

RS-2021  
-IP3211  
06

구근 화훼류에 발생하는 바이러스 동정 및 통합 진단 시스템 개발

2024

농림축산식품부  
농림식품기술기획평가원

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( O ), 비공개( ) 발간등록번호( O )  
작물바이러스및병해충대응사업 2023년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004601-01

# 구근 화훼류에 발생하는 바이러스 동정 및 통합 진단시스템 개발

2024.06.12.

주관연구기관 / 경북대학교

공동연구기관 / 강원대학교

(주) 씨더스

(주) 포스트바이오

농림축산식품부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

## 제 출 문

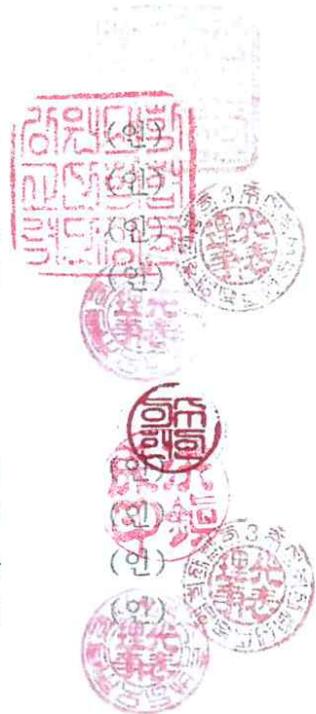
농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "구근 화훼류에 발생하는 바이러스 동정 및 통합 진단시스템 개발"  
(개발기간 : 2021. 04. ~ 2023. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2024. 06. 12.

주관연구기관명 : 경북대학교 산학협력단 (대표자) 공성호  
공동연구기관명 : 강원대학교 산학협력단 (대표자) 장철성  
공동연구기관명 : (주) 씨더스 (대표자) 조성환  
공동연구기관명 : (주) 포스트바이오 (대표자) 천두성

주관연구책임자 : 이 수 헌  
공동연구책임자 : 홍 진 성  
공동연구책임자 : 조 성 환  
공동연구책임자 : 천 두 성



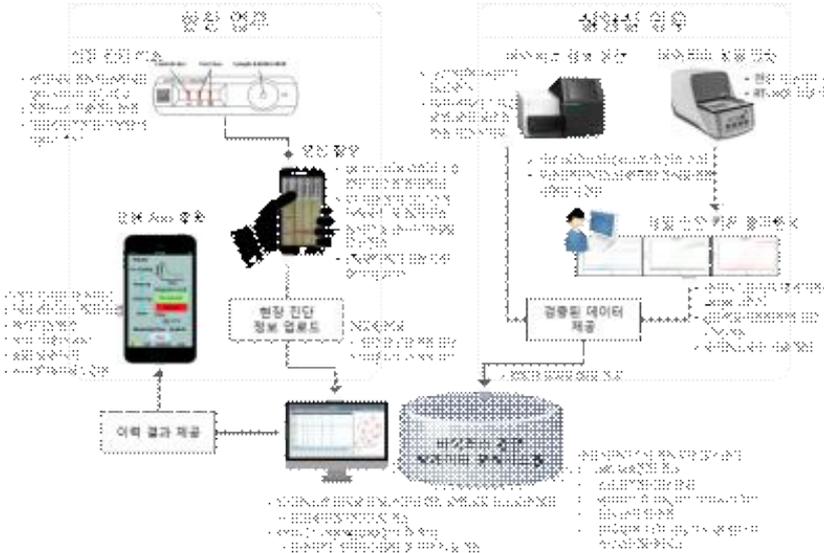
국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## < 요약 문 >

사업명		작물바이러스 및 병해충대응사업		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
내역사업명 (해당 시 작성)		진단기술 사업화		연구개발과제번호		321106-3	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB0301	60%	LB0304	20%	LB0204	20%
	농림식품 과학기술분류	RA0301	80%	RA0304	10%	RA0399	10%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명		구근 화훼류에 발생하는 바이러스 동정 및 통합 진단시스템 개발					
전체 연구개발기간		2021. 04. 01 - 2023. 12. 31(2년 9개월)					
해당단계		2단계					
해당연도		2023. 01. 01 - 2023. 12. 31(1년)					
총 연구개발비		총 1,069,000천원 (정부지원연구개발비: 935,000천원, 기관부담연구개발비: 134,000천원)					
해당단계		총 389,400천원 (정부지원연구개발비: 340,000천원, 기관부담연구개발비 : 49,400천원)					
해당연도		총 389,400천원 (정부지원연구개발비: 340,000천원, 기관부담연구개발비 : 49,400천원)					
연구개발단계		기초[ <input checked="" type="checkbox"/> ] 응용[ <input type="checkbox"/> ] 개발[ <input checked="" type="checkbox"/> ] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ <input type="checkbox"/> ]		기술성숙도 (해당 시 작성)		착수시점 기준(30) 종료시점 목표(90)	
연구개발과제 유형		지정공모(연구 단계)					
연구개발과제 특성							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	<p><b>구근 화훼류에 발생하는 바이러스 동정 및 진단법 정립을 통한 바이러스 통합 진단시스템 구축</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>□ 구근 화훼류(튤립, 수선화, 백합, 글라디올러스 등)에 발생하는 바이러스의 동정 및 진단기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 백합, 글라디올러스, 튤립, 수선화 등 4종 이상의 구근류에 발생하는 바이러스를 동정하고, 분자생물학적 특성을 구명하여 유전자 정밀진단법과 현장현시 진단을 위한 신속진단키트를 개발함</li> <li>○ 구근류에서 검출된 바이러스의 염기서열 정보를 결정하여 확장 기술을 개발함</li> <li>○ 개발된 유전자 정밀진단법과 신속진단키트는 외부 인증기관을 통하여 실증(민감도, 특이도 90% 이상)</li> </ul> </li> <li>□ 구근 화훼류에서 발생하는 바이러스 통합 진단시스템 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 백합, 글라디올러스, 튤립, 수선화 등 4종 이상의 구근류에서 검출된 바이러스의 종류와 감염실태 자료를 근거하여 구근별 바이러스 위험 순위를 분류함</li> <li>○ 구근류에서 바이러스의 조직별 및 시기별 검출양상을 분석하여 구근류 바이러스의 통합 진단시스템 구축을 위한 채집방법을 표준화함</li> <li>○ 4종 이상의 구근류에서 RT-PCR을 이용한 유전자 정성 및 정량 정밀진단법, 개별 및 다중진단법, 현장 신속진단키트를 활용한 작물별로 통합 진단시스템을 구축함</li> <li>○ 구근 화훼류 바이러스 진단 결과와 작물의 다양한 정보를 ICT 기술과 접목하며, 스마트폰에서 직접 확인이 가능한 APP를 개발함</li> <li>○ 구근 화훼류 작물의 육안적 특성, 종합적 바이러스 진단 결과, 감염 바이러스의 염기서열 정보 등을 기반으로 하는 Big Data 및 분석시스템을 개발함</li> </ul> </li> </ul>					

전체 내용

- 구근 화훼류(튤립, 수선화, 백합, 글라디올러스 등)에 발생하는 바이러스의 동정 및 진단기술 개발
  - 유전자진단법 및 전사체 분석을 이용한 작물별 감염 바이러스의 종류 규명 및 진단기술 개발
  - 검출된 바이러스의 다양한 변종 염기서열 및 항원 확보
  - 항체 생산을 통한 현장현시 진단을 위한 신속진단키트의 개발
  - 백합, 글라디올러스, 튤립, 수선화 등의 구근류에서 검출된 3종 이상의 바이러스에 대하여 개별 유전자 진단법 개발
  - 바이러스 염기서열 분석을 통한 확진 기술 개발
  - 외부 인증기관을 통한 개발된 진단법 실증(민감도, 특이도 90% 이상)
- 구근 화훼류에서 발생하는 바이러스 통합 진단시스템 개발
  - 백합, 글라디올러스, 튤립, 수선화 등의 구근류 바이러스 발생 실태 분석을 통한 위험 순위 분류
  - 구근류 조직 및 시기별 진단 특성 분석으로 채집방법의 표준화
  - 백합, 글라디올러스, 튤립, 수선화 등의 구근류 바이러스의 작물별 통합 진단시스템 구축
  - 바이러스 진단의 결과 및 평가에 대한 ICT 기술 접목
  - 스마트폰에서 직접 확인 가능한 APP 개발
  - 구근 화훼류 바이러스 진단을 위한 Big Data 및 분석시스템 개발



< 연구과제 주요 내용 및 추진흐름도 >

- 구근 화훼류(튤립, 수선화, 백합, 글라디올러스 등)에 발생하는 바이러스의 동정 및 진단기술 개발
- 구근 화훼류에서 발생하는 바이러스 통합 진단시스템 개발

1단계  
(2021-2022)

목표

- 구근 화훼류 바이러스 동정 및 유전자진단법 개발
  - 튤립, 수선화, 백합, 글라디올러스 등 바이러스 감염 시료 채집
  - 유전자진단법(RT-PCR)을 이용한 바이러스 동정
  - 작물별 전사체 분석을 통한 바이러스 동정 및 진단법 개발
  - 튤립, 수선화, 백합, 글라디올러스 등 구근 화훼류에서 검출된 주요 바이러스 3종 이상의 개별 유전자진단법 개발
  - 유전자 다중진단법 개발
- 현장현시 진단(POC)을 위한 신속 및 정밀 진단기술 개발
  - 구근 화훼류 바이러스 항원 및 특이항체 생산
  - 현장용 유전자진단기술(qRT-PCR 기반) 개발
- 구근 화훼류 바이러스 진단을 위한 Big Data 및 분석시스템 개발
  - 작물별 바이러스 Big Data 구축
  - 분석 시스템 설계
  - 스마트폰용 APP 개발

		내용	<p><b>□ 구근 화훼류 바이러스 동정 및 유전자진단법 개발</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 톨립, 수선화, 백합, 글라디올러스 등 바이러스 감염 시료 채집 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 구근 화훼류 특성을 고려한 다양한 병징 시료 채집</li> <li>- 시료의 바이러스 생물정보(병징 사진, 감염 양상 등) 확보</li> </ul> </li> <li>○ 유전자진단법(RT-PCR)을 이용한 바이러스 동정 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 작물별 국내외 보고 바이러스 목록을 기반으로 주요 바이러스 유전자진단법 확보 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 톨립 : Arabis mosaic virus 등(표 4)</li> <li>- 수선화 : Arabis mosaic virus 등(표 5)</li> <li>- 백합 : Apple stem grooving virus 등(표 6)</li> <li>- 글라디올러스 : Arabis mosaic virus 등(표 7)</li> </ul> </li> <li>- 국내외 보고 주요 바이러스 RT-PCR 진단 수행</li> </ul> </li> <li>○ 작물별 전사체 분석을 통한 바이러스 동정 및 진단법 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 전사체 분석을 통하여 바이러스 관련 염기서열 탐색</li> <li>- 유전자 증폭(PCR)을 통하여 검출 바이러스 염기서열 확인</li> <li>- 유전자 염기서열 분석을 통한 검출 바이러스 동정</li> </ul> </li> <li>○ 톨립, 수선화, 백합, 글라디올러스 등 구근 화훼류에서 검출된 주요 바이러스 3종 이상의 개별 유전자진단법 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- RT-PCR 진단과 전사체 분석을 통하여 검출된 주요 바이러스의 개별 유전자진단법 확보</li> </ul> </li> <li>○ 유전자 다중진단법 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 발생 바이러스와 기주 특성에 따른 최적 조합 선별</li> </ul> </li> </ul> <p><b>□ 현장현시 진단(POC)을 위한 신속 및 정밀 진단기술 개발</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 구근 화훼류 바이러스 항원 및 특이항체 생산 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 증식기주에 흡액 접종을 통한 바이러스 항원 생산 및 분리</li> <li>- 클로닝 벡터 시스템을 통한 바이러스 항원 단백질 생산</li> </ul> </li> </ul> <div data-bbox="767 1081 1270 1193" data-label="Diagram"> </div> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 마우스 면역 등을 통하여 바이러스 항원 특이항체 확보</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 현장용 유전자진단기술(qRT-PCR 기반) 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- qRT-PCR 기반의 구근 화훼류 바이러스 개별 및 다중진단법 개발</li> </ul> </li> </ul> <p><b>□ 구근 화훼류 바이러스 진단을 위한 Big Data 및 분석시스템 개발</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 작물별 바이러스 Big Data 구축 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 구근 화훼류 작물별 감염 바이러스의 병징, 감염 양상 등 DB 재표 생산</li> </ul> </li> <li>○ 분석 시스템 설계 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 작물별 최적화된 분석 파이프라인 알고리즘 개발</li> <li>- 작물 작기에 따른 주요 병징과 작물 특성 학습</li> <li>- 지속적인 이미지 데이터 분석을 통한 학습</li> </ul> </li> <li>○ 스마트폰용 APP 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 생산자 및 소비자 접근성을 고려한 현장형 APP 개발</li> <li>- 진단 사례 및 결과 평가 누적으로 빅데이터화</li> </ul> </li> </ul>
	2단계 (2023)	목표	<p><b>□ 구근 화훼류 바이러스 위험 순위 분류 및 채집방법 표준화</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 작물별 바이러스 발생실태 분석</li> <li>○ 채집방법 표준화</li> </ul> <p><b>□ 현장현시 진단키트 제품화</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 면역크로마토그래피법 기반 현장진단키트 제작</li> <li>○ 현장용 분자진단장비 기반 qRT-PCR 진단키트 제작</li> <li>○ 효율적 현장현시 진단을 위한 프로토콜 확립</li> </ul> <p><b>□ 구근 화훼류 바이러스 통합 진단시스템 구축 및 실증</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 유전자진단법 및 전사체 분석을 이용한 진단시스템</li> <li>○ 작물별 유전자 개별 및 다중진단법 구성체계 고도화</li> <li>○ 구근 화훼류의 작물 특성에 기인한 표준 진단체계 구축</li> <li>○ 현장현시 진단(POC) 체계 구축</li> <li>○ ICT 기술 접목한 첨단 진단시스템</li> <li>○ 외부 인증기관을 통한 진단법 실증</li> </ul>

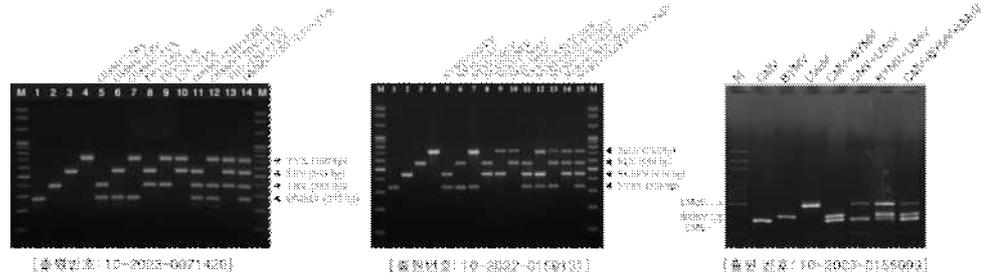
	내용	<p><b>□ 구근 화훼류 바이러스 위험 순위 분류 및 채집방법 표준화</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 작물별 바이러스 발생실태 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 대상 작물의 조직별 바이러스 검출양상 분석</li> <li>- 작물별 발생양상 분석을 통하여 주요 바이러스 선정</li> <li>- 바이러스 감염 및 발생 정도를 고려한 위험 순위 분류</li> </ul> </li> <li>○ 채집방법 표준화 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 구근 시료 특성에 적합한 최적 핵산추출 기술 확립</li> <li>- 조직 및 시기별 바이러스 감염특성 분석으로 채집방법 표준화</li> </ul> </li> </ul>  <p><b>□ 현장현시 진단키트 제품화</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 면역크로마토그래피법 기반 현장진단키트 제작 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 바이러스 특이 항체페어를 이용하여 정성적 진단 구현</li> </ul> </li> <li>○ 현장용 분자진단장비 기반 qRT-PCR 진단키트 제작 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 이동형 qRT-PCR 장비를 이용한 간편 유전자진단 수행</li> </ul> </li> <li>○ 효율적 현장현시 진단을 위한 프로토콜 확립 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 시료 전처리, 진단키트 적용 및 결과 해석 전반의 진단프로토콜 정립</li> </ul> </li> </ul> <p><b>□ 구근 화훼류 바이러스 통합 진단시스템 구축 및 실증</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 유전자진단법 및 전사체 분석을 이용한 진단시스템 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내 구근 화훼류 바이러스 목록 최신화 및 감염실태 조사</li> <li>- RT-PCR 진단과 전사체 분석을 통하여 검출된 주요 바이러스 3종 이상의 개별 유전자진단법 확보</li> </ul> </li> <li>○ 작물별 유전자 개별 및 다중진단법 구성체계 고도화 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 바이러스 진단효율 최적 조합 선발 및 정밀도 향상</li> </ul> </li> <li>○ 구근 화훼류의 작물 특성에 기인한 표준 진단체계 구축 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 시기별, 조직별 특성 및 감염 바이러스 특성 고려</li> <li>- 작물 특성을 고려한 시료 채집방법 표준화</li> </ul> </li> <li>○ 현장현시 진단(POC) 체계 구축 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 유전자 정밀 진단키트 및 혈청학적 현장신속 진단키트를 이용한 현장용 진단체계 구축</li> </ul> </li> <li>○ ICT 기술 접목한 첨단 진단시스템 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 현장과 실험실의 유기적 연결을 통한 사용자 친화성 향상</li> <li>- 바이러스 생물정보의 빅데이터화</li> </ul> </li> <li>○ 외부 인증기관을 통한 진단법 실증 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 공인시험기관의 진단법 실증</li> <li>- 민감도, 특이도 90% 이상</li> </ul> </li> </ul>
--	----	---

연구개발성과	<p><b>□ 구근 화훼류 바이러스 동정 및 유전자진단법 개발</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 툴립, 수선화, 백합, 및 글라디올러스 등 바이러스 감염 시료 채집 <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 툴립, 수선화, 백합, 글라디올러스 각각 다양한 이상증상을 보이는 시료를 50점 이상 확보하였음(툴립 86점, 수선화 75점, 백합 53점, 글라디올러스 99점).</li> <li>2. 분석 시료를 기반으로 이상 증상 및 바이러스 병징관련 육안적 특성 정보를 파악하였음.</li> </ol> </li> <li>○ 유전자진단법(RT-PCR) 및 메타전사체 분석을 이용한 바이러스 동정 및 진단기술 개발 <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 전 세계적으로 구근 화훼류(툴립, 수선화, 백합, 글라디올러스)에 보고된 바이러스 82종의 유전자진단법을 확보하고 RT-PCR 진단을 수행하였음. <ul style="list-style-type: none"> <li>- 툴립 : <i>Tulip breaking virus</i> 등 20종의 유전자진단법 확보</li> <li>- 수선화 : <i>Narcissus late season yellows virus</i> 등 23종의 유전자진단법 확보</li> <li>- 백합 : <i>Lily mottle virus</i> 등 23종의 유전자진단법 확보</li> <li>- 글라디올러스 : <i>Bean yellow mosaic virus</i> 등 16종의 유전자진단법 확보</li> </ul> </li> <li>2. 검역병해충으로 지정된 바이러스의 경우 농림축산검역본부에서 고시한 진단법을 확보하였음.</li> </ol> </li> </ul>
--------	---

3. RT-PCR 기반 검정에서 예측할 수 없는 바이러스를 탐색하기 위하여 차세대 염기서열분석법(Next generation sequencing, NGS) 기반 메타전사체 분석을 수행하였음
4. RT-PCR 및 메타전사체 분석을 통하여 총 26종의 바이러스가 검출되었으며, 각각의 바이러스를 동정하고 유전자 개별진단법을 개발하였음.
- 틀립(4종) : *Lily symptomless virus*(LSV), *Tulip breaking virus*(TBV), *Tulip virus X*(TVX), *Olive mild mosaic virus*(OMMV)
  - 수선화(10종) : *Cyrtanthus elatus virus A*(CEVA), *Narcissus late season yellows virus*(NLSYV), *Narcissus latent virus*(NLV), *Narcissus mosaic virus*(NMV), *Narcissus yellow stripe virus*(NYSV), *Nerine latent virus*(NeLV), *Japanese iris necrotic ring virus*(JINRV), *Snowdrop virus Y*(SVY), *Turnip yellow virus*(TuYV), *Tobacco rattle virus*(TRV).
  - 백합(5종) : *Lily mottle virus*(LMOv), *Cucumber mosaic virus*(CMV), *Lily symptomless virus*(LSV), *Plantago asiatica mosaic virus*(PIAMV), *Rembrandt tulip breaking virus*(ReTBV)
  - 글라디올러스(7종) : *Bean yellow mosaic virus*(BYMV), *Lily mottle virus*(LMOv), *Cucumber mosaic virus*(CMV), *Tobacco streak virus*(TSV), *Broad bean wilt virus 2*(BBWV2), *Tobacco mosaic virus*(TMV), *Bean common mosaic virus*(BCMV)
- 틀립, 수선화, 백합, 글라디올러스 등 구근 화훼류에서 검출된 바이러스의 다중 유전자진단법 개발

1. 유전자 개별진단법 조합을 이용한 유전자 다중진단법을 개발하였음.

No.	구분	특허명	출원번호	진단 바이러스
1	특허출원	틀립에 발생하는 바이러스의 다중 진단용 조성물	10-2023-0071420	LSV, TBV, TVX, OMMV
2	특허출원	수선화에 발생하는 바이러스의 다중 진단용 조성물	10-2022-0159131	NLSYV, NLV, NYSV, NeLV
3	특허출원	글라디올러스 감염 바이러스의 다중 진단용 프라이머 및 이의 용도	10-2023-0155099	BYMV, CMV, LMOv



2. qRT-PCR 기반 실험실용 다중 유전자진단법 개발하였음.

No.	구분	사업화명	제품명	업체명	진단 바이러스
1	제품화	수선화 바이러스 실험실용 동시 진단키트	POBGEN Narcissus Virus Detection Kit	(주) 포스트바이오	LSV, TVX, OMMV
2	제품화	틀립 바이러스 실험실용 동시 진단키트	POBGEN Tulip Virus Detection Kit	(주) 포스트바이오	NYSV, NMV, TRV
3	제품화	백합 바이러스 실험실용 동시 진단키트	POBGEN Lily Virus Detection Kit	(주) 포스트바이오	CMV, LSV, LMOv



**□ 구근 화훼류 바이러스 위험 순위 분류 및 채집방법 표준화**

○ 작물별 바이러스 발생실태 분석

1. 튜립 바이러스의 발생실태를 분석하고 위험 순위를 분류하였음.
  - 튜립 바이러스는 4종이 검출되었으며, OMMV와 TBV의 검출률이 30.2%이고 LSV는 17.4%, TVX는 15.1%로 나타남.
  - OMMV는 LSV, TBV와 복합감염 되었을 때 튜립의 생육을 매우 불량하게 함.
  - LSV를 제외한 TBV, TVX, OMMV는 본 과제 수행을 통하여 국내에 처음으로 보고되는 바이러스임.
  - 튜립에 주요 바이러스는 LSV, TBV, TVX 및 OMMV 4종으로 판단됨.
2. 수선화 바이러스의 발생실태를 분석하고 위험 순위를 분류하였음.
  - 수선화 바이러스는 10종이 검출되었으며, NeLV의 검출률이 100%로 모든 수선화에서 검출되었으며, 다음으로 NLSYV(97.3%), NLV(52%), NYSV(32%), JINRV(29.3%), NMV(18.7%), TRV(14.7%), TuYV(14.7%), SVY(13.3%), CEVA(1.3%) 순으로 나타남.
  - 모든 수선화 시료에서 최소 2종 이상의 바이러스가 검출되었으며, 다수의 바이러스가 복합 감염되었을 때 수선화의 생육을 불량하게 함.
  - CEVA, JINRV 및 SVY는 본 과제 수행을 통하여 국내에 처음으로 보고되는 바이러스임.
  - NLSYV, NLV, NYSV, 및 NeLV 4종은 모든 지역에서 검출되었으며, 수선화에 나타나는 전반적인 바이러스 병징과 관련 있는 것으로 판단됨.
  - 수선화에 주요 바이러스는 NLSYV, NLV, NYSV, 및 NeLV로 판단됨.
3. 백합 바이러스의 발생실태를 분석하고 위험 순위를 분류하였음.
  - 백합 바이러스는 6종이 검출되었으며, LMoV의 검출률이 50.9%, 다음으로 LSV(43.4%), CMV(41.5%), PIAMV(20.8%), ReTBV(15.1%) 순으로 나타남.
  - PIAMV는 다른 바이러스와 복합 감염되었을 때 백합의 생육을 불량하게 함.
  - 백합에 주요 발생 바이러스는 LMoV, LSV, CMV, PIAMV로 판단됨.
4. 글라디올러스 바이러스의 발생실태를 분석하고 위험 순위를 분류하였음.
  - 글라디올러스 바이러스는 7종이 검출되었으며, BYMV가 53.5%로 가장 높은 검출률이 나타났으며, 다음으로 LMoV(44.4%), CMV(25.3%), TSV(5.1%), BBWV2(3.1%), TMV(2.1%), BCMV(1.1%) 순으로 나타남.
  - CMV는 BYMV와 LMoV와 복합적으로 발생하여 글라디올러스의 생육을 불량하게 함.
  - 글라디올러스 주요 발생 바이러스는 LMoV, CMV, BYMV로 판단됨.

○ 채집방법 및 진단체계의 표준화

1. 바이러스가 감염된 구근 화훼류의 조직별(구근, 잎, 꽃) 및 시기별(생육 초기, 중기, 후기)로 분석 시료를 채집하여 바이러스 RT-PCR 진단 및 qRT-PCR 진단을 수행하였음.
  - RT-PCR 및 qRT-PCR 분석 결과에 따르면 구근 화훼류에서 바이러스는 생육 초기 앞에서 진단하는 것이 가장 효과적임.
  - 구근 화훼류는 영양 생식을 하며 대부분 구근을 수입하여 재배하기 때문에 화훼류별로 알뿌리(구근 조직)에서 바이러스의 진단을 수행하는 것이 중요할 것으로 판단됨.
  - 구근 화훼류의 조직별(구근, 잎, 꽃)로 바이러스의 농도 차이는 있으나, qRT-PCR을 이용한 분석 결과에 따르면 조직에 상관없이 바이러스가 검출되는 양상을 확인함.
  - 조직별 및 시기별로 바이러스의 검출 양상을 보았을 때 진단 환경 및 목적에 따라 시료를 채집하고 바이러스 진단을 수행하여야 할 것으로 판단됨.
2. 다양한 핵산추출 키트를 사용하여 구근 화훼류에서 효율적인 핵산 추출 방식을 조사하였음.
  - 식물에서 핵산을 추출할 때 흔히 사용되는 방법을 이용하여 효율적인 RNA 추출 방식을 조사하였음.
  - Phenol을 이용하여 RNA 추출 시 구근 화훼류에서 효과적으로 RNA를 추출할 수 있음.

**□ 현장현시 진단(POC)을 위한 신속 및 정밀 진단기술 개발 및 제품화**

○ 현장용 유전자진단기술 개발

1. 이동형 qRT-PCR 장비를 이용한 구근 화훼류 바이러스 현장 진단법을 개발하였

음.

- 개발한 현장 진단법은 외부인증기관인 (주) 코스모진텍에 시험의뢰하였으며, 민감도 및 특이도가 90% 이상으로 나타남.

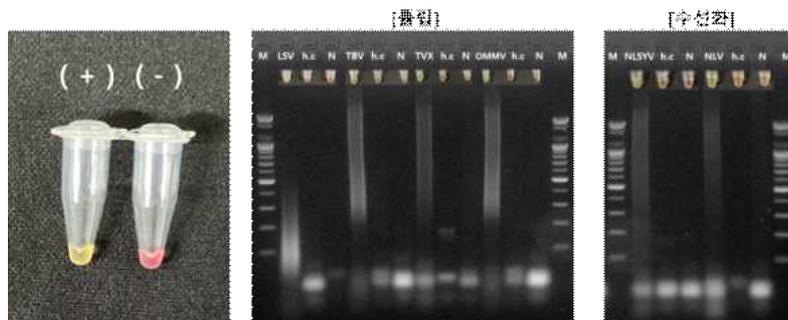
No.	사업화명	제품명	업체명	사업화형태	진단 바이러스
1	수선화 바이러스 현장용 동시 진단키트	POBGEN XQ Narcissus Virus Detection Kit	(주) 포스트바이오	제품화	LSV, TVX, OMMV
2	튤립 바이러스 현장용 동시 진단키트	POBGEN XQ Tulip Virus Detection Kit	(주) 포스트바이오	제품화	NYSV, NMV, TRV
3	백합 바이러스 현장용 동시 진단키트	POBGEN XQ Lily Virus Detection Kit	(주) 포스트바이오	제품화	CMV, LSV, LMoV



[POBGEN XQ Tulip virus Detection Kit] [POBGEN XQ Narcissus virus Detection Kit] [POBGEN XQ Lily virus Detection Kit]

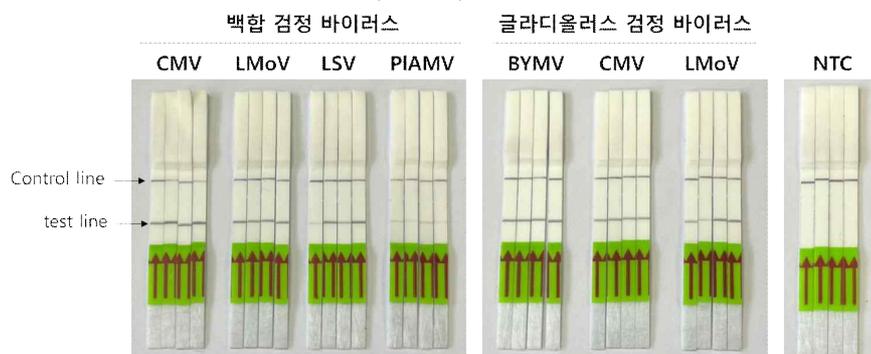
2. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification(RT-LAMP) 진단법을 이용한 현장 진단법 개발하였음.

- RT-LAMP 진단법은 등온에서 증폭이 이루어지므로 온도조절을 위한 고가의 장비가 현장에서 요구되지 않으며, PCR에 비교하여 빠른 시간(30분 내외)에 증폭이 이루어져 바이러스 진단 할 수 있음.
- RT-LAMP를 이용하여 튤립 바이러스 4종(LSV, TBV, TVX, OMMV)과 수선화 바이러스는 2종(NLSYV와 NLV)의 현장 진단법을 개발하였음.



3. Recombinase polymerase amplification with lateral flow dipstick (RPA-LFD) 방법을 이용한 현장 진단법 개발하였음.

- RPA-LFD는 40도의 온도로 약 15분간 정치한 뒤, 스트립을 반응시키면 즉시 바이러스의 감염을 진단할 수 있고, Taqman probe 기법을 사용하기에 정밀하게 바이러스를 진단할 수 있음.
- RPA-LFD 진단법을 이용하여 백합 바이러스 4종(CMV, LMoV, LSV, PIAMV)과 글라디올러스 바이러스 3종(BYMV, CMV, LMoV)의 현장 진단법을 개발하였음.



## □ 구근 화훼류 바이러스 진단을 위한 Big Data 및 분석시스템 개발

### ○ 웹 기반의 데이터베이스 개발

1. 웹 기반 데이터베이스(<http://fvirus.seeders.co.kr>)를 구현하였음.

- 확보한 구근화훼류 4종의 3,908장의 이미지 데이터와 일반식물 6,320장의 데이터를 누적하여 총 10,228장의 누적데이터 셋을 확보함.
- 구축한 10,228장의 데이터 셋을 기반으로 사용자 편의성을 고려하여 바이러스 병징별 이미지 검색 기능, 병징별 대표 이미지 구현, 및 바이러스 상세 정보 페이지 등을 제공함.

2. 지속적인 이미지 데이터를 누적할 수 있도록 설계되었음.

- 누적된 이미지 데이터는 현장 AI 진단 모듈 개발을 위한 인공지능 학습에 활용됨.
- 학습된 모델을 웹과 앱의 통합 관리시스템과 연동하여, 실시간 이미지 분석과 진단을 가능하게 함.
- 사용자는 현장에서 촬영한 이미지를 앱에 업로드하면 인공지능모델이 분석 후 관련 정보를 제공하며, 웹DB에 데이터가 누적되어 향후 연구분석에 활용할 수 있는 통합 워크플로우를 생성함.

### ○ 스마트폰용 APP 개발

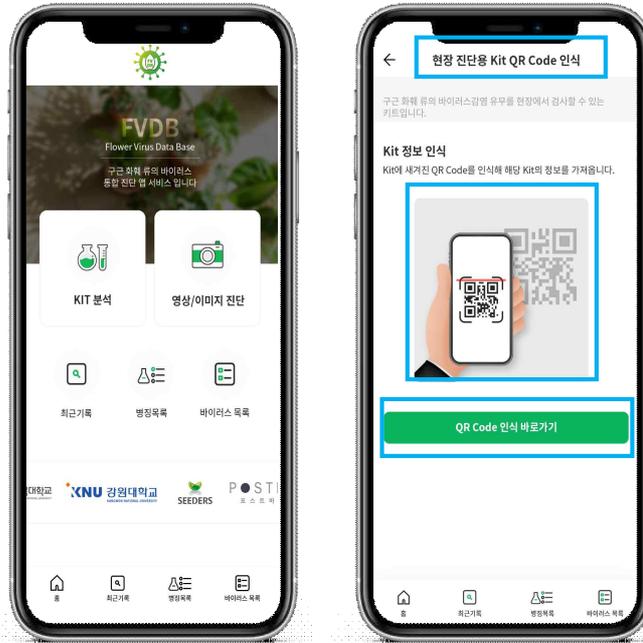
1. 현장에서 구근 화훼류에 대한 바이러스를 진단하고 확보한 데이터를 웹 DB와 연동하여 실시간으로 통합하기 위한 현장진단용 앱을 제작함.

- GPS를 이용하여 촬영 장소의 위치정보를 추출할 수 있는 기능을 구현하였음.
- 스마트폰에 설치된 카메라 설정값을 조정할 수 있는 제어 기능을 구현하였음.
- 현장 진단키트를 사용하여 수행한 바이러스 진단 결과를 저장 및 전송할 수 있는 QR 코드 인식기를 개발하였음.
- 구근화훼류에 발생하는 바이러스 통합 진단을 위한 데이터 관리를 위해 현장과 실험실의 유기적 연결하는 맞춤형 웹을 제작함. 수집한 데이터셋을 통합적으로 관리하고 검색할 수 있는 기능을 구현하고 BLAST와 NGS 분석 결과를 제공하여 유전체 분석과 결과와 하나의 웹에 통합함.
- ICT 기술을 접목한 웹과 앱의 통합 시스템 구축은 구근 화훼류 바이러스의 특성과 확산 패턴을 더 정밀하게 모니터링하고 분석할 수 있도록 도움.

### [웹 기반의 데이터베이스 개발]



[스마트용 APP 개발]



□ 구근 화훼류 바이러스 통합 진단시스템 개발

○ 구근 화훼류의 작물 특성에 기인한 표준 진단체계 구축

1. 튨립 바이러스의 통합 진단체계 구축

- [최적 진단 시기 및 조직] 튨립 바이러스는 생육 초기의 잎에서 진단하는 것이 효과적이거나, 본 연구개발과제에서 개발한 다양한 진단 기술을 활용하여 진단 목적 및 환경에 따라 적절히 바이러스 진단을 수행할 것을 권장함.
- [주요 진단 대상 바이러스] 튨립 주요 바이러스 4종(LSV, TBV, TVX, 및 OMMV)을 대상으로 우선적으로 진단해야 할 것으로 판단되며, 특히 OMMV는 다른 바이러스와 복합감염 되었을 때 튨립의 생육을 크게 불량하게 함.
- [현장 진단] 현장에서 바이러스 감염이 의심되는 튨립 시료는 이동형 qPCR 장치 기반 다중진단 키트 및 RT-LAMP 진단법을 이용하여 현장에서 바이러스의 감염을 정성 혹은 정량적으로 확인할 수 있음. 또한 개발한 스마트폰 APP에서 제공하는 튨립 바이러스 병징 데이터를 이용하여 현장에서 튨립에 나타난 이상 증상과 비교하고, 분석 결과를 웹 기반 데이터베이스에 저장할 수 있음.
- [실험실 진단] 개발한 RT-PCR 및 qRT-PCR 기반 유전자진단법을 이용하여 실험실에서 정밀진단을 수행할 수 있으며, 웹 기반 데이터베이스에 진단 및 동정 결과를 웹 기반 데이터베이스에 저장할 수 있음. 또한, 국내외로 보고된 튨립 바이러스 20종의 유전자진단법을 확보하였기에 튨립 주요 바이러스를 포함하여 다양한 바이러스를 진단할 수 있음.
- [Big data 구축] 웹페이지 및 스마트폰 APP을 이용하여 현장 및 실험실에서 검출된 바이러스에 대한 데이터를 지속해서 저장할 수 있음. 현장과 실험실의 유기적 연결을 통하여 사용자가 쉽게 접근할 수 있는 ICT 기술을 접목한 바이러스 진단 시스템을 구축하였으며, 이를 통하여 현장에서 튨립 바이러스의 간편한 진단을 제공하고 빅데이터 구축의 기반을 마련하였음.

2. 수선화 바이러스의 통합 진단체계 구축

- [진단 시기 및 조직] 수선화 바이러스는 생육 초기의 잎에서 진단하는 것이 효과적이거나, 본 연구개발과제에서 개발한 다양한 진단 기술을 활용하여 진단 목적 및 환경에 따라 적절히 바이러스 진단을 수행할 것을 권장함.
- [주요 진단 대상 바이러스] 수선화 바이러스 4종(NLSYV, NLV, NYSV, 및 NeLV)은 복합감염의 형태로 발생하여 수선화의 품질 가치를 저하하기에 우선적으로 진단할 필요가 있음. 본 연구에서 채집한 수선화는 최소 2종 이상의 바이러스에 복합 감염된 것을 확인하였으며 여러 가지 바이러스의 복합감염 여부를 고려하여야 함.
- [현장 진단] 바이러스 감염이 의심되는 수선화 시료는 이동형 qPCR 장치 기반 다중진단 키트 및 RT-LAMP 진단법을 이용하여 바이러스 감염을 정성 혹은 정량적으로 확인할 수 있음. 또한, 개발한 스마트폰 APP에서 제공하는 수선화 바이러스

- 병징 데이터를 이용하여 현장 수선화에 나타난 이상 증상과 비교하고 그 분석 결과를 웹 기반 데이터베이스에 저장할 수 있음.
- [실험실 진단] 개발한 RT-PCR 및 qRT-PCR 기반 유전자진단법을 이용하여 정밀 진단을 수행할 수 있으며, 웹 기반 데이터베이스에 진단 및 동정 결과를 웹 기반 데이터베이스에 저장할 수 있음. 국내외로 보고된 수선화 바이러스 23종의 유전자진단법을 확보하였기에 수선화 주요 바이러스를 포함하여 다양한 바이러스를 진단할 수 있음.
  - [Big data 구축] 웹페이지 및 스마트폰 APP을 이용하여 현장 및 실험실에서 검출된 바이러스에 대한 데이터를 지속해서 저장할 수 있음. 현장과 실험실의 유기적 연결을 통한 사용자가 쉽게 접근할 수 있는 ICT 기술을 접목한 바이러스 진단시스템을 구축하였으며, 이를 통하여 현장에서 수선화 바이러스의 간편한 진단을 제공하고 빅데이터 구축의 기반을 마련하였음.
3. 백합 바이러스의 통합 진단체계 구축
- [진단 시기 및 조직] 백합 바이러스는 생육 초기의 잎에서 진단하는 것이 효과적이거나, 본 연구개발과제에서 개발한 다양한 진단 기술을 활용하여 진단 목적 및 환경에 따라 적절히 바이러스 진단을 수행할 것을 권장함.
  - [주요 진단 대상 바이러스] 백합 주요 바이러스 4종(CMV, LMoV, LSV, PIAMV)을 대상으로 우선 진단해야 할 것으로 판단되며 바이러스가 복합적으로 감염될수록 백합의 생육을 불량하게 함.
  - [현장 진단] 바이러스 감염이 의심되는 백합 시료는 이동형 qPCR 장치 기반 다중진단 키트 및 RPA-LFD 진단법을 이용하여 현장에서 바이러스 감염 여부를 확인할 수 있음. 또한, 개발한 스마트폰 APP에서 제공하는 백합 바이러스 병징 데이터를 이용하여 현장 수선화에 나타난 이상 증상과 비교하고 그 분석 결과를 웹 기반 데이터베이스에 저장할 수 있음.
  - [실험실 진단] 개발한 RT-PCR 및 qRT-PCR 기반 유전자진단법을 이용하여 실험실에서 정밀 진단을 수행할 수 있으며, 웹 기반 데이터베이스에 진단 및 동정 결과를 웹 기반 데이터베이스에 저장할 수 있음. 국내외로 보고된 백합 바이러스 23종의 유전자진단법을 확보하였기에 백합 주요 바이러스를 포함하여 다양한 바이러스를 진단할 수 있음.
  - [Big data 구축] 웹페이지 및 스마트폰 APP을 이용하여 현장 및 실험실에서 검출된 바이러스에 대한 데이터를 지속해서 저장할 수 있음. 현장과 실험실의 유기적 연결을 통한 사용자가 쉽게 접근할 수 있는 ICT 기술을 접목한 바이러스 진단시스템을 구축하였으며, 이를 통하여 현장에서 백합 바이러스의 간편한 진단을 제공하고 빅데이터 구축의 기반을 마련하였음.
4. 글라디올러스 바이러스의 통합 진단체계 구축
- [진단 시기 및 조직] 글라디올러스 바이러스는 생육 초기의 잎에서 진단하는 것이 효과적이거나, 본 연구개발과제에서 개발한 다양한 진단 기술을 활용하여 진단 목적 및 환경에 따라 적절히 바이러스 진단을 수행할 것을 권장함.
  - [주요 진단 대상 바이러스] 글라디올러스의 주요 바이러스는 BYMV, CMV, LMoV로 단일감염뿐 아니라 이중, 삼중으로 다양한 형태로 복합 감염하는 것을 확인함.
  - [현장 진단] 바이러스 감염이 의심되는 글라디올러스 시료는 이동형 qPCR 장치 기반 다중진단 키트 및 RPA-LFD 진단법을 이용하여 현장에서 바이러스 감염 여부를 확인할 수 있음. 또한, 개발한 스마트폰 APP에서 제공하는 백합 바이러스 병징 데이터를 이용하여 현장 글라디올러스에 나타난 이상 증상과 비교하고 그 분석 결과를 웹 기반 데이터베이스에 저장할 수 있음.
  - [실험실 진단] 개발한 RT-PCR 및 qRT-PCR 기반 유전자진단법을 이용하여 실험실에서 정밀진단을 수행할 수 있으며, 웹 기반 데이터베이스에 진단 및 동정 결과를 웹 기반 데이터베이스에 저장할 수 있음. 국내외로 보고된 백합 바이러스 16종의 유전자진단법을 확보하였기에 글라디올러스 주요 바이러스를 포함한 다양한 바이러스를 진단할 수 있음.
  - [Big data 구축] 웹페이지 및 스마트폰 APP을 이용하여 현장 및 실험실에서 검출된 바이러스에 대한 데이터를 지속해서 저장할 수 있음. 현장과 실험실의 유기적 연결을 통한 사용자가 쉽게 접근할 수 있는 ICT 기술을 접목한 바이러스 진단시스템을 구축하였으며, 이를 통하여 현장에서 글라디올러스 바이러스의 간편한 진단을 제공하고 빅데이터 구축의 기반을 마련하였음.

[정량적 연구개발성과표]							
성과지표명		연도	1단계	2단계	계	가중치 (%)	
			(2021~2022)	(2023)			
전담기관 등록·기탁 지표	논문	목표(단계별)	1	2	3	-	
		실적(누적)	1	3	4	-	
	특허(출원)	목표(단계별)	1	2	3	30	
		실적(누적)	1	2	3	30	
	학술발표	목표(단계별)	2	1	3	10	
		실적(누적)	8	3	11	10	
	생명자원 (생명정보)	목표(단계별)	4	2	6	5	
		실적(누적)	10	3	13	5	
	연구개발과제 특성 반영 지표	기술실시 (이전)	목표(단계별)	0	1	1	10
			실적(누적)	0	1	1	10
사업화 (제품화)		목표(단계별)	0	4	4	20	
		실적(누적)	0	6	6	20	
인력양성		목표(단계별)	1	2	3	10	
		실적(누적)	1	2	3	10	
고용창출		목표(단계별)	4	2	6	10	
		실적(누적)	4	3	7	10	
정책건의		목표(단계별)	1	1	2	5	
		실적(누적)	1	2	3	5	
계	목표(단계별)	14	17	31	100		
	실적(누적)	26	25	51	100		

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<p><b>□ 활용계획</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 본 과제 수행을 통한 연구개발성과는 다음과 같음. <ul style="list-style-type: none"> <li>- 특허 출원 : 3건(특허 등록 예정)</li> <li>- 제품개발 : 6건</li> <li>- 논문(SCI) : 4편</li> <li>- 정책활용 : 3건</li> <li>- 고용창출 : 7명</li> <li>- 학술발표 : 11건</li> <li>- 인력양성 : 3명</li> <li>- 기타(생명자원 수집 및 생명정보 등록) : 13건</li> </ul> </li> <li>○ 본 연구개발과제 종료 후 예상되는 성과는 다음과 같음. <ul style="list-style-type: none"> <li>- 논문(SCI 및 KCI) : 1편(구근 화훼류 바이러스 감염실태 및 진단법)</li> <li>- 학술발표 : 1건(구근 화훼류 바이러스 감염실태 및 진단법)</li> </ul> </li> </ul> <p><b>□ 기대 효과</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 본 과제의 연구결과로 구근 화훼류에서 바이러스병의 피해를 사전예방하거나 최소화하며, 바이러스 무병 구근 화훼류의 생산과 유통의 기반 구축으로 세계 수준의 품질 경쟁력을 확보할 수 있음.</li> <li>○ 백합, 글라디올러스, 튜립, 수선화 등의 구근 화훼류의 이상증상에 대한 정확한 원인 규명으로 재배 및 품질 제한요인을 해소함.</li> <li>○ 구근 화훼류에 발생하는 국내 바이러스병을 동정함으로써 화훼류 구근의 수입과 관련된 비과학적이고 불필요한 검역 규제를 해소할 수 있을 것으로 기대되며, 또한 수출 구근 화훼류에 대한 수입국의 진단대상 바이러스의 정밀진단으로 국가 신뢰도를 향상시킬 수 있음.</li> <li>○ 구근 화훼류 바이러스 관련 유전자 정밀진단법 및 현장진단법의 기술이전을 통한 병원체 진단키트의 산업화 도모.</li> <li>○ 구근 화훼류에 발생하는 바이러스를 동정하고, 정밀진단 및 현장신속 진단법의 개발로 작물별 통합 진단시스템을 구축하고, 나아가 정보통신기술(ICT)과 접목을 통하여 생산자 및 소비자가 손쉽게 이용할 수 있는 빅데이터 기반을 구축함.</li> </ul>				
	국문핵심어	구근류 바이러스	유전자진단법	진단시스템	정보통신기술 접목
영문핵심어	Bulbs and tubers Virus	RT-PCR	Diagnosis system	ICT	Big Data

최종보고서										보안등급	
										일반[ O ], 보안[ ]	
중앙행정기관명		농림축산식품부			사업명		작물바이러스 및 병해충대응사업				
전문기관명 (해당 시 작성)		농림식품기술기획평가원			내역사업명 (해당 시 작성)		진단기술 사업화				
공고번호		농축2021-85호			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)						
					연구개발과제번호		321106-3				
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB0301	60%	2순위	소분류 코드 명	20%	3순위	소분류 코드명	20%		
	농림식품과학기술분류	FA0301	80%	2순위	소분류 코드 명	10%	3순위	소분류 코드명	10%		
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문									
		영문									
연구개발과제명		국문		구근 화훼류에 발생하는 바이러스 동정 및 통합 진단시스템 개발							
		영문		Identification of viruses infecting bulbous flowers and development of its integrated virus diagnosis system							
주관연구개발기관		기관명		경북대학교 산학협력단		사업자등록번호		504-82-09678			
		주소		(우) 41566 대구광역시 북구 대학로 80		법인등록번호					
연구책임자		성명		이수현		직위		교수			
		연락처		직장전화		휴대전화					
				전자우편		국가연구자번호		10195127			
연구개발기간		전체		2021. 04. 01 - 2023. 12. 31(2년 9개월)							
		단계 (해당 시 작성)		1단계		2021. 04. 01 - 2022. 12. 31(1년 9개월)					
				2단계		2023. 01. 01 - 2023. 12. 31(1년)					
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비		기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금 지방자치단체 기타( )				연구개발비 외 지원금	
		현금		현금		현물		현금		현물	
총계		935,000		12,500		120,500		947,500		121,500	
1단계		1년차		255,000		2,200		33,000		257,200	
		2년차		340,000		5,150		44,250		345,150	
2단계		1년차		340,000		5,150		44,250		389,400	
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명		책임자		직위		휴대전화		전자우편	
		강원대학교		홍진성		교수				비고 역할 기관유형	
공동연구개발기관 위탁연구개발기관 연구개발기관 외 기관		(주) 씨더스		조성환		대표				공동 중소기업 (농업협 사법인)	
		(주) 포스트바이 오		천두성		대표				공동 중소기업	
연구개발담당자 실무담당자		성명		김민석		직위		박사과정			
		연락처		직장전화		휴대전화					
				전자우편		국가연구자번호		12422133			

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

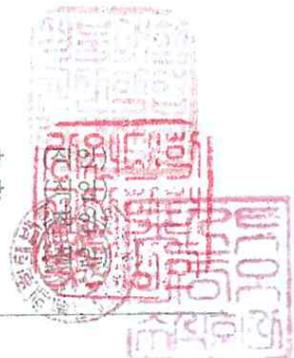
2024년 02월 04일

연구책임자: 이수현



주관연구개발기관의 장: 경북대학교 산학협력단장  
 공동연구개발기관의 장: 강원대학교 산학협력단장  
 공동연구개발기관의 장: (주) 씨더스 대표  
 공동연구개발기관의 장: (주) 포스트바이오 대표

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하



## 〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요 .....	15
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용 .....	20
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도 .....	270
4. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도 .....	294
5. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획 .....	296

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1) 연구개발의과제의 필요성

- 세계시장에서 경쟁할 수 있는 고품질 구근 화훼류 생산과 유통을 위해서는 바이러스병의 관리가 필수적임.
- 이를 위하여 본 과제에서는 구근 화훼류에 발생하는 바이러스를 동정하고, 정밀진단 및 현장신속 진단법의 개발로 작물별 통합 진단시스템을 구축하고, 나아가 정보통신기술(ICT)과 접목을 통하여 생산자 및 소비자가 손쉽게 이용할 수 있는 빅데이터 기반을 구축하고자 함.
- 본 과제의 연구결과로 구근 화훼류에서 바이러스병의 피해를 사전예방하거나 최소화하며, 무병 구근 화훼류의 생산과 유통으로 세계 수준의 품질 경쟁력을 확보할 수 있음.
- 구근 화훼류에 발생하는 국내 바이러스병을 동정함으로써 화훼류 구근의 수입과 관련된 비 과학적이고 불필요한 검역 규제를 해소할 수 있을 것으로 기대되며, 또한 수출 구근 화훼류에 대한 수입국의 진단대상 바이러스의 정밀진단으로 국가 신뢰도를 향상시킬 수 있음.
- 본 과제 수행으로 예상되는 연구결과 및 성과물은 아래와 같음.
  - 유전자진단 및 전사체 분석을 통한 구근 화훼류별(백합, 글라디올러스, 튤립, 수선화 등) 국내 발생 바이러스 목록 및 유전정보 : 논문 및 검역분야 정책건의
  - 4종 이상의 구근 화훼류에 발생하는 바이러스에 대한 개별 진단법(유전자 정밀진단법 및 혈청학적 현장신속 진단법) : 특허 및 제품개발
  - 구근 화훼류별 통합 진단시스템(바이러스별 위험 순위에 따른 다중진단시스템 및 개별 정밀진단법의 조합) : 논문 및 특허
  - 구근 화훼류 이상증상에 따른 병징과 바이러스 감염양상 분석에 대한 정보통신기술(ICT) 접목 : DB 구축
  - 스마트폰에서 확인이 가능한 APP 개발 및 구근류 진단을 위한 빅데이터 및 분석시스템 개발 : APP 및 빅데이터 분석 시스템
  - 국내 분포 구근 화훼류 바이러스의 검역 규제 해소 또는 미분포 바이러스의 추가 지정 : 정책활용(식물방역법 관련)
  - 무병 구근 화훼류 생산과 보급을 위한 작물별 통합 진단시스템 : 정책활용(종자산업법 관련)

## 2) 연구개발 대상의 국내외 현황 및 문제점과 전망

- 구근 화훼류는 일반적으로 종자로 키우면 개화까지 오랜 시간이 걸리기 때문에 주로 구근으로 영양번식을 하는데, 이 과정에서 감염된 구근, 토양, 매개체에 의한 감염을 통하여 다양한 바이러스병에 심각한 피해를 입고 있음.
- 고품질 구근 화훼류 생산을 위해서는 바이러스 무병 구근의 개발과 검증이 필요하나, 현재 국내에 유통되는 구근류 대부분은 바이러스에 감염되어 있으며, 발생하고 있는 바이러스의 실태 파악은 매우 미흡한 실정에 있음.
- 튤립, 수선화, 백합, 글라디올러스 등 9종의 구근 화훼류에서 전 세계적으로 보고된 바이러스는 73종에 달하며, 국내에서는 35종(48%)의 바이러스가 보고되어 있음(표 1).

표 1. 전 세계적으로 주요 구근 화훼류 9종에 보고된 바이러스 목록<sup>1, 2</sup>

종	바이러스		백합	튤립	프리	글라	카라	수선	아이	히야	아마	보고 기주
	약어	속										
•Apple stem grooving virus	ASGV	Capillovirus	○	×	×	×	×	×	×	×	×	1
•Arabis mosaic virus	ArMV	Nepovirus	○	○	×	○	×	○	○	○	×	6
•Bean common mosaic virus	BCMV	Potyvirus	×	×	×	○	×	×	×	×	×	1
•Bean yellow mosaic virus	BYMV	Potyvirus	×	○	○	○	○	○	○	×	○	7
•Broad bean wilt virus	BBWV	Fabavirus	○	×	×	×	×	○	○	×	×	3
Butterfly flower mosaic virus	BFMV	Potyvirus	×	×	×	×	×	×	○	×	×	1
Calla lily chlorotic spot virus	CCSV	Orthotospovirus	×	×	×	×	○	×	×	×	×	1
Calla lily latent virus	CLLV	Potyvirus	×	×	×	×	○	×	×	×	×	1
•Capsicum chlorosis virus	CaCV	Orthotospovirus	×	×	×	×	○	×	×	×	×	2
•Carnation latent virus	CLV	Carlavirus	×	×	×	×	×	○	×	×	×	1
•Carnation mottle virus	CarMV	Alphacarmovirus	×	×	×	×	○	×	×	×	×	1
Clover yellow mosaic virus	CIYMV	Potexvirus	×	○	×	×	×	×	×	×	×	1
•Clover yellow vein virus	CIYVV	Potyvirus	×	×	×	○	×	×	×	×	×	1
•Cucumber mosaic virus	CMV	Cucumovirus	○	○	○	○	○	○	○	○	○	9
•Cycas necrotic stunt virus	CNSV	Nepovirus	×	×	×	○	×	×	×	×	×	1
Cyrtanthus elatus virus A	CEVA	Potyvirus	×	×	×	×	×	○	×	×	×	1
•Dasheen mosaic virus	DsMV	Potyvirus	×	×	×	×	○	×	×	×	×	1
•Eggplant mottled crinkle virus	EMCV	Tombusvirus	×	×	×	×	○	×	×	×	×	1
•Freesia mosaic virus	FreMV	Potyvirus	×	×	○	×	×	×	×	×	×	1
•Freesia sneak virus	FreSV	Ophiovirus	×	×	○	×	×	×	×	×	×	1
Hippeastrum chlorotic ringspot virus	HCRV	Orthotospovirus	×	×	×	×	×	×	×	×	○	1
Hippeastrum latent virus	HLV	Carlavirus	×	×	×	×	×	×	×	×	○	1
Hippeastrum mosaic virus	HiMV	Potyvirus	×	×	×	×	×	×	×	×	○	1
Hyacinth mosaic virus	HyaMV	Potyvirus	×	×	×	×	×	×	×	○	×	1
•Impatiens necrotic spot virus	INSV	Orthotospovirus	×	×	○	○	○	×	○	×	○	5
•Iris fulva mosaic virus	IFMV	Potyvirus	×	×	×	×	×	×	○	×	×	1
Iris germanica leaf stripe virus	IGLSV	Genus unsigned	×	×	×	×	×	×	○	×	×	1
Iris mild mosaic virus	IMMV	Potyvirus	×	×	×	×	×	×	○	×	×	1
Iris severe mosaic virus	ISMV	Potyvirus	×	×	×	×	×	×	○	×	×	1
•Iris yellow spot orthotospovirus	IYSV	Orthotospovirus	○	×	×	×	×	×	×	○	×	3
Japanese iris necrotic ring virus	JINRV	Betacarmovirus	×	×	×	×	×	×	○	×	×	1
•Konjac mosaic virus	KoMV	Potyvirus	×	×	×	×	○	×	×	×	×	1
Lily latent virus	LiLV	Potyvirus	○	×	×	×	×	×	×	×	×	1
Lily mild mosaic virus	LMMV	Potyvirus	○	×	×	×	×	×	×	×	×	1
•Lily mottle virus	LMoV	Potyvirus	○	○	×	×	○	○	×	×	×	4
•Lily symptomless virus	LSV	Carlavirus	○	○	×	×	×	×	×	×	×	2
Lily virus A	LVA	Cholivirus	○	×	×	×	×	×	×	×	×	1
Lily virus X	LVX	Potexvirus	○	×	×	×	×	×	×	×	×	1
•Narcissus common latent virus	NCLV	Carlavirus	×	×	×	×	×	○	×	×	×	1
Narcissus degeneration virus	NDV	Potyvirus	×	×	×	×	×	○	×	×	×	1
Narcissus late season yellows virus	NLSYV	Potyvirus	×	×	×	×	×	○	×	×	×	1
•Narcissus latent virus	NLV	Macluravirus	×	×	×	×	×	○	○	×	×	2
Narcissus mosaic virus	NMV	Potexvirus	○	×	×	×	×	○	○	×	×	3

(계속)

종	바이러스		백합 튜립 프리 글라 카라 수선 아이 히야 아마											보고 기주
	약어	속	백합	튜립	프리	글라	카라	수선	아이	히야	아마			
<i>Narcissus tip necrosis virus</i>	NTNV	Genus unsigned	×	×	×	×	×	○	×	×	×	1		
<i>Narcissus yellow stripe virus</i>	NYSV	<b>Potyvirus</b>	×	×	×	×	×	○	×	×	×	1		
<i>Nerine latent virus</i>	NeLV	<b>Carlavirus</b>	×	×	×	×	×	○	×	×	○	2		
<i>Olive latent virus 1</i>	OLV-1	<b>Alphanecrovirus</b>	×	○	×	×	×	×	×	×	×	1		
● <i>Onion yellow dwarf virus</i>	OYDV	<b>Potyvirus</b>	×	×	×	×	×	○	×	×	×	1		
● <i>Ornithogalum mosaic virus</i>	OrMV	<b>Potyvirus</b>	×	×	×	○	×	○	○	○	×	4		
<i>Pelargonium leaf curl virus</i>	PLCV	<b>Tombusvirus</b>	×	○	×	×	×	×	×	×	×	1		
● <i>Plantago asiatica mosaic virus</i>	PIAMV	<b>Potexvirus</b>	○	×	×	×	×	×	×	×	×	1		
<i>Raspberry ringspot virus</i>	<b>RpRSV</b>	<b>Nepovirus</b>	×	×	×	×	×	○	×	×	×	1		
<i>Rembrandt tulip breaking virus</i>	ReTBV	<b>Potyvirus</b>	○	○	×	×	×	×	×	×	×	2		
● <i>Shallot yellow stripe virus</i>	SYSV	<b>Potyvirus</b>	○	×	×	×	×	×	×	×	×	1		
<i>Strawberry latent ringspot virus</i>	<b>SLRSV</b>	Genus unsigned	○	×	×	×	×	○	×	×	×	2		
● <i>Tobacco mosaic virus</i>	TMV	<b>Tobamovirus</b>	×	○	×	×	×	×	○	×	○	3		
● <i>Tobacco necrosis virus</i>	<b>TNV</b>	<b>Necrovirus</b>	○	○	×	○	×	○	×	○	×	5		
● <i>Tobacco rattle virus</i>	<b>TRV</b>	<b>Tobravirus</b>	○	○	○	○	×	○	○	○	×	7		
● <i>Tobacco ringspot virus</i>	<b>TRSV</b>	<b>Nepovirus</b>	○	○	×	○	×	○	○	○	×	6		
● <i>Tobacco streak virus</i>	<b>TSV</b>	<b>Ilavirus</b>	×	×	×	○	×	×	×	×	×	1		
● <i>Tomato aspermy virus</i>	TAV	<b>Cucumovirus</b>	×	×	×	○	×	×	×	○	×	2		
● <i>Tomato black ring virus</i>	<b>TBRV</b>	<b>Nepovirus</b>	×	○	×	○	×	○	×	×	×	3		
● <i>Tomato bushy stunt virus</i>	<b>TBSV</b>	<b>Tombusvirus</b>	×	○	×	×	×	×	×	×	×	1		
● <i>Tomato ringspot virus</i>	<b>ToRSV</b>	<b>Nepovirus</b>	○	×	×	○	×	○	○	×	×	4		
● <i>Tomato spotted wilt virus</i>	TSWV	<b>Orthospovirus</b>	○	×	×	○	○	×	○	×	○	5		
<i>Tomato zonate spot virus</i>	TZSV	<b>Orthospovirus</b>	×	×	×	×	×	×	○	×	×	1		
● <i>Tulip breaking virus</i>	TBV	<b>Potyvirus</b>	○	○	×	×	×	×	×	×	×	2		
<i>Tulip mild mottle mosaic virus</i>	TMMMV	<b>Ophiovirus</b>	×	○	×	×	×	×	×	×	×	1		
<i>Tulip mosaic virus</i>	TuIMV	<b>Potyvirus</b>	×	○	×	×	×	×	×	×	×	1		
<i>Tulip severe mosaic virus</i>	TSMV	<b>Ampelovirus</b>	×	○	×	×	×	×	×	×	×	1		
<i>Tulip virus X</i>	TVX	<b>Potexvirus</b>	×	○	×	×	×	×	×	×	×	1		
● <i>Turnip mosaic virus</i>	TuMV	<b>Potyvirus</b>	○	○	×	×	○	×	○	×	×	4		
<i>Zantedeschia mild mosaic virus</i>	ZaMMV	<b>Potyvirus</b>	×	×	×	×	○	×	×	×	×	1		
합계	73종		23	21	6	16	14	24	22	8	11			

<sup>1</sup> 백합: 백합(*Lilium* spp.), 튜립: 튜립(*Tulipa* spp.), 글라: 글라디올러스(*Gladiolus* spp.), 프리: 프리지아(*Freesia* spp.), 카라: 카라(*Zantedeschia* spp.), 수선: 수선화(*Narcissus* spp.), 아이: 아이리스(*Iris* spp.), 히야: 히야신스(*Hyacinthus* spp.), 아마: 아마릴리스(*Amaryllis* spp.).

<sup>2</sup> 붉은 글씨: 국내 검역병해충으로 지정되어 있는 바이러스(14종).

● 국내보고종(수입 식물체 포함) : 35종.

○ 구근 화훼류에서 바이러스 진단은 잎, 줄기, 꽃잎 등 다양한 조직을 사용할 수 있으나, 진단 결과는 어떤 조직을 검체로 사용하느냐에 따라 달라질 수 있음. 또한 생육 초기에는 뚜렷한 병징을 보이지 않지만, 생육 후기에 심각한 피해를 나타낼 수 있으므로 조기 진단을 통한 바이러스병의 방제가 매우 중요함. 따라서 다양한 조직과 생육 시기별로 바이러스 검정을 시행하고, 가장 높은 검정 효율을 보이는 조직과 시기를 분석하고자 함. 이를 통하여 구근 화훼류 바이러스의 효과적인 검정을 위한 채집방법의 표준화가 가능함.

○ 구근 화훼류 중 대표적인 식물인 백합의 경우, 성장점 배양을 통해 기본 식물을 생산하여 1

차 바이러스 검정을 하고, 인편 증식을 통해 2차 바이러스 검정을 최종적으로 진행하고 있음. 구근에서 바이러스를 검정하는 과정에서 RNA의 추출 방법에 따라 검정 정확도가 달라지기 때문에 구근에서 바이러스 RNA 추출 기술의 확립이 필요함.

### 3) 국내 연구개발의 필요성 및 정책 연관성

- 국내 구근 화훼류에 발생하는 바이러스의 종류와 위험순위 구명이 제대로 이루어지지 않아, 작물별로 통합 진단시스템의 구축이 어려움.
- 재식용으로 사용되는 화훼류 구근을 종자산업법에서 관리가 제대로 이루어지기 위해서는 ‘종자산업법’ ‘종자관리요강’에 구근 화훼류에 대한 검사대상 바이러스의 지정과 무병묘 검정을 위한 정밀 및 통합 진단시스템이 제공되어야 함.
- 재식용 구근류(화물) 수출입과 관련된 검역통계에서 수출입되는 재식용 구근류에서 검역병해충의 발견으로 식물위생조치가 취해서는 건수를 보면 2020년 약 8% 정도에 이르고 있음(표 2). 이것으로 볼 때, 구근류 화훼류 수출입 관련 관계자는 식물검역적 규제로 인하여 경제적으로 엄청난 손실을 보고 있다는 것을 확인할 수 있음.
- 또한 수출입 구근류의 ‘식물방역법’ 관련 식물위생조치 처분은 2000년 대비 현재 약 20배 증가하였으며, 전년도에 비해서도 2배 이상 급격히 증가하고 있음. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 국내 분포 바이러스의 종류와 위험도에 따른 과학적인 식물검역 조치가 이루어져야 할 것으로 판단됨.

표 2. 수출입 재식용 구근류(화물) 검역건수 및 식물위생조치 처분 실적<sup>1</sup>

년도	2000	2008	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	대비 (%)	
	(A)											(B)	(C)	C/A	C/B
수출	9	17	26	15	17	18	26	40	40	20	20	29	39	433	134
수입	733	920	1,034	925	1,055	1,187	966	1,158	1,316	1,163	1,379	1,400	3,428	468	245
처분 <sup>2</sup>	13	11	57	29	35	50	82	92	58	67	155	117	272	2,092	232

<sup>1</sup> 단위: 건.

<sup>2</sup> 처분 : 식물검역 관련 식물위생조치 처분.

- 구근 화훼류에 발생하는 73종의 바이러스에 대하여 개별 유전자진단법은 논문 및 연구자에 의하여 단편적으로 개발되어 있으나, 각각의 구근 화훼류에서 작물별로 통합진단법은 개발되어 있지 않음.
- 통합 진단시스템을 구축하기 위해서는 구근 화훼류별 바이러스의 위험도 및 발생양상을 분석하여, 진단의 필요성과 용도에 따른 다양한 진단기법의 개발이 필요함. 진단기법으로는 RT-PCR을 이용한 정성 및 정량 진단법과 현장현시 진단을 위한 immunostrip 진단법 등이 필요함.
- 특히 국내 구근 화훼류에서 다양한 신규 바이러스들이 출현하고 있으며, 이러한 바이러스에 대한 현장 진단이 체계화되어 있지 않음.
- 현재까지 개발된 바이러스 진단법 중에서 가장 신속하고 편리하게 진단할 수 있는 immunostrip 진단법의 경우, 구근 화훼류에 발생하는 바이러스 73종 중에서 10종이 개발되

어 있음. 개발된 immunostrip 진단법은 소수에 불과하며, 그 중에서 일부는 국내 미분포 바이러스이기 때문에 현장에서 바이러스병을 신속히 규명하기는 어려움.

- Immunostrip 진단법이 시판되고 있는 구근 화훼류 관련 바이러스 : *Arabid mosaic virus* (ArMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), *Iris yellow spot virus* (IYSV), *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV), *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tobacco ringspot virus* (TRSV), *Tobacco streak virus* (TSV), *Tomato ringspot virus* (ToRSV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV).
- 본 연구과제에서 구근 화훼류 바이러스의 발생양상과 위험도 순위 분석에 따라 추가로 필요한 바이러스에 대하여 immunostrip 진단법을 개발하고자 함.

## 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

### 1) 주관연구기관 : 경북대학교

#### 1. 튜립, 수선화 등 구근 화훼류에서 바이러스 분석 시료 채집

##### ○ 바이러스 분석용 시료 채집

- 튜립과 수선화의 국내 재배 지역에서 이상 증상을 나타내는 시료를 채집하였음(그림 1).
- 육안으로 관찰하여 잎과 꽃, 줄기 등에서 바이러스 감염이 추정되는 개체에서 구근을 포함한 개체 전체를 채집하였음.
- 튜립은 5개 지역(강원 춘천, 경북 예천, 경북 칠곡, 경남 고성, 충남 예산)에서 86점의 시료를 채집하였음(그림 2).
- 수선화는 4개 지역(강원 원주, 경남 거제, 전남 신안, 충남 예산)에서 75점의 시료를 채집하였음.
- 채집한 개체의 지상부(잎, 꽃 등)로부터 전체 RNA를 추출하여 RT-PCR 진단 및 NGS 분석에 사용하였음.
- 채집한 시료는 초저온 냉동고(-70℃)에 저장하여 사용하였음.

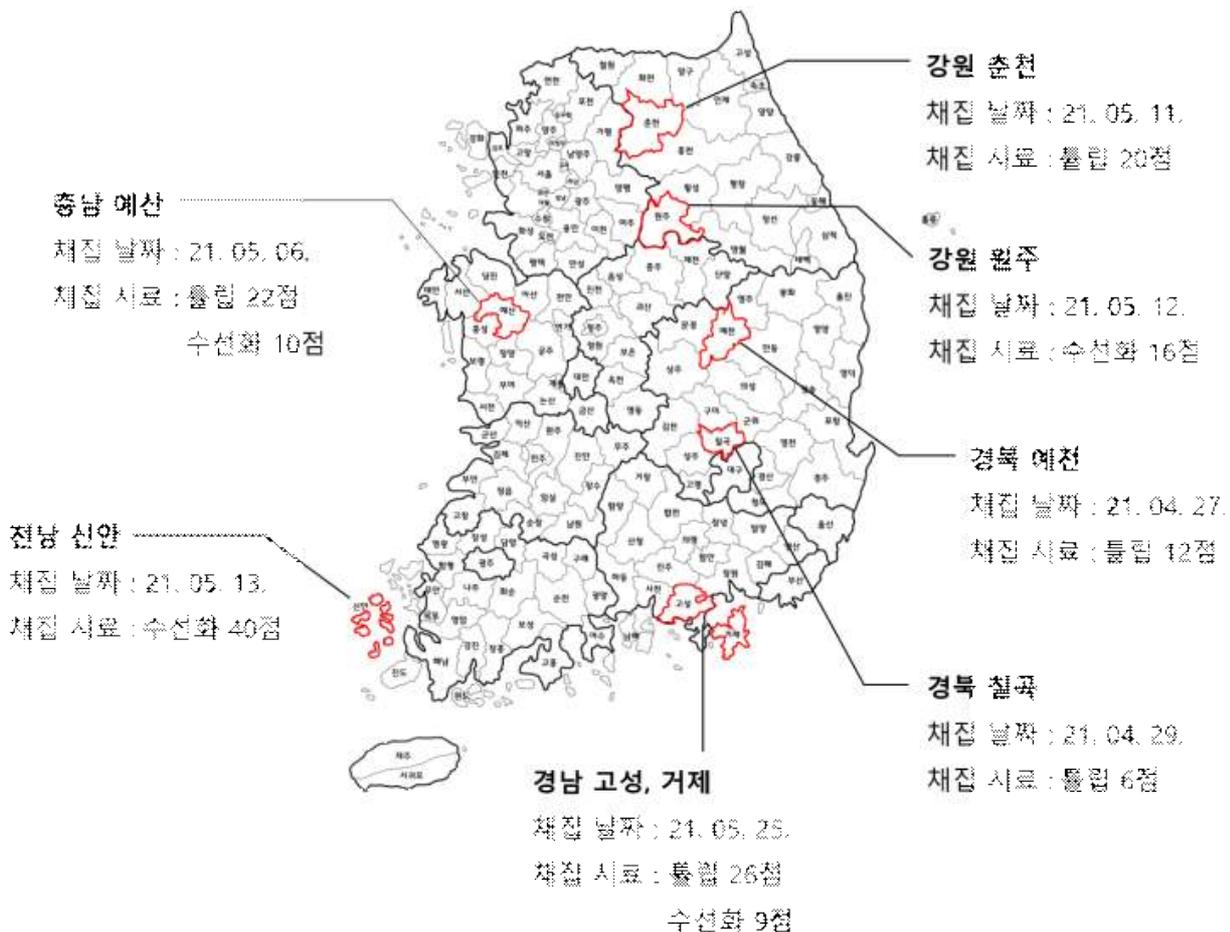


그림 1. 튜립과 수선화에서 발생하는 바이러스를 조사하기 위하여 시료를 채집한 지역. 튜립과 수선화의 국내 주요 재배 지역을 대상으로 시료를 채집하였음. 튜립은 5개 지역(강원 춘천, 경북 예천, 경북 칠곡, 경남 고성, 충남 예산)에서 86점의 시료를 채집하였으며, 수선화는 4개 지역(강원 원주, 경남 거제, 전남 신안, 충남 예산)에서 75점의 시료를 채집하였음. 채집한 시료는 초저온 상태(-70℃)에 저장하여 연구에 사용하였음.

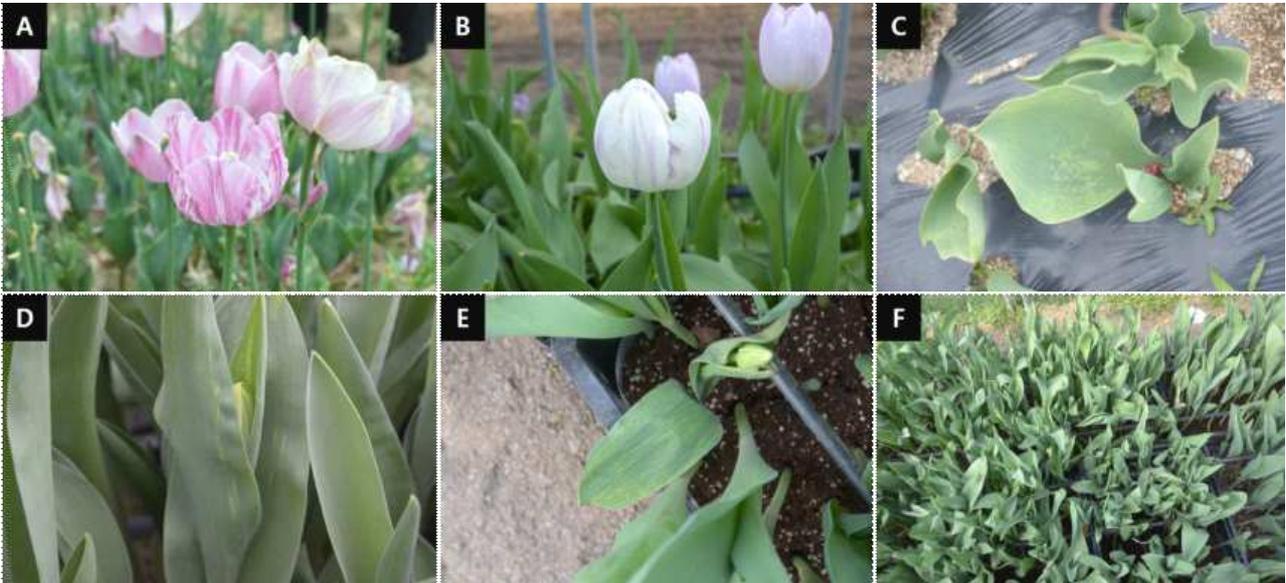


그림 2. 국내 튜립 주요 재배지역에서 발생하는 바이러스병 조사를 위하여 채집한 튜립. 국내 5개 지역(강원 춘천, 경북 예천, 경북 칠곡, 경남 고성, 충남 예산)을 조사하였음. 강원 춘천지역은 시설재배 농가에서 조사하였으며, 그 외 4개 지역은 노지재배 농가에서 조사하였음. 육안으로 관찰하여 튜립 개체에서 바이러스 병징 또는 이상증상이 나타나는 시료 86점을 채집하였음. A-B: flower color breaking, C-E: leaf yellow streak, F: leaf malformation.

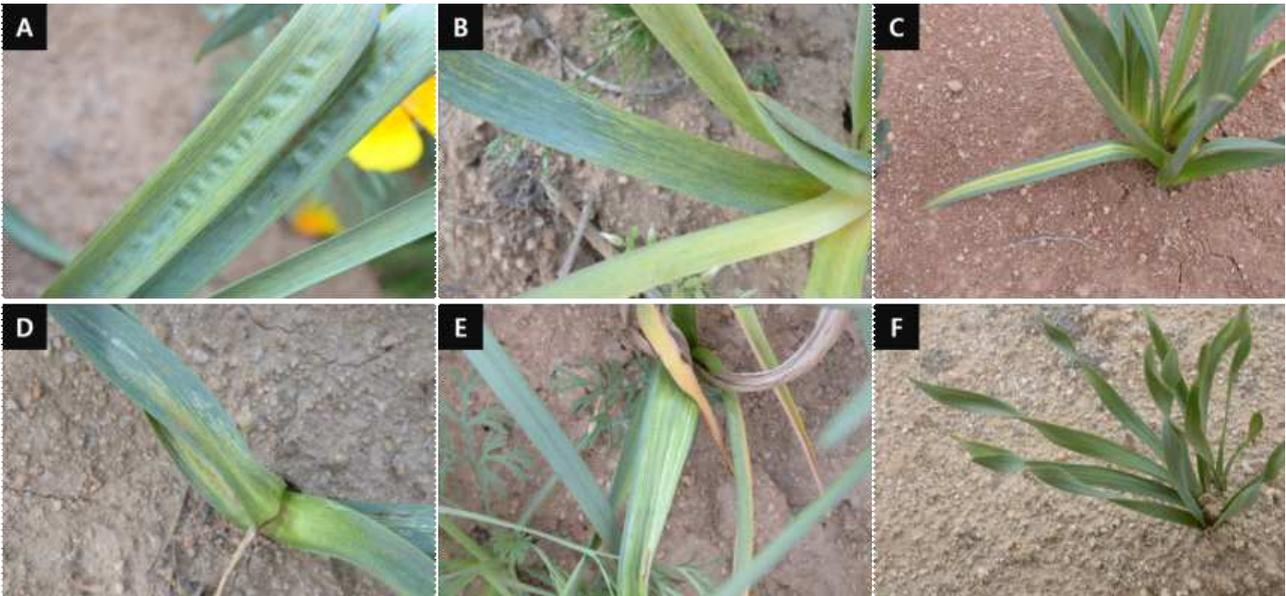


그림 3. 국내 수선화 주요 재배지역에서 발생하는 바이러스병 조사를 위하여 채집한 수선화. 국내 4개 지역(강원 원주, 경남 거제, 전남 신안, 충남 예산)을 조사하였음. 채집한 모든 지역의 수선화는 노지 농가에서 재배되었음. 채집 시료는 육안으로 관찰하여 바이러스 병징 또는 이상증상이 나타나는 수선화 개체이며, 총 75점을 채집하였음. A-C: yellow streak, D-E: white streak, F: leaf malformation.

## 2. RT-PCR 기반 구근 화훼류 바이러스의 탐색

### ○ 구근 화훼류 바이러스의 동정

- 문헌조사를 통하여 전 세계적으로 튜립과 수선화에서 발생이 보고된 바이러스의 목록을 작성하였음(표 1, 4).
- 전 세계적으로 튜립에 보고된 바이러스는 19종이며, 국내에는 12종의 바이러스가 보고되었음.

표 1. 전 세계적으로 튜립에서 발생 보고된 바이러스<sup>a</sup>

종	약어	속
<i>Arabis mosaic virus</i>	ArMV	<i>Nepovirus</i>
• <i>Bean yellow mosaic virus</i>	BYMV	<i>Potyvirus</i>
<i>Clover yellow mosaic virus</i>	CIYMV	<i>Potexvirus</i>
• <i>Cucumber mosaic virus</i>	CMV	<i>Cucumovirus</i>
• <i>Lily mottle virus</i>	LMoV	<i>Potyvirus</i>
• <i>Lily symptomless virus</i>	LSV	<i>Carlavirus</i>
<i>Olive latent virus 1</i>	OLV-1	<i>Alphanecrovirus</i>
<i>Pelargonium leaf curl virus</i>	PLCV	<i>Tombusvirus</i>
<i>Rembrandt tulip breaking virus</i>	ReTBV	<i>Potyvirus</i>
• <i>Raspberry ringspot virus</i>	RpRSV	<i>Nepovirus</i>
• <i>Tobacco mosaic virus</i>	TMV	<i>Tobamovirus</i>
• <i>Tobacco necrosis virus</i>	TNV	<i>Necrovirus</i>
• <i>Tobacco rattle virus</i>	TRV	<i>Tobravirus</i>
• <i>Tobacco ringspot virus</i>	TRSV	<i>Nepovirus</i>
• <i>Tomato black ring virus</i>	TBRV	<i>Nepovirus</i>
• <i>Tomato bushy stunt virus</i>	TBSV	<i>Tombusvirus</i>
• <i>Tulip breaking virus</i>	TBV	<i>Potyvirus</i>
<i>Tulip mild mottle mosaic virus</i>	TMMMV	<i>Ophiovirus</i>
<i>Tulip virus X</i>	TVX	<i>Potexvirus</i>
• <i>Turnip mosaic virus</i>	TuMV	<i>Potyvirus</i>
계	20	

<sup>a</sup> 파란 글씨: 국내 검역병해충으로 지정되어 있는 바이러스(6종).

• 국내 보고종 : 12종.

- 전 세계에서 툴립에 보고된 바이러스는 20종 중에서 11종에 대한 진단법은 선행연구를 통하여 개발되어 경북대학교 식물바이러스연구실에서 보유 중인 프라이머를 사용하였음(표 2).
- 검역병해충으로 지정된 바이러스의 경우 농림축산검역본부에서 고시한 진단법을 확보하였음.
- 9종 바이러스의 미보유 진단법은 NCBI GenBank의 서열을 이용하여 종 특이적 프라이머를 설계하였음(표 4).

표 2. 경북대학교에서 보유한 툴립 보고 바이러스 진단법<sup>a</sup>

바이러스	약어	이름	염기서열 (5' to 3')	크기 (bp)
<i>Arabidopsis mosaic virus</i>	ArMV	ArM-C32	ATTGGGGAAGGACGGAACAGAAAGA	780
		ArM-N30	AACGCGGGGTCTTGCTGGTA	
<i>Bean yellow mosaic virus</i>	BYMV	BYM-N40	GCAGAAAAGCTTGGTATC	782
		BYM-C20	TTAAGAACTATTTTTCCACCA	
<i>Clover yellow mosaic virus</i>	CIYMV	CIYMV-F1	CGTGTACGAGCATCTCTCTCC	383
		CIYMV-R1	TCGTCGTATCTCGCCACGTCT	
<i>Cucumber mosaic virus</i>	CMV	CMR3-C60	CGACTGACCATTTTAGCCGTA	438
		CMR3-N20	ATTTGATTCTACCGTGTGG	
<i>Raspberry ringspot virus</i>	RpRSV	RpRS-C15	GGTGCATATTCTTTCAAGGGAGGAT	673
		RpRS-N37	CAAAGAGTGCGCTGTTCCATA	
<i>Tobacco mosaic virus</i>	TMV	TM-N1	ATCGATGATGATTCGGAGGCTACTG	501
		TM-C2	AACCAGAAGAGCTCTCGAAAGAGCT	
<i>Tobacco necrosis virus</i>	TNV	TNV-D-N10	GAGTTGGCCTGGCTGAATCTTT	781
		TNV-D-C10	ATGGTGGGATTGACTGGTTC	
<i>Tobacco ringspot virus</i>	TRSV	TRSV-C80	TAAGTCCCGGAATATGAAAT	691
		TRSV-N10	GTTGTTCCCGATCCCACTTGTT	
<i>Tomato black ring virus</i>	TBRV	TBR-N40	ACTGTGTTAAATCGCCCGCA	510
		TBR-C30	TGCCAGCCTCAACGAAATC	
<i>Tomato bushy stunt virus</i>	TBSV	TBS-N25	AAATTTACCGGAAGGACATCTGG	570
		TBS-C25	GGCCAAAGTTCCGGTAAGGTC	
<i>Turnip mosaic virus</i>	TuMV	TuM-N60	ACATTGAAAAGCGTAACCA	461
		TuM-C10	TCACCACATGCGCTAACACCAA	

<sup>a</sup> 기존 연구를 통하여 개발되어 경북대학교 식물바이러스연구실에서 보유 중인 툴립 바이러스의 종 특이적 진단법 목록임.

표 3. 튨립 보고 바이러스 9종의 진단을 위하여 설계한 프라이머<sup>a</sup>

바이러스 종	약어	프라이머	서열 (5' to 3')	크기 (bp)
<i>Lily mottle virus</i>	LMoV	LMoV-F6711	CTGAAGCTAGTTTGATCACTCG	358
		LMoV-R7068	CTGCTTTGAAGTCCAACAGG	
		LMoV-F8164	CTTTGCGAACACTTTCCAGC	605
		LMoV-R8768	GGATTTGGTATGTTCCACG	
		LMoV-F8164	CTTTGCGAACACTTTCCAGC	812
		LMoV-R8975	CATTCATTGCGAGAGCCATAC	
<i>Lily symptomless virus</i>	LSV	LSV-F7013	CTTGGTCGACAGGGACATAAC	326
		LSV-R7338	GATTGGAATTGTGCTTTTCAGC	
		LSV-F7077	CACCTTTAGGTTTACAGGCTG	262
		LSV-R7338	GATTGGAATTGTGCTTTTCAGC	
		LSV-F7013	CTTGGTCGACAGGGACATAAC	485
		LSV-R7497	CCATTTGCAATATACTGATGCG	
		LSV-F7077	CACCTTTAGGTTTACAGGCTG	421
		LSV-R7497	CCATTTGCAATATACTGATGCG	
<i>Olive latent virus 1</i>	OLV-1	OLV-1-F2603	CATTTGCAACTCTCTCAAC	608
		OLV-1-R3210	CATTCCAGGAATGTTGCCG	
		OLV-1-F2603	CATTTGCAACTCTCTCAAC	852
		OLV-1-R3454	CTCACCCATCGTTGTGTGG	
		OLV-1-F2667	CGAAAGTGGACCACAGCG	544
		OLV-1-R3210	CATTCCAGGAATGTTGCCG	
		OLV-1-F2667	CGAAAGTGGACCACAGCG	788
		OLV-1-R3454	CTCACCCATCGTTGTGTGG	
<i>Pelargonium leaf curl virus</i>	PLCV	PLCV-F2722	GGCAACTATTGTTGGCACTG	558
		PLCV-R3279	GCTGTCTCTTTGAGCACTC	
		PLCV-F2722	GGCAACTATTGTTGGCACTG	701
		PLCV-R3422	CAATAGCGTTAGTCCCGGAG	
		PLCV-F2853	GAGGAAATCAGCAGATGATAC	427
		PLCV-R3279	GCTGTCTCTTTGAGCACTC	
		PLCV-F2853	GAGGAAATCAGCAGATGATAC	570
		PLCV-R3422	CAATAGCGTTAGTCCCGGAG	
<i>Rembrandt tulip breaking virus</i>	ReTBV	ReTBV-F156	GTCCGGACTTTGAGTACATATTG	419
		ReTBV-R574	GTACGCCTCCAACACTACTCT	
		ReTBV-F156	GTCCGGACTTTGAGTACATATTG	450
		ReTBV-R605	CAAACCTCCTCCAGCAGATTC	
		ReTBV-F156	GTCCGGACTTTGAGTACATATTG	930
		ReTBV-R1085	GTTCAATCATTGGACGCAATG	
		ReTBV-F177	TGGACCACTTATCCACAACG	398
		ReTBV-R574	GTACGCCTCCAACACTACTCT	
		ReTBV-F177	TGGACCACTTATCCACAACG	429
		ReTBV-R605	CAAACCTCCTCCAGCAGATTC	
		ReTBV-F177	TGGACCACTTATCCACAACG	909
		ReTBV-R1085	GTTCAATCATTGGACGCAATG	

(계속)

바이러스 종	약어	프라이머	서열 (5' to 3')	크기 (bp)
<i>Tulip breaking virus</i>	TBV	TBV-F7465	CTAATGGTGATATTAGCCATGC	652
		TBV-R8116	CAACTGATTTGCTACCGCTAG	
		TBV-F7465	CTAATGGTGATATTAGCCATGC	676
		TBV-R8140	GAGAAGATTCAGCAGCTGG	
		TBV-F7515	GTGTGTCATGGATGATTGTTGC	602
		TBV-R8116	CAACTGATTTGCTACCGCTAG	
		TBV-F7515	GTGTGTCATGGATGATTGTTGC	626
		TBV-R8140	GAGAAGATTCAGCAGCTGG	
<i>Tulip mild mottle mosaic virus</i>	TMMMV	TMMMV-F187	CAATTGCAGAGTAAAGTTCTTCC	596
		TMMMV-R782	GTACGTATAAAGATTCAAATGAGC	
		TMMMV-F187	CAATTGCAGAGTAAAGTTCTTCC	720
		TMMMV-R907	CTTACCACGCACAGCTGAG	
		TMMMV-F445	GCGAGATGAAACTTCAGTGG	338
		TMMMV-R782	GTACGTATAAAGATTCAAATGAGC	
		TMMMV-F445	GCGAGATGAAACTTCAGTGG	463
		TMMMV-R907	CTTACCACGCACAGCTGAG	
<i>Tulip virus X</i>	TVX	TVX-F5024	GACTACTTCCGACCACACTC	601
		TVX-R5624	GTGCGTTCCAGATAAGCTTG	
		TVX-F5024	GACTACTTCCGACCACACTC	664
		TVX-R5688	CACTTTTGGCCGGTTTTGAC	
		TVX-F5024	GACTACTTCCGACCACACTC	809
		TVX-R5832	GAGTTAGCTCTTGATTCGAAG	
		TVX-F5093	CTATCCGGA CT CATTCTACTTC	532
		TVX-R5624	GTGCGTTCCAGATAAGCTTG	
		TVX-F5093	CTATCCGGA CT CATTCTACTTC	596
		TVX-R5688	CACTTTTGGCCGGTTTTGAC	
		TVX-F5093	CTATCCGGA CT CATTCTACTTC	740
		TVX-R5832	GAGTTAGCTCTTGATTCGAAG	
<i>Tobacco rattle virus</i>	TRV	TRV_F1	GACGCATCGCTTGCGAAAGT	401
		TRV_R1	CCGGGTTCAATTCCTTATCGTTTTTC	
		TRV_F1	GACGCATCGCTTGCGAAAGT	467
		TRV_R2	GGATCATATCTCTGTCTGCC	
		TRV_F2	TCGTGCCAGATCCGGTAAAAGTTC	299
		TRV_R1	CCGGGTTCAATTCCTTATCGTTTTTC	
		TRV_F2	TCGTGCCAGATCCGGTAAAAGTTC	345
		TRV_R2	GGATCATATCTCTGTCTGCC	

<sup>a</sup> 툴립 바이러스 9종의 진단법 개발을 위하여 NCBI GenBank에 등록된 염기서열을 이용하여 종 특이적으로 반응하는 프라이머를 설계하였음.

- 전 세계적으로 수선화에 보고된 바이러스는 23종이며, 국내에는 14종의 바이러스가 보고됨 (표 4).

표 4. 전 세계적으로 수선화에서 발생 보고된 바이러스<sup>a</sup>

종	약어	속
<i>Arabidopsis mosaic virus</i>	ArMV	<i>Nepovirus</i>
• <i>Bean yellow mosaic virus</i>	BYMV	<i>Potyvirus</i>
• <i>Broad bean wilt virus</i>	BBWV	<i>Fabavirus</i>
• <i>Carnation latent virus</i>	CLV	<i>Carlavirus</i>
• <i>Cucumber mosaic virus</i>	CMV	<i>Cucumovirus</i>
<i>Cyrtanthus elatus virus A</i>	CEVA	<i>Potyvirus</i>
• <i>Lily mottle virus</i>	LMoV	<i>Potyvirus</i>
• <i>Narcissus common latent virus</i>	NCLV	<i>Carlavirus</i>
<i>Narcissus degeneration virus</i>	NDV	<i>Potyvirus</i>
<i>Narcissus late season yellows virus</i>	NLSYV	<i>Potyvirus</i>
• <i>Narcissus latent virus</i>	NLV	<i>Macluravirus</i>
<i>Narcissus mosaic virus</i>	NMV	<i>Potexvirus</i>
<i>Narcissus tip necrosis virus</i>	NTNV	Genus unsigned
<i>Narcissus yellow stripe virus</i>	NYSV	<i>Potyvirus</i>
<i>Nerine latent virus</i>	NeLV	<i>Carlavirus</i>
• <i>Ornithogalum mosaic virus</i>	OrMV	<i>Potyvirus</i>
<i>Raspberry ringspot virus</i>	RpRSV	<i>Nepovirus</i>
<i>Strawberry latent ringspot virus</i>	SLRSV	Genus unassigned
• <i>Tobacco necrosis virus</i>	TNV	<i>Necrovirus</i>
• <i>Tobacco rattle virus</i>	TRV	<i>Tobravirus</i>
• <i>Tobacco ringspot virus</i>	TRSV	<i>Nepovirus</i>
• <i>Tomato black ring virus</i>	TBRV	<i>Nepovirus</i>
• <i>Tomato ringspot virus</i>	ToRSV	<i>Nepovirus</i>
계	23	

<sup>a</sup> 파란 글씨: 국내 검역병해충으로 지정되어 있는 바이러스(7종).

- 국내 보고종 : 14종.

- 전 세계에서 수선화에 보고된 바이러스 23종 중에서 11종에 대한 진단법은 기존 연구를 통하여 개발되어 경북대학교 식물바이러스연구실에서 보유 중인 프라이머를 사용하였음(표 5).
- 검역병해충으로 지정된 바이러스의 경우 농림축산검역본부에서 고시한 진단법을 확보하였음.
- 진단법 미보유 12종 바이러스의 진단법은 NCBI GenBank의 서열을 이용하여 종 특이적 프라이머를 설계하였음(표 6).

표 5. 경북대학교에서 보유한 수선화 보고 바이러스 진단법<sup>a</sup>

바이러스	약어	프라이머 이름	염기서열 (5' to 3')	크기 (bp)
<i>Arabidopsis mosaic virus</i>	ArMV	ArM-C32	ATTGGGGAAGGACGGAACAGAAAGA	780
		ArM-N30	AACGCGGGGTCTTGCTGGTA	
<i>Bean yellow mosaic virus</i>	BYMV	BYM-N40	GCAGAAAAGCTTGGTATC	782
		BYM-C20	TTAAGAACTATTTTTCCACCA	
<i>Broad bean wilt virus 2</i>	BBWV2	BBW2-N30	GTTGGTGCGATGTCAGG	579
		BBW2-C40	GCTAGGTCCAGGCAAATTGTA	
<i>Cucumber mosaic virus</i>	CMV	CMR3-C60	CGACTGACCATTTTAGCCGTA	438
		CMR3-N20	ATTTGATTCTACCGTGTGG	
<i>Onion yellow dwarf virus</i>	OYDV	OYD-N25	CACCNTAYATAGCRGARACAGCTCT	602
		OYD-C06	ACTGAAATGCGCCATTATYTYGCTA	
<i>Raspberry ringspot virus</i>	RpRSV	RpRS-C15	GGTGCATATTCTTTCAAGGGAGGAT	673
		RpRS-N37	CAAAGAGTGCCTGTTCCATA	
<i>Strawberry latent ringspot virus</i>	SLRSV	SLRSV-N10	TAATGTGGGCACTACCGTCT	749
		SLRSV-C70	CCTTTCCAGTAACGGTGATT	
<i>Tobacco necrosis virus</i>	TNV	TNV-D-N10	GAGTTGGCCTGGCTGAATCTTT	781
		TNV-D-C10	ATGGTGGGATTGACTGGTTC	
<i>Tobacco ringspot virus</i>	TRSV	TRSV-C80	TAAGTCCCGGGAATATGAAAT	691
		TRSV-N10	GTTGTTCCCGATCCCCTTGTT	
<i>Tomato black ring virus</i>	TBRV	TBR-N40	ACTGTGTTAAATCGCCCGCA	510
		TBR-C30	TGCCAGCCTCAACGAAATC	
<i>Tomato ringspot virus</i>	ToRSV	ToRSV-R1-C20	AAAATTTARCATCGGGCACATC	549
		ToRSV-R1-N120	TACCACGCCCCCTTGTA	

<sup>a</sup> 기존 연구를 통하여 개발되어 경북대학교 식물바이러스연구실에서 보유 중인 수선화 바이러스의 종 특이적 진단법 목록임.

