터 시작하여 4년 9개월 동안 과제를 수행하였음. 해마다 국내에서 발생하는 화상병균을 수집하고 수집된 화상병균을 가지고 WGS(whole genome sequencing) 기반의 유전체 분석과 생화학적 특성 분석을 수행하였으며, 최종적으로 2022년 분리주를 포함한 분석 결과들이 최근에 완료되어 과제 결과에 대한 정성 연구 성과들이 조금씩 늦어졌음. 따라서 과제 수행 동안 정성적 목표들은 모두 완료를 하였지만 정량적 목표들이 조금 미흡한 결과가 나타났음. 미흡한 정성적 목표들은 빠른 시간 내에 모두 달성할 예정임.
- 본 과제를 통해 수행한 결과들이 연구 결과로만 머물지 않게 하기 위해 각 기관이 최선을 다해 수행하였으며, 과제 수행 결과인 과수화상병균 역학조사를 위한 targeted bate 마커 세트를 농림축산검역본부의 과수화상병 역학조사 현장에서 사용되어 질수 있도록 정책제안 등을 수행할 계획임.
- 지속적으로 본 과제를 통해 개발된 과수화상병균 역학조사 마커 kit의 활용도를 높이기 위한 행정적인 조치(정책제안) 등을 위해 노력할 것이며, 이후 본 과제 결과를 이어나갈 후속 과제들의 개발이 필요할 것으로 여겨짐.

### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 본 과제를 통해 2015년 이후부터 2022년까지 발병된 과수화상병균 분리주들의 유전체 정보를 수집하고 분석하였음. 과제를 통해 확보한 유전체 정보는 지속적으로 과수화상병균의 국내 이동 경로 파악 등 역학조사 분석에 매우 유용한 reference data로 활용할 계획임.
- 본 과제의 최종 개발 산물인 과수화상병균 역학조사를 위한 targeted bate 세트는 과수화상병균 분리주 약 500여개의 유전체 분석을 통해 선발한 마커이며, 향후 과수화상병균의 분자역학조사의 활용성을 높이기 위해 개발하였음.
- 과수화상병균 targeted bate 세트는 분자역학조사를 위해 WGS(whole genome sequencing)을 수행하지 않고 비용과 시간면에서 효과적인 targeted 시퀀싱 방법으로 역학조사를 수행할 수 있도록 하며, genome-wide SNP에 대한 정확한 지노타입핑을 통해 역학조사의 활용성을 높일 수 있음.
- 과수화상병균을 효과적으로 관리하기 위해서는 방제, 진단과 더불어 국내 발생하는 과수화상병균에 대한 변이 발생 유무 조사와 같은 지속적인 유전체 DB 축적이 매우 중요함.
- 따라서, 국내 발생하는 과수화상병균의 지속적인 모니터링을 위한 연구비 지원 등이 필요하다고 생각됨.

## IV. 보안성

### 검토

○ 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구개발기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

#### 1. 연구책임자의 의견

#### 2. 연구개발기관 자체의 검토결과



[별첨2]

## 연구성과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야		
연구과제명	과수화상병 유전자 변이형 분석기술 개발 및 현장 실증			
주관연구개발기관	제노믹베이스(주)		주관연구책임자	남문
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	475,000,000	98,600,000		573,600,000
연구개발기간	2018. 12. 03. - 2023. 09. 02 (4년 9개월)			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타(                      ) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:                      )			

### 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
①과수화상병균 정밀 예찰 매뉴얼 개발 및 지속적인 정밀 예찰 활동 진행	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 과수화상병균 정밀 예찰을 위해 국내 과수화상병 분리주 535개와 국외 분리주 19개 총 554개 분리주를 대상으로 유전체 분석을 수행하였으며, 이를 기반으로 genome-wide SNP 마커를 선별하여 유연관계 분석을 기반으로 정밀 예찰 활동을 진행하였음.</li> <li>- 과수화상병의 SNP 마커 정보를 이용하여 국내 분리주들은 북미나 캐나다 분리주들과 유전적으로 매우 가까운 것을 확인하였으며, 국내 분리주들이 유전적으로 매우 가까운 것을 확인하여 국외에서 지속적으로 국내에 유입되는 것이 아닌 2015년 이전에 우연한 기회에 유입된 후 인근 지역으로 확산하는 경향을 확인하였음.</li> </ul>
②과수 화상병균의 국내 확산 경로 추적을 위한 Genome-wide SNP 마커를 이용한 유전자 변이형 추적 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 과수화상병균 WGS(whole genome sequencing) 분석을 통해 선별한 genome-wide SNP 마커 세트를 이용하여 유전자 기반의 haplotype 마커를 제작하였으며, 최종 선별한 SNP 마커를 hybrid bate로 제작하여 targeted sequencing을 이용한 유전자 변이형 추적 기술을 개발함</li> </ul>
③국내 발생 과수화상병원균 유전 type 형에 대한 생리생화학 정보 기반 마련	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 과수화상병균 VNTR 유전형 30 균주에 대하여 저온 중온 고온 및 산성 중성 알카리성 pH조건, 7가지 세포외효소 활성여부, 20가지 기질 이용 능력, 생물막 형성 능력, 사과 배에 대한 병원성 정도, streptomycin 항생제 민감도 등 정보를 파악함.</li> <li>- 과수화상병균 SNP 유전형 10 균주에 대하여 저온 중온 고온 및 산성 중성 알카리성 pH조건, 7가지 세포외효소 활성여부, 20가지 기질 이용 능력, 생물막 형성 능력, 사과 배에 대한 병원성 정도, streptomycin 항생제 민감도 등 정보를 파악함.</li> <li>- 해외유래 과수화상병균 10 균주에 대하여 온도, pH, 세포외효소 7가지, 생물막 형성 능력, 사과 배 병원성 정도, 항생제 민감도 등 정보를 파악함.</li> <li>- 가지검은마름병균 9 균주에 대하여 온도, pH, 세포외효소 7가지, 생물막 형성 능력, 사과에 병원성 정도, 항생제 민감도 등 정보를 파악함.</li> </ul>