표 6. 수선화 바이러스 12종의 진단을 위하여 설계된 프라이머<sup>a</sup>

바이러스 종	약어	프라이머	서열 (5' to 3')	크기 (bp)
<i>Carnation latent virus</i>	CLV	CLV-F7037	GTCTCATATTTGGCACTCTTAC	960
		CLV-R7996	CCGTTGGAATCCTCAGCAG	
		CLV-F7037	GTCTCATATTTGGCACTCTTAC	1036
		CLV-R8072	CTAGAGAATCTTGCATTTCTACG	
		CLV-F7174	GAATTCACAACCTTAGGTTAC	823
		CLV-R7996	CCGTTGGAATCCTCAGCAG	
		CLV-F7174	GAATTCACAACCTTAGGTTAC	899
CLV-R8072	CTAGAGAATCTTGCATTTCTACG			
<i>Cyrtanthus elatus virus A</i>	CEVA	CEVA-F8911	GAGGAAGAGTTGGAAAAATATTAC	594
		CEVA-R9504	CCGTTTCAGTAACATTTCTCTTC	
		CEVA-F8911	GAGGAAGAGTTGGAAAAATATTAC	631
		CEVA-R9541	CTCTCAGATTCCTTTGGAGG	
		CEVA-F8982	CTTCCAGTCTGACGAAACAAC	523
		CEVA-R9504	CCGTTTCAGTAACATTTCTCTTC	
		CEVA-F8982	CTTCCAGTCTGACGAAACAAC	560
CEVA-R9541	CTCTCAGATTCCTTTGGAGG			
<i>Lily mottle virus</i>	LMoV	LMoV-F6711	CTGAAGCTAGTTTGATCACTCG	358
		LMoV-R7068	CTGCTTTGAAGTCCAACAGG	
		LMoV-F8164	CTTTGCGAACACTTTCCAGC	605
		LMoV-R8768	GGATTTGGTATGTTCCCACG	
		LMoV-F8164	CTTTGCGAACACTTTCCAGC	812
LMoV-R8975	CATTCATTGCGAGAGCCATAC			
<i>Narcissus common latent virus</i>	NCLV	NCLV-F7013	CACTAATGCTTTTGCTTCTAGC	326
		NCLV-R7338	CTTCTTCAGTTTGTCTGCATTC	
		NCLV-F7013	CACTAATGCTTTTGCTTCTAGC	485
		NCLV-R7497	CATGTCGTCAGCCAAGTTC	
		NCLV-F7077	CACAGCACAACCGAGCTGTC	262
		NCLV-R7338	CTTCTTCAGTTTGTCTGCATTC	
		NCLV-F7077	CACAGCACAACCGAGCTGTC	421
NCLV-R7497	CATGTCGTCAGCCAAGTTC			
<i>Narcissus degeneration virus</i>	NDV	NDV-F6537	GCAAAAGAAATGGATCTAACGG	751
		NDV-R7287	CCTTAAGCGTACGAAACATAC	
		NDV-F6537	GCAAAAGAAATGGATCTAACGG	796
		NDV-R7332	CATCGTGTGATTGCATACCAAC	
		NDV-F6619	GTTTGCGTAACTATAGTCCG	669
		NDV-R7287	CCTTAAGCGTACGAAACATAC	
		NDV-F6619	GTTTGCGTAACTATAGTCCG	714
NDV-R7332	CATCGTGTGATTGCATACCAAC			

(계속)

바이러스 종	약어	프라이머	서열 (5' to 3')	크기 (bp)
<i>Narcissus late season yellows virus</i>	NLSYV	NLSYV-F8399	GTCTCAAGCACCTTATAGTG	474
		NLSYV-R8872	CATGTGTCTCGAATTGCCTTTG	
		NLSYV-F8399	GTCTCAAGCACCTTATAGTG	897
		NLSYV-R9295	CCAAATAAATGATTTTGCGTGCC	
		NLSYV-F8439	GCACCATACATTGCTGAGAC	434
		NLSYV-R8872	CATGTGTCTCGAATTGCCTTTG	
		NLSYV-F8439	GCACCATACATTGCTGAGAC	857
		NLSYV-R9295	CCAAATAAATGATTTTGCGTGCC	
<i>Narcissus latent virus</i>	NLV	NLV-F6653	GATAGTTCAGGTGGGTGAG	782
		NLV-R7434	CAACCGTCCACGCATCATC	
		NLV-F6653	GATAGTTCAGGTGGGTGAG	1,077
		NLV-R7729	GTGTTTGTGACGACATAGTAG	
		NLV-F6952	GCGTGGATTTTGAGAGTGAC	483
		NLV-R7434	CAACCGTCCACGCATCATC	
		NLV-F6952	GCGTGGATTTTGAGAGTGAC	778
		NLV-R7729	GTGTTTGTGACGACATAGTAG	
<i>Narcissus mosaic virus</i>	NMV	NMV-F6066	GAAGTCCCAACAACCTGATC	528
		NMV-R6593	GGACGTTTGAGTCTAGTAGC	
		NMV-F6066	GAAGTCCCAACAACCTGATC	801
		NMV-R6866	GAGGTGCTTCAATGGCGTAC	
		NMV-F6100	CTCAATCTATCACCGTGGAAC	494
		NMV-R6593	GGACGTTTGAGTCTAGTAGC	
		NMV-F6100	CTCAATCTATCACCGTGGAAC	767
		NMV-R6866	GAGGTGCTTCAATGGCGTAC	
<i>Narcissus yellow stripe virus</i>	NYSV	NYSV-F8438	CTCTCCCAAGCACCATACAG	502
		NYSV-R8939	CGTATTCTGATTTTACTCCTTC	
		NYSV-F8438	CTCTCCCAAGCACCATACAG	1068
		NYSV-R9505	CTCTACGATGAGAATACTAACG	
		NYSV-F8628	CACTTGATGCCGGTCTAGAG	312
		NYSV-R8939	CGTATTCTGATTTTACTCCTTC	
		NYSV-F8628	CACTTGATGCCGGTCTAGAG	878
		NYSV-R9505	CTCTACGATGAGAATACTAACG	

(계속)

바이러스 종	약어	프라이머	서열 (5' to 3')	크기 (bp)	
<i>Nerine latent virus</i>	NeLV	NeLV-F6940	GTTCTAAGAGTTTAGTGTCTCTC	628	
		NeLV-R7567	GTAAGCACGGCAAAGGCTC		
	NeLV	NeLV-F6940	GTTCTAAGAGTTTAGTGTCTCTC	719	
		NeLV-R7658	CAGCAAATTTTGTGGTTCACTG		
		NeLV-F7300	CAAAAAGGTTGGAGACCTTC		268
		NeLV-R7567	GTAAGCACGGCAAAGGCTC		
		NeLV-F7300	CAAAAAGGTTGGAGACCTTC		359
		NeLV-R7658	CAGCAAATTTTGTGGTTCACTG		
<i>Ornithogalum mosaic virus</i>	OrMV	OrMV-F8539	CTACCAAAGTGCGAGGAAAG	655	
		OrMV-R9193	CTAATCCACCTTCACTAAATCAC		
	OrMV	OrMV-F8539	CTACCAAAGTGCGAGGAAAG	706	
		OrMV-R9244	GCATAATTCAAAAGAAAGGATGC		
		OrMV-F8887	GAGAAAAGAACTCGGAACAAAG		307
		OrMV-R9193	CTAATCCACCTTCACTAAATCAC		
		OrMV-F8887	GAGAAAAGAACTCGGAACAAAG		358
		OrMV-R9244	GCATAATTCAAAAGAAAGGATGC		
<i>Tobacco rattle virus</i>	TRV	TRV_F1	GACGCATCGCTTGCGAAAGT	401	
		TRV_R1	CCGGGTTCAATTCCTTATCGTTTTTC		
	TRV	TRV_F1	GACGCATCGCTTGCGAAAGT	467	
		TRV_R2	GGATCATATCTCTGTCTGCC		
		TRV_F2	TCGTGCCAGATCCGGTAAAAGTTC		299
		TRV_R1	CCGGGTTCAATTCCTTATCGTTTTTC		
		TRV_F2	TCGTGCCAGATCCGGTAAAAGTTC		345
		TRV_R2	GGATCATATCTCTGTCTGCC		

<sup>a</sup> 수선화 바이러스 12종의 진단법 개발을 위하여 NCBI GenBank에 등록된 염기서열을 이용하여 종 특이적으로 반응하는 프라이머를 설계하였음.

- 보고된 바이러스 목록(표 1, 2)을 기반으로 확보한 진단법을 이용하여 RT-PCR 분석을 수행하였음.
- 채집한 튤립과 86점과 수선화 시료 75점을 각각 풀링(pooling)하여 하나로 된 검체를 대상으로 전 세계 보고 바이러스를 대상으로 진단하였음.
- 진단 결과, 튤립에서 3종(표 7), 수선화에서 7종 바이러스가 검출되었음(표 8).

**표 7. RT-PCR 진단을 통하여 검출된 튤립 바이러스 3종<sup>a</sup>**

종	약어	속
<i>Lily symptomless virus</i>	LSV	<i>Carlavirus</i>
<i>Tulip breaking virus</i>	TBV	<i>Potyvirus</i>
<i>Tulip virus X</i>	TVX	<i>Potexvirus</i>

<sup>a</sup> 보고 바이러스 목록 기반 RT-PCR 진단 결과, 검출된 바이러스는 3종이며 추후 메타전사체분석 결과와 비교하였음.

**표 8. RT-PCR 진단을 통하여 검출된 수선화 바이러스 7종<sup>a</sup>**

종	약어	속
<i>Cyrtanthus elatus virus A</i>	CEVA	<i>Carlavirus</i>
<i>Narcissus late season yellows virus</i>	NLSYV	<i>Potyvirus</i>
<i>Narcissus latent virus</i>	NLV	<i>Macluravirus</i>
<i>Narcissus mosaic virus</i>	NMV	<i>Potextvirus</i>
<i>Narcissus yellow stripe virus</i>	NYSV	<i>Potyvirus</i>
<i>Onion yellow dwarf virus</i>	OYDV	<i>Potyvirus</i>
<i>Tobacco rattle virus</i>	TRV	<i>Tobravirus</i>

<sup>a</sup> 보고 바이러스 목록 기반 RT-PCR 진단 결과, 검출된 바이러스는 7종이며 추후 메타전사체분석 결과와 비교하였음.

### 3. 전사체 분석 기반 구근 화훼류 바이러스 탐색

○ 전사체 분석을 통하여 바이러스 관련 염기서열 탐색

- RT-PCR 기반 검정에서 예측할 수 없는 바이러스를 탐색하기 위하여 차세대염기서열분석법(Next generation sequencing, NGS) 기반 메타전사체 분석을 수행하였음.
- 메타전사체 분석은 채집한 튜립과 수선화 시료를 이용하여 작물별로 각각 수행하였음.
- 작물별로 채집한 시료의 지상부(잎, 꽃 등)를 적정량 취하여 집단화(pooling)된 하나의 검체로 만들어 분석을 수행하였음.
- 작물별로 각각 약 60 Gbps의 raw data를 생성하였으며, raw data를 기존의 생물정보 DB를 기반으로 *de novo assembly*를 수행하여 튜립과 수선화 시료에서 각각 498,795개, 96,215개의 contig를 생성하였음(표 9, 표 10).

표 9. 국내 튜립과 수선화의 메타전사체 분석을 위하여 생성한 raw data<sup>a, b</sup>

작물	Read 수	GC 비율(%)	Q20(%)	Q30(%)
튜립	648,148,622	45.65	98.88	96.32
수선화	656,983,494	43.77	98.55	95.73

<sup>a</sup> 채집한 시료의 전체 전사체 분석을 위하여 작물별로 풀링(pooling)한 하나의 검체를 이용하여 시퀀싱을 진행하였음.

<sup>b</sup> Read 수: 시퀀싱을 통하여 확보한 read의 수, GC 비율(%): 시퀀싱한 서열의 GC 비율, Q20(%) 및 Q30: phred score가 20 또는 30 이상인 염기 비율.

표 10. 국내 튜립과 수선화의 메타전사체 분석을 통하여 확보한 contig 통계 정보<sup>a, b</sup>

작물	Contig 수	GC 비율(%)	평균 길이(bp)
튜립	498,795	42.59	418.23
수선화	96,215	40.26	531.60

<sup>a</sup> Raw data로부터 *de novo assembly*를 수행하기 위하여 Trinity version trinityrnaseq\_r20140717, bowtie 1.1.2 소프트웨어를 이용하였음.

<sup>b</sup> 전사체의 annotation을 위하여 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG), NCBI Nucleotide(NT), Pfam, Gene ontology(GO), NCBI non-redundant Protein(NR), UniProt, EggNOG의 데이터베이스에 BLASTn 및 BLASTx를 수행하였음.

- 메타전사체 분석을 통하여 튜립에서는 4종, 수선화에서는 10종의 식물바이러스로부터 유래된 것으로 판단되는 contig가 탐색 되었음.
- 튜립에서는 RT-PCR 진단으로 검출된 3종(표 7)을 포함하여 메타전사체 분석으로 새롭게 1종의 바이러스가 탐색 되었음(표 11-12, 그림 4-7)

표 11. 메타전사체 분석을 통하여 튜립에서 검출된 식물바이러스 목록<sup>a</sup>

작물	검출된 바이러스			
	과명	속명	종명	Contig 수
튜립	<i>Betaflexivirus</i>	<i>Carlavirus</i>	<i>Lily symptomless virus</i>	1
	<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Tulip breaking virus</i>	1
	<i>Alphaflexiviridae</i>	<i>Potexvirus</i>	<i>Tulip virus X</i>	1
	<i>Tombusviridae</i>	<i>Alphanecrovirus</i>	<i>Olive mild mosaic virus</i>	1

<sup>a</sup> 파란 글씨: 메타전사체 분석을 통하여 새롭게 탐색 된 바이러스.

표 12. 튜립의 메타전사체 분석으로 획득한 식물바이러스 관련 contig의 NCBI BLAST 분석 결과<sup>a, b</sup>

Contig ID	Read count	BLASTn Description	Query Length (bp)	Query cover (%)	Identity (%)	Accession No.
c937791_g1_l1	32,749	Lily symptomless virus genes for polymerase, TGBp1, TGBp2, TGBp3, coat protein and nucleic acid binding protein genomic RNA, isolate Sb	8,387	99	99	MK649770
c940618_g4_l1	7,217,924	Tulip breaking virus isolate BC24 polyprotein gene, partial cds	9,590	94	99	MH886517
c928274_g1_l1	24,068	Tulip virus X genomic RNA, complete genome	6,076	99	100	AB066288
c894923_g1_l1	201,346	Olive mild mosaic virus isolate PPO-L190209 p23, RdRp, small protein, and coat protein genes, complete cds	3,713	95	99	KY769774

<sup>a</sup> 국내 튜립에서 발생하는 바이러스를 탐색하기 위하여 주요 재배지역에서 채집한 튜립을 이용하여 메타전사체 분석을 수행하였음. 4종의 바이러스로부터 유래된 것으로 추정되는 contig가 각 1개씩 탐색되었음.

<sup>b</sup> 파란 글씨: 메타전사체 분석을 통하여 새롭게 탐색 된 바이러스.

*Lily symptomless virus*  
Genus : *Carlavirus*  
ss(+) RNA virus

Length range  
Min = 8,393; max = 8,393

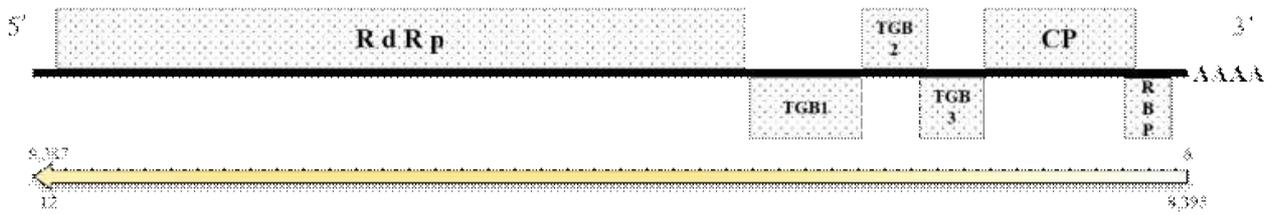


그림 4. 튜립의 메타전사체 분석에서 검출된 *Lily symptomless virus*(LSV) 관련 contig의 모식도. 메타전사체 분석을 통하여 LSV 관련 contig는 1개가 검출되었음. 검출된 contig의 길이는 8,393 bp임. NCBI BLASTn 분석을 수행하여 위치를 표시함. 검정 막대는 LSV의 게놈 모식도를 나타내며, 노란색 화살 막대는 검출된 LSV 관련 contig의 상대적 위치를 나타냄.

*Tulip breaking virus*  
Genus : *Potyvirus*  
ss(+) RNA virus

Length range  
Min = 9,081; max = 9,081

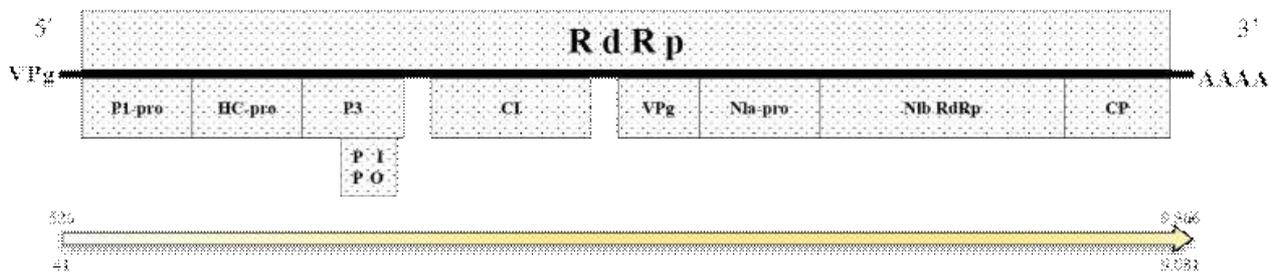


그림 5. 튜립의 메타전사체 분석에서 검출된 *Tulip breaking virus*(TBV) 관련 contig의 모식도. 메타전사체 분석을 통하여 TBV 관련 contig는 1개가 검출되었음. 검출된 contig의 길이는 9,081 bp임. NCBI BLASTn 분석을 수행하여 위치를 표시함. 검정 막대는 TBV의 게놈 모식도를 나타내며, 노란색 화살 막대는 검출된 TBV 관련 contig의 상대적 위치를 나타냄.

*Tulip virus X*  
Genus : *Potexvirus*  
ss(+) RNA virus

Length range  
Min = 6,076; max = 6,076

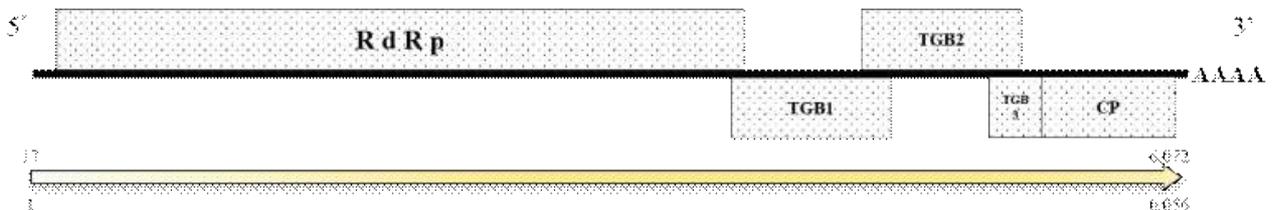


그림 6. 튜립의 메타전사체 분석에서 검출된 *Tulip virus X*(TVX) 관련 contig의 모식도. 메타전사체 분석을 통하여 1개의 TVX 관련 contig가 검출되었음. 검출된 contig의 길이는 6,076 bp임. NCBI BLASTn 분석을 수행하여 위치를 표시함. 검정 막대는 TVX의 게놈 모식도를 나타내며, 노란색 화살 막대는 검출된 TVX 관련 contig의 상대적 위치를 나타냄.

*Olive mild mosaic virus*      Length range  
 Genus : *Alphanecrovirus*      Min = 3,556; max = 3,556  
 ss(+) RNA virus

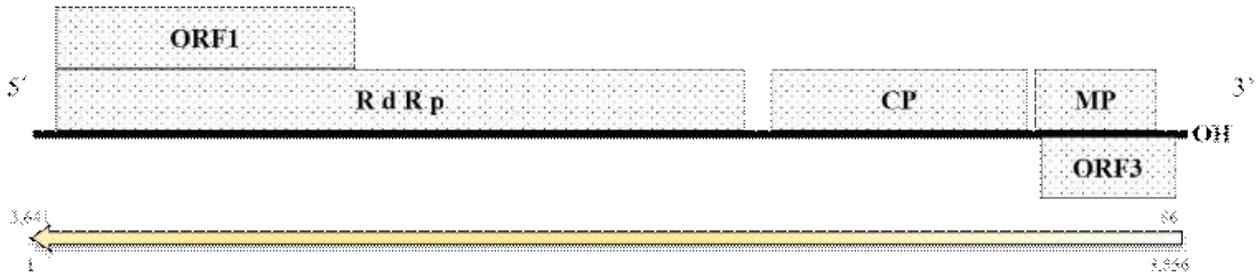


그림 7. 툼립의 메타전사체 분석에서 검출된 *Olive mild mosaic virus*(OMMV) 관련 contig의 모식도. 메타전사체 분석을 통하여 1개의 OMMV 관련 contig가 검출되었음. 검출된 contig의 길이는 3,556 bp임. NCBI BLASTn 분석을 수행하여 위치를 표시함. 검정 막대는 OMMV의 게놈 모식도를 나타내며, 노란색 화살 막대는 검출된 OMMV 관련 contig의 상대적 위치를 나타냄.

- 수선화에서는 RT-PCR 진단으로 검출된 7종 중 6종과 메타전사체 분석으로 새롭게 3종의 바이러스가 탐색 되었음(표 13, 그림 8-17)
- 반면, *Onion yellow dwarf virus*(OYDV)는 RT-PCR 검정에서 검출되었으나 메타전사체 분석에서는 탐색 되지 않음.
- 메타전사체 분석을 통하여 검출된 *Snowdrop virus* (SVY)가 OYDV와 유연관계가 가까운 바이러스로 분석되었으며, RT-PCR에서 사용한 OYDV 진단용 프라이머가 작동하여 SVY에 반응한 것을 확인함(그림 18).

표 13. 메타전사체 분석을 통하여 수선화에서 검출된 식물바이러스 목록<sup>a</sup>

작물	검출된 바이러스			
	과명	속명	종명	Contig 수
수선화	<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Cyrtanthus elatus virus A</i>	6
	<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Narcissus late season yellows virus</i>	1
	<i>Potyviridae</i>	<i>Macluravirus</i>	<i>Narcissus latent virus</i>	6
	<i>Potyviridae</i>	<i>Potexvirus</i>	<i>Narcissus mosaic virus</i>	1
	<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Narcissus yellow stripe virus</i>	9
	<i>Betaflexivirus</i>	<i>Carlavirus</i>	<i>Nerine latent virus</i>	1
	<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Snowdrop virus Y</i>	1
	<i>Tombusviridae</i>	<i>Betacarmovirus</i>	<i>Japanese iris necrotic ring virus</i>	1
	<i>Luteoviridae</i>	<i>Polerovirus</i>	<i>Turnip yellows virus</i>	3
	<i>Virgaviridae</i>	<i>Tobravirus</i>	<i>Tobacco rattle virus</i>	4

<sup>a</sup> 과란 글씨: 메타전사체 분석을 통하여 새롭게 탐색 된 바이러스.

표 14. 수선화의 메타전사체 분석으로 획득한 식물바이러스 관련 contig의 NCBI BLAST 분석 결과<sup>a, b</sup>

Contig ID	Read count	BLASTn Description	Query Length (bp)	Query cover (%)	Identity (%)	Accession No.
c506148_g5_j1	26,284	Cyrtanthus elatus virus A isolate Marijiniup7, complete genome	9,911	99	78	KX575832
c522005_g1_j2	5,267	Cyrtanthus elatus virus A isolate Marijiniup7, complete genome	3,646	99	97	KX575832
c506138_g6_j2	3,822	Cyrtanthus elatus virus A isolate Marijiniup7, complete genome	2,901	100	98	KX575832
c506148_g4_j1	2,000	Cyrtanthus elatus virus A isolate Marijiniup7, complete genome	1,713	100	92	KX575832
c510511_g2_j3	340	Cyrtanthus elatus virus A isolate Marijiniup7, complete genome	932	100	99	KX575832
c521624_g1_j2	100	Cyrtanthus elatus virus A isolate Marijiniup7, complete genome	860	100	9	KX575832
c521041_g1_j1	501,565	Japanese iris necrotic ring virus isolate Marijiniup10, complete genome	4,082	97	84	JQ807998
c531938_g1_j1	7,152,249	Narcissus late season yellows virus isolate BC37 polyprotein gene, complete cds	9,640	99	98	MH886515
c517188_g3_j1	10	Narcissus latent virus isolate BC37 polyprotein gene, complete cds	209	100	86	MH886520
c515860_g1_j1	295,036	Narcissus latent virus isolate BC37 polyprotein gene, complete cds	1,061	99	81	MH886520
c531579_g1_j1	3,776,859	Narcissus latent virus isolate NL, complete genome	8,243	98	95	KX979913
c526823_g1_j1	912,763	Narcissus latent virus isolate NL, complete genome	2,527	100	81	KX979913
c527268_g1_j1	5,656	Narcissus latent virus isolate NL, complete genome	1,429	100	82	KX979913
c506251_g1_j1	167,961	Narcissus latent virus isolate NLV5_1 polyprotein gene, partial cds	614	100	100	JX270766

(계속)

Contig ID	Read count	BLASTn Description	Query Length (bp)	Query cover (%)	Identity (%)	Accession No.
c530926_g1_j1	359,202	Narcissus mosaic virus genomic RNA, complete genome	6,970	99	97	D13747
c518465_g1_j1	81,914	Narcissus yellow stripe virus genomic RNA, nearly complete genome, isolate: NY-HG27	2,749	100	97	LC314397
c511617_g1_j1	63,541	Narcissus yellow stripe virus genomic RNA, nearly complete genome, isolate: NY-HG27	1,666	100	97	LC314397
c520767_g2_j1	13,465	Narcissus yellow stripe virus genomic RNA, nearly complete genome, isolate: NY-HG27	1,072	100	94	LC314397
c527648_g2_j1	13,576	Narcissus yellow stripe virus genomic RNA, nearly complete genome, isolate: NY-HG27	619	99	97	LC314397
c524748_g1_j1	97	Narcissus yellow stripe virus genomic RNA, nearly complete genome, isolate: NY-HG27	528	100	97	LC314397
c512714_g6_j1	63	Narcissus yellow stripe virus genomic RNA, nearly complete genome, isolate: NY-HG27	397	100	97	LC314397
c520767_g1_j1	5,807	Narcissus yellow stripe virus genomic RNA, nearly complete genome, isolate: NY-HG27	395	100	98	LC314397
c531322_g1_j1	547,002	Narcissus yellow stripe virus genomic RNA, nearly complete genome, isolate: NY-OI1	6,328	100	93	LC314391
c527648_g1_j1	166,940	Narcissus yellow stripe virus genomic RNA, nearly complete genome, isolate: NY-OI1	3,102	99	93	LC314391

(계속)

Contig ID	Read count	BLASTn Description	Query Length (bp)	Query cover (%)	Identity (%)	Accession No.
c531826_g1_j1	247,432	Nerine latent virus isolate Marijiniup5, complete genome	8,299	99	99	JQ395044
c530125_g1_j1	724,055	Snowdrop virus Y isolate BC28 polyprotein gene, partial cds	10,552	82	98	MH886519
c526106_g2_j1	401,869	Turnip yellows virus isolate 5511, complete genome	5,651	99	91	MT586596
c546615_g1_j1	2,890	Turnip yellows virus isolate WA-1, complete genome	415	97	91	JQ862472
c539321_g1_j1	7	Turnip yellows virus isolate WA-1, complete genome	278	100	92	JQ862472
c529797_g2_j1	211,3123	Tobacco rattle virus isolate DSMZ PV-1227 segment RNA 1, partial sequence	6,749	99	100	MW854287
c529797_g1_j1	5,802	Tobacco rattle virus isolate DSMZ PV-1227 segment RNA 1, partial sequence	317	100	100	MW854287
c508871_g1_j3	416,025	Tobacco rattle virus isolate DSMZ PV-1227 segment RNA 2, partial sequence	3,062	100	100	MW854288
c517281_g2_j5	1,459	Tobacco rattle virus isolate DSMZ PV-1227 segment RNA 2, partial sequence	2,612	83	100	MW854288

<sup>a</sup> 국내 수선화에서 발생하는 바이러스를 탐색하기 위하여 주요 재배지역에서 채집한 수선화를 이용하여 메타전사체 분석을 수행하였음. 식물바이러스 관련 contig는 33개가 탐색되었으며, 10종의 바이러스로부터 유래된 것으로 추정됨.

<sup>b</sup> 파란 글씨: 메타전사체 분석을 통하여 새롭게 탐색된 바이러스.

*Cyrtanthus elatus virus A*  
 Genus : *Potyvirus*  
 ss(+) RNA virus

Length range  
 Min = 859; max = 9,911

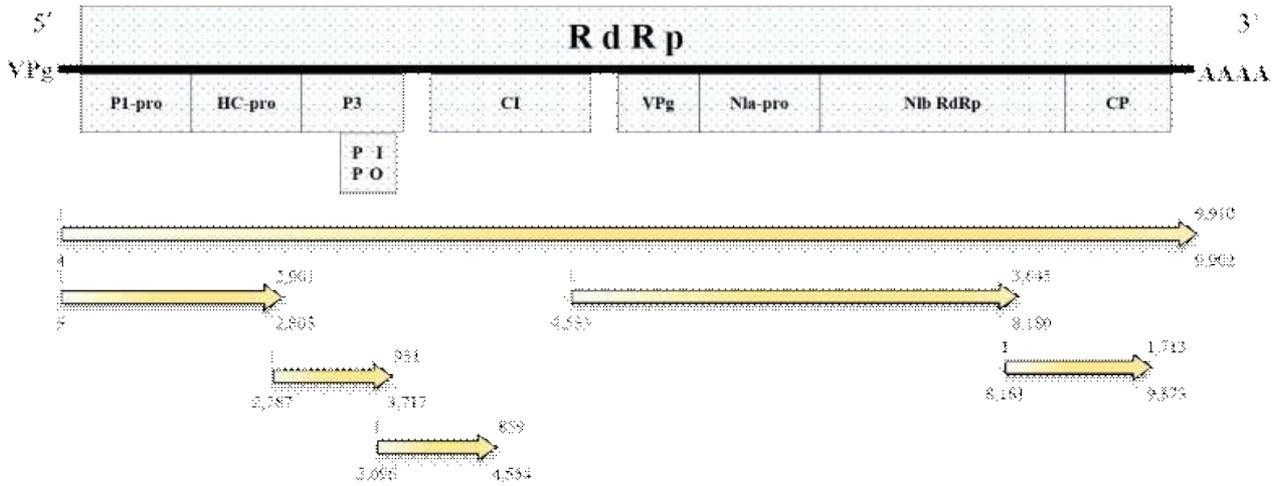


그림 8. 수선화의 메타전사체 분석에서 검출된 *Cyrtanthus elatus virus A*(CEVA) 관련 contig의 모식도. 메타전사체 분석을 통하여 6개의 CEVA 관련 contig가 검출되었음. 검출된 contig는 859 bp에서 9,911 bp의 길이로 구성되었음. NCBI BLASTn 분석을 수행하여 위치를 표시함. 검정 막대는 CEVA의 게놈 모식도를 나타내며, 노란색 화살 막대는 검출된 CEVA 관련 contig의 상대적 위치를 나타냄.

*Narcissus late season yellow virus*  
 Genus : *Potyvirus*  
 ss(+) RNA virus

Length range  
 Min = 9,643; max = 9,643

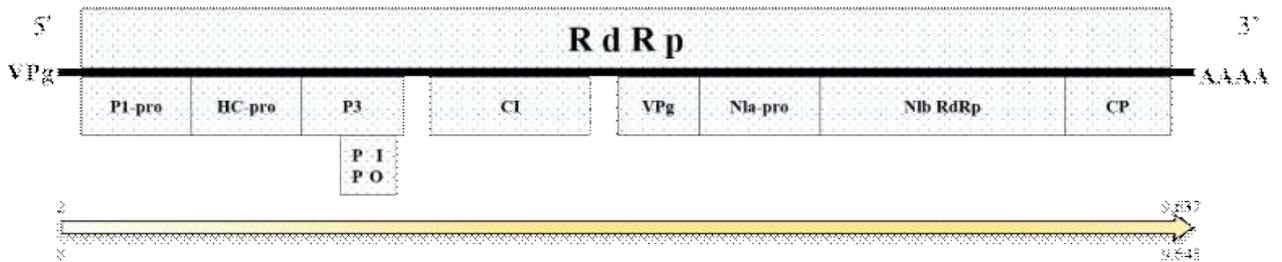


그림 9. 수선화의 메타전사체 분석에서 검출된 *Narcissus late season yellow virus*(NLSYV) 관련 contig의 모식도. 메타전사체 분석을 통하여 1개의 NLSYV 관련 contig가 검출되었음. 검출된 contig는 9,643 bp의 길이로 구성되었음. NCBI BLASTn 분석을 수행하여 위치를 표시함. 검정 막대는 NLSYV의 게놈 모식도를 나타내며, 노란색 화살 막대는 검출된 NLSYV 관련 contig의 상대적 위치를 나타냄.

*Narcissus latent virus*      Length range  
 Genus : *Macluravirus*      Min = 614; max = 8,243  
 ss(+) RNA virus

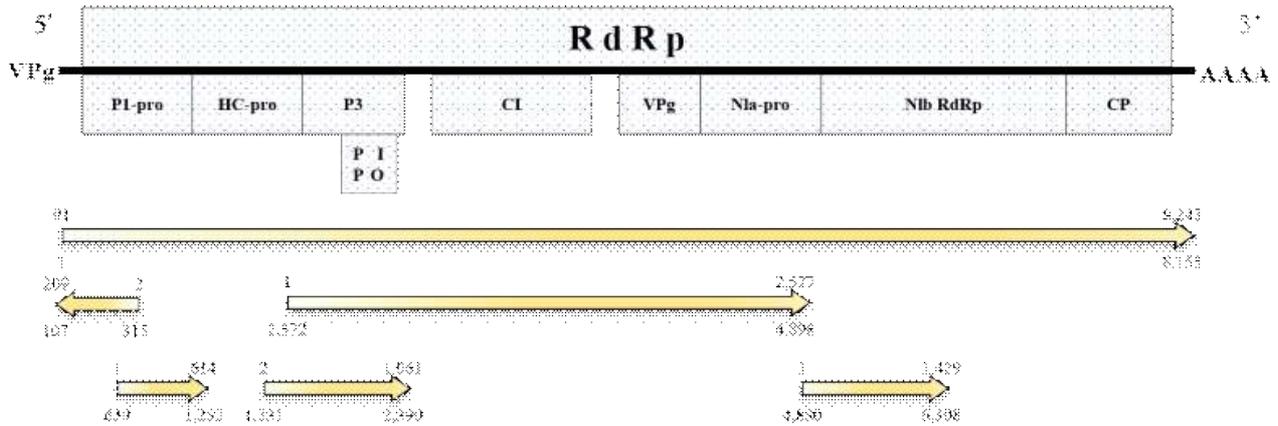


그림 10. 수선화의 메타전사체 분석에서 검출된 *Narcissus latent virus*(NLV) 관련 contig의 모식도. 메타전사체 분석을 통하여 6개의 NLV 관련 contig가 검출되었음. 검출된 contig는 614 bp에서 8,243 bp의 길이로 구성되었음. NCBI BLASTn 분석을 수행하여 위치를 표시함. 검정 막대는 NLV의 게놈 모식도를 나타내며, 노란색 화살 막대는 검출된 NLV 관련 contig의 상대적 위치를 나타냄.

*Narcissus mosaic virus*      Length range  
 Genus : *Potexvirus*      Min = 6,955; max = 6,955  
 ss(+) RNA virus

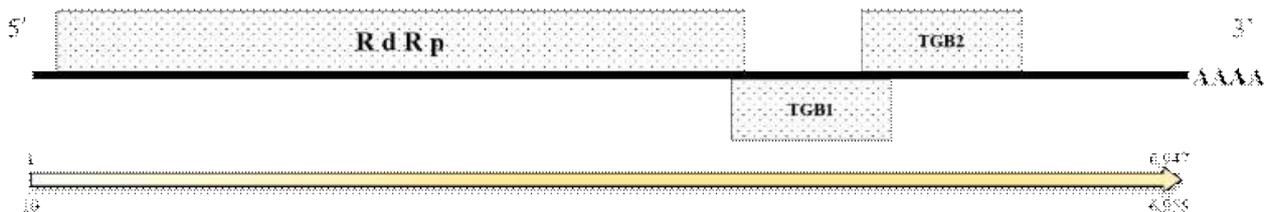


그림 11. 수선화의 메타전사체 분석에서 검출된 *Narcissus mosaic virus*(NMV) 관련 contig의 모식도. 메타전사체 분석을 통하여 NMV 관련 contig는 1개가 검출되었음. 검출된 contig의 길이는 6,955 bp임. NCBI BLASTn 분석을 수행하여 위치를 표시함. 검정 막대는 NMV의 게놈 모식도를 나타내며, 노란색 화살 막대는 검출된 NMV 관련 contig의 상대적 위치를 나타냄.

*Narcissus yellow stripe virus*

Length range

Genus : *Potyvirus*

Min = 395; max = 9,325

ss(+) RNA virus

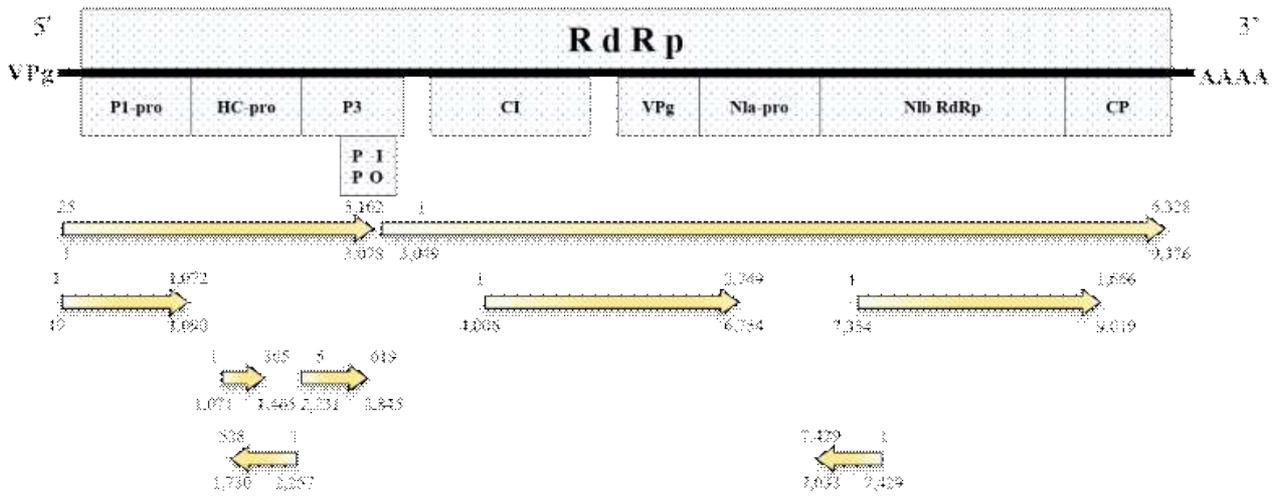


그림 12. 수선화의 메타전사체 분석에서 검출된 *Narcissus yellow stripe virus*(NYSV) 관련 contig의 모식도. 메타전사체 분석을 통하여 9개의 NYSV 관련 contig가 검출되었음. 검출된 contig는 395 bp에서 9,325 bp의 길이로 구성되었음. NCBI BLASTn 분석을 수행하여 위치를 표시함. 검정 막대는 NYSV의 게놈 모식도를 나타내며, 노란색 화살 막대는 검출된 NYSV 관련 contig의 상대적 위치를 나타냄.

*Nerine latent virus*

Length range

Genus : *Carlavirus*

Min = 8,299; max = 8,299

ss(+) RNA virus

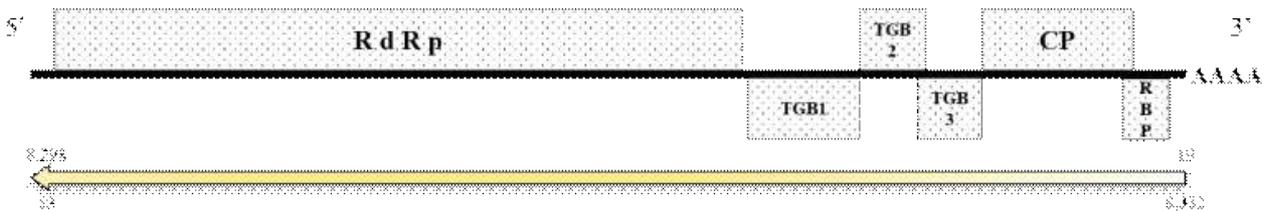


그림 13. 수선화의 메타전사체 분석에서 검출된 *Nerine latent virus*(NeLV) 관련 contig의 모식도. 메타전사체 분석을 통하여 1개의 NeLV 관련 contig가 검출되었음. 검출된 contig의 길이는 8,299 bp임. NCBI BLASTn 분석을 수행하여 위치를 표시함. 검정 막대는 NeLV의 게놈 모식도를 나타내며, 노란색 화살 막대는 검출된 NeLV 관련 contig의 상대적 위치를 나타냄.

*Snowdrop virus Y* Length range  
 Genus : unclassified *Potyvirus* Min = 3,050; max = 5,648  
 ss(+) RNA virus

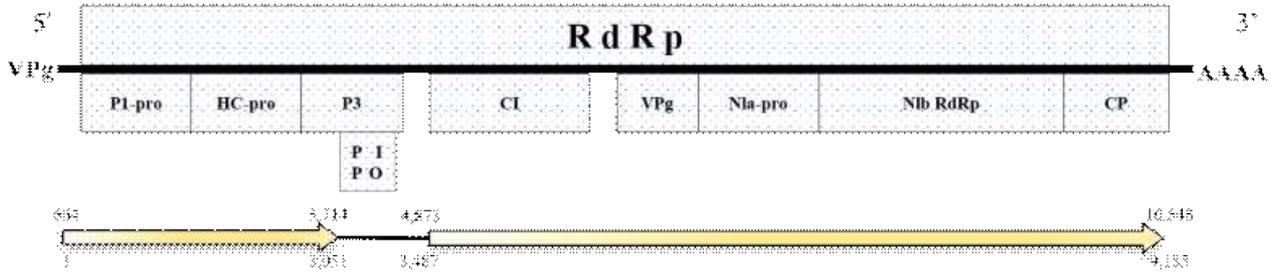


그림 14. 수선화의 메타전사체 분석에서 검출된 *Snowdrop virus Y*(SVY) 관련 contig의 모식도. 메타전사체 분석을 통하여 1개의 SVY 관련 contig가 검출되었음. 검출된 contig의 길이는 8,898 bp 임. NCBI BLASTn 분석을 수행하여 위치를 표시함. 검정 막대는 SVY의 게놈 모식도를 나타내며, 노란색 화살 막대는 검출된 SVY 관련 contig의 상대적 위치를 나타냄.

*Japanese iris necrotic ring virus* Length range  
 Genus : *Betacarmovirus* Min = 4,082; max = 4,082  
 ss(+) RNA virus

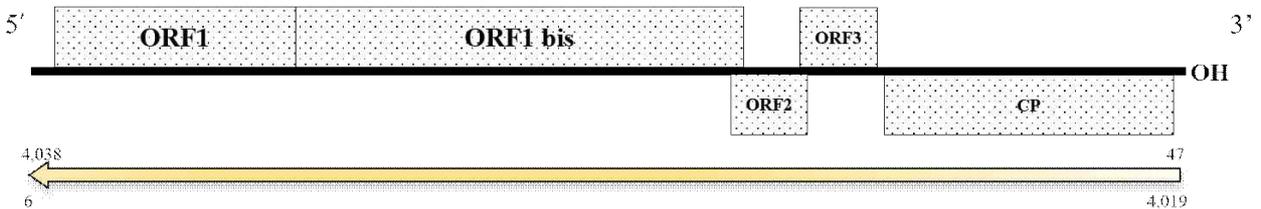


그림 15. 수선화의 메타전사체 분석에서 검출된 *Japanese iris necrotic ring virus*(JINRV) 관련 contig의 모식도. 메타전사체 분석을 통하여 1개의 JINRV 관련 contig가 검출되었음. 검출된 contig의 길이는 4,089 bp임. NCBI BLASTn 분석을 수행하여 위치를 표시함. 검정 막대는 JINRV의 게놈 모식도를 나타내며, 노란색 화살 막대는 검출된 JINRV 관련 contig의 상대적 위치를 나타냄.

*Turnip yellow virus*  
Genus : *Potterovirus*  
ss(+) RNA virus

Length range  
Min = 386; max = 5,627

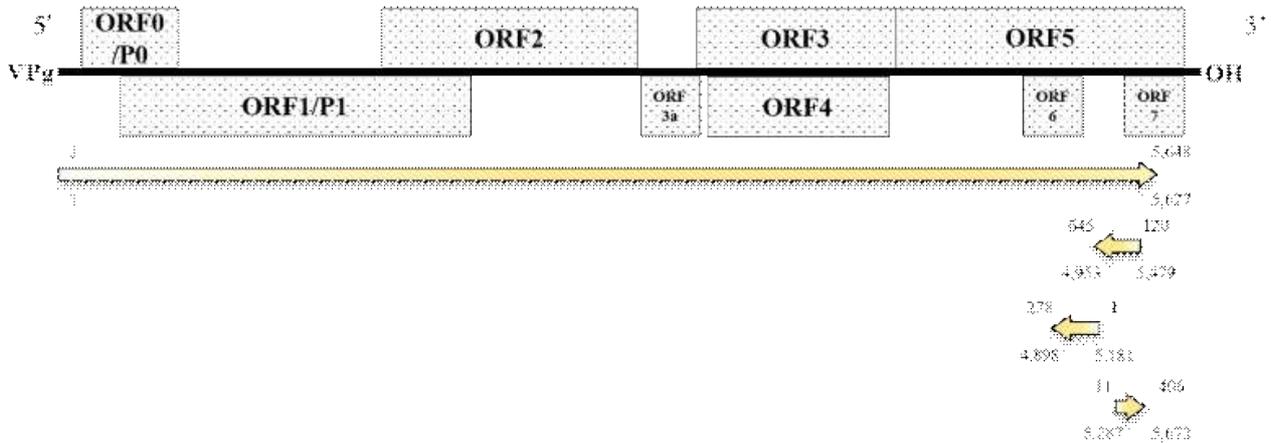


그림 16. 수선화의 메타전사체 분석에서 검출된 *Turnip yellow virus*(TuYV) 관련 contig의 모식도. 메타전사체 분석을 통하여 4개의 TuYV 관련 contig가 검출되었음. 검출된 contig는 386 bp에서 5,627 bp의 길이로 구성되었음. NCBI BLASTn 분석을 수행하여 위치를 표시함. 검정 막대는 TuYV의 게놈 모식도를 나타내며, 노란색 화살 막대는 검출된 TuYV 관련 contig의 상대적 위치를 나타냄.

*Tobacco rattle virus*  
Genus : *Tobravirus*  
ss(+) RNA virus

Length range  
Min = 572; max = 6,749

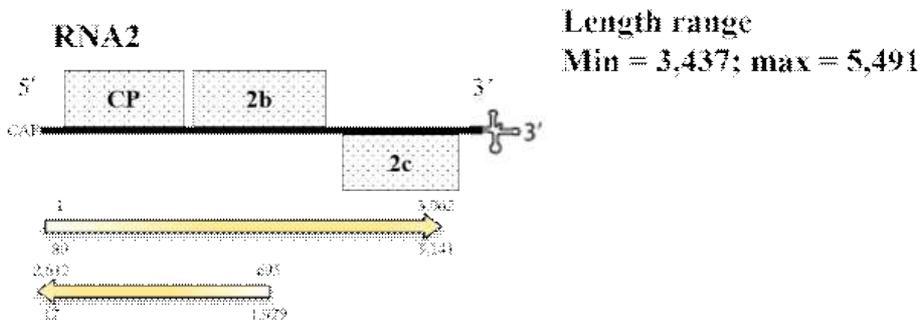
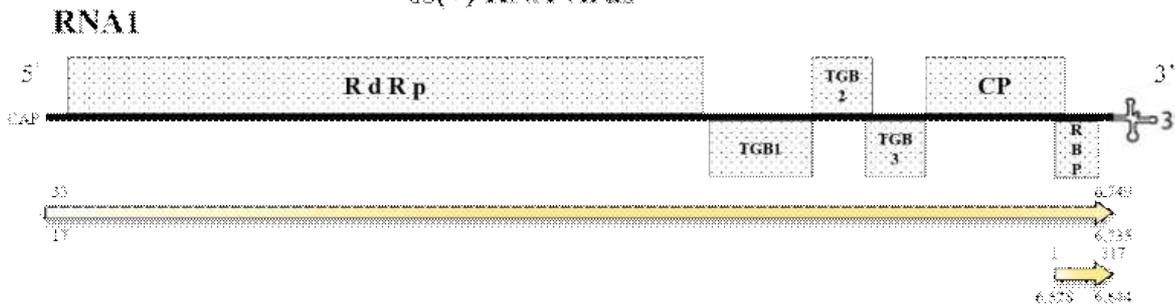


그림 17. 수선화의 메타전사체 분석에서 검출된 *Tobacco rattle virus*(TRV) 관련 contig의 모식도. 메타전사체 분석을 통하여 4개의 TRV 관련 contig가 검출되었음. 검출된 4개의 contig는 TRV의 RNA1과 RNA2에서 각각 2개씩 유래된 것으로 추정됨. 검출된 contig의 길이는 576 bp에서 6,749 bp로 구성되었음. NCBI BLASTn 분석을 수행하여 위치를 표시함. 검정 막대는 TRV의 게놈 모식도를 나타내며, 노란색 화살 막대는 검출된 TRV 관련 contig의 상대적 위치를 나타냄.

A1510223.1 Onion yellow dwarf virus gene for polyprotein, genomic RNA, isolate Yuhang  
 HQ258894.1 Onion yellow dwarf virus isolate MS/SW1, complete genome  
 JX429964.1 Onion yellow dwarf virus isolate SGI, complete genome  
 JX433019.1 Onion yellow dwarf virus isolate OYDV-Se, complete genome  
 KX433020.1 Onion yellow dwarf virus isolate OYDV-At, complete genome  
 K451436.1 Onion yellow dwarf virus isolate RR1, complete genome  
 MN059558.1 Onion yellow dwarf virus isolate G2, complete genome  
 MN059620.1 Onion yellow dwarf virus isolate G100, complete genome  
 MN528769.1 Onion yellow dwarf virus isolate IR-Kh2, complete genome  
 MT131494.1 Onion yellow dwarf virus isolate 2/R1/3910, complete genome  
 NC\_005029.1 Onion yellow dwarf virus, complete genome  
 KF862683.1 Onion yellow dwarf virus isolate 53 coat protein gene, complete cds  
 KF862684.1 Onion yellow dwarf virus isolate 72 coat protein gene, complete cds  
 KF862685.1 Onion yellow dwarf virus isolate 161 coat protein gene, complete cds  
 KF862686.1 Onion yellow dwarf virus isolate OY206 coat protein gene, complete cds  
 KF862687.1 Onion yellow dwarf virus isolate OY207 coat protein gene, complete cds  
 KF862688.1 Onion yellow dwarf virus isolate OY208 coat protein gene, complete cds  
 KF862689.1 Onion yellow dwarf virus isolate OY209 coat protein gene, complete cds  
 KF862690.1 Onion yellow dwarf virus isolate 219 coat protein gene, complete cds  
 KF862691.1 Onion yellow dwarf virus isolate 220 coat protein gene, complete cds  
 KT225546.1 Onion yellow dwarf virus isolate OYDV-Egyptian coat protein gene, complete c  
 Snowdropvirus\_Y\_NGS  
 EU927399.1 Snowdrop virus Y polyprotein gene, partial cds  
 MH886519.1 Snowdrop virus Y isolate BC28 polyprotein gene, partial cds

A1510223.1 Onion yellow dwarf virus gene for polyprotein, genomic RNA, isolate Yuhang  
 HQ258894.1 Onion yellow dwarf virus isolate MS/SW1, complete genome  
 JX429964.1 Onion yellow dwarf virus isolate SGI, complete genome  
 JX433019.1 Onion yellow dwarf virus isolate OYDV-Se, complete genome  
 KX433020.1 Onion yellow dwarf virus isolate OYDV-At, complete genome  
 K451436.1 Onion yellow dwarf virus isolate RR1, complete genome  
 MN059558.1 Onion yellow dwarf virus isolate G2, complete genome  
 MN059620.1 Onion yellow dwarf virus isolate G100, complete genome  
 MN528769.1 Onion yellow dwarf virus isolate IR-Kh2, complete genome  
 MT131494.1 Onion yellow dwarf virus isolate 2/R1/3910, complete genome  
 NC\_005029.1 Onion yellow dwarf virus, complete genome  
 KF862683.1 Onion yellow dwarf virus isolate 53 coat protein gene, complete cds  
 KF862684.1 Onion yellow dwarf virus isolate 72 coat protein gene, complete cds  
 KF862685.1 Onion yellow dwarf virus isolate 161 coat protein gene, complete cds  
 KF862686.1 Onion yellow dwarf virus isolate OY206 coat protein gene, complete cds  
 KF862687.1 Onion yellow dwarf virus isolate OY207 coat protein gene, complete cds  
 KF862688.1 Onion yellow dwarf virus isolate OY208 coat protein gene, complete cds  
 KF862689.1 Onion yellow dwarf virus isolate OY209 coat protein gene, complete cds  
 KF862690.1 Onion yellow dwarf virus isolate 219 coat protein gene, complete cds  
 KF862691.1 Onion yellow dwarf virus isolate 220 coat protein gene, complete cds  
 KT225546.1 Onion yellow dwarf virus isolate OYDV-Egyptian coat protein gene, complete c  
 Snowdropvirus\_Y\_NGS  
 EU927399.1 Snowdrop virus Y polyprotein gene, partial cds  
 MH886519.1 Snowdrop virus Y isolate BC28 polyprotein gene, partial cds

그림 18. *Onion yellow dwarf virus*(OYDV) 진단용 프라이머의 염기서열 위치. OYDV와 *Snowdrop virus* (SVY)의 염기서열을 정렬하고 OYDV 프라이머의 염기서열 위치를 분석하였음. 수선화에 감염되어있는 SnYV에 OYDV 진단용 프라이머가 오작동한 것으로 판단 됨. 빨간 박스: OYDV 프라이머 염기서열 위치; 파란 박스: SVY 염기서열 위치.

Sequences producing significant alignments

Download Select columns Show 100

select all 100 sequences selected

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<a href="#">Snowdrop virus Y isolate BC28 polyprotein gene, partial cds</a>	<a href="#">Snowdrop virus Y</a>	9771	15199	82%	0.0	98.12%	9135	<a href="#">MH886519.1</a>
<a href="#">Snowdrop virus Y polyprotein gene, partial cds</a>	<a href="#">Snowdrop virus Y</a>	3035	3035	16%	0.0	99.82%	1702	<a href="#">EU927399.1</a>
<a href="#">Lettuce Italian necrotic virus, complete genome</a>	<a href="#">Lettuce Italian necrotic virus</a>	378	635	17%	8e-99	68.59%	9829	<a href="#">KP769852.1</a>
<a href="#">Lettuce Italian necrotic virus strain 7091, complete genome</a>	<a href="#">Lettuce Italian necrotic virus</a>	351	620	19%	1e-90	67.97%	9839	<a href="#">KU941945.1</a>
<a href="#">Turnip mosaic virus strain J14, complete genome</a>	<a href="#">Turnip mosaic virus</a>	349	759	27%	4e-90	67.82%	9833	<a href="#">KCX579480.1</a>
<a href="#">Turnip mosaic virus isolate DSMZ PV-0104, partial sequence</a>	<a href="#">Turnip mosaic virus</a>	337	569	22%	2e-86	67.69%	9834	<a href="#">MZ405633.1</a>
<a href="#">Yam mosaic virus isolate DSMZ PV-0106, partial genome</a>	<a href="#">Yam mosaic virus</a>	335	667	27%	8e-86	67.61%	9605	<a href="#">MW197133.1</a>
<a href="#">Turnip mosaic virus gene for polyprotein, complete cds isolate ITA7</a>	<a href="#">Turnip mosaic virus</a>	334	651	27%	8e-86	67.55%	9798	<a href="#">AB093600.1</a>

Sequences producing significant alignments

Download Select columns Show 100

select all 100 sequences selected

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<a href="#">polyprotein [Snowdrop virus Y]</a>	<a href="#">Snowdrop virus Y</a>	3678	5758	80%	0.0	98.01%	2963	<a href="#">QDC21211.1</a>
<a href="#">polyprotein [Onion yellow dwarf virus]</a>	<a href="#">Onion yellow dw...</a>	2378	2378	88%	0.0	41.00%	3402	<a href="#">QED45214.1</a>
<a href="#">polyprotein [Onion yellow dwarf virus]</a>	<a href="#">Onion yellow dw...</a>	2360	2360	88%	0.0	40.89%	3403	<a href="#">QED45238.1</a>
<a href="#">polyprotein [Onion yellow dwarf virus]</a>	<a href="#">Onion yellow dw...</a>	2359	2359	86%	0.0	41.26%	3403	<a href="#">QED45236.1</a>
<a href="#">polyprotein [Onion yellow dwarf virus]</a>	<a href="#">Onion yellow dw...</a>	2353	2353	87%	0.0	40.69%	3403	<a href="#">QED45210.1</a>
<a href="#">polyprotein [Onion yellow dwarf virus]</a>	<a href="#">Onion yellow dw...</a>	2347	2347	87%	0.0	41.12%	3381	<a href="#">AFU35736.1</a>
<a href="#">polyprotein [Onion yellow dwarf virus]</a>	<a href="#">Onion yellow dw...</a>	2333	2333	88%	0.0	40.50%	3372	<a href="#">AHB33485.1</a>
<a href="#">polyprotein [Onion yellow dwarf virus]</a>	<a href="#">Onion yellow dw...</a>	2311	2311	86%	0.0	41.05%	3338	<a href="#">QED45188.1</a>

그림 19. 수선화에서 검출된 *Snowdrop virus* (SVY)의 NCBI BLAST 분석 결과. 종 특이적으로 설계한 SVY의 프라이머를 이용하여 수선화를 진단하고 Sanger sequencing 분석을 수행하였음. 분석 결과, 수선화에서는 OYDV가 아닌 SVY가 감염되어있음을 확인함.

○ 전사체 분석으로 탐색된 구근 화훼류 바이러스 동정

- 메타전사체 분석으로 탐색된 튨립 바이러스 1종(OMMV)과 수선화 바이러스 3종(SVY, JINRV, TuYV)를 진단하기 위하여 종 특이적 프라이머를 설계하였음(표 15-16).
- NCBI GenBank에 등록된 염기서열과 튨립의 메타전사체 분석을 통하여 확보한 염기서열을 이용하여 종 특이적 프라이머를 설계하였음.

표 15. 튨립의 메타전사체 분석을 통하여 새롭게 탐색된 *Olive mild mosaic virus*(OMMV)의 진단을 위하여 설계한 프라이머<sup>a</sup>

프라이머	서열 (5' to 3')	크기 (bp)
OMMV-F2709	CAGAAACGGGCAGAGTAC	530
OMMV-R3238	CGATTCCCCTCCAGAGC	
OMMV-F2709	CAGAAACGGGCAGAGTAC	896
OMMV-R3604	GTGTCTAGTGGTTGTATCAGC	
OMMV-F2839	GTTATTTATAGCAGACCTCGC	400
OMMV-R3238	CGATTCCCCTCCAGAGC	
OMMV-F2839	GTTATTTATAGCAGACCTCGC	766
OMMV-R3604	GTGTCTAGTGGTTGTATCAGC	

<sup>a</sup> OMMV의 진단법 개발을 위하여 NCBI GenBank에 등록된 염기서열과 튨립의 메타전사체 분석을 통하여 확보한 염기서열을 이용하여 종 특이적으로 반응하는 프라이머를 설계하였음.

표 16. 수선화의 메타전사체 분석을 통하여 새롭게 탐색된 *Snowdrop virus* (SVY), *Japanese iris necrotic ring virus*(JINRV), 및 *Turnip yellows virus*(TuYV)의 진단을 위하여 설계한 프라이머<sup>a</sup>

바이러스	프라이머	서열 (5' to 3')	크기 (bp)
SVY	SVY-F9858	CTCAACGGGACAGGGACATC	245
	SVY-R06	GAAGGGGAAGATGCAGCAG	
	SVY-F9741	CAGTCCGCTTCCAAATGTCTG	362
	SVY-R06	GAAGGGGAAGATGCAGCAG	
JINRV	JINRV-F2542	GAGACAATCAACAACACAAACC	614
	JINRV-R3155	CAGAAACAGAGAGTTGGGG	
	JINRV-F2542	GAGACAATCAACAACACAAACC	782
	JINRV-R3323	GCATAGCCCCTGAATACTC	
	JINRV-F2679	GCTCAACAACAACCAATCTAC	477
	JINRV-R3155	CAGAAACAGAGAGTTGGGG	
	JINRV-F2679	GCTCAACAACAACCAATCTAC	645
	JINRV-R3323	GCATAGCCCCTGAATACTC	
TuYV	TuYV-F3021	GGGAGCTACAATACATCAAG	545
	TuYV-R3565	CGATGAAACGAAACCTGCG	
	TuYV-F3021	GGGAGCTACAATACATCAAG	764
	TuYV-R3784	GTCTAGGTCGGCGTTGTG	
	TuYV-F3307	CTAACTACTTGGCCGCTTG	259
	TuYV-R3565	CGATGAAACGAAACCTGCG	
	TuYV-F3307	CTAACTACTTGGCCGCTTG	478
	TuYV-R3784	GTCTAGGTCGGCGTTGTG	

<sup>a</sup> SVY, JINRV, 및 TuYV의 진단법 개발을 위하여 NCBI GenBank에 등록된 염기서열과 수선화의 메타전사체 분석을 통하여 확보한 컨티그 염기서열을 이용하여 종 특이적으로 반응하는 프라이머를 설계하였음.

#### 4. 유전자진단법(RT-PCR) 분석을 통한 바이러스 진단 및 동정

○ 유전자진단법(RT-PCR)을 이용한 튜립 바이러스 진단 및 동정

- RT-PCR 진단 및 메타전사체 분석 결과를 기반으로 검출된 바이러스 목록(표 11)을 대상으로 채집한 튜립의 개별 시료 86점에 대하여 RT-PCR 진단을 수행하였음(표 17).
- 진단 결과, 튜립에서는 86점 중 53점(검출률 61.6%)에서 바이러스가 검출되었음(표 18).
- 튜립에서 검출된 바이러스 4종.
  - *Lily symptomless virus*(LSV)
  - *Tulip breaking virus*(TBV)
  - *Tulip virus X*(TVX)
  - *Olive mild mosaic virus*(OMMV)
- OMMV와 TBV의 검출률이 30.2%이고 LSV는 17.4%, TVX는 15.1%로 나타남.
- LSV를 제외한 TBV, TVX, OMMV는 국내 튜립에서 처음으로 보고 되는 바이러스임.
- 검역병해충 목록에 등록된 바이러스는 검출되지 않음.

표 17. RT-PCR을 이용한 튜립 시료 75점의 바이러스 개별 진단 결과<sup>a</sup>

번호	채집 지역	품종	검출된 바이러스			
			LSV	TBV	TVX	OMMV
1	경북 예천군	살몬임프레션	-	-	-	-
2	경북 예천군	살몬임프레션	-	-	-	-
3	경북 예천군	살몬임프레션	-	-	-	-
4	경북 예천군	살몬임프레션	-	-	-	-
5	경북 예천군	리마	-	-	-	-
6	경북 예천군	리마	-	+	-	-
7	경북 예천군	리마	-	+	-	-
8	경북 예천군	리마	-	-	-	-
9	경북 예천군	알가브	-	-	-	-
10	경북 예천군	스트롱골드	-	-	-	-
11	경북 예천군	스트롱골드	-	-	-	-
12	경북 예천군	알가브	-	-	-	-
13	경북 칠곡군	알가브	-	-	-	-
14	경북 칠곡군	알가브	-	-	-	-
15	경북 칠곡군	알가브	-	-	-	-
16	경북 칠곡군	알가브	-	-	-	-
17	경북 칠곡군	알가브	-	-	-	-
18	경북 칠곡군	알가브	-	-	-	-
19	충남 예산시	퀸오브나이트	-	+	-	-
20	충남 예산시	콜롬점보뷰티	-	+	-	-
21	충남 예산시	캔디애플딜라이트	-	-	-	-
22	충남 예산시	캔디애플딜라이트	-	-	-	-
23	충남 예산시	카루셀	-	-	-	-
24	충남 예산시	옥스퍼드 원텀	-	-	+	-
25	충남 예산시	옥스퍼드 원텀	-	+	+	-
26	충남 예산시	옥스퍼드 원텀	-	+	+	-
27	충남 예산시	멘톤	-	-	+	-
28	충남 예산시	바레알타	-	-	+	-
29	충남 예산시	바레알타	-	-	+	-
30	충남 예산시	해피패밀리	-	-	+	-
31	충남 예산시	Blushing lady	-	-	+	-
32	충남 예산시	미스브리브	-	-	+	-
33	충남 예산시	스트롱러브	-	-	+	-
34	충남 예산시	마가리티	+	-	+	-

(계속)

번호	채집 지역	품종	검출된 바이러스			
			LSV	TBV	TVX	OMMV
35	충남 예산시	마가리티	+	-	+	-
36	충남 예산시	콜롬정보뷰티	+	-	-	-
37	충남 예산시	콜롬정보뷰티	+	-	-	-
38	충남 예산시	옥스퍼드 원텀	-	-	+	-
39	충남 예산시	고릴라	+	-	-	-
40	충남 예산시	고릴라	+	-	-	-
41	강원 춘천시	미확인	-	+	-	-
42	강원 춘천시	미확인	-	+	-	-
43	강원 춘천시	미확인	-	+	-	-
44	강원 춘천시	미확인	-	+	-	-
45	강원 춘천시	미확인	-	+	-	+
46	강원 춘천시	미확인	-	+	-	+
47	강원 춘천시	미확인	-	+	-	+
48	강원 춘천시	미확인	-	+	-	+
49	강원 춘천시	미확인	-	+	-	+
50	강원 춘천시	미확인	-	+	-	+
51	강원 춘천시	미확인	-	+	-	+
52	강원 춘천시	미확인	-	+	-	+
53	강원 춘천시	미확인	-	+	-	+
54	강원 춘천시	미확인	-	+	-	+
55	강원 춘천시	미확인	-	+	-	+
56	강원 춘천시	미확인	+	+	-	+
57	강원 춘천시	미확인	+	+	-	+
58	강원 춘천시	미확인	+	+	-	+
59	강원 춘천시	미확인	-	+	-	+
60	강원 춘천시	미확인	+	+	-	+
61	경남 고성군	미확인	+	-	-	+
62	경남 고성군	미확인	+	-	-	+
63	경남 고성군	미확인	+	-	-	+
64	경남 고성군	미확인	+	-	-	+
65	경남 고성군	미확인	+	-	-	-
66	경남 고성군	미확인	-	-	-	-
67	경남 고성군	미확인	+	-	-	-
68	경남 고성군	미확인	-	-	-	-
69	경남 고성군	미확인	-	-	-	-
70	경남 고성군	미확인	+	-	-	-
71	경남 고성군	미확인	+	-	-	-
72	경남 고성군	미확인	-	-	-	-
73	경남 고성군	미확인	-	-	-	-
74	경남 고성군	미확인	-	-	-	-
75	경남 고성군	미확인	-	-	-	-
76	경남 고성군	미확인	+	-	-	+
77	경남 고성군	미확인	+	-	-	-
78	경남 고성군	미확인	+	-	-	-
79	경남 고성군	미확인	+	-	-	-
80	경남 고성군	미확인	+	-	-	+
81	경남 고성군	미확인	+	-	-	+
82	경남 고성군	미확인	+	-	-	+
83	경남 고성군	미확인	+	-	-	+
84	경남 고성군	미확인	+	-	-	-
85	경남 고성군	미확인	+	-	-	+
86	경남 고성군	미확인	+	-	-	+
<b>바이러스가 검출된 시료 수</b>			<b>15</b>	<b>26</b>	<b>13</b>	<b>27</b>

<sup>a</sup> LSV: *Lily symptomless virus*, OMMV: *Olive mottle mosaic virus*, TBV: *Tulip breaking virus*, TVX: *Tulip virus X*.

표 18. 국내 주요 재배지역에서 튜립 바이러스의 검출 양상<sup>a, b</sup>

바이러스	강원 춘천		경남 고성		경북 예천		경북 칠곡		충남 예산		계	
	시료 수	검출률 (%)										
LSV	4/20	20.0	5/26	19.2	0/12	0.0	0/6	0.0	6/22	27.3	15/86	17.4
TBV	20/20	100.0	0/26	0.0	2/12	16.7	0/6	0.0	4/22	18.2	26/86	30.2
TVX	0/20	0.0	0/26	0.0	0/12	0.0	0/6	0.0	13/22	59.1	13/86	15.1
OMMV	15/20	75.0	11/26	42.3	0/12	0.0	0/6	0.0	0/22	0.0	26/86	30.2
ArMV	0/20	0.0	0/26	0.0	0/12	0.0	0/6	0.0	0/22	0.0	0/86	0.0
BYMV	0/20	0.0	0/26	0.0	0/12	0.0	0/6	0.0	0/22	0.0	0/86	0.0
CIYMV	0/20	0.0	0/26	0.0	0/12	0.0	0/6	0.0	0/22	0.0	0/86	0.0
CMV	0/20	0.0	0/26	0.0	0/12	0.0	0/6	0.0	0/22	0.0	0/86	0.0
LMoV	0/20	0.0	0/26	0.0	0/12	0.0	0/6	0.0	0/22	0.0	0/86	0.0
LSV	0/20	0.0	0/26	0.0	0/12	0.0	0/6	0.0	0/22	0.0	0/86	0.0
OLV-1	0/20	0.0	0/26	0.0	0/12	0.0	0/6	0.0	0/22	0.0	0/86	0.0
PLCV	0/20	0.0	0/26	0.0	0/12	0.0	0/6	0.0	0/22	0.0	0/86	0.0
ReTBV	0/20	0.0	0/26	0.0	0/12	0.0	0/6	0.0	0/22	0.0	0/86	0.0
TMV	0/20	0.0	0/26	0.0	0/12	0.0	0/6	0.0	0/22	0.0	0/86	0.0
TBV	0/20	0.0	0/26	0.0	0/12	0.0	0/6	0.0	0/22	0.0	0/86	0.0
TMMMV	0/20	0.0	0/26	0.0	0/12	0.0	0/6	0.0	0/22	0.0	0/86	0.0
TuIMV	0/20	0.0	0/26	0.0	0/12	0.0	0/6	0.0	0/22	0.0	0/86	0.0
TSMV	0/20	0.0	0/26	0.0	0/12	0.0	0/6	0.0	0/22	0.0	0/86	0.0
TVX	0/20	0.0	0/26	0.0	0/12	0.0	0/6	0.0	0/22	0.0	0/86	0.0
TuMV	0/20	0.0	0/26	0.0	0/12	0.0	0/6	0.0	0/22	0.0	0/86	0.0
TNV	0/20	0.0	0/26	0.0	0/12	0.0	0/6	0.0	0/22	0.0	0/86	0.0
TRV	0/20	0.0	0/26	0.0	0/12	0.0	0/6	0.0	0/22	0.0	0/86	0.0
TRSV	0/20	0.0	0/26	0.0	0/12	0.0	0/6	0.0	0/22	0.0	0/86	0.0
TBRV	0/20	0.0	0/26	0.0	0/12	0.0	0/6	0.0	0/22	0.0	0/86	0.0
TBSV	0/20	0.0	0/26	0.0	0/12	0.0	0/6	0.0	0/22	0.0	0/86	0.0

<sup>a</sup> 강원 춘천지역의 모든 시료에서 TBV가 검출되어 해당 지역의 우점 바이러스로 판단됨. 경남 고성지역은 OMMV, 충남 예산지역은 TVX가 해당 지역의 우점 바이러스로 판단되며 경북 2개 지역에서는 뚜렷한 우점 바이러스를 관찰할 수 없음. 특히, 경북 칠곡의 경우 채집한 시료에서 바이러스가 검출되지 않았음.

<sup>b</sup> LSV: *Lily symptomless virus*, TBV: *Tulip breaking virus*, TVX: *Tulip virus X*, OMMV: *Olive mild mosaic virus*.

○ 유전자진단법(RT-PCR)을 이용한 수선화 바이러스 진단 및 동정

- RT-PCR 진단 및 메타전사체 분석 결과를 기반으로 검출된 바이러스 목록(표 13)을 대상으로 채집한 튜립의 개별 시료 75점에 대하여 RT-PCR 진단을 수행하였음(표 19).
- 수선화에서는 채집한 시료 75점 모두 바이러스가 검출되었음(표 20).
- 수선화에서 검출된 바이러스 10종.
  - *Cyrtanthus elatus virus A(CEVA)*,
  - *Narcissus late season yellows virus(NLSYV)*
  - *Narcissus latent virus(NLV)*
  - *Narcissus mosaic virus(NMV)*
  - *Narcissus yellow stripe virus(NYSV)*
  - *Nerine latent virus(NeLV)*
  - *Tobacco rattle virus(TRV)*
  - *Japanese iris necrotic ring virus(JINRV)*

- *Snowdrop virus* (SVY)
- *Turnip yellow virus*(TuYV)
- 검출률은 NeLV가 100%로 모든 수선화에서 검출되었으며, 다음으로 NLSYV(97.3%), NLV(52%), NYSV(32%), JINRV(29.3%), NMV(18.7%), TRV(14.7%), TuYV(14.7%), SVY(13.3%), CEVA(1.3%) 순으로 바이러스가 검출되었음.
- *Narcissus late season yellows virus*(NLSYV), *Narcissus latent virus*(NLV), *Narcissus yellow stripe virus*(NYSV), 및 *Nerine latent virus*(NeLV) 4종은 모든 지역에서 검출되었음.
- 채집한 모든 수선화 시료에서 2종 이상의 바이러스가 검출되었으며, 특히 NeLV는 모든 시료에서 검출됨.
- CEVA, JINRV, SVY는 본 과제 수행을 통하여 국내 수선화에서 처음으로 보고되는 것으로 판단됨.
- 검역병해충 목록에 등록된 바이러스는 검출되지 않음.

표 19. RT-PCR을 이용한 수선화 시료의 바이러스 개별 진단 결과<sup>a</sup>

번호	채집 지역	품종	검출된 바이러스									
			CEVA	NLSV	NLV	NMV	NYSV	NeLV	SVY	TRV	JINRV	TuYV
1	충남 예산시	리플리트	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
2	충남 예산시	러브콜	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
3	충남 예산시	테테아테테	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
4	충남 예산시	케이타브르	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
5	충남 예산시	테테아테테	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
6	충남 예산시	러브콜	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
7	충남 예산시	러브콜	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
8	충남 예산시	타이티	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
9	충남 예산시	케이타브르	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
10	충남 예산시	러브데이	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
11	강원 원주시	아이보리	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
12	강원 원주시	아이보리	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
13	강원 원주시	흰색노랑겹	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
14	강원 원주시	노랑겹느림	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
15	강원 원주시	노랑겹느림	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
16	강원 원주시	노랑겹느림	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
17	강원 원주시	노랑겹느림	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
18	강원 원주시	노랑겹느림	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
19	강원 원주시	흰색겹	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
20	강원 원주시	흰색겹	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
21	강원 원주시	흰색겹	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
22	강원 원주시	노랑겹느림	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
23	강원 원주시	노랑겹느림	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
24	강원 원주시	아이보리	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-
25	강원 원주시	아이보리	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
26	강원 원주시	아이보리	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
27	전남 신안군	리플리트	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
28	전남 신안군	리플리트	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-
29	전남 신안군	리플리트	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-
30	전남 신안군	리플리트	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-
31	전남 신안군	리플리트	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-
32	전남 신안군	리플리트	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-
33	전남 신안군	리플리트	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
34	전남 신안군	리플리트	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-

계속

번호	채집 지역	품종	검출된 바이러스									
			CEVA	NLSV	NLV	NMV	NYSV	NeLV	SVY	TRV	JINRV	TuYV
35	전남 신안군	리플리트	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-
36	전남 신안군	리플리트	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-
37	전남 신안군	고블렛	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+
38	전남 신안군	고블렛	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+
39	전남 신안군	고블렛	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
40	전남 신안군	고블렛	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
41	전남 신안군	고블렛	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+
42	전남 신안군	고블렛	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+
43	전남 신안군	고블렛	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+
44	전남 신안군	고블렛	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+
45	전남 신안군	고블렛	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
46	전남 신안군	고블렛	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+
47	전남 신안군	고블렛	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
48	전남 신안군	타이티	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
49	전남 신안군	타이티	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-
50	전남 신안군	타이티	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
51	전남 신안군	타이티	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-
52	전남 신안군	타이티	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
53	전남 신안군	타이티	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
54	전남 신안군	타이티	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
55	전남 신안군	타이티	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
56	전남 신안군	타이티	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
57	전남 신안군	타이티	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
58	전남 신안군	살로우	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
59	전남 신안군	살로우	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
60	전남 신안군	살로우	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
61	전남 신안군	살로우	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
62	전남 신안군	살로우	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
63	전남 신안군	살로우	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
64	전남 신안군	살로우	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
65	전남 신안군	살로우	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
66	전남 신안군	살로우	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
67	경남 거제도	미확인	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
68	경남 거제도	미확인	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
69	경남 거제도	미확인	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
70	경남 거제도	미확인	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
71	경남 거제도	미확인	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
72	경남 거제도	미확인	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
73	경남 거제도	미확인	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
74	경남 거제도	미확인	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
75	경남 거제도	미확인	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<b>바이러스가 검출된 시료 수</b>			<b>1</b>	<b>73</b>	<b>39</b>	<b>14</b>	<b>24</b>	<b>75</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>22</b>	<b>11</b>

<sup>a</sup> CEVA: *Cyrtanthus elatus virus A*, JINRV: *Japanese iris necrotic ring virus*, NLSYV: *Narcissus late season yellows virus*, NLV: *Narcissus latent virus*, NMV: *Narcissus mosaic virus*, NYSV: *Narcissus yellow stripe virus*, NeLV: *Nerine latent virus*, SVY: *Snowdrop virus Y*, TuYV: *Turnip yellow virus*.

표 20. 국내 주요 재배지역에서 채집한 수선화 바이러스 검출 양상<sup>a, b</sup>

바이러스	경남 거제		강원 원주		전남 신안		충남 예산		계	
	시료 수	검출률 (%)	시료수	검출률 (%)						
CEVA	0/9	0.0	0/16	0.0	0/40	0.0	1/10	10.0	1/75	1.3
NLSYV	9/9	100.0	16/16	87.5	40/40	100.0	8/10	60.0	73/75	97.3
NLV	2/9	22.2	2/16	12.5	34/40	85.0	1/10	10.0	39/75	52.0
NMV	0/9	0.0	0/16	0.0	11/40	27.5	3/10	30.0	14/75	18.7
NYSV	3/9	33.3	5/16	31.3	9/40	22.5	7/10	70.0	24/75	32.0
NeLV	9/9	100.0	16/16	100.0	40/40	100.0	10/10	10.0	75/75	100.0
SVY	0/9	66.7	0/16	93.8	10/40	80.0	0/10	40.0	10/75	13.3
TRV	0/9	0.0	4/16	25.0	7/40	40.0	0/10	0.0	11/75	14.7
JINRV	0/9	0.0	0/16	0.0	22/40	55.0	0/10	0.0	22/75	29.3
TuYV	0/9	0.0	1/16	6.3	10/40	25.0	0/10	0.0	11/75	14.7
BYMV	0/9	0.0	0/16	0.0	0/10	0.0	0/10	0.0	0/75	0.0
BBWV	0/9	0.0	0/16	0.0	0/10	0.0	0/10	0.0	0/75	0.0
CLV	0/9	0.0	0/16	0.0	0/10	0.0	0/10	0.0	0/75	0.0
CMV	0/9	0.0	0/16	0.0	0/10	0.0	0/10	0.0	0/75	0.0
LMoV	0/9	0.0	0/16	0.0	0/10	0.0	0/10	0.0	0/75	0.0
NCLV	0/9	0.0	0/16	0.0	0/10	0.0	0/10	0.0	0/75	0.0
NDV	0/9	0.0	0/16	0.0	0/10	0.0	0/10	0.0	0/75	0.0
OYDV	0/9	0.0	0/16	0.0	0/10	0.0	0/10	0.0	0/75	0.0
OrMV	0/9	0.0	0/16	0.0	0/10	0.0	0/10	0.0	0/75	0.0
ArMV	0/9	0.0	0/16	0.0	0/10	0.0	0/10	0.0	0/75	0.0
RqRSV	0/9	0.0	0/16	0.0	0/10	0.0	0/10	0.0	0/75	0.0
SLRSV	0/9	0.0	0/16	0.0	0/10	0.0	0/10	0.0	0/75	0.0
TNV	0/9	0.0	0/16	0.0	0/10	0.0	0/10	0.0	0/75	0.0
TRV	0/9	0.0	0/16	0.0	0/10	0.0	0/10	0.0	0/75	0.0
TRSV	0/9	0.0	0/16	0.0	0/10	0.0	0/10	0.0	0/75	0.0
TBRV	0/9	0.0	0/16	0.0	0/10	0.0	0/10	0.0	0/75	0.0
ToRSV	0/9	0.0	0/16	0.0	0/10	0.0	0/10	0.0	0/75	0.0

<sup>a</sup> 전남 신안에서 가장 다양한 바이러스가 검출되어 수선화 바이러스의 다양성이 높은 지역으로 판단됨. 특히, JINRV는 전남 신안에서만 검출되는 바이러스로 나타남. 강원 원주, 충남 예산지역은 각각 7종의 바이러스가 검출되었으며, CEVA는 충남 예산에서만 검출되었음. NLSYV, NLV, NYSV, NeLV는 채집한 모든 지역에서 검출되어 국내 수선화 재배농가에 광범위하게 분포하고 있을 것으로 판단됨.

<sup>b</sup> CEVA: *Cyrtanthus elatus virus A*, NLSYV: *Narcissus late season yellows virus*, NLV: *Narcissus latent virus*, NMV: *Narcissus mosaic virus*, NYSV: *Narcissus yellow stripe virus*, NeLV: *Nerine latent virus*, SVY: *Snowdrop virus Y*, TRV: *Tobacco rattle virus*, JINRV: *Japanese iris necrotic ring virus*, TuYV: *Turnip yellow virus*.

## 5. 튜립 및 수선화에 발생하는 바이러스의 발생실태 조사

### ○ 구근 화훼류별 바이러스 발생실태 분석

- RT-PCR 검정 결과를 기반으로 튜립 바이러스의 감염양상을 분석하였음.
- 단독감염 시료가 29점(33.7%), 복합감염 시료가 24점(27.9%)으로 나타났으며 바이러스가 검출되지 않은 시료는 33점(38.4%)임을 확인함(표 21).
- *Tulip virus X*(TVX)는 단독감염에서 가장 높은 감염률을 보임.
- 복합감염에서는 *Tulip breaking virus*(TBV)와 *Olive mild mosaic virus*(OMMV)가 복합감염이 된 튜립의 비중이 가장 높았음.
- 3종 바이러스(*Lily symptomless virus*, LSV, *Tulip breaking virus*, TBV, *Olive mild mosaic virus*, OMMV)가 최대로 튜립에 복합감염 되어있음을 확인함.

표 21. 국내 주요 재배지역에서 채집한 튜립의 바이러스 감염양상<sup>a</sup>

감염양상	시료 수	감염률 (%)
<b>단독감염</b>	<b>29</b>	<b>33.7</b>
<i>Lily symptomless virus</i> (LSV)	5	5.8
<i>Tulip breaking virus</i> (TBV)	8	9.3
<i>Tulip virus X</i> (TVX)	9	10.5
<i>Olive mild mosaic virus</i> (OMMV)	7	8.1
<b>복합감염</b>	<b>24</b>	<b>27.9</b>
LSV+TVX	2	2.3
LSV+OMMV	4	4.7
TBV+TVX	2	2.3
TBV+OMMV	12	14.0
LSV+TBV+OMMV	4	4.7
미검출	33	38.4
<b>계</b>	<b>86</b>	<b>100.0</b>

<sup>a</sup> 실험에 사용된 튜립은 5개 지역(강원 춘천, 경북 예천, 경북 칠곡, 경남 고성, 충남 예산)의 재배 농가에서 채집하였음.

- 바이러스에 단독감염 된 튜립 시료들의 바이러스 병징 특성을 분석하였음(그림 20).
- LSV와 TBV에 감염된 튜립은 꽃잎의 변색을 관찰할 수 있었으며 잎에서 모자이크 증상이 나타남.
- TVX가 감염 된 시료에서는 흰색 모자이크 증상이 나타남.
- OMMV가 검출된 시료에서 괴사증상을 전반적으로 관찰할 수 있었으며 주로 튜립의 생육 불량에 원인이 되는 바이러스로 판단 됨.

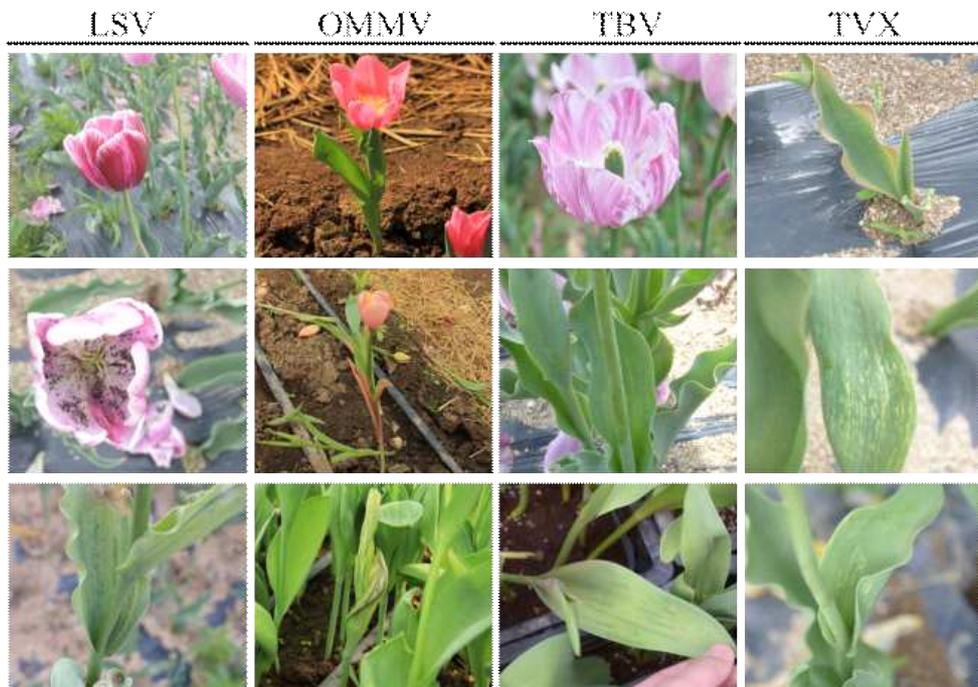


그림 20. 단독감염이 된 튜립에서 발생하는 주요 바이러스의 병징 및 피해. 바이러스에 단독감염된 시료들의 바이러스 병징을 관찰하였음. LSV는 꽃잎의 변색과 잎의 모자이크가 나타났으며 진딧물에 의한 피해가 시료에서 관찰되었음. OMMV가 검출된 시료에서는 잎에서 괴사 증상을 보였음. TBV가 검출된 샘플은 꽃의 변색이 일어나고 잎에서 모자이크가 나타남. TVX는 잎에서 모자이크와 줄무늬 증상이 나타남.

- 바이러스에 복합감염된 튜립 시료들의 바이러스 병징 특성을 분석하였음(그림 21).
- LSV, TVX, TBV에 감염된 시료에서는 모자이크 증상을 흔히 관찰할 수 있었음.
- OMMV와 다른 바이러스가 복합감염된 튜립 시료는 선명한 줄모양의 모자이크를 관찰할 수 있었으며 생육이 불량한 것을 확인하였음.
- 튜립에서 검출된 바이러스 4종(LSV, TVX, TBV 및 OMMV) 모두 튜립에 피해를 미치는 것으로 판단되며, 특히 OMMV로 인한 피해가 클 것으로 판단 됨.

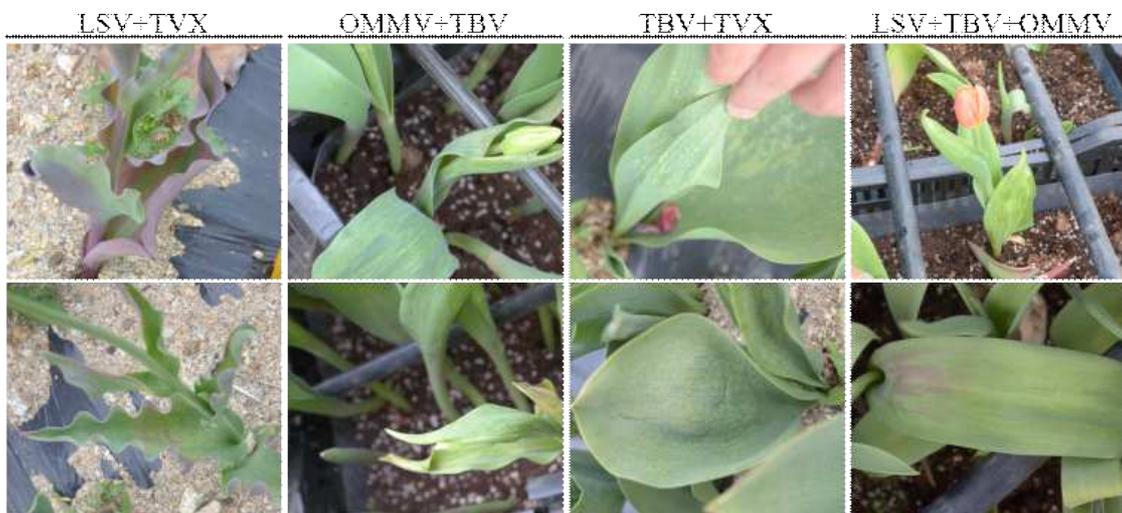


그림 21. 복합감염이 된 튜립에서 발생하는 주요 바이러스의 병징 및 피해. 튜립에서 검출된 바이러스 4종(LSV, TVX, TBV 및 OMMV) 모두 바이러스 피해를 미치는 것으로 판단되며 특히 OMMV로 인한 피해가 클 것으로 예상됨.

- RT-PCR 검정 결과를 기반으로 수선화 바이러스의 감염양상을 분석하였음.
- 수선화는 채집한 시료 전수에서 바이러스가 검출되었으며, 모든 시료는 2종 이상의 바이러스가 복합감염 된 것을 확인함(표 22).

표 22. 국내 주요 재배지역에서 채집한 수선화의 바이러스 감염양상<sup>a</sup>

감염양상	시료 수	감염률 (%)
<b>2종 복합감염</b>	<b>18</b>	<b>23.7</b>
NLSYV+NeLV	17	22.7
NLV+NYSV	1	1.3
<b>3종 복합감염</b>	<b>15</b>	<b>20.0</b>
CEVA+NMV+NeLV	1	1.3
NLSYV+NLV+NeLV	2	2.6
NLSYV+NMV+NeLV	3	4.0
NLSYV+NYSV+NeLV	7	9.3
NLSYV+NeLV+TRV	2	2.6
<b>4종 복합감염</b>	<b>20</b>	<b>26.7</b>
NLSYV+NLV+NMV+NeLV	4	5.3
NLSYV+NLV+NYSV+NeLV	4	5.3
NLSYV+NMV+NYSV+NeLV	2	2.6
NLSYV+NLV+NeLV+TRV	2	2.6
NLSYV+NYSV+NeLV+TuYV	1	1.3
NLSYV+NYSV+NeLV+TRV	3	4.0
NLSYV+NYSV+NeLV+JINRV	1	1.3
NLSYV+NLV+NeLV+JINRV	3	4.0
<b>5종 복합감염</b>	<b>17</b>	<b>22.7</b>
NLSYV+NLV+NMV+NeLV+SVY	4	5.3
NLSYV+NLV+NMV+NeLV+TRV	1	1.3
NLSYV+NLV+NYSV+NeLV+JINRV	1	1.3
NLSYV+NLV+NYSV+NeLV+TuYV	1	1.3
NLSYV+NLV+NeLV+JINRV+TuYV	6	8.0
NLSYV+NLV+NeLV+JINRV+TRV	3	4.0
NLSYV+NeLV+SnYV+JINRV+TuYV	1	1.3
<b>6종 복합감염</b>	<b>6</b>	<b>8.0</b>
NLSYV+NLV+NYSV+NeLV+SnYV+JINRV	1	1.3
NLSYV+NLV+NYSV+NeLV+JINRV+TRV	2	2.6
NLSYV+NLV+NeLV+SVY+JINRV+TuYV	3	4.0
<b>계</b>	<b>75</b>	<b>100.0</b>

<sup>a</sup> 수선화는 모든 시료가 바이러스에 복합감염 되어있으며, 최대 6종 이상의 바이러스에 복합감염 되어있음.

<sup>b</sup> CEVA: *Cyrtanthus elatus virus A*, NLSYV: *Narcissus late season yellows virus*, NLV: *Narcissus latent virus*, NMV: *Narcissus mosaic virus*, NYSV: *Narcissus yellow stripe virus*, NeLV: *Nerine latent virus*, SVY: *Snowdrop virus Y*, JINRV: *Japanese iris necrotic ring virus*, TuYV: *Turnip yellows virus*, TRV: *Tobacco rattle virus*.

- 수선화 시료의 RT-PCR 검정 결과를 기반으로 툴립에서 발생하는 바이러스 병징을 분석하였음.
- 수선화는 모든 시료에서 최소 2종 이상의 바이러스가 검출되었으며, 복합적인 바이러스로 인한 병징이 나타나는 것으로 추정됨.
- 4개 지역에서 모두 검출된 바이러스 4종(NLSYV, NLV, NYSV, 및 NeLV)은 채집한 수선화에 나타나는 전반적인 바이러스 병징과 관련 있는 것으로 판단됨(그림 22).
- NLSYV와 NYSV는 꽃 크기 및 생육의 저하와 황색의 반점·줄무늬 증상이 나타남.
- NLV는 감염 후 바이러스 피해가 적거나 잠복 감염하는 것으로 보이나, NLSYV와 NYSV 2종 바이러스와 함께 바이러스의 확산에 기여하는 것을 문헌조사를 통하여 확인함. 주요 증상으로는 잎에 모자이크 형상이 나타나며 잎끝에 황색을 띄며 잎말림 증상을 보이기도 함.
- 수선화에 발생하는 바이러스를 진단하기 위해서는 개별 바이러스에 대한 단편적인 검출이 아닌 다수의 바이러스를 동시에 진단할 수 있는 다중 진단법의 개발이 필요함.



그림 22. 수선화에서 발생하는 전반적인 바이러스 병징. 수선화에 나타나는 병징은 단일 바이러스로 인한 바이러스 피해 보다는 다수의 바이러스로 인한 복합적인 바이러스 피해를 일으키는 것으로 보임. (A-B) leaf distortion; (C) twisted leaf; (D) leaf rolling; (E-H) chlorotic yellow stripe; (I-L) Necrotic spindle shaped streak; (M-P) leaf tip chlorosis.

- 튜립에서 검출된 바이러스의 분자생물학적 특성을 분석하였음(그림 23-26)
- 검출된 바이러스의 계통 분석을 통하여 검출된 바이러스 분리주들의 유연관계를 비교·분석하였음.

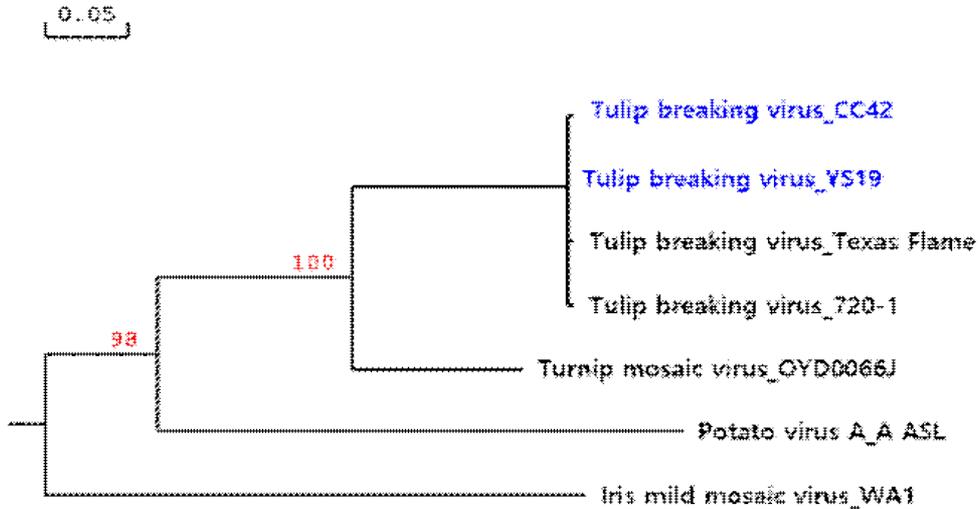


그림 23. 튜립에서 검출된 *Tulip breaking virus*(TBV)의 외피단백질 염기서열을 이용한 *Potexvirus* 5종의 유연관계 분석. 국내 수선화에서 검출된 TBV 분리주(파란 글씨)와 NCBI에 기보고된 TBV 분리주 3개(MH886517, MK368795, KF442403) 및 *Potexvirus* 3종(*Turnip mosaic virus*, *Potato virus A*, *Iris mild mosaic virus*)의 염기서열을 이용하였음. 국내 수선화에서 검출된 TBV는 해외에서 보고된 TBV 분리주들과 동일한 종으로 분석되며, 분리주간 유사한 상동성을 나타내고 있음

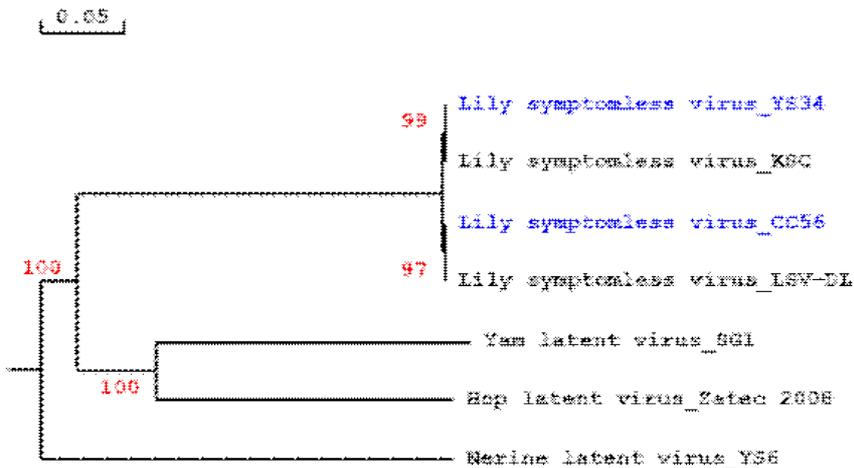


그림 24. 튜립에서 검출된 *Lily symptomless virus*(LSV)의 외피단백질 염기서열을 이용한 *Carlavirus* 3종의 유연관계 분석. 국내 수선화에서 검출된 LSV 분리주(파란 글씨)와 NCBI에 기보고된 LSV 분리주 2개(LC720794, HM222522) 및 *Carlavirus* 3종(*Yam latent virus*, *Hop latent virus*, *Nerine latent virus*)의 염기서열을 이용하였음. 국내 수선화에서 검출된 LSV는 해외에서 보고된 LSV 분리주들과 동일한 종으로 분석되며, 분리주간 유사한 상동성을 나타내고 있음.

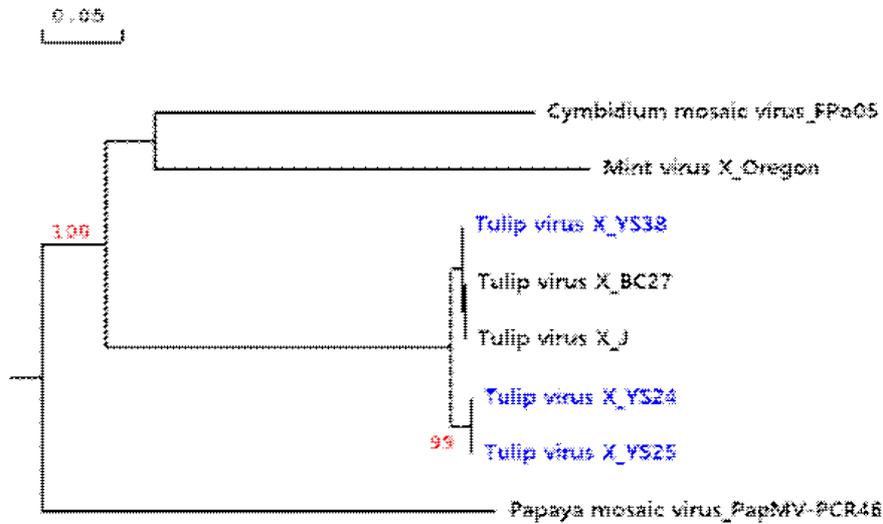


그림 25. 튜립에서 검출된 *Tulip virus X*(TBV)의 외피단백질 염기서열을 이용한 *Potexvirus* 5종의 유연관계 분석. 국내 수선화에서 검출된 TVX 분리주(파란 글씨)와 NCBI에 기보고된 TBV 분리주 3개(MH886522, AB066288, LC664027) 및 *Potexvirus* 3종(*Cymbidium mosaic virus*, *Mint virus X*, *Papaya mosaic virus*)의 염기서열을 이용하였음. 국내 수선화에서 검출된 TBV는 해외에서 보고된 TBV 분리주들과 동일한 종으로 분석되며, 분리주간 유사한 상동성을 나타내고 있음.

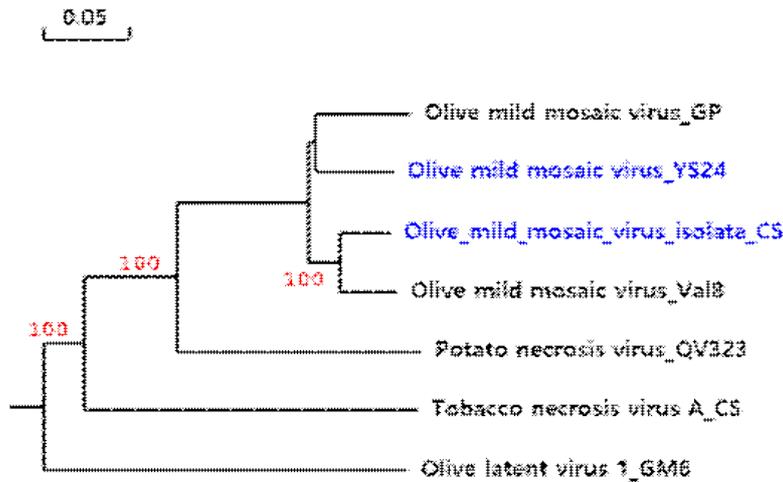


그림 26. 수선화에서 검출된 *Olive mild mosaic virus*(OMMV)의 외피단백질 염기서열을 이용한 *Alphanecrovirus* 3종의 유연관계 분석. 국내 수선화에서 검출된 OMMV 분리주(파란 글씨)와 NCBI에 기보고된 OMMV 분리주 2개(KY769774, KY769774) 및 *Alphanecrovirus* 3종(*Potato necrosis virus*, *Olive latent virus 1*, *Tobacco necrosis virus A*)의 염기서열을 이용하였음. 국내 수선화에서 검출된 OMMV는 해외에서 보고된 OMMV 분리주들과 동일한 종으로 분석되며, 분리주간 유사한 상동성을 나타내고 있음.

- 수선화에서 검출된 바이러스의 분자생물학적 특성을 분석하였음(그림 27-35)
- 검출된 바이러스의 계통 분석을 통하여 검출된 바이러스 분리주들의 유연관계를 비교·분석하였음.

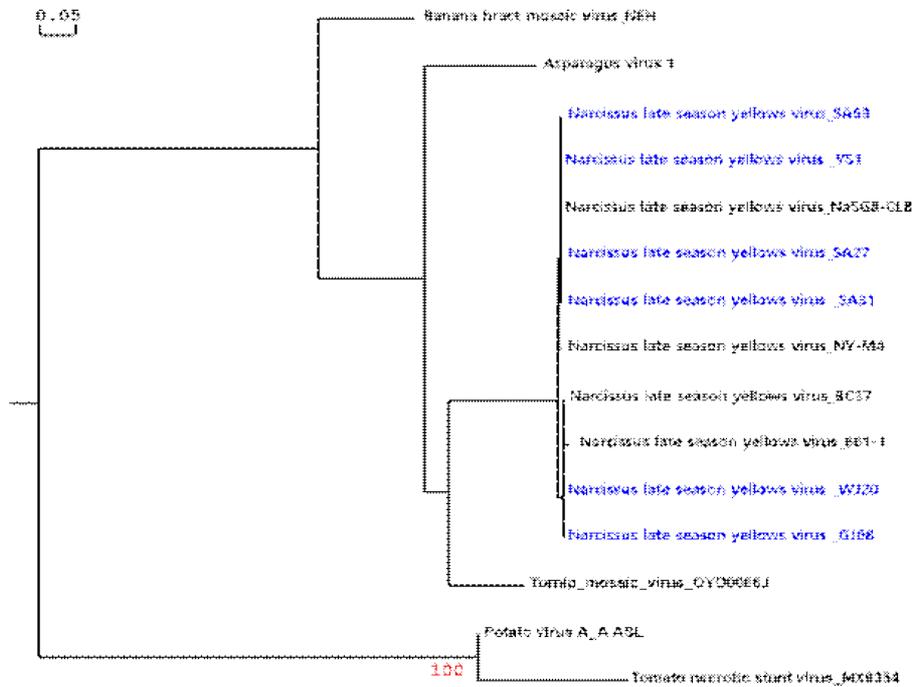


그림 27. 수선화에서 검출된 *Narcissus late season yellows virus*(NLSYV)의 외피단백질 염기서열을 이용한 *Potyvirus* 5종의 유연관계 분석. 국내 수선화에서 검출된 NLSYV 분리주(파란 글씨)와 NCBI에 기보된 NLSYV 분리주 4개(OP716854, OP716855, OP716856, OP716857, OP716858, OP716859) 및 *Potyvirus* 5종(*Asparagus virus 1*, *Banana bract mosaic virus*, *Potato virus A*, *Tomato necrotic stunt virus*, *Turnip mosaic virus*)의 염기서열을 이용하였음. 국내 수선화에서 검출된 NLSYV는 해외에서 보고된 NLSYV 분리주들과 동일한 종으로 분석되며, 분리주간 유사한 상동성을 나타내고 있음.

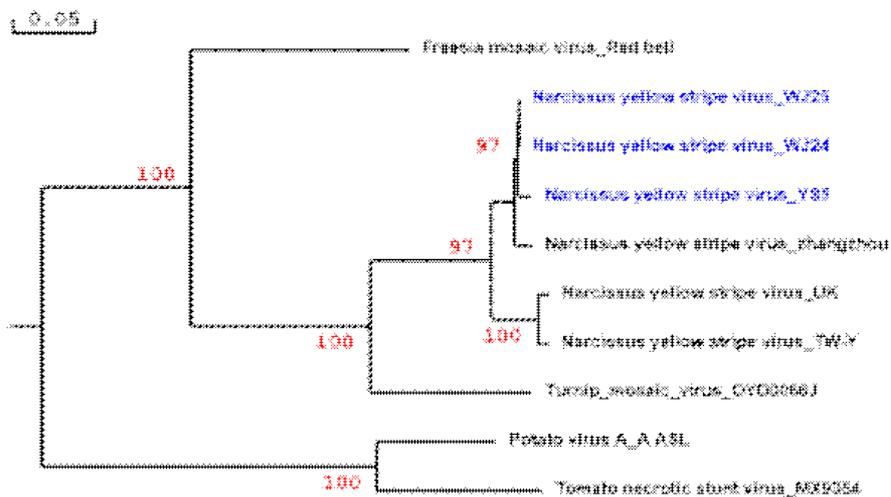


그림 28. 수선화에서 검출된 *Narcissus yellow stripe virus*(NYSV)의 외피단백질 염기서열을 이용한 *Potyvirus* 4종의 유연관계 분석. 국내 수선화에서 검출된 NYSV 분리주(파란 글씨)와 NCBI에 기보된 NYSV 분리주 3개(EU430294, FJ039524, KP893337) 및 *Potyvirus* 4종(*Freesia mosaic virus*, *Potato virus A*, *Turnip mosaic virus*, *Tomato necrotic stunt virus*)의 염기서열을 이용하였음. 국내 수선화에서 검출된 NYSV는 해외에서 보고된 NYSV 분리주 중 일부(*Narcissus yellow virus* Isolate UK 및 TW-Y)와 구분되는 것을 확인함.

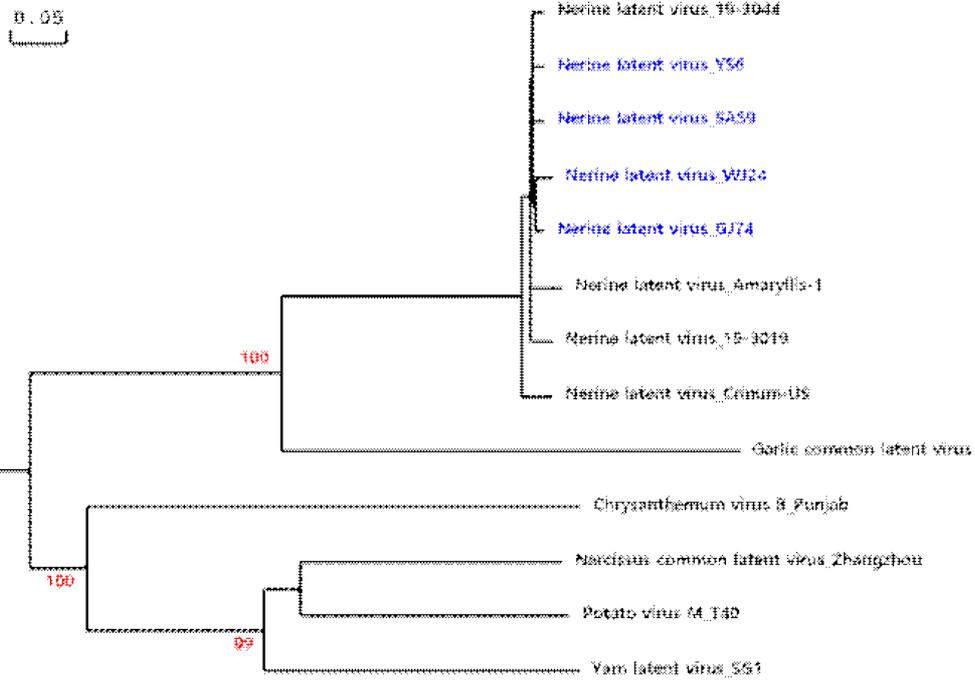


그림 29. 수선화에서 검출된 *Nerine latent virus*(NeLV)의 외피단백질 염기서열을 이용한 *Carlavirus* 5종의 유연관계 분석. 국내 수선화에서 검출된 NeLV 4가지 분리주(파란 글씨), NCBI에 기보고된 NeLV 분리주 4개(MG012804, MT536156, MT563158, MT536160) 및 *Carlavirus* 5종 (*Chrysanthemum virus B*, *Garlic common latent virus*, *Narcissus common latent virus*, *Potato virus M*, *Yam latent virus*)의 염기서열을 이용하였음. 국내 수선화에서 검출된 NeLV는 해외에서 보고된 NeLV 분리주들과 동일한 종으로 분석되며, 분리주간 유사한 상동성을 나타내고 있음.

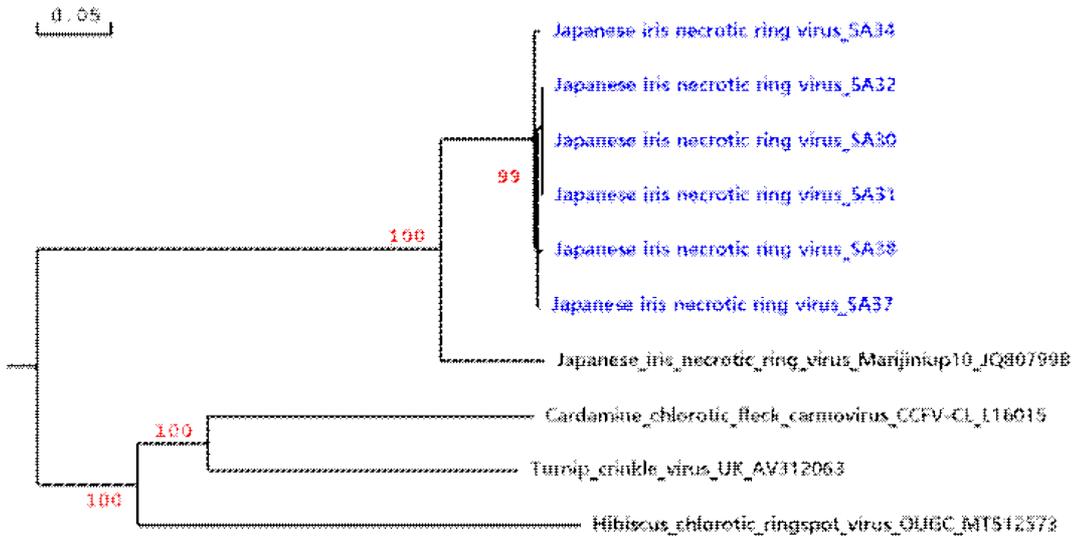


그림 30. 수선화에서 검출된 *Japanese iris necrotic ring virus*(JINRV)의 외피단백질 염기서열을 이용한 *Betacarmovirus* 3종의 유연관계 분석. 국내 수선화에서 검출된 NeLV 6개 분리주(파란 글씨), NCBI에 기보고된 JINRV 분리주 1개(JQ807998) 및 *Betacarmovirus* 3종(*Cardamine chlorotic fleck virus*, *Turnip crinkle virus*, *Hibiscus chlorotic ringspot virus*)의 염기서열을 이용하였음. 국내 수선화에서 검출된 JINRV는 해외에서 보고된 JINRV 분리주들과 동일한 종으로 분석되며, 분리주간 유사한 상동성을 나타내고 있음.

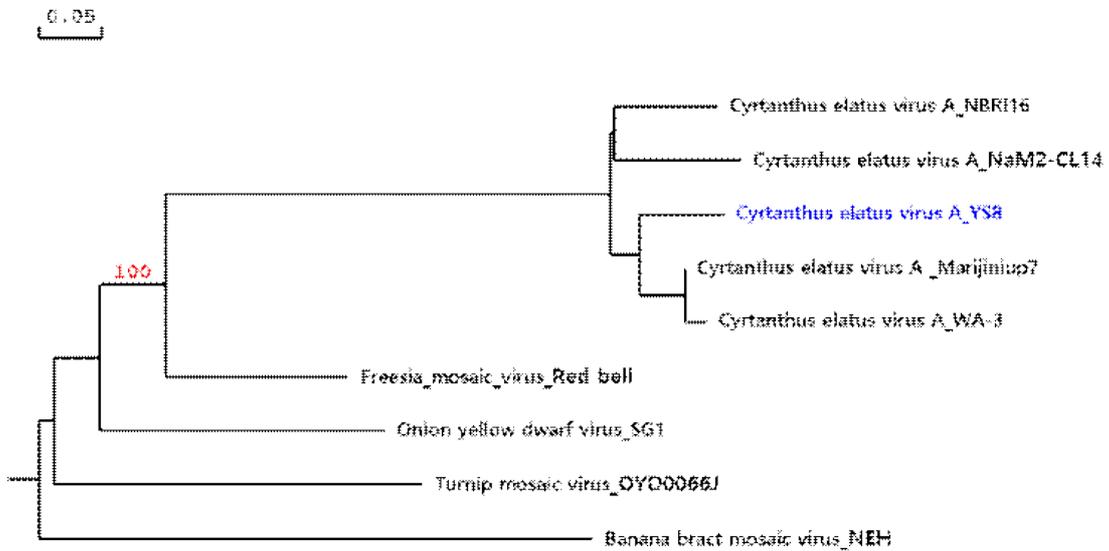


그림 31. 수선화에서 검출된 *Cyrtanthus elatus virus A*(CEVA)의 외피단백질 염기서열을 이용한 *potyvirus* 4종의 유연관계 분석. 국내 수선화에서 검출된 CEVA 1개 분리주(파란 글씨), NCBI에 기 보고된 CEVA 분리주 4개(JQ723475, KX575832, LC158492, GU812284) 및 *potyvirus* 4종(*Freesia mosaic virus*, *Banana bract mosaic virus*, *Onion yellow dwarf virus*, *Turnip mosaic virus*)의 염기서열을 이용하였음. 국내 수선화에서 검출된 CEVA는 해외에서 보고된 CEVA 분리주들과 동일한 종으로 분석되며, 분리주간 유사한 상동성을 나타내고 있음.

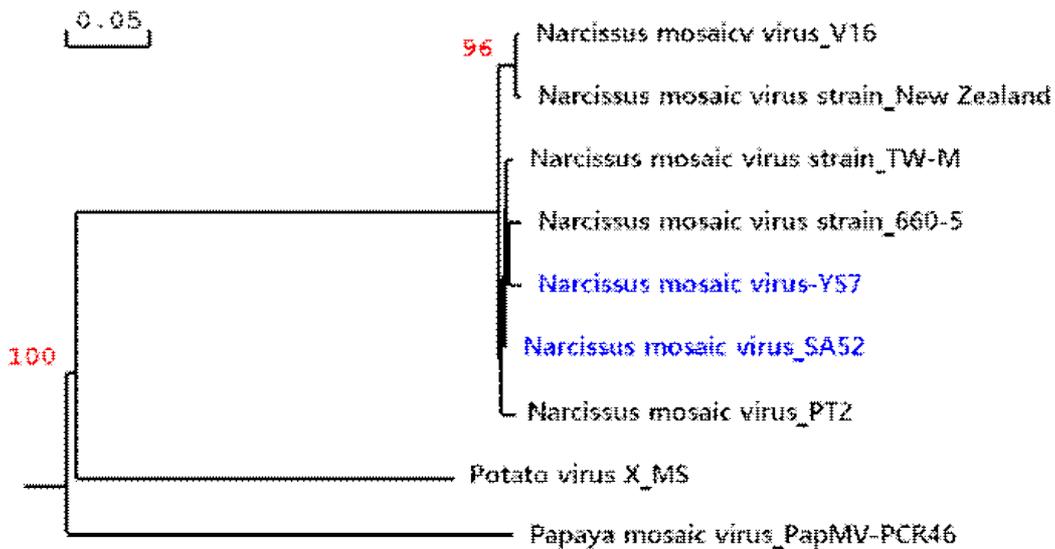


그림 32. 수선화에서 검출된 *Narcissus mosaic virus*(NMV)의 외피단백질 염기서열을 이용한 *potexvirus* 2종의 유연관계 분석. 국내 수선화에서 검출된 NMV 2개 분리주(파란색 글씨), NCBI에 기 보고된 NMV 분리주 5개(JQ911733, AY225449, KP893336, MN068009, D13747) 및 *potexvirus* 2종(*Papaya mosaic virus*, *Potato virus X*)의 염기서열을 이용하였음. 국내 수선화에서 검출된 NMV는 해외에서 보고된 NMV 분리주들과 동일한 종으로 분석되며, 분리주간 유사한 상동성을 나타내고 있음.

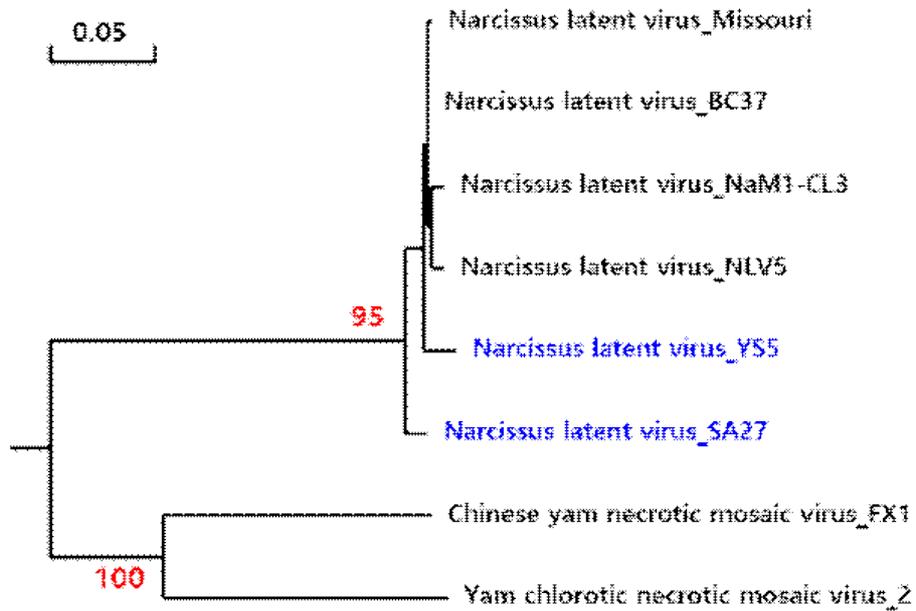


그림 33. 수선화에서 검출된 *Narcissus latent virus*(NLV)의 외피단백질 염기서열을 이용한 *potexvirus* 2종의 유연관계 분석. 국내 수선화에서 검출된 NMV 2개 분리주(파란색 글씨), NCBI에 기보고된 NLV 분리주 4개(FJ024083, MH886520, LC158507, JX270763) 및 *Macluravirus* 2종 (*Chinese yam necrotic mosaic virus*, *Yam chlorotic necrotic mosaic virus*)의 염기서열을 이용하였음. 국내 수선화에서 검출된 NLV는 해외에서 보고된 NLV 분리주들과 동일한 종으로 분석되며, 분리주간 유사한 상동성을 나타내고 있음.

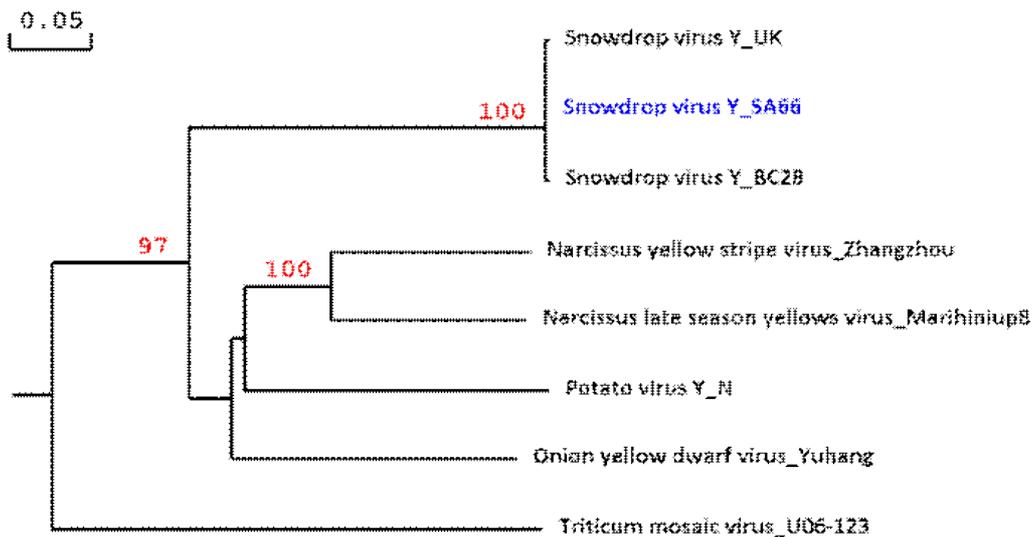


그림 34. 수선화에서 검출된 *Snowdrop virus* (YSVY)의 외피단백질 염기서열을 이용한 *potyvirus* 5종의 유연관계 분석. 국내 수선화에서 검출된 SVY 2개 분리주(파란색 글씨) NCBI에 기보고된 SVY 분리주 2개(Z34261, MH645171) 및 *potyvirus* 5종(*Narcissus yellow stripe virus*, *Narcissus late season yellows virus*, *Onion yellow dwarf virus*, *Triticum mosaic virus*)의 염기서열을 이용하였음. 국내 수선화에서 검출된 SVY는 해외에서 보고된 SVY 분리주들과 동일한 종으로 분석되며, 분리주간 유사한 상동성을 나타내고 있음.

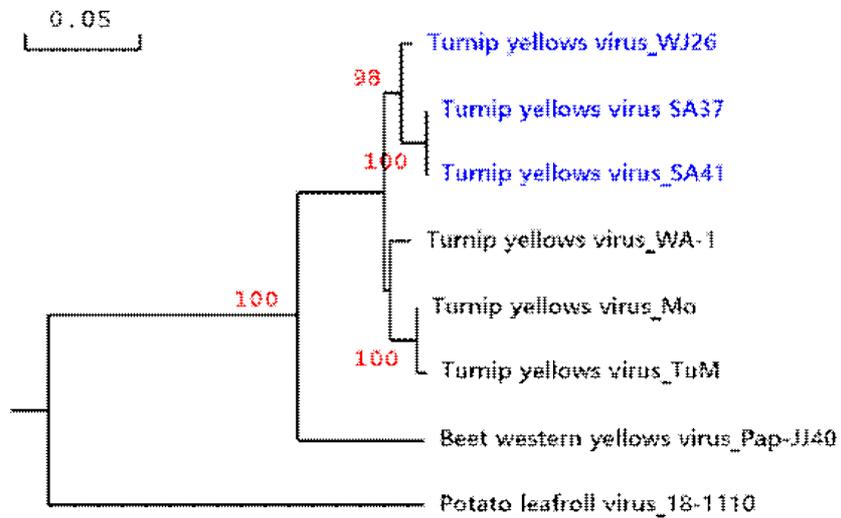


그림 35. 수선화에서 검출된 *Turnip yellows virus*(TuYV)의 외피단백질 염기서열을 이용한 2종의 유연관계 분석. 국내 수선화에서 검출된 TuYV 3개 분리주와 NCBI에 기보고된 TuYV 분리주 3개 (JQ862472, LR584020, LR584021) 및 *polerovirus* 2종(*Beet western yellows virus*, *Potato leafroll virus*)의 염기서열을 이용하였음. 국내 수선화에서 검출된 TuYV는 해외에서 보고된 TuYV 분리주들과 구분되는 것을 확인하여 염기서열 비교·분석이 필요할 것으로 판단됨.

## 6. 현장현시 진단(POC)용 바이러스 항원 생산

### ○ 생물검정을 이용한 바이러스 특성 구명 및 바이러스 증식

- 튨립과 수선화의 통합진단 과정에서 검출된 바이러스를 증식하기 위하여 즈액접종을 통한 생물검정을 수행하였음.
- 튨립 바이러스 4종을 지표식물 15종에 즈액접종하여 기주 반응을 관찰하였음(표 23).
- TVX를 즈액접종한 *Chenopodium quinoa*의 상엽에서 뚜렷한 반점을 관찰할 수 있었으며, RT-PCR 검정을 통하여 *C. quinoa*의 감염을 확인하였음(그림 36).

표 23. 튨립에서 검출된 바이러스의 생물검정 결과<sup>a, b</sup>

지표 식물		병징/감염여부 <sup>c</sup>			
과명	학명	LSV	TBV	TVX	OMMV
<i>Solanaceae</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>	-/-	-/-	-/-	-/-
	<i>N. clevelandii</i>	-/-	-/-	-/-	-/-
	<i>N. debneyi</i>	-/-	-/-	-/-	-/-
	<i>N. glutinosa</i>	-/-	-/-	-/-	-/-
	<i>N. rustica</i>	-/-	-/-	-/-	-/-
	<i>N. tabacum</i> cv. KY57	-/-	-/-	-/-	-/-
	<i>Datura stramonium</i>	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>Leguminosae</i>	<i>Glycine max</i>	-/-	-/-	-/-	-/-
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>Chenopodiaceae</i>	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	-/-	-/-	-/-	-/-
	<i>C. quinoa</i>	-/-	-/-	cs/+	-/-
<i>Cucurbitaceae</i>	<i>Cucumis sativus</i>	-/-	-/-	-/-	-/-
	<i>Cu. melo</i>	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>Amaranthaceae</i>	<i>Gomphrena globosa</i>	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>Aizoaceae</i>	<i>Tetragonia tetragonioides</i>	-/-	-/-	-/-	-/-

<sup>a</sup> TBV: *Tulip breaking virus*, TVX: *Tulip virus X*.

<sup>b</sup> TBV와 TVX가 검출된 튨립의 잎을 즈액접종의 접종원으로 사용하였으며, 접종 14일 후 RT-PCR 검정을 통하여 감염여부를 확인하였음.

<sup>c</sup> sl: symptomsless, cs: chlorotic spot, +: positive, -: negative.

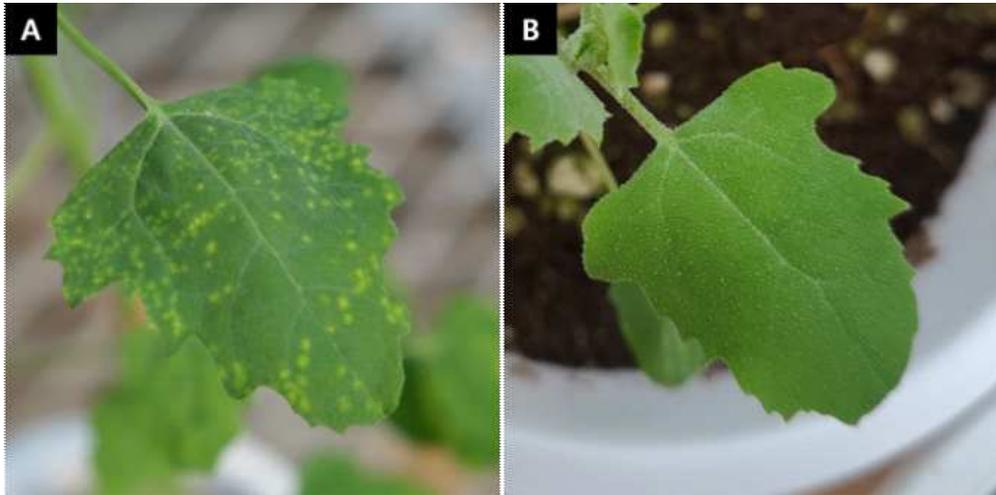


그림 36. *Tulip virus X*(TVX)가 즙액접종된 *Chenopodium quinoa*의 병징. TVX가 검출된 튜립의 잎을 접종원으로 즙액접종 하였음. 접종 14일 경과 후 뚜렷한 chlorotic spot 병징을 관찰할 수 있었음. 접종원 약 50 mg을 0.01M의 PBS 완충액에 완전히 마쇄한 즙액을 600 mesh의 carborundum을 이용하여 접종함. A: chlorotic spot 병징이 나타난 *C. quinoa*의 잎, B: 건전주.

- 수선화 바이러스 10종을 지표식물 15종에 즙액접종하여 기주 반응을 관찰하였음(표 24).
- 7종의 바이러스를 즙액접종한 15종의 지표식물에서 뚜렷한 병징을 관찰할 수 없었음.

표 24. 수선화에서 검출된 바이러스의 생물검정 결과<sup>a, b</sup>

지표 식물		병징/감염여부 <sup>c</sup>									
과명	학명	CEVA	NLSYV	NLV	NMV	NYSV	NeLV	SVY	JINRV	TRV	TuYV
<i>Solanaceae</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	<i>N. clevelandii</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	<i>N. debneyi</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	<i>N. glutinosa</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	<i>N. rustica</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	<i>N. tabacum</i> cv. KY57	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	<i>Datura stramonium</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>Leguminosae</i>	<i>Glycine max</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>Chenopodiaceae</i>	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	<i>C. quinoa</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>Cucurbitaceae</i>	<i>Cucumis sativus</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	<i>Cu. melo</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>Amaranthaceae</i>	<i>Gomphrena globosa</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>Aizoaceae</i>	<i>Tetragonia tetragonioides</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

<sup>a</sup> CEVA: *Cyrtanthus elatus virus A*, NLSYV: *Narcissus late season yellows virus*, NLV: *Narcissus latent virus*, NMV: *Narcissus mosaic virus*, NYSV: *Narcissus yellow stripe virus*, NeLV: *Nerine latent virus*, OYDV: *Onion yellow dwarf virus*.

<sup>b</sup> 바이러스가 검출된 수선화의 잎을 즙액접종의 접종원으로 사용하였으며, 접종 14일 후 RT-PCR 검정을 통하여 감염여부를 확인하였음.

<sup>c</sup> +: positive, -: negative.

○ 전자현미경 검경을 통한 바이러스 입자 관찰

- 바이러스가 검출된 튤립과 수선화 시료로부터 투과전자현미경을 이용하여 바이러스 입자를 관찰하였음(그림 38).
- TBV가 검출된 튤립 시료를 검경하여 사상형 바이러스 입자를 관찰하였음.
- 수선화 시료는 여러 종의 바이러스에 복합감염된 시료로부터 다수의 사상형 입자를 검경하였음.

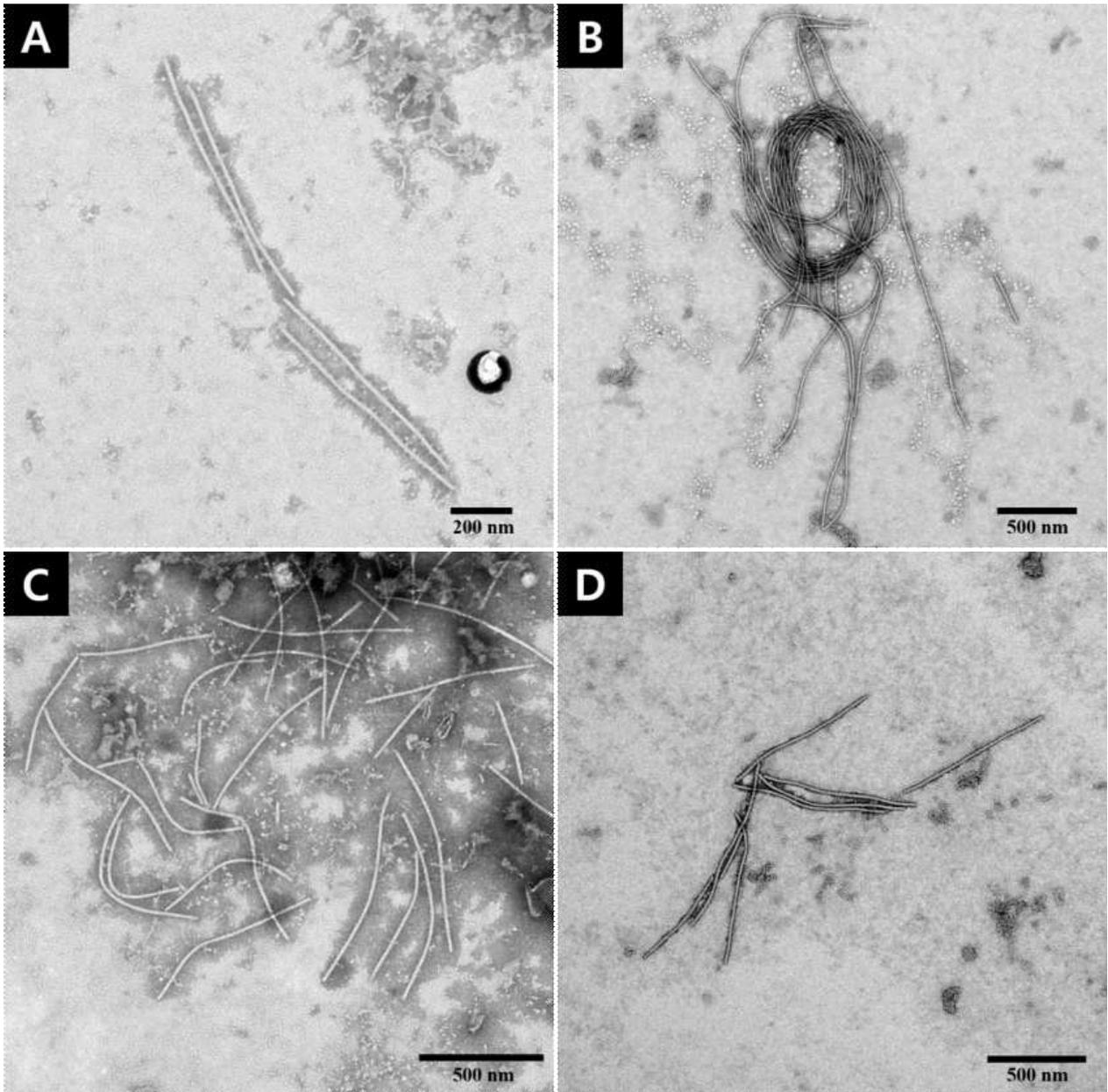


그림 38. 바이러스가 검출된 튤립과 수선화 시료의 투과전자현미경 검경. RT-PCR 검정을 통하여 바이러스가 검출된 튤립과 수선화 잎을 이용하여 검경하였음. A: *Tulip breaking virus*(TBV)에 감염된 튤립 44번 시료, B: 5종 바이러스[*Narcissus late season yellow virus*(NLSYV), *Narcissus latent virus*(NLV), *Nerine latent virus*(NeLV), *Japanese iris necrotic ring virus*(JINRV), *Tobacco rattle virus*(TRV)]가 검출된 수선화 34번 시료, C와 D: 3종 바이러스(NLSYV, NLV, NeLV)가 검출된 수선화 68번 시료.

## 7. 구근 화훼류 대상 작물별 바이러스 개별 진단법 개발

### ○ 구근 화훼류 바이러스 유전자 개별진단법 개발

- 툴립과 수선화에 발생하는 주요 바이러스들의 개별 유전자진단법을 설계하였음.
- 종 특이적 프라이머를 설계하기 위하여, 각기 다른 바이러스의 다양한 서열을 수집하고 정렬하여 바이러스의 공통된 서열을 선택하였음.
- 툴립 바이러스 4종에 대한 개별 유전자진단법을 설계하였음(그림 39-42).
  - *Lily symptomless virus*(LSV)
  - *Tulip breaking virus*(TBV)
  - *Tulip virus X*(TVX)
  - *Olive mild mosaic virus*(OMMV)

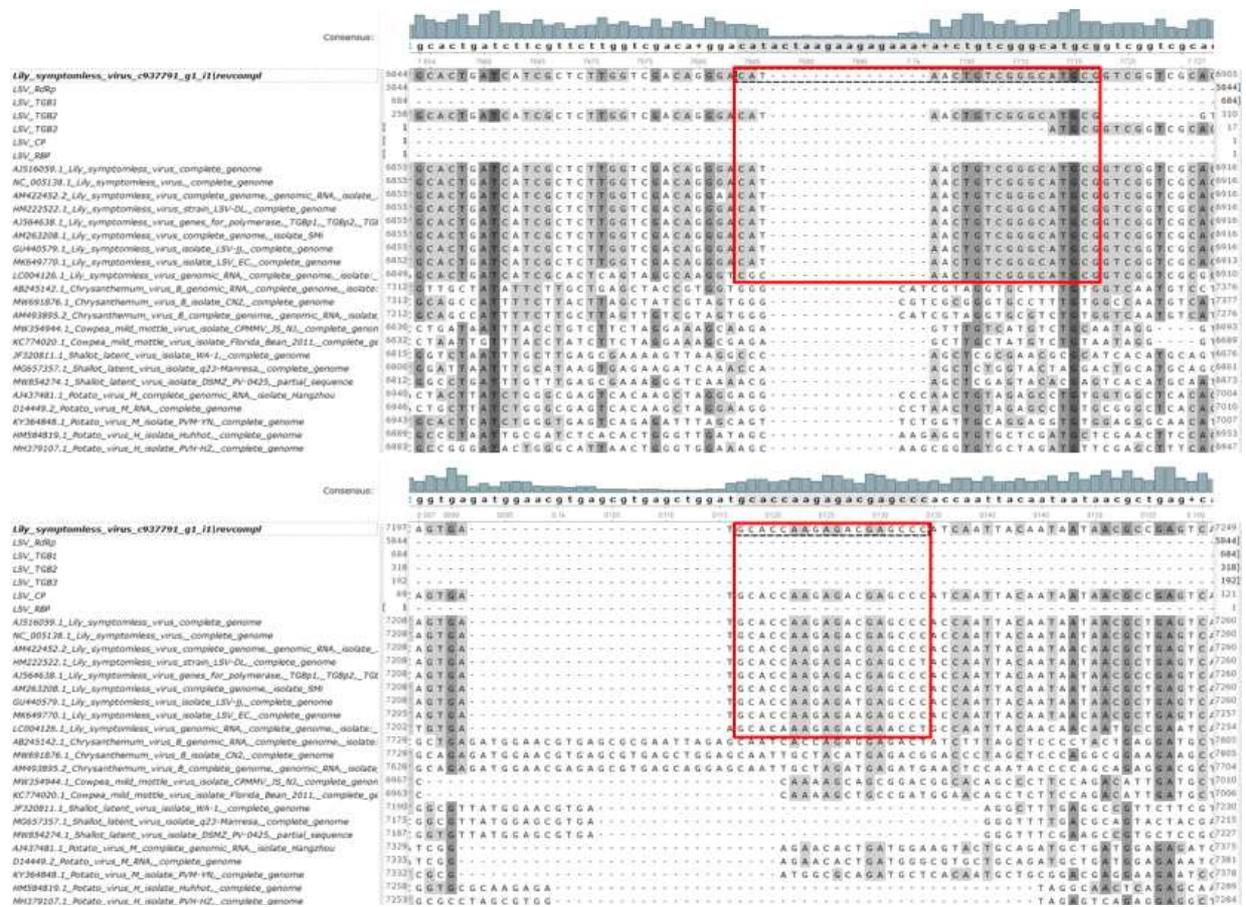


그림 39. *in silico* 분석을 통한 *Lily symptomless virus*(LSV)의 정밀 진단용 프라이머 설계. 붉은색 박스: 진단용 프라이머 염기서열 위치. 전 세계에서 보고된 LSV의 분리주들과 *Carlavirus*속 바이러스들의 염기서열을 NCBI를 통해 확보하였음. 이와 함께 메타전사체분석을 통해 획득한 LSV의 염기서열을 함께 정렬하여 LSV 진단용 프라이머를 설계하였으며 염기서열 정렬에 사용된 알고리즘은 Clustal W를 이용하였음.

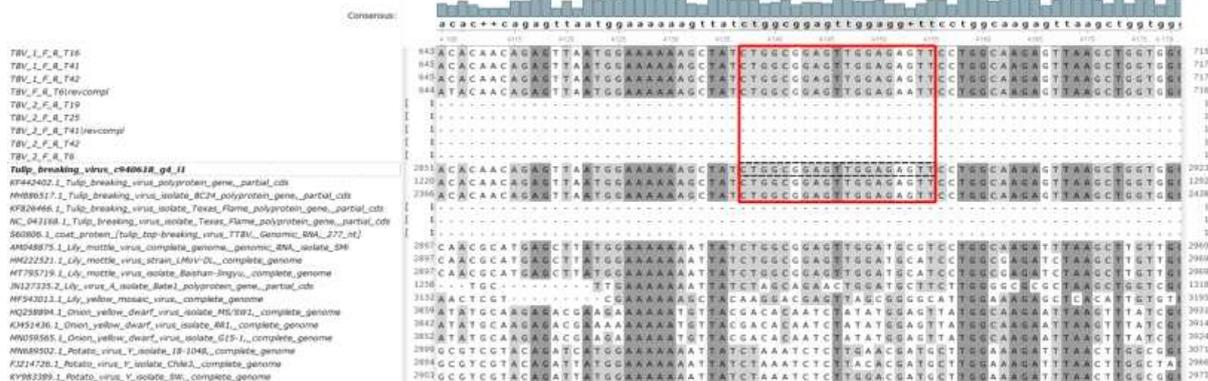
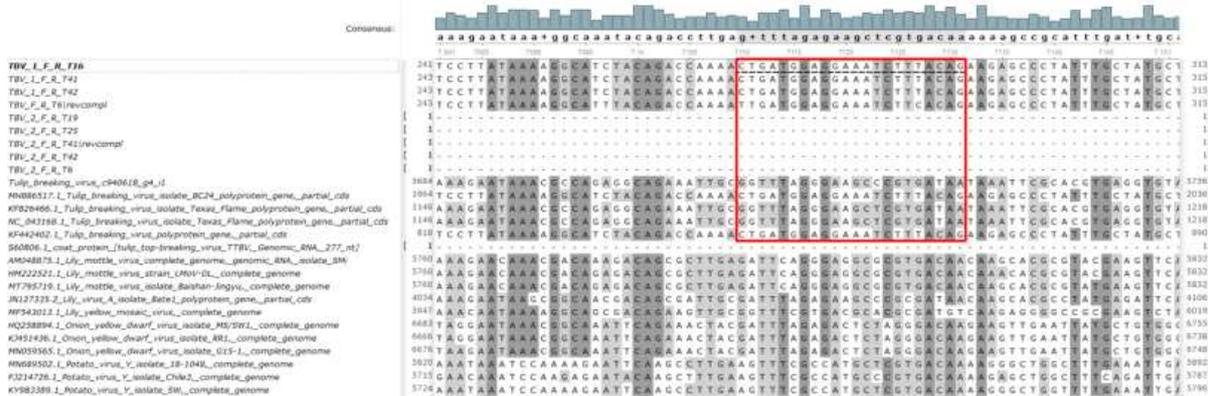


그림 40. *in silico* 분석을 통한 *Tulip breaking virus*(TBV)의 정밀 다중 진단용 프라이머 설계. 붉은 색 박스: 진단용 프라이머 염기서열 위치. 전 세계에서 보고된 TBV의 분리주들과 *Potexvirus*속 바이러스들의 염기서열을 NCBI를 통해 확보하였음. 이와 함께 메타전사체분석을 통해 획득한 TBV의 염기서열을 함께 정렬하여 TBV 진단용 프라이머를 설계하였으며 염기서열 정렬에 사용된 알고리즘은 Clustal W를 이용하였음.

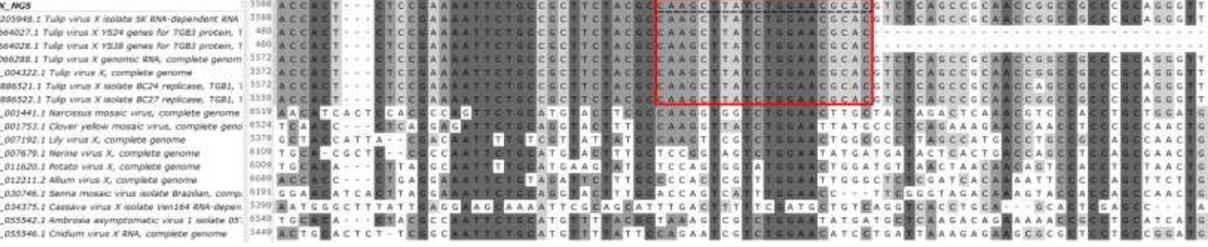
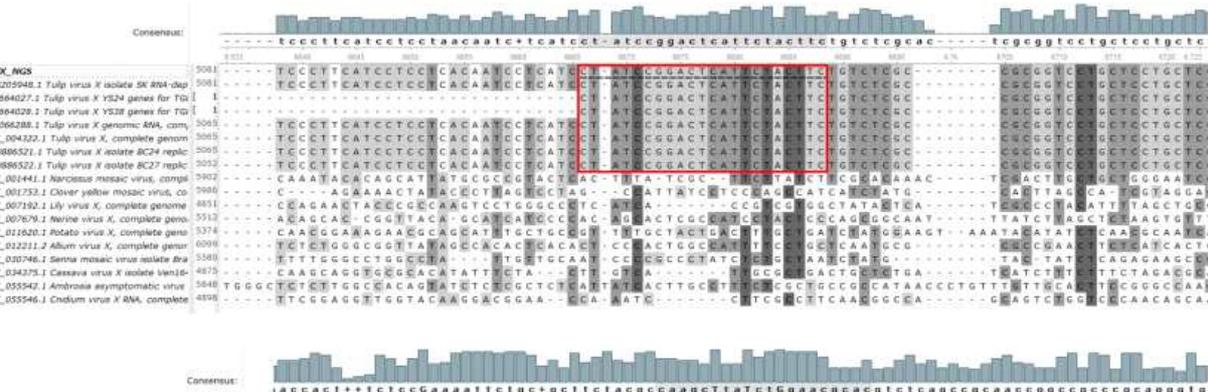


그림 41. *in silico* 분석을 통한 *Tulip virus X*(TVX)의 정밀 다중 진단용 프라이머 설계. 붉은색 박스: 진단용 프라이머 염기서열 위치. 전 세계에서 보고된 TVX의 분리주들과 *Potexvirus*속 바이러스들의 염기서열을 NCBI를 통해 확보하였음. 이와 함께 메타전사체분석을 통해 획득한 TVX의 염기서열을 함께 정렬하여 TVX 진단용 프라이머를 설계하였으며 염기서열 정렬에 사용된 알고리즘은 Clustal W를 이용하였음.

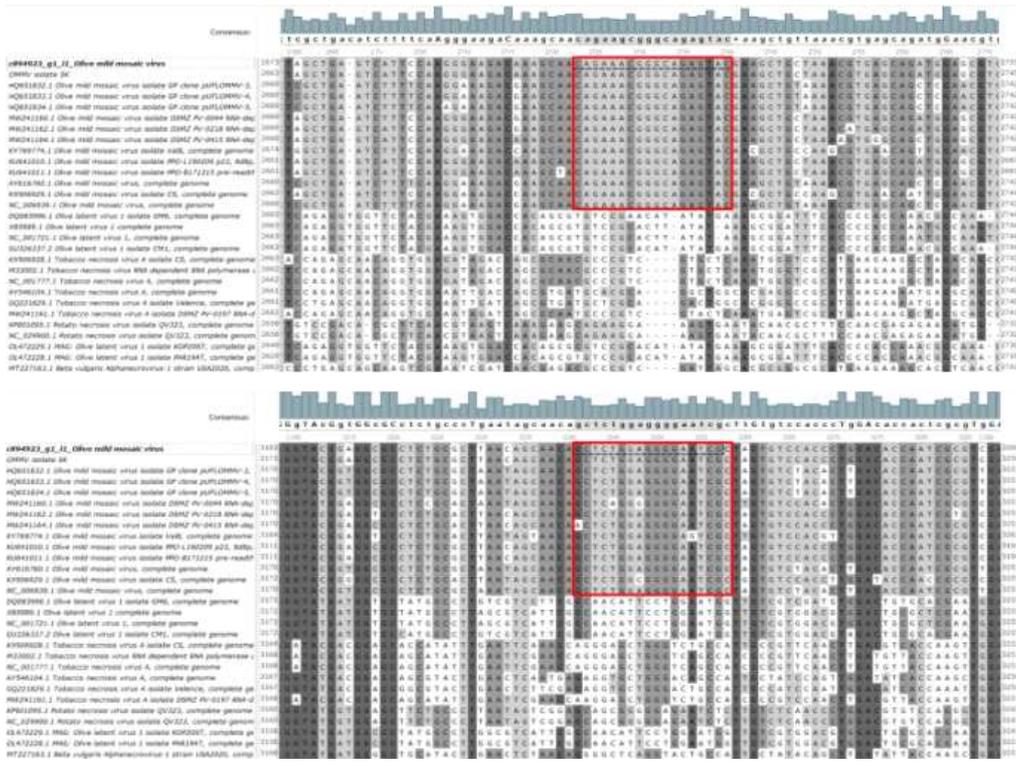


그림 42. *in silico* 분석을 통한 *Olive mild mosaic virus*(OMMV)의 정밀 다중 진단용 프라이머 설계. 붉은색 박스: 진단용 프라이머 염기서열 위치. 전 세계에서 보고된 OMMV의 분리주들과 *Alphanecrovirus*속 바이러스들의 염기서열을 NCBI를 통해 확보하였음. 이와 함께 메타전사체분석을 통해 획득한 OMMV의 염기서열을 함께 정렬하여 OMMV 진단용 프라이머를 설계하였으며 염기서열 정렬에 사용된 알고리즘은 Clustal W를 이용하였음.

- 수선화 바이러스 4종에 대한 개별 유전자진단법을 설계하였음(그림 43-46).
- *Narcissus late season yellows virus*(NLSYV)
- *Narcissus latent virus*(NLV)
- *Narcissus yellow stripe virus*(NYSV)
- *Nerine latent virus*(NeLV)

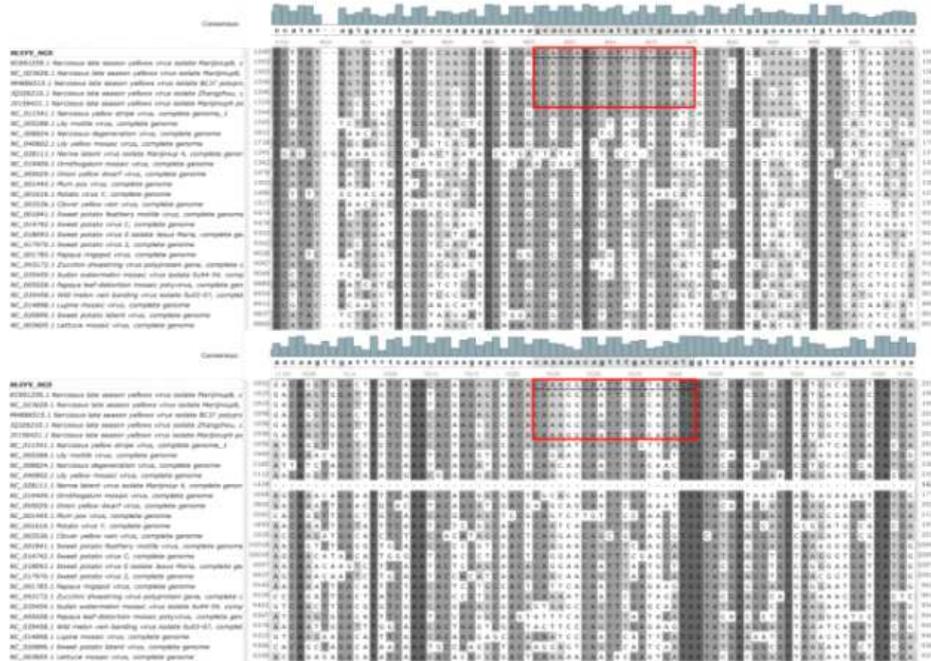


그림 43. *in silico* 분석을 통한 *Narcissus late season yellows virus*(NLSYV)의 정밀 다중 진단용 프라이머 설계. 붉은색 박스: 진단용 프라이머 염기서열 위치. 전 세계에서 보고된 NLSYV의 분리주들과 *Potyvirus*속 바이러스들의 염기서열을 NCBI를 통해 확보하였음. 이와 함께 메타전사체분석을 통해 획득한 NLSYV의 염기서열을 함께 정렬하여 NLSYV 진단용 프라이머를 설계하였으며 염기서열 정렬에 사용된 알고리즘은 Clustal W를 이용하였음.

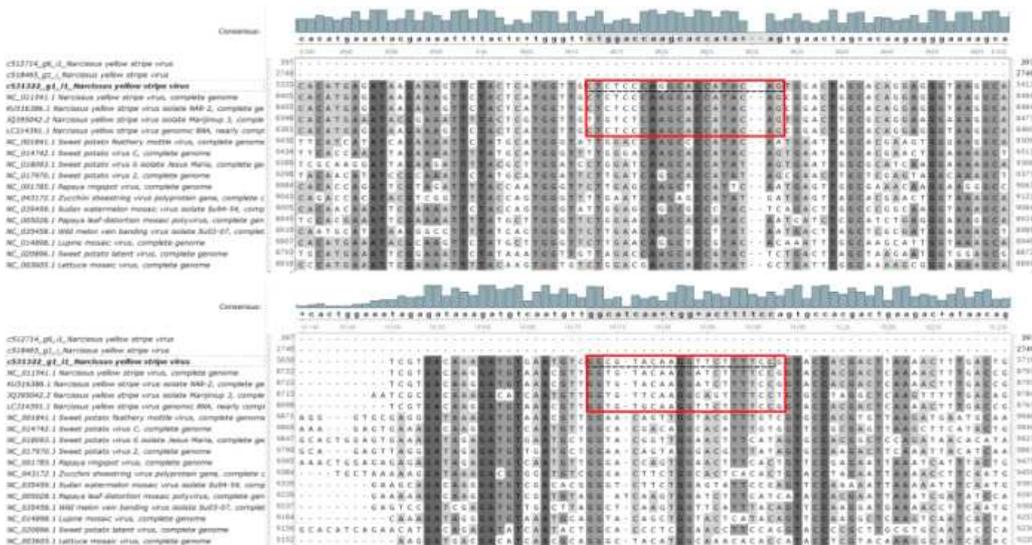


그림 44. *in silico* 분석을 통한 *Narcissus yellow stripe virus*(NYSV)의 정밀 진단용 프라이머 설계. 붉은색 박스: 진단용 프라이머 염기서열 위치. 전 세계에서 보고된 NYSV의 분리주들과 *Potyvirus*속 바이러스들의 염기서열을 NCBI를 통해 확보하였음. 이와 함께 메타전사체분석을 통해 획득한 NYSV의 염기서열을 함께 정렬하여 NYSV 진단용 프라이머를 설계하였으며 염기서열 정렬에 사용된 알고리즘은 Clustal W를 이용하였음.

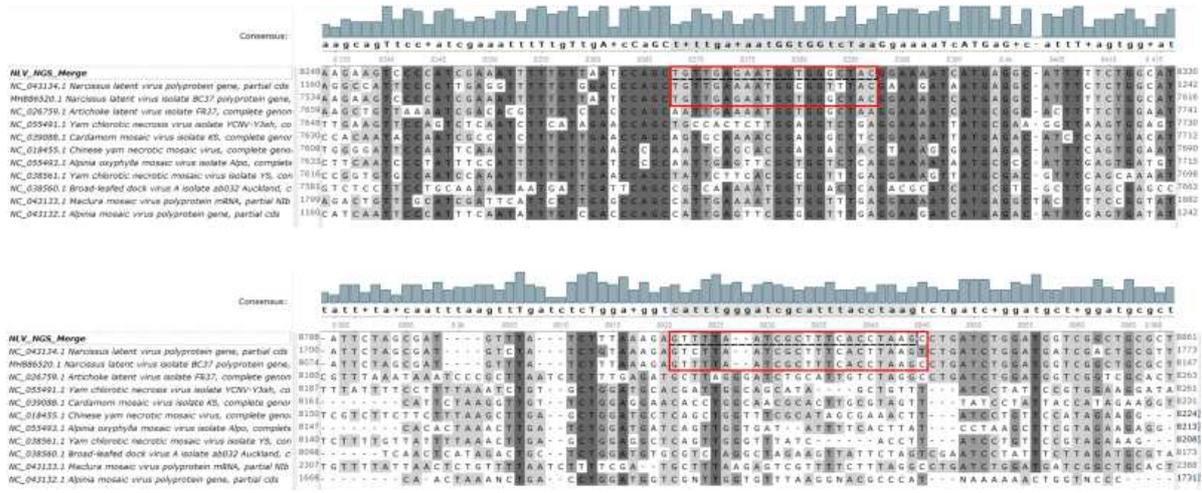


그림 45. *in silico* 분석을 통한 *Narcissus latent virus*(NLV)의 정밀 다중 진단용 프라이머 설계. 붉은색 박스: 진단용 프라이머 염기서열 위치. 전 세계에서 보고된 NLV의 분리주들과 *Macluravirus*속 바이러스들의 염기서열을 NCBI를 통해 확보하였음. 이와 함께 메타전사체분석을 통해 획득한 NLV의 염기서열을 함께 정렬하여 NLV 진단용 프라이머를 설계하였으며 염기서열 정렬에 사용된 알고리즘은 Clustal W를 이용하였음.

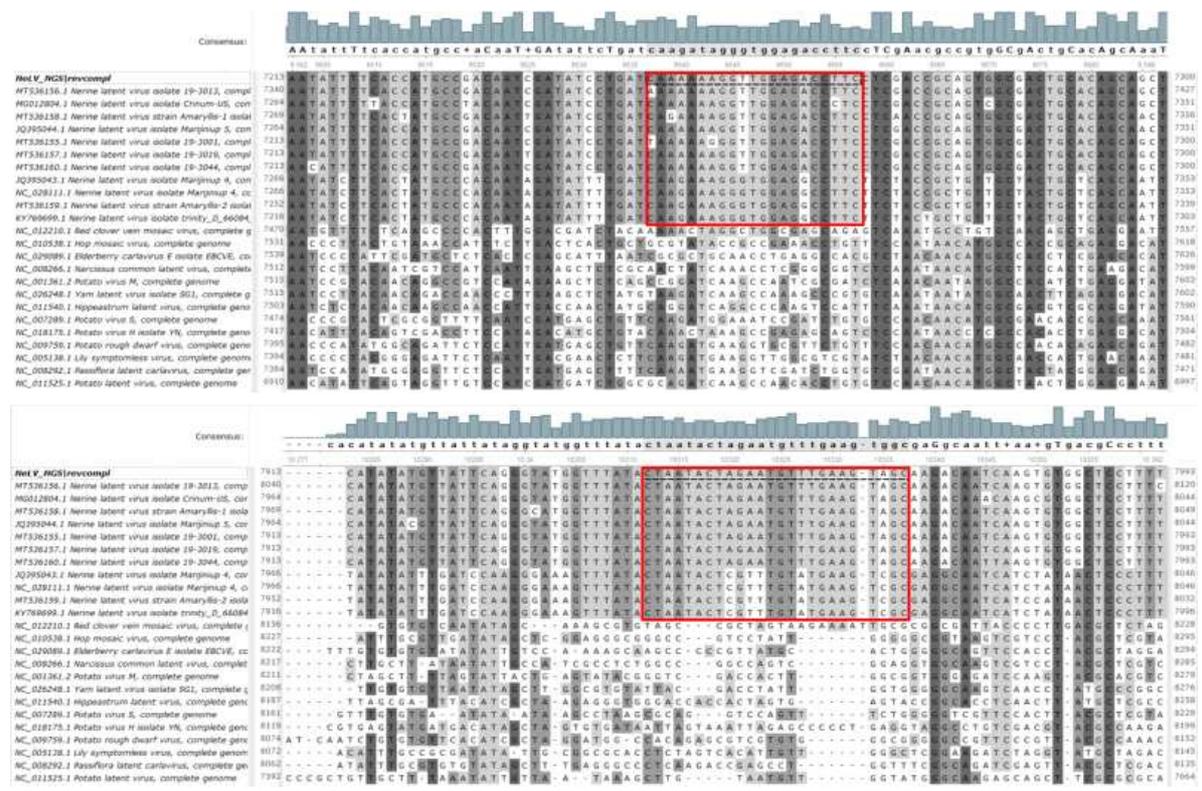


그림 46. *in silico* 분석을 통한 *Nerine latent virus*(NeLV)의 정밀 다중 진단용 프라이머 설계. 붉은색 박스: 진단용 프라이머 염기서열 위치. 전 세계에서 보고된 NeLV의 분리주들과 *Carlavirus*속 바이러스들의 염기서열을 NCBI를 통해 확보하였음. 이와 함께 메타전사체분석을 통해 획득한 NeLV의 염기서열을 함께 정렬하여 NeLV 진단용 프라이머를 설계하였으며 염기서열 정렬에 사용된 알고리즘은 Clustal W를 이용하였음.

○ 튨립 및 수선화 바이러스의 개별 진단용 프라이머의 선발

- 튨립 바이러스에 특이적인 프라이머 조합을 찾기 위하여 5단계의 RT-PCR 분석을 이용한 선발 단계를 거쳤음(표 25).
- 선발 단계를 거쳐 튨립에 발생하는 바이러스 4종을 특이적으로 진단할 수 있는 개별진단법을 확보하였음(표 26-29).

표 25. 튨립 바이러스 진단용 프라이머의 선발 단계 및 선발 조합 수

선발 단계	선발 프라이머 조합 수 <sup>a</sup>			
	LSV	TBV	TVX	OMMV
1단계 프라이머 설계	32	40	32	22
2단계 대상 바이러스 게놈에 대한 반응성	30	35	27	20
3단계 기주 식물 게놈에 대한 반응성	10	20	9	15
4단계 대상 바이러스의 유연종에 대한 반응	9	15	6	10
5단계 기타 튨립 바이러스에 대한 반응성	9	7	4	8

<sup>a</sup> LSV: *Lily symptomless virus*, TBV: *Tulip breaking virus*, TVX: *Tulip virus X*; OMMV: *Olive mild mosaic virus*.

표 26. *Lily symptomless virus*(LSV)의 최적 진단을 위해 선발한 프라이머 조합

조합	프라이머	염기서열 정보(5' → 3')	길이	산물(bp)
LSV-2G	LSV-F6875	CATAACTGTCGGGCATGCG	19	622
	LSV-R7497	CCATTTGCAATATACTGATGCG	22	
LSV-3G	LSV-F6885	GGGCATGCGGTCGGTTCG	18	612
	LSV-R7497	CCATTTGCAATATACTGATGCG	22	
LSV-5C	LSV-F6901	CGGTCGCACTAACACTTTG	19	321
	LSV-R7222	GGGCTCGTCTCTTGGTGC	18	
LSV-5D	LSV-F6901	CGGTCGCACTAACACTTTG	19	375
	LSV-R7276	CAGCCGGGTTAGTCGTTGC	19	
LSV-5E	LSV-F6901	CGGTCGCACTAACACTTTG	19	437
	LSV-R7338	GATTGGAATTGTGCTTTTCAGC	21	
LSV-5F	LSV-F6901	CGGTCGCACTAACACTTTG	19	537
	LSV-R7438	CGACGCCAACCTTCACTTG	19	
LSV-6G	LSV-F6901	CGGTCGCACTAACACTTTG	19	537
	LSV-R7438	CGACGCCAACCTTCATCTTG	20	
LSV-7C	LSV-F7015	CTGTAACCTTAGTCCAGCAC	20	207
	LSV-R7438	CGACGCCAACCTTCATCTTG	20	
LSV-7F	LSV-F7015	GGGCTCGTCTCTTGGTGC	18	423
	LSV-R7438	CGACGCCAACCTTCATCTTG	20	

<sup>a</sup> 프라이머 위치 결정을 위한 참조 번호(National Center for Biotechnology Information)로 LSV는 GU440578를 참조해 결정하였음.

표 27. *Tulip breaking virus*(TBV)의 최적 진단을 위해 선발한 프라이머 조합

조합	프라이머	염기서열 정보(5' → 3')	길이	산물(bp)
TBV-2C	TBV-F2363	GAGTGACAGCCTTGAATCTG	20	613
	TBV-R2976	CACCCATAGTAAGTTTTTCGTCTG	22	
TBV-2D	TBV-F2363	GAGTGACAGCCTTGAATCTG	20	677
	TBV-R3040	GCTACCACTTTCCATGATACG	21	
TBV-5C	TBV-F2591	GATAACGCAGGACAGAAGTG	20	385
	TBV-R2976	CACCCATAGTAATTTTTTCGTCTG	20	
TBV-5D	TBV-F2591	GATAACGCAGGACAGAAGTG	20	449
	TBV-R3040	GCTACCACTTTCCATGATACG	21	
TBV-7F	TBV-F3370	ACTACACGAAGCTCTAACCC	20	122
	TBV-R3492	GTTCCAACCTTTTGTGCATCG	20	
TBV-8H	TBV-F8761	AACCCGGAGCAAGTGGATC	19	571
	TBV-R9332	GAGACAAATTAATACGCGC	20	
TBV-9H	TBV-F8817	TGGTTTGAGGGTGTAAAGC	20	515
	TBV-R9332	GAGACAAATTAATACCGCGC	21	

<sup>a</sup> 프라이머 위치 결정을 위한 참조 번호(National Center for Biotechnology Information)로 TBV는 KF442402를 참조해 결정하였음.

표 28. *Tulip virus X*(TVX)의 최적 진단을 위해 선발한 프라이머 조합

조합	프라이머	염기서열 정보(5' → 3')	길이	산물(bp)
TVX-4B	TVX-F4409	CATCCCCGAGTCTAACAAAC	20	129
	TVX-R4538	TGTGGCTGGTGGTCTTGAG	19	
TVX-6G	TVX-F5093	CTATCCGGACTCATTCTACTTC	21	739
	TVX-R5832	GAGTTAGCTCTTGATTCTGAAG	20	
TVX-7H	TVX-FF6505	CCCCAACACCGCACTAAG	18	609
	TVX-RR7114	GATAGGTCGGATTGGAGTTC	19	
TVX-9H	TVX-FF6756	CCCCAACACCGCACTAAG	18	358
	TVX-RR7114	GATAGGTCGGATTGGAGTTC	19	

<sup>a</sup> 프라이머 위치 결정을 위한 참조 번호(National Center for Biotechnology Information)로 TVX는 MH886521를 참조해 결정하였음.

표 29. *Olive mild mosaic virus*(OMMV)의 최적 진단을 위해 선발한 프라이머 조합

조합	프라이머	염기서열 정보(5' → 3')	길이	산물(bp)
OMMV-1E	OMMV-F5777	TGATGCGCAGGACACCGTA	19	579
	OMMV-R6355	CACAATCGTTTCCAATTGATCA	21	
OMMV-a1	OMMV-F4807	ACCAAACATGCCTAAGAGAG	21	240
	OMMV-R5047	AATCGTCGACATTTGGTTGG	20	
OMMV-a2	OMMV-F4807	ACCAAACATGCCTAAGAGAG	21	391
	OMMV-R5198	CTGAACACCTAATCCATCTC	20	
OMMV-a6	OMMV-F4807	ACCAAACATGCCTAAGAGAG	21	826
	OMMV-R5633	AGCCAGTTAACTAACACTCAA	21	
OMMV-b3	OMMV-F4874	CAGAAACGGGCAGAGTACG	19	403
	OMMV-R5277	CGGTGTCCTGCGCATCATA	19	
OMMV-c3	OMMV-F5022	CAGACCTCGCGTGCCACA	18	255
	OMMV-R5277	CGGTGTCCTGCGCATCATA	19	
OMMV-d5	OMMV-F5122	TCAGTTTCACCGCCCAGC	18	442
	OMMV-R5564	GCATAAATACATCGCCACA	20	
OMMV-d6	OMMV-F5122	TCAGTTTCACCGCCCAGC	18	511
	OMMV-R5633	AGCCAGTTAACTAACACTCAA	21	

<sup>a</sup> 프라이머 위치 결정을 위한 참조 번호(National Center for Biotechnology Information)로 OMMV는 MW241164를 참조해 결정하였음.

- 수선화 바이러스에 특이적인 프라이머 조합을 찾기 위하여 5단계의 RT-PCR 분석을 이용한 선발 단계를 거쳤음(표 30).
- 선발 단계를 거쳐 툴립에 발생하는 바이러스 4종을 특이적으로 진단할 수 있는 개별진단법을 확보하였음(표 31-34).

표 30. 수선화 바이러스를 진단용 프라이머의 선발 단계 및 선발 조합 수

선발 단계	선발 프라이머 조합 수 <sup>a</sup>			
	NLSYV	NLV	NYSV	NeLV
1단계 프라이머 설계	28	30	23	26
2단계 대상 바이러스 계놈에 대한 반응성	23	15	21	18
3단계 기주 식물 계놈에 대한 반응성	22	7	6	10
4단계 대상 바이러스의 유연종에 대한 반응	13	3	5	3
5단계 기타 수선화 바이러스에 대한 반응성	12	3	4	2

<sup>a</sup> NLSYV: *Narcissus late season yellows virus*, NLV: *Narcissus latent virus*, NYSV: *Narcissus yellow stripe virus*, NeLV: *Nerine latent virus*.

표 31. *Narcissus late season yellows virus*(NLSYV)의 최적 진단을 위해 선발한 프라이머 조합

프라이머	염기서열 정보(5' → 3')	위치 <sup>a</sup>	길이	산물(bp)
NLSYV_F1	GTCTCAAGCACCTTATAGTG	8399-8418	20	565
NLSYV_R2	ATACACCACACCATAAGTCC	8969-8989	20	
NLSYV_F2	GCACCATACATTGCTGAGAC	8439-8458	20	434
NLSYV_R1	CATGTGTCTGAATTGCCTTTG	8953-8872	20	
NLSYV_F3	GAAAAGCACCATACATTGCTG	8470-8490	21	520
NLSYV_R2	ATACACCACACCATAAGTCC	8970-8989	20	
NLSYV_F4	GAAGCAATTTTGGGAAGATTTTG	8556-8575	22	353
NLSYV_R1	CATGTGTCTGAATTGCCTTTG	8953-8872	20	
NLSYV_F6	CACAAAGGCAATTCGATACAT	8887-8907	21	557
NLSYV_R5	CACACAATATTACACGCCCC	9425-9444	20	
NLSYV_F6	CACAAAGGCAATTCGATACAT	8887-8907	21	730
NLSYV_R6	CTGTTGGAGAGAAGCTCTCAC	9597-9617	21	

<sup>a</sup> 프라이머 위치 결정을 위한 참조 번호(National Center for Biotechnology Information)로 NLSYV는 LC664206를 참조해 결정하였음.

표 32. *Narcissus latent virus*(NLV)의 최적 진단을 위해 선발한 프라이머 조합

프라이머	염기서열 정보(5' → 3')	위치 <sup>a</sup>	길이	산물(bp)
NLV_F2	CCTGACAATAGTTCAAGTGG	6772-6791	20	1,055
NLV_R3	CGTAGGGGATCATCGATTTC	7845-7864	20	
NLV_F3	CGACAATGAAGATGAGAGTG	7090-7109	20	740
NLV_R3	CGTAGGGGATCATCGATTTC	7845-7864	20	
NLV_F4	TGTTGAGAATGGTGGGCTAC	7750-7769	20	554
NLV_R4	CTTAGGTGAAAGCGATTAAC	8261-8282	22	

<sup>a</sup> 프라이머 위치 결정을 위한 참조 번호(National Center for Biotechnology Information)로 NLV는 MH886520를 참조해 결정하였음.

표 33. *Narcissus yellow stripe virus*(NYSV)의 최적 진단을 위해 선별한 프라이머 조합

프라이머	염기서열 정보(5' → 3')	위치 <sup>a</sup>	길이	산물(bp)
NYSV_F1	GAAGTAGGCCTCAAATACAC	8253-8274	20	578
NYSV_R1	GGAAAAGATCCTTGTACACC	8794-8813	20	
NYSV_F1	GAAGTAGGCCTCAAATACAC	8253-8274	20	754
NYSV_R2	CGTATTCTGATTTTACTCCTTC	8918-8939	22	
NSYV_F2	CTCTCCCAAGCACCATACAG	8438-8457	20	326
NYSV_R1	GGAAAAGATCCTTGTACACC	8794-8813	20	
NYSV_F5	GTGGATGATGATAAGATGGC	9011-9030	20	564
NYSV_R4	CTCTACGATGAGAATACTAACG	9484-9505	22	

<sup>a</sup> 프라이머 위치 결정을 위한 참조 번호(National Center for Biotechnology Information)로 NYSV는 KU516386를 참조해 결정하였음.

표 34. *Nerine latent virus*(NeLV)의 최적 진단을 위해 선별한 프라이머 조합

프라이머	염기서열 정보(5' → 3')	위치 <sup>a</sup>	길이	산물(bp)
NeLV_F2	CAAAAAAGGTTGGAGACCTTC	7300-7320	21	657
NeLV_R5	GGGGAACACACAAACGGTA	7887-7905	19	
NeLV_F2	CAAAAAAGGTTGGAGACCTTC	7300-7320	21	718
NeLV_R6	GCTACTTCAAACATTCTAGTATTAG	7940-7964	25	

<sup>a</sup> 프라이머 위치 결정을 위한 참조 번호(National Center for Biotechnology Information)로 NeLV는 ON228217를 참조해 결정하였음.

## 8. 구근 화훼류별 바이러스 다중진단법 개발

### ○ 튤립 바이러스의 개별진단법 조합을 이용한 다중진단법 개발

- 확보한 튤립 바이러스 개별진단법 조합(그림 47)을 기반으로 튤립에 발생하는 주요 바이러스의 다중진단법을 개발하였음.
- 프라이머 세트 사이의 간섭을 줄이는 프라이머 조합을 선택하기 위해 다수의 다중 RT-PCR 실험을 수행하였음.
- 최종적으로 튤립에 감염하는 바이러스 4종 즉, *Lily symptomless virus*(LSV), *Tulip breaking virus*(TBV), *Tulip virus X*(TVX), 그리고 *Olive mild mosaic virus*(OMMV)에 대해 각각 효과적으로 다중 진단할 수 있는 프라이머 조합을 선별하였음(표 35, 그림 48).
- 4종의 바이러스인 LSV, TBV, TVX, 그리고 OMMV에 대한 정방향/역방향 프라이머 농도를 모두 10 pmol/μl, 그리고 DNase/RNase-free water (D.W)를 넣어 최종 반응액 20 μl를 조성으로 한 28가지의 앰플리콘을 대상으로 다중 RT-PCR을 수행하였음.

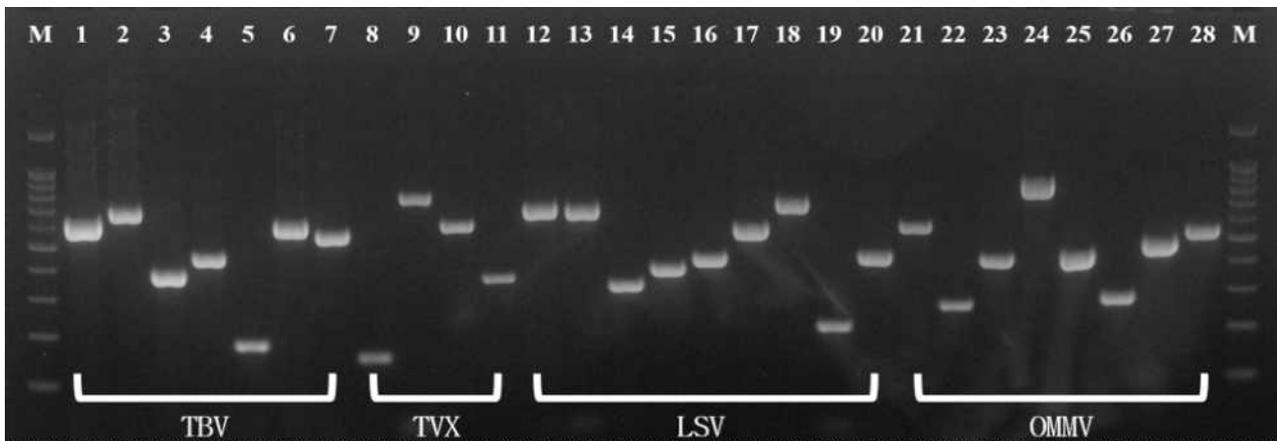


그림 47. 튤립에 발생하는 바이러스 4종을 진단하기 위해 설계한 종 특이적 프라이머 조합의 RT-PCR 반응 결과. 28개의 종 특이적 프라이머 세트는 튤립에서 발생하는 4종 바이러스의 다중 진단을 위한 진단법 개발에 사용되었음. M 레인: 사이즈 마커, 1-7 레인: *Tulip breaking virus*(TBV)에 감염된 샘플; 8-11 레인: *Tulip virus X*(TVX)에 감염된 샘플; 12-19 레인: *Lily symptomless virus*(LSV)에 감염된 샘플; 20-27 레인: *Olive mild mosaic virus*(OMMV)에 감염된 샘플.

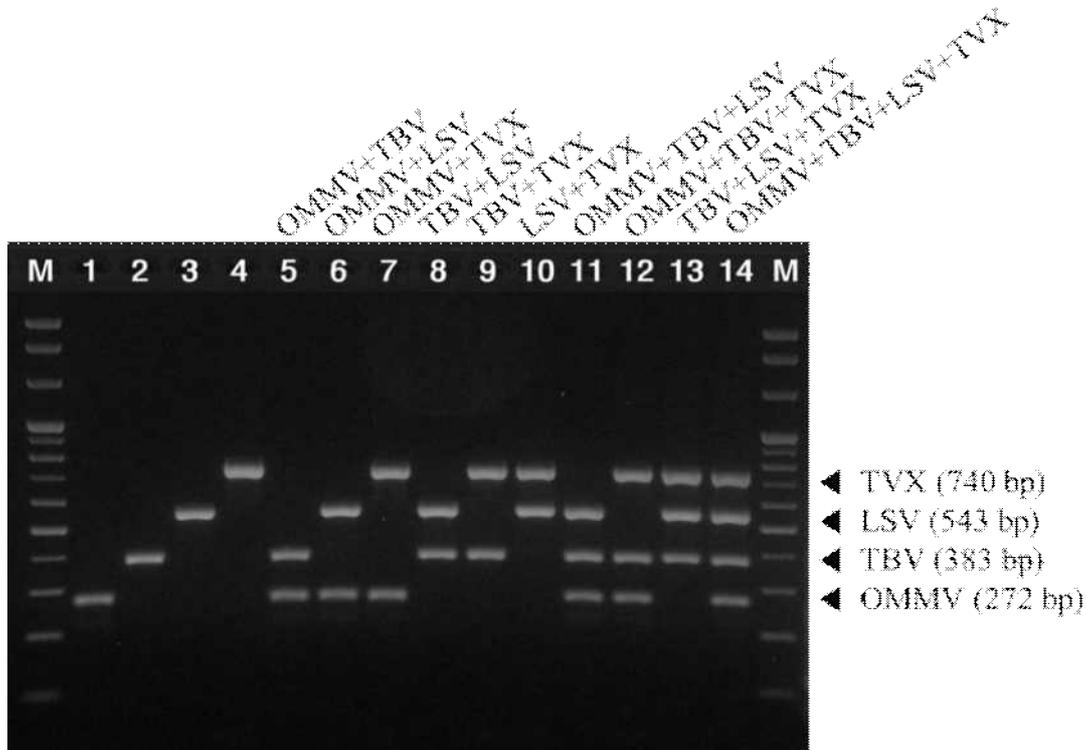


그림 48. 튨립에 발생하는 바이러스 4종 다중진단을 위해 선별한 프라이머 조합의 RT-PCR 반응 결과. 4종의 바이러스(TVX, LSV, TBV, 및 OMMV)에 대해 각각 특이성을 갖도록 원하는 증폭산물이 검출되었음. 2종의 프라이머 세트 및 3종의 프라이머 세트와 4종의 프라이머 세트를 사용한 경우에서 4종의 바이러스에 대해 프라이머 간의 간섭 없이 효과적으로 진단할 수 있음을 확인하였음. M 레인: 사이즈 마커, 1-4 레인: 1가지 바이러스에 감염된 샘플을; 5-10 레인: 2가지 바이러스에 감염된 샘플, 11-14 레인: 3가지 바이러스에 감염된 샘플; 15레인: 4가지 바이러스에 된샘플.

표 36. 최종 선발된 튨립 주요 바이러스의 다중 진단용 프라이머 조합<sup>a</sup>

바이러스 <sup>b</sup>	프라이머	염기서열 정보(5' → 3')	위치	크기 (bp)
TVX	TVX-F5093	CTATCCGGACTCATTCTACTTC	5,093-5,114	740
	TVX-R5832	GAGTTAGCTCTTGATTCGAAG	5,812-5,832	
TBV	LSV-F6901	CGGTGCGACTAACACTTTG	6,901-6,919	543
	LSV-R7438	CGACGCCAACCTTCATCTTG	7,419-7,438	
OMMV	TBV-F2591	GATAACGCAGGACAGAAGTG	2,109-2,128	383
	TBV-R2976	CACCCATAGTAAGTTTTTCGTCG	2,470-2,488	
LSV	OMMV-F5022	CAGACCTCGCGTGCCACA	2,839-2,853	272
	OMMV-R5277	CGGTGTCCTGCGCATCAT A	3,089-3,107	

<sup>a</sup> 튨립 바이러스 4종(TVX, TBV, OMMV, 및 LSV)의 개별진단법 15종 중 프라이머 간에 간섭없이 효과적으로 4종 바이러스를 다중진단 할 수 있는 프라이머 조합을 선별함.

<sup>b</sup> *Lily symptomless virus*(LSV), *Tulip breaking virus*(TBV), *Tulip virus X*(TVX), *Olive mild mosaic virus*(OMMV).

○ 튨립 다중 RT-PCR에서 검출한계 평가

- 최종적으로 선별한 프라이머 세트의 바이러스 검출한계를 평가하기 위해 4종 바이러스 바이러스가 검출된 양성대조구를 선정하여 전체 RNA를 추출하였음.
- 추출한 RNA의 농도는 99.2 ng/μl이며 이를 10배씩 희석( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ )하여 실험에 사용하였음.
- 검출한계 측정 결과, 튨립 바이러스 다중 진단용 프라이머 세트 모두  $10^{-5}$ 까지 희석한 시료에서 육안으로 밴드를 확인하였음.
- 바이러스 농도가 낮은 튨립 시료에서도 바이러스를 다중으로 검출할 수 있을 것으로 판단됨.
- 본 연구에서 발명한 다중 진단법은 ‘튨립에 발생하는 바이러스 4종의 다중 진단용 조성물 및 이의 이용(Composition for multiple detection of four viruses infecting Daffodil and its use)’의 명칭으로 특허 출원하였음(출원번호: 10-2023-0071420).

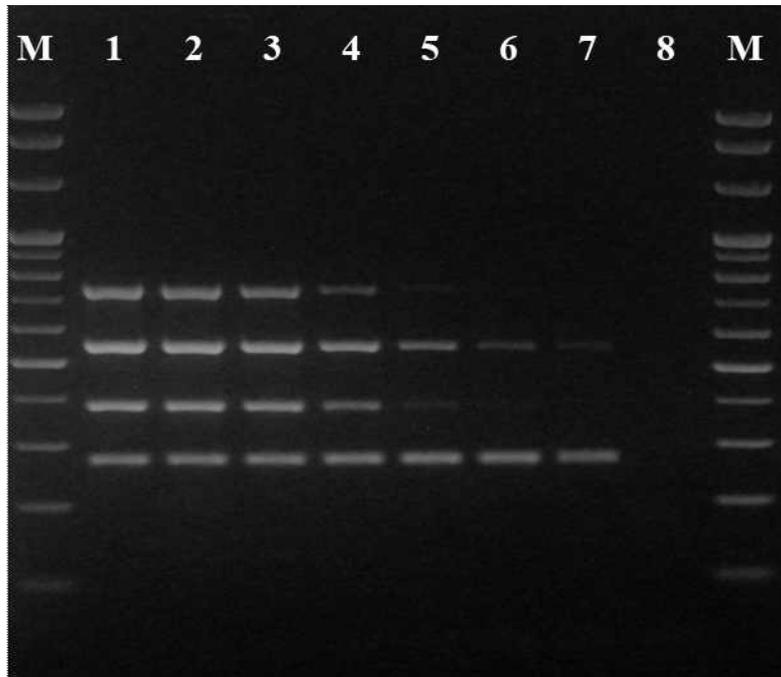


그림 49. 튨립에 발생하는 바이러스 4종의 다중진단을 위해 선택한 프라이머 세트의 다중 RT-PCR 검출의 한계를 평가하기 위한 실험 결과. M 레인은 사이즈 마커, 1 레인은 튨립 유래 바이러스 4종이 검출된 양성대조구 전체 RNA의 다중 RT-PCR 진단결과를 나타내었고, 2-8 레인은 상기된 양성대조구 전체 RNA를 10배씩( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ) 희석한 전체 RNA의 다중 RT-PCR 진단 결과를 나타내었음.

○ 수선화 바이러스의 개별진단법 조합을 이용한 다중진단법 개발

- 확보한 수선화 바이러스 개별진단법 조합(그림 50)을 기반으로 수선화에 발생하는 주요 바이러스의 다중진단법을 개발하였음.
- 프라이머 세트 사이의 간섭을 줄이는 프라이머 조합을 선택하기 위해 다수 횡수의 다중 RT-PCR 실험을 수행하였음.
- 최종적으로 수선화를 감염시키는 바이러스 4종 즉, *Narcissus late season yellows virus*(NLSYV), *Narcissus latent virus*(NLV), *Narcissus yellow stripe virus*(NYSV), 및 *Nerine latent virus*(NeLV)에 대해 각각 효과적으로 다중 진단할 수 있는 프라이머 조합을 선별하였음 (표 36, 그림 51).
- 1종의 바이러스인 NYSV에 대한 정방향/역방향 프라이머 농도를 5 pmol/μl, 3종의 바이러스인 NLSYV, NLV 및 NeLV에 대한 정방향/역방향 프라이머 농도를 각각 10 pmol/μl 그리고 DNase/RNase-free water (D.W)를 넣어 최종 반응액 20 μl를 조성으로 한 15가지의 앰플리콘을 대상으로 다중 RT-PCR을 수행하였음.

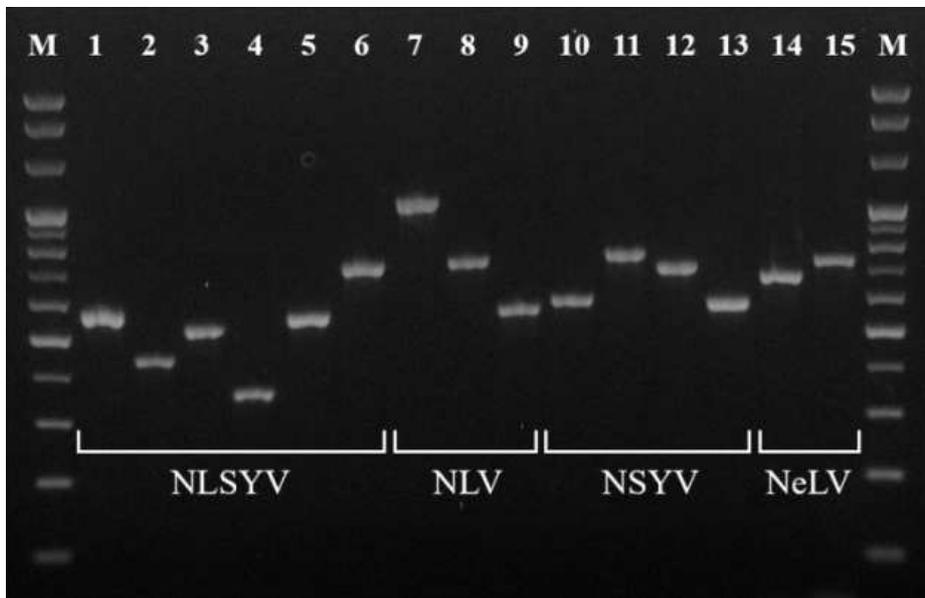


그림 50. 수선화에 발생하는 바이러스 4종을 진단하기 위해 설계한 종 특이적 프라이머 조합의 RT-PCR 반응 결과. 15개의 종 특이적 프라이머 세트는 수선화에서 발생하는 4종 바이러스의 다중진단을 위한 진단법 개발에 사용되었음. M 라인: 사이즈 마커, 1-6 라인: *Narcissus late season yellows virus*(NLSYV)에 감염된 샘플; 7-9 라인: *Narcissus latent virus*(NLV)에 감염된 샘플; 10-13 라인: *Narcissus yellow stripe virus*(NYSV)에 감염된 샘플; 14-15 라인: *Nerine latent virus*(NeLV)에 감염된 샘플.

표 36. 최종 선발된 수선화 주요 바이러스의 다중 진단용 프라이머 조합<sup>a</sup>

바이러스 <sup>b</sup>	프라이머	염기서열 정보(5' → 3')	위치	크기 (bp)
NLSYV	NLSYV_F2	GCACCATACATTGCTGAGAC	8439-8458	434
	NLSYV_R1	CATGTGTCGAATTGCCTTTG	8953-8872	
NLV	NLV_F4	TGTTGAGAATGGTGGGCTAC	7750-7769	554
	NLV_R4	CTTAGGTGAAAGCGATTA AAC	8261-8282	
NYSV	NYSV_F2	CTCTCCCAAGCACCATACAG	8438-8457	326
	NYSV_R1	GGAAAAGATCCTTGTACACC	8794-8813	
NeLV	NeLV_F2	CAAAAAGGTTGGAGACCTTC	7300-7320	718
	NeLV_R6	GCTACTTCAAACATTCTAGTATTAG	7940-7964	

<sup>a</sup> 수선화에 발생하는 4종 바이러스(NLSYV, NLV, NYSV, 및 NeLV)의 개별진단법 15종 중 프라이머 간에 간섭없이 효과적으로 4종 바이러스를 다중진단 할 수 있는 프라이머 조합을 선별함.

<sup>b</sup> NLSYV: *Narcissus late season yellows virus*, NLV: *Narcissus latent virus*, NYSV: *Narcissus yellow stripe virus*, NeLV: *Nerine latent virus*.

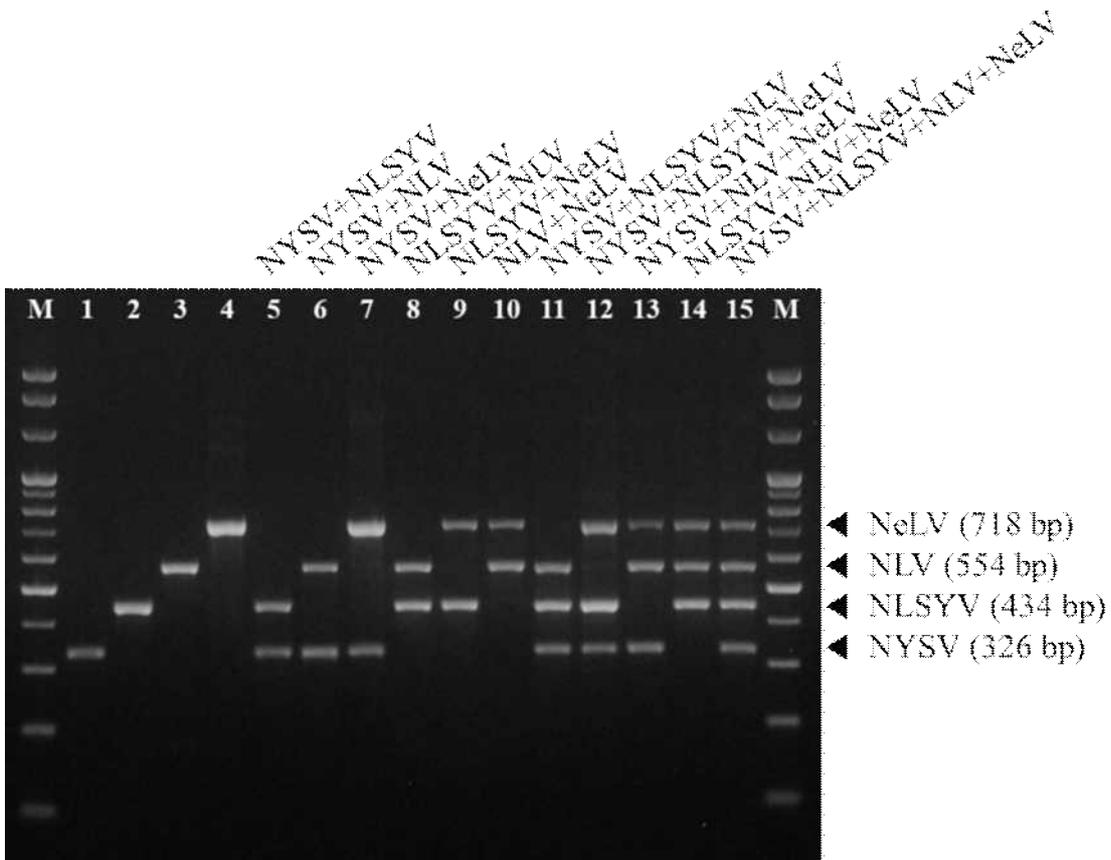


그림 51. 수선화에 발생하는 바이러스 4종 다중진단을 위해 선별한 프라이머 조합의 RT-PCR 반응 결과. 4종의 바이러스(NLSYV, NLV, NYSV 및 NeLV)에 대해 각각 특이성을 갖도록 원하는 증폭산물이 검출되었음. 2종의 프라이머 세트 및 3종의 프라이머 세트와 4종의 프라이머 세트를 사용한 경우에서 확인할 수 있듯이 4종의 바이러스(NLSYV, NYSV, NLV 및 NeLV)에 대해 프라이머 간의 간섭 없이 효과적으로 진단할 수 있음을 확인하였음. M 라인: 사이즈 마커, 1-4 라인: 1가지 바이러스에 감염된 샘플; 5-10 라인: 2가지 바이러스에 감염된 샘플, 11-14 라인: 3가지 바이러스에 감염된 샘플; 15라인: 4가지 바이러스에 감염된 샘플.

○ 수선화 다중 RT-PCR에서 검출한계 평가

- 최종적으로 선별한 프라이머 세트의 바이러스 검출한계를 평가하기 위해 4종 바이러스 바이러스가 검출된 양성대조구를 선정하여 전체 RNA를 추출하였음.
- 추출한 RNA의 농도는 99.2 ng/μl이며 이를 10배씩 희석( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ )하여 실험에 사용하였음.
- 검출한계 측정 결과, 수선화 바이러스 다중 진단용 프라이머 세트 모두  $10^{-2}$ 까지 희석한 시료에서 육안으로 밴드를 확인하였음(그림 52).
- 바이러스 농도가 낮은 수선화 시료에서도 바이러스를 다중으로 검출할 수 있을 것으로 판단됨.
- 본 연구에서 발명한 다중 진단법은 ‘수선화에 발생하는 바이러스 4종의 다중 진단용 조성물 및 이의 이용(Composition for multiple detection of four viruses infecting Daffodil and its use)’의 명칭으로 특허 출원(출원 번호 : 10-2023-0071420)을 신청하였음.

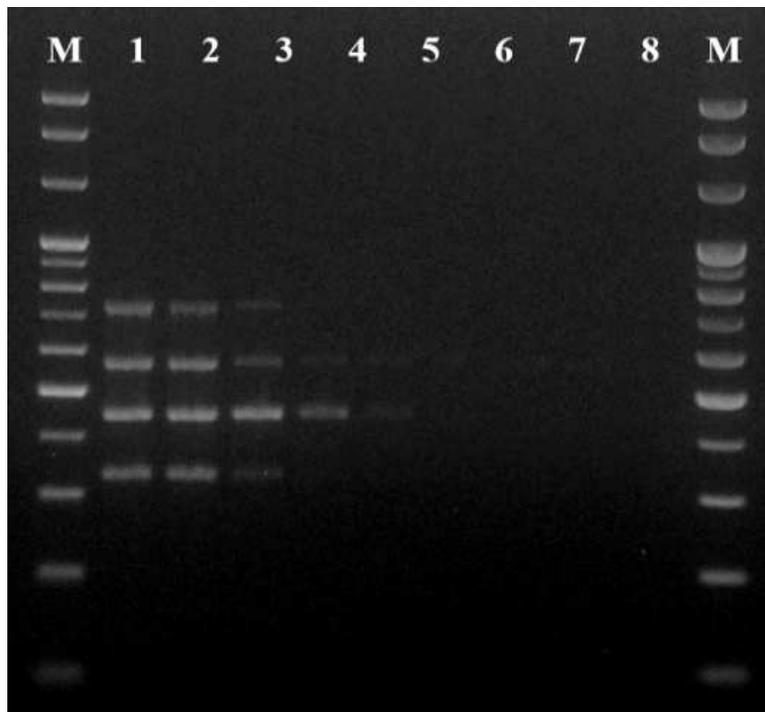


그림 52. 수선화에 발생하는 바이러스 4종의 다중진단을 위해 선택한 프라이머 세트의 다중 RT-PCR 검출의 한계를 평가하기 위한 실험 결과. M 레인은 사이즈 마커, 1 레인은 수선화 유래 바이러스 4종이 검출된 양성대조구 전체 RNA의 다중 RT-PCR 진단결과를 나타내었고, 2-8 레인은 상기된 양성대조구 전체 RNA를 10배씩( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ) 희석한 전체 RNA의 다중 RT-PCR 진단결과를 나타내었음.