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 (타연구 활용비)	
	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	논 문				학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
													SCI	비 SCI						
단위	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	건	건			
가중치	20	20				20								20	20					
최종 목표	1	1				1						2	1	1.5	12	2	1			
당해 년도	목표					1								2						
	실적					1								3		-				
달성률 (%)						100								100						

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	Genome-wide SNP 마커를 이용한 과수화상병 역학조사 분석 체계 구축
②	게놈 내 특정 마커를 선택적으로 확인할 수 있는 Hybrid bate 기반의 targeted sequencing 분석 기술

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	

\* 각 해당란에 v 표시



8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 <sup>1)</sup>			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간		실용화예상시기 <sup>3)</sup>	
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>			

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리  
 통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

## 연구진실성 관련 연구부정행위 예방을 위한 확인서

※ 주관·공동·위탁과제별로 연구책임자가 자체 점검 후 작성·제출

구분	번호	내용	예	아니오
위조	1	연구 수행 전과정에서 존재하지 않는 데이터 또는 결과 등을 거짓으로 만들거나 기록한 사실이 없는가?	<input type="radio"/>	
	2	연구수행 과정에서 데이터 또는 결과 등을 임의적으로 사실과 다르게 변형, 삭제, 왜곡하여 기록한 사실이 없는가?	<input type="radio"/>	
표절	3	이미 발표된 타인의 독창적인 아이디어나 연구성과물을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	4	일반적 지식이 아닌 타인의 독창적인 개념, 용어, 문장, 표현, 그림, 표, 사진, 영상, 데이터 등을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	5	타인의 연구성과물을 그대로 쓰지 않고 풀어쓰기(paraphrasing) 또는 요약(summarizing)을 하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	6	외국어 논문이나 저서를 번역하여 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	7	2차 문헌을 활용하면서 재인용 표기를 하지 않고 직접 원문을 본 것처럼 1차 문헌에 대해서만 출처를 표기한 적이 없는가?	<input type="radio"/>	
	8	출처 표기를 제대로 했으나, 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	<input type="radio"/>	
	9	타인의 저작물을 여러 번 인용한 경우 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처를 표기하였는가?	<input type="radio"/>	
	10	타인의 저작물을 직접 인용 할 경우, 적절한 인용 표기를 했는가?	<input type="radio"/>	
부당한 저자 표기	11	연구에 지적 기여를 한 연구자에게 저자의 자격을 부여하였는가?	<input type="radio"/>	
	12	연구에 지적 기여를 하지 않은 연구자에게는 저자의 자격을 제외하였는가?	<input type="radio"/>	
	13	저자들의 표기 순서와 연구 기여도가 일치하는가?	<input type="radio"/>	
부당한 중복 게재	14	자신의 이전 저작물을 활용하면서 적절한 출처 표기를 하였는가?	<input type="radio"/>	
	15	자신의 이전 저작물을 여러 번 활용하면서 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처 표기를 하였는가?	<input type="radio"/>	
	16	자신의 이전 저작물을 활용하면서 출처 표기를 제대로 했으나 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	<input type="radio"/>	

점검결과를 위와 같이 연구윤리 위반 사항이 없음을 확인하며, 위반사실이 확인될 경우 「국가연구개발혁신법」 제32조1항에 따라 참여제한, 연구비 환수 등 처분을 받게 됨을 인지하고 아래와 같이 서명합니다.

2023. 11. 01.

기관명 : 제노믹베이스(주)

점검자 : 남 문



농림식품기술기획평가원장 귀하