### 9. 구근 화훼류 진단체계 확립을 위한 채집방법 표준화

○ 화훼류 조직별 및 시기별 바이러스 진단 결과의 분석

- 튤립 및 수선화에 조직별(구근, 잎, 꽃) 및 시기별(생육 초기, 중기, 후기)로 바이러스의 검출 양상을 분석하고자 시중에 판매하는 튤립 및 수선화 구근을 구매하여 온실에 재식하였음(그림 53-54).
- 구근에서 잎이 나온 뒤 1주 후를 생육 초기, 꽃이 완전히 개화한 직후를 생육 중기, 꽃이 낙화할 때를 생육 후기로 구분하고 시기별 분석 시료를 확보하였음.
- 생육 중기의 개체를 뽑아 꽃, 잎, 구근의 조직으로 구분하여 조직별 바이러스 분석 시료를 확보하였음.



그림 53. 튤립 및 수선화의 구근 사진. 튤립 구근 20구와 수선화 구근 24구를 구매하여 정량적 분석 시료를 확보하고자 하였음.



그림 54. 튤립 및 수선화의 생육 과정. 파종한 튤립과 수선화의 조직별(구근, 잎, 꽃) 및 생육별(초기, 중기, 후기)로 분석 시료를 확보하였음. A-C: 튤립의 생육 과정; D-F: 수선화의 생육 과정.

- 확보한 튨립의 조직별(구근, 잎, 꽃잎) 바이러스의 검출 양상을 조사하고자, 조직별 분석 시료를 채집하여 qRT-PCR 분석을 수행하였음.
- 제3공동연구기관(포스트 바이오)에서 개발한 qRT-PCR 기반 유전자진단 키트를 이용하여 qRT-PCR 분석을 수행함.
  - 튨립 바이러스(LSV, TVX, OMMV) 실험실용 동시 진단키트(POBGENTM Tulip Virus Detection Kit)
- 튨립 바이러스 2종(LSV, TVX)이 복합 감염된 튨립 개체의 조직별 시료를 대상으로 qRT-PCR 진단을 수행함(표 37, 38).
- 진단 결과, LSV는 비교적 구근에서 높은 바이러스 복제수(copy number)가 나타났고, TVX는 잎에서 높은 바이러스 복제수가 나타남.

표 37. qRT-PCR을 이용한 튨립의 조직별 바이러스 정량적 분석<sup>a, b</sup>

조직	복제수(Copy number)	
	LSV	TVX
구근	2.19E+09	4.53E+09
잎	1.19E+09	2.23E+10
꽃	7.15E+08	2.07E+10

<sup>a</sup> RT-PCR로 튨립 바이러스 2종(LSV, TVX)이 복합 감염된 시료를 이용하여 조직별(구근, 잎, 꽃)로 qRT-PCR 정량적 분석을 수행하였음.

<sup>b</sup> LSV : *Lily symptomless virus*, TVX: *Tuilp virus X*.

- 튨립 바이러스 2종(LSV, TVX)이 복합 감염된 튨립 개체의 시기별 시료를 대상으로 qRT-PCR 진단을 수행함.
- 진단 결과, LSV와 TVX 모두 비교적 생육 초기에서 중기에 많은 바이러스 복제수가 나타나며, 생육 후기에는 적은 바이러스 복제수가 나타남.

표 38. qRT-PCR을 이용한 튨립의 생육 시기별 바이러스 정량적 분석<sup>a, b</sup>

시기 <sup>a</sup>	복제수(Copy number)	
	LSV	TVX
초기	2.77E+04	5.07E+04
중기	6.98E+04	5.94E+03
후기	1.09E+04	-

<sup>a</sup> RT-PCR로 튨립 바이러스 2종(LSV, TVX)이 검출된 시료를 이용하여 생육 시기(구근, 잎, 꽃)별로 qRT-PCR 정량적 분석을 수행하였음.

<sup>b</sup> LSV : *Lily symptomless virus*, TVX: *Tuilp virus X*.

- 제3공동연구기관(포스트 바이오)에서 개발한 qRT-PCR 기반 유전자진단 키트를 이용하여 qRT-PCR 분석을 수행함.
  - 수선화 바이러스(NYSV, NMV, TRV) 실험실용 동시 진단키트(POBGENTM Narcissus Virus Detection Kit)
- 수선화 바이러스 2종(NYSV, TRV)이 복합 감염된 수선화 개체의 조직별 시료를 대상으로 qRT-PCR 진단을 수행함.
- 진단 결과, NYSV는 비교적 구근에서 높은 바이러스 복제수가 나타났고, TRV는 잎에서 높은 바이러스 복제수가 나타났음.

표 39. qRT-PCR을 이용한 수선화의 조직별 바이러스 정량적 분석

조직 <sup>a</sup>	복제수(Copy number)	
	NYSV	TRV
구근	4.94E+02	1.10E+04
잎	1.30E+02	3.10E+04
꽃	6.40E+01	8.20E+03

<sup>a</sup> RT-PCR로 수선화 바이러스 2종(NYSV, TRV)이 검출된 시료를 이용하여 조직별(구근, 잎, 꽃)로 qRT-PCR 정량적 분석을 수행하였음.

<sup>b</sup> NYSV: *Narcissus yellow stripe virus*, TRV: *Tobacco rattle virus*.

- 수선화 바이러스 2종(NYSV, TRV)이 복합 감염된 수선화 개체의 시기별 시료를 대상으로 qRT-PCR 진단을 수행함.
- 진단 결과, NYSV, TRV 모두 비교적 생육 초기에서 많은 바이러스 복제수가 나타남.

표 40. qRT-PCR을 이용한 수선화의 생육 시기별 바이러스 정량적 분석

시기 <sup>a</sup>	복제수(Copy number)	
	NYSV	TRV
초기	1.01E+09	3.50E+05
중기	1.00E+09	6.30E+04
후기	1.77E+07	2.90E+04

<sup>a</sup> RT-PCR로 수선화 바이러스 2종(NYSV, TRV)이 검출된 시료를 이용하여 생육 시기(생육 초기, 중기, 후기)별로 qRT-PCR 정량적 분석을 수행하였음.

<sup>b</sup> NYSV: *Narcissus yellow stripe virus*, TRV: *Tobacco rattle virus*.

○ 핵산추출 및 진단법 적용 방식에 의한 진단 결과 분석

- 다양한 핵산추출제품을 사용하여 Total RNA를 추출 후 Nanodrop 분석을 실시하였음.
- 식물에서 RNA를 추출할 때 흔히 사용되는 phenol 및 trizol 등의 다양한 방법을 이용하여 효율적인 RNA 추출 방식을 조사하였음(표 39).
- Phenol을 이용하여 RNA 추출 시 구근 화훼류에서 높은 농도의 RNA를 추출할 수 있을 것으로 판단됨.
- 구근 조직에서 Total RNA 추출 시, 버퍼와의 혼합 가정에서 점액질의 증이 과다 형성되어 수율이 떨어지는 것으로 판단됨.
- 구근 조직에서 추출한 Total RNA에서도 바이러스 진단은 가능함을 확인하였음.

표 41. 다양한 핵산추출 키트 방법을 이용한 Total RNA 추출 결과<sup>a</sup>

키트 <sup>b</sup>	작물	구근		꽃		잎	
		농도	순도 (260/280)	농도	순도 (260/280)	농도	순도 (260/280)
A사 키트	튤립	113.44	1.65	55.91	2.16	76.82	2.08
	수선화	129.94	1.64	10.45	1.96	33.67	1.88
B사 키트	튤립	3.32	1.97	233.52	2.17	841.38	1.87
	수선화	8.56	1.72	110.67	2.25	216.97	2.12
C사 키트	튤립	22.95	1.8	5.37	1.77	29.14	2.18
	수선화	7.29	1.83	5.43	1.58	5.68	2.05

<sup>a</sup> 다양한 제조사의 키트를 이용하여 핵산추출 방식을 달리하여 분석을 수행하였음.

<sup>b</sup> A, B사 키트는 phenol을 이용하여 RNA를 추출하는 방법을 사용하였고, C사 키트는 trizol을 이용하여 RNA를 추출하는 방법을 사용하였음.

## 10. 현장현시 진단(POC) 체계 구축

- Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification(RT-LAMP) 진단법을 이용한 현장용 진단법 개발
- 툴립 주요 바이러스인 LSV, TBV, TVX, 및 OMMV의 현장 진단을 위한 RT-LAMP 진단법을 개발하였음.
  - RT-LAMP는 표적 유전자에서 6개의 영역을 선택하여 조합한 4개의 프라이머를 사용하여 사슬치환반응을 이용해 증폭하는 방법으로, 등은 하에서 증폭이 이루어지므로 온도조절을 위한 고가의 장비가 필요로 하지 않고 빠른 시간에 바이러스를 간편하게 진단 할 수 있음.
  - RT-LAMP 프라이머를 설계하기 위하여 NCBI에 등록된 염기서열과 NGS 컨티그 염기서열을 이용하였음. NEB LAMP design tool (New england biolabs, Massachusetts, America)를 사용하여 수집한 염기서열을 바탕으로 RT-LAMP 프라이머를 설계하였음(표 40-43).
  - RT-LAMP premix는 NEB 사(New england biolabs, Massachusetts, America)의 WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix with UDG를 사용하였음. FIP과 BIP (100 pmol/μl)은 16 μl, F3과 B3 (100 pmol/μl)는 2 μl, Loop F와 Loop B (100 pmol/μl)는 4 μl를 사용하여 하나의 primer mix를 만들었음.
  - 조성은 Premix 5 μl, total RNA 1 μl, primer mix 1 μl, 그리고 distilled water 3 μl로 총 10 μl로 설정하여 RT-LAMP를 수행하였음.

표 42. *Tulip breaking virus*(TBV)의 현장 진단을 위해 설계한 RT-LAMP 프라이머<sup>a</sup>

프라이머	염기서열	길이 (bp)
TBV-F3	GTTGATGCAGGCACAACA	18
TBV-B3	TCTGCTTTAACACCCTCA A	19
TBV-FIP	CCAAGTTTACCATTTTCTTTCCACGGCTACATTTCGAAATTCCAAGA	46
TBV-BIP	ACTACAACCCGGAGCAAGTGACCACGCATCAAAGTGT	38
TBV-LF	TGGTAGCACCAACTTTGACGATAT	24
TBV-LB	TCTATCAAACACAAGATCCACGCA	24

<sup>a</sup> 프라이머는 NEB LAMP primer design tool(<https://lamp.neb.com>)을 사용하여 제작하였음. 염기서열은 NCBI에 등록된 *Tulip breaking virus*의 염기서열 및 메타전사체 분석을 통하여 획득한 contig를 참고하였음.

표 43. *Tulip virus X(TVX)*의 진단을 위해 설계한 RT-LAMP 프라이머<sup>a</sup>

프라이머	염기서열	길이 (bp)
TVX-F3	CCTCTCGACAACCTTTTCGG	19
TVX-B3	GGTTGGCGGACACTTCG	17
TVX-FIP	AGCGATTCGCCGTCGGTGTTTTAGGACCAGTTGGAGGCA	39
TVX-BIP	TAAAGCTCCTCTGGAGACCGGGTTTTGGAGTCGGCACAGTTTTTG	45
TVX-LF	AGGFAGCCCAGCACATGCA	18
TVX-LB	CACCCGACACCCACCATTTC	20

<sup>a</sup> 프라이머는 NEB LAMP primer design tool(<https://lamp.neb.com>)을 사용하여 제작하였음. 염기서열은 NCBI에 등록된 Tulip breaking virus의 염기서열 및 메타전사체 분석을 통하여 획득한 contig를 참고함.

표 44. *Olive mild mosaic virus(OMMV)*의 진단을 위해 설계한 RT-LAMP 프라이머<sup>a</sup>

프라이머	염기서열	길이 (bp)
OMMV-F3	TCCAAGGGAAGACAAAGCAA	20
OMMV-B3	GCCACCAATTCAGTGTTTAC	20
OMMV-FIP	CCTGGGGTTGGCAACCTTAGAAGAAACGGGCAGAGTACGAAG	42
OMMV-BIP	ATCATTAGTGGCACCAGTCGCATGGTTGGTGCGAATCTGTG	41
OMMV-LF	CTCCATCTGCTCACGTTTAGCA	22
OMMV-LB	ATTTATAGCAGACCTCGCGTGC	22

<sup>a</sup> 프라이머는 NEB LAMP primer design tool(<https://lamp.neb.com>)을 사용하여 제작하였음. 염기서열은 NCBI에 등록된 Tulip breaking virus의 염기서열 및 메타전사체 분석을 통하여 획득한 contig를 참고함.

표 45. *Lily symptomless virus*(LSV)의 진단을 위해 설계한 RT-LAMP 프라이머<sup>a</sup>

프라이머	염기서열	길이 (bp)
LSV-F3	GCGTAACACACTACCTTCCG	20
LSV-B3	TGTCGACCAAGAGCGATGA	19
LSV-FIP	CGGGGGCCACAGTACTCTACATTGGTGATTTGCAGCACAAC	41
LSV-BIP	TTCTGTGAGAGTGGTAGCCGTTGCAACAAGCACGATGACC	41
LSV-LF	TTTTTGTGCCGTCCCGGTAC	20
LSV-LB	GACCTTCCAGCCTTGGCTTT	20

<sup>a</sup> 프라이머는 NEB LAMP primer design tool(<https://lamp.neb.com>)을 사용하여 제작하였음. 염기서열은 NCBI에 등록된 Tulip breaking virus의 염기서열 및 메타전사체 분석을 통하여 획득한 contig를 참고함.

- TBV, TVX, OMMV, 및 LSV에 특이적인 RT-LAMP 프라이머 조합을 선별하기 위하여 프라이머 조합들은 6단계로 구성된 실험을 수행하였음.
- 초기 반응조건은 65 °C에서 30분으로 설정하였음(제조사 권장 기준). distilled water를 넣은 음성 대조군과 Total RNA를 넣은 튜브의 색상 변화를 육안으로 관찰하였음. 그리고 1.5% agarose gel을 사용하여 전기영동을 수행하였고 이를 통해 증폭된 산물의 band를 관찰하였음.
- 1 단계: 4종의 바이러스에 대하여 각각의 프라이머가 정상적으로 증폭되는지 확인하였음. 또한 음성 대조군은 튜브의 시각적 변화가 일어나지 않았기 때문에 프라이머 간의 간섭이 일어나지 않음을 확인함(그림 55).
- 대상 바이러스에 프라이머가 결합하여 증폭 여부를 확인하고 이와 동시에 비특이반응이 없는 프라이머 조합을 선별하였음.

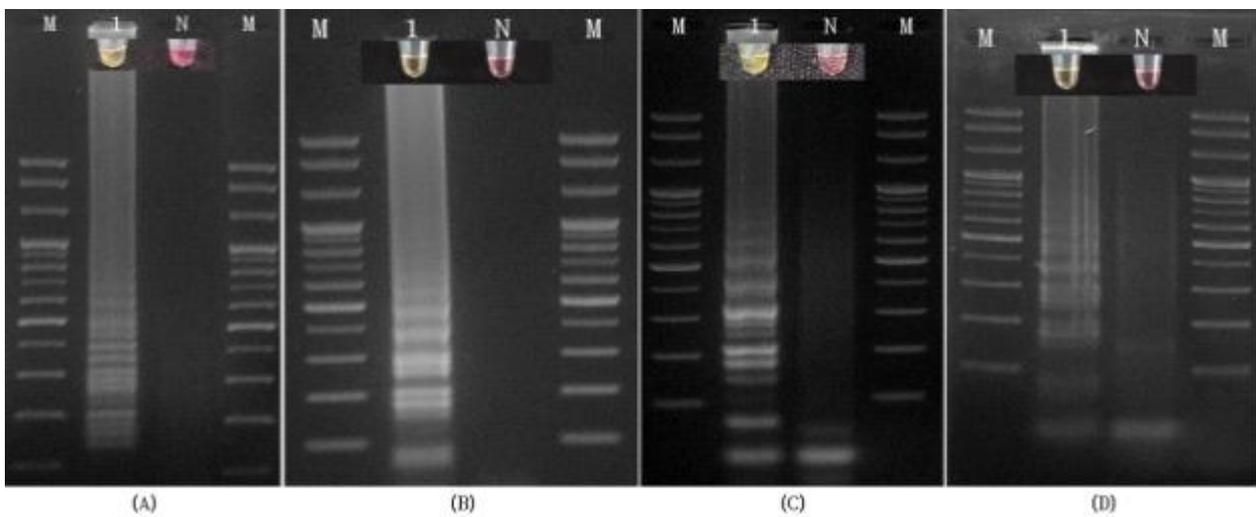


그림 55. RT-LAMP 프라이머 검증에 위한 1단계. 진단 대상으로 하는 바이러스에 개발한 프라이머의 반응 여부를 검증하였음. (A): Tulip virus X (TVX), (B): Tulip breaking virus (TBV), (C): Olive mild mosaic virus (OMMV), (D): Lily symptomless virus (LSV). lane M: BioFACT™ DNA ladder 100 bp, lane I: Total RNA containing the target virus, lane N: negative control.

- 2단계: 프라이머의 최적 반응온도 조건을 탐색하기 위하여 50 °C, 51.2 °C, 52.7 °C, 54.7 °C, 57.2 °C, 60.2 °C, 63.9 °C, 64.9 °C, 68.6 °C, 및 70 °C 조건에서 RT-LAMP 반응을 30분간 수행하였음. 색의 변화가 뚜렷한 온도 범위를 최적 반응 온도로 설정하였음.
- 이후 단계에서 반응 온도는 65°C로 설정하고 진행하였음(그림 56).

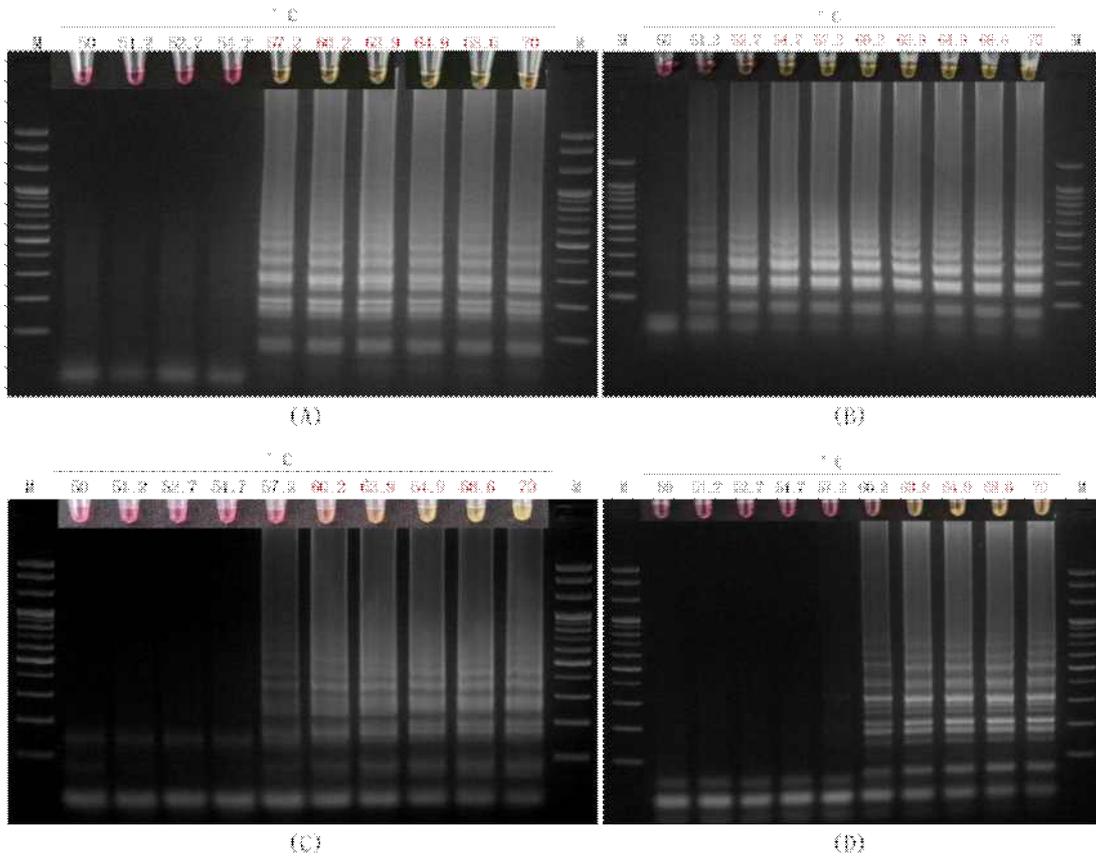


그림 56. RT-LAMP 프라이머 검증을 위한 2단계. 개발한 RT-LAMP 프라이머의 최적 반응온도를 탐색하고자 50°C에서 70°C 조건에서 RT-LAMP 반응을 30분간 수행하였음. 빨간색 글씨의 온도에서 적절한 반응을 보이는 것을 확인하였음. (A): *Tulip breaking virus*(TBV), (B): *Tulip virus X*(TVX), (C): *Lily symptomless virus*(LSV), (D): *Olive mild mosaic virus*(OMMV). lane M: BioFACT<sup>TM</sup> DNA ladder 100 bp, lane 50-70: reaction temperature (°C).

- 3 단계: 프라이머의 최적 반응시간 조건을 탐색하기 위하여 10분, 20분, 30분, 35분, 40분, 50분, 60분, 90분, 및 120분 조건에서 RT-LAMP 반응을 수행하였음.
- 반응 온도는 두 번째 단계에서 설정한 최적 반응온도(65 °C)임.
- 4종의 프라이머 조합 모두 최적 반응시간을 최소 20분으로 설정하였음(그림 57).

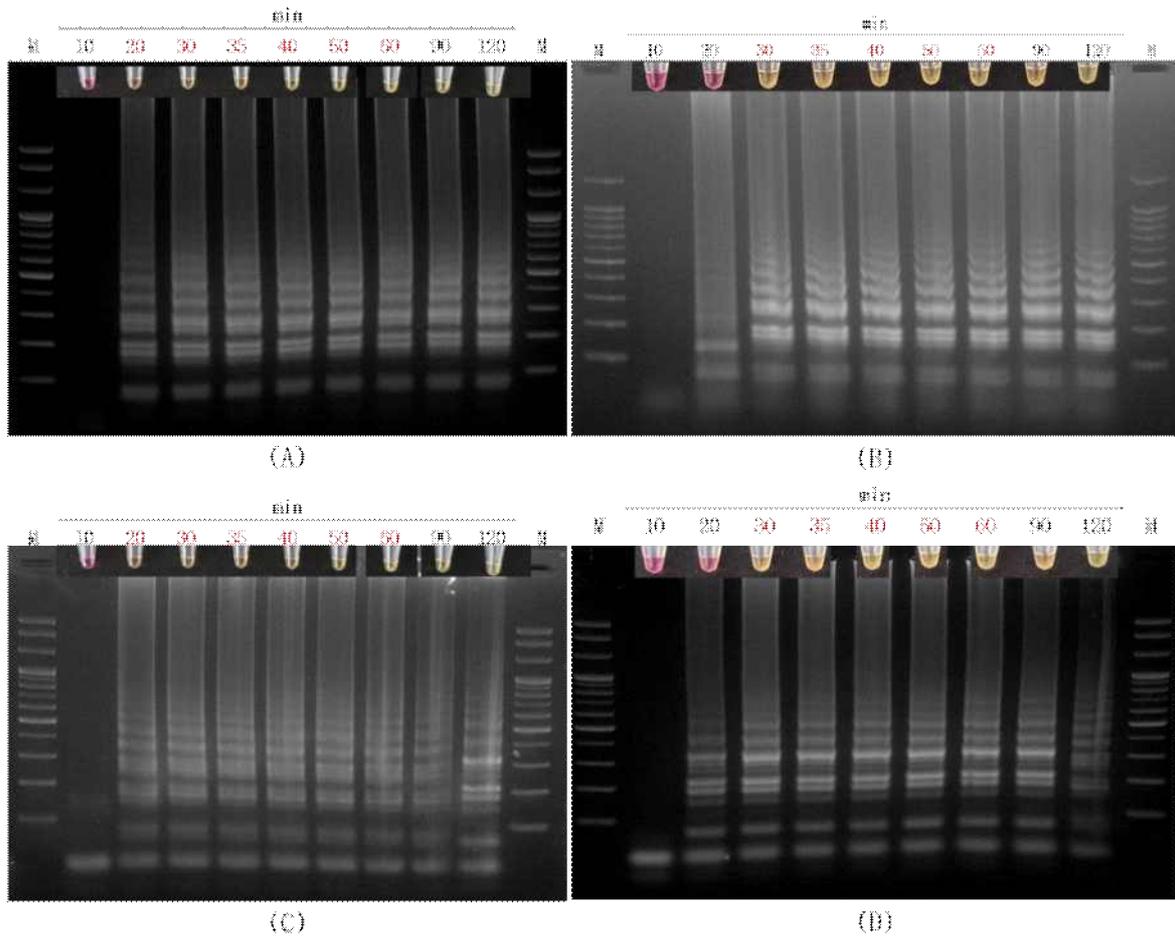


그림 57. RT-LAMP 프라이머 검증을 위한 3단계. 프라이머의 최적 반응시간 조건을 탐색하기 위하여 10분, 20분, 30분, 35분, 40분, 50분, 60분, 90분, 및 120분 조건에서 RT-LAMP 반응을 수행하였음. 빨간색 글씨의 반응시간에서 적절한 반응을 보이는 것을 확인하였음. (A): *Tulip breaking virus*(TBV), (B): *Tulip virus X*(TVX), (C): *Lily symptomless virus*(LSV), (D): *Olive mild mosaic virus*(OMMV). lane M: BioFACT™ DNA ladder 100 bp, lane 10-120: reaction time (min).

- 4 단계: 대상 바이러스와 근연관계에 있는 다른 바이러스들에 대한 반응 여부를 검증하는 단계임. 근연관계에 있는 바이러스들은 경북대학교 식물바이러스연구실에서 보유한 바이러스 유전자원의 total RNA를 추출하여 사용하였음.
- TBV의 유연종은 같은 *potyvirus* 속인 *Cyrtantus elatus virus A*(CEVA), *Pepper mottle virus* (PMMoV), *Watermelon mosaic virus*(WMV), *Narcissus late season yellows virus*(NLSYV), *Snow drop virus Y*(SVY), *Bean common mosaic virus*(BCMV) 총 6종을 사용하였음.
- TVX의 유연종은 같은 *potexvirus* 속인 *Potato virus X*(PVX), *Narcissus mosaic virus*(NMV), *Cactus virus X*(CVX), *White clover mosaic virus*(WCLMV), *Peppino mosaic virus* (PepMoV), *Cymbidium mosaic virus*(CymMV) 총 6종을 사용하였음.
- OMMV의 유연종은 같은 *Tombusviridae* 과인 *Japanese iris necrotic ring virus*(JINRV), *Melon necrotic spot virus*(MNSV), *Soybean mottle mosaic virus*(SYMMV), *Cucumber necrosis virus*(CNV) 총 4종을 사용하였음.
- LSV의 유연종은 같은 *Betaflexiviridae* 과인 *Sweet potato chlorotic fleck virus*(SPCFV), *Apple stem pitting virus*(ASPV), *Cherry green ring mottle virus*(CGRMV), *Nerine latent virus*(NeLV) 총 4종을 사용하였음.

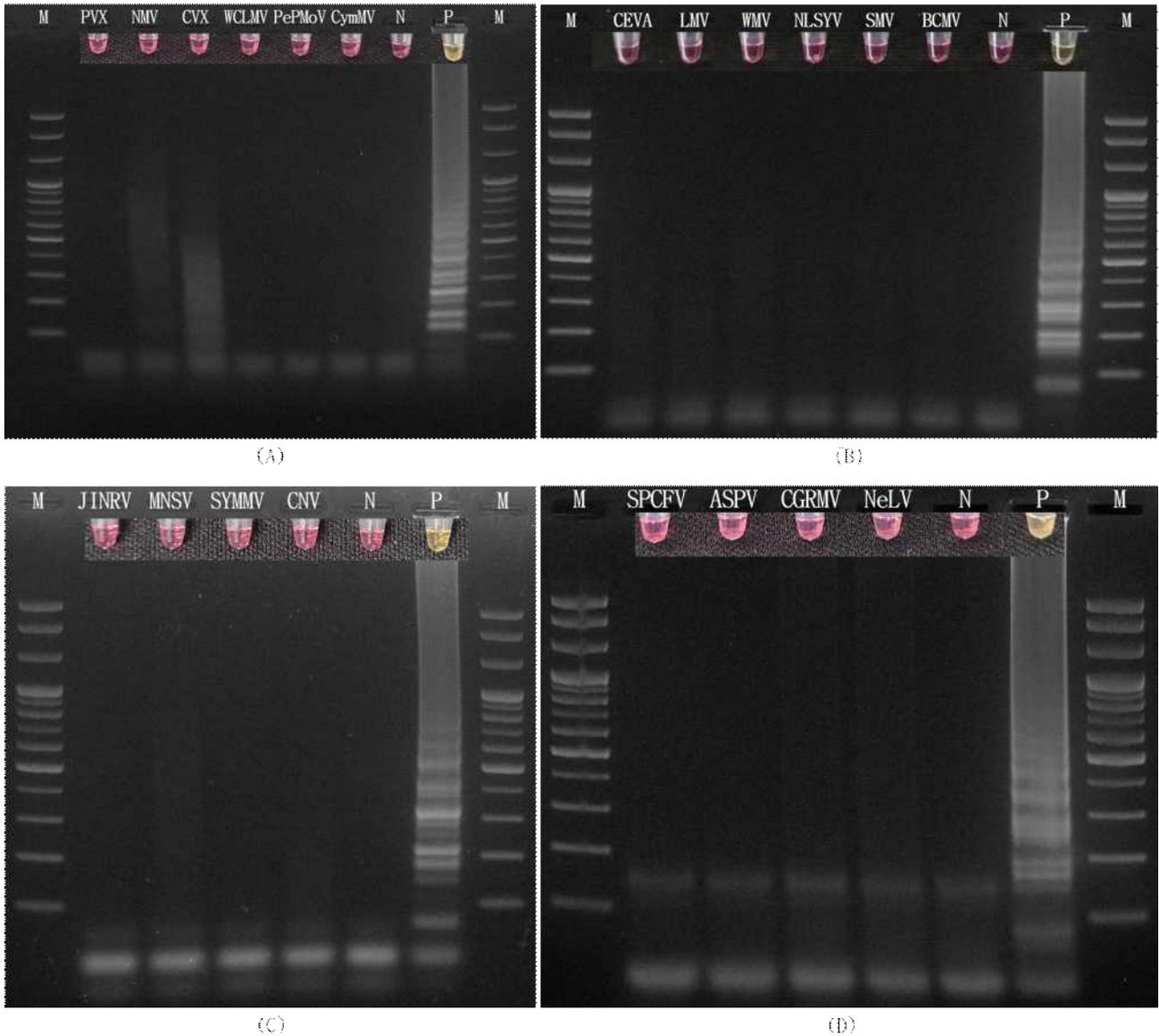


그림 58. RT-LAMP 프라이머 검증을 위한 4단계. 개발한 튜립 주요 바이러스 4종의 RT-LAMP 프라이머가 근연관계에 있는 다른 바이러스들에게 대한 반응 여부를 검증하는 단계. (A): TVX, (B): TBV, (C): OMMV, (D): LSV. lane M: BioFACT™ DNA ladder 100 bp, lane PVX: *Potato virus X*, lane NMV: *Narcissus mosaic virus*, lane CVX: *Cactus virus X*, lane WCLMV: *White clover mosaic virus*, lane PePMoV: *Pepper mottle virus*, lane CymMV: *Cymbidium mosaic virus*, lane CEVA: *Cyrtanthus elatus virus A*, lane PMMoV: *Pepper mild mottle virus*, lane WMV: *Watermelon mosaic virus*, lane NLSYV: *Narcissus late season yellows virus*, lane SMV: *Soybean mosaic virus*, lane BCMV: *Bean common mosaic virus*, lane JINRV: *Japanese iris necrotic ring virus*, lane MNSV: *Melon necrotic spot virus*, lane SYMMV: *Soybean yellow mottle mosaic virus*, lane CNV: *Cucumber necrosis virus*, lane SPCFV: *Sweet potato chlorotic fleck virus*, lane ASPV: *Apple stem pitting virus*, lane CGRMV: *Cherry green ring mottle virus*, lane NeLV: *Nerine latent virus*, lane N: negative control, lane P: positive control.

- 5 단계: 튤립에서 보고된 다른 바이러스에 반응 여부를 검증하는 단계임.
- 튤립에서 보고된 *Turnip mosaic virus*(TuMV), *Cucumber mosaic virus*(CMV), *Tobacco mosaic virus*(TMV), *Tobacco rattle virus*(TRV) 4종에 대하여 반응 여부를 확인하였음. 실험에서는 위 바이러스들의 유전체가 포함된 total RNA를 사용하였음.
- 설계한 4개의 프라이머는 튤립에서 발생한 다른 바이러스들에 대해서도 반응하지 않았기에 목표한 TVX, TBV, OMMV, LSV에만 특이적으로 반응하는 것을 확인함(그림 59).

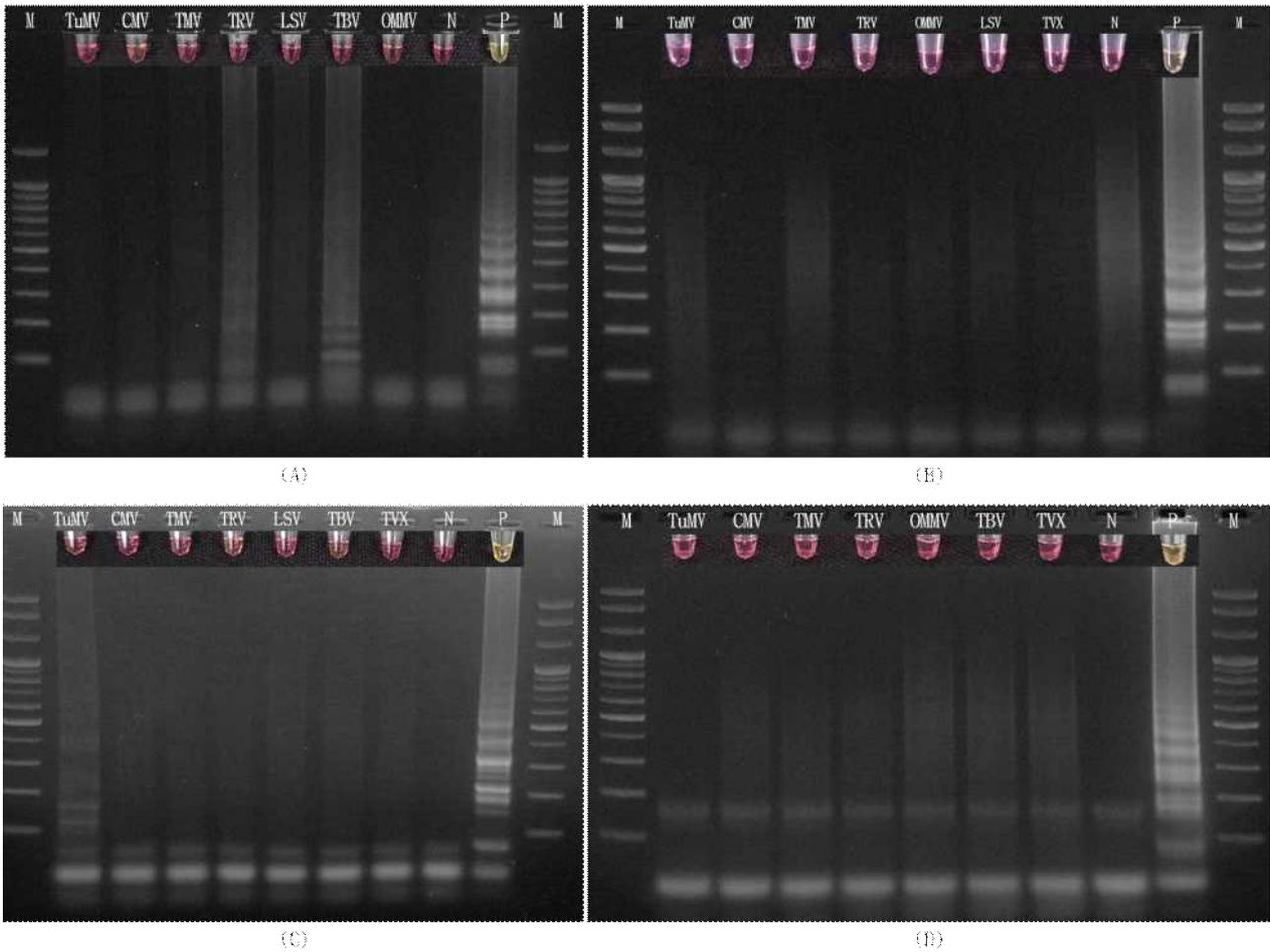


그림 59. RT-LAMP 프라이머 검증을 위한 5단계. 튤립에서 보고된 다른 바이러스에 반응 여부를 검증하는 단계. (A): *Tulip virus X*(TVX), (B): *Tulip breaking virus*(TBV), (C): *Olive mild mosaic virus*(OMMV), (D): *Lily symptomless virus*(LSV). lane M: BioFACT™ DNA ladder 100 bp, lane TuMV: *Turnip mosaic virus*, lane CMV: *Cucumber mosaic virus*, lane TMV: *Tobacco mosaic virus*, lane TRV: *Tobacco rattle virus*, lane TVX: *Tulip virus X*, lane TBV: *Tulip breaking virus*, lane OMMV: *Olive mild mosaic virus*, lane LSV: *Lily symptomless virus*, lane N: negative control, lane P: positive control.

- 6 단계: 개발한 RT-LAMP 프라이머의 검출한계를 평가하였음. 또한, F3와 B3 primer를 사용한 RT-PCR의 검출한계 평가과 비교하였음.
- total RNA 검출 한계 검정을 위하여 total RNA 양성 대조구를 초기 농도 142.34  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 부터 10 배씩 단계적으로 희석한 7개 처리구( $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ )를 사용하여 RT-PCR 과 RT-LAMP를 수행하였음.
- OMMV의 검출한계는 초기 농도의  $10^{-5}$ 배이며, TBV의 RT-LAMP 검출한계는 초기 농도의  $10^{-7}$  배로 나타났음. TVX의 RT-LAMP 검출한계는 초기 농도의  $10^{-4}$ 배로 나타났음. LSV의 RT-LAMP 검출한계는 초기 농도의  $10^{-4}$ 배로 나타났음. OMMV의 RT-LAMP 검출 한계는 142.34  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의  $10^{-4}$ 배로 나타났음(Fig. 60-63).

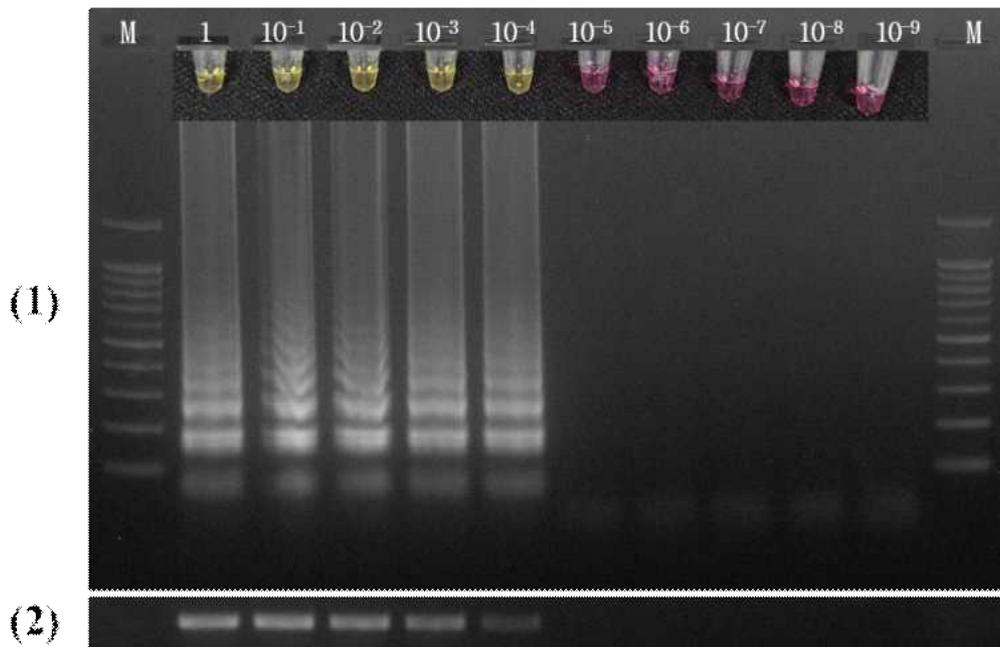


그림 60. TVX 진단을 위한 RT-LAMP 프라이머 검증에 위한 6단계. RT-LAMP의 검출한계를 평가 하고 F3와 B3 primer를 사용한 RT-PCR의 검출한계 평가와 비교하였음. TBV의 RT-LAMP 검출한 계는 초기 농도의  $10^{-4}$ 배로 나타났음. (1): Sensitivity of RT-LAMP for the detection of TBV. (2): Sensitivity of RT-PCR for the detection of TBV. lane M: BioFACT™ DNA ladder 100 bp, lane 1- $10^{-9}$ : 10-fold dilution of total RNA.

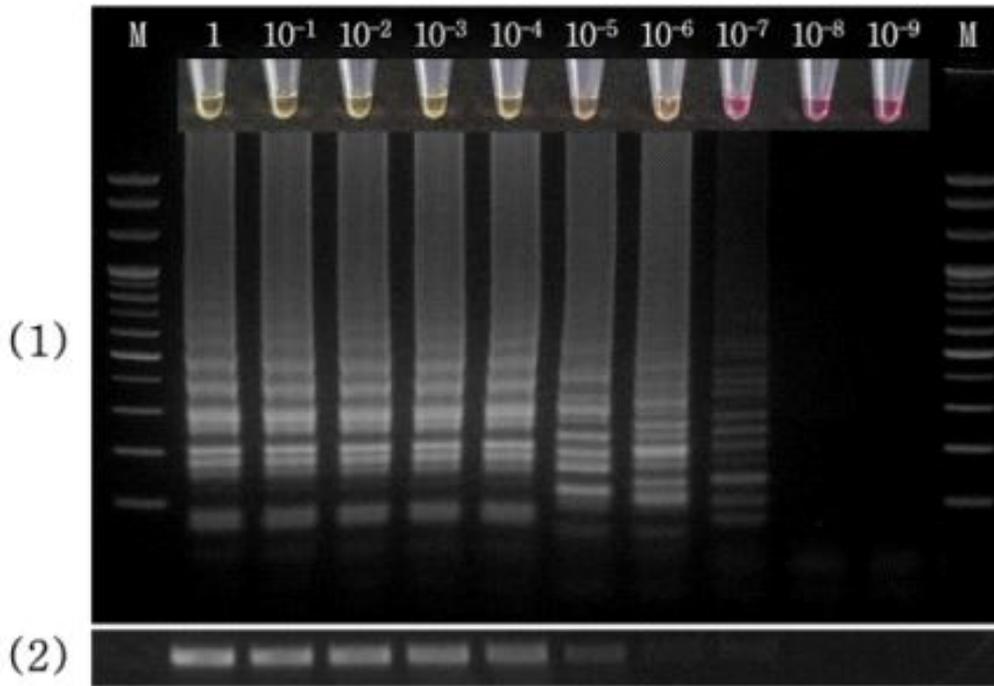


그림 61. TBV 진단을 위한 RT-LAMP 프라이머 검증을 위한 7단계. RT-LAMP의 검출한계를 평가하고 F3와 B3 primer를 사용한 RT-PCR의 검출한계 평가와 비교하였음. TBV의 RT-LAMP 검출한계는 초기 농도의  $10^{-7}$ 배로 나타났음. (1): Sensitivity of RT-LAMP for the detection of TVX. (2): Sensitivity of RT-PCR for the detection of TVX. lane M: BioFACT™ DNA ladder 100 bp, lane 1- $10^{-9}$ : 10-fold dilution of total RNA.

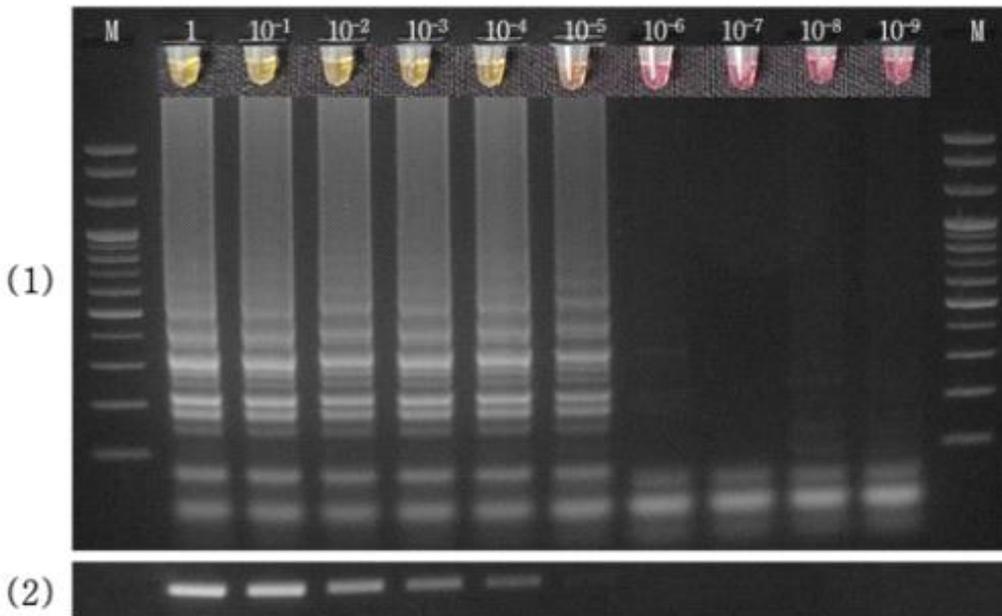
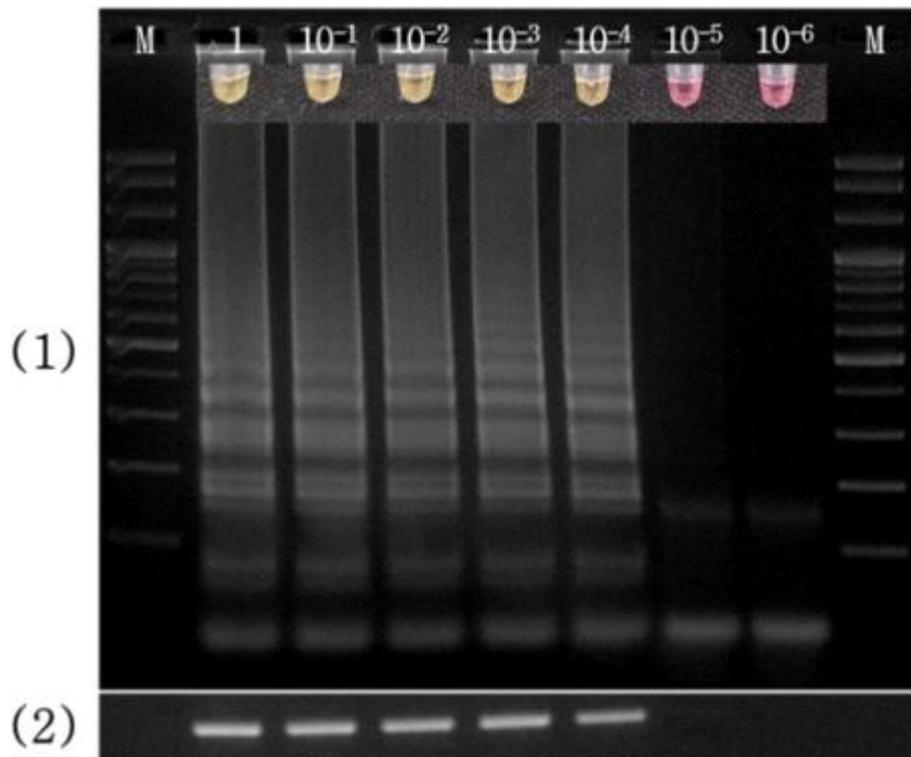


그림 62. OMMV 진단을 위한 RT-LAMP 프라이머 검증을 위한 7단계. RT-LAMP의 검출한계를 평가하고 F3와 B3 primer를 사용한 RT-PCR의 검출한계 평가와 비교하였음. TBV의 RT-LAMP 검출한계는 초기 농도의  $10^{-5}$ 배로 나타났음. (1): Sensitivity of RT-LAMP for the detection of OMMV. (2): Sensitivity of RT-PCR for the detection of OMMV. lane M: BioFACT™ DNA ladder 100 bp, lane 1- $10^{-9}$ : 10-fold dilution of total RNA.



**그림 63.** LSV 진단을 위한 RT-LAMP 프라이머 검증을 위한 7단계. RT-LAMP의 검출한계를 평가하고 F3와 B3 primer를 사용한 RT-PCR의 검출한계 평가와 비교하였음. TBV의 RT-LAMP 검출한계는 초기 농도의  $10^{-4}$ 배로 나타났음. (1): Sensitivity of RT-LAMP for the detection of LSV. (2): Sensitivity of RT-PCR for the detection of LSV. lane M: BioFACT™ DNA ladder 100 bp, lane 1- $10^{-6}$ : 10-fold dilution of total RNA.

- 수선화 주요 바이러스인 NLSYV와 NLV의 현장 진단을 위한 RT-LAMP 진단법을 개발하였음.
- RT-LAMP 프라이머를 설계하기 위하여 NCBI에 등록된 염기서열과 NGS 컨티그 염기서열을 이용하였음. NEB LAMP design tool (New england biolabs, Massachusetts, America)를 사용하여 수집한 염기서열을 바탕으로 RT-LAMP 프라이머를 설계하였음(표 44-45).
- RT-LAMP premix는 NEB 사(New england biolabs, Massachusetts, America)의 WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix with UDG를 사용하였음. FIP과 BIP (100 pmol/μl)은 16 μl, F3과 B3 (100 pmol/μl)는 2 μl, Loop F와 Loop B (100 pmol/μl)는 4 μl를 사용하여 하나의 primer mix를 만들었음.
- 조성은 Premix 5 μl, total RNA 1 μl, primer mix 1 μl, 그리고 distilled water 3 μl로 총 10 μl로 설정하여 RT-LAMP를 수행하였음.

**표 46. Narcissus late season yellows virus(NLSYV)의 현장 진단을 위해 설계한 RT-LAMP 프라이머<sup>a</sup>**

프라이머	염기서열	길이 (bp)
NLSYV-F3	ACCATCAACACCGCTTCC	18
NLSYV-B3	TTGCCTCCCATTTACGGAAG	20
NLSYV-FIP	CGGACGGACAACCTTCGAGAGTTTTTTTCAGCATGGCAACTCACC	44
NLSYV-BIP	ACCAATCCACCACGCAAACCATTTTCTCCCATTCCATTTCGGGC	42
NLSYV-LF	CGCAAGCGCTTGCTTCAC	18
NLSYV-LB	CGGCACATCGTCTGAAGTTGA	21

<sup>a</sup> 프라이머는 NEB LAMP primer design tool(<https://lamp.neb.com>)을 사용하여 제작하였음. 염기서열은 NCBI에 등록된 Tulip breaking virus의 염기서열 및 메타전사체 분석을 통하여 획득한 contig를 참고하였음.

**표 47. Narcissus latent virus(NLV)의 현장 진단을 위해 설계한 RT-LAMP 프라이머<sup>a</sup>**

프라이머	염기서열	길이 (bp)
NLV-F3	GGCAACTCAAGCCCAACT	18
NLV-B3	ATGGGGATAGCCTGAACCT	19
NLV-FIP	ACCGTCCATGCATCGTCTGTTTCACCTCATGGGTGGAGGA	40
NLV-BIP	GGTGCATTTGGTGCCTAACAATCCCAAACCATCGCGAATC	42
NLV-LF	CGCAAGCGCTTGCTTCAC	18
NLV-LB	CGGCACATCGTCTGAAGTTGA	21

<sup>a</sup> 프라이머는 NEB LAMP primer design tool(<https://lamp.neb.com>)을 사용하여 제작하였음. 염기서열은 NCBI에 등록된 Tulip breaking virus의 염기서열 및 메타전사체 분석을 통하여 획득한 contig를 참고하였음.

- NLSYV와 NLV에 특이적인 RT-LAMP 프라이머 조합을 선별하기 위하여 프라이머 조합들은 6단계로 구성된 실험을 수행하였음.
- 초기 반응조건은 65 °C에서 30분으로 설정하였음(제조사 권장 기준). distilled water를 넣은 음성 대조군과 Total RNA를 넣은 튜브의 색상 변화를 육안으로 관찰하였음. 그리고 1.5% agarose gel을 사용하여 전기영동을 수행하였고 이를 통해 증폭된 산물의 band를 관찰하였음.
- 1 단계: 4종의 바이러스에 대하여 각각의 프라이머가 정상적으로 증폭되는지 확인하였음. 또한 음성 대조군은 튜브의 시각적 변화가 일어나지 않았기 때문에 프라이머 간의 간섭이 일어나지 않음을 확인함(그림 64).
- 대상 바이러스에 프라이머가 결합하여 증폭 여부를 확인하고 이와 동시에 비특이반응이 없는 프라이머 조합을 선별하였음.

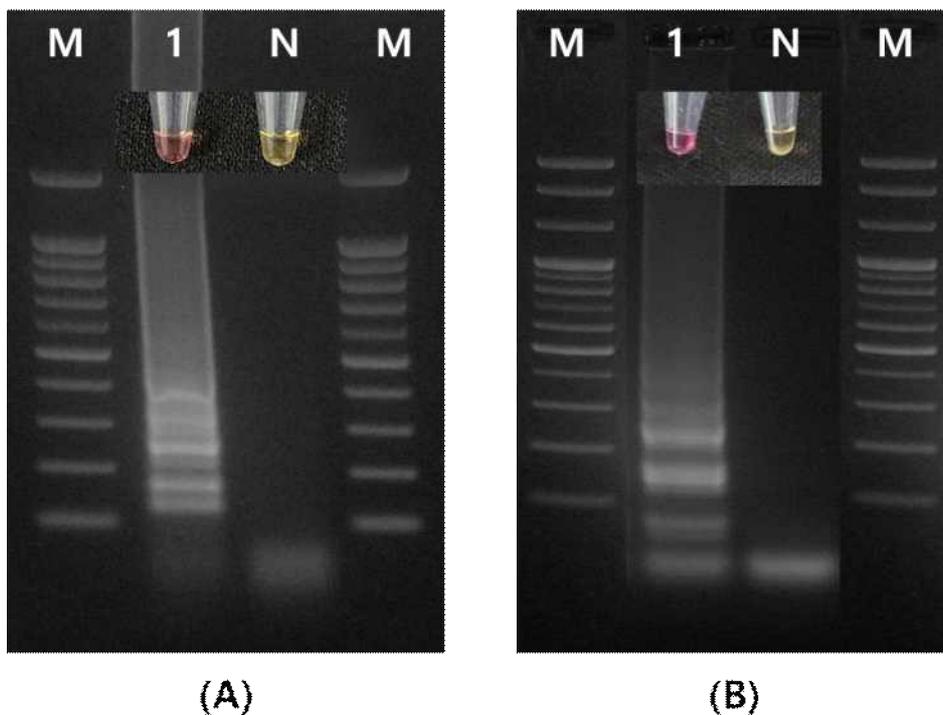


그림 64. RT-LAMP 프라이머 검증에 위한 1단계. 진단 대상으로 하는 바이러스에 개발한 프라이머의 반응 여부를 검증하였음. (A): *Narcissus late season yellows virus*(NLSYV), (B): *Narcissus latent virus*(NLV). lane M: BioFACT™ DNA ladder 100 bp, lane 1: Total RNA containing the target virus, lane N: negative control.

- 2단계: 프라이머의 최적 반응온도 조건을 탐색하기 위하여 49 °C 에서 70 °C 사이의 조건에서 RT-LAMP 반응을 30분간 수행하였음. 색의 변화가 뚜렷한 온도 범위를 최적 반응 온도로 설정하였음.
- 이후 단계에서 반응 온도는 65°C로 설정하고 진행하였음(그림 65 ).

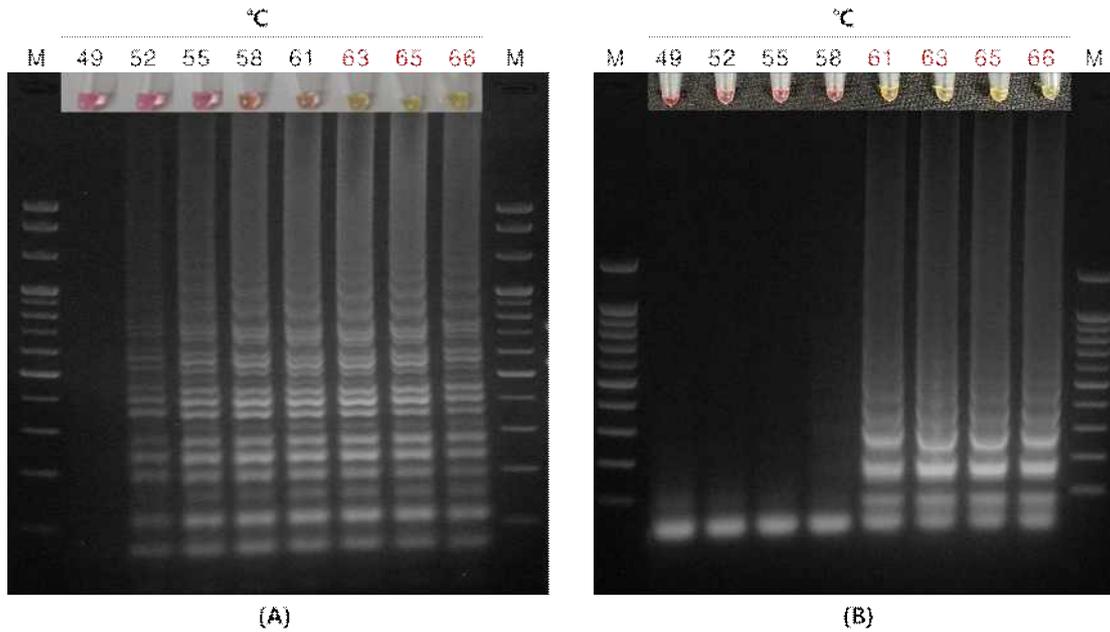


그림 65. RT-LAMP 프라이머 검증을 위한 2단계. 개발한 RT-LAMP 프라이머의 최적 반응온도를 탐색하고자 NLSYV의 프라이머는 49 °C 에서 66 °C 조건에서, NLV의 프라이머는 50 °C 에서 68 °C 조건에서 RT-LAMP 반응을 30분간 수행하였음. 빨간색 글씨의 온도에서 적절한 반응을 보이는 것을 확인하였음. (A): *Narcissus late season yellows virus*(NLSYV), (B): *Narcissus latent virus*(NLV), lane M: BioFACT™ DNA ladder 100 bp.

- 3 단계: 프라이머의 최적 반응시간 조건을 탐색하기 위하여 10분, 20분, 30분, 40분, 50분, 60분, 90분, 및 120분 조건에서 RT-LAMP 반응을 수행하였음.
- 반응 온도는 두 번째 단계에서 설정한 최적 반응온도(65 °C)임.
- 4종의 프라이머 조합 모두 최적 반응시간을 최소 20분으로 설정하였음(그림 66).

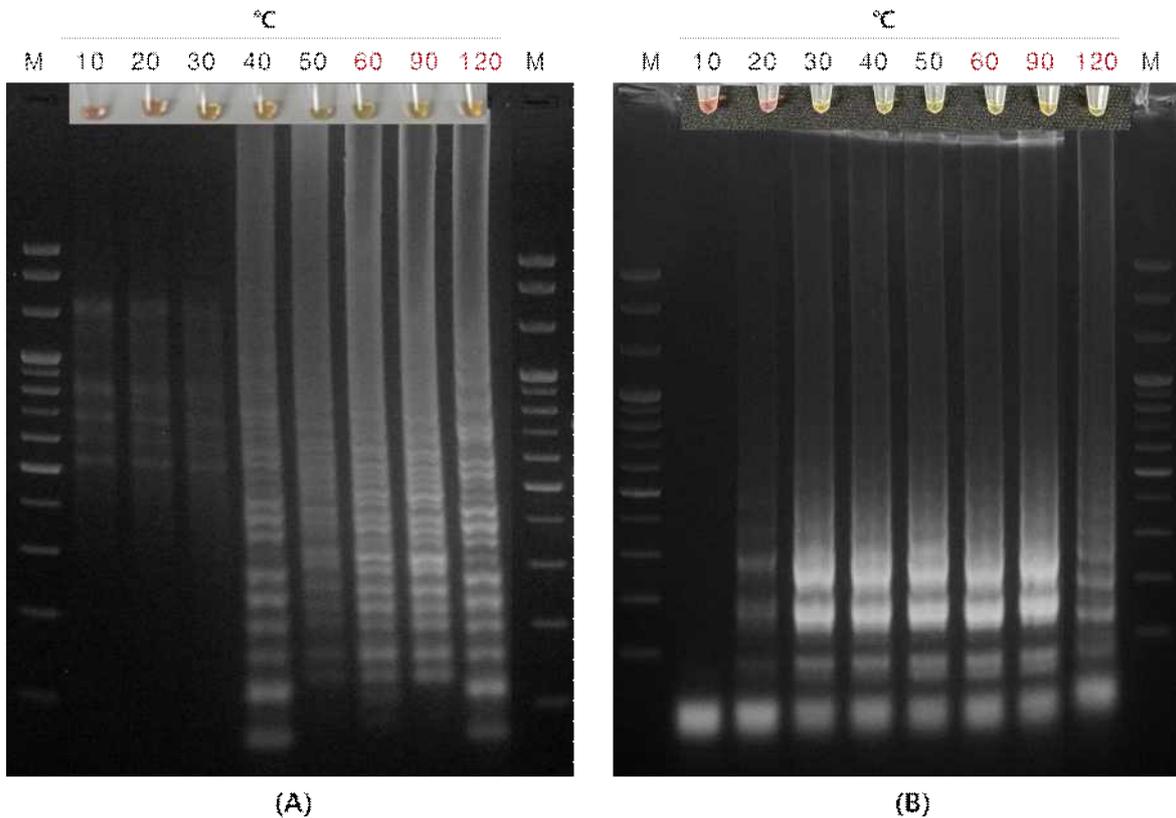


그림 66. RT-LAMP 프라이머 검증을 위한 3단계. 프라이머의 최적 반응시간 조건을 탐색하기 위하여 10분, 20분, 30분, 35분, 40분, 50분, 60분, 90분, 및 120분 조건에서 RT-LAMP 반응을 수행하였음. 빨간색 글씨의 반응시간에서 적절한 반응을 보이는 것을 확인하였음. (A): *Narcissus late season yellows virus*(NLSYV), (B): *Narcissus latent virus*(NLV), lane M: BioFACT™ DNA ladder 100 bp, lane 10-120: reaction time (min).

- 4 단계: 대상 바이러스와 근연관계에 있는 다른 바이러스들에 대한 반응 여부를 검증하는 단계임. 근연관계에 있는 바이러스들은 경북대학교 식물바이러스연구실에서 보유한 바이러스 유전자원의 total RNA를 추출하여 사용하였음(그림 67).
- NLSYV와 NLV의 유연종은 *Bean common mosaic virus*(BYMV), *Onion yellow dwarf virus*(OYDV), *Peanut mottle mosaic virus*(PeMoV), *Watermelon mosaic virus 2*(WMV2), *Soybean mosaic virus*(SMV), *Narcissus yellow stripe virus*(NYSV) 총 6종을 사용하였음.

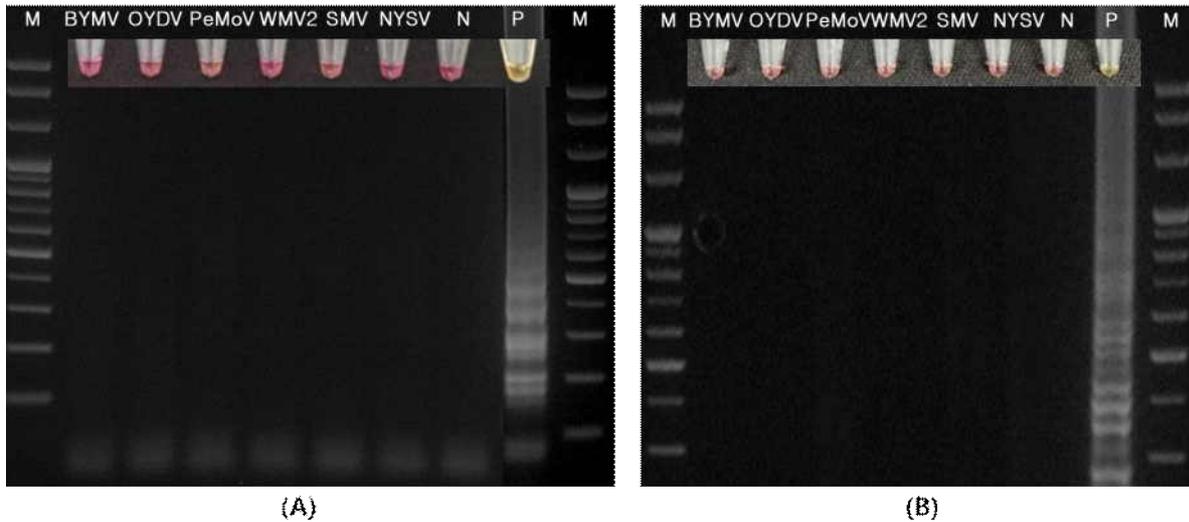


그림 67. RT-LAMP 프라이머 검증을 위한 4단계. 개발한 수선화 바이러스 2종의 RT-LAMP 프라이머가 근연관계에 있는 다른 바이러스들에게 대한 반응 여부를 검증하는 단계. (A): NLSYV, (B): NLV, lane M: BioFACT™ DNA ladder 100 bp, lane 1: *Bean common mosaic virus*(BYMV), lane 2: *Onion yellow dwarf virus*(OYDV), lane 3: *Peanut mottle mosaic virus*(PeMoV), lane 4: *Watermelon mosaic virus 2*(WMV2), lane 5: *Soybean mosaic virus*(SMV), *Narcissus yellow stripe virus*(NYSV) lane N: negative control, lane P: positive control.

- 5 단계: 수선화에서 보고된 다른 바이러스에 반응 여부를 검증하는 단계임.
- 수선화에서 보고된 *Cyrtanthus elatus virus A*(CEVA), *Narcissus mosaic virus*(NMV), *Japanese iris necrotic ring virus*(JINRV), *Turnip mosaic virus*(TuMV), *Tobacco rattle virus*(TRV), *Snowdrop virus Y*(SVY) 6종에 대하여 프라이머의 반응 여부를 확인하였음. 실험에서는 위 바이러스들의 유전체가 포함된 total RNA를 사용하였음.
- 설계한 2개의 프라이머는 수선화에서 발생한 다른 바이러스들에 대해서도 반응하지 않았기에 목표한 NLSYV, NLV에만 특이적으로 반응하는 것을 확인함(그림 68).

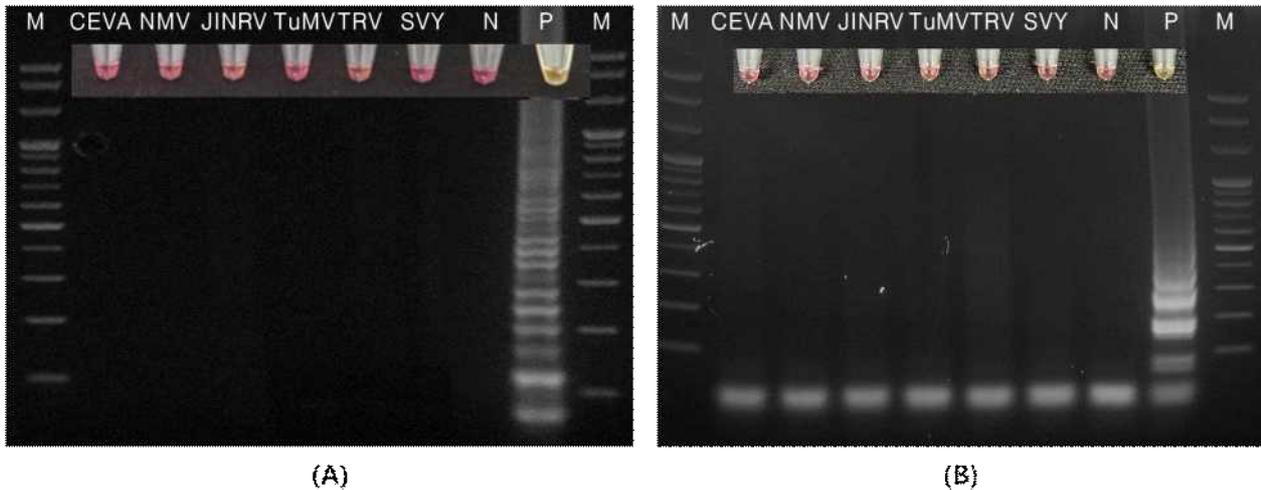


그림 68. RT-LAMP 프라이머 검증을 위한 5단계. 수선화에서 보고된 다른 바이러스에 반응 여부를 검증하는 단계. (A): *Narcissus late season yellows virus*(NLSYV), (B): *Narcissus latent virus*(NLV), lane M: BioFACT™ DNA ladder 100 bp, lane 1: *Cyrtanthus elatus virus A*(CEVA), lane 2: *Narcissus mosaic virus*(NMV), lane 3: *Japanese iris necrotic ring virus*(JINRV), lane 4: *Turnip mosaic virus*(TuMV), lane 5: *Tobacco rattle virus*(TRV), lane 6: *Snowdrop virus Y*(SVY), lane N: negative control, lane P: positive control.

- 6 단계: 개발한 RT-LAMP 프라이머의 검출한계를 평가하였음. 또한, F3와 B3 primer를 사용한 RT-PCR의 검출한계 평가과 비교하였음.
- total RNA 검출 한계 검정을 위하여 total RNA 양성 대조구를 초기 농도 159.73  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 부터 10 배씩 단계적으로 희석한 7개 처리구( $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ )를 사용하여 RT-PCR 과 RT-LAMP를 수행하였음.
- NLSYV의 검출한계는 초기 농도의  $10^{-6}$ 배이며, NLV의 RT-LAMP 검출한계는 초기 농도의  $10^{-5}$  배로 나타났음(그림 69-70).

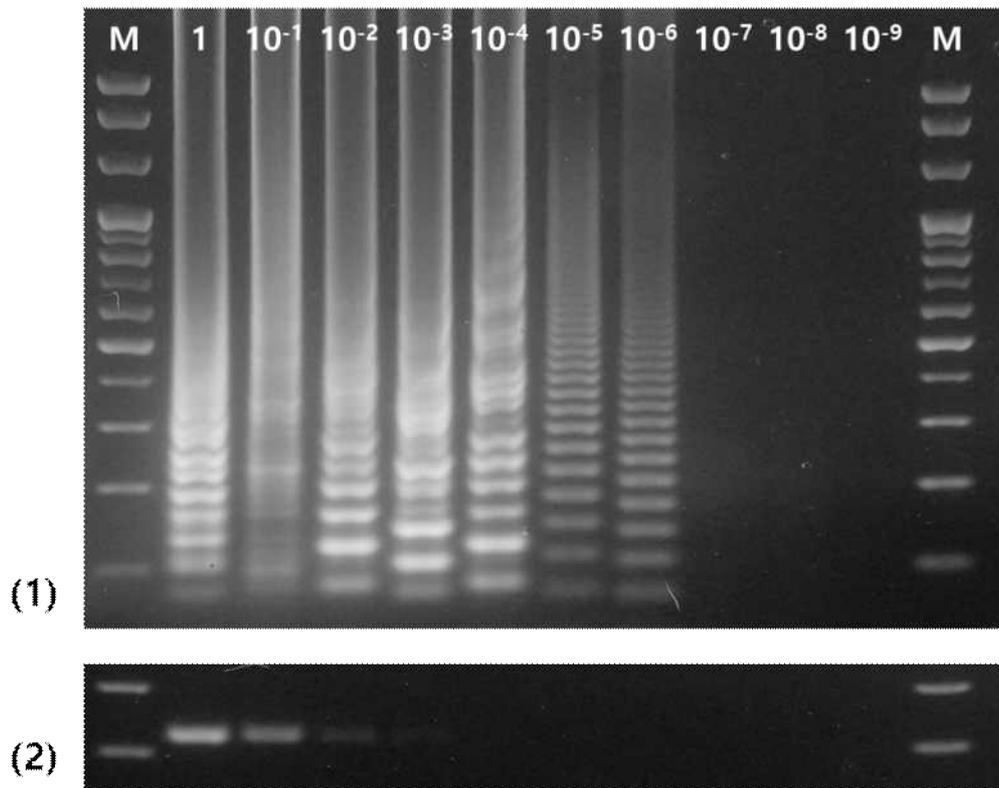


그림 69. NLSYV 진단을 위한 RT-LAMP 프라이머 검증을 위한 6단계. RT-LAMP의 검출한계를 평가하고 F3와 B3 primer를 사용한 RT-PCR의 검출한계 평가와 비교하였음. NLSYV RT-LAMP 프라이머의 검출한계는 초기 농도의  $10^{-6}$ 배로 나타났음. (1): Sensitivity of RT-LAMP for the detection of NLSYV. (2): Sensitivity of RT-PCR for the detection of NLSYV. lane M: BioFACT™ DNA ladder 100 bp, lane 1- $10^{-8}$ : 10-fold dilution of total RNA.

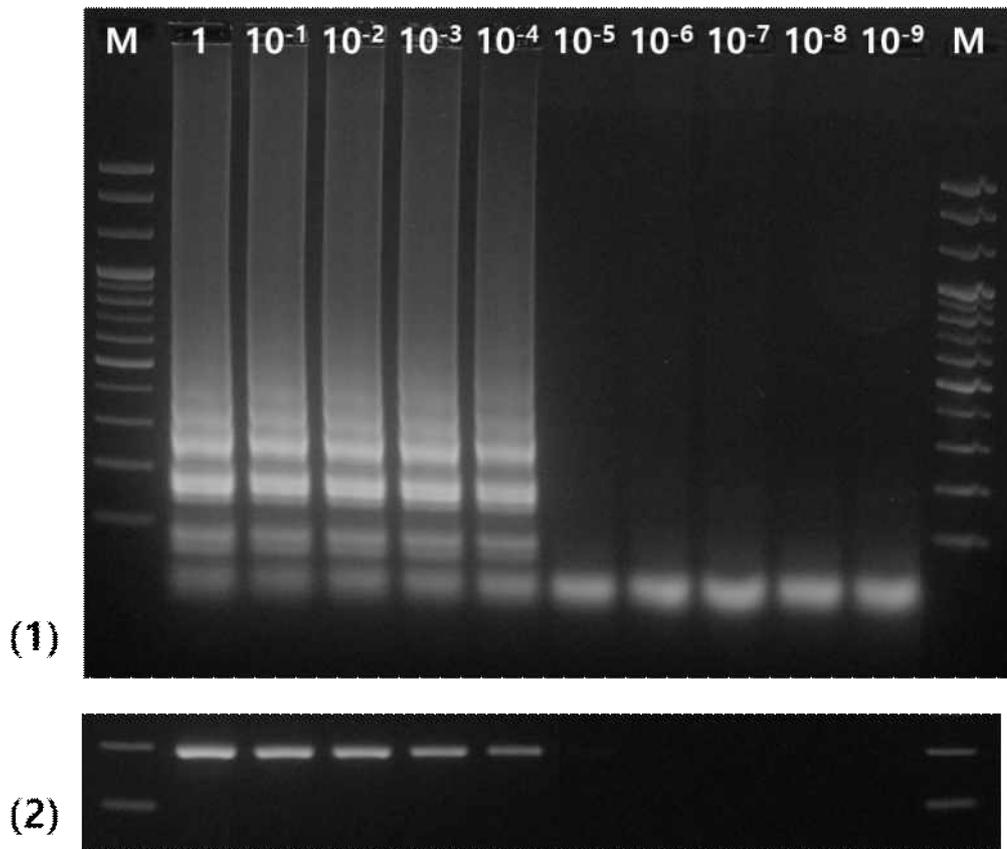


그림 70. NLV 진단을 위한 RT-LAMP 프라이머 검증을 위한 6단계. RT-LAMP의 검출한계를 평가하고 F3와 B3 primer를 사용한 RT-PCR의 검출한계 평가와 비교하였음. NLV RT-LAMP 프라이머의 검출한계는 초기 농도의  $10^{-5}$ 배로 나타났음. (A): Sensitivity of RT-LAMP for the detection of NLV. (B): Sensitivity of RT-PCR for the detection of NLV. lane M: BioFACT™ DNA ladder 100 bp, lane 1- $10^{-10}$ : 10-fold dilution of total RNA.

- 현장에서 진단 시, total RNA를 추출하지 않고 식물체의 잎의 즙액으로 RT-LAMP를 진행하였을 때, 튜립과 수선화에 바이러스의 반응성을 평가하였음(그림 71-72).
- LSV, TBV, TVX, OMMV가 감염된 튜립 시료와 NLSYV, NLV가 감염된 수선화 시료를 사용하여 평가를 진행하였음.
- 튜립 및 수선화 시료 10 mg에 PBE buffer 200  $\mu$ l을 넣고 막자사발을 이용하여 마쇄하고, 주형(template)으로 사용하여 RT-LAMP를 수행하였음.
- 즙액을 premix에 첨가하는 순간 색상의 변화를 확인할 수 있었으며, 바이러스가 감염되지 않은 식물체(healthy control)에서는 식물의 반응을 확인할 수 없었음.
- 30분이 지난 후 healthy control 및 negative control과 확연한 색상 차이가 나타남.

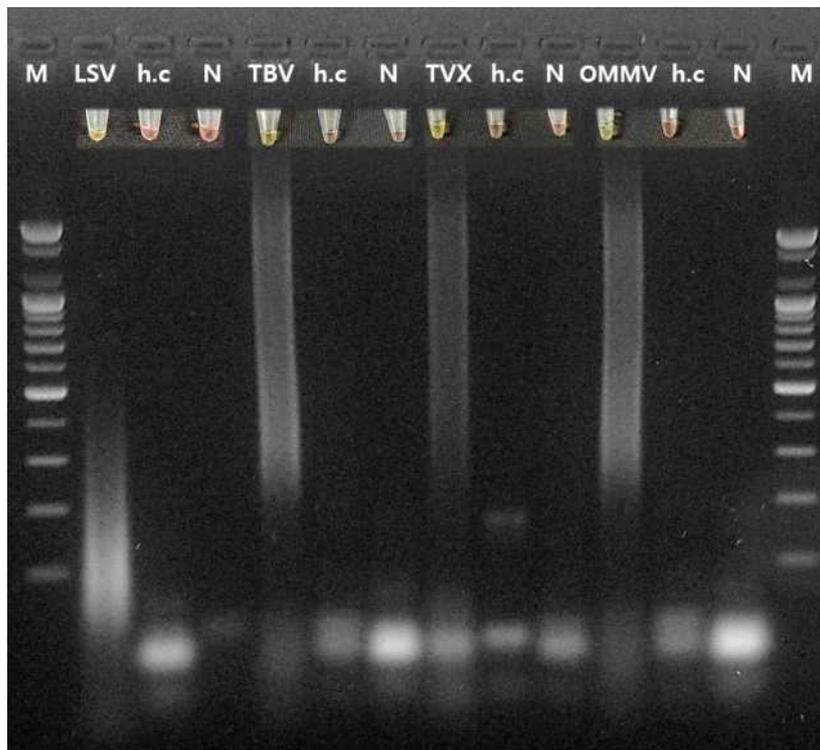


그림 71. 튜립 잎의 즙액을 이용한 튜립 바이러스 4종 RT-LAMP 진단법의 반응성 평가. 튜립 시료 10 mg과 PBE buffer 200  $\mu$ l 및 막자사발을 이용하여 마쇄하고, 주형(template)으로 사용하여 RT-LAMP를 수행하였음. 상온에서 30분 경과 후 색의 변화를 육안으로 확인할 수 있었음. LSV: *Lily symptomless virus*, TBV: *Tulip breaking virus*, TVX: *Tulip virus X*, OMMV: *Olive mild mosaic virus*, h.c: healthy control, N: negative control.

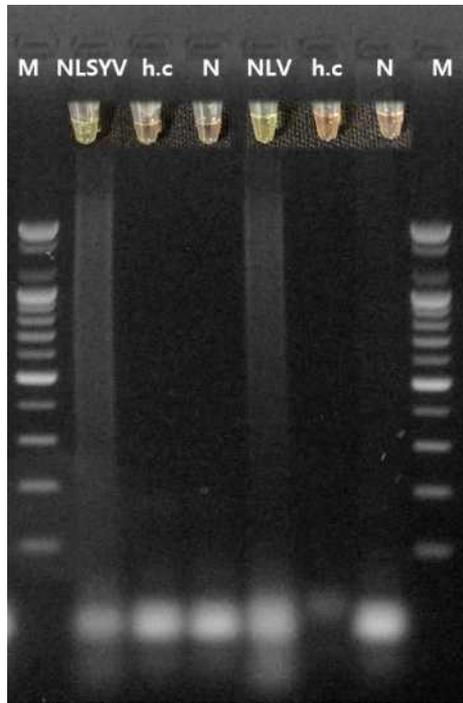


그림 72. 수선화 잎의 즙액을 이용한 수선화 바이러스 2종 RT-LAMP 진단법의 반응성 평가. 튜립 시료 10 mg과 PBE buffer 200  $\mu$ l 및 막자사발을 이용하여 마쇄하고, 주형(template)으로 사용하여 RT-LAMP를 수행하였음. 상온에서 30분 경과 후 색의 변화를 육안으로 확인할 수 있었음. NLSYV: *Narcissus late season yellows virus*, NLV: *Narcissus latent virus*, h.c: healthy control, N: negative control.

○ ICT 기술 접목하여 진단체계의 유기적 연결

- ICT 기술을 접목하기 위해, 현장에서 채집한 튤립과 수선화의 바이러스 병징 사진 및 정보를 제2공동연구기관(씨더스)에 제공하였음(그림 73).

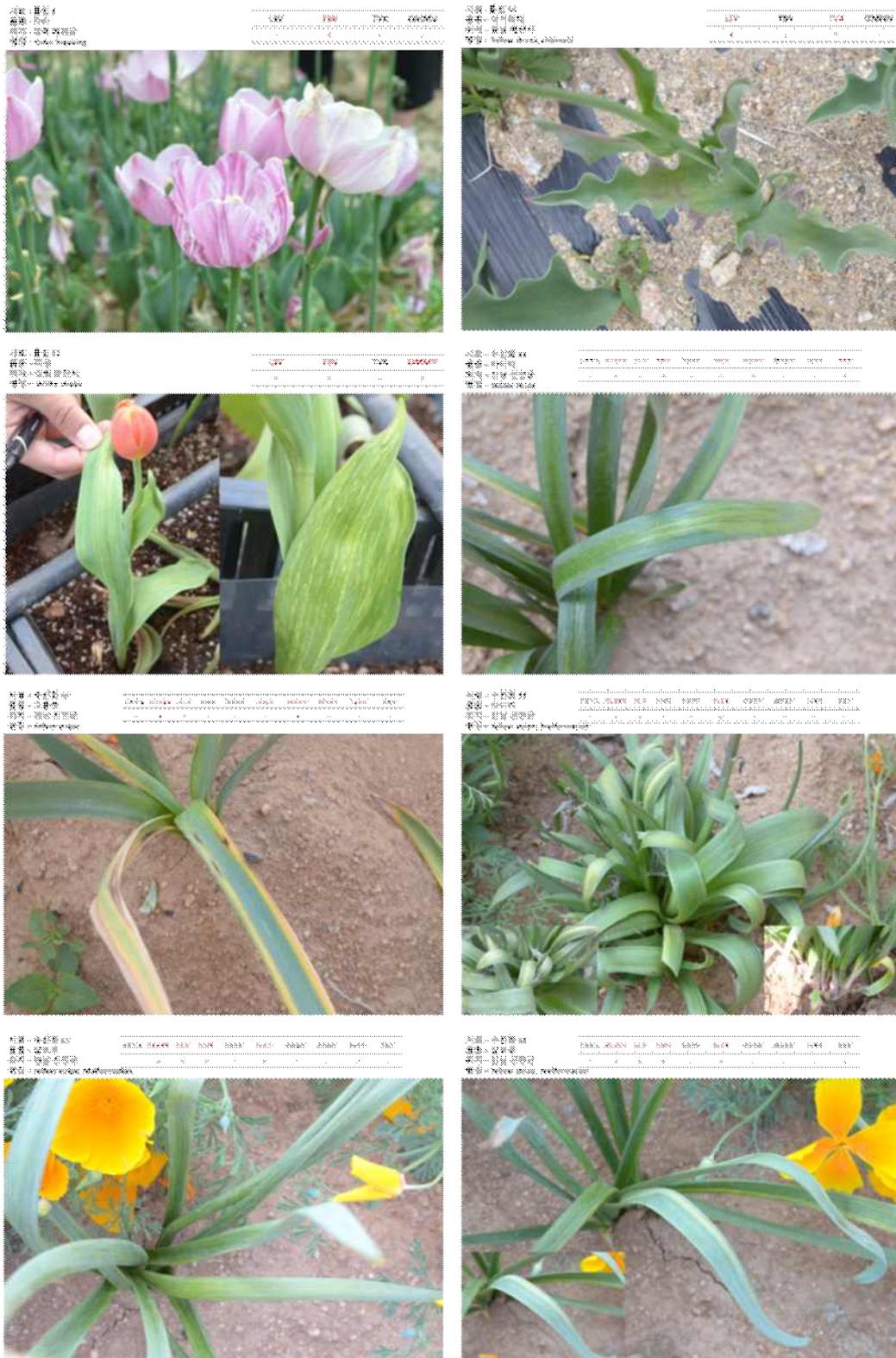


그림 73. 튤립과 수선화의 바이러스 병징 및 정보. 채집한 튤립 및 수선화에서 검출된 바이러스의 병징 사진과 정보를 지속적으로 제2공동연구기관에 제공하여, 빅데이터 기반 및 AI학습에 사용하고자 하였음.

## 2) 제1공동연구기관 : 강원대학교

### 1. 백합, 글라디올러스 등 구근 화훼류에서 바이러스 분석 시료 채집

#### ○ 바이러스 분석용 시료 채집

- 강원도를 중점으로 4개의 지역(춘천, 원주, 태안, 제천)의 백합과 글라디올러스 노지 포장과 하우스에서 다양한 바이러스성 병징을 보이는 시료를 채집하였음. 백합은 총 53개의 시료를 채집하였고, 글라디올러스는 총 99개의 시료를 채집하여 바이러스를 분석하는 재료로 활용하였음.

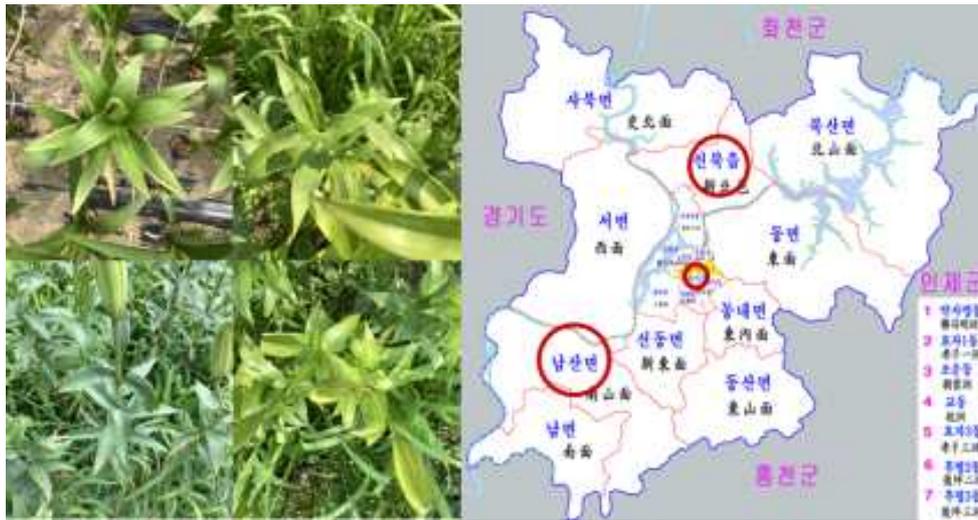


그림 1. 강원도 춘천시 백합 채집 장소와 채집한 시료의 병징사진. 춘천의 3지역 (남산면, 효자동, 신북읍)에서 백합을 채집하였으며, 남산면은 4개의 비닐하우스와 9개의 노지포장 재배를 하고 있었고, 효자동의 백합은 모두 하우스재배를 하고 있었음. 병징은 mosaic을 가장 많이 보였으며, yellowing, stripe, chlorotic spot, necrotic spot 등 다양한 병징을 나타내고 있었음. 채집 시기는 백합을 정식한 뒤 꽃대가 올라오기 전에 채집하였음. 시료들은 병징별로 구분하여 3개의 시료를 bulk로 하여 바이러스 감염 분석을 진행하였음.



그림 2. 강원도 원주시 백합 채집 장소와 채집한 시료의 병징사진. 강원도 원주시의 노지 백합 재배지에서 약 37개의 시료를 채집하였음. 병징은 주로 mosaic을 보이는 시료가 많았고, symptomless, necrotic spot, stripe 등 다양한 병징을 나타내고 있었음. 채집 시기는 꽃이 개화하기 전 절화 시기에 채집하였음. 시료들은 병징별로 구분하여 3개의 시료를 bulk로 바이러스 감염 분석을 진행하였음.



그림 3. 강원도 춘천시 글라디올러스 채집 장소와 채집한 시료의 병징사진. 강원도 춘천시 사북면의 노지 글라디올러스 재배지에서 시료를 채집하였음. 채집한 시료들의 바이러스 병징은 mosaic, stripe, yellowing 등 다양한 패턴을 보였음. 채집 시기는 글라디올러스의 꽃이 개화한 시기에 채집하였음. 시료들은 병징별로 구분하여 3개의 시료를 bulk로 바이러스 감염 분석을 진행하였음.



그림 4. 충청남도 태안군 글라디올러스 채집 장소와 채집한 시료의 병징사진. 충청남도 태안군의 노지 글라디올러스 재배지에서 시료를 채집하였음. 채집한 시료들의 바이러스 병징은 mosaic, stripe, yellowing 등 다양한 패턴을 보였음. 채집 시기는 글라디올러스의 꽃이 개화하기 전 꽃봉오리가 맺혔을 시기에 채집하였음. 시료들은 병징별로 구분하여 3개의 시료를 bulk로 바이러스 감염 분석을 진행하였음.



그림 5. 강원도 원주시 백합 채집 장소와 채집한 시료의 병징사진. 강원도 원주시의 하우스 재배지 2동과 노지 글라디올러스 재배지에서 시료를 채집하였음. 채집한 시료들의 바이러스 병징은 mosaic 이 가장 많았고, symptomless, necrotic spot, stripe, yellowing, streak 등 다양한 패턴을 보였음. 채집 시기는 글라디올러스의 꽃이 개화하는 시기에 채집하였음. 시료들은 병징별로 구분하여 3개의 시료를 bulk로 바이러스 감염 분석을 진행하였음.



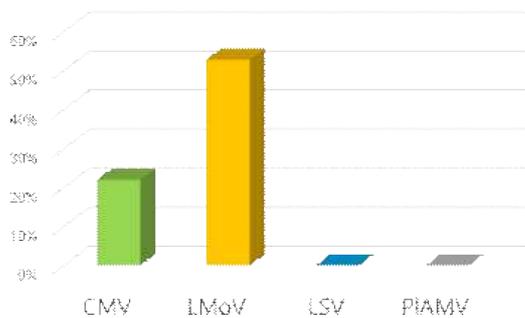
그림 6. 충청북도 제천시 백합 채집 장소와 채집한 시료의 병징사진. 충청북도 제천시의 노지 글라디올러스 재배지에서 시료를 채집하였음. 채집한 시료들의 바이러스 병징은 주로 mosaic 패턴을 보였음. 채집 시기는 글라디올러스의 꽃이 개화하기 전 꽃봉오리가 맺혔을 시기에 채집하였음. 시료들은 병징별로 구분하여 3개의 시료를 bulk로 바이러스 감염 분석을 진행하였음.

○ 구근 화훼류 진단 및 빅데이터 분석시스템 구축을 위한 기초 정보 확보

- 바이러스에 의해 생기는 이상증상이나 바이러스 관련 병징을 육안으로 확인하였으며, 3번의 채집시기를 통하여 백합의 주요 발생 바이러스인 CMV, LMoV, LSV, PIAMV의 발병 시기를 확인하였음.



1차 샘플링 시기



2차 샘플링 시기

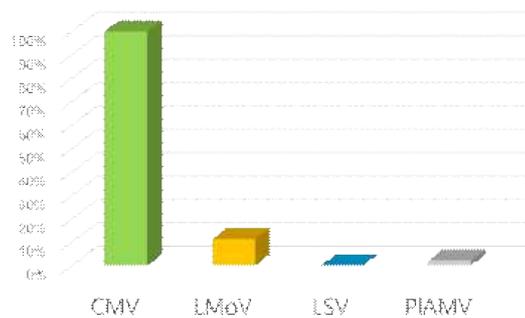


그림 7. 샘플링 시기에 따른 백합의 바이러스 병징 및 주요 바이러스 검정. 같은 백합 채집 장소에서 총 2번의 재배시기에 따른 샘플링을 진행하였음. 각 시기마다 백합의 길이가 약 15cm, 50cm일 때 샘플링을 진행하였음. 1차 샘플링 시기에는 모자이크 병징을 보이거나 병징을 보이지 않는 백합이 대부분임을 확인함. 2차 샘플링 시기에도 마찬가지로 대부분의 백합에서 병징을 확인할 수 없었음. RT-PCR을 통한 바이러스 검정 결과, 1차 샘플링 시기에 가장 많이 감염된 바이러스는 LMoV, 그 다음이 CMV로 확인되었으나, 2차 샘플링 시기에 CMV가 가장 많이 감염하는 것을 확인함.

- 바이러스에 의해 생기는 이상증상이나 바이러스 관련 병징을 육안으로 확인하였으며, 3번의 채집시기를 통하여 글라디올러스의 주요 발생 바이러스인 BYMV, LMoV, CMV의 발병시기를 확인하였음.

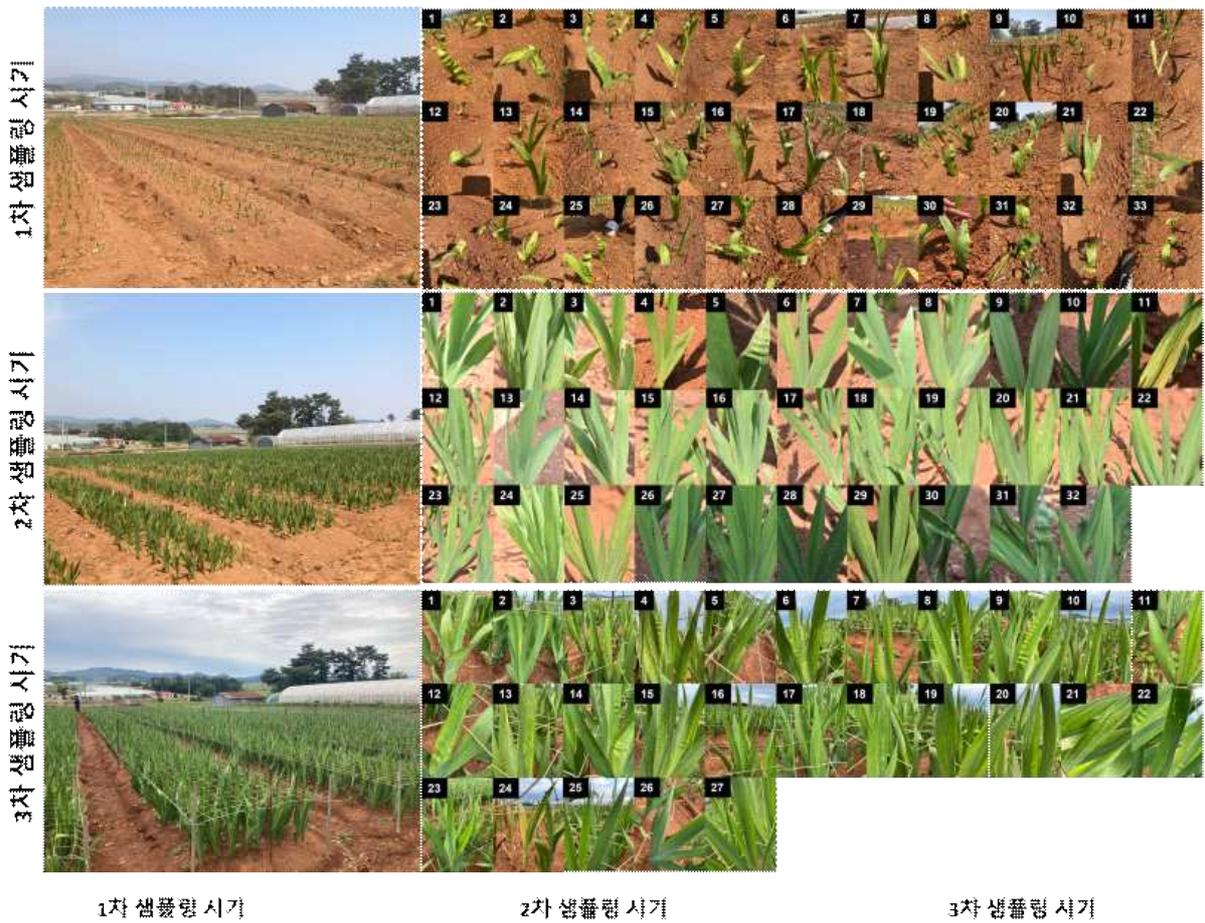


그림 8. 샘플링 시기에 따른 글라디올러스의 바이러스 병징 및 주요 바이러스 검정. 같은 글라디올러스 채집 장소에서 총 3번의 재배시기에 따른 샘플링을 진행하였음. 각 시기마다 글라디올러스의 길이가 약 10cm, 30cm, 50cm일 때 샘플링을 진행하였음. 1차 샘플링 시기에는 바이러스에 의한 증상 외에 생장에 의한 이상 증상이 보였음. 2차 샘플링 시기부터 바이러스에 의한 병징인 mosaic, chlorotic spot, necrotic spot 등의 병징이 발현하는 것을 육안으로 확인하였음. 각 시기별로 주요 바이러스인 BYMV, LMoV, CMV를 검정한 결과, 거의 모든 시기에서 BYMV의 감염이 확인되었음. 또한, LMoV와 CMV는 2차 샘플링시기에 많이 발생한 것을 확인하였음. 따라서 LMoV와 CMV를 방제하기 위해선 글라디올러스의 생장 길이가 30cm가 되기 전에 보독충이나 바이러스를 매개하는 잡초 등을 예방해야 할 것으로 판단됨. 또한, BYMV는 모든 샘플링 시기에 존재하는 것으로 보아 구근을 통하여 전염될 것으로 추측됨.

## 2. RT-PCR 기반 구근 화훼류 바이러스의 탐색 및 동정

### ○ 구근 화훼류 바이러스의 동정

- 보고된 바이러스 기반 RT-PCR 분석을 위하여 채집한 백합 51개의 시료를 병징별 별크로 묶어서 total RNA를 추출하여 RT-PCR을 진행하였음.
- 총 22종의 바이러스에 대한 감염성 분석을 RT-PCR을 통해 진행하였음(그림 9).

표 1. 백합에 감염하는 바이러스를 검정하기 위한 프라이머 디자인 목록<sup>a</sup>

바이러스	프라이머 이름	서열 (5' → 3')	사이즈 (bp)
<i>Cucumber mosaic virus</i>	CMV-Lily-NdeI-F	GGGAATTCCATATGGACAAATCTGAATCAACC	657
	CMV-Lily-SacI-R	CGAGCTCGCGACTGGGAGCACTCC	
<i>Lily mottle virus</i>	LMoV-Lily-NdeI-F	GGGAATTCCATATGGCAAATGAGACACTCAAT	825
	LMoV-Lily-XhoI-R	CCGCTCGAGCATAGAAATTCOAAGTAA	
<i>Lily symptomless virus</i>	LSV-Lily-NdeI-F	GGAATTCCATATGCAATCAAGACCAGCACAA	876
	LSV-Lily-XhoI-R	CCGCTCGAGTCCATTATTTGCGTATCGA	
<i>Plantago asiatica mosaic virus</i>	PIAMV-Lily-NdeI-F	GGAATTCCATATGGCACTCAACCAAGCYCC	624
	PIAMV-Lily-HindIII-R	CCCCAAGCTTRTCGGAGGGGGAGGGGA	
<i>Arabis mosaic virus</i>	ArMV-RNA2-F	CCAATTGCCCAAGTGGAG	546
	ArMV-3'	CAAARTTYCCTCTYGGCTTGC	
<i>Calla lily latent virus</i>	CLLV-CP-F	TCGGGAGAAAAGACAGGTGA	846
	CLLV-CP-R	CTGCGGTGGACCCATAC	
<i>Narcissus mosaic virus</i>	NMV-CP-F	ATGGCTACTCCCAGCACT	681
	NMV-CP-R	ACAATTCTGGAGGTGCTTC	
<i>Tobacco rattle virus</i>	TRV-CP-F	ATGACAGACGGTATGTACGA	602
	TRV-CP-R	TTAGGGATCCGGACGCG	
<i>Tomato spotted wilt virus</i>	TSWV-CP-F	GCTGGAGCTAAGTATAGCAGC	598
	TSWV-CP-R	CACAGGGCAAAGACCTTGAG	
<i>Tobacco necrosis virus A</i>	TNVA-CP-F	ATGGCAGGAAAGAAGAACAA	907
	TNVA-CP-R	CCTGTTTCCCAGGATCC	
<i>Strawberry latent ring spot virus</i>	SLRSV-R1-POL-F	AGTTGGGAGCATATGATGGC	545
	SLRSV-R1-POL-R	CTCCGGCTCCTCCCTCTCAA	
<i>Tomato ringspot virus</i>	ToRSV-F80	ATGGCAGCGATTTTGGTT	740
	ToRSV-R60	TGGTACGGTGATGCGATAAACA	
<i>Apple stem grooving virus</i>	ASGV-F	GCCACTTCTAGGCAGAACTCTTTGAA	272
	ASGV-R	AACCCCTTTTTGTCCTTCAGTACGAA	
<i>Tobacco ringspot virus</i>	TRSV-2203-F	TCATGCTTAAAGATGCAGATG	731
	TRSV-2934-R	AAAACATGGGAGGATGCAC	
<i>Turnip mosaic virus</i>	TuMV-CP(506)-5	AATGTGGGTGATGATGGACGG	506
	TuMV-CP(506)-3	CACACTGGCTGCTTTAACAAC	
<i>Broad bean wilt virus</i>	BBWV2-506-F	GGTGAGCAGTTTGTGAGAAGT	506
	BBWV2-506-R	CCAGATAATGCATATCCACC	
<i>Iris yellow spot virus</i>	IYSV-CP-F	FATGGCTACCGTTAGGGTGA	822
	IYSV-CP-R	TTAATTATATCTATCTTTCTTGGAGG	
<i>Shallot yellow stripe virus</i>	SYSV-CP-F	GCATCAGAAACAGAAGACGC	777
	SYSV-CP-R	TTACATACGAAGACCGAGCA	
<i>Rembrandt tulip breaking virus</i>	ReTBV-CP-F	GCCAATGAGACTTTGAATGC	805
	ReTBV-CP-R	CTACATGTTAACTCCCAAAGG	
<i>Lily virus X</i>	LVX-CP-F	CAACGTGCCGCATCTACC	763
	LVX-CP-R	AAGTTTAGTGTATGGTGGGC	
<i>Tulip breaking virus</i>	TBV-CI-F	CAACATTCTGGTGTATGTGG	700
	TBV-CI-R	GTTCTCAGTTGTATGATCCG	
<i>Zantedeschia mild mosaic virus</i>	ZaMMV-F	TGATGGAYGGGGATGAAC	434
	ZaMMV-R	CGATAACTGTGGGCTGTT	

<sup>a</sup> 백합 바이러스의 진단법 개발을 위하여 NCBI GenBank에 등록된 염기서열을 이용하여 종 특이적으로 반응하는 프라이머를 설계하였음.

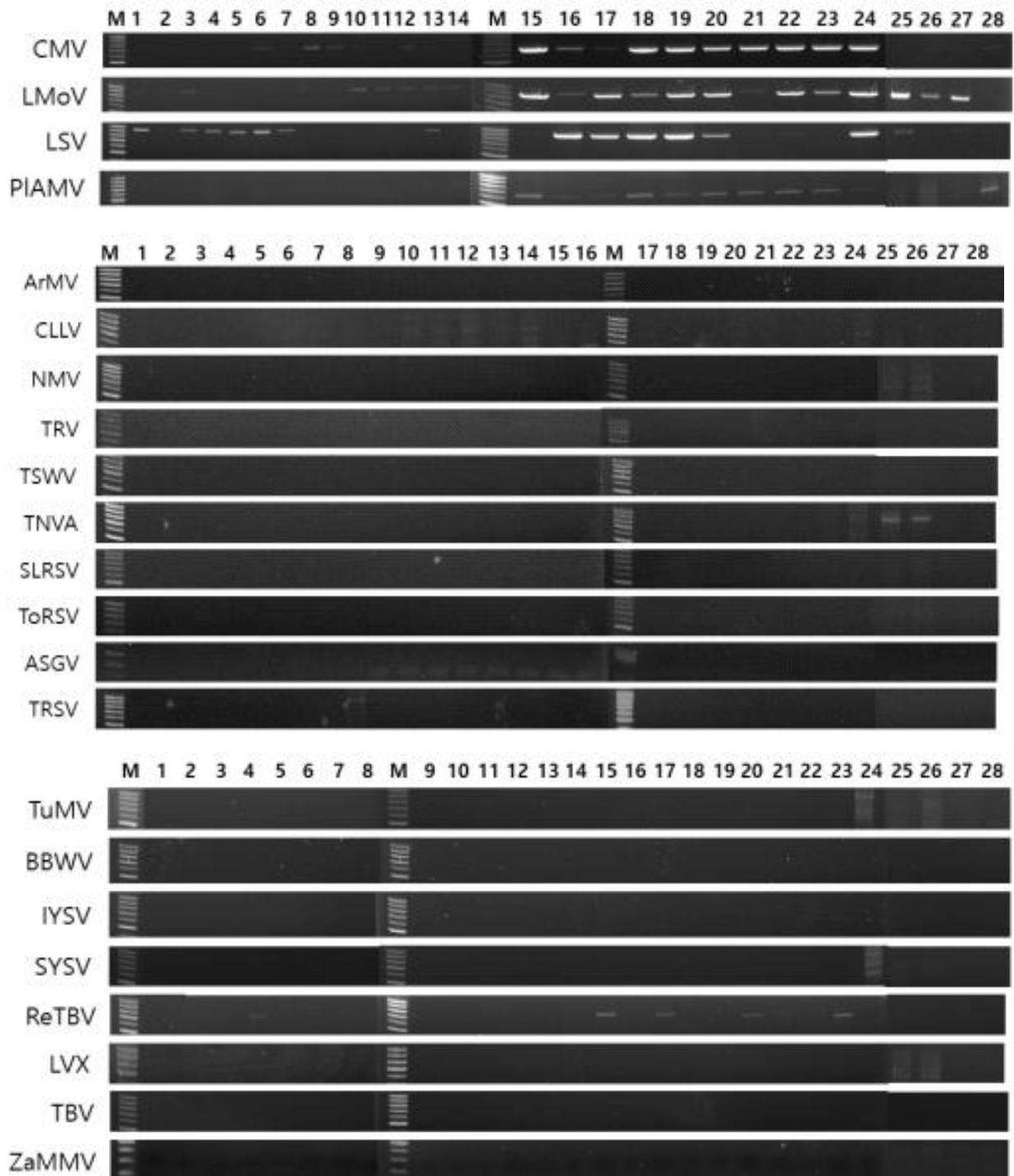


그림 9. 백합의 보고바이러스를 기반으로 바이러스 RT-PCR 분석. 51개의 샘플을 벌크로 합쳐서 total RNA를 추출하여 총 28개의 RNA를 사용하여 RT-PCR 검정을 수행하였음. 진단 결과, 가장 많이 검정된 바이러스는 LMoV, CMV, LSV, PIAMV 4종의 바이러스로 확인 되었으며, 그 외에도 국내에서 보고되지 않았던 ReTBV도 백합에서 감염한다고 확인할 수 있었음. 또한, 검역 바이러스 중 하나인 TNVA의 감염도 확인되어 이에 대한 역학관계 조사가 필요할 것으로 판단됨.

- 채집한 글라디올러스 시료 99종을 병징 별 별크로 묶어서 total RNA를 추출하여 RT-PCR을 진행하였음. *Cucumber mosaic virus*(CMV), *Lily mottle virus*(LMoV), *Lily symptomless virus*(LSV), *Plantago asiatica mosaic virus*(PIAMV), *Arabidopsis mosaic virus*(ArMV), *Tobacco rattle virus*(TRV), *Bean common mosaic virus*(BCMV), *Clover yellow vein virus*(CIYVV), *Cycas necrotic stunt virus*(CNSV), *Impatiens necrotic spot virus*(INSV), *Ornithogalum mosaic virus*(OrMV), *Tobacco black ring virus*(TBRV), *Tobacco necrosis virus A*(TNVA), *Bean yellow mosaic virus*(BYMV), *Tobacco streak virus*(TSV), *Tobacco ringspot virus*(TRSV), *Tomato ringspot virus*(ToRSV), *Tobacco mosaic virus*(TMV), *Tomato spotted wilt virus*(TSWV), *Broad bean wilt virus*(BBWV)와 *Tomato aspermy virus*(TAV) 총 21종의 바이러스에 대한 감염성 분석을 RT-PCR을 통해 진행하였음(그림 10).

표 2. 글라디올러스에 감염하는 바이러스를 검정하기 위한 프라이머 디자인 목록<sup>a</sup>

바이러스	프라이머 이름	서열 (5'→ 3')	사이즈 (bp)
<i>Cucumber mosaic virus</i>	CMV-Lily-NdeI-F	GGGAATTCCATATGGACAAATCTGAATCAACC	657
	CMV-Lily-SacI-R	CGAGCTCGCGACTGGGAGCACTCC	
<i>Lily mottle virus</i>	LMoV-Lily-NdeI-F	GGGAATTCCATATGGCAAATGAGACTCAAT	825
	LMoV-Lily-XhoI-R	CCGCTCGAGCATAGAAATTCCAAGTAA	
<i>Lily symptomless virus</i>	LSV-Lily-NdeI-F	GGAATTCATATGCAATCAAGACCAGCACAA	876
	LSV-Lily-XhoI-R	CCGCTCGAGTCCATTATTTGCGTATCGA	
<i>Plantago asiatica mosaic virus</i>	PIAMV-Lily-NdeI-F	GGAATTCATATGGCACTCAACCAAGCYCC	624
	PIAMV-Lily-HindIII-R	CCCAAGCTTRTCGGAGGGGGAGGGGA	
<i>Arabidopsis mosaic virus</i>	ArMV-RNA2-F	CCAATTGCCCAAGTGGAG	546
	ArMV-3'	CAAARTTYCCTCTYGGCTTGC	
<i>Tobacco rattle virus</i>	TRV-CP-F	ATGACAGACGGTATGTACGA	602
	TRV-CP-R	TTAGGGATTCCGGACGCG	
<i>Bean common mosaic virus</i>	BCMV-CP-5	TCAGGAACTGGACAGTTGCA	863
	BCMV-CP-3	CTGCGGGGGACCCATG	
<i>Clover yellow vein virus</i>	CIYVV4-F	GAATCACTAAACCCAGAACT	1,521
	CIYVV4-R	CCAAGTTAACTGTGTACATG	
<i>Cynas necrotic spot virus</i>	CNSV-CP-F	TATATAGGCCAGGTACCATT	499
	CNSV-CP-R	AAATCAAATGCCACTCCTGT	
<i>Impatiens necrotic spot virus</i>	INSV-CP-F	GTTAGTAAAGTCAGCAGATC	833
	INSV-CP-R	GCAAACCAAGCTTAAATCTC	
<i>Ornithogalum mosaic virus</i>	OrMV-CP-F	GCAGAATCTATGGATGCAG	762
	OrMV-CP-R	TCACATATTAACACCAAGTAGT	
<i>Tomato black ring virus</i>	TBRV-CP-F	GCAGACGGGGATTTTGC	1,536
	TBRV-CP-R	CTATGCAGGAATAGTTARAGG	
<i>Tobacco necrosis virus A</i>	TNVA-CP-F	ATGGCAGGAAAGAAGAACAA	907
	TNVA-CP-R	CCTGTTTCCCAGGATCC	
<i>Bean yellow mosaic virus</i>	BYMV-8951-F	GAATGGACAATGATGGATGG	410
	BYMV-9358-R	AATACGAACACCAAGCATGG	
<i>Tobacco streak virus</i>	TSV-CP-F	GTCCAGACCATCCATCCA	693
	TSV-CP-R	AAATCTTCTGGTGGCATCAA	
<i>Tobacco ringspot virus</i>	TRSV-2203-F	TCATGCTTAAAGATGCAGATG	731
	TRSV-2934-R	AAAACATGGGAGGATGCAC	
<i>Tomato ringspot virus</i>	ToRSV-F80	ATGGCAGCGATTTTGGTT	740
	ToRSV-R60	TGGTACGGTGATGCGATAAACA	
<i>Tobacco mosaic virus</i>	TMV-CP_5	ATGTCTTACAGTACTACTC	480
	TMV-CP_3	TCAAGTTGCAGGACCAGAG	
<i>Tomato spotted wilt virus</i>	TSWV-CP-F	GCTGGAGCTAAGTATAGCAGC	598
	TSWV-CP-R	CACAGGGCAAAGACCTTGAG	
<i>Broad bean wilt virus</i>	BBWV2-506-F	GGTGAGCAGTTTGTGAGAAGT	506
	BBWV2-506-R	CCAGATAATGCATATTCCACC	

<sup>a</sup> 글라디올러스 바이러스의 진단법 개발을 위하여 NCBI GenBank에 등록된 염기서열을 이용하여 종 특이적으로 반응하는 프라이머를 설계하였음.

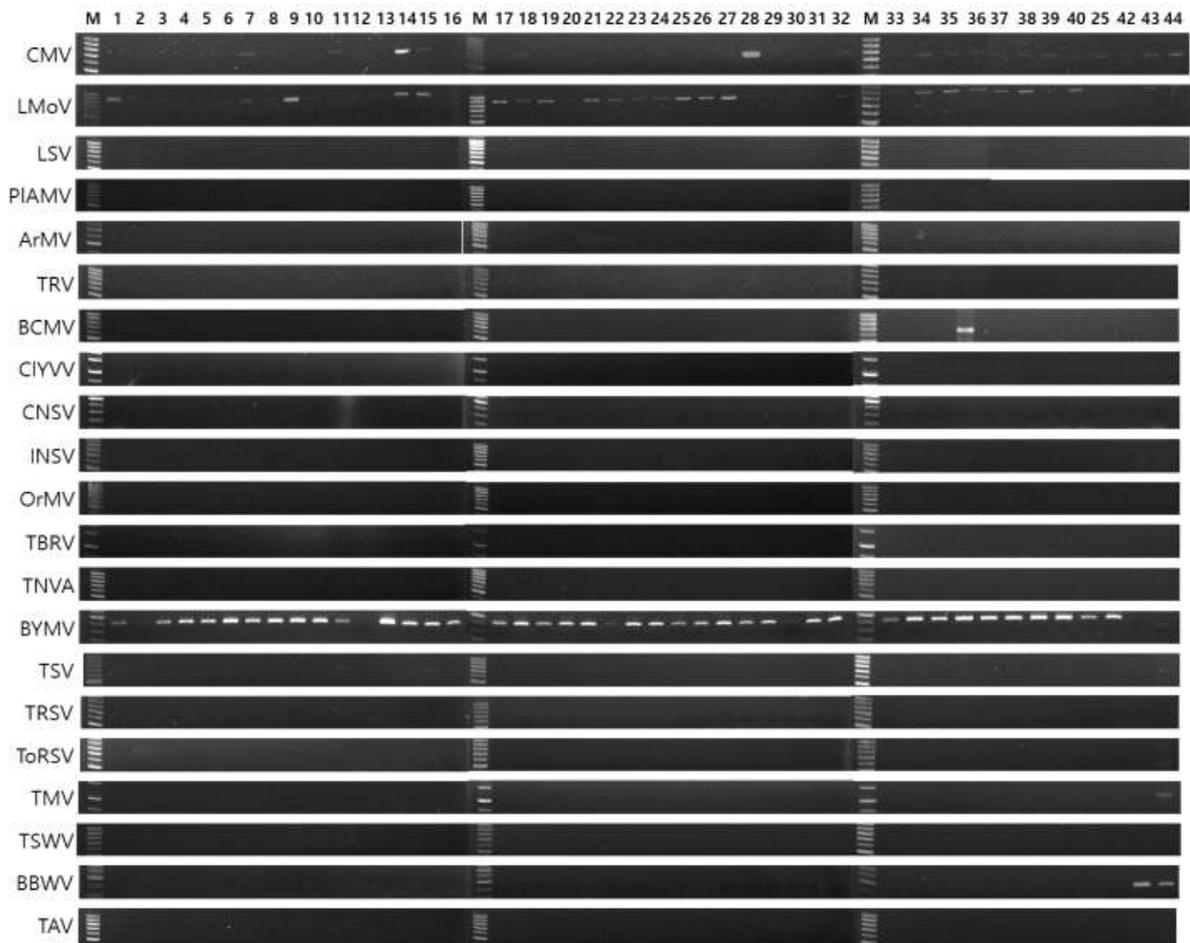


그림 10. 글라디올러스의 보고바이러스를 기반으로 바이러스 RT-PCR 분석. 99개의 샘플을 별크로 합쳐서 total RNA를 추출하여 총 44개의 RNA를 사용하여 RT-PCR 검정을 수행하였음. 거의 모든 샘플에서 BYMV가 감염한 것을 확인할 수 있었으며, 국내에서 보고되지 않았던 LMoV 또한 많이 감염하는 것을 확인하였음. 그 외에도 CMV, BBWV, BCMV도 소수 검정되었음. 또한, 검역 바이러스 중 하나인 TSV의 감염도 확인되어 이에 대한 역학관계 조사가 필요할 것으로 판단됨.

- 검출된 바이러스의 생물학적 및 분자생물학적 특성을 규명하였음.
- 백합에서 총 22종의 바이러스 검정 결과, LMoV, CMV, LSV, PIAMV가 가장 많이 감염하는 것으로 확인되었으며, 그 중 CMV에 대한 생물학적 및 분자생물학적 특성을 확인하고자 다양한 기주식물에 기계적 접종을 실시하였음. 또한, 백합에서 분리된 CMV들의 분자생물학적 특성을 확인하기 위해 외피단백질 부분의 계통 분석을 수행하였음.

표 3. 백합에서 분리한 *Cucumber mosaic virus*(CMV) 분리주들의 생물학적 특성 결과

기주식물	병징								
	KL1	KL2	KL3	KL4	KL5	KL6	Ly2 <sup>2</sup>	Ly8	Fny
<i>Nicotiana benthamiana</i>	+/M <sup>1</sup>	+/M	NR/M	+/M	NR/M	NR/M	NR/M	NR/M	+/M
<i>N. tabacum</i> cv. Xanthi nc	-/-	NR/-	NR/-	NR/-	NR/-	NR/-	NR/-	NR/NR	+/M
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	sL/-	sL/-	sL/-	sL/-	sL/-	sL/-	sL/-	sL/-	sL/-
<i>Cucurbita pepo</i> cv. Black beauty	-/-	-/-	+/M	+/+	+/+	-/-	-/-	+/M	+/M
<i>Capsicum annuum</i> cv. Cheongyang	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/M
<i>Zinnia elegans</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/M

<sup>1</sup> 접종엽/상엽; M, Mosaic; NR, necrotic ringspot; sL, necrotic local lesion of small size; +, Symptomless; -, no infection.

<sup>2</sup> Lee, J. A., Choi, S. K., Yoon, J. Y., Hong, J. S., Ryu, K. H., Lee, S. Y., & Choi, J. K. (2007). Variation in the pathogenicity of lily isolates of Cucumber mosaic virus. *The Plant Pathology Journal*

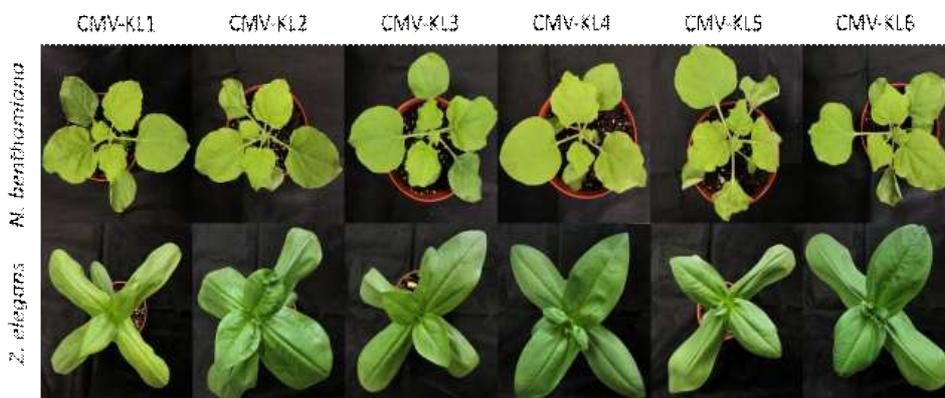
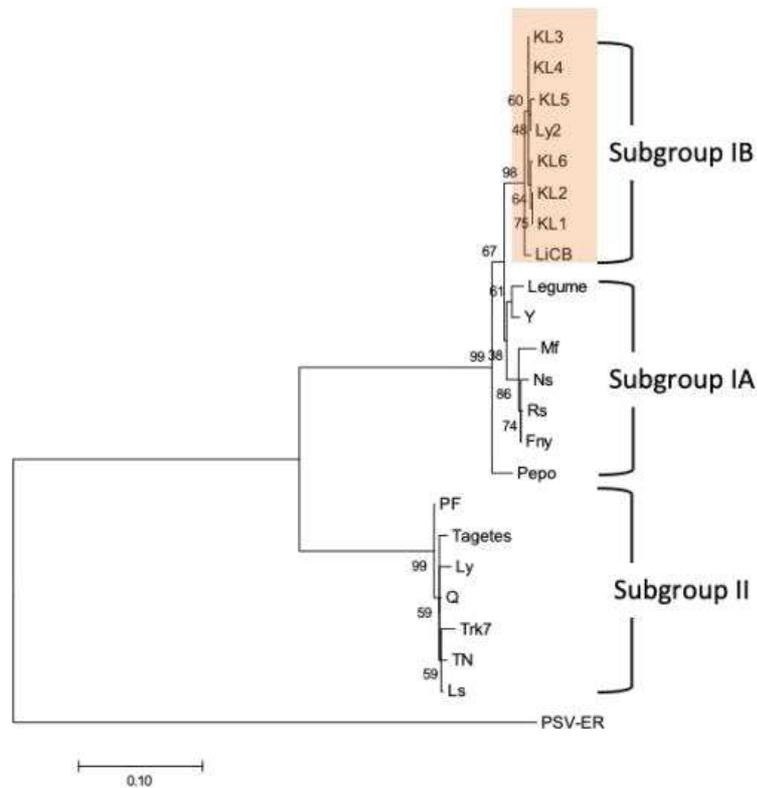


그림 11. 백합에서 분리한 CMV의 생물학적 특성 분석. 백합에서 분리한 CMV를 바이러스 기주식물인 담배 식물 2종(*Nicotiana benthamiana*와 *N. tabacum* cv. Xanthi nc), 명아주 (*Chenopodium amaranticolor*), 추키니 호박(*Cucurbita pepo* cv. Black beauty), 고추 (*Capsicum annuum* cv. Cheongyang), 백일홍(*Zinnia elegans*)에 기계적 접종을 통해 바이러스의 생물학적 특성을 확인하였음. *N. benthamiana*에서만 모든 백합 분리 CMV가 감염하는 것을 확인하였으며, 그 외에 다른 기주식물에는 감염하지 않는 것을 확인하였음. 이를 통해 백합에서 분리한 CMV가 매우 좁을 기주 범위를 갖는 것을 확인하였음.



**그림 12. 백합에서 분리한 CMV의 계통 분석.** 백합에서 분리한 CMV(CMV-KL1~CMV-KL6)들의 계통을 분석하기 위해, 외피단백질의 유전자를 서열상으로 확인하였음. 기주범위가 넓고 다양한 서브 그룹(서브 그룹 IA, IB, II)을 가진 CMV 내에서의 백합 분리 CMV의 유연관계를 분석하였음. 외피단백질(CP)의 아미노산 수준에서의 계통도를 분석한 결과, 백합 분리주 모두 서브 그룹 IB에 속하는 것을 확인할 수 있었으며, 백합에서 분리된 CMV들과 매우 가까운 유연관계를 가지는 것을 확인하였음. 주황 박스는 백합에서 새로 확인한 CMV를 나타냄. 글라디올러스에서 총 21종의 바이러스 검정 결과, BYMV, LMoV, CMV가 가장 많이 감염하는 것으로 확인되었으며, 그 중 BYMV에 대한 생물학적 및 분자생물학적 특성을 확인하고자 다양한 기주식물에 기계적 접종을 실시하였음. 또한, 글라디올러스에서 분리된 BYMV들의 분자생물학적 특성을 확인하기 위해 외피단백질 부분의 계통 분석을 수행하였음.

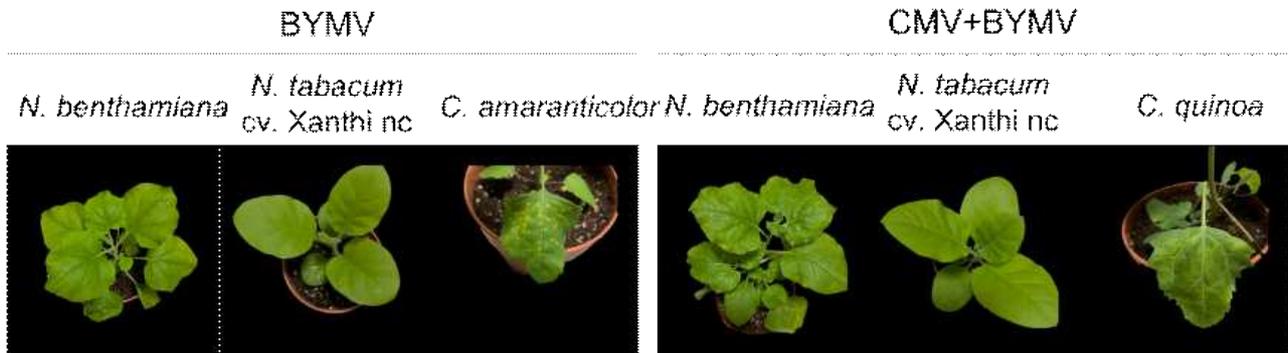


그림 13. 글라디올러스에서 분리한 BYMV의 생물학적 특성 분석. 글라디올러스에서 분리한 BYMV를 바이러스 기주식물인 담배 2종 (*Nicotiana benthamiana*와 *N. tabacum* cv. Xanthi nc)와 명아주 1종 (*Chenopodium amaranticolor*)에 기계적접종을 통하여 BYMV의 생물학적 특성을 확인하였음. BYMV는 두 종의 담배식물에서 모두 병징을 보이지 않았으나, 명아주의 접종엽에서 괴사반점을 형성한 것을 확인하였음. 또한, 글라디올러스에서 많이 발생한 주요바이러스 중 BYMV와 CMV의 혼합 감염되었을 시 바이러스의 생물학적 특성도 확인하였음. 마찬가지로 두 종의 담배식물에서는 병징을 보이지 않았음. 명아주에서 기존의 BYMV는 접종엽에 괴사반점을 나타냈지만, CMV와 혼합감염되었을 시, 접종엽에 괴사반점은 나타나지 않고 접종엽에 모자이크 병징이 확인되었음.

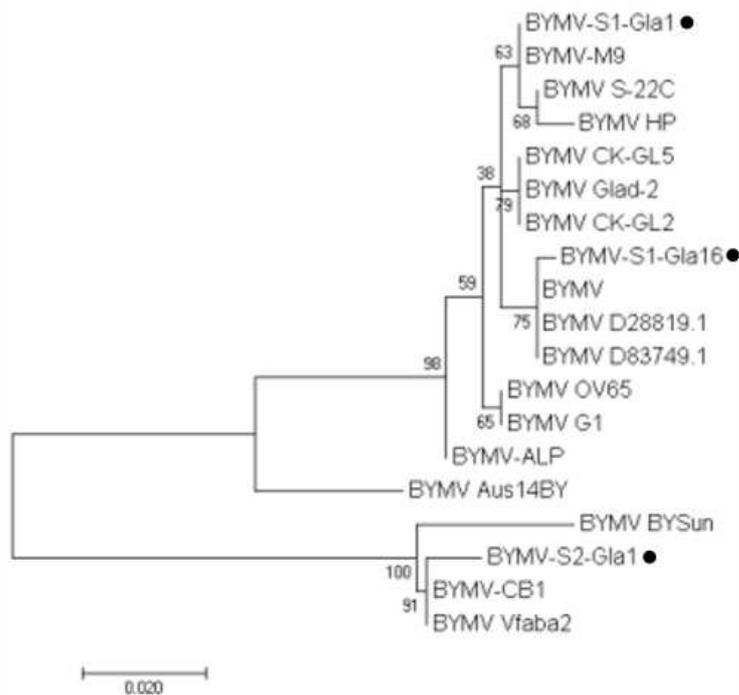


그림 14. 글라디올러스에서 분리한 BYMV의 계통 분석. 글라디올러스에서 분리한 BYMV (BYMV-S1-Gla1, BYMV-S1-Gla16, BYMV-S2-Gla1)들의 계통을 분석하기 위해, 외피단백질의 유전자를 서열상으로 확인하였음. 다양한 작물에서 분리한 BYMV 내에서의 글라디올러스 분리 BYMV의 유연관계를 분석하였음. 외피단백질(CP)의 뉴클레오타이드 수준에서의 계통도를 분석한 결과, 글라디올러스 분리주들은 CMV와는 달리 하나의 그룹으로 속하지 않고 상대적으로 먼 유연관계를 보였음.

### 3. 구근 화훼류 바이러스 유전자 개별진단법 개발

#### ○ 구근 화훼류 바이러스 유전자 진단법 개발

- 백합 감염 바이러스 9종(CLLV, IYSV, LVX, NMV, ReTBV, SYSV, TNVA, TRV, ArMV)과 글라디올러스 감염 바이러스 8종(CNSV, INSV, OrMV, TNVA, TSV, TBRV, TRV, ArMV)을 대상으로 미국 국립생물공학정보센터 (National center for Biotechnology Information, NCBI)에서 유전자 정보를 확보하였고, *in silico* 분석에 사용하였음.

표 4. 국내외 기보고 바이러스 분리주 염기서열 확보

Virus	NCBI accession no.
Calla lily latent virus	EF105299, EF101346, EF105298
Cycas necrotic stunt virus	MK512742, BK010817, JN127337, LC577869, MK521838, MN603966
Impatiens necrotic spot virus	MN553562, MH453567, MH453565, MH453563, MH453561, MH453546, LC384872, KX780323, GU112504, GQ336989, FN400773, FN400772, AB109100
Iris yellow spot virus	MG065700, MG065699, AF001387, AF067070, AB378751, AY377428, AB121026, AB121025, EF419888, EF427448
Lily virus X	LC335818, AJ633822, AY864849, X15342
Narcissus mosaic virus	D13747, KF752593, AY225449
Ornithogalum mosaic virus	AY994107, AY994102, JF682235, AF080587, AJ510250, KU981083, JN127345, FJ573184, AY994106, JQ019409
Rembrandt tulip breaking virus	MG637051, MK368780, MK368781, AB674535
Shallot yellow stripe virus	AM267479, MN607702, MK127536
Tobacco necrosis virus A	M33002, AY546104, GQ221829, MT675968, KX906928, EF201611, EF201610
Tobacco streak virus	KR017710, KP256520, KX523133, KY176870, KT445969, KM504248, JX463336, JX073658
Tobacco black ring virus	MN718461, MN699707, MN699706, MN699705, MN699704, MN699703, MG458221, KX977561, HG939488, AY157994, X80831
Tobacco rattle virus	AJ536414, AB369280, GQ903772, AF034621, AY166661, AY166663, AY166662, AY166660
Arabis mosaic virus	AB279741, AB279740, AB279739, EU617327, MN599985, EF426853, MH802017, HQ834962, AY017339, KT923130, KJ481190, KP027438, KJ481186

<sup>a</sup> 진단법 개발을 위하여 NCBI GenBank에 등록된 염기서열을 이용하여 종 특이적으로 반응하는 프라이머를 설계하였음.

- 개별 바이러스에 대한 정밀 진단용 프라이머를 설계하였음(그림 15-28).

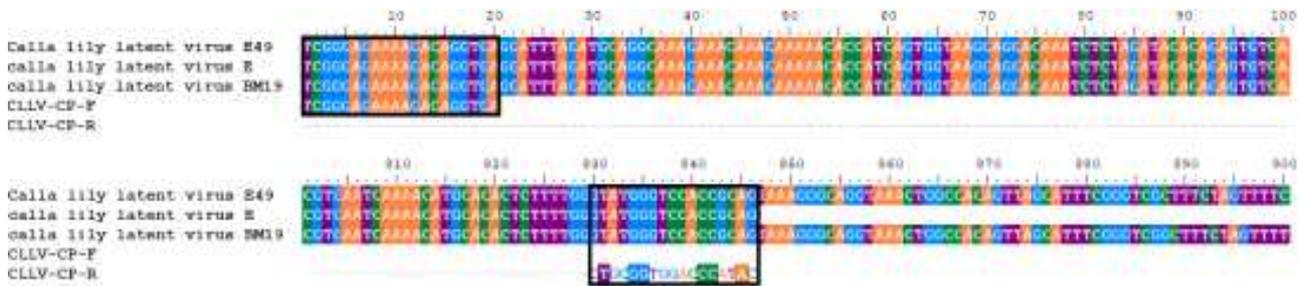


그림 15. *in silico* 분석을 통한 *Calla lily latent virus*(CLLV) 개별 바이러스의 정밀 진단용 프라이머 위치 확인. 검정색 박스: 진단 프라이머 염기서열 위치. 전 세계에서 보고된 CLLV의 염기서열들을 NCBI를 통해 확보하였으며, *in silico* 분석을 통해 가장 안정적인 유전자인 외피단백질(CP)에서 염기서열 위치를 탐색하였음. 외피단백질 중 약 846 bp로 증폭할 수 있는 정밀 진단용 프라이머를 제작하였음. 상단 그림에서 검정색 박스로 프라이머의 위치를 표시하였음.



그림 16. *in silico* 분석을 통한 *Cycas necrotic stunt virus*(CNSV) 개별 바이러스의 정밀 진단용 프라이머 위치 확인. 검정색 박스: 진단 프라이머 염기서열 위치. 전 세계에서 보고된 CNSV의 염기서열들을 NCBI를 통해 확보하였으며, *in silico* 분석을 통해 가장 안정적인 유전자인 외피단백질(CP)에서 염기서열 위치를 탐색하였음. 외피단백질 중 약 499 bp로 증폭할 수 있는 정밀 진단용 프라이머를 제작하였음. 상단 그림에서 검정색 박스로 프라이머의 위치를 표시하였음.

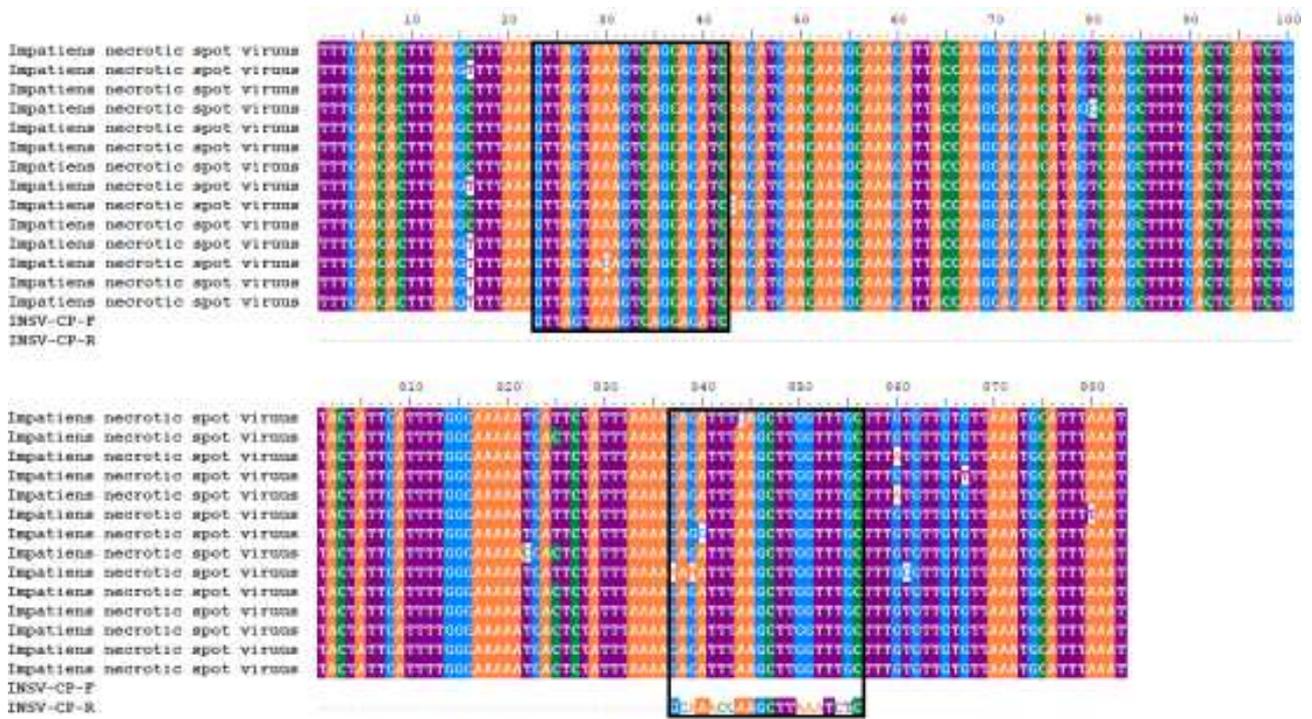


그림 17. *in silico* 분석을 통한 *Impatiens necrotic spot virus*(INSV) 개별 바이러스의 정밀 진단용 프라이머 위치 확인. 검정색 박스: 진단 프라이머 염기서열 위치. 전 세계에서 보고된 INSV의 염기서열들을 NCBI를 통해 확보하였으며, *in silico* 분석을 통해 가장 안정적인 유전자인 외피단백질(CP)에서 염기서열 위치를 탐색하였음. 외피단백질 중 약 833 bp로 증폭할 수 있는 정밀 진단용 프라이머를 제작하였음. 상단 그림에서 검정색 박스로 프라이머의 위치를 표시하였음.

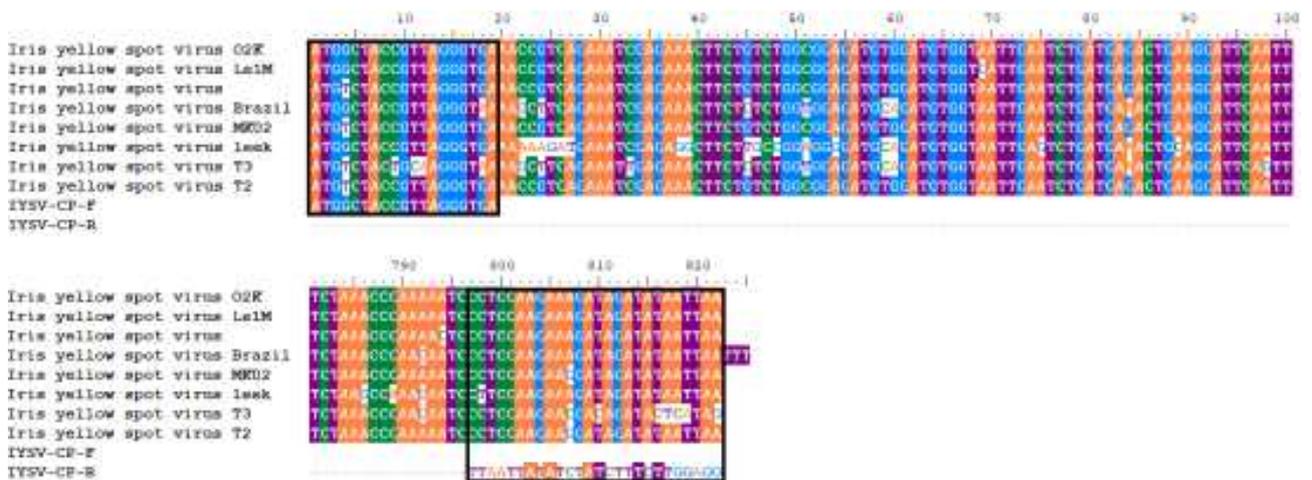


그림 18. *in silico* 분석을 통한 *Iris yellow spot virus*(IYSV) 개별 바이러스의 정밀 진단용 프라이머 위치 확인. 검정색 박스: 진단 프라이머 염기서열 위치. 전 세계에서 보고된 IYSV의 염기서열들을 NCBI를 통해 확보하였으며, *in silico* 분석을 통해 가장 안정적인 유전자인 외피단백질(CP)에서 염기서열 위치를 탐색하였음. 외피단백질 중 약 822 bp로 증폭할 수 있는 정밀 진단용 프라이머를 제작하였음. 상단 그림에서 검정색 박스로 프라이머의 위치를 표시하였음.

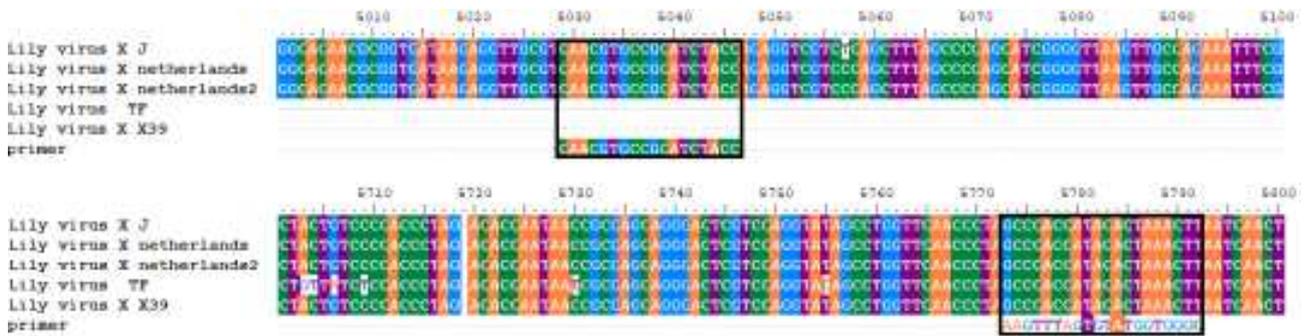


그림 19. *in silico* 분석을 통한 *Lily virus X*(LVX) 개별 바이러스의 정밀 진단용 프라이머 위치 확인. 검정색 박스: 진단 프라이머 염기서열 위치. 전 세계에서 보고된 LVX의 염기서열들을 NCBI를 통해 확보하였으며, *in silico* 분석을 통해 가장 안정적인 유전자인 외피단백질(CP)에서 염기서열 위치를 탐색하였음. 외피단백질 중 약 763 bp로 증폭할 수 있는 정밀 진단용 프라이머를 제작하였음. 상단 그림에서 검정색 박스로 프라이머의 위치를 표시하였음.

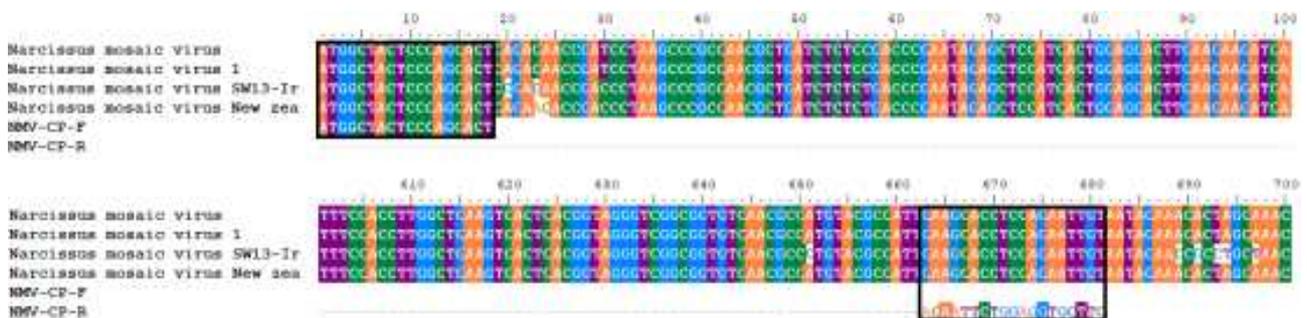


그림 20. *in silico* 분석을 통한 *Narcissus mosaic virus*(NMV) 개별 바이러스의 정밀 진단용 프라이머 위치 확인. 검정색 박스: 진단 프라이머 염기서열 위치. 전 세계에서 보고된 NMV의 염기서열들을 NCBI를 통해 확보하였으며, *in silico* 분석을 통해 가장 안정적인 유전자인 외피단백질(CP)에서 염기서열 위치를 탐색하였음. 외피단백질 중 약 681 bp로 증폭할 수 있는 정밀 진단용 프라이머를 제작하였음. 상단 그림에서 검정색 박스로 프라이머의 위치를 표시하였음.

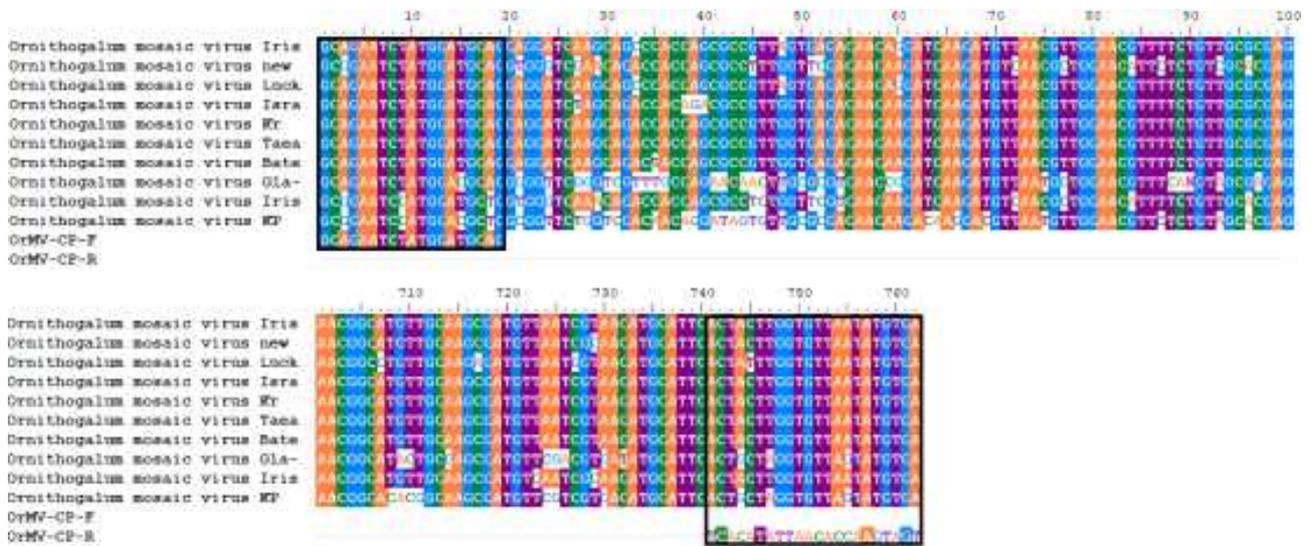


그림 21. *in silico* 분석을 통한 *Ornithogalum mosaic virus*(OrMV) 개별 바이러스의 정밀 진단용 프라이머 위치 확인. 검정색 박스: 진단 프라이머 염기서열 위치. 전 세계에서 보고된 OrMV의 염기서열들을 NCBI를 통해 확보하였으며, *in silico* 분석을 통해 가장 안정적인 유전자인 외피단백질(CP)에서 염기서열 위치를 탐색하였음. 외피단백질 중 약 762 bp로 증폭할 수 있는 정밀 진단용 프라이머를 제작하였음. 상단 그림에서 검정색 박스로 프라이머의 위치를 표시하였음.

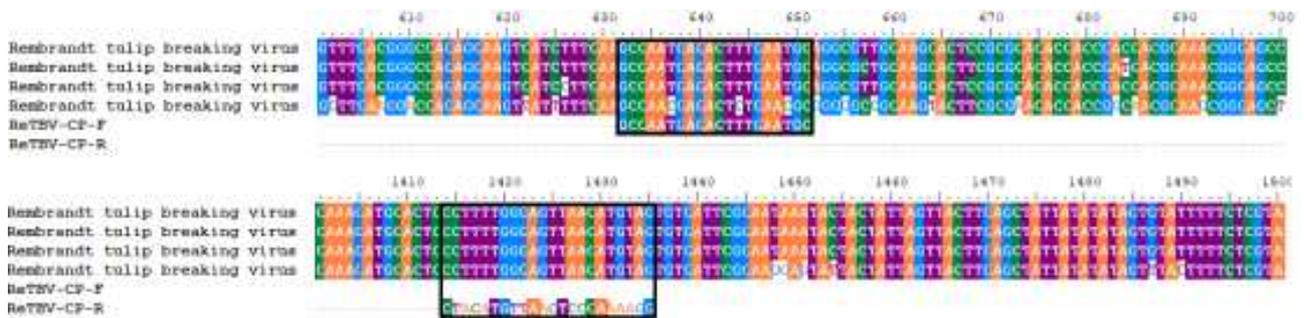


그림 22. *in silico* 분석을 통한 *Rembrandt tulip breaking virus*(ReTBV) 개별 바이러스의 정밀 진단용 프라이머 위치 확인. 검정색 박스: 진단 프라이머 염기서열 위치. 전 세계에서 보고된 ReTBV의 염기서열들을 NCBI를 통해 확보하였으며, *in silico* 분석을 통해 가장 안정적인 유전자인 외피단백질(CP)에서 염기서열 위치를 탐색하였음. 외피단백질 중 약 803 bp로 증폭할 수 있는 정밀 진단용 프라이머를 제작하였음. 상단 그림에서 검정색 박스로 프라이머의 위치를 표시하였음.

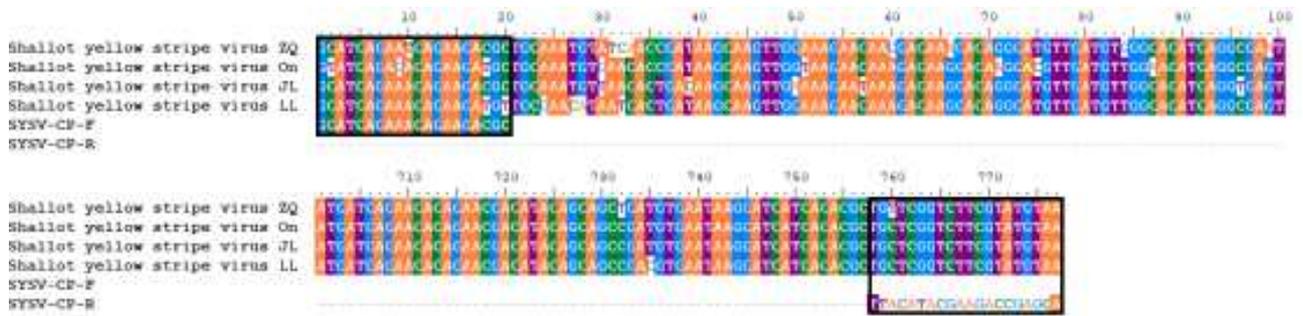


그림 23. *in silico* 분석을 통한 *Shallot yellow stripe virus*(SYSV) 개별 바이러스의 정밀 진단용 프라이머 위치 확인. 검정색 박스: 진단 프라이머 염기서열 위치. 전 세계에서 보고된 SYSV의 염기서열들을 NCBI를 통해 확보하였으며, *in silico* 분석을 통해 가장 안정적인 유전자인 외피단백질(CP)에서 염기서열 위치를 탐색하였음. 외피단백질 중 약 777 bp로 증폭할 수 있는 정밀 진단용 프라이머를 제작하였음. 상단 그림에서 검정색 박스로 프라이머의 위치를 표시하였음.

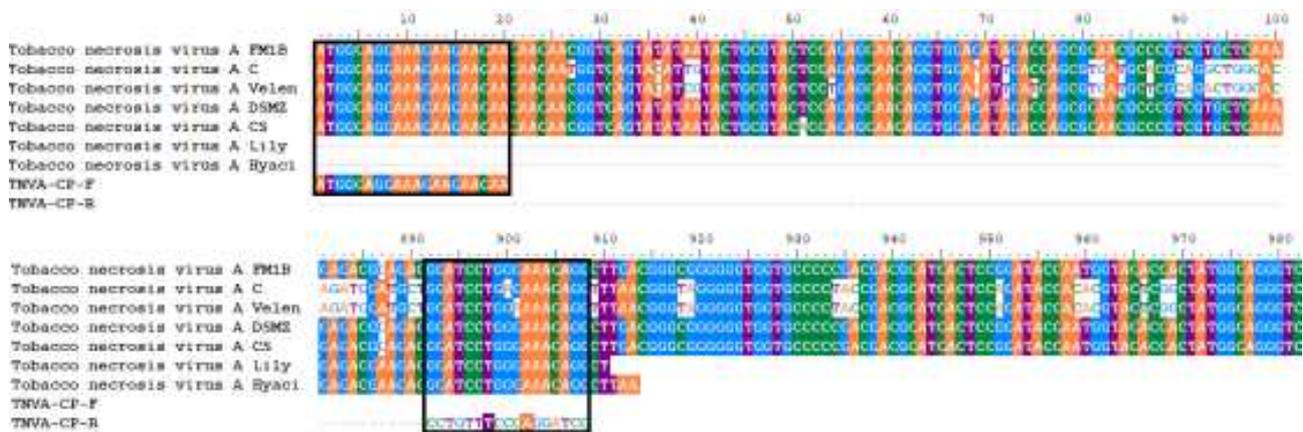


그림 24. *in silico* 분석을 통한 *Tobacco necrosis virus A*(TNVA) 개별 바이러스의 정밀 진단용 프라이머 위치 확인. 검정색 박스: 진단 프라이머 염기서열 위치. 전 세계에서 보고된 TNVA의 염기서열들을 NCBI를 통해 확보하였으며, *in silico* 분석을 통해 가장 안정적인 유전자인 외피단백질(CP)에서 염기서열 위치를 탐색하였음. 외피단백질 중 약 908 bp로 증폭할 수 있는 정밀 진단용 프라이머를 제작하였음. 상단 그림에서 검정색 박스로 프라이머의 위치를 표시하였음.

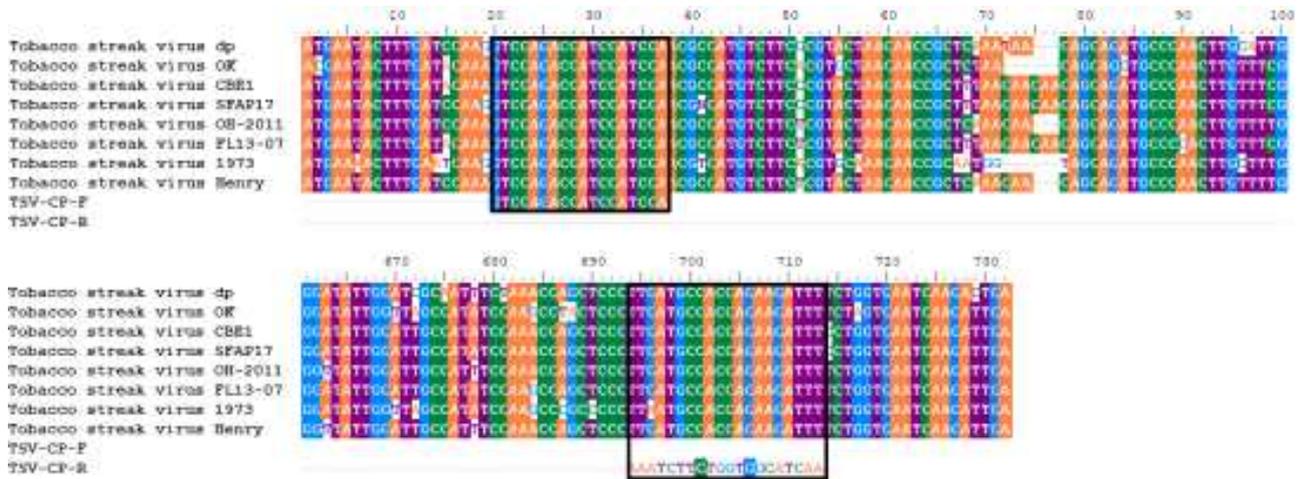


그림 25. *in silico* 분석을 통한 Tobacco streak virus(TSV) 개별 바이러스의 정밀 진단용 프라이머 위치 확인. 검정색 박스: 진단 프라이머 염기서열 위치. 전 세계에서 보고된 TSV의 염기서열들을 NCBI를 통해 확보하였으며, *in silico* 분석을 통해 가장 안정적인 유전자인 외피단백질(CP)에서 염기서열 위치를 탐색하였음. 외피단백질 중 약 693 bp로 증폭할 수 있는 정밀 진단용 프라이머를 제작하였음. 상단 그림에서 검정색 박스로 프라이머의 위치를 표시하였음.

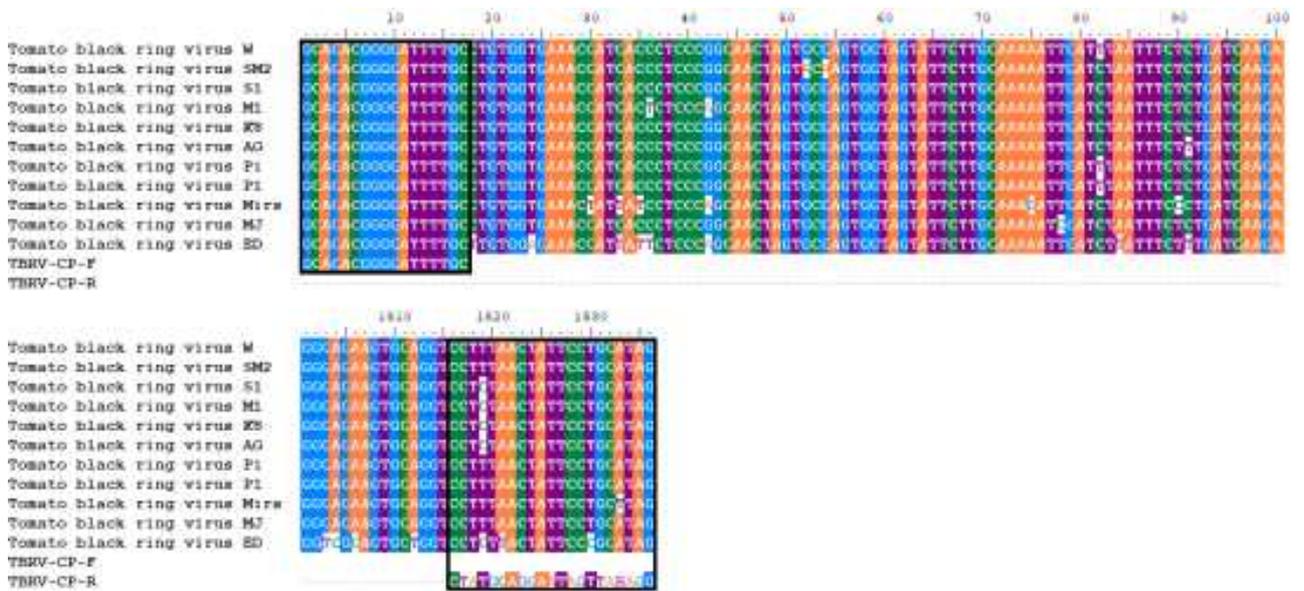


그림 26. *in silico* 분석을 통한 Tomato black ring virus(TBRV) 개별 바이러스의 정밀 진단용 프라이머 위치 확인. 검정색 박스: 진단 프라이머 염기서열 위치. 전 세계에서 보고된 TBRV의 염기서열들을 NCBI를 통해 확보하였으며, *in silico* 분석을 통해 가장 안정적인 유전자인 외피단백질(CP)에서 염기서열 위치를 탐색하였음. 외피단백질 중 약 1536 bp로 증폭할 수 있는 정밀 진단용 프라이머를 제작하였음. 상단 그림에서 검정색 박스로 프라이머의 위치를 표시하였음.

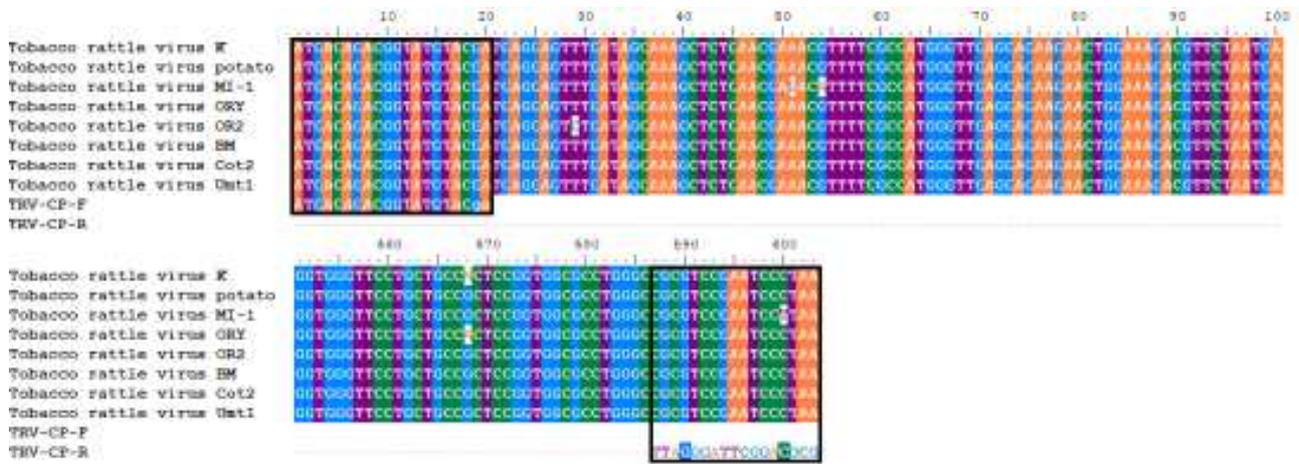


그림 27. *in silico* 분석을 통한 *Tobacco rattle virus*(TRV) 개별 바이러스의 정밀 진단용 프라이머 위치 확인. 검정색 박스: 진단 프라이머 염기서열 위치. 전 세계에서 보고된 TRV의 염기서열들을 NCBI를 통해 확보하였으며, *in silico* 분석을 통해 가장 안정적인 유전자인 외피단백질(CP)에서 염기서열 위치를 탐색하였음. 외피단백질 중 약 603 bp로 증폭할 수 있는 정밀 진단용 프라이머를 제작하였음. 상단 그림에서 검정색 박스로 프라이머의 위치를 표시하였음.

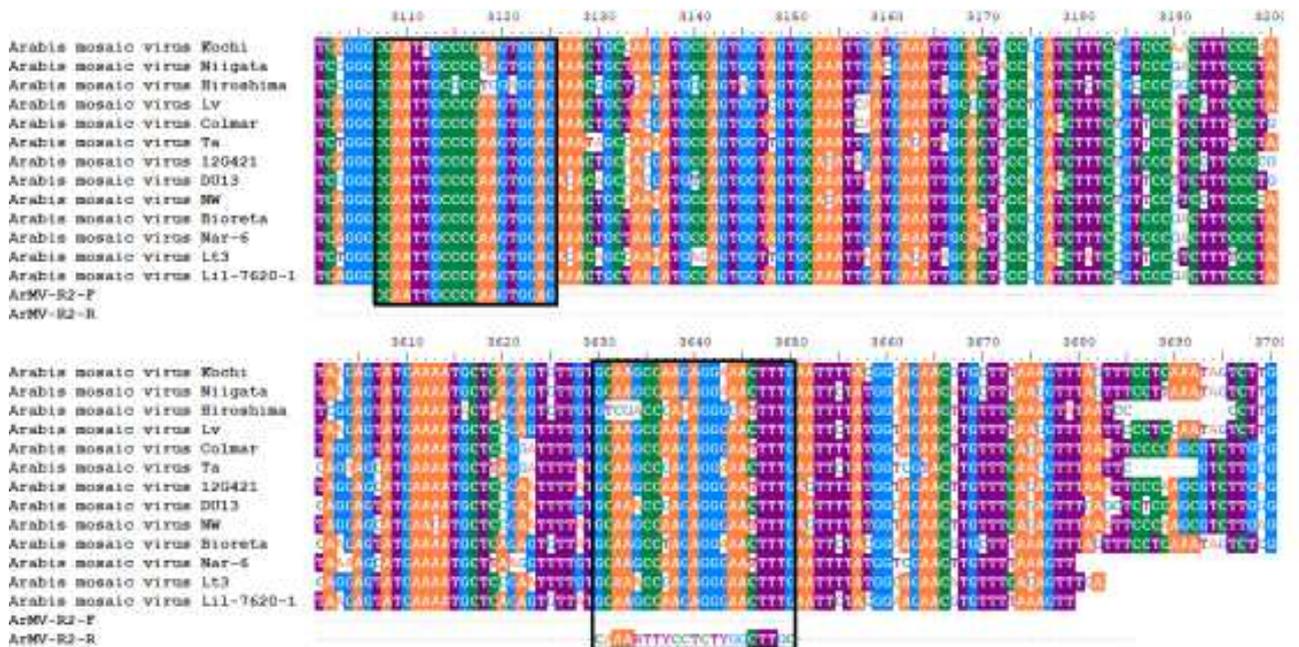


그림 28. *in silico* 분석을 통한 *Arabis mosaic virus*(ArMV) 개별 바이러스의 정밀 진단용 프라이머 위치 확인. 검정색 박스: 진단 프라이머 염기서열 위치. 전 세계에서 보고된 ArMV의 염기서열들을 NCBI를 통해 확보하였으며, *in silico* 분석을 통해 가장 안정적인 유전자인 외피단백질(CP)에서 염기서열 위치를 탐색하였음. 외피단백질 중 약 546 bp로 증폭할 수 있는 정밀 진단용 프라이머를 제작하였음. 상단 그림에서 검정색 박스로 프라이머의 위치를 표시하였음.

#### 4. 구근 화훼류별 바이러스 다중진단법 개발

- 바이러스별 개별진단법 조합을 이용한 구근별 다중진단법 개발
  - 대상 구근류 : 백합, 글라디올러스 등
  - 대상 바이러스 : 구근류별 주요 발생 바이러스
  - 개별 유전자진단법 기반 구근류별 최적 다중진단법 조합 선발
  - 백합에서 가장 많이 감염하는 것으로 확인된 *Cucumber mosaic virus*, *Lily mottle virus*, *Lily symptomless virus*, *Plantago asiatica mosaic virus* 총 4종의 바이러스를 대상으로 구근류별 최적의 다중진단법 조합을 선발하였음. 다중진단법의 2종의 바이러스, 3종의 바이러스와 4종의 바이러스의 조합에 맞춰 진단하는 다중진단법을 진행하였음. 2종의 바이러스에 대한 다중진단법은 LMoV+LSV, LMoV+PIAMV, LMoV+CMV, LSV+PIAMV, LSV+CMV, PIAMV+CMV이고, 3종의 바이러스에 대한 다중진단법은 LMoV+LSV+PIAMV, LMoV+LSV+CMV, LSV+PIAMV+CMV이고, 4종의 바이러스에 대한 다중진단법은 LMoV+LSV+PIAMV+CMV를 나타냄(그림 29).

표 5. 백합 주요 바이러스에 대한 다중진단법 개발<sup>a</sup>

바이러스	프라이머 이름	서열 (5'→3')	사이즈 (bp)
<i>Cucumber mosaic virus</i>	CMV_R3_1787_F	CTGATATAGGTGACATGAGAAAGTACGCCG	280
	CMV_R3_2039_F	GACTGACCATTTTAGCCGTAAGCTGGATGG	
<i>Lily mottle virus</i>	LMoV_CP_633_F	TGAAGTTACTTCACGACAGCCAGCACGGCG	150
	LMoV_CP_785_R	ACATCATCTGCTGTATGCCTCTCCGTGTCC	
<i>Lily symptomless virus</i>	LSV_CP_523_F	AAGCACGCTGGACTGCGGAAAGTCTGCCGG	200
	LSV_CP_731_R	TCAGCAGAAGTGGGTGCGCTGATGATCCCC	
<i>Plantago asiatica mosaic virus</i>	PIAMV_5677_F	AACGCCCGGCTTAGAAATCTCCCACCG	240
	PIAMV_5923_R	TGAACTGGGTGGAGGTTGAGGCTAGGTTGG	

<sup>a</sup> 백합 바이러스의 개별진단법 프라이머간에 간섭없이 효과적으로 4종 바이러스를 다중진단 할 수 있는 프라이머 조합을 선별함.

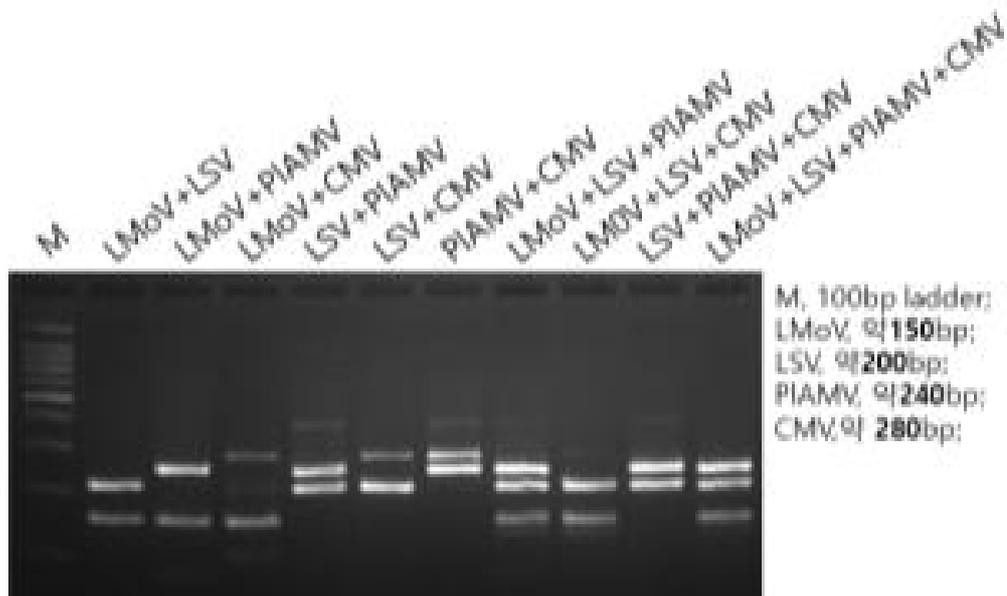


그림 29. 백합에 감염하는 바이러스 4종에 대한 다중진단법 개발. 다중진단법 실시 결과, 2종에 대한 다중진단법은 모두 정확하게 검정된 것을 확인함. 하지만, 3종과 4종에 대한 다중진단법은 LMoV+LSV+PIAMV외에는 한 종에 대한 검정이 되지 않는 것을 확인할 수 있음.

- 글라디올러스에 주요 감염한다고 확인된 바이러스인 *Bean yellow mosaic virus*, *Lily mottle virus*, *Cucumber mosaic virus* 3 종에 대한 다중진단법을 개발하였음. 다중진단법의 2종의 바이러스, 3종의 바이러스와 4종의 바이러스의 조합에 맞춰 진단하는 다중진단법을 진행하였음. 2종의 바이러스에 대한 다중진단법은 BYMV+CMV, BYMV+LMoV, LMoV+CMV, 3종의 바이러스에 대한 다중진단법은 BYMV+LMoV+CMV를 나타냄.

표 6. 글라디올러스 주요 바이러스에 대한 다중진단법 개발<sup>a</sup>

바이러스	프라이머이름	서열(5'→3')	사이즈 (bp)
<i>Bean yellow mosaic virus</i>	BYMV-343-F	AGCCAACATTCCGCCAAATAAT	343
	BYMV-343-R	CTCTAAATACGAACACCAAGCA	
<i>Lily mottle virus</i>	LMoV-570-F	AAGGGGCGAATGATAGTGAAC	570
	LMoV-570-R	TATGCCTCTCCGTGTCCTCATC	
<i>Cucumber mosaic virus</i>	CMV_R3_1787_F	CTGATATAGGTGACATGAGAAAGTACGCCG	280
	CMV_R3_2039_F	GACTGACCATTTTAGCCGTAAGCTGGATGG	

<sup>a</sup> 글라디올러스 바이러스의 개별진단법 프라이머간에 간섭없이 효과적으로 4종 바이러스를 다중진단할 수 있는 프라이머 조합을 선별함.

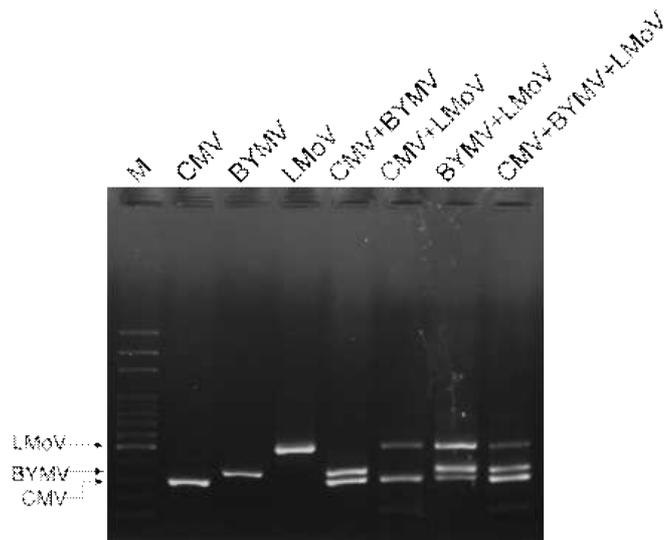


그림 30. 글라디올러스에 감염하는 바이러스 4종에 대한 다중진단법 개발. 다중진단법 실시 결과, 각각의 바이러스에 대한 단일검정은 용이하나, BYMV와 LMoV의 다중검정에 대한 정확도가 떨어지는 것으로 사료됨.

## 5. 백합, 글라디올러스 등 전사체 분석을 통하여 바이러스 탐색 및 동정

- 글라디올러스와 백합에서의 전사체 분석을 하기 위해 글라디올러스 잎, 백합 잎 (병징에 따라 2개의 샘플로 나뉨)의 total RNA를 추출하여 *De novo* transcriptome assembly를 진행하였음 (표 7).

표 7. 백합과 글라디올러스에서의 *De novo* transcriptome assembly 결과<sup>a</sup>

샘플	Transcripts 수	Transcripts의 길이 (bp)				
		Sum. of bp	Min	Max	Aver.	N50
Gladiolus_leaf	64,756	74,289,447	500	26,206	1,147	1,324
Lily_mild_sym	55,416	60,469,539	500	32,606	1,091	1,243
Lily_severe_sym	148,692	147,436,960	500	18,561	991	1,034

<sup>a</sup> 글라디올러스에서는 총 64,756개의 transcripts가 확인이 되었으며, 백합은 병징에 따라 나뉨 2개의 샘플들이 각각 55,416개의 transcripts와 148,692개의 transcripts가 확인되었음. 백합의 결과, 병징에 따라 확인된 전사체 수가 약 3배 이상 차이를 보이는 것을 확인하였음.

표 8. 클라디올러스 앞에서 annotation된 바이러스<sup>a</sup>

Species	No. of genes	Total read count
<i>Papaya mosaic virus</i>	2	15,082,101
<i>White spot syndrome virus</i>	8	14,008,063
<i>Pittosporum cryptic virus-1</i>	1	10,538,959
<i>Bean yellow mosaic virus</i>	5	2,402,197
<i>Cowpea polerovirus 2</i>	1	2,046,614
<i>Narcissus latent virus</i>	1	1,117,277
<i>Ornithogalum mosaic virus</i>	1	630,717
<i>Dickeya phage phiDP10.3</i>	16	602,565
<i>Stealth virus 1</i>	5	115,298
<i>Bat vircovirus POA/2012/V</i>	1	57,325
<i>Grapevine associated narnavirus-1</i>	1	41,213
<i>Moraxella phage Mcat16</i>	2	23,269
<i>Soybean leaf-associated endornavirus 1</i>	1	22,707
<i>Dickeya phage phiDP23.1</i>	1	18,920
<i>Bovine viral diarrhea virus 1</i>	1	9,244
<i>Botrytis virus F</i>	3	8,928
<i>Escherichia phage sp.</i>	1	8,341
<i>Bat SARS-like coronavirus</i>	17	4,006
<i>Sclerotinia sclerotiorum umbra-like virus 3</i>	1	3,039
<i>uncultured hypovirus</i>	2	1,074
<i>Cucumber mosaic virus</i>	4	893
<i>Alternaria alternata chrysovirus 1</i>	1	750
<i>Guanarito mammarenavirus</i>	1	333
<i>Phage21</i>	1	295
<i>Tomato spotted wilt tospovirus</i>	1	215
<i>Sclerotinia nivalis nitovirus 1</i>	2	209
<i>Klebsiella phage ST13-OXA48phi12.1</i>	1	200
<i>Erwinia phage ENT90</i>	1	183
<i>BtRs-BetaCoV/YN2013</i>	1	176
<i>Human gammaherpesvirus 4</i>	2	140
<i>Proteus phage VB_Pmis-Isfahan</i>	1	102
<i>Klebsiella phage ST16-OXA48phi5.1</i>	1	80
<i>Botrytis cinerea mitovirus 1</i>	1	75
<i>Botrytis cinerea mitovirus 3</i>	2	72
<i>Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 3</i>	1	64
<i>Lily symptomless virus</i>	1	34
<i>Soybean leaf-associated motovirus 2</i>	1	30
<i>Botrytis vinerea mitovirus 1 S</i>	1	30
<b>Total</b>	<b>95</b>	<b>46,745,738</b>

<sup>a</sup> 클라디올러스 앞에서 *De novo* transcriptome assembly 확인 결과, papaya mosaic virus가 15,082,101로 가장 많은 read수를 보였으며, 그 뒤로 pittosporum cryptic virus-1, Bean yellow mosaic virus, Cowpea polerovirus 2, Narcissus latent virus, Ornithogalum mosaic virus 등의 식물 바이러스가 확인되었음.

표 9. 백합(mild)앞에서 annotation된 바이러스<sup>a</sup>

Species	No. of genes	Total read count
<i>Cucumber mosaic virus</i>	5	15,618,754
<i>Lily symptomless virus</i>	5	9,694,889
<i>Lily mottle virus</i>	13	626,626
<i>Lily virus A</i>	5	339,620
<i>Stealth virus 1</i>	1	267,175
<i>White spot syndrome virus</i>	4	59,005
<i>Pittosporum cryptic virus-1</i>	1	13,832
<i>Citrus exocortis Yucatan viroid</i>	1	3,096
<i>Dickeya phage phiDP10.3</i>	3	502
<i>Proteus phage VB_PmiS-Isfahan</i>	1	450
<i>Hepatitis B virus</i>	1	388
<i>Guanarito mammarenavirus</i>	1	370
<i>Dickeya phage phiDP23.1</i>	1	239
<i>Bat SARS-like coronavirus</i>	3	238
<i>Dahlia mosaic virus</i>	1	66
<b>total</b>	<b>46</b>	<b>26,625,250</b>

<sup>a</sup> 병징이 약한 백합에서의 *De novo* transcriptome assembly 확인 결과, Cucumber mosaic virus가 15,618,754로 가장 많은 read수를 보였으며, 그 뒤로 lily symptomless virus, Lily mottle virus, Lily virus A 등의 식물 바이러스가 확인되었음.

표 10. 백합(severe)앞에서 annotation된 바이러스 확인<sup>a</sup>

Species	No. of genes	Total read count
<i>Cucumber mosaic virus</i>	9	20,145,332
<i>Lily symptomless virus</i>	6	6,997,793
<i>Stealth virus 1</i>	2	1,249,331
<i>Cucumber mosaic virus satellite RNA</i>	1	416,629
<i>Soybean leaf-associated endornavirus 1</i>	1	408,553
<i>Lily virus A</i>	4	318,876
<i>Lily mottle virus</i>	7	314,614
<i>White spot syndrome virus</i>	2	3,375
<i>Pittosporum cryptic virus-1</i>	1	1,892
<i>Dickeya phage phiDP10.3</i>	3	1,260
<i>Dahlia mosaic virus</i>	2	1,168
<i>Dickeya phage phiDP23.1</i>	1	221
<i>Guanarito mammarenavirus</i>	1	209
<i>Bat SARS-like coronavirus</i>	3	138
<i>Moraxella phage Mcat16</i>	1	132
<i>Proteus phage VB_PmiS-Isfahan</i>	1	59
<b>total</b>	<b>45</b>	<b>29,859,582</b>

<sup>a</sup> 병징이 강한 백합에서의 *De novo* transcriptome assembly 확인 결과, 병징이 약했던 백합에서의 결과와 마찬가지로 Cucumber mosaic virus가 20,145,332로 가장 많은 read수를 보였으며, 그 뒤로 lily symptomless virus, Lily mottle virus, Lily virus A 등의 식물 바이러스가 확인되었음. 또한 병징이 약한 백합에서는 확인되지 않았던 Cucumber mosaic virus satellite RNA가 416,629의 read수가 확인되었음.

- 백합과 글라디올러스에서 RT-PCR 결과 이외에 *De novo transcriptome assembly*로 확인된 바이러스를 확인하고자, 백합과 글라디올러스 *De novo transcriptome assembly* 결과에서 각각 read 수가 높은 바이러스들을 선별하여 RT-PCR용 바이러스 확인 프라이머를 제작하였음.

표 11. *De novo transcriptome assembly*로 확인된 글라디올러스 바이러스 확인용 프라이머 제작<sup>a</sup>

바이러스	프라이머이름	서열(5'→3')	사이즈 (bp)
<i>Papaya mosaic virus</i>	PapMV-CP-F	ATGTCTAAGTCAAGTATGTCCACACC	678
	PapMV-CP-R	TAGTGCTAAACAACGGGCTGG	
<i>Pittosporum cryptic virus-1</i>	PiCV1-(364)-F	ACTCGCACACA ACTAACGGATCT	364
	PiCV1-(364)-R	GCCACCTTCTTATGGATGAACAAT	
<i>Cowpea polerovirus 2</i>	CPPV2-CP-F	ATGAATTCGGCAGGGGTCCGTAA	680
	CPPV2-CP-R	GAATTTCTTGCACGGCTGTGGATC	
<i>NArcissus latent virus</i>	NLV-CP-Partial-F	GTTTGTTACATGGACCCATGTCAG	580
	NLV-CP-Partial-R	TTGTTAGCGCACCAAATGCACCAA	
<i>Ornithogalum mosaic virus</i>	OrMV-CP-F	GCAGAATCTATGGATGCAG	762
	OrMV-CP-R	TCACATATTAACACCAAGTAGT	

<sup>a</sup> NCBI GenBank에 등록된 염기서열과 메타전사체 분석을 통하여 확보한 염기서열을 이용하여 종 특이적으로 반응하는 프라이머를 설계하였음.

표 12. *De novo transcriptome assembly*로 확인된 백합 바이러스 확인용 프라이머 제작<sup>a</sup>

바이러스	프라이머이름	서열(5'→3')	사이즈 (bp)
<i>Lily virus A</i>	LVA-CP-F	GCCAATGAGACTCTGAACGCG	800
	LVA-CP-R	CACTCCCTTTTGGGAGTTAACATG	
<i>Pittosporum cryptic virus-1</i>	PiCV1-(364)-F	ACTCGCACACA ACTAACGGATCT	364
	PiCV1-(364)-R	GCCACCTTCTTATGGATGAACAAT	

<sup>a</sup> NCBI GenBank에 등록된 염기서열과 메타전사체 분석을 통하여 확보한 염기서열을 이용하여 종 특이적으로 반응하는 프라이머를 설계하였음.

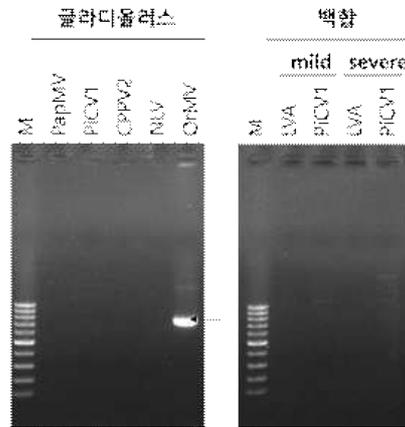


그림 30. *De novo* transcriptome assembly로 확인된 글라디올러스와 백합 바이러스 RT-PCR 검정. 글라디올러스와 백합 각각의 샘플에서 RT-PCR로 확인된 바이러스 외에 *De novo* transcriptome assembly로 read 수가 높은 식물바이러스들을 확인하기 위한 프라이머를 제작하였음. 글라디올러스는 PapMV, PicV1, CPPV2, NLV, OrMV를 RT-PCR 검정하였으며, 백합은 LVA와 PicV1을 검정하였음. RT-PCR 검정 결과, 글라디올러스에서 OrMV만 바이러스가 확인되었음.

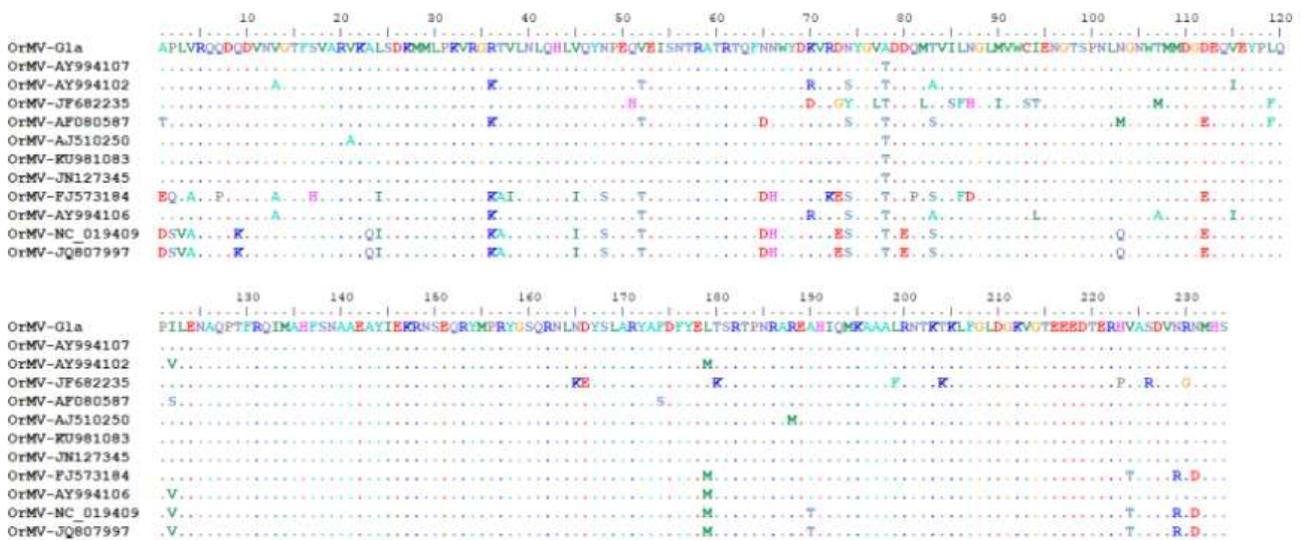


그림 31. *De novo* transcriptome assembly로 확인된 OrMV 유전자 alignment. 글라디올러스에서 *De novo* transcriptome assembly로 확인된 OrMV를 다시 RT-PCR로 확인하였으며, 확인된 OrMV의 외피단백질을 아미노산 수준에서 alignment 하였음. 다양한 작물에서 분리된 OrMV들과 글라디올러스에서 확인된 OrMV의 외피단백질이 아미노산 수준에서 매우 유의한 차이가 있는 것을 확인하였음.

## 5. 바이러스 염기서열 분석을 통한 확진 기술 개발

○ 변종 및 신종 바이러스의 염기서열 분석 및 정보 획득(그림 32-35)



그림 32. 백합 시료에서 검정된 *Rembrandt tulip breaking virus*의 서열 비교. 3개의 시료에서 *Rembrandt tulip breaking virus*(ReTBV)의 검정이 확인되어 sequencing을 통해 바이러스 서열을 결정하였음. 국내 보고가 되어있지 않은 새로운 종이 국내에서 백합에 감염하는 것은 확인하였음. 또한 다양한 한 개체 이상의 다종의 백합에서 감염됨을 확인하였음.

○ 바이러스 종간 및 종내 변이 및 유연관계 분석

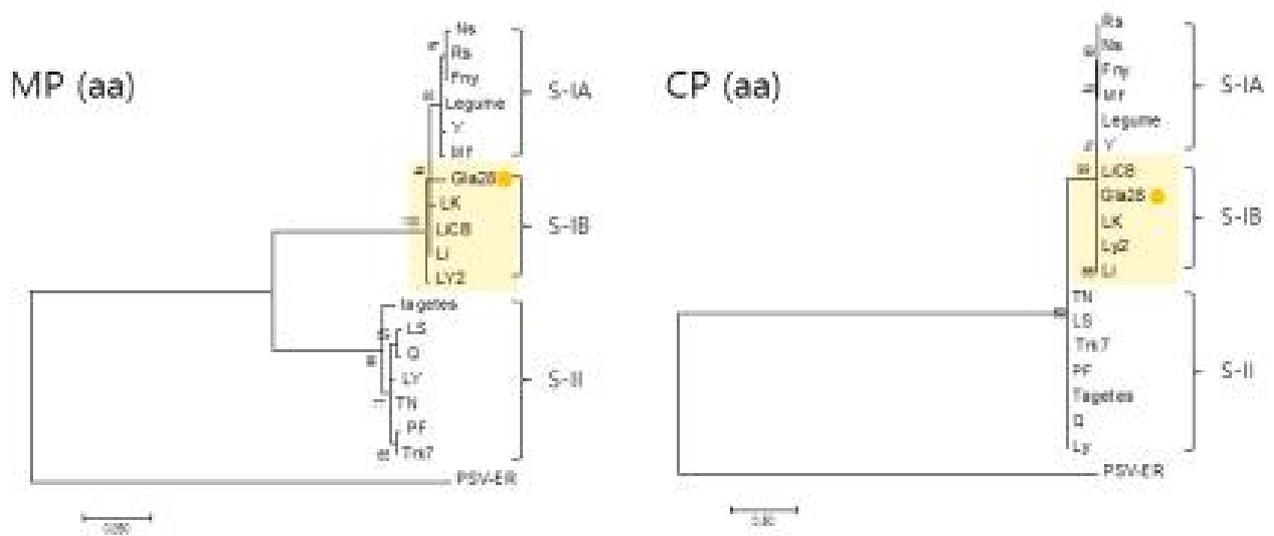


그림 33. 글라디올러스에서 검정된 *Cucumber mosaic virus*(CMV)의 이동단백질(MP)과 외피단백질(CP)에 대한 아미노산 수준의 계통도 분석. 글라디올러스에서 *Cucumber mosaic virus*(CMV)의 감염을 확인하였고, 기주범위가 넓고 다양한 서브 그룹(서브 그룹 IA, IB, II)을 가진 CMV 내에서의 글라디올러스 분리 CMV의 유연관계를 분석하였음. 이동 단백질(MP)과 외피단백질(CP)의 아미노산 수준에서의 계통도를 분석한 결과, 두 단백질 모두 서브 그룹 IB에 속하는 것을 확인할 수 있었으며, 백합에서 분리된 CMV들과 매우 가까운 유연관계를 가지는 것을 확인하였음. 노란 동그라미는 글라디올러스에서 새로 확인한 CMV를 나타냄.

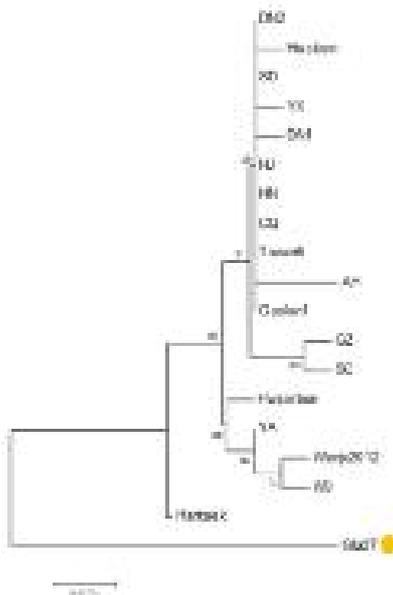


그림 34. 글라디올러스에서 검정된 *Lily mottle virus*(LMoV)의 외피단백질(CP)에 대한 아미노산 수준의 계통도 분석. 글라디올러스에서 *Lily mottle virus*(LMoV)의 감염을 국내 최초로 확인하였고, 다양하게 보고된 LMoV 내에서 글라디올러스 분리 LMoV의 유연관계를 분석하였음. 외피단백질(CP)의 아미노산 수준에서의 계통도를 분석한 결과, 대부분의 LMoV들과 매우 거리가 먼 유연관계를 가지는 것을 확인하였음. 노란 동그라미는 글라디올러스에서 새로 확인한 LMoV를 나타냄.

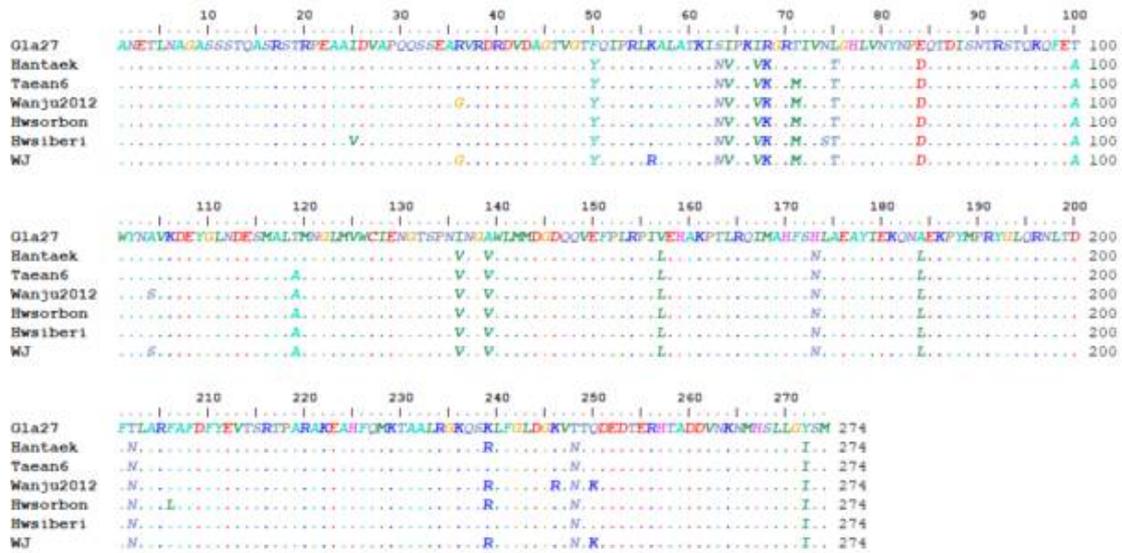


그림 35. 글라디올러스에서 검정된 LMoV과 국내에서 보고된 LMoV들의 외피단백질(CP)의 아미노산 서열 비교. 글라디올러스에서 새로 분리한 LMoV가 다른 LMoV들과 먼 유연관계를 보였기 때문에, 국내에서 보고되었던 LMoV들과 외피단백질의 아미노산 염기서열을 비교 분석하였음. 국내에서 보고된 LMoV들은 공통적으로 유사한 서열을 가지고 있으나, 글라디올러스에서 새로 분리한 LMoV는 그와는 다른 서열을 가지는 것을 확인하였음.

### 6. 현장현시 진단(POC)용 바이러스 항원 생산

- 증식된 바이러스 시료를 이용한 항원 단백질 획득
  - 백합에 가장 많이 감염하는 바이러스인 CMV, LMoV와 PIAMV의 항원 단백질을 획득하기 위해, 검정된 CMV, LMoV와 PIAMV를 T/A cloning vector에 ligation 하여 단백질 생산하기 위한 유전자를 클로닝 하였음(그림 36-42).
  - 생산한 항원 단백질은 제3 공동연구기관(포스트바이오)에 전달하여 특이항체를 생산하고자 함.

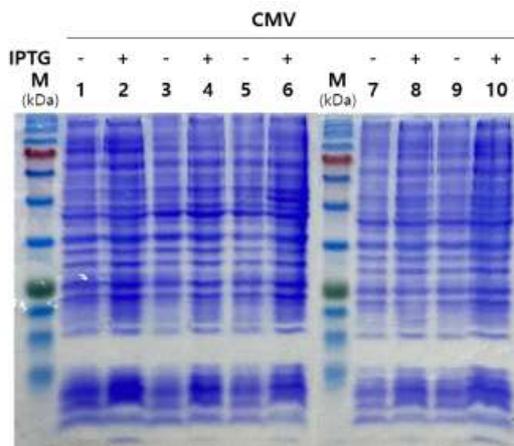


그림 36. CMV의 외피단백질을 T/A cloning vector에 삽입한 뒤, IPTG 유도 발현. 검정된 CMV의 외피단백질을 T/A cloning vector에 ligation하여 외피단백질을 보존하는 클로닝 벡터를 제작하였음. CMV의 외피단백질을 단백질 발현 전용 벡터에 삽입하기 전, IPTG 유도발현을 통해 단백질의 발현을 확인하였음. IPTG 유도 발현하지 않은 단백질과 유도 발현한 단백질을 SDS-PAGE를 통하여 분석하였음.

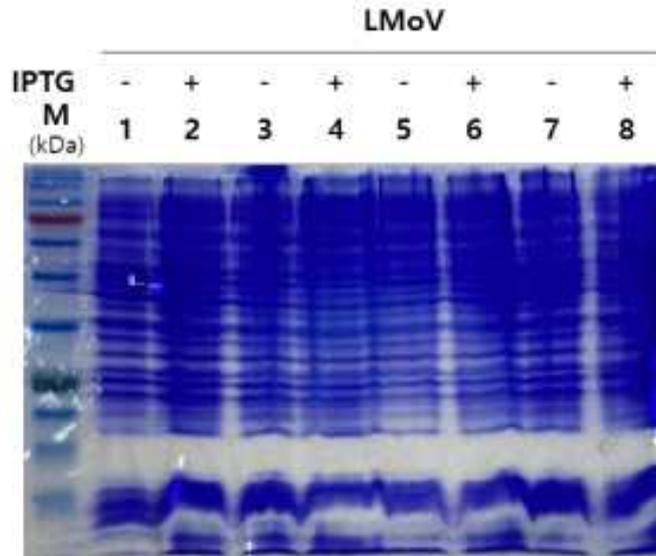


그림 38. LMoV의 외피단백질을 T/A cloning vector에 삽입한 뒤, IPTG 유도 발현. 검정된 LMoV의 외피단백질을 T/A cloning vector에 ligation하여 외피단백질을 보존하는 클로닝 벡터를 제작하였음. LMoV의 외피단백질을 단백질 발현 전용 벡터에 삽입하기 전, IPTG 유도발현을 통해 단백질의 발현을 확인하였음. IPTG 유도 발현하지 않은 단백질과 유도발현한 단백질을 SDS-PAGE를 통하여 분석하였음.

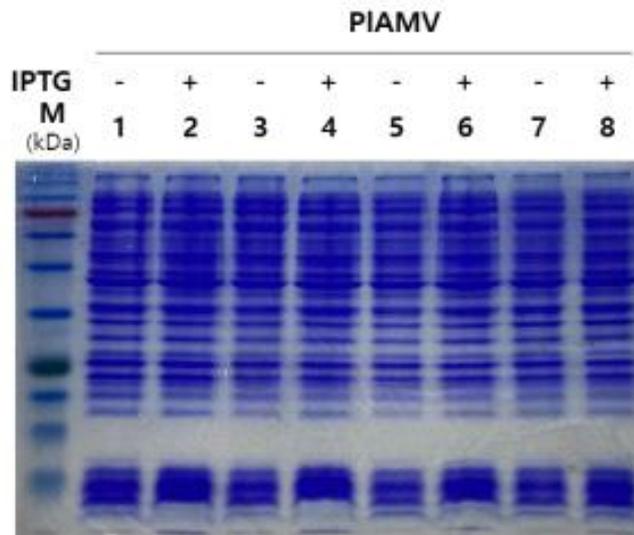


그림 39. PIAMV의 외피단백질을 T/A cloning vector에 삽입한 뒤, IPTG 유도 발현. 검정된 LMoV의 외피단백질을 T/A cloning vector에 ligation하여 외피단백질을 보존하는 클로닝 벡터를 제작하였음. LMoV의 외피단백질을 단백질 발현 전용 벡터에 삽입하기 전, IPTG 유도발현을 통해 단백질의 발현을 확인하였음. IPTG 유도 발현하지 않은 단백질과 유도발현한 단백질을 SDS-PAGE를 통하여 분석하였음.

○ 클로닝 벡터 시스템을 통한 바이러스 항원 단백질 생산

- 글라디올러스와 백합 모두에서 바이러스가 확인된 CMV와 LMoV의 항원을 생산하기 위해 단백질발현벡터인 pET21a(+)에 클로닝을 진행하였음. 유전자는 모두 외피단백질을 타겟으로 클로닝을 진행하였으며, HIS를 붙여서 정제하기 쉽게 제작하였음.

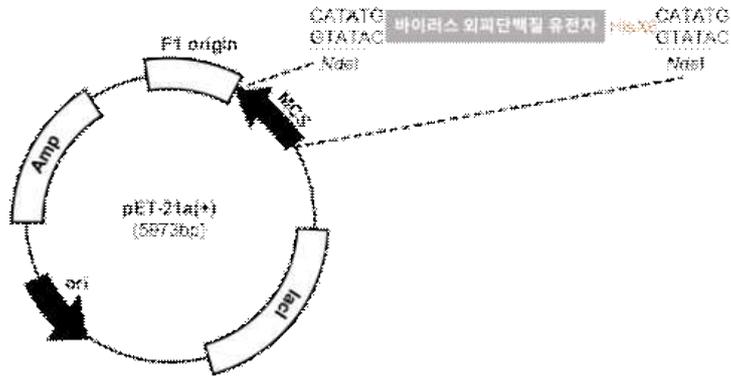


그림 40. 단백질 발현 벡터 pET21a(+)에 바이러스 외피단백질 유전자 삽입 모식도. 단백질 발현 벡터인 pET21a(+) vector에 삽입하여 외피단백질을 발현하는 벡터를 제작하였음.

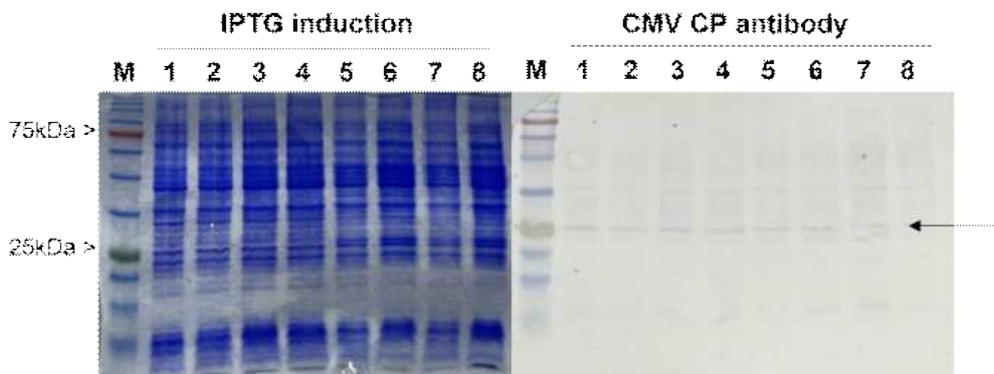


그림 41. Western blot assay를 통한 CMV CP 발현 벡터의 단백질 발현 확인. 확인된 CMV의 외피 단백질을 단백질 발현 벡터인 pET21a(+) vector에 삽입하여 외피단백질을 발현하는 벡터를 제작하였음. 단백질 발현 벡터에 CMV 외피단백질을 삽입 후, IPTG 유도발현을 시켜 SDS-PAGE gel상에서 단백질을 확인하였으며, western blot assay를 통해 CMV의 외피단백질이 발현되는 것을 확인하였음.

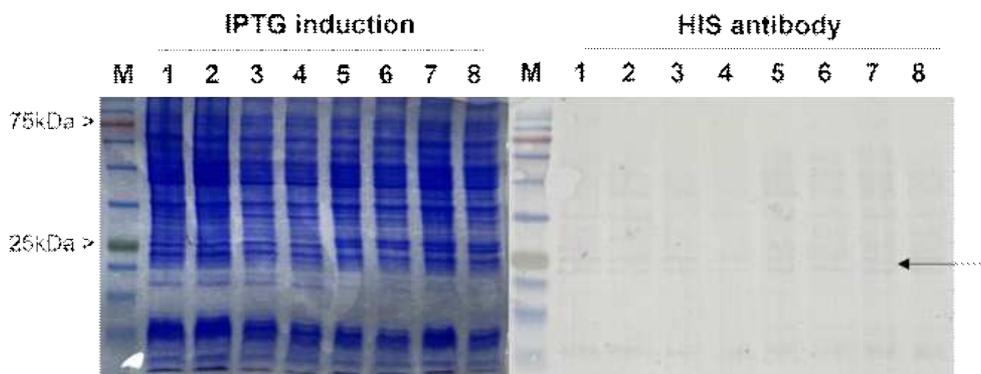


그림 42. Western blot assay를 통한 CMV와 LMoV CP 발현 벡터의 단백질 발현 확인. 확인된 CMV와 LMoV의 외피단백질을 단백질 발현 벡터인 pET21a(+) vector에 삽입하여 외피단백질을 발현하는 벡터를 제작하였음. 단백질 발현 벡터에 CMV와 LMoV 외피단백질을 삽입 후, IPTG 유도 발현을 시켜 SDS-PAGE gel상에서 단백질을 확인하였음. 또한, western blot assay를 벡터 내에 달려있는 HIS 서열의 antibody를 사용하여 CMV와 LMoV의 외피단백질이 발현되는 것을 확인하였음.

7. 백합, 글라디올러스 등 구근 화훼류 바이러스 발생실태 조사

○ 구근 화훼류별 주요 바이러스 발생실태 분석

- RT-PCR 검정 결과를 기반으로 백합 바이러스의 감염양상을 분석하였음(그림 43-47).



그림 43. 백합과 글라디올러스의 채집. 분석에 필요한 시료는 강원도를 중심으로 채집하였는데, 백합은 주로 강원도 춘천과 원주에서 채집하였으며, 글라디올러스는 강원도 춘천과 원주, 충청남도 태안과 충청북도 제천에서 채집하였음.

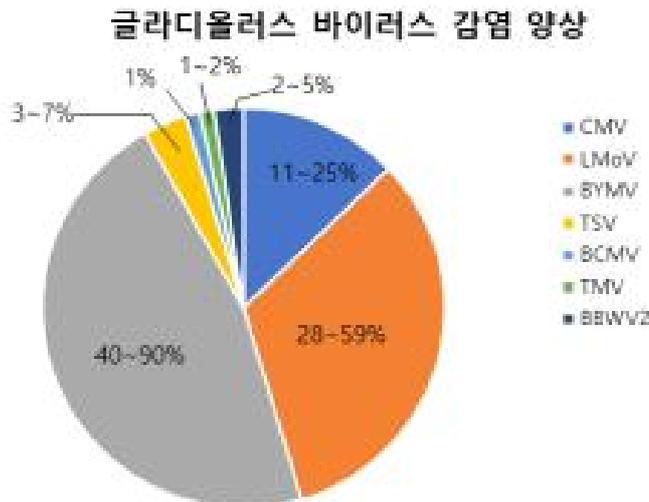


그림 44. 글라디올러스의 개별진단법을 통한 바이러스 감염 양상 그래프. 채집한 글라디올러스의 개별진단법을 통하여 21종의 바이러스에 대한 감염 양상을 RT-PCR 검정을 통해 확인해 봤을 때, 7종의 바이러스(BYMV, LMoV, CMV, TSV, BBWV2, TMV, BCMV) 감염하는 것을 확인하였음. 감염 양상은 BYMV가 글라디올러스에서 약 40~90%로 가장 우점하는 바이러스임을 확인할 수 있었고, 그 다음으로 국내에서 보고되지 않았던 LMoV가 28~59%로 높은 감염 양상을 보였음. 이에 따라 국내에서는 글라디올러스 재배지 내 BYMV나 LMoV에 대한 방제를 할 필요가 있을 것으로 사료됨.

### 글라디올러스 주요바이러스 복합감염 양상

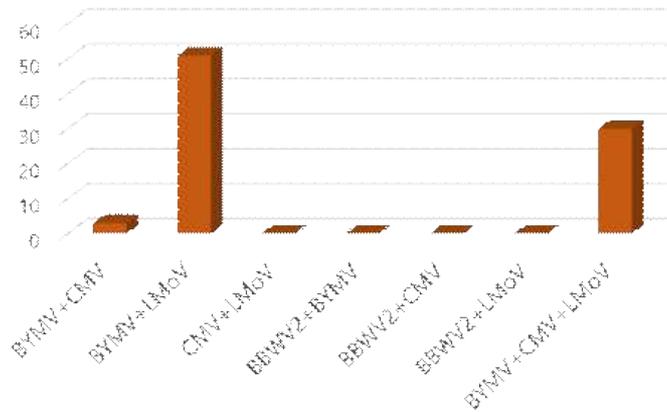


그림 45. 글라디올러스의 개별진단법을 통한 바이러스 복합감염 양상 그래프. 채집한 글라디올러스의 개별진단법을 통하여 21종의 바이러스에 대한 단일감염 양상을 RT-PCR 검정을 통해 확인하였으며, 그 결과를 활용하여 바이러스의 복합감염 양상을 확인함. 주요 바이러스인 BYMV, LMoV, CMV 그리고 BBWV2에 대해 복합감염 양상을 확인하였음. 2종의 바이러스의 복합감염 결과, BYMV와 LMoV의 혼합감염률이 가장 높은 것을 보였으며, 나머지의 복합감염은 미미한 결과를 보였음. 3종은 BYMV, CMV와 LMoV만 확인되었음. 3종의 바이러스가 복합감염된 결과도 BYMV와 LMoV 두 종이 복합감염된 결과와 비슷한 양상을 나타냄.

### 백합 바이러스 감염 양상

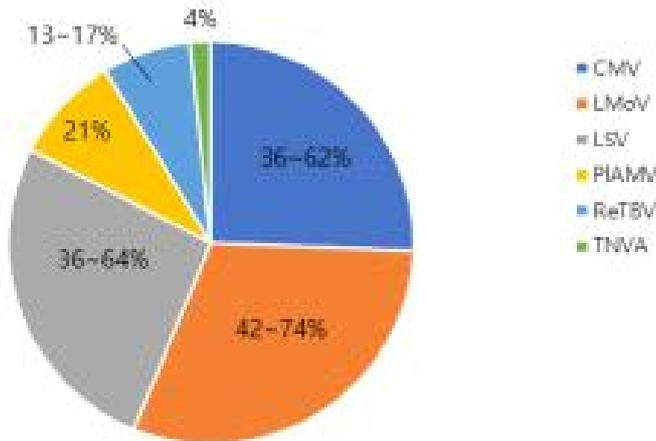


그림 46. 백합의 개별진단법을 통한 바이러스 감염 양상 그래프. 채집한 백합의 개별진단법을 통하여 22종의 바이러스에 대한 감염 양상을 RT-PCR 검정을 통해 확인해 봤을 때, 6종의 바이러스(LMoV, LSV, CMV, PIAMV, ReTBV, TNVA)가 감염하는 것을 확인하였음. 감염 양상은 LMoV가 백합에서 42~74%로 가장 우점하는 바이러스임을 확인할 수 있었고, 그 다음으로 LSV와 CMV가 비슷한 양상으로 감염하고 있음. 또한, 국내에서 보고되지 않았던 ReTBV가 약 21%의 감염 양상을 보였음. 이에 따라 국내에서는 백합 재배지 내 LMoV 또는 CMV 또는 LSV에 대한 방제를 할 필요가 있을 것으로 사료됨.

백합 주요바이러스 복합감염 양상

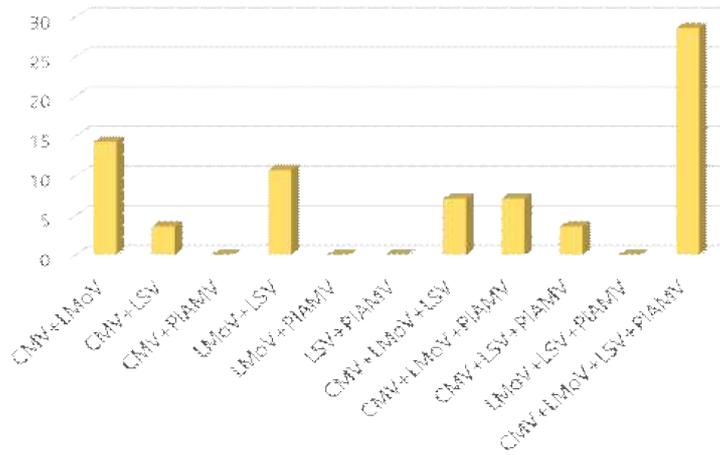


그림 47. 백합의 개별진단법을 통한 바이러스 복합감염 양상 그래프. 채집한 백합의 개별진단법을 통하여 22종의 바이러스에 대한 단일감염 양상을 RT-PCR 검정을 통해 확인하였으며, 그 결과를 활용하여 바이러스의 복합감염 양상을 확인함. 그 결과, 2종의 바이러스는 CMV와 LMoV의 복합감염이 가장 높았으며, 3종의 복합감염 결과, CMV와 LMoV는 2종의 바이러스 복합감염의 결과와 동일하며 LSV나 PIAMV가 함께 있을 때의 3종의 복합감염율이 가장 높았음. 전체적으로 CMV, LMoV, LSV와 PIAMV 4종의 복합감염이 가장 높은 비율을 나타내었음. PIAMV의 경우, 병징이 괴사이기 때문에 복합감염을 했을 시, 식물이 괴사를 하기 때문에 복합감염률이 상대적으로 낮은 것으로 추측됨.

1. 구근 화훼류별 바이러스 개별 및 다중진단법 개발

○ 구근 화훼류 바이러스 유전자 개별진단법 개발

- Next generation sequencing (NGS)을 통해 백합 시료에서 확인된 바이러스들의 리스트를 통해 다양한 바이러스가 백합에서 존재하는 것을 확인하였음 (표 13). 총 71종의 바이러스가 확인되었으며, 그중 약 30종의 바이러스가 DNA virus가 차지하고 있음.

표 13. NGS 분석을 통해 백합에서 확인된 바이러스 목록

No	Viruses species	Abbreviation	No. of contigs
1	Acer pseudosieboldianum amalgavirus 1	ApAV1	1
2	Alfalfa leaf curl virus	ALCV	2
3	Allium cepa amalgavirus 1	AcAV1	1
4	Allium cepa amalgavirus 2	AcAV2	2
5	Ambrosia artemisiifolia mitovirus 1	AmarMV1	1
6	Angelica bushy stunt virus	AnBSV	2
7	Atractylodes mild mottle virus	AMMV	5
8	Beet western yellows virus	BWYV	6
9	Beta vulgaris mitovirus 1	BevuMV1	6
10	Blackberry virus F	BVF	1
11	Blueberry fruit drop associated virus	BFDaV	1
12	Cacao swollen shoot Togo A virus	CSSToAV	1
13	Cacao swollen shoot virus	CSSV	1
14	Camellia cryptic virus 1	CCV1	1
15	Camellia oleifera geminivirus	CaOV	1
16	Camellia ringspot associated virus 3	CRSaV-3	3

(계속)

17	Camellia totivirusA	CTA	1
18	Carnation etched ring virus	CERV	5
19	Carrot reovirus 1	CaRV1	12
20	Cauliflower mosaic virus	CaMV	13
21	Dahlia common mosaic virus	DCMV	3
22	Dahlia mosaic virus	DMV	16
23	Dregea volubilis virus 2	DVV2	1
24	East African cassava mosaic Cameroon virus	EACMCMV	1
25	Eupatorium vein clearing virus	EVCV	1
26	Figwort mosaic virus	FMV	13
27	Garlic common latent virus	GarCLV	3
<b>28</b>	<b>Gentian Kobu-sho-associated virus</b>	<b>GKaV</b>	<b>18</b>
29	Grapevine Cabernet Sauvignon reovirus	GCSV	1
30	Grapevine pararetrovirus	GPRV	2
<b>31</b>	<b>Grapevine-associated botourmia-like virus 9</b>	<b>GaBV-9</b>	<b>8</b>
32	Grapevine-associated mitovirus 11	GaMV-11	1
33	Grapevine-associated mitovirus 9	GaMV-9	1
<b>34</b>	<b>Grapevine-associated RNA virus 2</b>	<b>GaV-2</b>	<b>3</b>
35	Green Sichuan pepper vein clearing-associated virus	GSPVCaV	1
36	Hardenbergia virus A	HVA	2
37	Iris potyvirus A	IPA	1
38	Lamium leaf distortion virus	LLDV	3
39	Lettuce dieback associated virus	LdaV	2
40	Lily amalgavirus1	LAV1	1
41	Lily amalgavirus 2	LAV2	2
42	Maize associated partiti-like virus	MaPV	1
43	Milk vetch dwarf virus	MVDV	9
44	Mirabilis mosaic virus	MMV	4
45	Olea europaea geminivirus	OEGV	1
46	Panax cryptic virus 1	PCV1	2
47	Petunia exserta mitovirus 1	PeexMV1	1
48	Phalaenopsis equestris amalgavirus 2	PeAV-2	1
49	Phlomis mottle virus	PMV	1
50	Pinus nigra virus 1	PNV-1	1
51	Piper yellow mottle virus	PYMoV	1
52	Plantago latent caulimovirus	PLCV	2
53	Potato virus Y	PVY	1
<b>54</b>	<b>Raphanus sativus cryptic virus 1</b>	<b>RsCV-1</b>	<b>3</b>
<b>55</b>	<b>Raspberry latent virus</b>	<b>RpLV</b>	<b>3</b>
56	Rhodolacryptic virus 1	RdCV1	1
<b>57</b>	<b>Rice dwarf-associated bunya-like virus</b>	<b>RDaBV</b>	<b>8</b>
58	Rose yellow vein virus	RYVV	94
59	Rudbeckia flower distortion virus	RuFDV	1
60	Soybean leaf-associated ourmiavirus 1	SaOurV1	1
61	Soybean leaf-associated ourmiavirus2	SaOurV2	2
62	Soybean Putnam virus	SPuV	7
63	Strawberry vein banding virus	SBVB	7
64	Sweet potato vein clearing virus	SPVCV	6
<b>65</b>	<b>Swertia japonica amalgavirus1</b>	<b>SjAV1</b>	<b>3</b>
66	Tobacco vein clearing virus	TVCV	5
67	Tomato associated geminivirus 2	TaGV2	1
68	Trifolium virus 1	TrV1	1
<b>69</b>	<b>Turnip mosaic virus</b>	<b>TuMV</b>	<b>9</b>
70	Viola yellow mottle virus	VYMV	35
<b>71</b>	<b>Vitis cryptic virus</b>	<b>VCV</b>	<b>3</b>
		<b>Total</b>	<b>365</b>

- NGS를 통해 확인된 바이러스 중 DNA virus를 제외하고 contig 수가 높은 12종 바이러스를

검정하고자 프라이머를 제작하였음(표 14).

- 12종의 바이러스는 beet western yellows virus, beta vulgaris mitovirus1, camellia associated virus 3, gentian kobu-sho-associated virus, grapevine-associated botourmia-like virus 9, grapevine-associated RNA virus 2, Raphanus sativus cryptic virus 1, raspberry latent virus, rice dwarf-associated bunya-like virus, swertia japonica amalgavirus 1, turnip mosaic virus, vitis cryptic virus로 RT-PCR 검정을 진행하였음.

**표 14. NGS를 통해 확인된 바이러스를 검정하기 위한 디자인한 프라이머<sup>a</sup>**

Genus	Species	Primer name	Sequence (5'→3')	Size (bp)
Polerovirus	Beet western yellows virus	BWYV-F	CTTCACGGAAGAGGAGATAC	392
		BWYV-R	GCCCAGCTCGCTTTGGT	
Mitovirus	Beta vulgaris mitovirus1	BevuMV1-F	ATAACCTCTTGTGCGAGGAC	944
		BevuMV1-R	AGTAGATCTTAAGGCCGCC	
Unclassified vetaflexiviridae	Camellia ringspot associated virus 3	CRSaV-3-F	CAGAATAAAGAAAGGAAGCAATC	439
		CRSaV-3-R	GGATTTTCGGATAACCACC	
Unclassified daRNAvirus	Gentian Kobu-sho-associated virus	GKaV-F	CTCTTAAGATCGAGGAGCTA	656
		GKaV-R	GCTTCTTCCTCGAGGTTTT	
Unclassified botourmiaviridae	Grapevine-associated botourmia-like virus 9	GaBV-9-F	GCCTGTTTCAAATACTTCGGTC	560
		GaBV-9-R	GGACAATCCGAAAGACCGTAA	
Unclassified daRNAvirus	Grapevine-associated RNA virus 2	GaV-2-F	TTGAGAACGATTTCAAGAACAAC	561
		GaV-2-R	GCAATTTACCGGCCATATAATC	
Unclassified partitiviridae	Raphanus sativus cryptic virus 1	RsCV-1-F	TGAACTCAAGTTACAAGTGC	707
		RsCV-1-R	GTGTACTTACGACCATTACACTA	
Unclassified orthornavirae	Raspberry latent virus	RpLV-F	GGCGATGTCTATTTTCGAT	375
Unclassified orthornavirae	Rice dwarf-associated bunya-like virus	RDaBV-F	GTTAGCGAGAAGCTTGGAGTT	377
		RDaBV-R	GTTTGAAAACCTGAGCTCTG	
Amalgavirus	Swertia japonica amalgavirus1	SjAV1-F	GAGAGGCCCGCTGAAGATAT	459
		SjAV1-R	GCTGGAAAAACCGCCTGC	
Potyvirus	Turnip mosaic virus	TuMV-F	GCAATACTGATCAAAGGGGC	578
		TuMV-R	GGTCGCCGCTGTTGCCAA	
Unclassified partitiviridae	Vitis cryptic virus	VCV-F	GGGCAATCAACGTTCTTAC	894
		VCV-R	TTCTAGGAATGATACCTCTTC	

<sup>a</sup> NCBI GenBank에 등록된 염기서열과 수선화의 메타전사체 분석을 통하여 확보한 컨티그 염기서열을 이용하여 종 특이적으로 반응하는 프라이머를 설계하였음.

- 선정된 바이러스를 대상으로 제작한 프라이머를 사용하여 백합 샘플에서 12종의 바이러스를 RT-PCR 검정을 진행하였음(표 15).
- RT-PCR을 통한 바이러스 검정 결과, 2, 3, 5, 9, 10번 샘플에서 바이러스가 단독 또는 복합 감염한 것을 확인하였음.
- 감염이 확인된 바이러스는 beta vulgaris mitovirus1, camellia ringspot associated virus 3, grapevine-associated botourmia-like virus 9, grapevine-associated RNA virus 2, raphanus sativus cryptic virus 1, raspberry latent virus, rice dwarf-associated bunya-like virus, turnip mosaic virus로 8종이 검정되었음.

표 15. NGS를 통해 확인된 바이러스의 백합 감염 검정 결과<sup>a</sup>

바이러스	샘플 1	샘플 2	샘플 3	샘플 4	샘플 5	샘플 6	샘플 7	샘플 8	샘플 9	샘플 10
BWYV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BevuMV1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CRSaV3	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
GKaV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GaBV-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
GaV-2	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
RSCV1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
RpLV	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
RDaBV	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
SjAV1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TuMV	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VCV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> 선정된 바이러스를 대상으로 제작한 프라이머를 사용하여 백합 샘플에서 12종의 바이러스를 RT-PCR 검정을 진행하였음

○ 바이러스별 개별진단법 조합을 이용한 다중진단법 개발

- 글라디올러스에 감염하는 바이러스 중 주로 감염하는 바이러스인 Bean yellow mosaic virus, Cucumber mosaic virus, Lily mottle virus 세 종을 대상으로, 이 바이러스들은 단백질 감염뿐 아니라 복합적으로 글라디올러스에 감염하여 작물의 성장과 수확에 큰 영향을 미치고 있어 3종의 바이러스를 동시에 진단할 수 있는 다중 진단법을 개발하였음. 또한, 18s rRNA를 내부 대조군 프라이머로 함께 설계하였음(표 16).

표 16. 글라디올러스 감염 바이러스 다중 진단을 위한 검정 프라이머 표<sup>a</sup>

바이러스	프라이머 이름	서열 (5'→3')	사이즈 (bp)
Bean yellow mosaic virus	BYMV-343-F	AGCCAACATTCCGCCAAATGGT	343
	BYMV-343-R	CTCTAAATACGAACACCAAGCA	
Cucumber mosaic virus	CMV-623-F	GAACAAGAAGTCCGCCCA	623
	CMV-623-R	CCAAAGTAACGTGGTCTTCGGA	
Lily mottle virus	LMoV-CP-633-F	TGAAGTTACTTCACGACAGCCAGCACGGCG	409
	LMoV-Cter-R	GTCCCTTCTTCCAAGACTAGT	
18s rRNA	18s-796-F	GATTCCGGAGAGGGAGCCTG	796
	18s-796-R	CTCCACTCCTGGTGGTGCC	

<sup>a</sup> NCBI GenBank에 등록된 염기서열과 수선화의 메타전사체 분석을 통하여 확보한 컨티그 염기서열을 이용하여 종 특이적으로 반응하는 프라이머를 설계하였음.

- 3종의 바이러스를 동시 진단하기 위해 설계된 프라이머 세트를 활용하여 글라디올러스에서 추출한 total RNA를 사용하여 단일, 이중, 삼중 진단법을 개발하였음(그림 48).
- 글라디올러스에서 검정하는 3종의 바이러스의 다중 진단법의 진단 한계를 확인하기 위해, 추출된 RNA를 농도별 희석하여 RT-PCR을 진행하였음(그림 49).

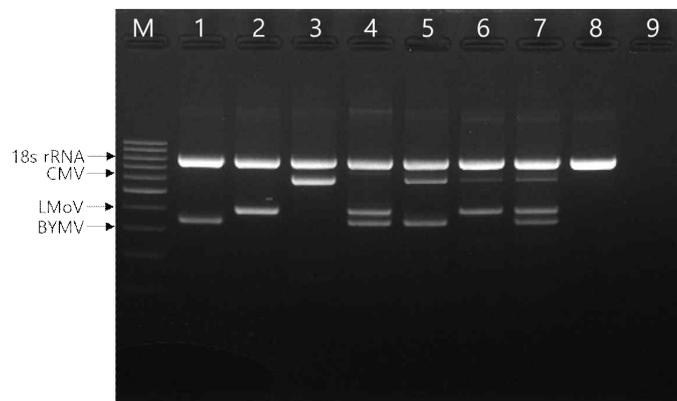


그림 48. 글라디올러스에 감염하는 바이러스. 글라디올러스에 주로 감염하는 바이러스인 bean yellow mosaic virus, cucumber mosaic virus, lily mottle virus를 대상으로 다중진단법을 개발하였음. 분자적 마커로 100bp ladder를 사용하였으며, BYMV, LMoV, CMV 순으로 단일 바이러스(lane 1-3), BYMV+LMoV, BYMV+CMV, LMoV+CMV 순으로 이중 바이러스(lane 4-6), BYMV+LMoV+CMV(lane 7), 내부 대조군 18s rRNA(lane 8), non template control (lane 9) 순으로 2% 아가로스 젤 전기영동을 통해 확인하였음.

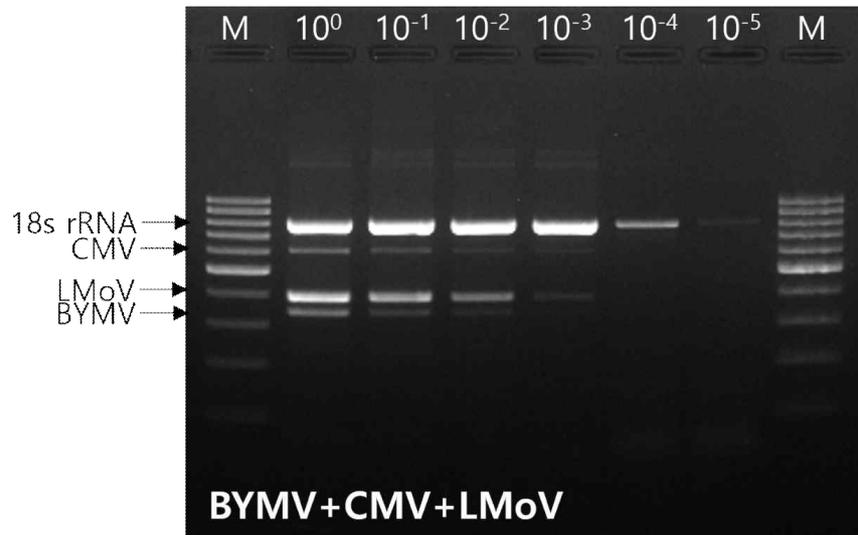


그림 49. 글라디올러스에 감염하는 바이러스. 글라디올러스에 주로 감염하는 바이러스인 bean yellow mosaic virus, cucumber mosaic virus, lily mottle virus를 대상으로 개발된 다중진단법의 진단 한계를 확인하고자, 바이러스의 전체 농도별( $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ )로 희석하여 각각 RT-PCR 진행하였음. BYMV+CMV+LMoV 3중 바이러스의 동시 진단을 시행했을 시,  $10^{-2}$ 의 농도까지 진단 효과가 있는 것으로 보이며 이후에는 효과가 감소하는 것을 확인하였음.

## 2. 백합, 글라디올러스 등 바이러스 위험 순위 분류

○ 작물별 발생 양상 분석을 통하여 바이러스 위험 순위 분류

- 국내 주요 백합 재배 지역에서 채집한 백합을 국내·외 백합에 감염한다고 보고된 바이러스를 대상으로 감염 바이러스를 진단하여 그에 따른 지역별 바이러스 발생 순위를 부여하였음 (표 17).
- 백합에서 lily mottle virus, cucumber mosaic virus, lily symptomless virus, plantago asiatica mosaic virus, rembrandt tulip breaking virus, tobacco necrosis virus A로 총 6종의 바이러스를 확인하였음. 또한, lily mottle virus가 가장 많이 발생한 것을 확인할 수 있었음.

표 17. 국내 주요 재배지역에서 채집한 백합의 바이러스 진단 결과

바이러스	강원 춘천		강원 원주		계	
	시료수	검정률 (%)	시료수	검정률 (%)	시료수	검정률 (%)
Lily mottle virus	14/16	87.5	13/37	35.1	27/53	50.9
Cucumber mosaic virus	13/16	81.3	9/37	24.3	22/53	41.5
Lily symptomless virus	11/16	68.8	12/37	32.4	23/53	43.4
Plantago asiatica mosaic virus	11/16	68.8	0/37	0.0	11/53	20.8
Rembrandt tulip breaking virus	6/16	37.5	2/37	5.4	8/53	15.1
Tobacco necrosis virus A	2/16	12.5	0/37	0.0	2/53	3.8
Apple stem grooving virus	0/16	0.0	0/37	0.0	0/53	0.0
Arabis mosaic virus	0/16	0.0	0/37	0.0	0/53	0.0
Broad bean wilt virus	0/16	0.0	0/37	0.0	0/53	0.0
Calla lily latent virus	0/16	0.0	0/37	0.0	0/53	0.0
Iris yellow spot virus	0/16	0.0	0/37	0.0	0/53	0.0
Lily virus X	0/16	0.0	0/37	0.0	0/53	0.0
Narcissus mosaic virus	0/16	0.0	0/37	0.0	0/53	0.0
Shallot yellow stripe virus	0/16	0.0	0/37	0.0	0/53	0.0
Strawberry latent ringspot virus	0/16	0.0	0/37	0.0	0/53	0.0
Tobacco rattle virus	0/16	0.0	0/37	0.0	0/53	0.0
Tobacco ringspot virus	0/16	0.0	0/37	0.0	0/53	0.0
Tomato ringspot virus	0/16	0.0	0/37	0.0	0/53	0.0
Tomato spotted wilt virus	0/16	0.0	0/37	0.0	0/53	0.0
Tulip breaking virus	0/16	0.0	0/37	0.0	0/53	0.0
Turnip mosaic virus	0/16	0.0	0/37	0.0	0/53	0.0
Zantedeschia mild mosaic virus	0/16	0.0	0/37	0.0	0/53	0.0

<sup>a</sup> 국내 주요 백합 재배 지역에서 채집한 백합을 국내·외 백합에 감염한다고 보고된 바이러스를 대상으로 감염 바이러스를 진단하여 그에 따른 지역별 바이러스 발생 순위를 부여하였음

- 강원(춘천, 원주) 지역에서 mosaic, yellowing, stripe, necrosis 등의 바이러스성 병징을 보이는

- 시료 23점에 대하여 주요 바이러스(CMV, LMoV, LSV, PIAMV)의 발생을 조사하였음(표 18).
- 28개의 시료 중 23점의 시료가 단독 혹은 복합으로 바이러스에 감염되었으며, 이 중 21종이 2종 이상의 바이러스에 복합 감염된 것을 확인하였음. 단독 감염 바이러스보다 복합으로 감염된 복합 시료가 많았으며, 2종의 바이러스가 복합 감염된 경우, CMV와 LMoV의 복합 감염이 가장 많았고, 3종의 바이러스가 복합 감염된 경우, 비슷한 비율로 주요 바이러스가 다양하게 복합 감염된 결과를 보임.

표 18. 백합 바이러스의 발생 실태 조사<sup>a</sup>

감염종 수	바이러스	검정주 수	검정률 (%)
1종	CMV	1	4.3
	LMoV	1	4.3
	LSV	0	0
	PIAMV	0	0
2종	CMV+LMoV	4	17.4
	CMV+LSV	1	4.3
	CMV+PIAMV	0	0
	LMoV+LSV	3	13
	LMoV+PIAMV	0	0
	LSV+PIAMV	0	0
3종	CMV+LMoV+LSV	2	8.8
	CMV+LMoV+PIAMV	2	8.8
	CMV+LSV+PIAMV	1	4.3
	LMoV+LSV+PIAMV	0	0
4종	CMV+LMoV+LSV+PIAMV	8	34.8
	Total	23	100

- 백합에 주요 감염 바이러스가 감염했을 시, 백합에 나타나는 병징에 대한 피해를 확인하기 위해, 다양한 경우로 주요 감염 바이러스가 혼합 감염된 백합에서의 병징을 확인하였음 (그림 50).



그림 50. 백합 감염 바이러스 병징 사진. 백합에 감염한 다양한 바이러스들은 대부분 mosaic 외에도 stripe, necrosis 등 다양한 병징을 나타냄. 바이러스가 복합 감염됨에 따른 백합에 나타나는 병징의 피해 해석을 하기 위해 다양한 병징을 나타내는 백합에서 주요 바이러스인 CMV, LMoV, LSV, PIAMV를 검정하였음. A는 CMV와 LSV(2종), B는 LMoV와 LSV(2종), C는 LMoV와 PIAMV(2종), D는 CMV와 LMoV(2종), E는 CMV, LMoV와 LSV(3종), F는 CMV, LSV와 PIAMV(3종), G는 LMoV, LSV와 PIAMV(3종)이 복합 감염되어 있음. 3종 이상 감염되어 있는 경우, 2종이 복합 감염된 경우보다 병징의 세기가 확실히 강해지는 것으로 확인됨.

- 국내 글라디올러스 재배 지역에서 채집한 글라디올러스에서 국내·외 글라디올러스에 감염한다고 보고된 바이러스를 대상으로 감염 바이러스를 진단하여 그에 따른 지역별 발생 순위를 부여하였음(표 19).
- 글라디올러스에서 bean yellow mosaic virus, lily mottle virus, cucumber mosaic virus, tobacco streak virus, broad bean wilt virus 2, tobacco mosaic virus, bean common mosaic virus로 총 7종의 바이러스를 확인하였음. 또한, bean yellow mosaic virus가 가장 많이 발생한 것을 확인할 수 있었음.

표 19. 국내 주요 재배지역에서 채집한 글라디올러스의 바이러스 진단 결과<sup>a</sup>

검정 바이러스	강원 춘천		강원 원주		충북 제천		충남 태안		계	
	시료 수	검정률 (%)								
Bean yellow mosaic virus	8/11	72.7	44/82	53.7	1/1	100	0/5	0.0	53/99	53.5
Lily mottle virus	7/11	63.6	32/82	39.0	1/1	100	4/5	80	44/99	44.4
Cucumber mosaic virus	8/11	72.7	12/82	15.9	1/1	100	4/5	80	25/99	25.3
Tobacco streak virus	0/11	0.0	5/82	6.1	0/1	0.0	0/5	0.0	5/99	5
Broad bean wilt virus 2	0/11	0.0	0/82	0.0	0/1	0.0	3/5	60	3/99	3
Tobacco mosaic virus	0/11	0.0	0/82	0.0	0/1	0.0	2/5	40	2/99	2
Bean common mosaic virus	0/11	0.0	0/82	0.0	1/1	100	0/5	0.0	1/99	1
Arabis mosaic virus	0/11	0.0	0/82	0.0	0/1	0.0	0/5	0.0	0/99	0.0
Clover yellow vein virus	0/11	0.0	0/82	0.0	0/1	0.0	0/5	0.0	0/99	0.0
Cynas necrotic spot virus	0/11	0.0	0/82	0.0	0/1	0.0	0/5	0.0	0/99	0.0
Inpatiens necrotic spot virus	0/11	0.0	0/82	0.0	0/1	0.0	0/5	0.0	0/99	0.0
Lily symptomless virus	0/11	0.0	0/82	0.0	0/1	0.0	0/5	0.0	0/99	0.0
Ornithogalum mosaic virus	0/11	0.0	0/82	0.0	0/1	0.0	0/5	0.0	0/99	0.0
Plantago asiatica mosaic virus	0/11	0.0	0/82	0.0	0/1	0.0	0/5	0.0	0/99	0.0
Tomato black ring virus	0/11	0.0	0/82	0.0	0/1	0.0	0/5	0.0	0/99	0.0
Tobacco necrosis virus A	0/11	0.0	0/82	0.0	0/1	0.0	0/5	0.0	0/99	0.0
Tobacco ringspot virus	0/11	0.0	0/82	0.0	0/1	0.0	0/5	0.0	0/99	0.0
Tomato ringspot virus	0/11	0.0	0/82	0.0	0/1	0.0	0/5	0.0	0/99	0.0
Tomato spotted wilt virus	0/11	0.0	0/82	0.0	0/1	0.0	0/5	0.0	0/99	0.0
Tobacco rattle virus	0/11	0.0	0/82	0.0	0/1	0.0	0/5	0.0	0/99	0.0

<sup>a</sup> 국내 글라디올러스 재배 지역에서 채집한 글라디올러스에서 국내·외 글라디올러스에 감염한다고 보고된 바이러스를 대상으로 감염 바이러스를 진단하였음.

- 강원(춘천, 원주)과 충청(태안, 제천) 지역에서 yellowing, mosaic, stripe, chlorosis, necrosis 등의 바이러스성 병징을 보이는 시료 44점에 대하여 주요 바이러스의 발생을 조사하였음(표 20).
- 44개의 시료 중 42점의 시료가 단독 혹은 복합으로 바이러스에 감염되었으며, 이 중 35종이 2종 이상의 바이러스에 복합 감염된 것을 확인하였음. BYMV 43%, CMV 21%, LMoV 36%의 감염률을 보였으며, BYMV와 LMoV의 감염률이 38%로 가장 높은 비율을 보임.

표 20. 글라디올러스 바이러스 발생 조사 결과<sup>a</sup>

감염종 수	바이러스	검정주수	검정률 (%)
1종	BYMV	6	14.3
	CMV	0	0
	LMoV	1	2.4
2종	BYMV+CMV	4	9.5
	BYMV+LMoV	16	38
	CMV+LMoV	2	4.8
3종	BYMV+CMV+LMoV	13	31
Total		42	100

<sup>a</sup> 강원(춘천, 원주)과 충청(태안, 제천) 지역에서 yellowing, mosaic, stripe, chlorosis, necrosis 등의 바이러스성 병징을 보이는 시료 44점에 대하여 주요 바이러스의 발생을 조사하였음.

- 글라디올러스에 주요 감염 바이러스가 감염했을 시, 글라디올러스에 나타나는 병징에 대한 피해를 확인하기 위해, 다양한 경우로 주요 감염 바이러스가 혼합 감염된 글라디올러스에서 병징을 확인하였음(표 51).



그림 51. 글라디올러스 감염 바이러스 병징 사진. 글라디올러스에 감염한 바이러스들은 대부분 mosaic 외에도 stripe, necrotic spot 등 다양한 병징을 나타냄. 바이러스가 복합 감염됨에 따른 글라디올러스에 나타나는 병징의 피해 해석하기 위해 다양한 병징을 나타내는 글라디올러스에서 주요 바이러스인 BYMV, CMV, LMoV를 검정하였음. A는 BYMV와 CMV(2종), B는 CMV와 LMoV(2종), C는 BYMV와 LMoV(2종), D는 BYMV, CMV와 LMoV(3종)이 복합 감염되어 있음. 2종의 바이러스가 감염된 경우, 대부분 약한 병징을 보이는 반면, 3종의 바이러스가 감염된 대부분의 글라디올러스 시료들은 비교적 강한 모자이크 병징을 나타냄.

- 백합에 감염하는 바이러스 중 검역 바이러스로 분류된 바이러스는 arabis mosaic virus (ArMV), iris yellow spot virus(IYSV), strawberry latent ringspot virus(SLRSV), tobacco necrosis virus A(TNV-A), tobacco rattle virus(TRV), tobacco ringspot virus(TRSV), tomato ringspot virus(ToRSV)로 7종이 확인됨.
- 채집된 백합 시료 중 TNV-A에 감염된 시료가 확인되어 국내 재배되고 있는 백합 작물 내 TNV-A의 감염에 따른 경제적 피해가 생길 수 있을 것으로 사료됨.
- 글라디올러스에 감염하는 바이러스 중 검역 바이러스로 분류된 바이러스는 arabis mosaic virus(ArMV), impatiens necrotic spot virus(INSV), tobacco necrosis virus A(TNV-A), tobacco rattle virus(TRV), tobacco ringspot virus(TRSV), tobacco streak virus(TSV), tomato black ring virus(TBRV), tomato ringspot virus(ToRSV)로 총 8종이 확인됨.
- 채집된 글라디올러스 시료 중 TSV에 감염된 시료가 확인되어 국내 재배되고 있는 글라디올러스 작물 내 TSV의 감염에 따른 경제적 피해가 생길 수 있을 것으로 사료됨.
- 백합은 cucumber mosaic virus, lily mottle virus, lily symptomless virus, plantago asiatica mosaic virus가 주로 감염하는 바이러스인데, 이 4종 중 CMV와 PIAMV 2종만이 즙액으로 접종이 가능한 바이러스로 알려져 있음. 즙액으로 접종되지 않는 LMoV와 LSV는 주로 구근을 통하여 수직 전염하는 것으로 확인됨.
- PIAMV의 경우 즙액으로 접종이 가능하여, 4개의 과에 속하는 13종의 기주식물에 즙액 접종 실험을 통해 PIAMV의 기주의 범위를 확인해 봤을 때, 대부분의 기주식물에 감염하지 않고 1종의 담배작물과 1종의 명아주 작물에만 감염하는 것으로 나타남(표 21).

표 21. 백합에서 분리한 *Plantago asiatica mosaic virus*(PIAMV)의 기주 반응<sup>a</sup>

Family	Species	PIAMV
		Inoculated/Upper leaves
<i>Chenopodiaceae</i>	<i>Chenopodium quinoa</i>	CS/CS
<i>Solanaceae</i>	<i>Nicotiana glauca</i>	NS/M
	<i>N. tabacum</i> cv. Xanthi nc	-/-
	<i>N. rustica</i>	-/-
	<i>N. glutinosa</i>	-/-
	<i>Capsicum annuum</i> cv. Long green	-/-
	<i>Capsicum annuum</i> cv. PR ssagsseuli	-/-
	<i>Physalis salkekengi</i> var. francheti	-/-
<i>Cucurbitaceae</i>	<i>Cucurbita pepo</i>	-/-
	<i>Cucumis sativus</i>	-/-
<i>Labiatae</i>	<i>Perilla frutescens</i> var. japonica Hara	-/-

<sup>a</sup> CS : Chlorotic Spot, NS : Necrotic Spot, M : Mosaic

- 그에 반해 CMV는 매우 넓은 기주 범위를 가지고 있지만, 백합에서 분리한 CMV는 특이적으로 매우 좁은 기주범위를 갖고 있음을 여러 연구를 통해 확인하였음. 백합에서 분리한 CMV 분리주를 다양한 기주식물에 접종 실험했을 때, 특정 기주식물을 제외하고 감염하지 않는 것을 확인하였음 (표 3).
- 글라디올러스는 bean yellow mosaic virus, cucumber mosaic virus, lily mottle virus가 주요 감염 바이러스인데, 이 중 BYMV와 CMV가 즙액 접종이 가능한 바이러스 알려져 있음.
- 글라디올러스에서 분리한 CMV는 그림 33에서 나타낸 CMV의 분리주간의 이동단백질과 외피단백질의 아미노산 계통도에서 백합 분리주와 매우 높은 서열 상동성을 보이는 것을 확인할 수 있었음.
- 또한, 글라디올러스에서 분리한 CMV를 기주 작물인 담배 2품종에 접종했을 때, 백합 CMV 분리주와 유사하게 매우 약한 병징을 보이는 것을 확인하였음(그림 52).

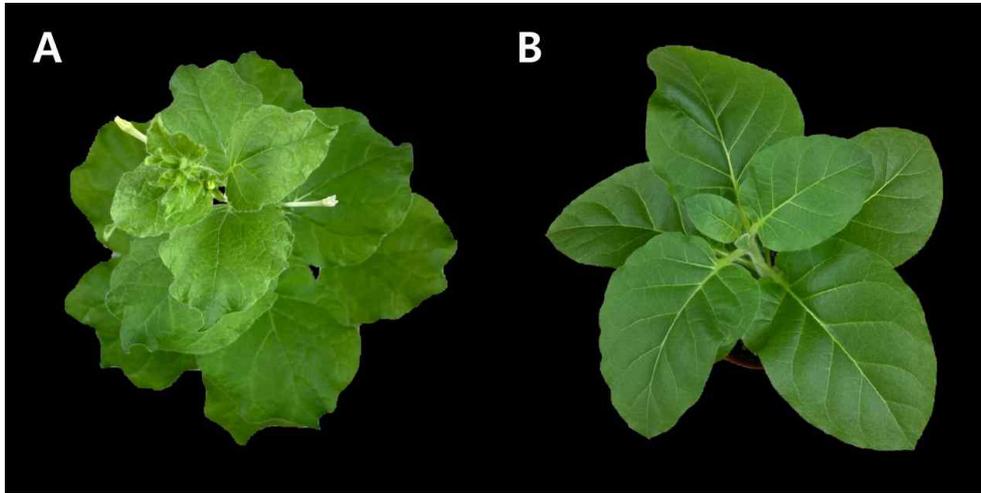


그림 52. 글라디올러스에서 분리한 CMV의 기주 반응 사진. 담배 품종인 *Nicotiana benthamiana* (A)와 *N. tabacum* cv. Xanthi nc (B)에 글라디올러스에서 분리한 CMV의 접종 후 20일 뒤의 병징 사진. 두 작물 모두 바이러스 병징이 거의 보이지 않는 굉장히 약한 병징을 보임.

- 백합과 글라디올러스에서 주로 감염하는 바이러스 중 대부분의 바이러스는 즙액으로 접종이 되지 않으며, 주로 구근을 통해 수직 전염하는 것으로 확인됨.
- 또한, 즙액 접종이 되는 바이러스들도 대부분 기주범위가 넓지 않으며, 기주범위가 넓은 CMV도 백합과 글라디올러스 분리주의 고유의 특이적인 특성으로 기주범위가 좁은 것으로 나타남.
- 따라서, 구근 화훼류에 주요 감염 바이러스 대부분은 기주 범위가 넓지 않아, 다른 작물에 영향을 미치지 않을 것으로 사료됨.
- 백합에 감염하는 바이러스 22종의 대부분은 주로 매개충에 의해 바이러스가 전염되는 것으로 보고되어 있음(표 22). 특히, 22종 중 15종은 모두 진딧물에 의해 전파되는 것으로 알려져 있으며, 백합의 주요 감염 바이러스인 CMV, LMoV, LSV도 모두 진딧물 전파가 가능하여 백합 재배 시, 진딧물의 대발생하는 상황을 유의해야 할 것으로 사료됨.

표 22. 백합에 감염하는 바이러스의 전염 방식<sup>a</sup>

속 (Genus)	바이러스명	전염
Capillovirus	Apple stem grooving virus	접목
Nepovirus	Arabis mosaic virus	선충, 종자
Fabavirus	Broad bean wilt virus	진딧물
Potyvirus	Calla lily latent virus	진딧물
Cucumovirus	Cucumber mosaic virus	즙액, 진딧물
Orthotospovirus	Iris yellow spot virus	총체벌레
Potyvirus	Lily mottle virus	진딧물
Carlavirus	Lily symptomless virus	진딧물
Potexvirus	Lily virus X	진딧물
Potexvirus	Narcissus mosaic virus	진딧물
Potexvirus	Plantago asiatica mosaic virus	즙액
Potyvirus	Rembrandt tulip breaking virus	구근, 진딧물
Potyvirus	Shallot yellow stripe virus	구근, 진딧물
Sadwavirus	Strawberry latent ringspot virus	선충
Nepovirus	Tobacco necrosis virus A	<i>Olpidium brassicae</i>
Tobravirus	Tobacco rattle virus	즙액, 선충
Nepovirus	Tobacco ringspot virus	즙액, 종자
Nepovirus	Tomato ringspot virus	접목, 선충
Orthotospovirus	Tomato spotted wilt virus	즙액, 총체벌레
Potyvirus	Tulip breaking virus	진딧물
Potyvirus	Turnip mosaic virus	즙액, 진딧물
Potyvirus	Zantedeschia mild mosaic virus	진딧물

<sup>a</sup> 백합에 감염하는 바이러스 22종의 대부분은 주로 매개충에 의해 바이러스가 전염되는 것으로 보고되어 있음.

- 글라디올러스에 감염하는 바이러스 15종은 다양한 방식으로 바이러스가 전염되는데, 그 방법으로 선충이나 진딧물, 총체벌레 등의 매개충이 대부분을 차지하고 있음(표 23). 특히, 글라디올러스에 주요 감염 바이러스인 BYMV, CMV, LMoV는 모두 진딧물을 통해 전염되기 때문에, 진딧물에 의한 피해에 대해 방제할 필요성이 있음.

표 23. 글라디올러스에 감염하는 바이러스의 전염 방식<sup>a</sup>

속 (Genus)	바이러스명	전염
Nepovirus	Arabis mosaic virus	선충, 종자
Potyvirus	Bean common mosaic virus	즙액, 종자, 진딧물
Potyvirus	Bean yellow mosaic virus	즙액, 진딧물
Potyvirus	Clover yellow vein virus	즙액, 진딧물
Cucumovirus	Cucumber mosaic virus	즙액, 진딧물
Nepovirus	Cycas necrotic stunt virus	선충
Orthotospovirus	Impatiens necrotic spot virus	총체벌레
Potyvirus	Lily mottle virus	진딧물
Necrovirus	Tobacco necrosis virus	곰팡이
Tobravirus	Tobacco rattle virus	즙액, 선충
Nepovirus	Tobacco ringspot virus	즙액, 종자
Ilarvirus	Tobacco streak virus	총체벌레, 종자
Cucumovirus	Tomato aspermy virus	즙액, 진딧물
Nepovirus	Tomato black ring virus	선충, 종자
Nepovirus	Tomato ringspot virus	접목, 선충
Orthotospovirus	Tomato spotted wilt virus	즙액, 총체벌레

<sup>a</sup> 글라디올러스에 감염하는 바이러스 15종은 다양한 방식으로 바이러스가 전염되는데, 그 방법으로 선충이나 진딧물, 총체벌레 등의 매개충이 대부분을 차지하고 있음

○ 구근 화훼류 특성과 바이러스 감염 양상에 기반한 진단체계 표준화

- 백합에 가장 많이 감염하는 바이러스는 lily mottle virus와 cucumber mosaic virus 두 종인데, 두 바이러스의 공통적인 전염 방식인 진딧물은 재배 과정 중 백합에 바이러스를 감염하게 할 수 있음. 또한, 백합의 재배 특성상 구근으로 주로 번식하는 과정에서 바이러스가 제거되지 않은 채 다음 세대로 전달되어 여러가지의 바이러스가 복합적으로 감염되기 때문에, 점차 바이러스에 의한 피해가 클 것으로 예측됨. 따라서, 구근에서 바이러스를 검정하여 바이러스가 감염되지 않은 무병주를 진단하는 것이 가장 중요함.
- 글라디올러스에 가장 많이 감염하는 바이러스는 bean yellow mosaic virus와 lily mottle virus 두 종으로 두 바이러스의 공통적인 전염 방식인 진딧물이 재배 과정 중 글라디올러스에 바이러스를 감염하게 함. 또한, 글라디올러스도 백합과 마찬가지로 구근 화훼 식물이기 때문에 주로 구근으로 번식하게 되는데, 이 과정에서 바이러스가 제거되지 않은 채 다음 세대로 전달되고, 매개충에 의해 다른 바이러스가 다시 감염하게 되면서 여러가지의 바이러스가 복합적으로 감염되게 될 가능성이 높음. 이로 인해, 글라디올러스에 나타나는 병징들로 인해 재배에 큰 피해가 생길 것으로 사료됨. 따라서, 글라디올러스도 구근에서 바이러스를 검정하여 바이러스가 감염되지 않은 무병주를 진단하는 것이 필요함.

3. 구근 화훼류 진단체계 확립을 위한 채집 방법 표준화

○ 화훼류 조직별 및 시기별 바이러스 진단 결과의 분석

- 구근 화훼류 작물인 백합은 주로 구근으로 생산되기 때문에, 다양한 부위에서 바이러스를 검정하여 바이러스의 검정 부위에 따라 바이러스 진단 체계를 확립하고자 백합의 3개의 조직(구근, 잎, 꽃잎) 별 total RNA를 추출하였음.
- 정밀한 농도를 측정하고자 추출된 RNA를 사용하여 digital PCR 검정을 진행하였음. 검정 바이러스는 백합 주요 감염 바이러스인 CMV, LMoV, LSV, PIAMV를 대상으로 실험하였음 (그림 53).

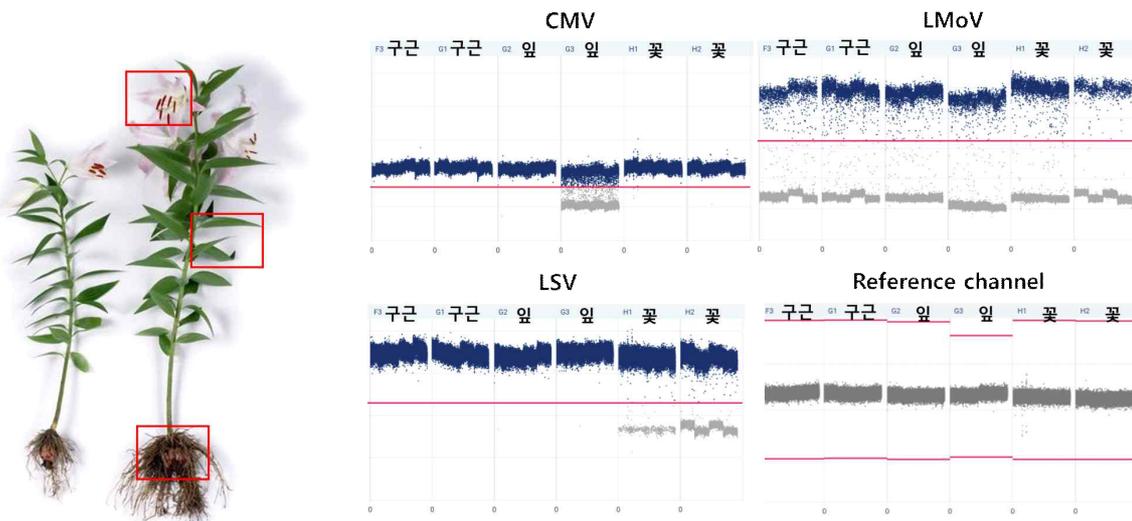


그림 53. 백합 조직 별(구근, 잎, 꽃) 바이러스 digital PCR 진단 결과. 백합의 3 조직(구근, 잎, 꽃잎) 각 부분에서 digital PCR을 진행하였으며, 오른쪽의 그래프가 검정 결과를 나타냄. 빨간 선 (threshold) 위의 파란 점이 검정된 바이러스를 나타냄. CMV, LMoV, LSV가 모든 조직에서 검정된 것으로 나타나며, CMV와 LMoV는 구근, 잎, 꽃잎에서 콜고루 바이러스가 검정된 반면, LSV는 꽃에서 검정된 바이러스 양이 구근이나 잎보다 떨어지는 것을 확인할 수 있었음.

- 그림 53의 digital PCR 검정 결과를 보면 4개의 검정 바이러스(CMV, LMoV, LSV, PIAMV) 중 PIAMV를 제외한 CMV, LMoV, LSV가 모두 검정된 것을 확인하였음.
- 바이러스 간의 농도를 확인해 보면 CMV가 모든 부위에서 가장 많이 존재하는 것으로 보이며, LMoV는 높은 농도는 아니지만 3부위 모두에서 골고루 분포하는 것으로 보임 (표 24).

표 24. 백합 조직별(구근, 잎, 꽃) 바이러스 진단 결과<sup>a</sup>

	CMV		LMoV		LSV		PIAMV	
	Copies/ul	CI (95%)						
구근	n.a.	-	91.31	4.8	n.a.	-	0.055	274.4
구근	n.a.	-	184.5	3.3	n.a.	-	0.053	274.4
잎	14085.8	0.4	182.1	3.4	14085.8	0.4	0.000	-
잎	220.8	3.1	128.9	4.0	13791.2	0.4	0.000	-
꽃	11086.0	0.4	166.7	3.5	5142.7	0.6	0.209	109.1
꽃	13684.1	0.4	57.86	5.9	2643.1	0.9	0.159	130.0

<sup>a</sup> 4개의 검정 바이러스(CMV, LMoV, LSV, PIAMV) 중 PIAMV를 제외한 CMV, LMoV, LSV가 모두 검출되었음.

- 구근 화훼류 작물인 글라디올러스는 주로 구근으로 생산되기 때문에, 다양한 부위에서 바이러스를 검정하여 바이러스의 검정 부위에 따라 바이러스 진단 체계를 확립하고자 글라디올러스의 3개의 조직(구근, 잎, 꽃잎) 별 total RNA를 추출하였음.
- 정밀한 농도를 측정하고자 추출된 RNA를 사용하여 digital PCR 검정을 진행하였음. 검정 바이러스는 글라디올러스 주요 감염 바이러스인 BYMV, CMV, LMoV를 대상으로 실험하였음(그림 54).

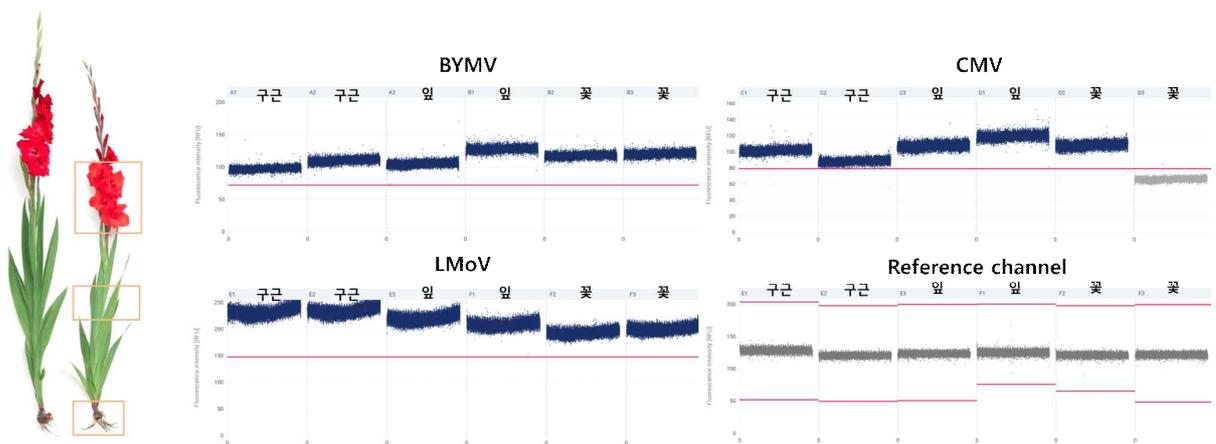


그림 54. 글라디올러스 조직 별(구근, 잎, 꽃) 바이러스 digital PCR 진단 결과. 글라디올러스의 3 조직(구근, 잎, 꽃잎) 각 부분에서 digital PCR을 진행하였으며, 오른쪽의 그래프가 검정 결과를 나타냄. 빨간선(threshold) 위의 파란 점이 검정된 바이러스를 나타냄. BYMV, CMV, LMoV가 모든 조직에서 검정된 것으로 나타나며, 모든 바이러스가 구근, 잎, 꽃잎에서 골고루 바이러스가 검정된 것을 확인할 수 있었음.

- 그림 54의 digital PCR 검정 결과를 보면 3개의 검정 바이러스(BYMV, CMV, LMoV)가 모두 검정된 것을 확인하였음.
- 바이러스 간의 농도를 확인해 보면 대체로 3종의 바이러스가 모두 비슷하게 높은 농도로 존재하는 것으로 보이며, BYMV는 특히 꽃에서 가장 높은 농도로 존재하는 것으로 보임(표 25).

표 25. 글라디올러스 조직별(구근, 잎, 꽃) 바이러스 진단 결과<sup>a</sup>

	BYMV		CMV		LMoV	
	Copies/ul	CI (95%)	Copies/ul	CI (95%)	Copies/ul	CI (95%)
구근	12350.8	28	10390.0	15.9	n.a.	-
구근	12351.5	28	9432.1	8.8	n.a.	-
잎	12349.1	28	n.a.	-	n.a.	-
잎	n.a.	-	12349.7	28	n.a.	-
꽃	n.a.	-	11507.0	32.6	n.a.	-
꽃	n.a.	-	0.048	147.5	n.a.	-

<sup>a</sup> 3개의 바이러스(BYMV, CMV, LMoV)가 모두 검출된 것을 확인하였음.

- 백합의 재배 시기별 주요 감염 바이러스(CMV, LMoV, LSV, PIAMV)의 발생을 확인하였음(그림 55). 백합의 채집 시기는 백합의 생장이 약 30cm 자랐을 때 1차 시기(S1), 백합이 약 50cm 이상 자랐으며 꽃봉오리가 맺혔을 시기를 2차 시기(S2)로 선택하여 백합을 채집하였고, RT-PCR 검정을 통하여 주요 바이러스를 검정하여 시기별 바이러스를 진단하였음.

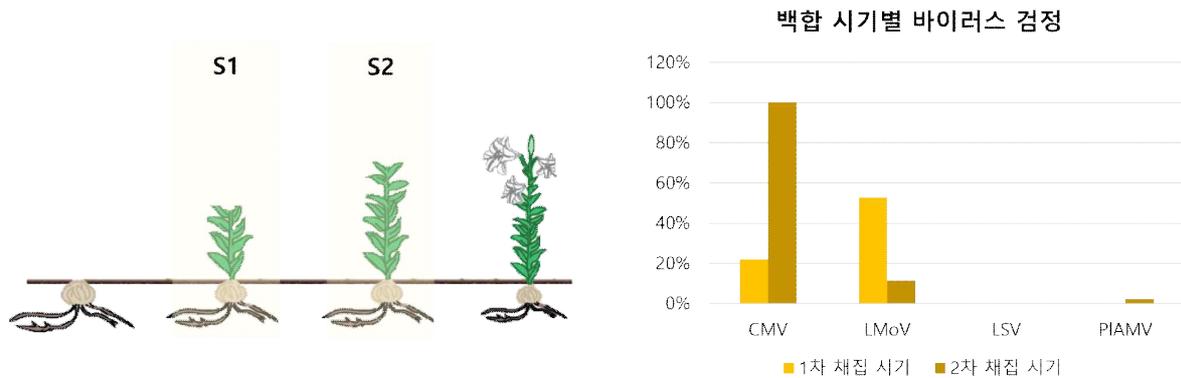


그림 55. 백합의 재배 과정에 따른 채집 시기와 시기별 바이러스 검정 결과. 백합 채집시기는 2번으로 나뉘어 채집하였으며, 주요 바이러스인 CMV, LMoV, LSV, PIAMV 4종의 바이러스를 RT-PCR 검정하였음. 검정 결과, 주로 CMV와 LMoV가 감염한 것으로 나타났으며, S1시기에는 LMoV가 CMV보다 많이 감염되다, S2 시기가 되면 LMoV보다 CMV가 더 많이 감염하는 것으로 나타남.

- 글라디올러스의 재배 시기별 주요 감염 바이러스(BYMV, CMV, LMoV)의 발생을 확인하였음(그림 56). 글라디올러스의 채집 시기는 글라디올러스의 생장이 약 10cm 자랐을 때 1차 시기(S1), 글라디올러스의 잎이 약 5개의 잎으로 나왔을 때 2차 시기(S2), 꽃봉오리가 맺혔을 시기를 3차 시기(S3)로 선택하여 글라디올러스를 채집하였고, RT-PCR 검정을 통하여 주요 바이러스를 검정하여 시기별 바이러스를 진단하였음.

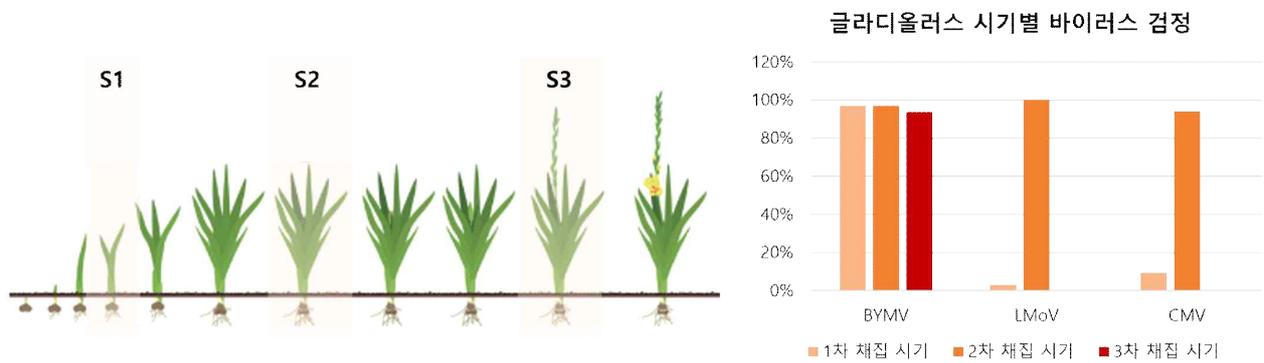


그림 56. 글라디올러스의 재배 과정에 따른 채집 시기와 시기별 바이러스 검정 결과. 글라디올러스 채집 시기는 3번으로 나누어 채집하였으며, 주요 바이러스인 BYMV, CMV, LMoV 3종의 바이러스를 RT-PCR 검정하였음. 검정 결과, 주로 BYMV가 감염한 것으로 나타났으며, S1 시기에는 BYMV만 대부분이 감염되었으나, 2차 시기에는 BYMV, CMV, LMoV 3종의 바이러스가 모두 높은 수준으로 검정되는 결과를 보임.

○ 핵산 추출 및 진단법 적용 방식에 의한 진단 결과 분석

- 구근 화해 식물인 백합과 글라디올러스의 구근에서 정밀하게 바이러스를 검정하기 위해서는 구근에서 효율적으로 RNA를 추출하는 것이 중요하여 3사의 RNA 추출 키트를 사용하여 구근에서 RNA를 추출하였을 시, RNA의 농도와 순도를 비교하였음(표 26과 27).
- 백합 구근에서 3사의 RNA 추출 키트의 추출 방식에 따라 추출된 RNA의 농도와 순도를 비교해 봤을 때, Q사의 추출 키트가 가장 높은 RNA 농도와 순도를 보이는 것을 확인하였으며, Phenol을 사용한 manual 방식은 추출된 RNA의 농도가 높지만 그만큼 순도가 확연히 낮은 것으로 보임.

표 26. 백합 구근 추출 방법에 따른 RNA nanodrop 농도 측정<sup>a</sup>

추출방법	G사		B사		Q사		manual			
ng/ul	49.23	24.85	37.47	44.19	57.89	52.07	82.11	61.18	95.17	225.79
A260/A280	2.14	2.21	2.13	2.12	2.09	2.08	2.01	2.02	1.99	1.69
A260/A230	1.65	1.84	1.89	0.51	1.34	1.33	1.96	1.86	1.83	1.12

<sup>a</sup> 3사의 RNA 추출 키트를 사용하여 구근에서 RNA를 추출하였을 시, RNA의 농도와 순도를 비교하였음

- 글라디올러스 구근에서 3사의 RNA 추출 키트의 추출 방식에 따라 추출된 RNA의 농도와 순도를 비교해 봤을 때, G사의 추출 키트가 가장 높은 RNA 농도를 보이는 것을 확인하였으며, Phenol을 사용한 manual 방식은 추출된 RNA의 농도가 높지만 그만큼 순도가 확연히 낮은 것으로 보임.

표 27. 글라디올러스 구근 추출 방법에 따른 RNA nanodrop 농도 측정<sup>a</sup>

추출방법	G사			B사			Q사			manual
ng/ul	989.94	1129.82	1048.68	855.45	928.42	482.47	400.04	464.70	826.63	1570.13
A260/A280	2.21	2.21	2.21	2.18	2.10	2.19	2.18	2.17	2.18	1.66
A260/A230	2.33	2.27	2.25	1.88	1.49	2.16	2.25	2.22	2.15	0.86

<sup>a</sup> 3사의 RNA 추출 키트를 사용하여 구근에서 RNA를 추출하였을 시, RNA의 농도와 순도를 비교하였음.

○ 유전자 정밀진단 및 현장 진단시스템 최적 조건 설정

- 유전자 정밀진단 또는 현장 진단시스템으로서 구근 화훼 작물인 백합과 글라디올러스에서 바이러스를 진단하기 위해 Recombinase polymerase amplification with lateral flow dipstick(RPA-LFD) 방법을 사용하였음.
- 백합은 주요 감염 바이러스인 CMV, LMoV, LSV, PIAMV를 대상으로 진행하였으며, 글라디올러스는 BYMV, CMV, LMoV를 주요 대상 바이러스로 RPA-LFD를 활용하기 위해 PRA용 진단 프라이머를 제작하였음(표 28, 표 29)

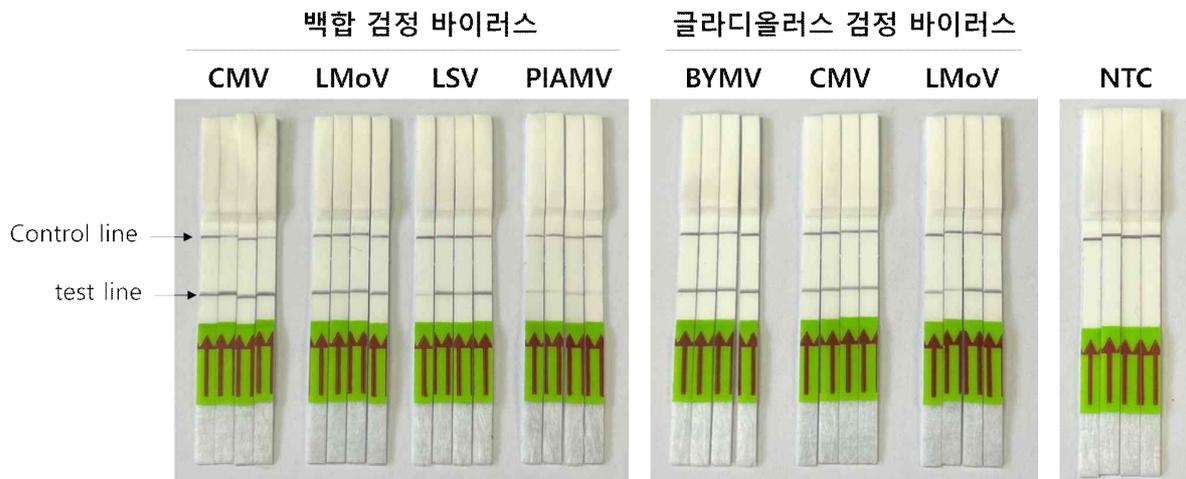
표 28. 백합 감염 바이러스를 정밀진단하기 위한 RPA 검정용 프라이머 및 프로브 서열 목록

Set name	Primer/Probe	Sequence (5'→ 3')
CMV	Forward primer	TCTTATTATGGTAAAAGGTTGTTATTACCTGATTC
	Reverse primer	[Biotin]TAGAATCAAATTTTCGGCAAAGGATTAAGTTCGAATT
	Probe	[FAM]TGATTCAGTCACGGAATATGATAAGAAGCTG-dSpacer-TTCGCGCATTCAAATTC
LMoV	Forward primer	GACCAAACAGATATTTCAAATACAAGGTCAA
	Reverse primer	[Biotin]CTAAATTTTGCTTCTCAATATAAGCTTCAGC
	Probe	[FAM]AGATCAGCAAGTTGAATTTCCCTTTACGTCCTA[dSpacer]ACTTGAACACGCAAACCC[C3 spacer]
LSV	Forward primer	AGAAACAAACAACCTAGTAAATTGCATAGAT
	Reverse primer	[Biotin] CCTAAGCTTCTAATCTAATTGTTCCATAC
	Probe	[FAM]TTGCGTGCGTATAATTGTCAAAAATAAGCAC[THF]GTGAAATCAGACGTGC
PIAMV	Forward primer	CAGGTAACGGTTCGTGATTTAGTTAAGTTC
	Reverse primer	[Biotin]TAGTTCCTTGAAAGTTGTTAGATGTTAGTGC
	Probe	[FAM]TCGTGATTTAGTTAAGTTCGGTGGTTCACCT[THF]CCTAACTCCGATTAACATG

**표 29. 글라디올러스 감염 바이러스를 정밀진단하기 위한 PRA 검정용 프라이머 및 프로브 서열 목록**

Set name	Primer/Probe	Sequence (5'→ 3')
BYMV	Forward primer	TCGTATTTAGAGTATCCGTCTTTAAATTCTCTATA
	Reverse primer	[Biotin]GAGTAGAGAGAATGATACACATACTGAATTTAAAA
	Probe	[FAM]TCTATAATTTGGCGTTACATTACTTAATACA[THF]GATTAGTAGGTTTCA
CMV	Forward primer	TCTTATTATGGTAAAAGGTTGTTATTACCTGATTC
	Reverse primer	[Biotin]TAGAATCAAATTTTCGGCAAAGGATTAACCTCGAATT
	Probe	[FAM]TGATTTCAGTCACGGAATATGATAAGAAGCTG-dSpacer-TTCGCGCATTCAAATTC
LMoV	Forward primer	GACCAAACAGATATTTCAAATACAAGGTCAA
	Reverse primer	[Biotin]CTAAATTTTGCTTCTCAATATAAGCTTCAGC
	Probe	[FAM]AGATCAGCAAGTTGAATTTCTTTACGTCCTA[dSpacer]ACTTGAACACGCAAAACC[C3 spacer]

- RPA-LFD는 40도의 온도로 약 15분간 정치한 뒤, 스트립을 반응시키면 즉시 바이러스의 감염을 진단할 수 있어 매우 빠르고, Taqman probe 기법을 사용하기에 매우 정밀하게 바이러스를 진단할 수 있음.
- 제작된 RPA-LFD 용 프라이머를 사용하여 바이러스를 검정하였을 때, 백합과 글라디올러스에서 모든 바이러스가 검정되는 것을 확인하였음(그림 57).



**그림 57. 백합과 글라디올러스의 RNA에서 주요 감염 바이러스 RPA 정밀진단 결과.** 백합 주요 바이러스 4종과 글라디올러스 주요 바이러스 3종의 감염을 RPA-LFD 방법을 사용하여 확인하였음. 진단된 바이러스 모두 control line과 test line 모두 검정된 것으로 나타났으며, non template control에서는 control line에서만 밴드가 확인되었음.

- 현장에서 진단 시, total RNA를 추출하지 않고 식물체의 잎의 즙액으로 RPA를 진행하였을 때, 백합과 글라디올러스에서 주요 감염 바이러스의 감염을 검정하였음(그림 58).
- total RNA 대신 사용될 식물 마쇄 방법을 막자사발을 사용한 방법과 지퍼백에서 마쇄하는 방법으로 나누어 바이러스의 검정을 진행하였음.
- 막자사발로 마쇄 시, 백합과 글라디올러스 모두 곱게 갈렸으나, 지퍼백에서 손으로 마쇄하는 방법은 잎의 마쇄가 특히 글라디올러스에서 잘 이루어지지 않는 것을 보임.
- 갈린 즙액을 사용하여 RPA-LFD의 방법을 통해 백합은 CMV와 LMoV, 글라디올러스는 BYMV, CMV와 LMoV를 진단하였음.



그림 58. 현장진단에서 마쇄방법을 통한 백합과 글라디올러스 감염 바이러스 진단 결과. 백합과 글라디올러스의 잎을 사용하여 현장 진단하기 위해, 2가지 마쇄 방법을 통해 바이러스를 검정하였음. 막자사발에 비해 지퍼백에서 마쇄한 경우 완전히 마쇄되지 않았지만, RPA-LFD는 막자사발과 지퍼백 마쇄 방법 모두 뚜렷하게 검정되는 것을 확인하였음.

#### 4. 현장현시 진단(POC)용 바이러스 항원 생산

- 구근 화훼류에 발생하는 주요 바이러스의 탐색 및 선정
  - Cucumber mosaic virus와 Lily mottle virus 두 바이러스가 공통으로 많이 감염하여 두 바이러스를 현장 현시 진단키트를 제작하기 위한 항원 생산 바이러스로 선정함.
  - Cucumber mosaic virus는 1,200종 이상의 굉장히 넓은 기주범위를 가지고 있으며, 혼합 감염되었을 시, 작물에 더 큰 피해를 미치기 때문에 cucumber mosaic virus를 항원 생산 대상 바이러스로 선정함.

- 클로닝 벡터 시스템을 통한 바이러스 항원 단백질 생산
  - 대상 바이러스인 CMV의 항원 단백질을 생산하기 위해, 단백질 발현 벡터인 pET-28a(+)에 제한효소를 사용하여 CMV의 외피단백질을 삽입하였음(그림 59).
  - N-terminal에 *Bam*HI, C-terminal에 *Xho*I의 제한효소를 사용해 벡터를 잘라 바이러스를 삽입하였으며, *Xho*I 뒤에 추가적으로 RGS His\*6를 넣어 항원 단백질을 생산하는데 효율을 높여 주었음.

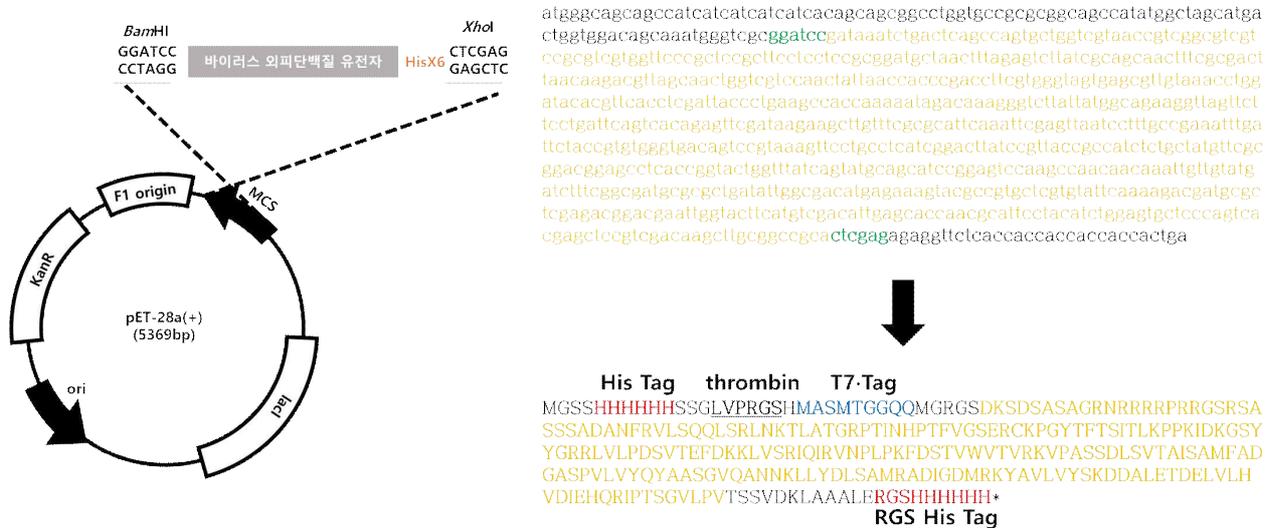


그림 59. CMV의 항원 단백질을 생산하기 위한 클로닝 벡터 시스템. pET28a(+) vector에 대상 바이러스인 CMV의 외피단백질을 *Bam*HI과 *Xho*I을 사용하여 삽입하였음. 바이러스를 삽입한 후, 벡터내 삽입된 바이러스 외피단백질 서열을 시퀀싱한 결과, 제대로된 바이러스 서열이 삽입되었으며, 그 외의 His tag도 모두 온전히 존재하는 것을 확인하였음.

## 5. 구근 화훼류별 통합 진단시스템 구축

- 백합, 글라디올러스 등의 국내 바이러스 발생 실태 분석
  - 전 세계적으로 22종의 바이러스가 백합에 감염한다고 보고되어 있음. 22종의 바이러스를 대상으로 53개의 백합 시료에 감염하는 바이러스를 검정했을 때, 약 51%의 백합 시료가 lily mottle virus에 가장 많이 감염하는 것을 확인하였음. 또한, cucumber mosaic virus와 lily symptomless virus도 각각 약 41%와 43%로 백합에서 우점하는 바이러스로 나타남.
  - 전 세계적으로 16종의 바이러스가 글라디올러스에 감염한다고 보고되어 있음. 16종의 보고된 바이러스를 대상으로 99개의 글라디올러스 시료에 감염하는 바이러스를 검정했을 때, 약 54%의 글라디올러스가 bean yellow mosaic virus에 가장 많이 감염하는 것을 확인하였음. 또한, 보고된 바이러스 이외의 lily mottle virus가 BYMV 다음으로 44.4%로 가장 많이 검정되었으며, cucumber mosaic virus도 약 25%로 감염하는 것으로 나타남.
  - 백합은 4종의 바이러스인 lily mottle virus, cucumber mosaic virus, lily symptomless virus, plantago asiatica mosaic virus가 주로 발생하는 바이러스로 확인되며, 글라디올러스는 bean yellow mosaic virus, cucumber mosaic virus, lily mottle virus가 주로 발생하는 바이러스로 나타남.
  - 또한 두 작물 모두 바이러스의 복합감염률이 높는데, 바이러스가 복합 감염할수록 작물에 나타나는 병징의 세기가 강해지기 때문에, 바이러스가 많이 감염되어 있을수록 바이러스에 의한 작물에 피해가 클 것으로 예상됨.
  - 백합과 글라디올러스의 감염하는 주요 바이러스들의 주된 전염 방식은 구근 또는 진딧물이기 때문에, 바이러스에 의한 피해를 최소화하기 위해, 바이러스가 감염하지 않은 구근을 사용하거나, 진딧물에 대한 방제가 필요할 것으로 사료됨.
- 현장 및 실험실용 개별 및 다중진단법 체계 구축
  - 현장에서 백합과 글라디올러스에서 바이러스를 진단할 경우, 잎의 즙액만으로도 충분히 바이러스가 검정되는 것을 확인할 수 있었으며, 단시간내에 신속하게 바이러스를 정밀히 검정한 결과를 보임.
  - 실험실내에서는 백합과 글라디올러스에 감염하는 바이러스를 RT-PCR 진단법을 통해 바이러스를 검정할 수 있었으며, 백합은 CMV, LMoV, LSV, PLAMV 4종의 바이러스의 다중 진단을 진행하였음. 글라디올러스는 BYMV, CMV, LMoV 3종의 바이러스의 다중 진단을 통해 단일 바이러스를 검정했을 시보다 시간을 단축할 수 있었음.
- ICT 기술 접목하여 진단체계의 유기적 연결
  - ICT 기술을 접목하기 위해, 현장에서 채집한 백합과 글라디올러스의 다양한 병징 사진을 선 발하였으며, 각각의 바이러스에 의한 병징을 구분하기 위해, 병징과 검정된 바이러스의 목록을 제공하였음(그림 60).



### 3) 제2공동연구기관: (주) 씨더스 농업회사법인

#### 1. 바이러스 분석 시스템 구축(분석 파이프라인 알고리즘)

##### ○ 백합 등 구근류 작물에 최적화된 분석 파이프라인 알고리즘 개발

- 백합 등 구근류 작물에 감염된 바이러스를 탐색하기 위하여 최적화된 total RNA에서 바이러스 유전체 서열 확보를 확보하고자 함.
- Sequencing reads의 pre-processing 단계
  - 바이러스가 감염된 기주식물과 함께 total RNA를 이용하여 rRNA를 제거 후 sequencing 된 RNA short reads의 pre-processing 과정을 위하여 SolexaQA package의 DynamicTrim 과 LengthSort 프로그램을 사용함. DynamicTrim은 phred score에 따라 short read의 양 쪽 끝의 bad quality base를 잘라내고 양질의 cleaned read로 정제하는 과정을 수행하며, LengthSort는 DynamicTrim에서 너무 많은 base가 잘린 read를 제거하는 과정을 수행함. DynamicTrim의 phred score  $\geq 20$ 을, LengthSort 과정은 short read length  $\geq 25$ bp을 기준으로 사용함.
- Filtering plant sequences 단계
  - Sequencing을 통해서 생산된 데이터에는 숙주인 백합 등의 서열이 다량 포함되어 있고 바이러스 유전자 서열이 포함되어 있어, 숙주 식물의 유전자 서열을 최대한 제거하는 것이 감염된 바이러스 유전체 서열 확보에 중요함.
  - 일반적으로 포함된 식물 유전체 서열을 제거하고 virus에서 유래된 short read를 확보하기 위하여 생산된 short read 식물 유전체 서열에 raw read mapping하여 제거하는 과정을 수행하나 글라디올러스와 백합의 유전체가 보고되지 않아 raw read mapping 방식을 적용하기는 불가능한 상황임.
- *de novo* Transcriptome Assembly 단계
  - 전처리 과정을 통과한 cleaned reads을 이용해 Trinity 프로그램의 기본 protocol에 따라 *de novo* assembly를 수행함.
  - 본 어셈블리 과정을 지나면서 식물 유래의 mRNA, 바이러스 유래 바이러스지놈, tRNA, ncRNA 등 다양한 종류의 RNA 염기서열 정보를 확보함.
  - 따라서, 바이러스 유래 서열만을 골라내는 것에 주의가 요구됨.
- 식물 contig 서열 filtering 단계
  - Assembled transcripts내 포함되어 있을 수 있는 식물 유래의 서열을 파악하기 위해 NCBI의 식물 nucleotide 서열 정보를 DB화 하여 서열 유사도 비교를 수행함. 서열 비교는 BLASTN 프로그램을 이용하여 탐지하는 방법을 수행하며 적정 유사도는 e-value, identity, coverage 등의 다양한 파라미터를 고려하여 단계적 완화 과정을 통해 적정수준을 결정함.
- 바이러스 contig 서열 검출 및 annotation 단계
  - 식물유래 contig를 제외시킨 후 나머지 contig에서 바이러스 DB내 서열과의 BLASTN의 비교를 통해 annotation을 수행함. NCBI에 등록된 전체 서열 중에서 바이러스 DB를 별도로 작성함. 바이러스 유래 서열을 확인하는 과정도 e-value, identity, coverage 등의 다양한 파라미터를 고려하여 높은 수준에서 점차로 완화하면서 바이러스 계놈의 후보서열을 결정함.
- 감염된 식물체 내 바이러스의 정량분석
  - 생산된 바이러스 염기 서열의 비율의 측정함.
  - 확인된 바이러스 별로 구성하는 비율을 측정함으로써 우점하는 바이러스가 어느 종인지 판단함(그림 1).

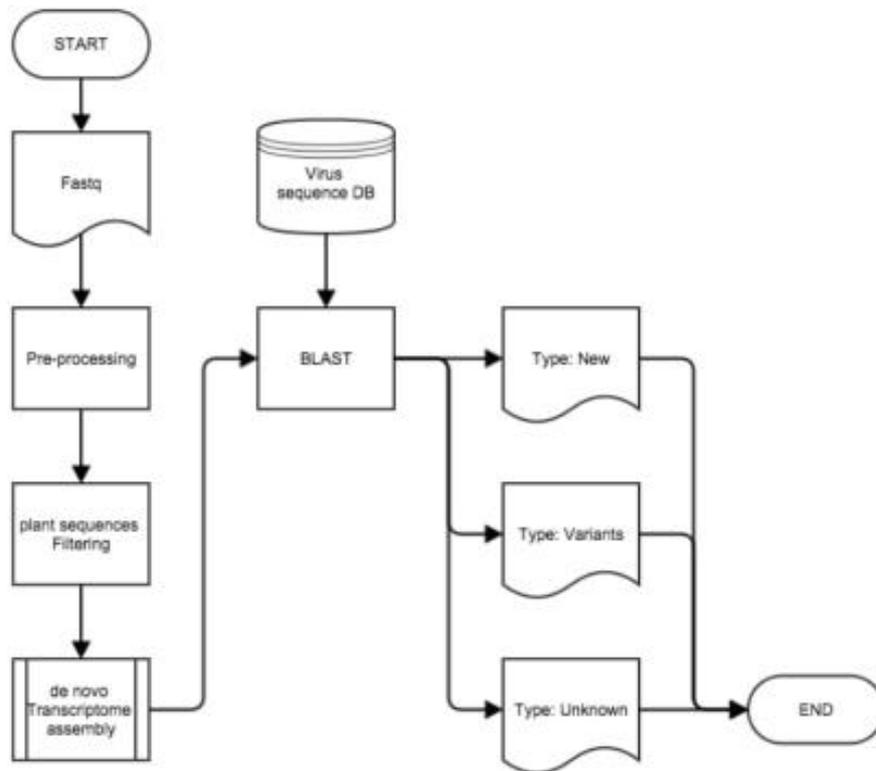


그림 1. 식물에 감염된 total RNA로부터 바이러스 서열 확보를 위한 분석 모식도. 위 모식도는 식물에 감염된 총 RNA로부터 바이러스 서열을 확보하기 위한 분석 절차를 나타냄. 과정은 Fastq 형식의 데이터로 시작하여, 전처리를 거쳐 식물 sequence를 필터링함. 그 후 *de novo* transcriptome assembly를 통해 draft genome을 조립하고, 조립된 데이터는 'BLAST'를 통해 바이러스 서열 데이터베이스와 비교함. 이 비교를 통해 식별된 바이러스는 새로운 타입, 변종, 또는 알려지지 않은 타입으로 분류되어 최종적인 결과를 제공함.

## 2. 전사체를 통해서 바이러스 NGS 생물정보 분석

○ 백합, 글라디올러스 NGS 전사체 데이터 생산

- RNA-sequencing을 위해 바이러스가 감염된 글라디올러스 잎 1샘플과 백합 시료 2개 샘플에서 total RNA를 분리하여 샘플 QC를 진행함.

#	Library Name	Library Type	Conc. (ng/ul)	Conc. (nM)	Size (bp)	Result*	
1	Gladiolus_leaf	TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plant	46.9	198	332	Pass	
2	Lily_mild_sym	TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plant	79.8	324	348	Pass	
3	Lily_severe_sym	TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plant	81.5	364	313	Pass	

그림 2. 바이러스 감염 글라디올러스, 백합 total RNA QC 결과. 바이러스에 감염된 글라디올러스와 백합의 total RNA 품질 검사(QC) 결과를 나타낸 표임. RIN값과 rRNA Ratio는 RNA 샘플의 품질과 순도를 평가하는 중요한 지표로, 1번과 3번 샘플이 PASS로 확인됐으며, 2번 샘플 RIN값이 6.5로 HOLD로 판정되어 다음 단계 실험에서 주의를 요함.

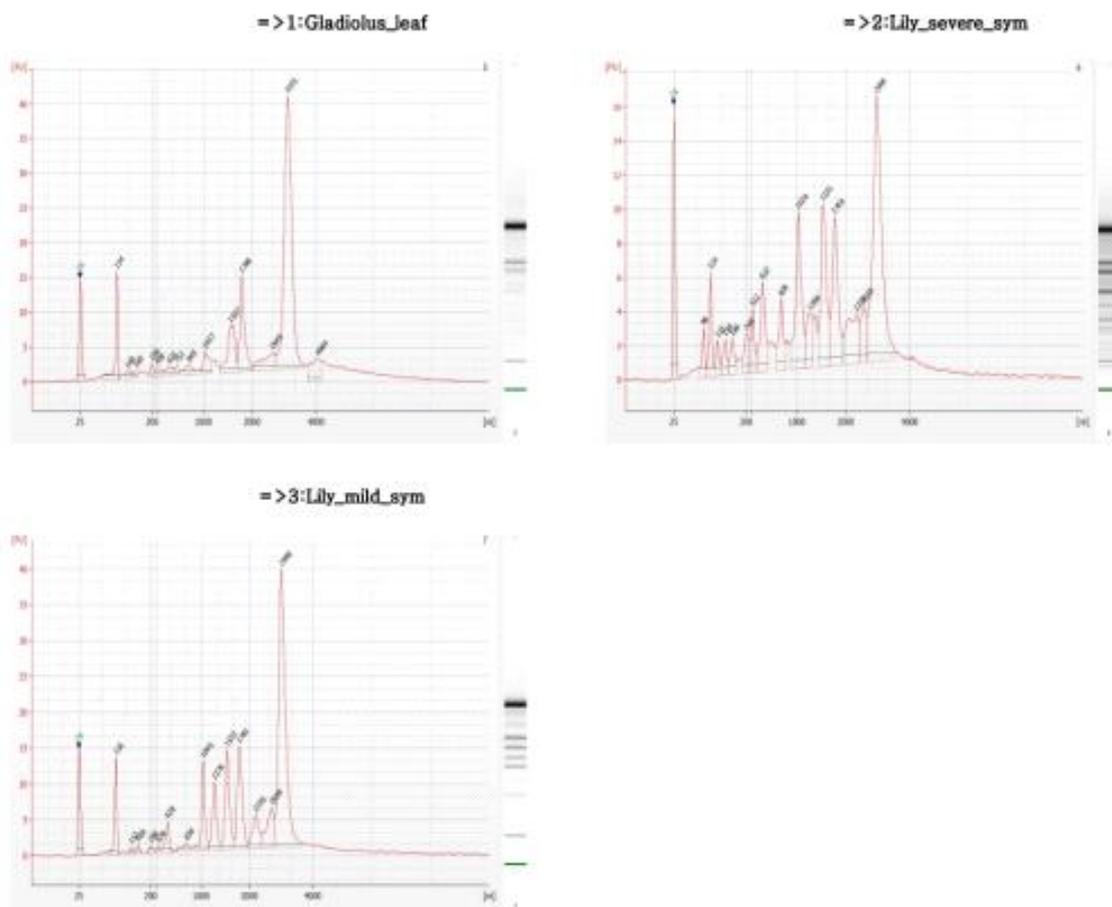


그림 3. 바이러스 감염 글라디올러스, 백합 total RNA 샘플 QC 결과 (Bioanalyzer). 바이러스에 감염된 글라디올러스와 백합의 총 RNA 샘플의 품질 검사(QC) 결과를 Bioanalyzer를 사용한 결과임. 적절한 RNA 농도와 Integrity을 평가하기 위해 분석을 진행함. 그래프의 높은 피크는 RNA 샘플 중 rRNA를 나타내며, 이는 샘플의 높은 순도를 시사하며 후속 실험에 적합한 샘플이 준비되었음을 보여줌.

#	Sample Name	Conc. (ng/ul)	Final Volume (ul)	Total Amount (ug)	RIN	rRNA Ratio	Result*	
1	Gladiolus_leaf	54.391	50	2.72	8	4.9	Pass	
2	Lily_severe_sym	27.146	50	1.357	6.5	3.4	Hold	RIN
3	Lily_mild_sym	36.588	50	1.829	7.9	3.1	Pass	

그림 4. 3개 샘플의 RNA 라이브러리 제작 및 QC 결과. TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plant 타입으로 3개의 Library를 제작함. 3개의 RNA 라이브러리 모두 적절한 농도와 200~300bp 내외의 크기를 가지고 있으므로 다음 시퀀싱 단계를 진행에 적합한 것으로 판단함.

- 바이러스가 감염된 글라디올러스 잎 1샘플과 백합 시료 2개 샘플에서 total RNA를 TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plant 키트를 이용하여 라이브러리를 작성함 (그림 3, 4).
- 식물 RNA 중 rRNA가 대부분을 차지하고 있어서 total RNA에서 ribosomal RNA만을 제거하고 나머지 RNA를 이용하여 라이브러리를 작성하여 sequencing을 실시함.

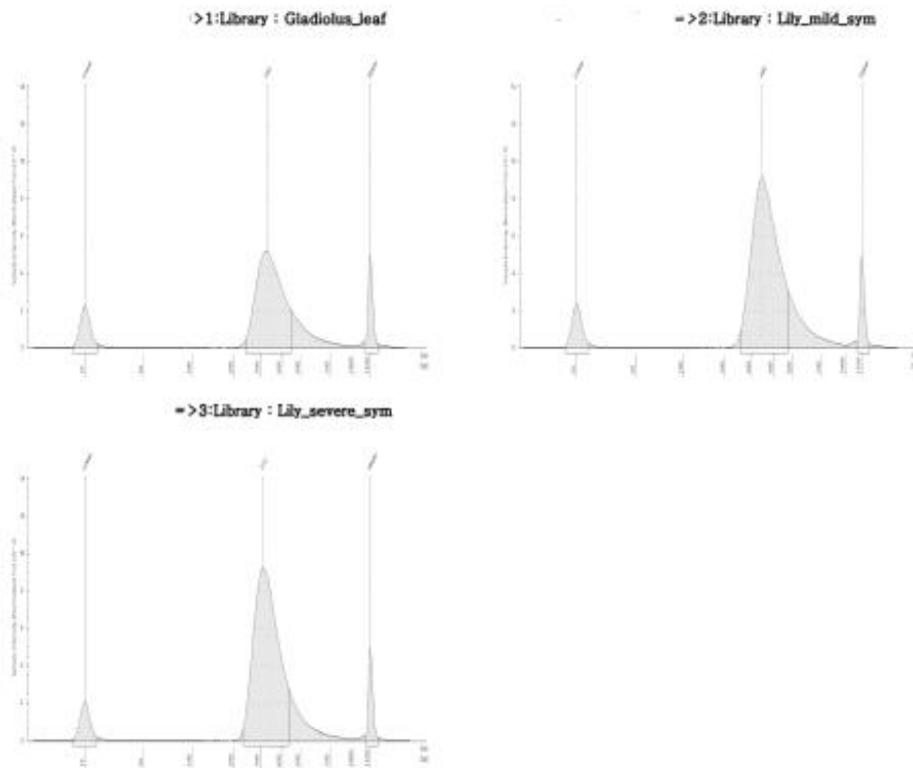


그림 5. 3개 샘플의 RNA 라이브러리 제작 및 QC 결과 (TapeStation D1000 Screen Tape). TapeStation D1000 ScreenTape을 사용하여 얻은 세 RNA 라이브러리 샘플의 제작 및 품질 검사 (QC) 결과를 나타내는 전기영동 프로파일임. 깨끗한 단일 피크가 RNA 라이브러리의 좋은 품질을 나타내므로 3개 라이브러리 모두 특정 크기가 범위 내에 균일하게 분포되어 있음을 의미함. 이는 시퀀싱 과정에서 균등한 reads를 얻기 적합할 것으로 판단함.

- 바이러스가 감염된 글라디올러스 잎 1샘플과 백합 시료 2개의 RNA 시퀀싱을 실시함.
- RNA 시퀀싱 데이터가 샘플 당 27-40Gb 생산되었으며, 분석을 위한 전처리를 진행한 결과 샘플 당 17-22Gb 정도의 cleaned reads 가 확보되어 이후 분석에 사용함(표 1).

**표 1. 백합과 글라디올러스 RNA sequencing 결과 통계치**

File name	No. of reads	Aver. length	Total length (bp)	No. of reads	Aver. length	Total length (bp)	%
Gladiolus_leaf_1	264,516,361	151	39,941,970,511	96,675,810	121.75	11,770,232,750	29.47%
Gladiolus_leaf_2	264,516,361	151	39,941,970,511	96,675,810	111.45	10,774,490,770	26.98%
Lily_mild_sym_1	226,124,337	151	34,144,774,887	73,907,387	123.43	9,122,238,137	26.72%
Lily_mild_sym_2	226,124,337	151	34,144,774,887	73,907,387	112.77	8,334,676,709	24.41%
Lily_severe_sym_1	179,998,767	151	27,179,813,817	75,403,748	125.72	9,480,028,700	34.88%
Lily_severe_sym_2	179,998,767	151	27,179,813,817	75,403,748	113.18	8,534,023,522	31.40%
<b>Total</b>	<b>1,341,278,930</b>	<b>151</b>	<b>202,533,118,430</b>	<b>491,973,890</b>	<b>118.05</b>	<b>58,015,690,588</b>	<b>28.97%</b>

- 글라디올러스 잎 1개와 백합 시료 2개의 RNAseq 데이터를 이용하여 *de novo* transcriptome assembly를 실시함(표 2).
- 3샘플 각각의 gene set 확보를 위해 Trinity (<https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq/wiki>)를 이용해 *de novo* transcriptome assembly를 수행함. 서열의 길이 통계는 다음과 같음.

**표 2. 백합과 글라디올러스 assembles transcripts 통계**

Sample	No. of transcripts	Total length (bp)	Min	Max	Aver.	N50
Gladiolus_leaf	64,756	74,289,447	500	26,206	1,147	1,324
Lily_mild_sym	55,416	60,469,539	500	32,606	1,091	1,243
Lily_severe_sym	148,692	147,436,960	500	18,561	991	1,034

- 확보된 3샘플 각 gene set을 NT virus DB에 BLASTX (filter 기준 : e-value  $\leq 1e-10$ , best hits)로 annotation을 수행함. Annotation된 종(species)의 분포는 아래 표와 같음.
- 글라디올러스 내에 존재하는 바이러스를 살펴보면 papaya mosaic virus가 가장 높은 빈도로 존재하고 있었으며 이외에도 white spot syndrome virus, pittosporum cryptic virus, bean yellow mosaic virus, cowpea polerovirus, narcissus latent virus 등 총 95종의 바이러스가 검출되어 다양한 바이러스가 동시에 감염되어 있는 것으로 확인되었음(표 3).

표 3. 글라디올러스 샘플(Gladiolus\_leaf)에 존재하는 바이러스 annotation

Species	No. of genes	Total read count
Papaya mosaic virus	2	15,082,101
White spot syndrome virus	8	14,008,063
Pittosporum cryptic virus-1	1	10,538,959
Bean yellow mosaic virus	5	2,402,197
Cowpea polerovirus 2	1	2046614
Narcissus latent virus	1	1117277
Ornithogalum mosaic virus	1	630,717
Dickeya phage phiDP10.3	16	602,565
Stealth virus 1	5	115,298
Bat circovirus POA/2012/V	1	57,325
Grapevine associated narnavirus-1	1	41,213
Moraxella phage Mcat16	2	23,269
Soybean leaf-associated endornavirus 1	1	22,707
Dickeya phage phiDP23.1	1	18,920
Bovine viral diarrhea virus 1	1	9,244
Botrytis virus F	3	8,928
Escherichia phage sp.	1	8,341
Bat SARS-like coronavirus	17	4,006
Sclerotinia sclerotiorum umbra-like virus 3	1	3,039
uncultured hypovirus	2	1074
Cucumber mosaic virus	4	893
Alternaria alternata chrysovirus 1	1	750
Guanarito mammarenavirus	1	333
Phage 21	1	295
Tomato spotted wilt tospovirus	1	215
Sclerotinia nivalis mitovirus 1	2	209
Klebsiella phage ST13-OXA48phi12.1	1	200
Erwinia phage ENT90	1	183
BtRs-BetaCoV/YN2013	1	176
Human gammaherpesvirus 4	2	140
Proteus phage VB_PmiS-Isfahan	1	102
Klebsiella phage ST16-OXA48phi5.1	1	80
Botrytis cinerea mitovirus 1	1	75
Botrytis cinerea mitovirus 3	2	72
Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 3	1	64
Lily symptomless virus	1	34
Soybean leaf-associated mitovirus 2	1	30
Botrytis cinerea mitovirus 1 S	1	30
<b>Total</b>	<b>95</b>	<b>46,765,738</b>

- 백합에 감염된 바이러스 분석은 병징이 심각한 시료와 육안으로 병징이 매우 적은 시료를 NGS 분석을 통하여 비교분석함.
- 병징이 미비한 시료에서는 총 46종의 바이러스가 탐지되었으며 가장 우점하는 바이러스는 cucumber mosaic virus로 나타났고 다음으로 lily symptomless virus가 우점하고 있는 것으로 확인됨(표 4, 5).
- 바이러스 병징이 심각하게 나타났던 시료에서는 총 45종의 바이러스가 검출되었고 우점하는 바이러스는 병징이 심하지않은 시료와 동일하게 cucumber mosaic virus와 lily symptomless virus가 높은 빈도로 관찰됨.
- 병징이 심한 시료와 미비한 시료간에는 cucumber mosaic virus satellite RNA가 의미있는 발현을 보이는 것으로 확인하여 추가적인 연구를 협동연구팀에서 수행함.

표 4. 백합 샘플(Lily\_mild\_sym)내 바이러스 annotation 결과

Species	No. of genes	Total read count
Cucumber mosaic virus	5	15,618,754
Lily symptomless virus	5	9,694,889
Lily mottle virus	13	626,626
Lily virus A	5	339,620
Stealth virus 1	1	267,175
White spot syndrome virus	4	59,005
Pittosporum cryptic virus-1	1	13,832
Citrus exocortis Yucatan viroid	1	3,096
Dickeya phage phiDP10.3	3	502
Proteus phage VB_PmiS-Isfahan	1	450
Hepatitis B virus	1	388
Guanarito mammarenavirus	1	370
Dickeya phage phiDP23.1	1	239
Bat SARS-like coronavirus	3	238
Dahlia mosaic virus	1	66
<b>Total</b>	<b>46</b>	<b>26,625,250</b>

표 5. 백합 샘플(Lily\_severe\_sym) annotation 결과

Species	No. of genes	Total read count
Cucumber mosaic virus	9	20,145,332
Lily symptomless virus	6	6,997,793
Stealth virus 1	2	1,249,331
Cucumber mosaic virus satellite RNA	1	416,629
Soybean leaf-associated endornavirus 1	1	408,553
Lily virus A	4	318,876
Lily mottle virus	7	314,614
White spot syndrome virus	2	3,375
Pittosporum cryptic virus-1	1	1,892
Dickeya phage phiDP10.3	3	1,260
Dahlia mosaic virus	2	1,168
Dickeya phage phiDP23.1	1	221
Guanarito mammarenavirus	1	209
Bat SARS-like coronavirus	3	138
Moraxella phage Mcat16	1	132
Proteus phage VB_PmiS-Isfahan	1	59
<b>Total</b>	<b>45</b>	<b>29,859,582</b>

- 글라디올러스와 백합에 보고된 바이러스 목록(글라디올러스 15종, 백합 14종)에 존재하는 바이러스가 본 실험에서 검출 여부를 파악하고 read count를 통해 분포 밀도를 파악함.
- 국내 글라디올러스 검역 병해충으로 지정되어있는 바이러스(8종)는 조사된 시료에서는 존재하고 있지 않은 것으로 파악함(표 6).
- 국내 백합 검역 병해충으로 지정되어 있는 바이러스(7종) 또한 본 시료에서는 존재하지 않은 것으로 파악됨(표 7-9).

표 6. 국내 글라디올러스에 보고된 바이러스 목록

종	No	Gene id	Read count	NT_viruses				
				Evalue	Identity	Accession No.	Description	Species
<i>Arabidopsis mosaic virus</i>	일치항목 없음							
<i>Bean common mosaic virus</i>	일치항목 없음							
<i>Bean yellow mosaic virus</i>	7	TRINITY_DN153_c0_g1_i7	1905431	0	96	AB079886.1	Bean yellow mosaic virus genomic RNA, complete genome, strain:M11	Species:Bean yellow mosaic virus
	41	TRINITY_DN538_c0_g1_i1	260504	0	95	U47033.1	Bean yellow mosaic potyvirus polyprotein mRNA, complete cds	Species:Bean yellow mosaic virus
	118	TRINITY_DN1207_c0_g1_i2	92731	0	99	KF155420.2	Bean yellow mosaic virus isolate CK-GL5, complete genome	Species:Bean yellow mosaic virus
	122	TRINITY_DN3687_c0_g1_i1	90301	0	99	KF155420.2	Bean yellow mosaic virus isolate CK-GL5, complete genome	Species:Bean yellow mosaic virus
	214	TRINITY_DN35034_c0_g1_i1	53230	0	99	HG970856.1	Bean yellow mosaic virus gene for polyprotein, isolate ES69C	Species:Bean yellow mosaic virus
<i>Clover yellow vein virus</i>	일치항목 없음							
<i>Cucumber mosaic virus</i>	13,677	TRINITY_DN98079_c0_g1_i2	744	0	99	AJ296154.1	Cucumber mosaic cucumovirus 3a gene for movement protein and cp gene for coat protein, genomic RNA	Species:Cucumber mosaic virus
	51,104	TRINITY_DN37768_c0_g1_i1	60	0	100	AJ276583.1	Cucumber mosaic virus (Lily strain) 2a gene for replicase, genomic RNA	Species:Cucumber mosaic virus
	55,425	TRINITY_DN140776_c0_g1_i1	48	0	99	AB506795.1	Cucumber mosaic virus RNA 1, complete sequence, strain: Li	Species:Cucumber mosaic virus
	58,417	TRINITY_DN72596_c0_g1_i1	41	0	99	MH360232.1	Cucumber mosaic virus isolate C6 segment RNA2 RdRp (ORF1) and 2b protein (ORF2) genes, complete cds	Species:Cucumber mosaic virus
<i>Cycas necrotic stunt virus</i>	일치항목 없음							
<i>Impatiens necrotic spot virus</i>	일치항목 없음							
<i>Ornithogalum mosaic virus</i>	15	TRINITY_DN877_c0_g1_i4	630717	0	98	KU981083.1	Ornithogalum mosaic virus isolate Taeaan, complete genome	Species:Ornithogalum mosaic virus
<i>Tobacco necrosis virus</i>	일치항목 없음							
<i>Tobacco rattle virus</i>	일치항목 없음							
<i>Tobacco ringspot virus</i>	일치항목 없음							
<i>Tobacco streak virus</i>	일치항목 없음							
<i>Tomato aspermy virus</i>	일치항목 없음							
<i>Tomato black ring virus</i>	일치항목 없음							
<i>Tomato ringspot virus</i>	일치항목 없음							
<i>Tomato spotted wilt virus</i>	27,167	TRINITY_DN101077_c0_g1_i1	215	0	98.86	DQ376184.1	Tomato spotted wilt virus isolate VE430 nonstructural protein (NSs) and nucleocapsid (N) genes, complete cds	Species:Tomato spotted wilt tospovirus

표 7. 국내 백합에 보고된 바이러스 목록 (1)

종	No	Gene id	Read count	NT viruses				
				Evalue	Identity	Accession No.	Description	Species
<i>Apple stem grooving virus</i>	mild, severe	일치항목 없음						
<i>Arabid mosaic virus</i>	mild, severe	일치항목 없음						
<i>Broad bean wilt virus</i>	mild, severe	일치항목 없음						
<i>Cucumber mosaic virus</i>	mild	TRINITY_DN248_c0_g2_i1	8,943,826	0.00E+00	99.28	AJ495841.1	Cucumber mosaic virus from Lily, Korean isolate, complete genomic segment RNA3	Species:Cucumber mosaic virus
		TRINITY_DN248_c0_g1_i1	3,278,600	0.00E+00	98.5	AB506798.1	Cucumber mosaic virus RNA 1, complete sequence, strain: LiCB	Species:Cucumber mosaic virus
		TRINITY_DN248_c0_g4_i3	2,827,720	0	99.41	AB506799.1	Cucumber mosaic virus RNA 2, complete sequence, strain: LiCB	Species:Cucumber mosaic virus
		TRINITY_DN16823_c0_g1_i3	392,553	9.00E-124	98.06	HG965233.1	Cucumber mosaic virus MP gene for Movement protein, isolate Ghatasni	Species:Cucumber mosaic virus
		TRINITY_DN29720_c0_g1_i1	176,055	1.00E-74	99.37	KU976463.1	Cucumber mosaic virus isolate PV-1016 coat protein (CP) gene, complete cds	Species:Cucumber mosaic virus
	severe	TRINITY_DN296_c1_g1_i3	8,960,118	0.00E+00	99.44	AB506797.1	Cucumber mosaic virus RNA 3, complete sequence, strain: Li	Species:Cucumber mosaic virus
		TRINITY_DN296_c0_g2_i1	5,841,775	0	99.09	AB506798.1	Cucumber mosaic virus RNA 1, complete sequence, strain: LiCB	Species:Cucumber mosaic virus
		TRINITY_DN296_c0_g1_i5	4,232,438	0.00E+00	99.38	AJ276583.1	Cucumber mosaic virus (Lily strain) 2a gene for replicase, genomic RNA	Species:Cucumber mosaic virus
		TRINITY_DN18305_c0_g1_i2	607,954	0	96.47	MH360229.1	Cucumber mosaic virus isolate C3 segment RNA1 replicase (ORF1) gene, complete cds	Species:Cucumber mosaic virus
		TRINITY_DN52597_c0_g1_i2	274,620	3.00E-118	97.98	MH360229.1	Cucumber mosaic virus isolate C3 segment RNA1 replicase (ORF1) gene, complete cds	Species:Cucumber mosaic virus
		TRINITY_DN14673_c0_g1_i1	175,618	2.00E-73	98.74	LC066452.1	Cucumber mosaic virus genomic RNA, segment: 3, complete sequence, isolate: TYD083J	Species:Cucumber mosaic virus
		TRINITY_DN22248_c0_g1_i1	26,117	9.00E-50	97.5	MG696854.1	Cucumber mosaic virus isolate San_Vicente1 segment RNA1, complete sequence	Species:Cucumber mosaic virus
		TRINITY_DN29868_c0_g1_i1	14,135	5.00E-47	99.07	LC066489.1	Cucumber mosaic virus genomic RNA, segment: 1, complete sequence, isolate: IRN-WRN15	Species:Cucumber mosaic virus
		TRINITY_DN80763_c5_g1_i1	12,557	8.00E-41	97.09	AB506795.1	Cucumber mosaic virus RNA 1, complete sequence, strain: Li	Species:Cucumber mosaic virus
		<i>Iris yellow spot orthotospovirus</i>	mild, severe	일치항목 없음				
<i>Lily latent virus</i>	mild, severe	일치항목 없음						
<i>Lily mild mosaic virus</i>	mild, severe	일치항목 없음						

표 8. 국내 백합에 보고된 바이러스 목록 (2)

종	No	Gene id	Read count	NT_viruses				
				Evalve	Identity	Accession No.	Description	Species
<i>Lily mottle virus</i>	mild	TRINITY_D N110_c0_g 2_i5	356,186	0	92.36	AM048875.1	Lily mottle virus complete genome, genomic RNA, isolate SMi	Species:Lily mottle virus
		TRINITY_D N188_c0_g 1_i1	43,531	0	87.56	JN127341.2	Lily mottle virus isolate Bate5, complete genome	Species:Lily mottle virus
		TRINITY_D N110_c1_g 3_i1	39,343	0	97.94	MH360244.1	Lily mottle virus isolate C7 polyprotein (ORF1) gene, complete cds; and PIPO (ORF2) gene, partial cds	Species:Lily mottle virus
		TRINITY_D N4547_c0_g 1_i1	30,673	0	97.72	HM222521.1	Lily mottle virus strain LMoV-DL, complete genome	Species:Lily mottle virus
		TRINITY_D N1250_c0_g 1_i1	27,238	0	98.42	HM222521.1	Lily mottle virus strain LMoV-DL, complete genome	Species:Lily mottle virus
		TRINITY_D N329_c0_g 1_i8	24,289	0	97.71	HM222521.1	Lily mottle virus strain LMoV-DL, complete genome	Species:Lily mottle virus
		TRINITY_D N110_c1_g 2_i1	23,508	0	99.25	HM222521.1	Lily mottle virus strain LMoV-DL, complete genome	Species:Lily mottle virus
		TRINITY_D N110_c1_g 1_i1	18,948	0	96.86	HM222521.1	Lily mottle virus strain LMoV-DL, complete genome	Species:Lily mottle virus
		TRINITY_D N43940_c0_g 1_i1	15,558	0	92.47	JN127341.2	Lily mottle virus isolate Bate5, complete genome	Species:Lily mottle virus
		TRINITY_D N6010_c0_g 1_i1	14,568	0	99.62	HM222521.1	Lily mottle virus strain LMoV-DL, complete genome	Species:Lily mottle virus
		TRINITY_D N1605_c0_g 1_i3	13,659	0	96.75	MH360245.1	Lily mottle virus isolate C8 polyprotein (ORF1) gene, complete cds; and PIPO (ORF2) gene, partial cds	Species:Lily mottle virus
		TRINITY_D N22_c1_g1_i1	10,560	0	89.41	JN127341.2	Lily mottle virus isolate Bate5, complete genome	Species:Lily mottle virus
		TRINITY_D N10052_c0_g 1_i2	8,565	0	96.54	JQ361115.1	Lily mottle virus isolate LMoV-GZ P1 protein gene, partial cds	Species:Lily mottle virus
	severe	TRINITY_D N8_c0_g1_i10	221,146	0.00E+00	97.52	AM048875.1	Lily mottle virus complete genome, genomic RNA, isolate SMi	Species:Lily mottle virus
		TRINITY_D N802_c0_g 1_i1	41,440	0	88.64	JN127341.2	Lily mottle virus isolate Bate5, complete genome	Species:Lily mottle virus
		TRINITY_D N1195_c0_g 1_i1	18,610	0	91.47	JN127341.2	Lily mottle virus isolate Bate5, complete genome	Species:Lily mottle virus
		TRINITY_D N33411_c1_g 1_i1	11,914	0	98.48	MH360245.1	Lily mottle virus isolate C8 polyprotein (ORF1) gene, complete cds; and PIPO (ORF2) gene, partial cds	Species:Lily mottle virus
		TRINITY_D N3253_c0_g 1_i3	11,385	0	96.95	AB570195.1	Lily mottle virus RNA, complete genome, isolate: ML61	Species:Lily mottle virus
		TRINITY_D N1098_c0_g 1_i5	7,023	0	96.38	MH360245.1	Lily mottle virus isolate C8 polyprotein (ORF1) gene, complete cds; and PIPO (ORF2) gene, partial cds	Species:Lily mottle virus
		TRINITY_D N94555_c0_g 1_i1	3,096	0	96.6	MH360245.1	Lily mottle virus isolate C8 polyprotein (ORF1) gene, complete cds; and PIPO (ORF2) gene, partial cds	Species:Lily mottle virus

(계속)

<i>Lily symptomless virus</i>	mild	TRINITY_D N233_c0_g 1_i2	8,035,179	0	98.13	AJ516059.1	Lily symptomless virus complete genome	Species:Lily symptomless virus
		TRINITY_D N12999_c1 _g1_i1	628,255	0	97.32	HM222522.1	Lily symptomless virus strain LSV-DL, complete genome	Species:Lily symptomless virus
		TRINITY_D N1874_c0_ g1_i1	418,454	0	99.27	MH360246.1	Lily symptomless virus isolate A RdRp (ORF1), TGB1 (ORF2), TGB2 (ORF3), TGB3 (ORF4), CP (ORF5), and 16 kDa protein (ORF6) genes, complete cds	Species:Lily symptomless virus
		TRINITY_D N16658_c0 _g1_i2	310,905	0	97.04	AJ516059.1	Lily symptomless virus complete genome	Species:Lily symptomless virus
		TRINITY_D N4434_c0_ g1_i1	302,096	0	98.15	AJ516059.1	Lily symptomless virus complete genome	Species:Lily symptomless virus
	severe	TRINITY_D N220_c0_g 1_i4	5,410,504	0	98.91	MH360246.1	Lily symptomless virus isolate A RdRp (ORF1), TGB1 (ORF2), TGB2 (ORF3), TGB3 (ORF4), CP (ORF5), and 16 kDa protein (ORF6) genes, complete cds	Species:Lily symptomless virus
		TRINITY_D N4110_c0_ g1_i3	425,843	0	97.69	AJ516059.1	Lily symptomless virus complete genome	Species:Lily symptomless virus
		TRINITY_D N2037_c0_ g1_i1	399,813	0.00E+00	97.18	GU440579.1	Lily symptomless virus isolate LSV- <i>jj</i> , complete genome	Species:Lily symptomless virus
		TRINITY_D N10019_c0 _g1_i1	271,797	0	97.64	HM222522.1	Lily symptomless virus strain LSV-DL, complete genome	Species:Lily symptomless virus
		TRINITY_D N64732_c0 _g1_i2	249,089	0	98.13	AJ516059.1	Lily symptomless virus complete genome	Species:Lily symptomless virus
		TRINITY_D N41961_c0 _g1_i1	240,747	0	98.37	MH360246.1	Lily symptomless virus isolate A RdRp (ORF1), TGB1 (ORF2), TGB2 (ORF3), TGB3 (ORF4), CP (ORF5), and 16 kDa protein (ORF6) genes, complete cds	Species:Lily symptomless virus

표 9. 국내 백합에 보고된 바이러스 목록 (3)

종	No	Gene id	Read count	NT_viruses				
				Evalue	Identity	Accession No.	Description	Species
<i>Lily virus A</i>	mild	TRINITY_DN110_c0_g1_i2	191,282	0.00E+00	94.72	JN127335.2	Lily virus A isolate Bate1 polyprotein gene, partial cds	Species:Lily virus A
		TRINITY_DN22_c0_g1_i7	78,913	0	87.77	JN127335.2	Lily virus A isolate Bate1 polyprotein gene, partial cds	Species:Lily virus A
		TRINITY_DN221_c1_g1_i1	32,789	7.00E-97	92.46	JN127335.2	Lily virus A isolate Bate1 polyprotein gene, partial cds	Species:Lily virus A
		TRINITY_DN720_c0_g1_i1	30,110	0	86.96	JN127335.2	Lily virus A isolate Bate1 polyprotein gene, partial cds	Species:Lily virus A
		TRINITY_DN8182_c0_g1_i1	6,526	5.00E-94	96.28	JN127335.2	Lily virus A isolate Bate1 polyprotein gene, partial cds	Species:Lily virus A
	severe	TRINITY_DN8_c1_g1_i3	245,874	0	93.22	JN127335.2	Lily virus A isolate Bate1 polyprotein gene, partial cds	Species:Lily virus A
		TRINITY_DN36676_c0_g1_i1	47,104	0	85.59	JN127335.2	Lily virus A isolate Bate1 polyprotein gene, partial cds	Species:Lily virus A
		TRINITY_DN560_c0_g2_i1	14,761	5.00E-176	91.57	JN127335.2	Lily virus A isolate Bate1 polyprotein gene, partial cds	Species:Lily virus A
		TRINITY_DN1195_c0_g2_i1	11,137	0	95.77	JN127335.2	Lily virus A isolate Bate1 polyprotein gene, partial cds	Species:Lily virus A
	<i>Lily virus X</i>	mild, severe	일치항목 없음					
<i>Narcissus mosaic virus</i>	mild, severe	일치항목 없음						
<i>Plantago asiatica mosaic virus</i>	mild, severe	일치항목 없음						
<i>Rembrandt tulip breaking virus</i>	mild, severe	일치항목 없음						
<i>Shallot yellow stripe virus</i>	mild, severe	일치항목 없음						
<b><i>Strawberry latent ringspot virus</i></b>	mild, severe	일치항목 없음						
<b><i>Tobacco necrosis virus</i></b>	mild, severe	일치항목 없음						
<b><i>Tobacco rattle virus</i></b>	mild, severe	일치항목 없음						
<b><i>Tobacco ringspot virus</i></b>	mild, severe	일치항목 없음						
<b><i>Tomato ringspot virus</i></b>	mild, severe	일치항목 없음						
<i>Tomato spotted wilt virus</i>	mild, severe	일치항목 없음						
<i>Tulip breaking virus</i>	mild, severe	일치항목 없음						
<i>Turnip mosaic virus</i>	mild, severe	일치항목 없음						

○ RNA-sequencing을 위한 RNA 샘플 추출

- RNA-sequencing을 위해 툴립 구근 4개 샘플에서 total RNA를 분리하여 샘플 QC를 진행함(그림 6).

Denovix Nanodrop					
No	Sample	Con. (ng/ul)	260/280	260/230	Result
1	툴립 구근 1	368.843	2	2.21	Pass
2	툴립 구근 2	383.273	1.99	2.19	Pass
3	툴립 구근 3	236.475	1.97	2.15	Pass
4	툴립 구근 4	271.432	1.98	2.22	Pass

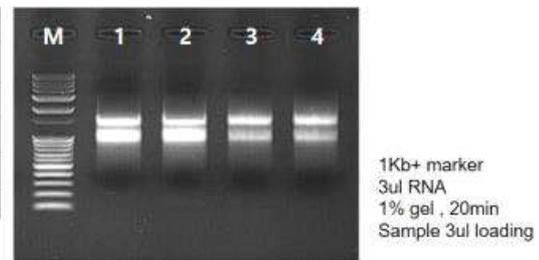


그림 6. 툴립 구근 RNA 추출 결과. RNA 추출 샘플의 품질을 Nanodrop 장비와 gel 전기영동을 통해 확인한 결과임. Nanodrop 결과는 RNA 샘플의 농도를 나타내며, 260/280과 260/230 비율은 샘플의 순도에 관한 정보를 제공함. 이상적인 순도를 나타내는 260/280 비율은 2.0에 가까우며, 260/230 비율은 일반적으로 2.0 이상이면 순도가 좋다고 평가함. 모든 샘플이 'Pass' 결과를 받았으며, gel 전기영동 이미지의 밝은 밴드는 RNA가 잘 추출되었고 후속 실험을 위한 샘플의 적합성을 보여줌.

- RNA 추출 결과 농도와 순도가 기준값을 만족하여 QC를 진행함(권장농도 : 100 ng 이상/μl, total vol.: 20 μl, A260/A280 1.9~2.1)
- Agilent 2100 BioAnalyzer를 이용한 concentration와 RIN(RNA Integrity Number) 값 측정 결과, 4샘플 RNA 모두 기준값 이상을 만족하여 library 제작을 진행함(그림 7, 8).

No	Sample or Kit	Result	Concentration (ng/μL)		Volume (μL)	Quantity (μg)		Purity	
			BioAnalyzer	NanoDrop		BioAnalyzer	NanoDrop	RIN	28s/18s
<b>S1 RNA Sequencing — TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit (Eukaryotes)</b>									
<b>Sample requirements</b>			≥ 65	≥ 65	N/A	≥ 1	≥ 1	≥ 6	N/A
1	툴립 구근1 Plant TN2209R2088(RNA)	pass	366	456.88	15	5.49	6.85	7.0	1.1
2	툴립 구근2 Plant TN2209R2089(RNA)	pass	387	465.36	15	5.81	6.98	6.4	1.0
3	툴립 구근3 Plant TN2209R2090(RNA)	pass	230	274.56	15	3.45	4.12	7.0	1.1
4	툴립 구근4 Plant TN2209R2091(RNA)	pass	282	318.08	15	4.23	4.77	6.7	1.1

그림 7. 툴립 구근의 RNA QC 분석. Agilent 2100 BioAnalyzer를 이용한 concentration와 RIN(RNA Integrity Number) 값을 측정하였음.

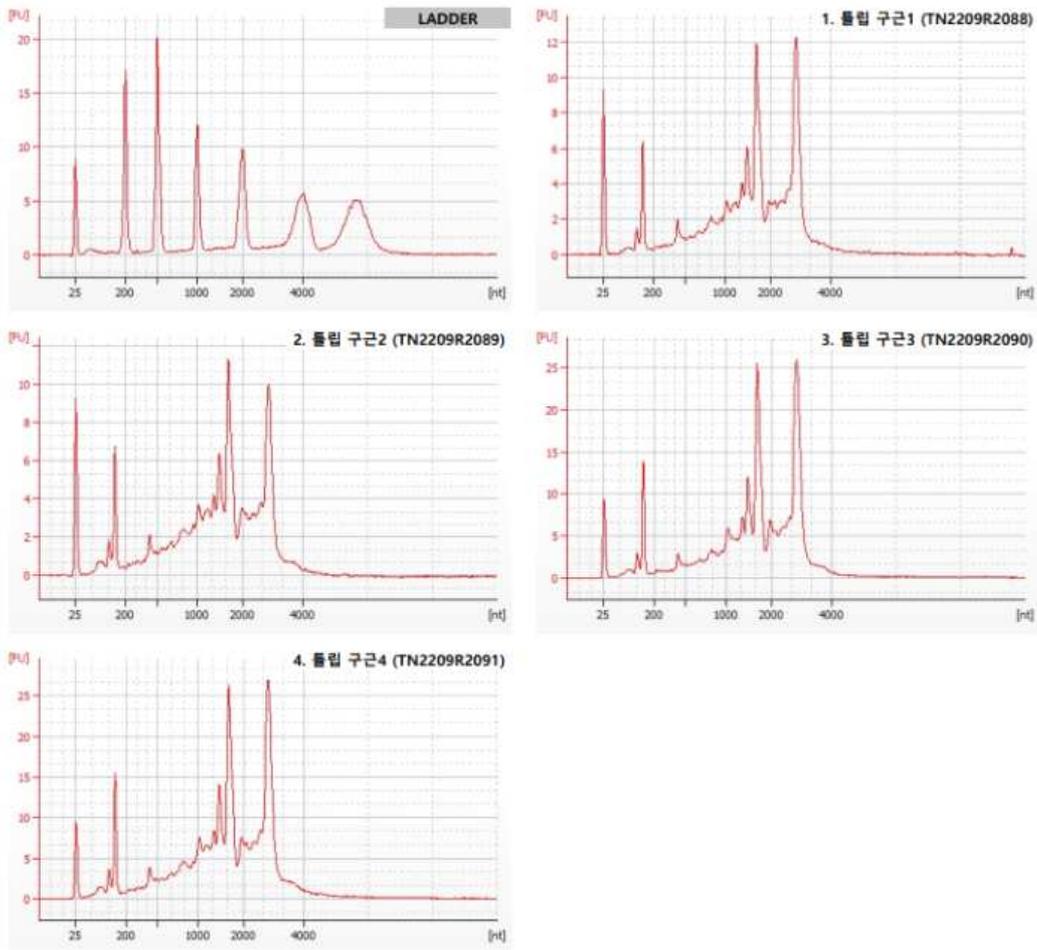


그림 8. 툴립 구근 RNA QC 결과 (Electropherograms). 툴립 구근에서 추출한 5개의 RNA 샘플의 품질 검사(QC) 결과임. 첫 번째 그래프는 사이즈 표준인 LADDER를 나타내며, 이어지는 그래프들은 각각의 샘플의 RNA Integrity을 보여줌. 각 샘플 그래프에서 주요 피크는 rRNA를 나타내며, 이 피크들의 명확함과 비율은 RNA의 무결성과 순도를 나타내는 지표임. 그래프의 baseline이 대체로 매끄럽고, 불필요한 노이즈 피크가 없으므로 RNA 샘플이 RNA 시퀀싱에 적합함을 나타냄.

- 툴립 구근 4개 샘플에서 total RNA를 TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plant 키트를 이용하여 라이브러리를 제작함 (그림 9, 10).
- 식물 RNA 중 rRNA가 대부분을 차지하고 있어서 total RNA에서 ribosomal RNA만을 제거하고 나머지 RNA를 이용하여 라이브러리를 제작하고, Agilent TapeStation 4200를 이용하여 라이브러리 QC를 진행한 결과 4샘플 모두 기준값 이상을 만족하여 시퀀싱을 진행함.

No	Delivery name	Theragen name	Concentration (ng/ $\mu$ L)	Volume( $\mu$ L)	Quantity (ng)	Main peak Size	Result
1	툴립 구근1	TN2209R2088	20.00	20	400.00	360	Pass
2	툴립 구근2	TN2209R2089	19.20	20	384.00	347	Pass
3	툴립 구근3	TN2209R2090	19.40	20	388.00	349	Pass
4	툴립 구근4	TN2209R2091	8.51	20	170.20	339	Pass

그림 9. 툴립 구근 RNA library 제작 후 QC 결과. TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plant 키트를 이용하여 라이브러리를 제작하였음.

### TapeStation image

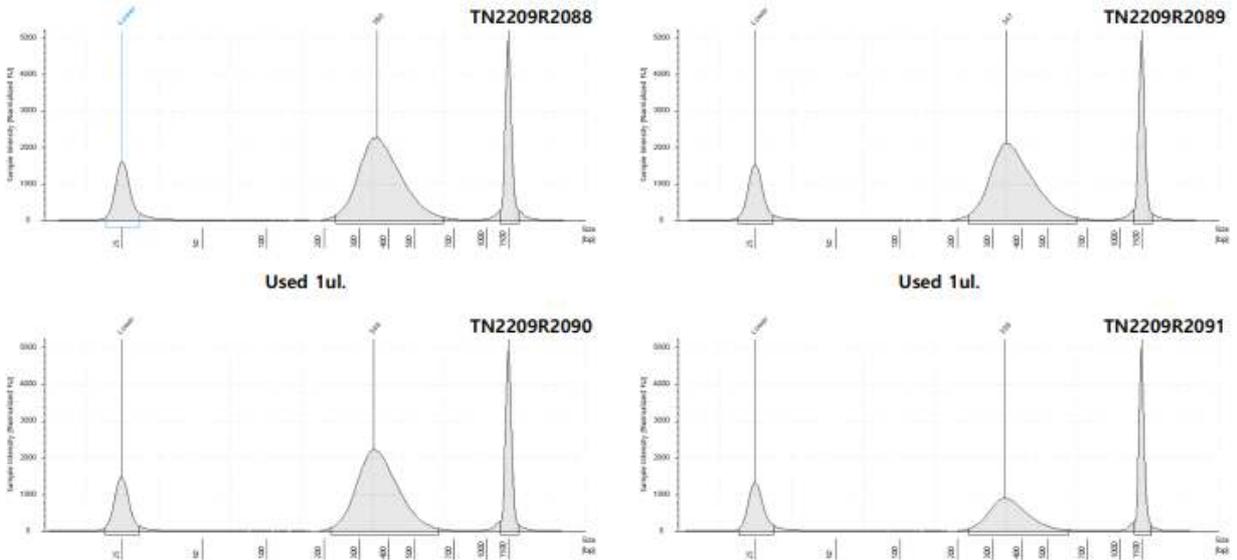


그림 10. 튤립 구근 RNA library 제작 후 QC 결과(TapeStation image). 튤립 구근에서 추출한 5개의 RNA 샘플의 품질 검사(QC) 결과임. 첫 번째 그래프는 사이즈 표준인 LADDER를 나타내며, 이어지는 그래프들은 각각의 샘플의 RNA Integrity을 보여줌. 각 샘플 그래프에서 주요 피크는 rRNA를 나타내며, 이 피크들의 명확함과 비율은 RNA의 무결성과 순도를 나타내는 지표임. 그래프의 baseline이 대체로 매끄럽고, 불필요한 노이즈 피크가 없으므로 RNA 샘플이 RNA 시퀀싱에 적합함을 나타냄.

- 튤립 구근 RNA 4개 샘플의 시퀀싱 데이터 생산이 완료된 결과는 아래와 같음(표 10).
- RNA 시퀀싱 데이터는 샘플 당 약 10Gb 생산되었으며, 분석을 위한 전처리를 진행한 결과 샘플 당 7~8Gb 정도의 cleaned reads 가 확보되어 이후 분석에 사용함.

표 10. 튤립 구근 RNA sequencing 결과 통계치

SampleID	TotalReads	TotalBases	GC (%)	Q30 (%)
Tulip_googeun1	68,475,964	10,339,870,564	49.05%	88.78%
Tulip_googeun2	68,655,338	10,366,956,038	49.36%	93.80%
Tulip_googeun3	69,457,638	10,488,103,338	51.67%	94.25%
Tulip_googeun4	69,130,116	10,438,647,516	50.65%	94.96%

- Transcriptome *de novo* assembly 실시
  - 튤립 구근 4샘플의 RNAseq 데이터를 이용하여 transcriptome *de novo* assembly를 실시함(표 11).
  - Assembly 데이터는 샘플 당 약 8만개 이상, 길이는 100Mb이상이 생산되었으며, 평균 길이는 약 1.2Kb임. 높은 N50값은 전사체의 길이가 일정한 것을 의미하므로 튤립 구근 4 샘플의 Assembly의 결과가 유의미함을 보임.

표 11. 튜립 구근 RNA *de novo* assembly 결과 통계치

Sample	Number of total transcripts	Total Length	MIN	MAX	AVG	N50
Tulip_googeun1	111,850	141,464,118	500	15,531	1,264	1,517
Tulip_googeun2	107,324	136,325,432	500	14,112	1,270	1,519
Tulip_googeun3	95,263	119,626,335	500	23,062	1,255	1,495
Tulip_googeun4	84,743	102,781,067	500	18,471	1,212	1,418

### 3. 확보한 바이러스 정보 DB화 및 웹 페이지 설계

#### ○ 웹 기반의 DATABASE 설계 및 개발

- 생산되는 데이터의 유형을 살펴보면 4종의 구근 화훼작물에 대하여 NGS를 통하여 감염된 RNA 바이러스 종류 확인 및 바이러스 서열 확보, 감염 조사된 지역, 품종명, 감염 바이러스, 감염 증상을 담은 사진을 확보하고 있음(그림 11).
- 조사되는 정보를 DB화하기 위해 작물정보, 바이러스 정보, 시료정보 3개의 테이블로 분류함. 3개의 테이블 정보를 구성하여 정보제공용 웹의 기본 정보로 활용하고자 함 (표 12, 13).

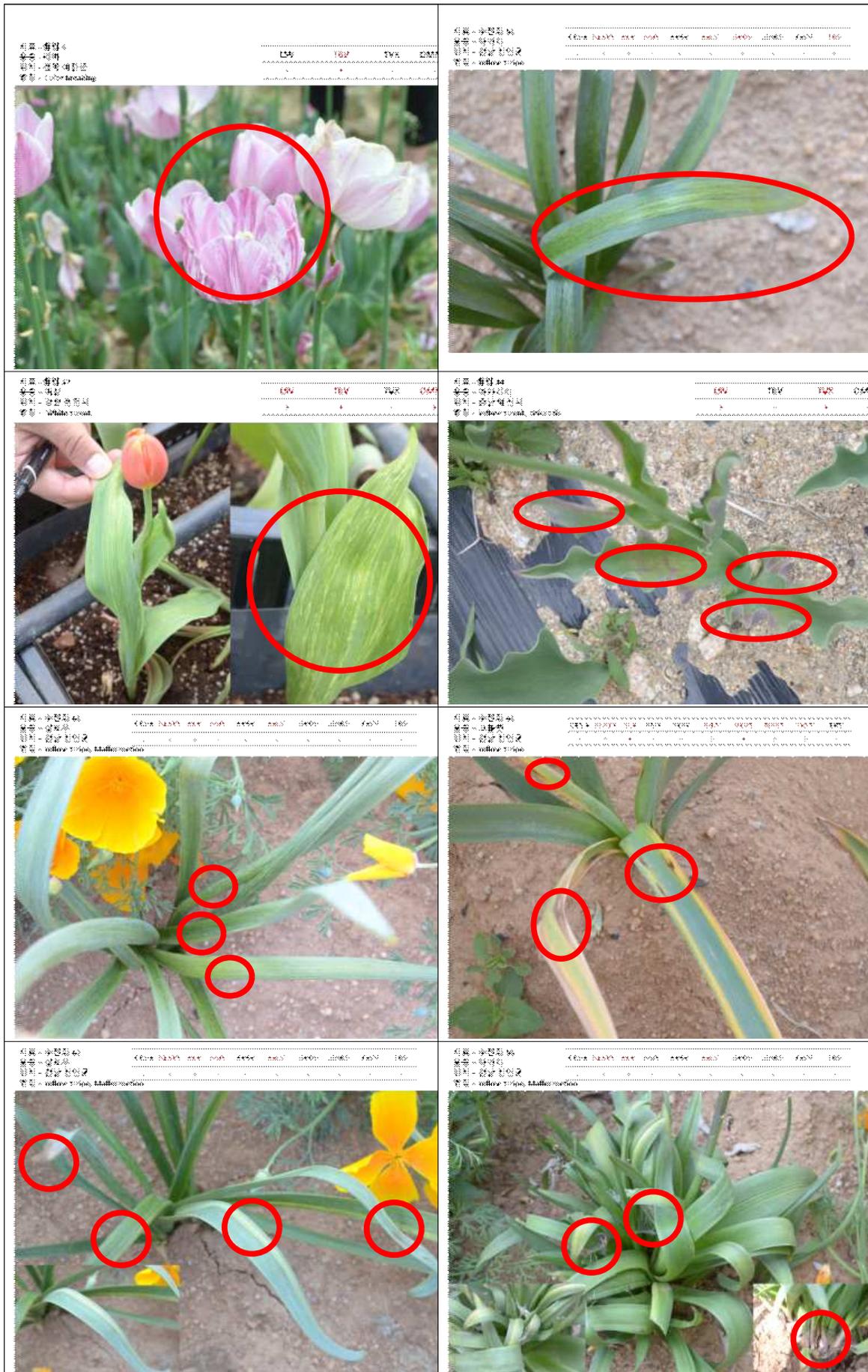


그림 11. 튤립과 수선화 시료 정보(품종별 병징). 바이러스 종류 확인, 조사된 지역, 품종명, 바이러스 병징 사진 등 정보를 지속적으로 확보하고 있음.

표 12. 지역별 튤립 시료 정보(품종별 병징) - 주관기관 제공<sup>a</sup>

시료	채집장소	품종	병징	바이러스				합계
				LSV	TBV	TVX	OMMV	
1	경북 예천군	살몬임프레션	Chlorosis	-	-	-	-	0
2	경북 예천군	살몬임프레션	Chlorosis	-	-	-	-	0
3	경북 예천군	살몬임프레션	Yellow streak	-	-	-	-	0
4	경북 예천군	살몬임프레션	Leaf malformation, Chlorosis	-	-	-	-	0
5	경북 예천군	리마	Color breaking	-	-	-	-	0

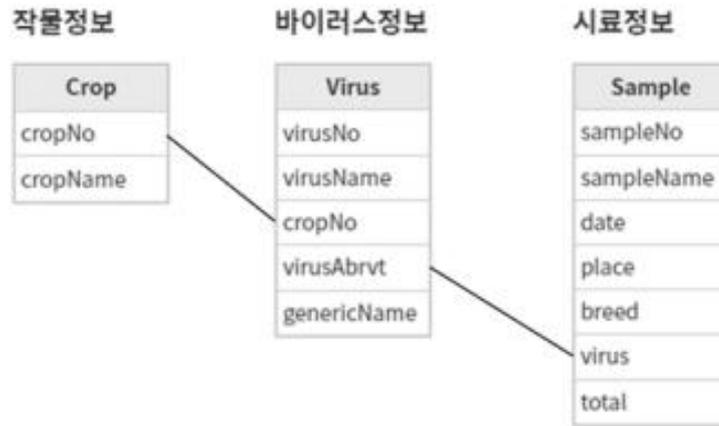
<sup>a</sup> LSV: *Lily symptomless virus*, TBV: *Tulip breaking virus*, TVX: *Tulip virus X*, OMMV: *Olive mild mosaic virus*.

표 13. 지역별 수선화 시료 정보(품종별 병징) - 주관기관 제공<sup>a</sup>

시료	채집장소	품종	병징	바이러스										합계
				CEVA	NLSYV	NLV	NMV	NYSV	NeLV	SnYV	JINRV	TuYV	TRV	
1	충남 예산시	리플리트	Yellow streak	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	3
2	충남 예산시	러브콜	Yellow streak	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	4
3	충남 예산시	테테아테테	Yellow streak	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	4
4	충남 예산시	케이타브르	Yellow streak	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	2
5	충남 예산시	테테아테테	Yellow streak	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	4
6	충남 예산시	러브콜	Yellow streak	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	4

<sup>a</sup> CEVA: *Cyrtanthus elatus virus A*, JINRV: *Japanese iris necrotic ring virus*, NLSYV: *Narcissus late season yellows virus*, NLV: *Narcissus latent virus*, NMV: *Narcissus mosaic virus*, NYSV: *Narcissus yellow stripe virus*, NeLV: *Nerine latent virus*, SVY: *Snowdrop virus Y*, TuYV: *Turnip yellow virus*.

- 웹 화면의 표현 방식을 작물종류에 따른 선택방식과 바이러스 종류에 따른 표현방식의 접근 방식에 대한 이용자 인식의 편리성 기준에 따라 첫 페이지의 구성을 설계함(그림 19).
- NGS 분석을 통해 감염된 바이러스 복잡도에 따라 바이러스의 종류 및 바이러스의 감염 정도를 정량적으로 표현함.
- 샘플의 상세정보를 함께 제공함으로써 현장에서 감염된 바이러스의 종류를 판단하는데 도움이 될 수 있도록 정보의 종류를 결정함(그림 20-22).
- 바이러스 서열 제공 여부는 필요성 및 활용 여부 등을 고려하여 복잡성을 해치지 않는 수준에서 제공함.



**그림 12. 웹 페이지 화면단 설계.** 웹 페이지의 데이터베이스 설계도를 나타냄. '작물정보', '바이러스정보', '시료정보' 세 가지 주요 데이터 Entity를 보여주며, 각각의 Entity는 다양한 속성들을 포함함. 예를 들어, '작물정보'는 작물번호(cropNo)와 작물명(cropName)을, '바이러스정보'는 바이러스 번호(virusNo), 이름(virusName), 작물 번호(cropNo), 약어(virusAbrvt), 그리고 학명(genericName), '시료정보'는 시료 번호(sampleNo), 시료명(sampleName), 날짜(date), 장소(place), 품종(breed), 바이러스(virus), 총계(total)를 포함함. 위의 설계도는 작물과 바이러스 간의 관계를 도식화함으로써, 구근화훼류에 대한 바이러스의 영향을 관리하고 추적하기 위한 웹 기반 시스템의 설계 구조를 표현함.



**그림 13. 화면단 메인페이지 예시.** 구근화훼류 바이러스 관리 시스템의 메인 페이지 디자인임. 페이지 상단에는 '홈', '소개', '바이러스', '도움말' 등의 탭으로 구성된 네비게이션 메뉴가 있으며, 이는 사용자가 시스템 내에서 쉽게 탐색할 수 있도록 돕는 기능을 함. 중앙에는 두 개의 이미지가 포함된 박스가 있으며, 이는 주요 기능으로 이동하는 링크임. 페이지 하단의 텍스트는 시스템 사용 방법 및 목적을 설명함. 이를 통해 사용자가 시스템을 효과적으로 활용할 수 있도록 정보를 제공함.

No.	바이러스 명	약어	속명
1	Lily symptomless virus	LSV	Carlavirus
2	Tulip breaking virus	TBV	Potyvirus

그림 14. 샘플 상세 정보 및 바이러스 종류 정보 제공 예시. 샘플에 대한 상세 정보와 각 샘플에 영향을 미치는 바이러스 종류를 제공하는 페이지로, 약어와 속명으로 바이러스의 정보를 표기함.

시료	채집날짜	채집장소	품종	병징	LSV	TBV	TVX	OMMV	합계
1	21.04.27	경북 예천군	살본영프레이션	Chlorosis	-	-	-	-	0
2	21.04.27	경북 예천군	리마	Color breaking	-	+	-	-	1

그림 15. 바이러스 감염 정도 정보 제공 예시. 수집된 샘플 데이터에 대한 정보를 제공하는 페이지로, 채집날짜, 채집장소, 품종, 병징, 바이러스 종류와 감염정도를 한 화면에 볼 수 있도록 구성함.

- 백합, 글라디올라스 등 생산된 raw data, 가공 데이터 가시화 툴 개발
  - 감염된 바이러스의 종류 및 감염된 바이러스 중 각 바이러스의 함량을 직관적으로 인식할 수 있도록 테이블 및 파이차트, 막대그래프 등으로 표현하기 위한 가시화단계를 준비함.

### 3. 구근화훼류 바이러스 현장진단을 지원하는 웹 페이지 구현 (2년차)

○ 구근화훼류 바이러스 통합진단 시스템용 웹 개발

- Web database : <http://fvirus.seeders.co.kr>
- 구근화훼류에서 발생하는 바이러스를 현장에서 최대한 빠르게 확인하고 관련된 데이터를 수집, 보관, 관리하기 위해서 활용할 수 있는 웹 페이지를 구축함.
- 본 웹사이트는 개발되고 있는 스마트폰용 앱과 연동되도록 설계가 되었으며 현장에서 앱을 통해 수집되는 위치정보, 사진정보, 현장진단 정보 등을 수집, 저장하도록 구현함.
- 바이러스 유전체 정보를 제공하여 신규 바이러스가 발생할 경우, 비교 분석할 수 있도록 과제를 통해 확보한 유전체 서열을 탐색할 수 있는 기능을 제공함.

표 14. 바이러스진단 ICT 웹사이트 기획개요

구분	내용
기획 서비스명	구근 화훼 류에 발생하는 바이러스 통합 진단을 위한 데이터 통합관리
기획 배경	- 세계시장에서 경쟁할 수 있는 고품질 구근 화훼류 생산과 유통을 위한 바이러스 병의 관리를 위해 통합 진단 시스템을 구축 - 수집한 데이터들을 통합적으로 관리하고 서치할수 있는 기능을 구현하게 됨
기획 목적	데이터의 통합, 관리를 통한 통계치 분석과 연구에 용이한 데이터 서치 기능 제공
기대 효과	연구 데이터들을 통합적으로 관리, 연구 데이터를 모아 새로운 가치 데이터의 발견
주요 기능	- 샘플, 바이러스, 병징 목록 - Blast 기능 제공 - 병징 이미지 분석 기능 - 통계치 제공 - NGS 분석 결과 제공
주요 예상 고객	- 구근화훼류 연구원 - 구근화훼류 농가농민 - 구근화훼류를 기르는 일반인
서비스 채널	웹

○ 웹 데이터베이스 메인페이지 개발

- 첫페이지는 본 페이지의 기본 목적을 설명함.
- 웹 데이터베이스 작물별로 작성되어 있어 작물 선택 시, 해당 작물에 해당하는 진단정보, 병징정보, 바이러스 정보를 제공함(그림 16).
- 진단정보를 선택하면 현장에서 수집하여 누적된 기존의 정보를 탐색할 수 있으며, 스마트폰 앱을 통해 확보되는 데이터가 누적되도록 설계함.
- 품종 혹은 병징에 따라 탐색이 가능하여 유사한 병징을 쉽게 탐색할 수 있음.



그림 16. 구근화훼류 바이러스 통합 진단 시스템 웹 화면(메인페이지). 구근화훼류 바이러스 통합 진단 시스템 웹사이트의 메인페이지로, 상단에는 메인 메뉴가 위치함. 메인 메뉴를 통해 사용자가 홈, 매뉴얼, 참고자료, BLAST 등의 다른 섹션으로 쉽게 이동할 수 있음. 페이지의 제목 아래에는 시스템의 소개가 있어 사용자에게 시스템의 목적, 작동원리, 사용 방법 등에 대한 개요를 얻을 수 있음. 시스템 모식도와 관련된 다이어그램을 제공하여 시각적으로 쉽게 정보를 전달함으로써 사용자가 데이터와 프로세스에 쉽게 접근할 수 있도록 도움.

○ 진단 목록 페이지 개발

- 진단용 앱으로 저장한 전체 시료 진단 목록 (그림 16)
- 병징/품종으로 진단 목록 조회 기능: 특정 품종을 선택하여 결과를 탐색하기 위한 기능으로 탐색의 편리성 기능으로 설치함.
- 병징을 체크하여 해당 되는 병징만 진단 목록 조회 기능: 자료가 많이 축적될 것을 대비하여 확인을 원하는 병징만을 선택하여 보다 편리하게 비교할 수 있는 기능임.
- 진단 상세정보 확인: 원하는 샘플을 선택하면 보다 상세한 정보를 팝업창을 통해 제공함. 샘플의 상세페이지를 선택하게 되면 추가적인 실험결과 등을 제공하고 있음(그림 17).

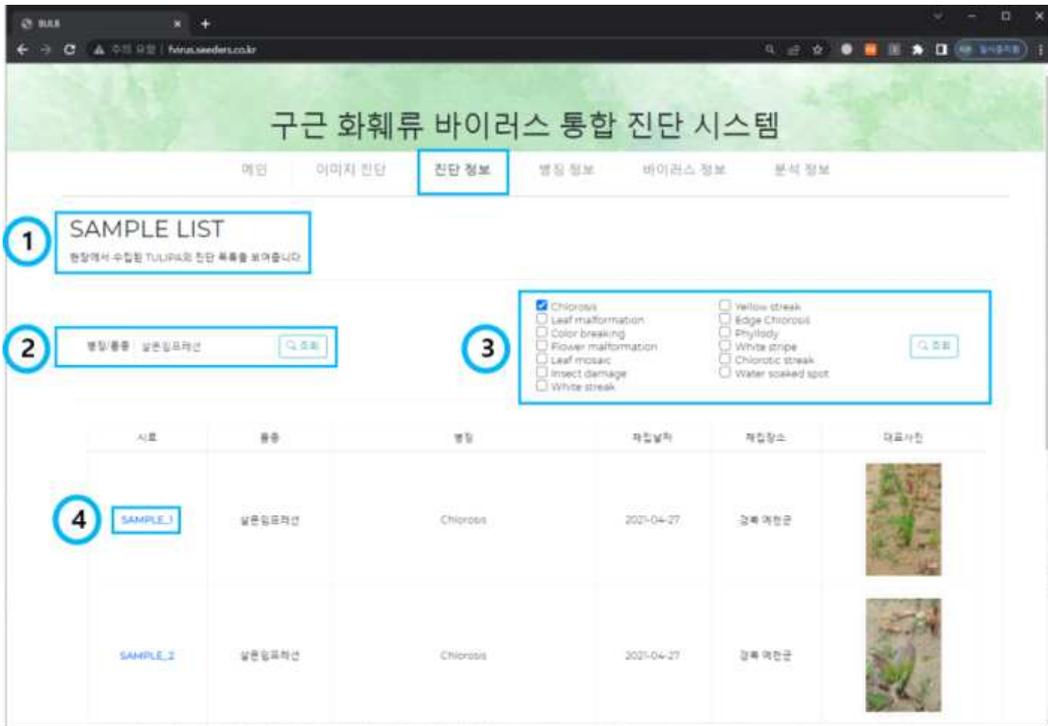


그림 17. 진단 정보 페이지. Sample List 제목과 시료 목록을 보여주는 테이블 형식의 레이아웃으로 구성하였으며, 사용자는 ‘① 시료 이름’과 ‘② 시료 기본 정보’를 확인할 수 있음. ‘③ 병징’의 체크박스를 통해 원하는 병징을 선택하여 관련 정보를 쉽게 검색할 수 있도록 구성함. ‘선택된 ④ 병징과 연관된 시료’를 선택하여 상세정보를 확인할 수 있는 팝업 기능을 제공함.

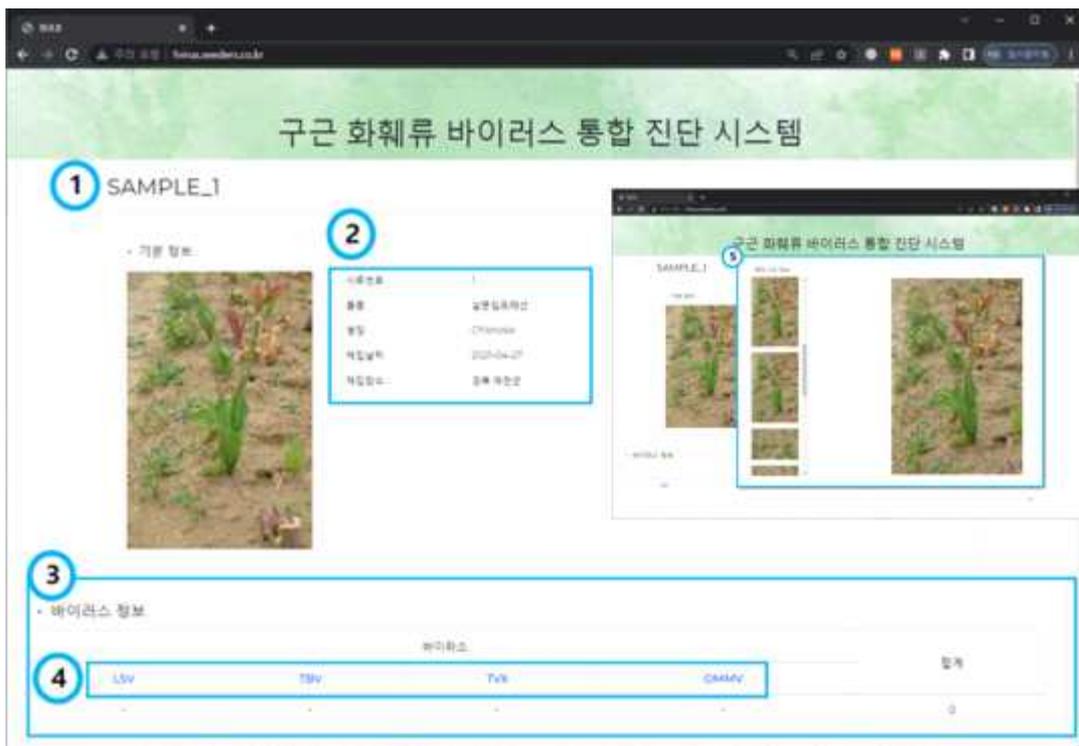


그림 18. 시료 상세 페이지. 시료의 상세페이지로 ‘① 시료 이름’, ‘② 시료 기본 정보’, ‘③ 바이러스 진단 정보’, ‘④ 바이러스명’, ‘⑤ 진단한 시료의 상세 정보’로 구성됨. 사용자가 구체적인 시료에 대한 상세한 정보와 진단 결과를 쉽게 이해하고 접근할 수 있도록 구성함.

○ 이미지진단 기능 구현

- CNN알고리즘을 통해 학습된 모델을 설치하여 현장에서 수집된 사진정보를 이용하여 분석할 수 있는 기능을 구현함. 모델이 고도화될수록 지속적인 업그레이드를 통해 개선해나갈 수 있도록 해당 페이지를 디자인함(그림 19, 20).

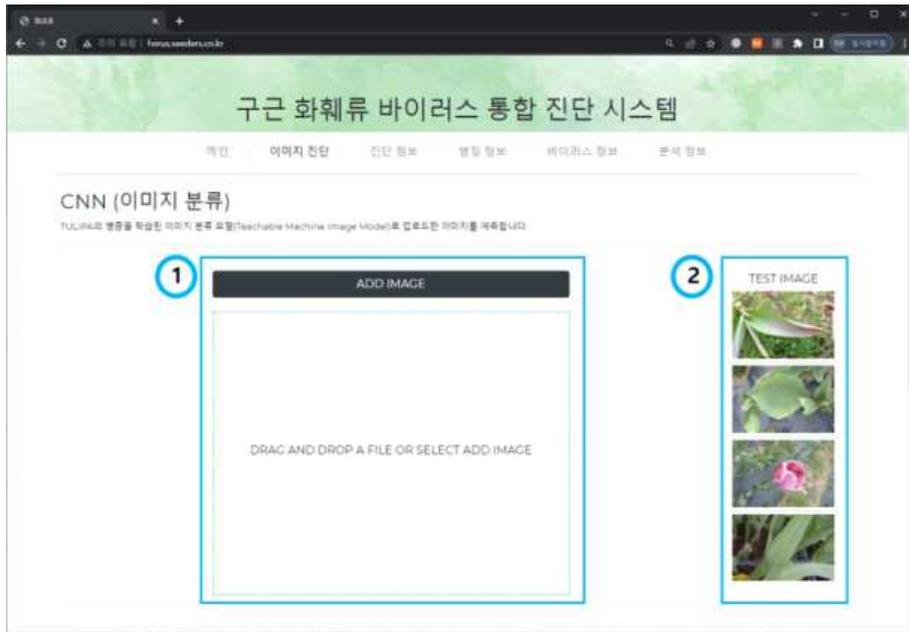


그림 19. 이미지 진단 페이지. CNN 이미지 분석 페이지로, 사용자가 진단을 위한 시료 ‘① 이미지를 업로드 할 수 있는 영역’ 과 ‘② 테스트 이미지를 제공’ 함. 해당 기능은 사용자가 바이러스 감염 여부 판단을 하기 위해 이미지를 시스템에 제공하고, 딥러닝 모델을 사용하여 자동으로 분석하도록 설계함. 이미지 인풋에는 버튼 클릭과 드래그 앤 드랍 기능을 구현함.

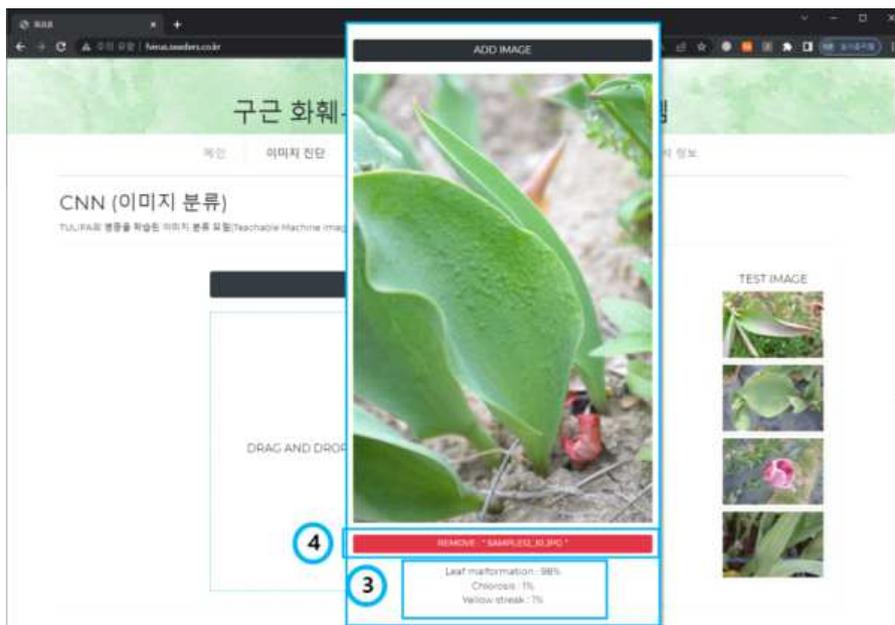


그림 20. 이미지 진단 페이지(진단 결과). 이미지 진단 결과 페이지는 ‘③ 이미지 진단 결과’와 ‘④ 다른 이미지 테스트 기능’으로 구현함. 진단 결과는 CNN 이미지 분류 모델에 따라 확률이 가장 높은 확률을 가지는 병징(증상) 순으로 결과를 표시함.

○ 병징정보 페이지 구현

- 병징정보를 선택하면 수집되어 병징정보를 비교할 수 있어 판단에 도움을 주고자 함(그림 21, 22).

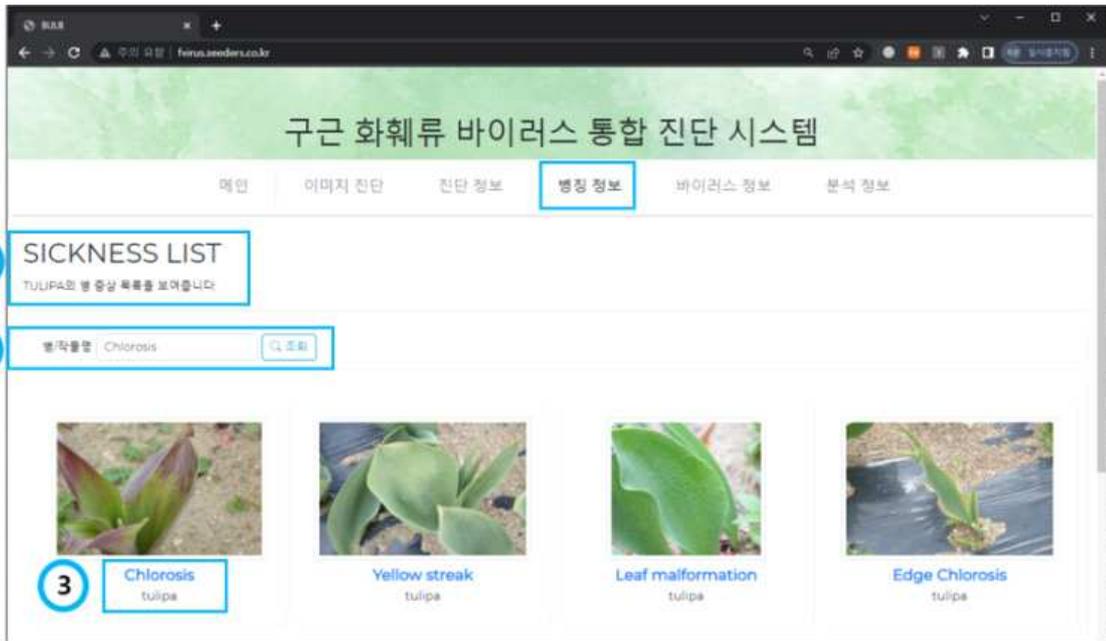


그림 21. 병징 정보 페이지. 병징 목록 페이지로, ‘① 해당 작물에 대한 병징 목록’, ‘② 병징/작물명으로 병징 목록 조회 기능’, ‘③ 병징 상세정보 확인’으로 구성됨. 검색바 기능을 이용하여 조회할 수 있으며, 사용자가 다양한 질병 증상을 보고 선택할 수 있도록 구현함.

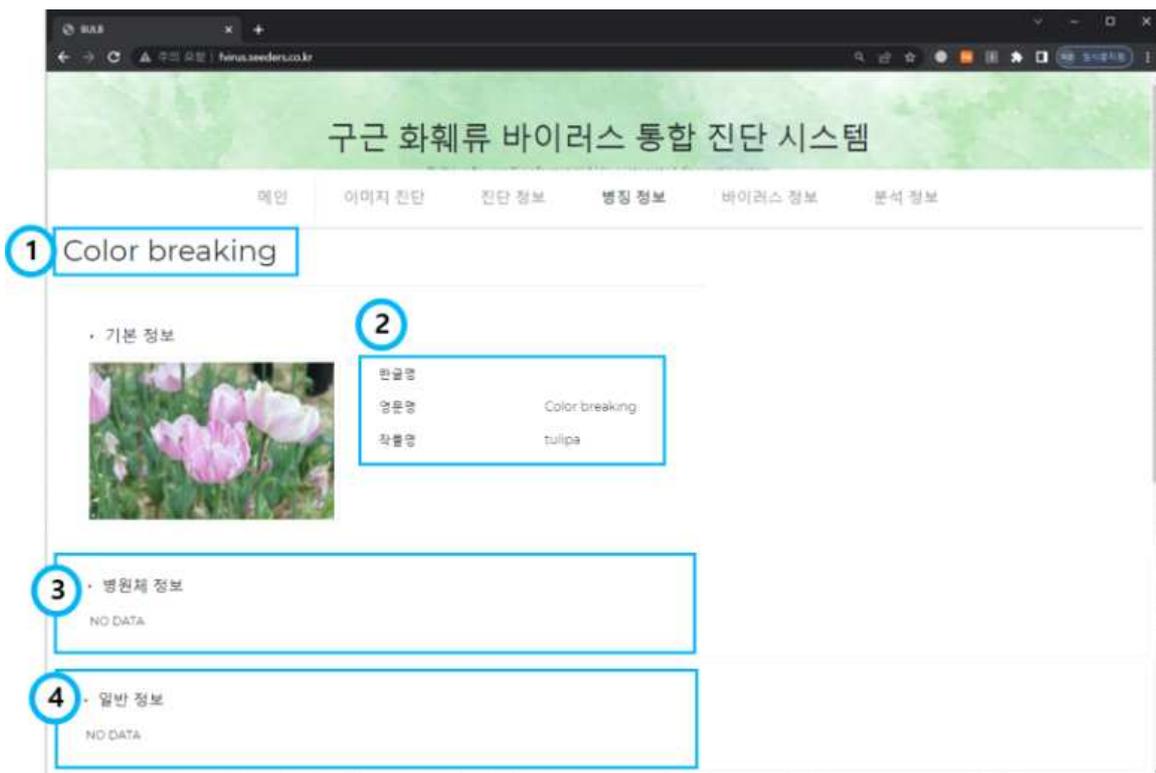


그림 22. 병징 상세정보 페이지. 병징 상세정보 페이지로, ‘① 병징 이름’, ‘② 병징 기본 정보’, ‘③ 병징의 병원체 정보’, ‘④ 병징의 일반 정보’로 구성됨. 해당 병징과 관련된 진단된 사진 정보를 최대 10개까지 제공할 수 있음.

○ 바이러스 정보 페이지 구현

- 바이러스 정보 페이지에서는 바이러스의 다양한 정보를 제공하여 현장에서 판단에 도움을 주고자 함(그림 23, 24).

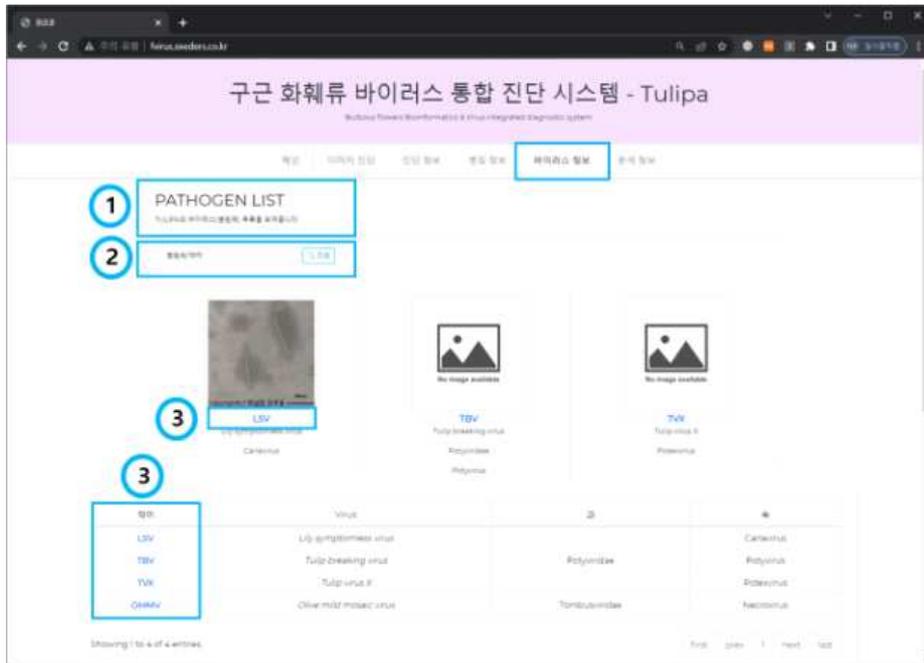


그림 23. 바이러스 목록 페이지. 바이러스 목록 페이지로 ‘① 해당 작물에 대한 바이러스 목록’, ‘② 병원체/약어 바이러스 목록 조회 기능’, ‘③ 바이러스 상세정보 확인’으로 구성됨. 검색으로 나온 바이러스에 대한 사진과 정보를 한 페이지에 제공하고, 페이지네이션 컨트롤 기능을 제공하여 병원체의 전체 목록에 대한 정보에 쉽게 접근할 수 있도록 구현함.

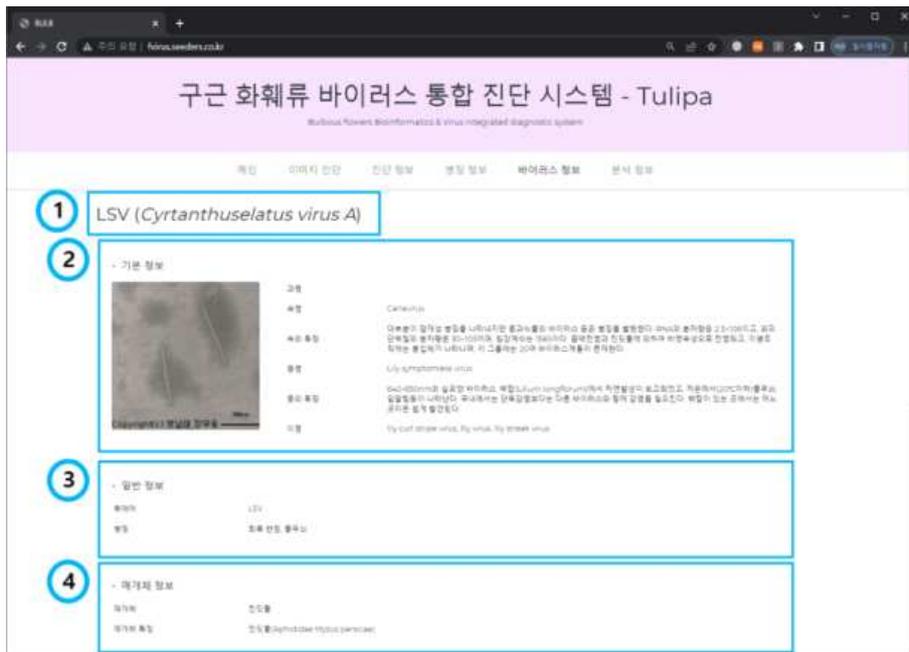


그림 24. 바이러스 상세정보 페이지. 바이러스 상세정보 페이지로, ‘① 바이러스 약어와 학명’, ‘② 바이러스의 기본 정보’, ‘③ 바이러스의 일반 정보’, ‘④ 바이러스의 매개체 정보’를 제공함. 사용자가 바이러스에 대한 포괄적인 정보를 얻고, 바이러스 특성, 영향 및 관리 방법을 이해하도록 도움.

○ 분석 정보 페이지 구현

- 바이러스 유전체 정보: NGS를 통해 확보된 구근에 감염된 바이러스 정보를 제공함. 바이러스의 상세정보를 탐색할 수 있도록 국제 데이터베이스에 연동되도록 구현함(그림 25, 26).
- 본 웹 데이터베이스에 수집된 정보의 통계치를 정리하여 표현함. 수집된 구근 데이터의 전체 통계치를 가시화하여 직관적으로 확인할 수 있도록 구현함(그림 27, 28)

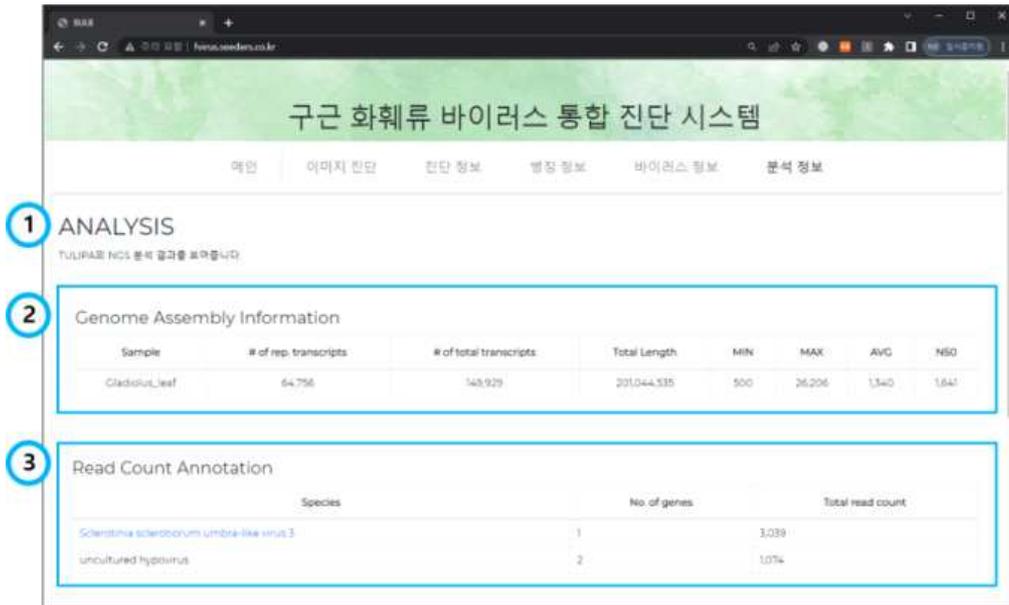


그림 25. 분석정보 페이지 분석정보 페이지로 ‘① 해당 작물’ ‘② 해당작물의 genome assembly 결과’, ‘③ Read count annotation 결과’ 로 구성됨. Genome assembly와 시료에서 발견된 바이러스의 양적 정보를 제공하여 유전적 정보를 해석하고 바이러스를 정량화하는데 유용한 정보를 제공함.

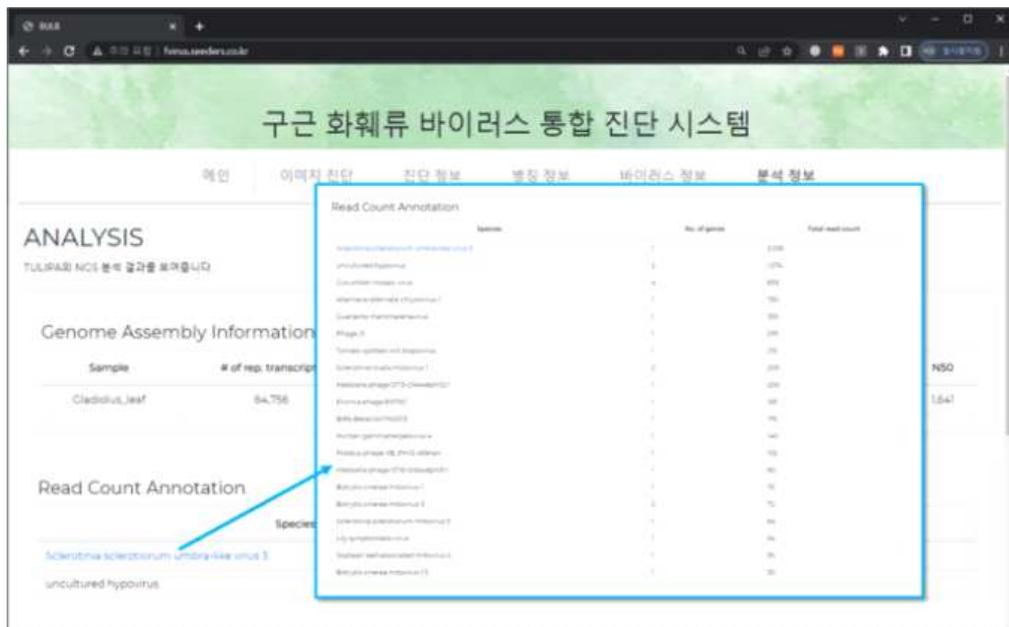


그림 26. 분석정보 페이지(상세). 분석정보 페이지에서 Read annotation 결과에 대한 상세 페이지로 annotation 결과에서 확인할 수 있는 종명, 유전자 수, 해당 read수에 대한 정보를 제공함. 연구자가 시료 내 바이러스 분포와 양을 파악하는데 사용할 수 있으며, 감염상태를 모니터링 및 관리하는데 기여함.



그림 27. 데이터 통계 페이지(1) 구근화훼류 바이러스 통합 진단 시스템 내 데이터 통계를 가시화한 상단 페이지로 ‘① 구근화훼류 전체 통계치’, ‘② 바이러스 통계치’로 구성됨. 구근화훼류 전체통계치는 파이차트로 카테고리를 종별로 나눠 데이터 비율을 색으로 구분하여 직관적으로 표시함. 바이러스 통계치는 레이더차트로 병원체에 대한 수치를 다각형 형태로 나타내어 각 변수의 상대적인 크기를 한 눈에 비교할 수 있도록 구현함.

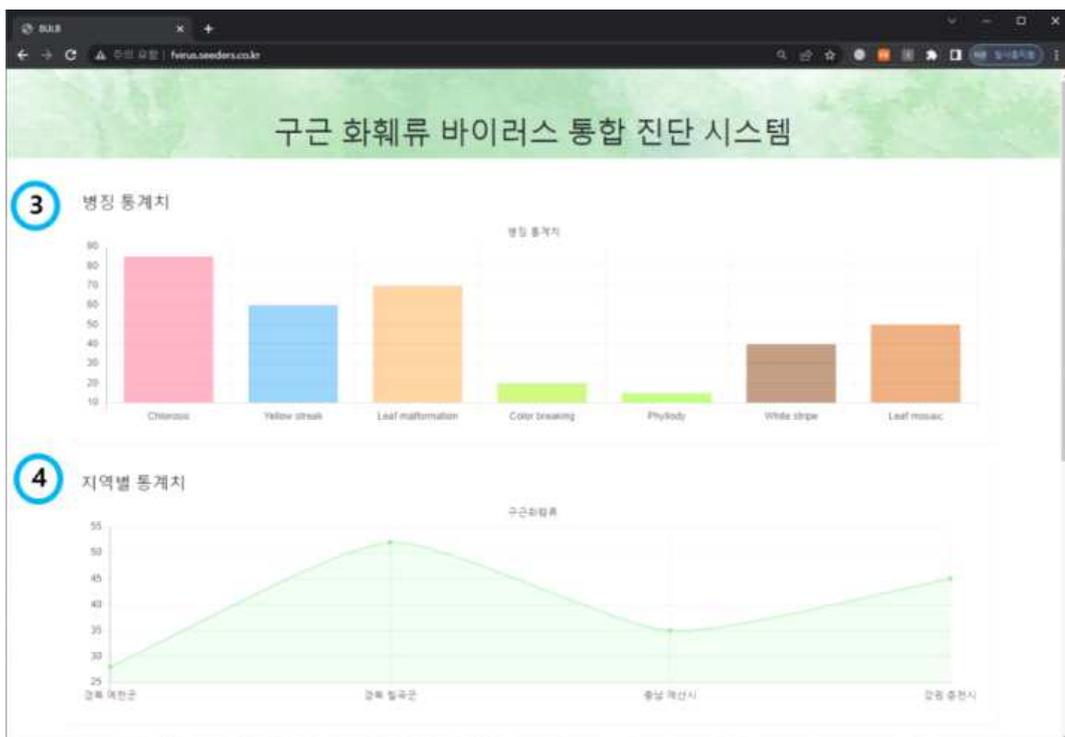


그림 28. 데이터 통계 페이지(2). 구근화훼류 바이러스 통합 진단 시스템 내 데이터 통계를 가시화한 하단 페이지로 ‘③ 병징 통계치’, ‘④ 지역별 통계치’로 구성됨. 병징 발생빈도를 막대그래프로 표현했고, 지역별 빈도를 선 그래프로 표현하여 병징 별 추세 분석에 유용하도록 구성함.

○ WEB BLAST 구현 기능

- NCBI의 WEB BLAST 구현 : NGS를 통해 확보한 국내 재배 중인 백합 및 글라디올라스에 감염된 바이러스 유전체 정보를 확인할 수 있도록 국제적으로 가장 넓게 활용되고 있는 BLAST 검색 기능을 장착함 (그림 36).
- 구근화훼류.fna DB를 이용한 BLAST 구동

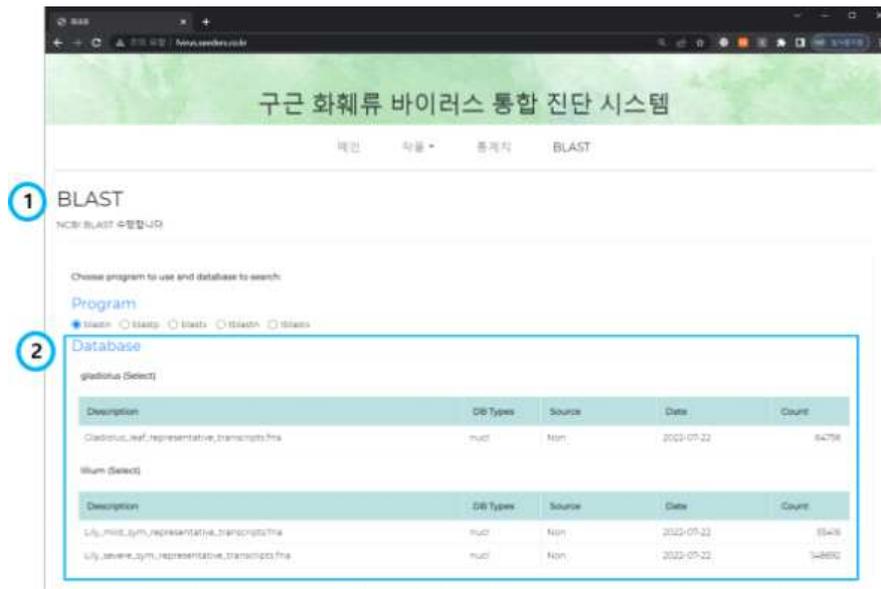


그림 29. 바이러스 검색을 위한 BLAST 페이지. 바이러스 검색을 위한 BLAST 페이지로 구근화훼류.fna 데이터베이스의 시퀀스와 비교하여 유사성을 찾는 기능을 제공함. 결과는 Database 섹션에서 확인할 수 있으며, 데이터베이스의 종류와 타입, 출처, 날짜, 시퀀스 수에 대한 정보를 제공함.

○ 작물 영상 이미지 해석 및 진단을 위한 데이터 셋 표준화

- 구근화훼류 4종은 총 3,908장의 데이터 누적, 구근화훼류 4종 외 일반식물 6,320장의 데이터 누적하여 총 10,228장의 데이터를 누적함(표 15).

표 15. 이미지 데이터 셋 수집

품종	데이터 이미지 수
튤립	1,116장
글라디올라스	849장
백합	1,148장
수선화	795장
구근4종 외 일반 식물	316 종 20장씩, 총 6,320장

○ 표준 이미지 데이터셋을 통한 인공지능 훈련(Deep learning)

- 영상 이미지 기반의 바이러스 감염 상태 평가 모델 개발함.
- \*CNN : 전이 학습 기법과 사전 학습된 MobileNet 모델을 사용한 Teachable machine을 이용해 이미지 진단 모델을 학습 및 생성하였고 옵션은 에포크 50, 배치크기 64, 학습률 0.0005을 적용하여 정확도 0.9098, 손실률 0.2586, 총 12개의 병징을 구분할 수 있음.

○ 웹 및 앱 서비스 개발

- 훈련된 모델은 이미지진단 서비스를 위해 웹 및 앱에 설치하여 현장에서 수집된 결과를 진단할 수 있도록 구현함.

5. 현장 진단 ICT 앱 개발

○ 스마트폰용 APP 개발

- 접근성이 우수한 보편화된 스마트폰에 설치된 카메라를 활용하여 손쉽게 구근 이미지를 확보하고 이미지 설정값을 조정할 수 있도록 제어하는 기능을 구현함.
- 시료를 채취하는 위치 정보를 수집하기 위하여 스마트폰이 이용하고 있는 GPS로부터 위치 정보를 수집하는 기능 구현함.
- 기획을 위해 해당 앱의 예상되는 사용자 유형을 연구 종사자, 화훼 농가, 일반 사용자 의 세 분류로 나눠서 가상 사용자를 설정함(표 16).
- 이용 흐름 예상도 작성 : 설정한 가상 사용자 중 초기 연구 과제 목표에 부합하는 관련 연구 종사자를 타겟팅해 사용자 이용 흐름 예상도를 작성함(그림 30).
- 이미지 진단 기능과 kit 분석 기능을 핵심 기능으로 선정, 그 외 핵심 기능을 사용하는데 도움이 될 것이라 생각되는 최근 기록 라이브러리, 바이러스 목록, 병징 목록 등을 서브 기능으로 지정해 흐름을 예상함(그림 31).
- 서버로부터 제공되는 다양한 이력정보 및 채집 방법 그리고 최근 결과 등을 탐색하고 비교해 볼 수 있도록 정보를 제공하는 화면 구현함(그림 32).

표 16. 현장진단 ICT 앱 시나리오 작성

구분	내용
기획 서비스	구근 화훼류에 발생하는 바이러스 통합 진단을 위한 데이터 수집
기획 배경	- 세계시장에서 경쟁할 수 있는 고품질 구근 화훼류 생산과 유통을 위한 바이러스 병의 관리를 위해 통합 진단 시스템을 구축 - 현장에서 구근의 바이러스 유무를 진단해서 데이터베이스를 전송하기 위한 기능들을 편리성과 휴대성이 뛰어난 모바일을 이용해 구현
기획 목적	현장에서 구근 화훼류에 대한 바이러스를 진단하고 데이터를 데이터베이스에 실시간 통합
기대 효과	간단하고 빠르게 연구 데이터들을 수집
주요 기능	- 바이러스 감염의심 구근화훼류의 이미지 데이터: 내장카메라 - 현재 사용자의(시료채취) 위치정보 : GPS - 사용한 현장진단키트의 정보: QR코드 인식 - 현장진단 키트 결과정보: 사용자 input - 현장에서 수집한 데이터들을 분석 서버로 전송: 서버기능
주요 예상 고객	- 구근화훼류 연구원 - 구근화훼류 농가농민 - 구근화훼류를 기르는 일반인
서비스 채널	앱

<사용자 이용 흐름 예상도>

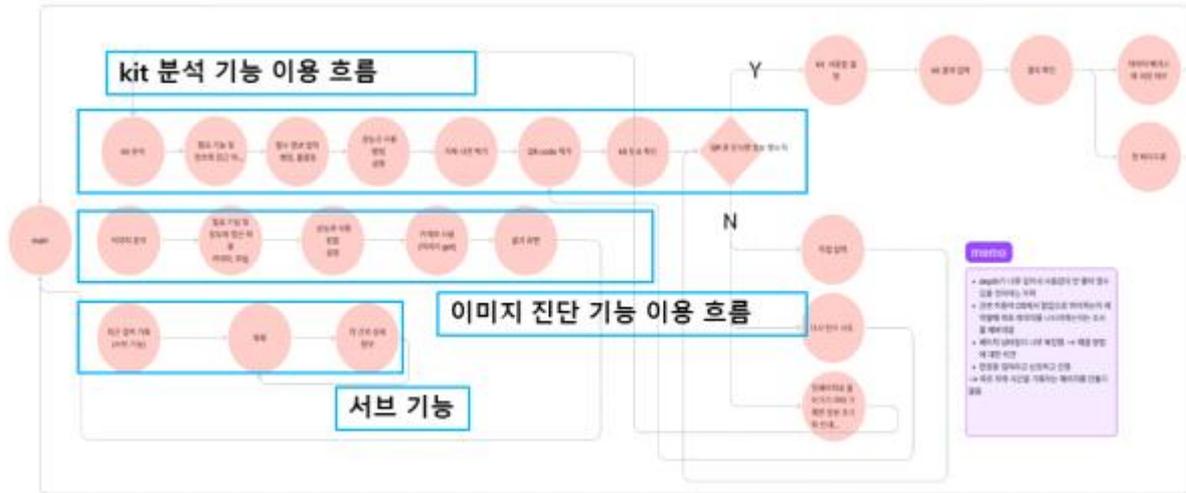


그림 30. 앱 페이지 구성 flow chart. 앱 내에서 진단 키트를 사용하거나 이미지 진단 기능을 사용하여 질병을 진단하는 과정을 나타냄. '키트 분석 기능 이용 흐름'은 사용자가 키트를 사용하여 샘플을 분석하고 결과에 따라 'Y' 또는 'N' 경로를 따르도록 안내함. '이미지 진단 기능 이용 흐름'은 사용자가 사진을 업로드하고 앱이 이미지를 분석하여 질병을 진단하는 단계를 보여줌.

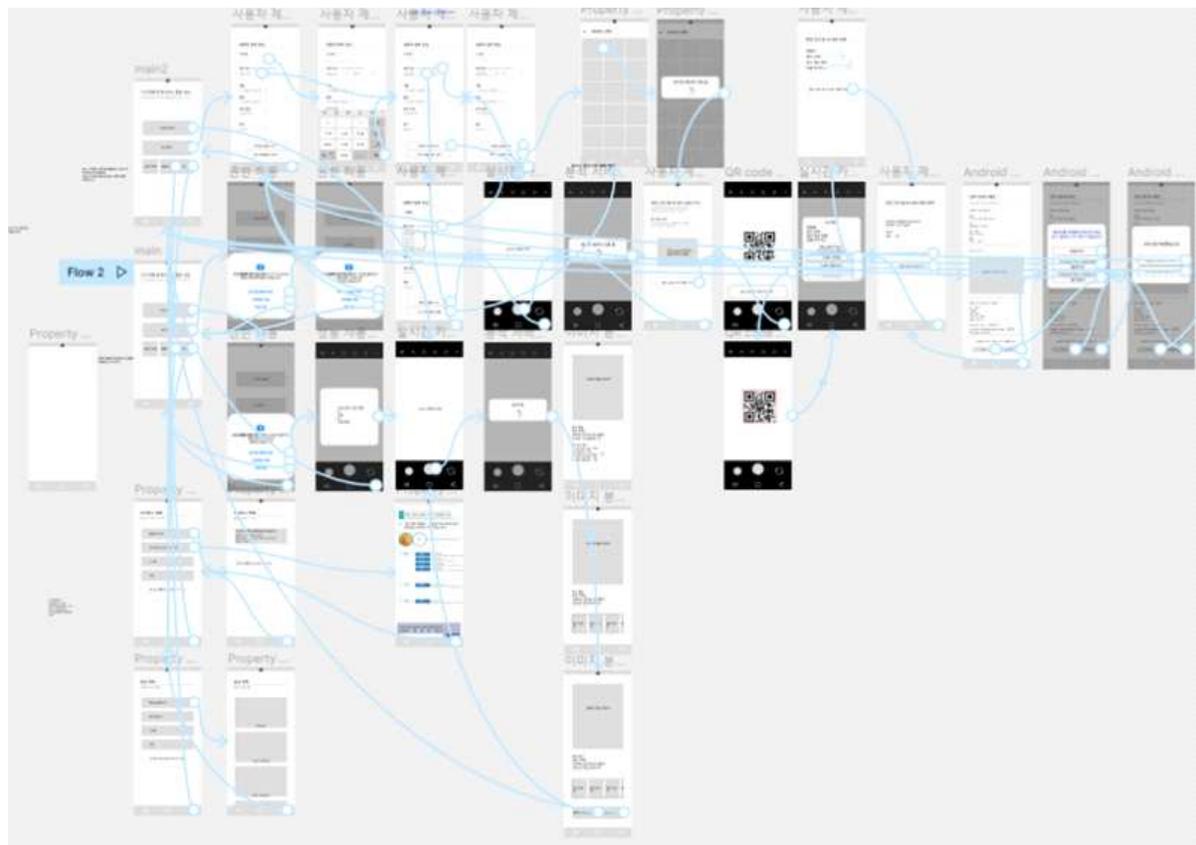


그림 31. APP 화면단 설계. 구근화훼류 바이러스 현장진단 앱 내 화면 연결도를 표현함. 설계도는 앱의 다양한 화면, 사용자 인터페이스 요소, 그리고 사용자의 액션에 따른 화면 간의 전환을 상세하게 나타냄. 각 화면은 서로 연결된 화살표 방향으로 움직이며, 사용자의 경로에 따라 앱이 어떻게 반응하는지 시각적으로 이해할 수 있음. QR 코드 스캔, 질병 정보 조회, 결과 공유 등의 기능이 포함된 플로우를 통해 사용자가 앱을 사용하여 바이러스 진단을 하는 전체적인 과정을 한눈에 볼 수 있음.

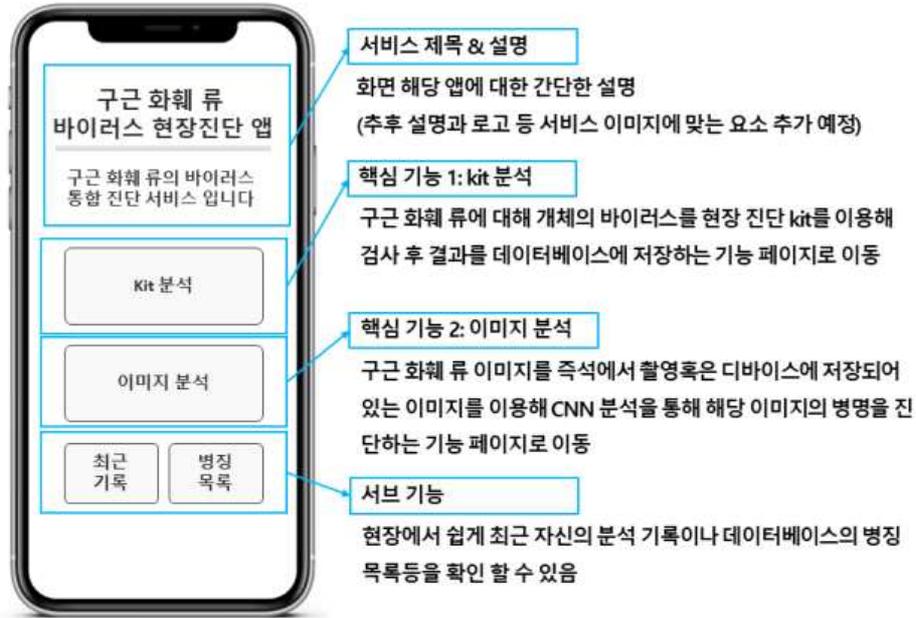


그림 32. APP 화면단 - 메인페이지. 서버로부터 제공되는 다양한 이력정보 및 채집 방법 그리고 최근 결과 등을 탐색하고 비교해 볼 수 있도록 정보를 제공

○ 현장진단 키트 검사 결과 입력단 개발

- 현장에서 스트립 키트를 이용하여 진단을 수행하고 나면 곧바로 결과를 입력하여 서버내 DB로 전송할 수 있는 입력단 구현함. (표 17, 그림 33)
- 서브 기능은 현장에서 필요한 기능이 무엇인지 분석 후 추가함.
- 해당 페이지에서 입력한 정보들은 최종 저장 페이지에서 확인 가능함.

표 17. APP 화면단 - Kit 분석 - 분석 샘플 정보 입력 페이지 (항목)

No	기능	설명
1	샘플 명	분석 샘플 명 50자 이내 키보드 입력
2	채집 장소	현재 위치로 기록(gps이용) 혹은 위치 직접 선택
3	작물, 품종	샘플의 작물과 품종 입력, 드롭다운 메뉴
4	생육 환경	생육 환경 기록 (필요 여부에 따라 삭제 가능)
5	병징	사용자가 판단한 병징기록, 드롭다운 메뉴

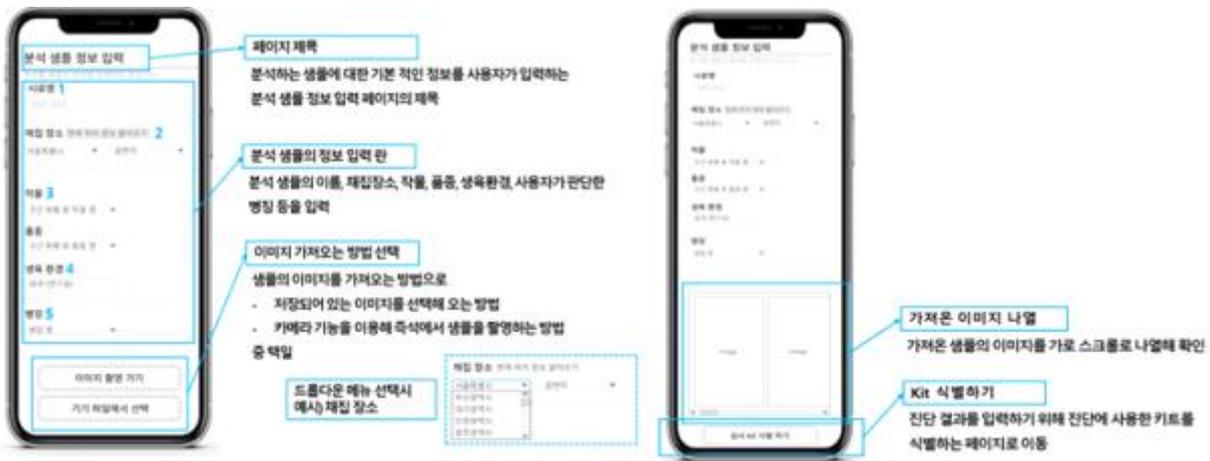


그림 33. APP 화면단 - Kit 분석 - 분석 샘플 정보 입력 페이지 (이미지 선택 전/ 후). 현장 진단용 키트의 정보를 쉽게 입력하기 위해 키트에 QR 코드를 삽입, QR 코드를 인식하면 해당 키트에 대한 정보를 자동으로 가져오는 기능을 구현하였음

○ QR 코드 인식하여 저장 및 전송하는 기능 개발

- 현장에서 사용한 스트립 키트의 기본정보를 획득하는 방식으로 QR코드 인식기 방식을 이용하여 사용한 스트립 키트의 정보 및 진단한 바이러스의 정보를 수집하는 기능을 구현하였음.
- 현장 진단용 키트의 정보를 쉽게 입력하기 위해 키트에 QR 코드를 삽입, QR 코드를 인식하면 해당 키트에 대한 정보를 자동으로 가져오는 기능을 구현하였음(그림 34, 35).
- 이미지 진단 기능을 이용하기 위해 진단할 이미지를 선택하는 페이지를 구현하였음(그림 36).



그림 34. APP 화면단 - Kit 분석 - 현장 진단용 키트 식별 QR코드 인식 현장 진단용 키트의 정보를 쉽게 입력하기 위해 키트에 QR 코드를 삽입, QR 코드를 인식하면 해당 키트에 대한 정보를 자동으로 가져오는 기능을 구현하였음

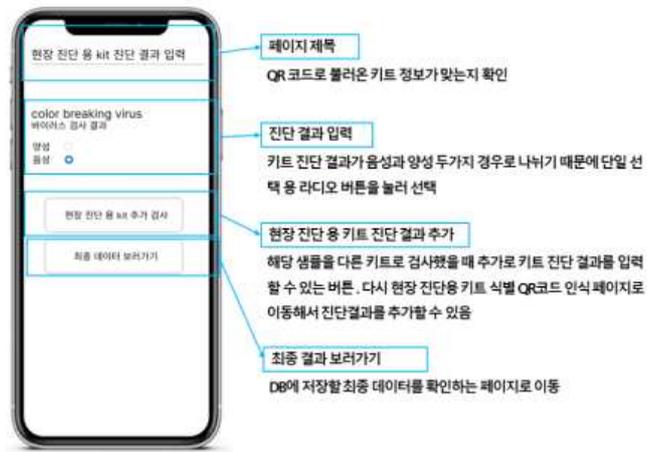


그림 35. APP 화면단 - Kit 분석 - 진단 결과 입력. QR 코드를 인식하면 해당 키트에 대한 정보를 자동으로 가져오는 기능을 구현하였음.



그림 36. APP 화면단 - 이미지 진단 - 이미지 선택 페이지. 이미지 진단 기능을 이용하기 위해 진단할 이미지를 선택하는 페이지를 구현하였음

○ 현장진단 ICT 앱 개발 디자인 적용

- 현장진단 ICT 앱의 디자인은 사용자가 현장에서 실시간으로 데이터를 입력하고 진단 결과를 받아볼 수 있도록 하는 사용자 친화적 인터페이스 디자인에 중점을 둠(그림 37).
- 직관적인 메뉴 구성, 단계별 진행 안내, 그리고 쉬운 데이터 입력 방법을 제공하여 비전문가도 손쉽게 사용할 수 있음.
- 고해상도 이미지와 샘플 데이터를 통한 시각적 분석 기능을 통해 사용자가 더욱 정확하고 빠르게 현장 정보를 분석하고 판단할 수 있도록 함(그림 38).



그림 37. 메인 페이지 및 KIT분석 페이지. 사용자가 현장에서 실시간으로 데이터를 입력하고 진단 결과를 받아볼 수 있도록 설계함.

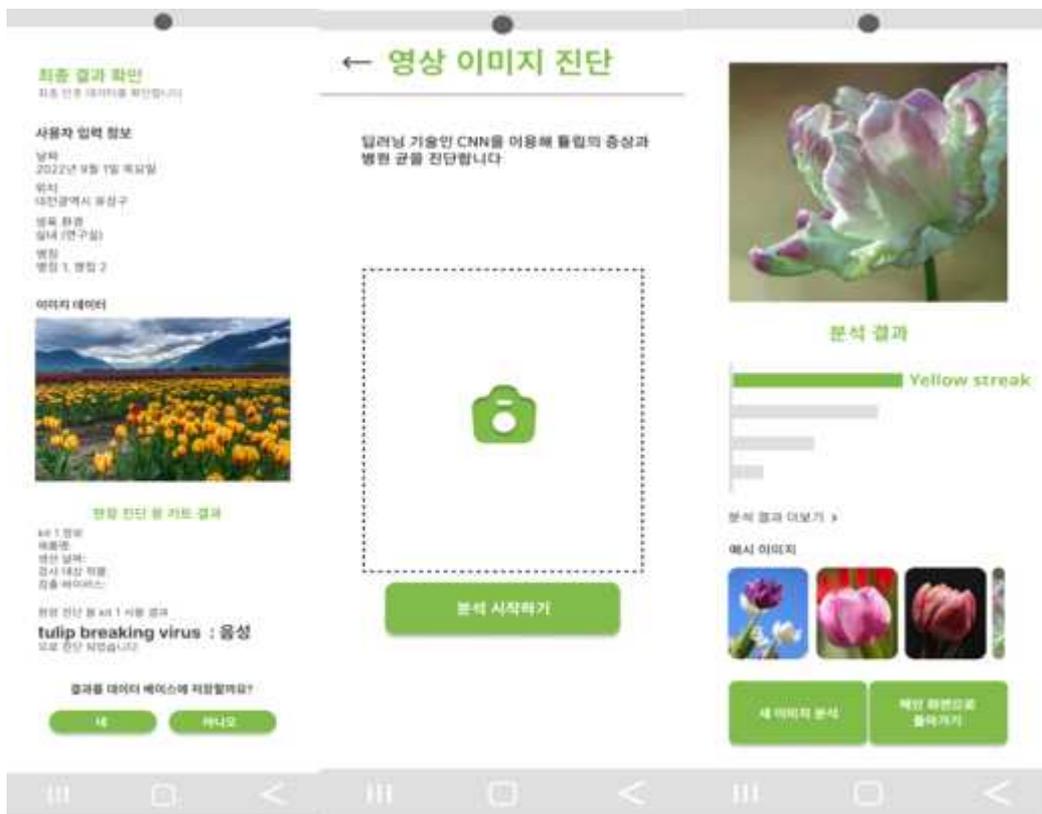


그림 38. KIT 분석 결과 페이지 및 이미지 진단 페이지. 고해상도 이미지와 샘플 데이터를 통한 시각적 분석 기능을 통해 사용자가 더욱 정확하고 빠르게 현장 정보 분석을 도움.

## 6. ICT 기술을 접목한 첨단 진단 시스템 구축

○ 현장과 실험실의 유기적 연결을 위한 맞춤형 웹 디자인 제작

- 데이터 시각화 웹메인 페이지 : 서비스의 제목과 간단한 설명, Kit 분석, 이미지 진단 등 기능 구성 (그림 39).
- 국내 바이러스 현황과 식물별 진단 목록 구성 (그림 40).
- 진단정보 SAMPLE LIST : 현장에서 수집된 식물별 바이러스 진단 목록 (그림 41).
- 식물별 증상 정보, 바이러스 정보 리스트 구성 (그림 42).



그림 39. 데이터 시각화 웹 메인 페이지 디자인. 구근 화훼류 바이러스 데이터베이스 웹 메인페이지의 네 가지 주요 요소를 설명함. 첫째, “메인 이미지 제목“은 구근 화훼류 데이터베이스의 시각적 표현을 나타냄. 둘째, “작물별 정보“ 섹션은 데이터베이스가 포함하는 작물의 이미지와 정보를 설명함. 셋째, “현장진단 ICT 앱 안내“는 현장에서 바이러스 진단 데이터를 수집하고 분석하는 데 사용되는 앱의 기능을 나열함. 넷째, “참여 연구 기관 로고“는 연구개발에 참여한 기관 로고를 나타냄.

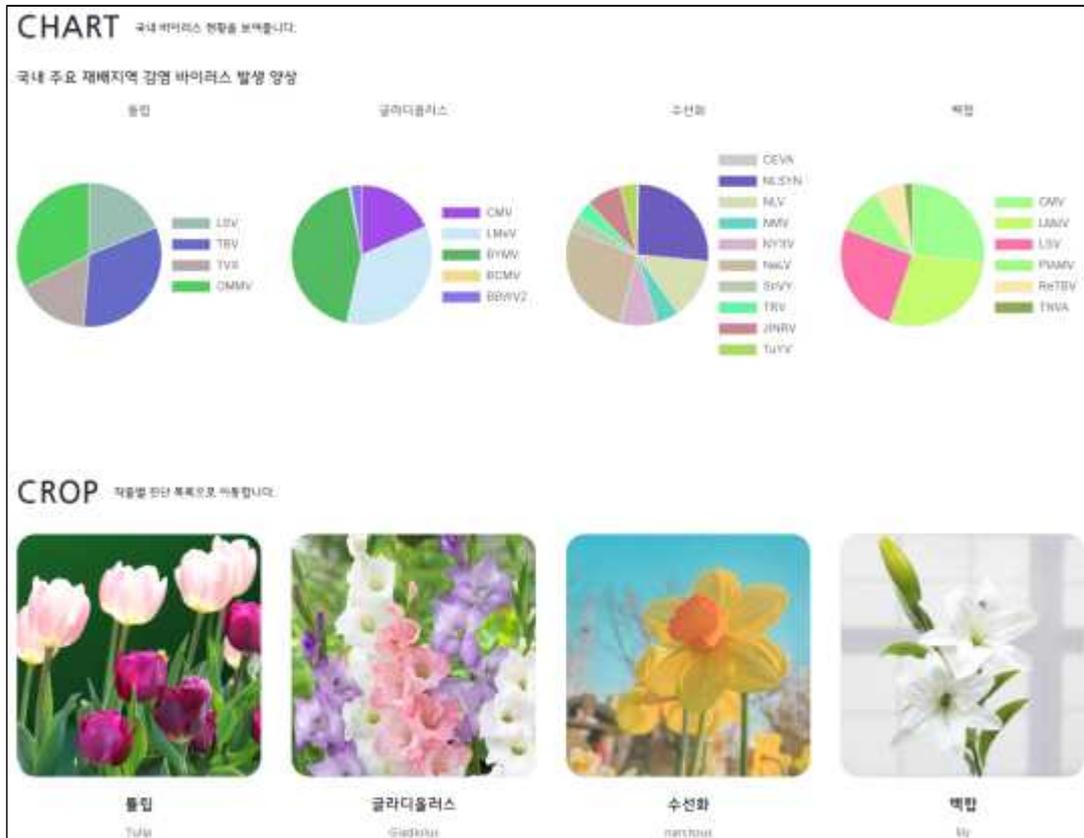


그림 40. 국내 바이러스 현황과 식물별 진단 목록. 국내 바이러스 현황과 작물별 진단 목록 페이지로, 특정 작물의 바이러스 분포를 차트로 표현함. 현재는 튤립, 글라디올러스, 수선화, 백합 네 가지 구근화훼류 작물이 메인으로 표현됨. ‘CROP’ 섹션에서는 각 작물에 해당하는 데이터베이스와 연동하여 누구나 손쉽게 접근할 수 있도록 구성함.



그림 41. 진단정보 SAMPLE LIST. ‘CROP’ 섹션에서 연결된 SAMPLE LIST는 각 샘플 별 품종, 병징, 채집날짜, 채집장소, 대표사진에 대한 정보를 제공함. 병징 또는 품종으로 검색할 수 있으며, 체크박스를 통해 필터 검색기능을 추가하여 편의성을 높임.

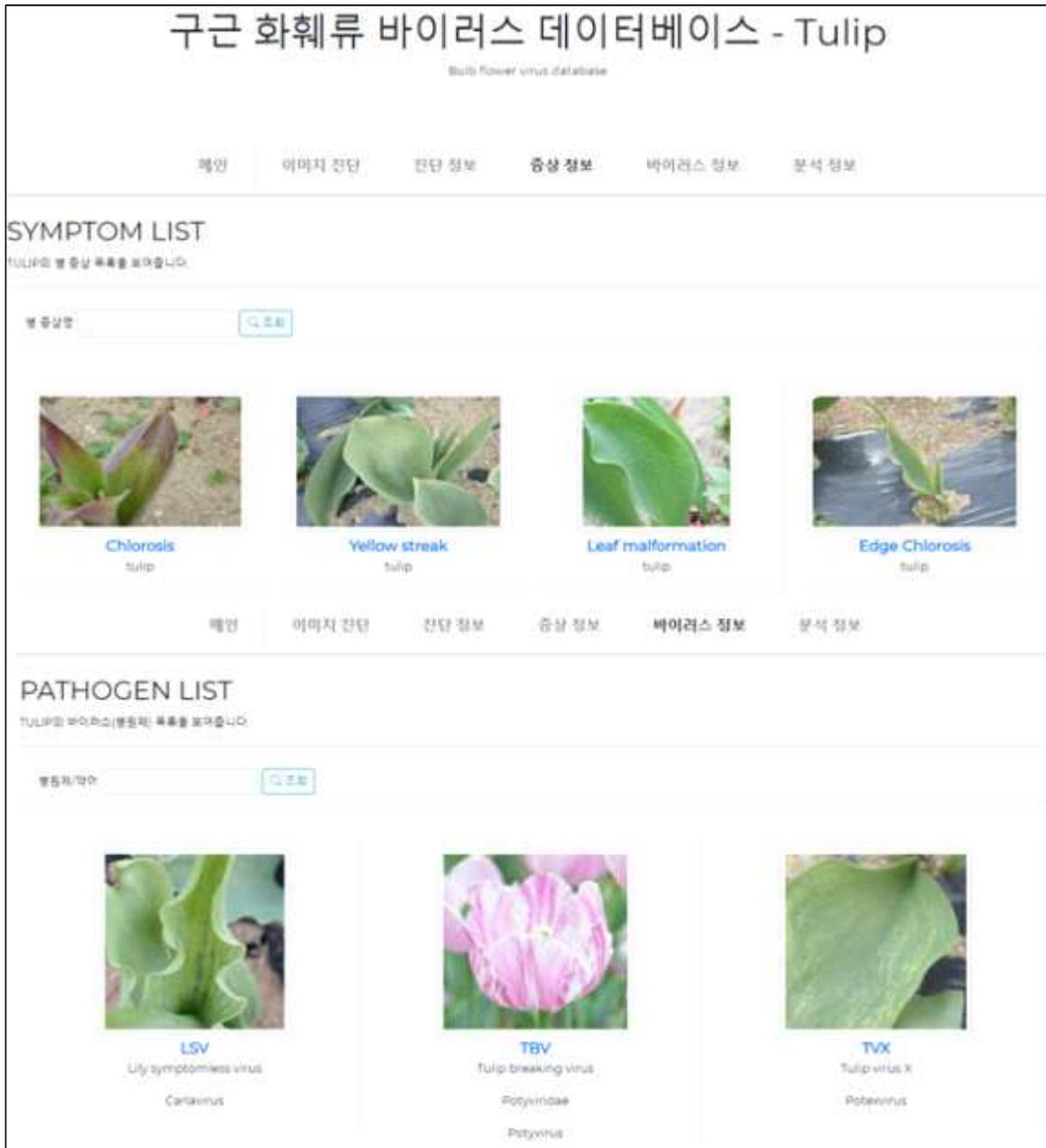


그림 42. 작물별 증상 정보 및 바이러스 정보. 작물별 증상 정보 및 바이러스 정보 페이지에서는 증상 명으로 검색이 가능하며 페이징 기능을 추가하여 데이터를 총 데이터 수와 보여지는 데이터 수를 출력하도록 구성함. 클릭 시 세부 정보 페이지로 연결되도록 함.

○ 사용자 친화성 향상을 위한 현장 진단 용 앱 디자인 제작

- 앱 메인 페이지 : 서비스의 제목과 간단한 설명, Kit 분석, 이미지 진단 등 기능 구성 (그림 43).
- 분석 샘플 정보 입력 페이지 : 페이지 제목, 분석 샘플의 정보 입력 란 구성 (그림 44).
- 현장 진단 용 Kit 진단 결과 입력 페이지 : 키트 결과 예시 이미지를 확인하여 결과 입력가능. 추가 검사 결과 입력 및 DB에 저장 할 최종 데이터 확인 페이지 이동가능 (그림 45).
- 데이터 저장 페이지 : 최종 데이터 저장. 분석 샘플의 정보, 키트 진단 결과 정보 저장 (그림 46)
- 바이러스 정보 페이지 : 바이러스의 기본정보와 일반정보, 매개체 정보 (그림 46)



그림 43. 앱 메인 페이지. 구급화취류 바이러스 현장진단 앱 메인페이지로 ‘서비스 제목 & 설명’, ‘핵심 기능1:kit 분석’, ‘핵심 기능 2:이미지분석’, ‘서브기능’ 으로 구성됨. 자주 쓰는 핵심 기능을 중앙에 배치하고 하단 메뉴바를 추가하여 구축함.

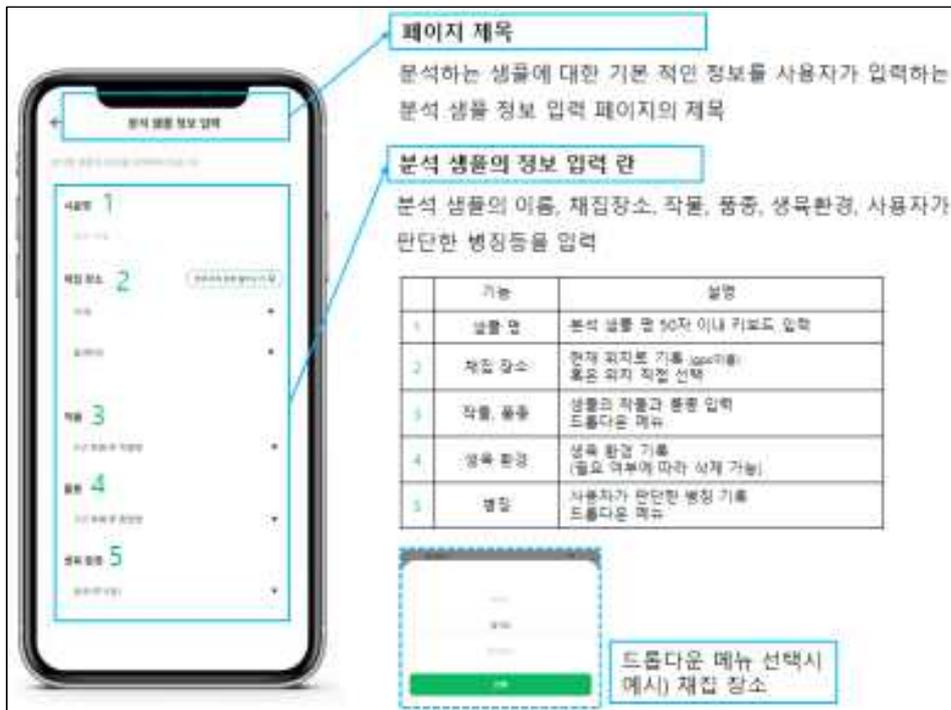


그림 44. 분석 샘플 정보 입력 페이지. 질병 진단을 위한 샘플 정보 입력 페이지로 사용자는 샘플 번호, 질병명, 조직 유형 등과 같은 기본 정보를 입력할 수 있는 여러 필드를 제공받음. 드롭다운 메뉴로 특정 메타 정보를 추가하는 기능을 구현함.

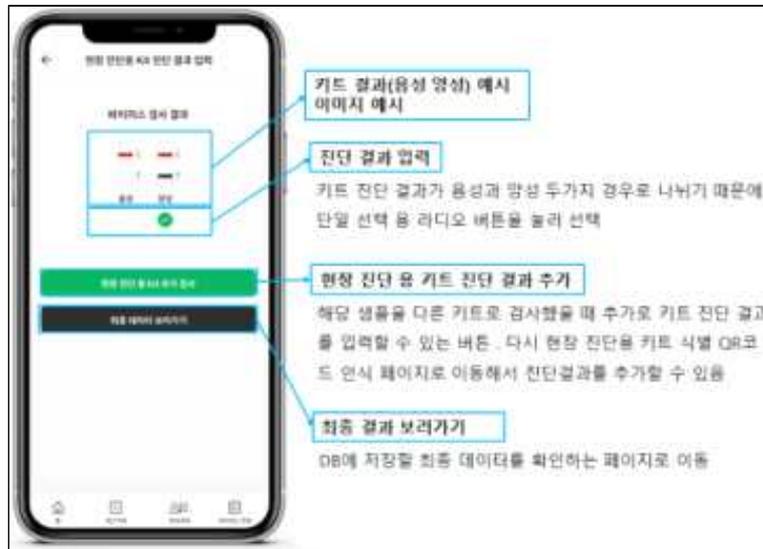


그림 45. 현장진단 앱 kit 결과 입력 페이지. 사용자가 진단 키트에서 얻은 결과를 입력할 수 있는 페이지로, 결과 이미지를 캡처하고 업로드하는 옵션이 포함됨. '진단 결과 입력' 영역은 사용자가 키트에서 나타난 색 변화를 통해 양성 또는 음성 결과를 앱에 직접 입력할 수 있도록 설계됨. '분석 진단 후 기록된 진단 결과' 부분에서는 입력된 데이터를 바탕으로 앱이 자동으로 분석을 수행하고, 결과를 데이터베이스에 기록하는 과정을 나타냄. 사용자가 최종 결과를 데이터베이스에 저장하여 추후 사용할 수 있도록 구성함.

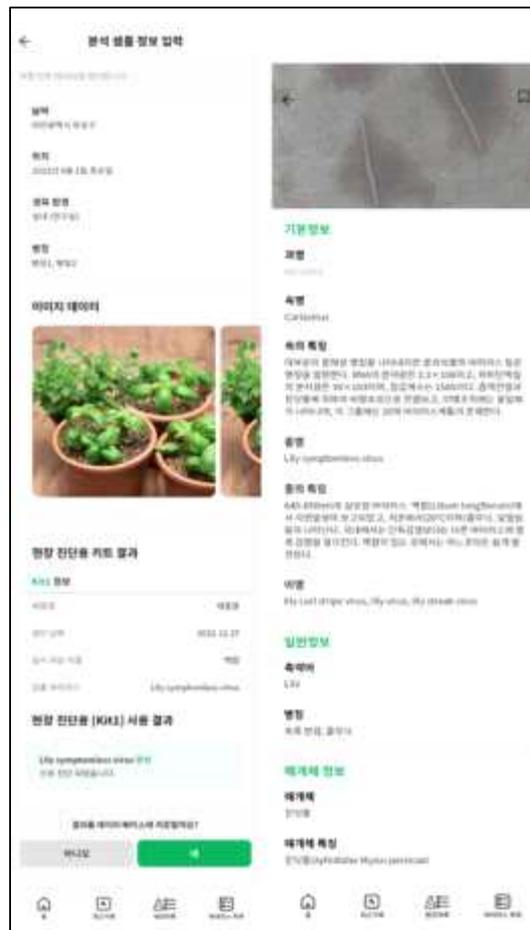


그림 46. 데이터 저장 및 바이러스 정보 페이지. 사용자에게 의해 입력된 모든 데이터는 항목별 입력에 맞게 섹션 별로 정리되어 표현됨. 현장 진단용 Kit에 저장된 내용을 불러올 수 있으며 데이터베이스에 저장하는 기능이 추가되어 다음 단계 분석에서 사용할 수 있음. 진단 결과로 나온 바이러스에 대한 기본 정보를 데이터베이스와 연동하여 구축함.

○ 구근화훼류 바이러스 진단 및 생물정보의 빅데이터화

- 국내 주요 재배지역 감염 바이러스 발생 데이터 가공
- 작물 별 감염 바이러스를 정리하여 표로 정리 후 양상 데이터를 그래프화 (그림 47, 표 18)
- 가공한 감염 바이러스 별 수치 데이터를 데이터베이스에 적용 후 웹에서 시각화 (그림 48)

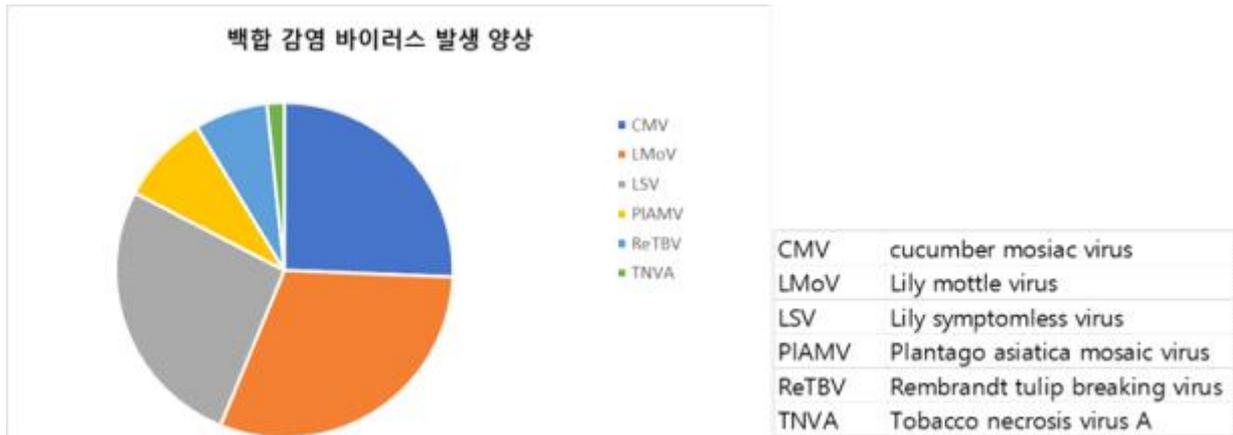


그림 47. 백합 바이러스 발생 양상 데이터. 각 작물 별 바이러스의 발생 양상을 원그래프로 표현함. 위의 예시에서 가장 큰 비중을 차지한 것은 LMoV(주황색)이고 가장 낮은 발생 비율을 보이는 것은 ReTBV와 TNVA로 각각 7%와 2%로 나타남.

표 18. 백합 바이러스 검정 데이터

채집장소	채집날짜	샘플 넘버	병징	감염 바이러스
원주	2021-08-03	1	무병징	LMoV, LSV
원주	2021-08-03	2	stripe	LMoV, LSV
원주	2021-08-03	3	necrotic spot	LMoV, LSV, ReTBV
원주	2021-08-03	4	necrotic spot	LSV
원주	2021-08-03	5	necrotic spot	LSV
원주	2021-08-03	6	necrotic spot, mosaic	CMV, LSV
원주	2021-08-03	7	mosaic	LSV
원주	2021-08-03	8	mosaic	CMV, LSV
원주	2021-08-03	9	mosaic	CMV, LMoV
원주	2021-08-03	10	mosaic	CMV, LMoV
원주	2021-08-03	11	mosaic	LMoV
원주	2021-08-03	12	mosaic	CMV, LMoV
원주	2021-08-03	13	mosaic	CMV, LMoV, LSV
원주	2021-08-03	14	mosaic	LMoV
춘천	2021-08-18	15	severe mosaic	CMV, LMoV, PIAMV, ReTBV
춘천	2021-08-18	16	-	CMV, LMoV, LSV, PIAMV, ReTBV
춘천	2021-08-18	17	-	CMV, LMoV, LSV, PIAMV, ReTBV
춘천	2021-08-18	18	-	CMV, LMoV, LSV, PIAMV
춘천	2021-08-18	19	-	CMV, LMoV, LSV, PIAMV
춘천	2021-08-18	20	-	CMV, LMoV, LSV, PIAMV, ReTBV
춘천	2021-08-18	21	-	CMV, LMoV, PIAMV, ReTBV
춘천	2021-08-18	22	-	CMV, LMoV, LSV, PIAMV
춘천	2021-08-18	23	-	CMV, LMoV, LSV, PIAMV, ReTBV
춘천	2021-08-18	24	-	CMV, LMoV, LSV, PIAMV
춘천	2021-06-25	25	-	LMoV, LSV, TNVA
춘천	2021-06-25	26	-	CMV, LMoV, TNVA
춘천	2021-06-25	27	-	CMV, LMoV, LSV
춘천	2021-06-25	28	-	CMV, LSV, PIAMV
춘천	2022-09-07	29	mosaic	CMV, LMoV
춘천	2022-09-07	30	mosaic	LMoV
춘천	2022-09-07	31	mosaic	LMoV
춘천	2022-09-07	32	mosaic	-

춘천	2022-09-07	33	mosaic	-
춘천	2022-09-07	34	mosaic	CMV
춘천	2022-09-07	35	stripe	-
춘천	2022-09-07	36	stripe	CMV, LMoV
춘천	2022-09-07	37	mosaic	CMV
춘천	2022-09-07	38	mosaic	-
춘천	2022-09-07	39	mosaic	LMoV
춘천	2022-09-07	40	stripe	-
춘천	2022-09-07	41	necrotic spot	CMV
춘천	2022-09-07	42	mosaic	LMoV
춘천	2022-09-07	43	stripe	-
춘천	2022-09-07	44	mosaic	CMV, LMoV
춘천	2022-09-07	45	necrotic spot	CMV
춘천	2022-09-07	46	stripe	-
춘천	2022-09-07	47	mosaic	LMoV
춘천	2022-09-07	48	stripe	LMoV
춘천	2022-09-07	49	mosaic	LMoV
춘천	2022-09-07	50	stripe	-
춘천	2022-09-07	51	necrotic spot	LMoV
춘천	2022-09-07	52	mosaic	LMoV
춘천	2022-09-07	53	mosaic	LMoV
춘천	2022-09-07	54	mosaic	LMoV
춘천	2022-09-07	55	mosaic	LMoV
춘천	2022-09-07	56	mosaic	LMoV
춘천	2022-09-07	57	stripe	-
춘천	2022-09-07	58	stripe	LMoV
춘천	2022-09-07	59	mosaic	-
춘천	2022-09-07	60	mosaic	-
춘천	2022-09-07	61	stripe	-
춘천	2022-09-07	62	mosaic	CMV, LMoV
춘천	2022-09-07	63	mosaic	-
춘천	2022-09-07	64	mosaic	LMoV
춘천	2022-10-07	65	severe mosaic	CMV, LMoV
춘천	2022-10-07	66	mild mosaic	CMV, LMoV
춘천	2022-10-07	67	mild mosaic	CMV
춘천	2022-10-07	68	severe mosaic	CMV
춘천	2022-10-07	69	severe mosaic	CMV
춘천	2022-10-07	70	stripe	CMV
춘천	2022-10-07	71	severe mosaic	CMV
춘천	2022-10-07	72	severe mosaic	CMV
춘천	2022-10-07	73	severe mosaic	CMV
춘천	2022-10-07	74	severe mosaic	CMV
춘천	2022-10-07	75	mild mosaic	CMV
춘천	2022-10-07	76	severe mosaic	CMV
춘천	2022-10-07	77	severe mosaic	CMV
춘천	2022-10-07	78	severe mosaic	CMV
춘천	2022-10-07	79	necrotic spot	CMV
춘천	2022-10-07	80	stripe	CMV
춘천	2022-10-07	81	무병징	CMV, PIAMV
춘천	2022-10-07	82	necrotic spot	CMV
춘천	2022-10-07	83	rugose	CMV
춘천	2022-10-07	84	necrotic spot	CMV
춘천	2022-10-07	85	necrotic spot	CMV
춘천	2022-10-07	86	무병징	CMV
춘천	2022-10-07	87	stripe	CMV, LMoV
춘천	2022-10-07	88	무병징	CMV
춘천	2022-10-07	89	무병징	CMV
춘천	2022-10-07	90	mild mosaic	CMV
춘천	2022-10-07	91	severe mosaic	CMV
춘천	2022-10-07	92	mild mosaic	CMV
춘천	2022-10-07	93	necrotic spot	CMV

춘천	2022-10-07	94	severe mosaic	CMV
춘천	2022-10-07	95	무병징	CMV
춘천	2022-10-07	96	stripe	CMV
춘천	2022-10-07	97	무병징	CMV
춘천	2022-10-07	98	severe mosaic	CMV
춘천	2022-10-07	99	necrotic spot	CMV
춘천	2022-10-07	100	stripe	CMV
춘천	2022-10-07	101	mottle	CMV, LMoV
춘천	2022-10-07	102	mottle	CMV, LMoV
춘천	2022-10-07	103	severe mosaic	CMV
춘천	2022-10-07	104	necrotic spot	CMV
춘천	2022-10-07	105	mild mosaic	CMV
춘천	2022-10-07	106	leaf curl	CMV
춘천	2022-10-07	107	necrotic spot	CMV
춘천	2022-10-07	108	severe mosaic	CMV
INDEX				
CMV	cucumber mosiac virus			
LMoV	Lily mottle virus			
LSV	Lily symptomless virus			
PIAMV	Plantago asiatica mosaic virus			
ReTBV	Rembrandt tulip breaking virus			
TNVA	Tobacco necrosis virus A			

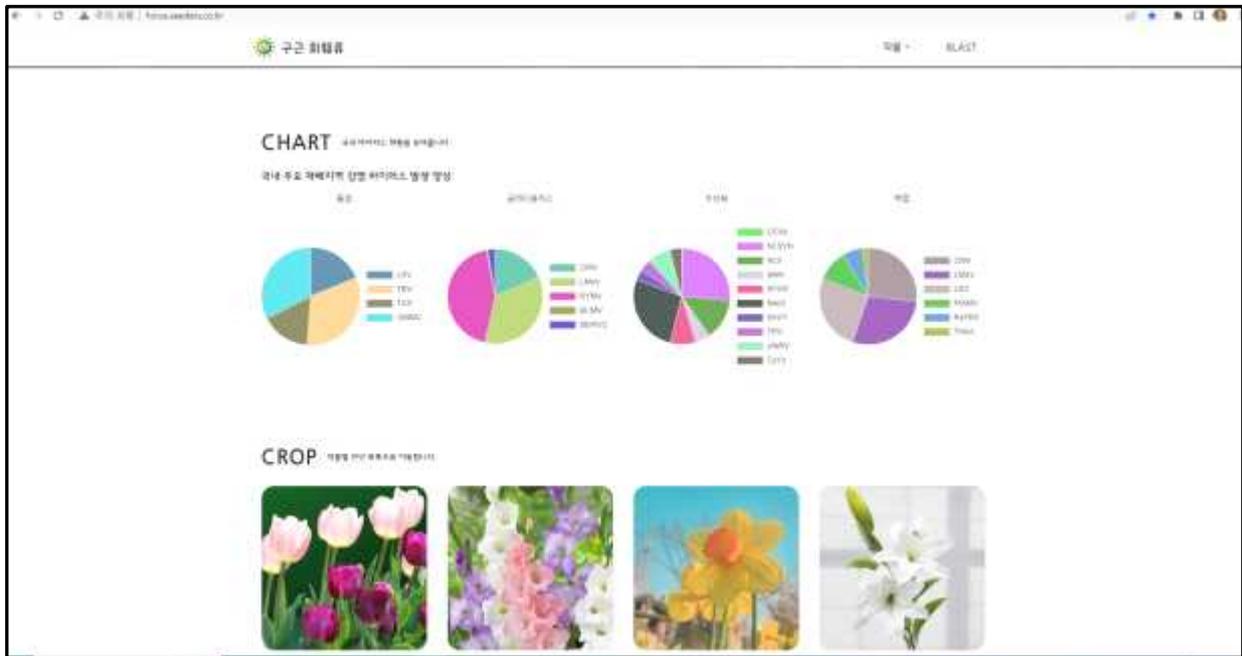


그림 48. 국내 주요 재배지역 감염 바이러스 발생 현황. 국내 주요 재배지역에서 채집한 구근화훼류 데이터로 작물 별 바이러스가 발생하는 주요 병원체를 식별하고, 사용자가 바이러스 발생 패턴을 쉽게 인식하여 연구의 방향을 정하는데 도움을 줄 수 있음.

#### 4) 제3공동연구기관: (주) 포스트바이오

##### 1. 진단대상 목표 바이러스 선정 및 특이 항원 확보

###### ○ 구근 화훼류 바이러스 항원 및 특이항체 생산

- 제1공동연구기관(강원대): 클로닝 벡터 시스템을 통한 바이러스 항원 단백질 생산
- 백합에 가장 많이 감염하는 바이러스인 CMV, LMoV와 PIAMV의 항원 단백질을 획득하기 위해, 검정된 CMV, LMoV와 PIAMV를 T/A cloning vector에 ligation 하여 단백질 생산하기 위한 유전자를 클로닝 하였음(그림 1-6).

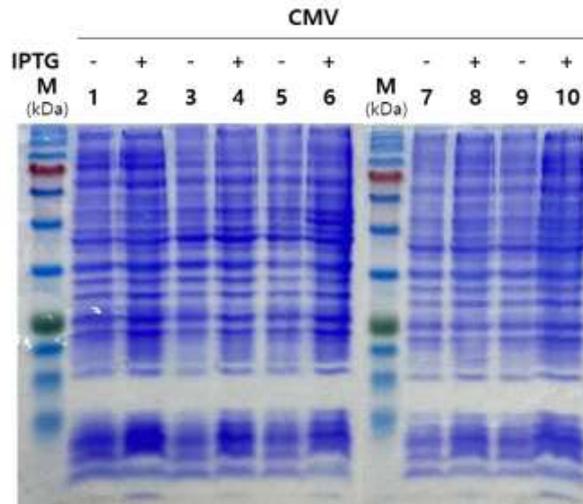


그림 1. CMV의 외피단백질을 T/A cloning vector에 삽입한 뒤, IPTG 유도 발현. 검정된 CMV의 외피 단백질을 T/A cloning vector에 ligation하여 외피단백질을 보존하는 클로닝 벡터를 제작하였음. CMV의 외피단백질을 단백질 발현 전용 벡터에 삽입하기 전, IPTG 유도발현을 통해 단백질의 발현을 확인하였음. IPTG 유도 발현하지 않은 단백질과 유도발현한 단백질을 SDS-PAGE를 통하여 분석하였음.

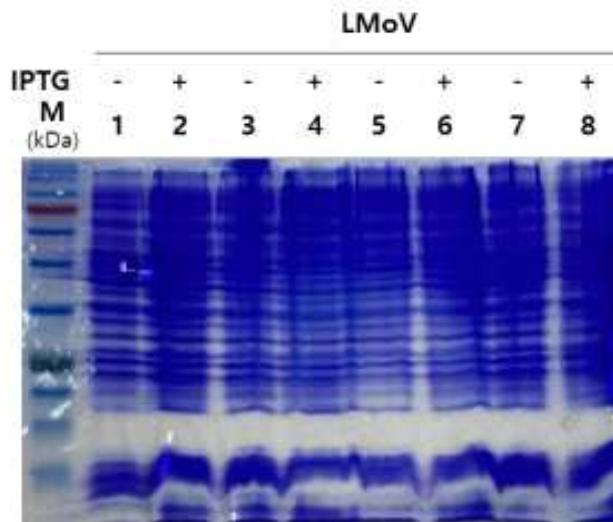


그림 2. LMoV의 외피단백질을 T/A cloning vector에 삽입한 뒤, IPTG 유도 발현. 검정된 LMoV의 외피 단백질을 T/A cloning vector에 ligation하여 외피단백질을 보존하는 클로닝 벡터를 제작하였음. LMoV의 외피단백질을 단백질 발현 전용 벡터에 삽입하기 전, IPTG 유도발현을 통해 단백질의 발현을 확인하였음. IPTG 유도 발현하지 않은 단백질과 유도발현한 단백질을 SDS-PAGE를 통하여 분석하였음.

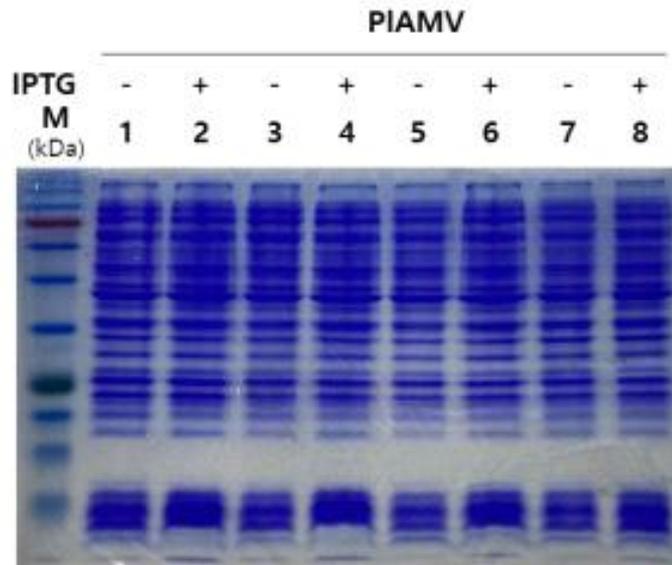


그림 3. PIAMV의 외피단백질을 T/A cloning vector에 삽입한 뒤, IPTG 유도 발현. 검정된 LMoV의 외피단백질을 T/A cloning vector에 ligation하여 외피단백질을 보존하는 클로닝 벡터를 제작하였음. LMoV의 외피단백질을 단백질 발현 전용 벡터에 삽입하기 전, IPTG 유도발현을 통해 단백질의 발현을 확인하였음. IPTG 유도 발현하지 않은 단백질과 유도발현한 단백질을 SDS-PAGE를 통하여 분석하였음.

○ 클로닝 벡터 시스템을 통한 바이러스 항원 단백질 생산

- 글라디올러스와 백합 모두에서 바이러스가 확인된 CMV와 LMoV의 항원을 생산하기 위해 단백질발현벡터인 pET21a(+)에 클로닝을 진행하였음. 유전자는 모두 외피단백질을 타겟으로 클로닝을 진행하였으며, HIS를 붙여서 정제하기 쉽게 제작하였음.

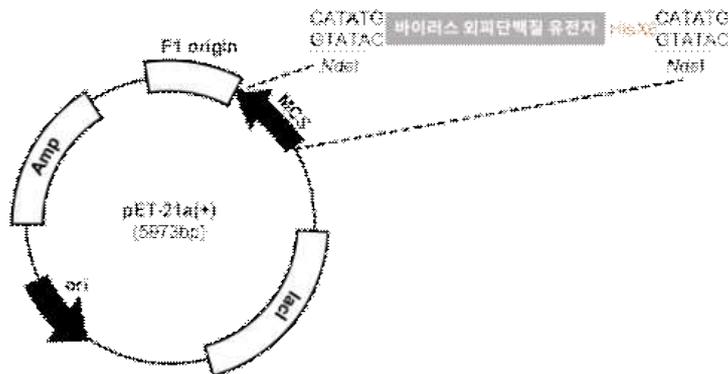


그림 4. 단백질 발현 벡터 pET21a(+)에 바이러스 외피단백질 유전자 삽입 모식도. 단백질 발현 벡터인 pET21a(+) vector에 삽입하여 외피단백질을 발현하는 벡터를 제작하였음.

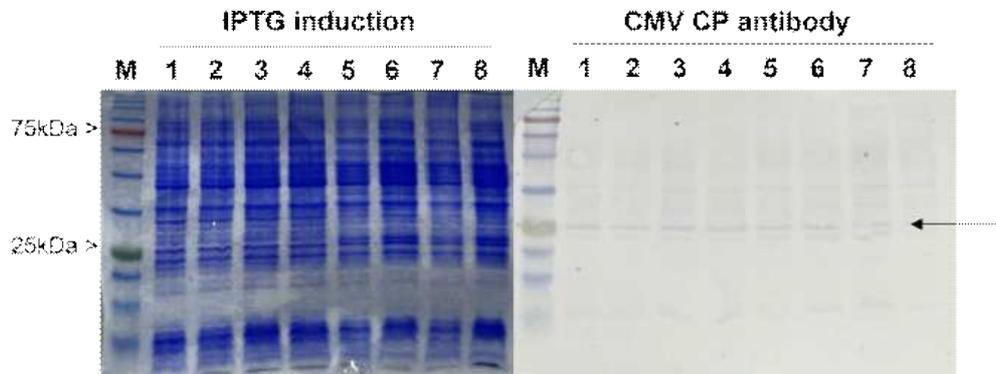


그림 5. Western blot assay를 통한 CMV CP 발현 벡터의 단백질 발현 확인. 확인된 CMV의 외피단백질을 단백질 발현 벡터인 pET21a(+) vector에 삽입하여 외피단백질을 발현하는 벡터를 제작하였음. 단백질 발현 벡터에 CMV 외피단백질을 삽입 후, IPTG 유도발현을 시켜 SDS-PAGE gel상에서 단백질을 확인하였으며, western blot assay를 통해 CMV의 외피단백질이 발현되는 것을 확인하였음.

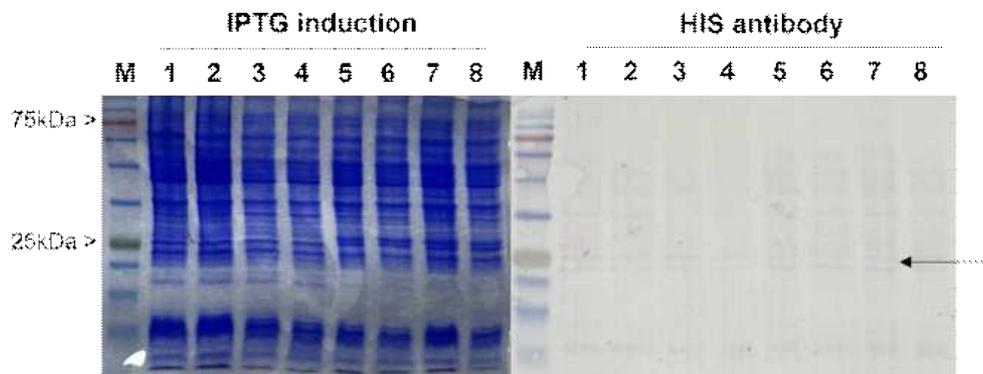


그림 6. Western blot assay를 통한 CMV와 LMoV CP 발현 벡터의 단백질 발현 확인. 확인된 CMV와 LMoV의 외피단백질을 단백질 발현 벡터인 pET21a(+) vector에 삽입하여 외피단백질을 발현하는 벡터를 제작하였음. 단백질 발현 벡터에 CMV와 LMoV 외피단백질을 삽입 후, IPTG 유도 발현을 시켜 SDS-PAGE gel상에서 단백질을 확인하였음. 또한, western blot assay를 벡터 내에 달려있는 HIS 서열의 antibody를 사용하여 CMV와 LMoV의 외피단백질이 발현되는 것을 확인하였음.

## 2. 이동형 정량적 유전자진단법(qRT-PCR) 개발

○ 목표 바이러스 특이적 염기서열 선별 및 특이 프라이머-프로브(Taqman) 개발

- 주관 및 제1공동연구기관(강원대학교)으로부터 구근 화훼류 바이러스의 양성 및 음성 시료를 수령하여 진단법 개발에 사용함(표 2, 3).

표 2. 주관연구기관(경북대학교)으로부터 확보한 구근 화훼류 바이러스 4종의 양성 및 음성 시료<sup>a</sup>

구분	튤립에서 검출된 바이러스 4종			
	LSV	TBV	TVX	OMMV
양성 시료	LSV-1	TBV-1	TVX-1	OMMV-1
	LSV-2	TBV-2	TVX-2	OMMV-2
	LSV-3	TBV-3	TVX-3	OMMV-3
음성 시료	LSV-N	TBV-N	TVX-N	OMMV-N

<sup>a</sup>LSV: *Lily symptomless virus*, TBV: *Tulip breaking virus*, TVX: *Tulip virus X*.

표 3. 주관연구기관(경북대학교)으로부터 확보한 구근 화훼류 바이러스 10종의 양성 및 음성 시료<sup>a</sup>

구분	수선화에서 검출된 바이러스 10종									
	CEVA	NLSYV	NLV	NYSV	NMV	NeLV	SVY	JINRV	TRV	TuYV
양성 시료	CEVA-1	NLSYV-1	NLV-1	NYSV-1	NMV-1	NeLV-1	SVY-1	JINRV-1	TRV-1	TuYV-1
	CEVA-2	NLSYV-2	NLV-2	NYSV-2	NMV-2	NeLV-2	SVY-2	JINRV-2	TRV-2	TuYV-2
	CEVA-3	NLSYV-3	NLV-3	NYSV-3	NMV-3	NeLV-3	SVY-3	JINRV-3	TRV-3	TuYV-3
음성 시료	CEVA-N	NLSYV-N	NLV-N	NYSV-N	NMV-N	NeLV-N	SVY-N	JINRV-N	TRV-N	TuYV-N

<sup>a</sup> CEVA: *Cyrtanthus elatus virus A*, NLSYV: *Narcissus late season yellows virus*, NLV: *Narcissus latent virus*, NMV: *Narcissus mosaic virus*, NYSV: *Narcissus yellow stripe virus*, NeLV: *Nerine latent virus*, SVY: *Snowdrop virus Y*, JINRV: *Japanese iris necrotic ring virus*, TRV: *Tobacco rattle virus*, TuYV: *Turnip yellows virus*.

표 4. 제1공동 연구기관(강원대학교)으로부터 확보한 백합 바이러스 4종의 양성 및 음성 시료

real-time PCR 용 RNA 샘플 리스트					
	채집 지역	채집 시료	농도 (ng/ul)	복합감염 여부	복합감염 바이러스
CMV1	충청남도 예산군	백합	64	X	-
CMV2	충청남도 예산군	백합	163.64	O	LMoV, LSV
CMV3	충청남도 예산군	백합	141.62	O	LMoV
CMV4	충청남도 예산군	백합	417.24	O	LMoV
CMV5	제주도	백합	172.79	O	LMoV, LSV, PIAMV
LMoV1	강원도 횡성군	백합	42.31	O	PIAMV
LMoV2	강원도 영월군	백합	62.97	O	LSV
LMoV3	강원도 영월군	백합	121.89	O	CMV
LMoV4	강원도 영월군	백합	123.93	O	CMV, PIAMV
LMoV5	강원도 원주시	백합	67.66	X	-
LSV1	경기도 과천시	백합	51.48	X	-
LSV2	강원도 영월군	백합	100.08	O	CMV, LMoV
LSV3	강원도 영월군	백합	118.94	O	CMV, LMoV
LSV4	강원도 영월군	백합	54.28	O	CMV
LSV5	강원도 영월군	백합	64.39	O	LMoV
PIAMV1	강원도 횡성군	백합	23.78	X	-
PIAMV2	강원도 영월군	백합	167.39	O	CMV, LMoV
PIAMV3	강원도 강릉시	백합	44.28	O	LMoV, LSV
PIAMV4	강원도 강릉시	백합	34.6	O	CMV, LSV

LMoV: *Lily mottle virus*, LSV: *lily symptomless virus*, PIAMV: *Plantago asiatica mosaic virus*, CMV: *Cucumber mosaic virus*.

- 주관 및 제1공동연구기관으로부터 제공받은 식물바이러스에 특이적으로 반응하는 프라이머-프로브(Taqman) 세트를 바이러스당 2세트 이상 설계함.
- 설계된 프라이머-프로브 세트 후보를 양성 및 음성 시료를 이용하여 유효성 평가를 수행함.
- 유효성 평가 결과를 바탕으로 민감도가 가장 높은 프라이머-프로브 세트를 선정하였음(그림 7-19).

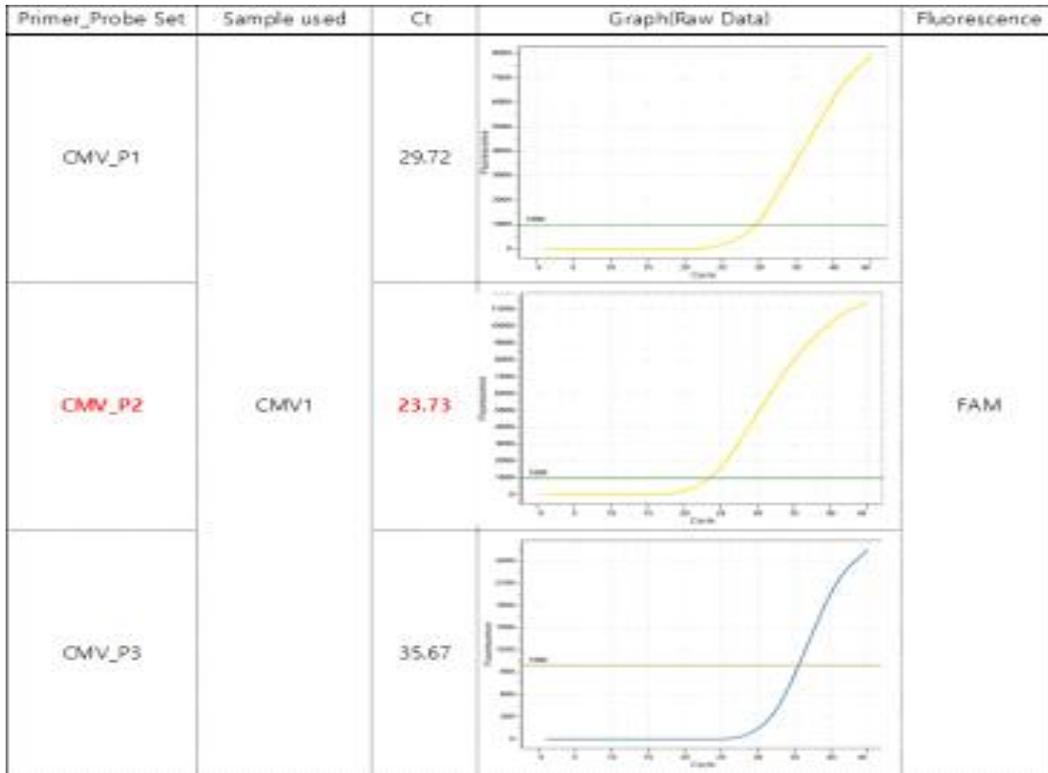


그림 7. *Cucumber mosaic virus*(CMV)의 프라이머-프로브(Taqman) 세트 설계. 프라이머-프로브(Taqman) 세트 후보를 양성 및 음성 시료를 통하여 유효성 평가하였음. 빨간색 글씨 : 민감도가 가장 높은 프라이머-프로브 세트.

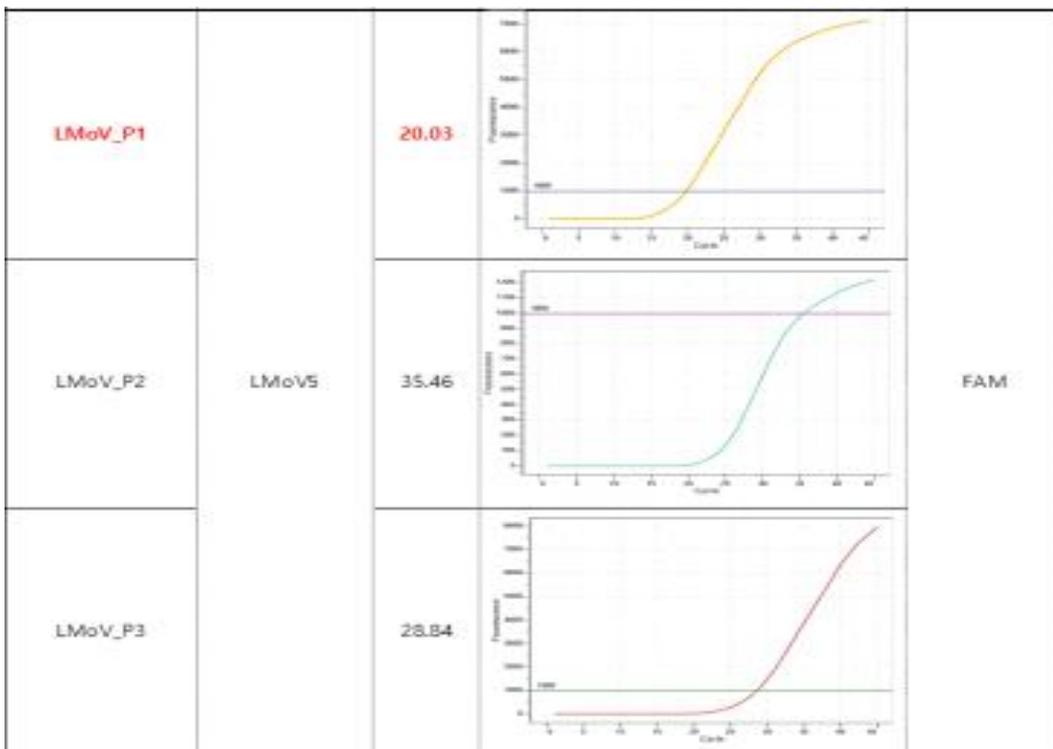


그림 8. *Lily mottle virus*(LMoV)의 프라이머-프로브(Taqman) 세트 설계. 프라이머-프로브(Taqman) 세트 후보를 양성 및 음성 시료를 통하여 유효성 평가하였음. 빨간색 글씨 : 민감도가 가장 높은 프라이머-프로브 세트.

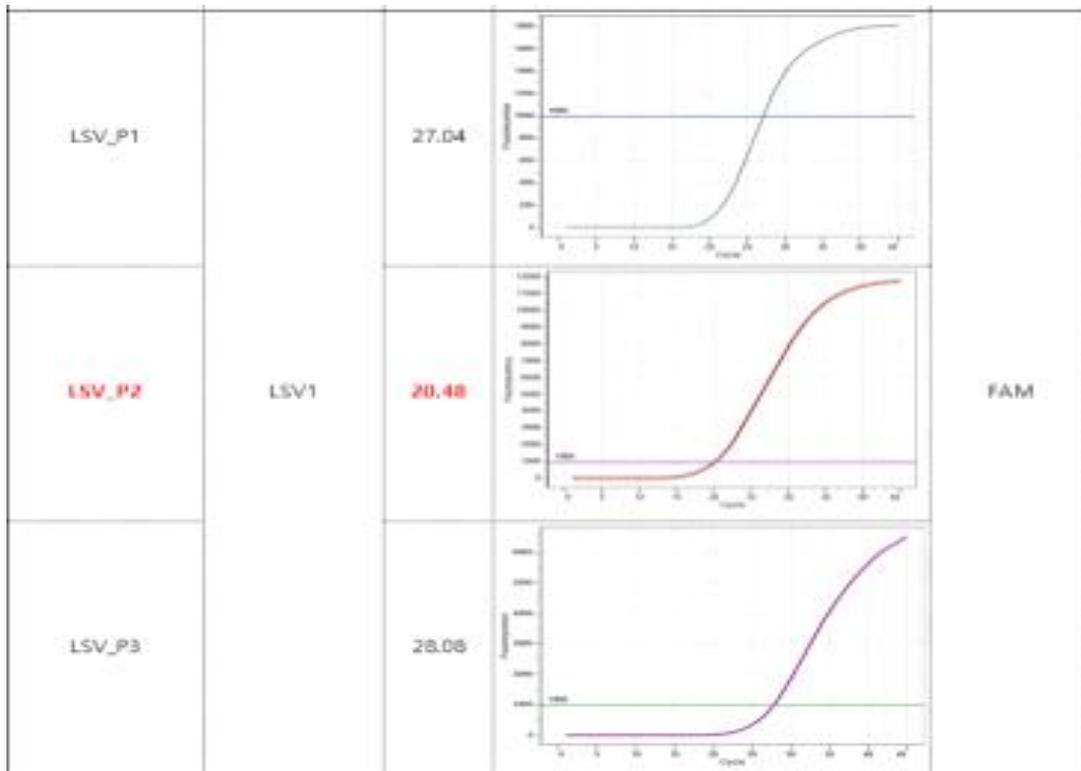


그림 9. *Lily symptomless virus*(LSV)의 프라이머-프로브(Taqman) 세트 설계. 프라이머-프로브(Taqman) 세트 후보를 양성 및 음성 시료를 통하여 유효성 평가하였음. 빨간색 글씨 : 민감도가 가장 높은 프라이머-프로브 세트.

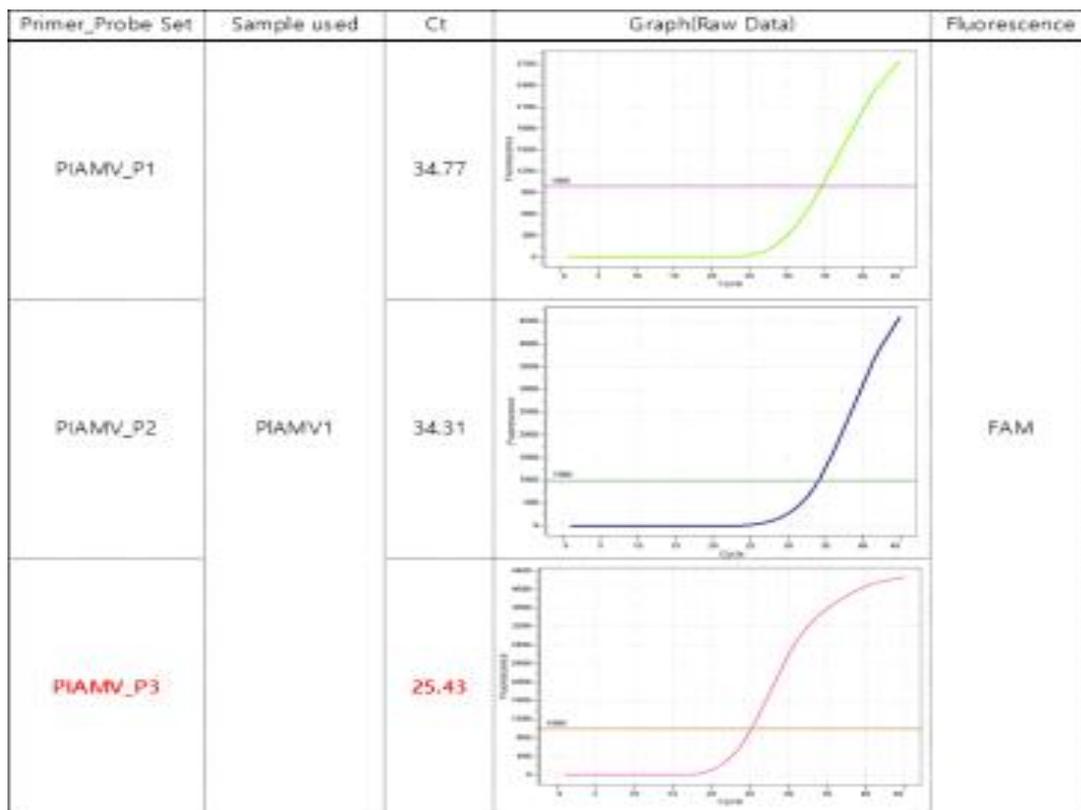


그림 10. *Plantago asiatica mosaic virus*(PIAMV)의 프라이머-프로브(Taqman) 세트 설계. 프라이머-프로브(Taqman) 세트 후보를 양성 및 음성 시료를 통하여 유효성 평가하였음. 빨간색 글씨 : 민감도가 가장 높은 프라이머-프로브 세트.

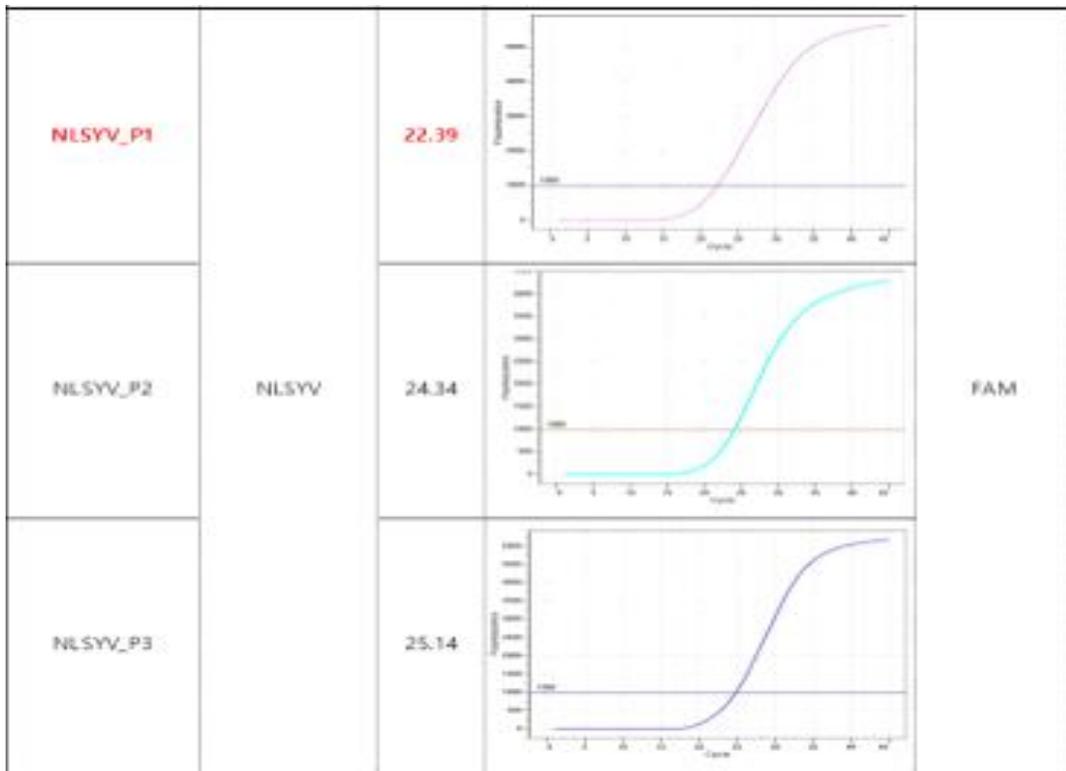


그림 11. *Narcissus late season yellows virus*(NLSYV)의 프라이머-프로브(Taqman) 세트 설계. 프라이머-프로브(Taqman) 세트 후보를 양성 및 음성 시료를 통하여 유효성 평가하였음. 빨간색 글씨 : 민감도가 가장 높은 프라이머-프로브 세트.

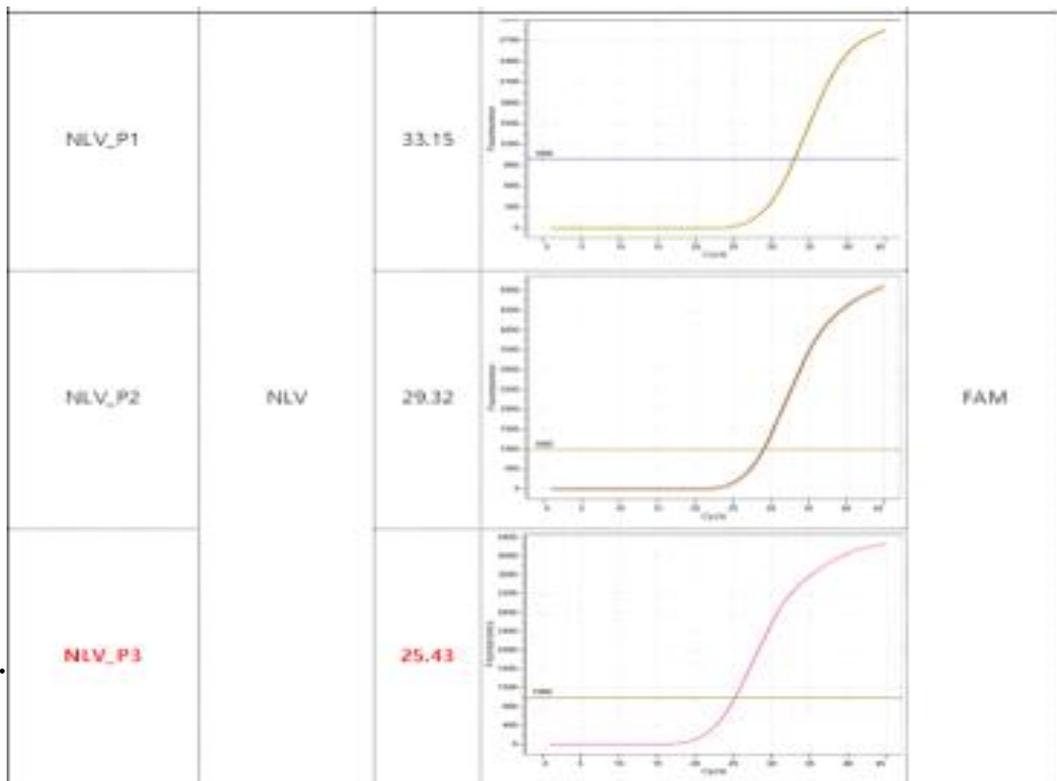


그림 12. *Narcissus latent virus*(NLV)의 프라이머-프로브(Taqman) 세트 설계. 프라이머-프로브(Taqman) 세트 후보를 양성 및 음성 시료를 통하여 유효성 평가하였음. 빨간색 글씨 : 민감도가 가장 높은 프라이머-프로브 세트.

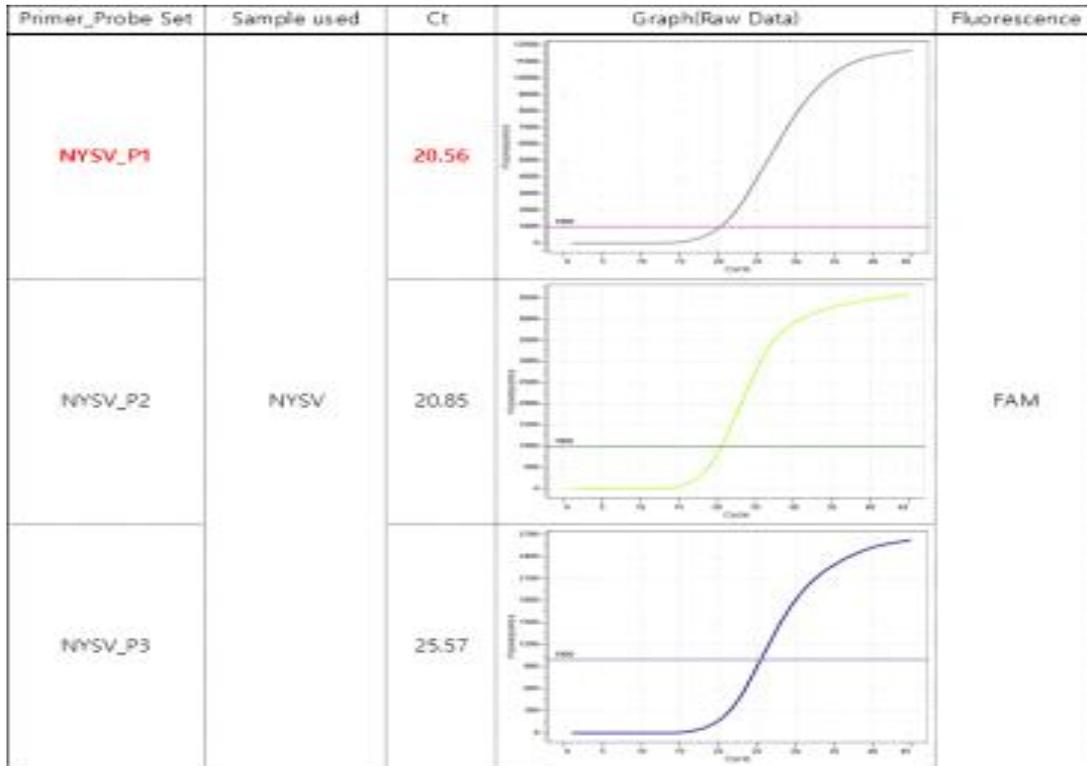


그림 13. *Narcissus yellow stripe virus*(NYSV)의 프라이머-프로브(Taqman) 세트 설계. 프라이머-프로브(Taqman) 세트 후보를 양성 및 음성 시료를 통하여 유효성 평가하였음. 빨간색 글씨 : 민감도가 가장 높은 프라이머-프로브 세트.

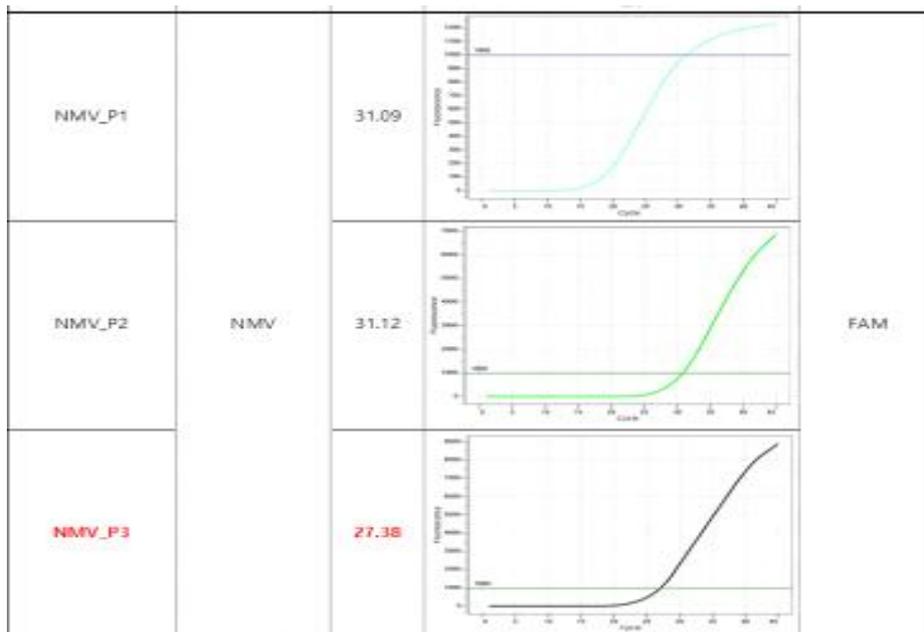


그림 14. *Narcissus mosaic virus*(NMV)의 프라이머-프로브(Taqman) 세트 설계. 프라이머-프로브(Taqman) 세트 후보를 양성 및 음성 시료를 통하여 유효성 평가하였음. 빨간색 글씨 : 민감도가 가장 높은 프라이머-프로브 세트.

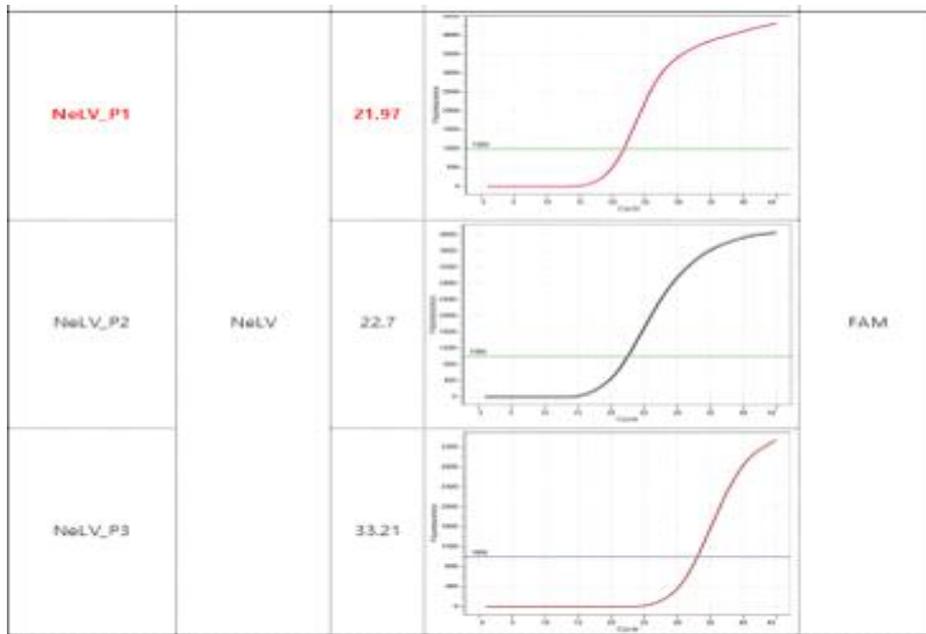


그림 15. *Nerine latent virus*(NeLV)의 프라이머-프로브(Taqman) 세트 설계. 프라이머-프로브(Taqman) 세트 후보를 양성 및 음성 시료를 통하여 유효성 평가하였음. 빨간색 글씨 : 민감도가 가장 높은 프라이머-프로브 세트.

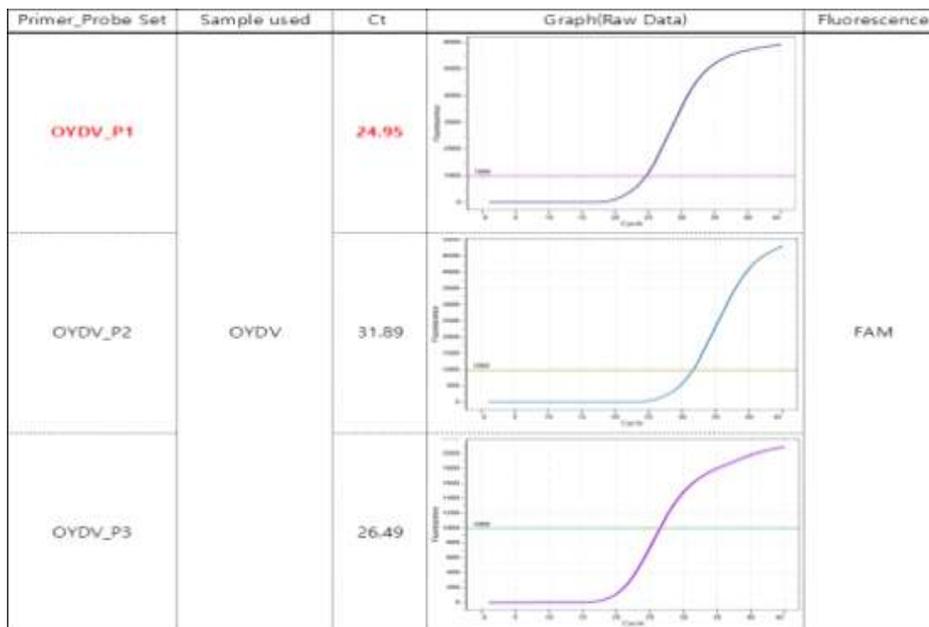


그림 16. Snow dropvirus Y(SVY)의 프라이머-프로브(Taqman) 세트 설계. OYDV(*Onion yellow dwarf virus*)는 주관연구기관(경북대학교)를 통하여 snowdrop virus Y로 수정하였음. 프라이머-프로브(Taqman) 세트 후보를 양성 및 음성 시료를 통하여 유효성 평가하였음. 빨간색 글씨 : 민감도가 가장 높은 프라이머-프로브 세트.

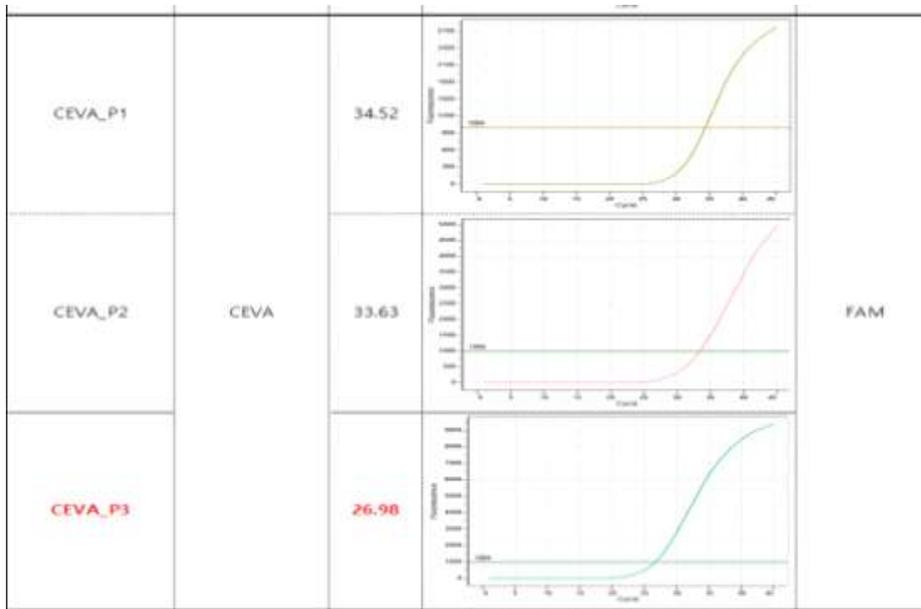


그림 17. *Cyrtanthus elatus virus A*(CEVA)의 프라이머-프로브(Taqman) 세트 설계. 프라이머-프로브(Taqman) 세트 후보를 양성 및 음성 시료를 통하여 유효성 평가하였음. 빨간색 글씨 : 민감도가 가장 높은 프라이머-프로브 세트.

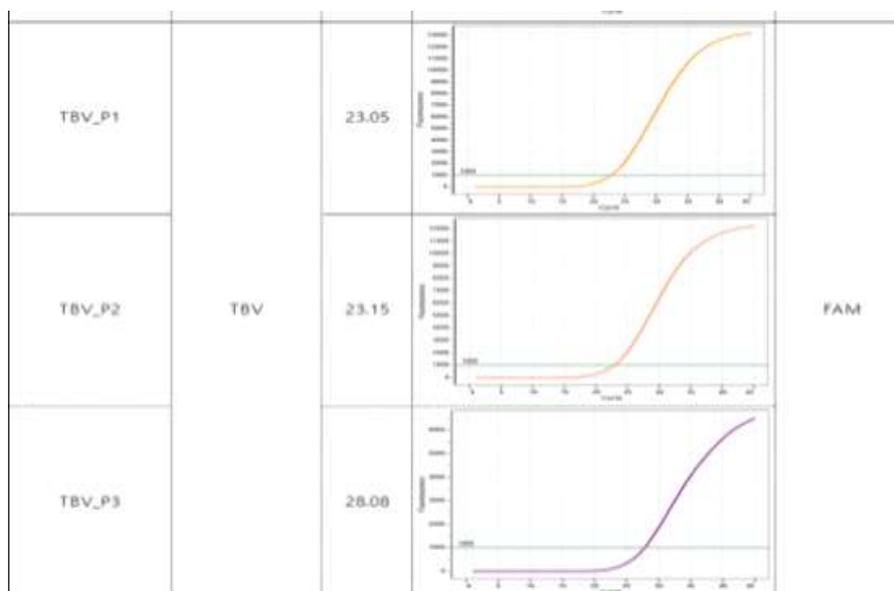


그림 18. *Tulip breaking virus*(TBV)의 프라이머-프로브(Taqman) 세트 설계. 프라이머-프로브(Taqman) 세트 후보를 양성 및 음성 시료를 통하여 유효성 평가하였음. 빨간색 글씨 : 민감도가 가장 높은 프라이머-프로브 세트.

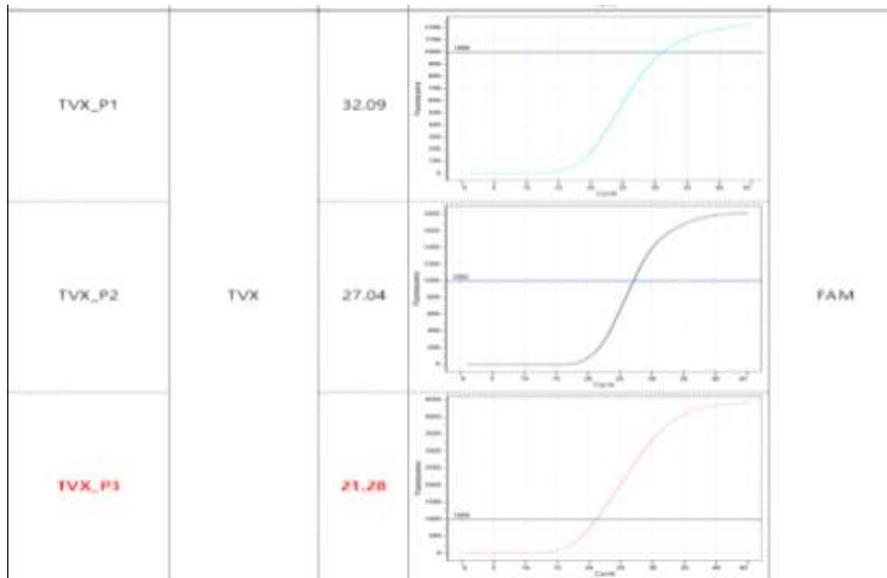


그림 19. *Tulip virus X*(TVX)의 프라이머-프로브(Taqman) 세트 설계. 프라이머-프로브(Taqman) 세트 후보를 양성 및 음성 시료를 통하여 유효성 평가하였음. 빨간색 글씨 : 민감도가 가장 높은 프라이머-프로브 세트.

○ 바이러스 다중진단법 확립 및 임상적 검증

- 구근 화훼류 바이러스 다중진단법 개발을 위해서 1차년도에 각 바이러스에 대해 특이적으로 반응하는 프라이머-프로브셋을 기초로 3종의 구근류(튤립, 수선화, 백합)에 대해서 Duplex 또는 Triplex의 다중 진단법을 확립하였음(표 5, 6).
- 구근 화훼류 바이러스 다중진단법의 임상적인 성능검증을 위해 주관 및 제1공동연구기관 으로부터 제공된 양성 및 음성 시료에 대해 반응성을 확인하여 성능을 검증함(그림 20-22).

표 5. 튤립, 수선화, 백합 바이러스에 대한 다중진단 키트(Duplex)의 구성개요<sup>a</sup>

구근 화훼류	다중진단 키트(Duplex)	
	키트 이름	진단 바이러스
튤립	T2-1	<i>Lily symptomless virus</i>
		<i>Tulip virus X</i>
수선화	N2-1	<i>Narcissus yellow stripe virus</i>
		<i>Narcissus mosaic virus</i>
백합	L2-1	<i>Cucumber mosaic virus</i>
		<i>Lily symptomless virus</i>
	L2-2	<i>Lily symptomless virus</i>
		<i>Lily mottle virus</i>

<sup>a</sup> 구근 화훼류 바이러스 6종(LSV, TVX, NYSV, NMV, CMV, LMoV)에 대하여 2가지 바이러스를 동시 진단할 수 있는 진단법을 개발하였음.

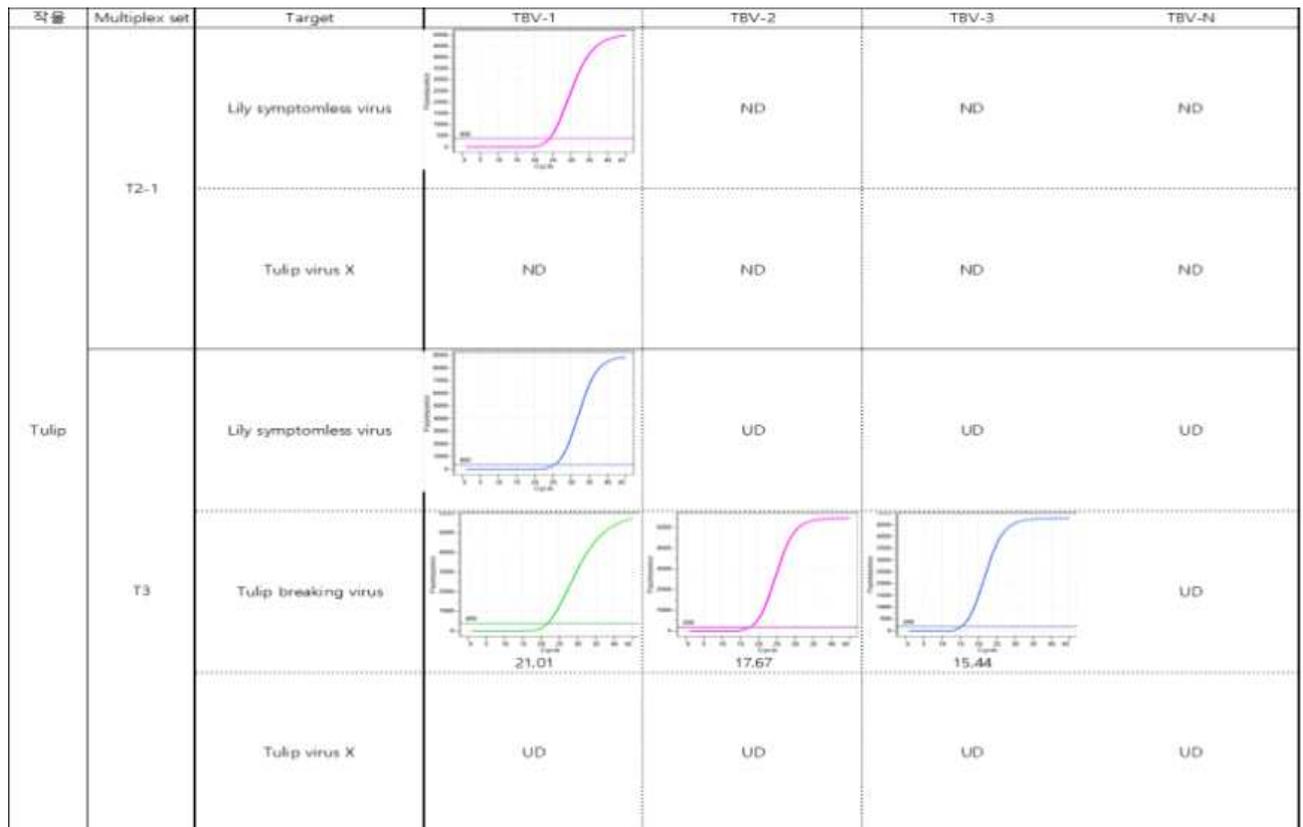
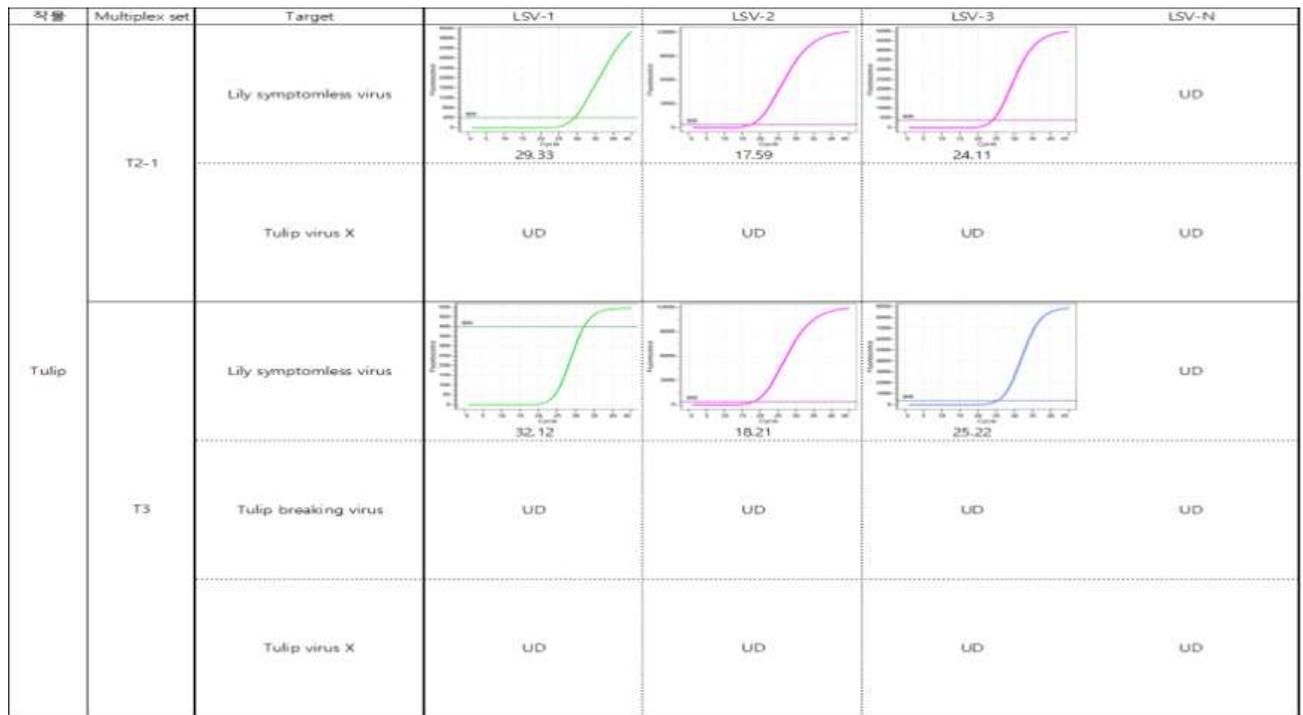
표 6. 튤립, 수선화, 백합 바이러스에 대한 다중진단 키트(Triplex)의 구성개요<sup>a</sup>

구근 화훼류	다중진단 키트(Triplex)	
	키트 이름	진단 바이러스
튤립	T3	<i>Lily symptomless virus</i>
		<i>Tulip virus X</i>
		<i>Tulip breaking virus</i>
수선화	N3	<i>Narcissus yellow stripe virus</i>
		<i>Narcissus mosaic virus</i>
		<i>Narcissus latent virus</i>
백합	L3	<i>Cucumber mosaic virus</i>
		<i>Lily symptomless virus</i>
		<i>Lily mottle virus</i>

<sup>a</sup> 구근 화훼류 바이러스 6종(LSV, TVX, NYSV, NMV, CMV, LMoV)에 대하여 3가지 바이러스를 동시 진단할 수 있는 진단법을 개발하였음.

그림 20. 튤립에 대한 다중진단법 검사결과

작물	Multiplex set	Target	Sample											
			LSV-1	LSV-2	LSV-3	LSV-N	TBV-1	TBV-2	TBV-3	TBV-N	TVX-1	TVX-2	TVX-3	TVX-N
Tulip	T2-1	Lily symptomless virus	29.33	17.59	24.11	UD	ND	ND	ND	ND	UD	UD	UD	UD
		Tulip virus X	UD	UD	UD	UD	ND	ND	ND	ND	16.13	18.19	14.68	UD
	T3	Lily symptomless virus	32.12	18.21	25.22	UD								
		Tulip breaking virus	UD	UD	UD	UD	21.01	17.67	15.44	UD	UD	UD	UD	UD
		Tulip virus X	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	



작물	Multiplex set	Target	TVX-1	TVX-2	TVX-3	TVX-N
			 16.13	UD	UD	UD
Tulip	T2-1	Lily symptomless virus	 16.13	 18.19	 14.68	UD
		Tulip virus X	UD	UD	UD	UD
	T3	Lily symptomless virus	 16.92	UD	UD	UD
T3	Tulip breaking virus	 16.92	UD	UD	UD	
	Tulip virus X	 16.92	 19.01	 14.44	UD	

그림 21. 수선화에 대한 다중진단법 검사결과

작물	Multiplex set	Target	Sample												
			NYSV-1	NYSV-2	NYSV-3	NYSV-N	NLV-1	NLV-2	NLV-3	NLV-N	NMV-1	NMV-2	NMV-3	NMV-N	
Narcissus	N2-1	Narcissus yellow stripe virus	15.83	27.12	14.99	UD	ND	ND	ND	ND	UD	UD	UD	UD	
		Narcissus mosaic virus	UD	UD	UD	UD	ND	ND	ND	ND	15.13	26.42	28.11	UD	
	N3	Narcissus yellow stripe virus	16.67	29.72	14.38	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	
		Narcissus latent virus	UD	UD	UD	UD	15.14	14.20	26.58	UD	UD	UD	UD	UD	
		Narcissus mosaic virus	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	15.34	28.32	30.59	UD

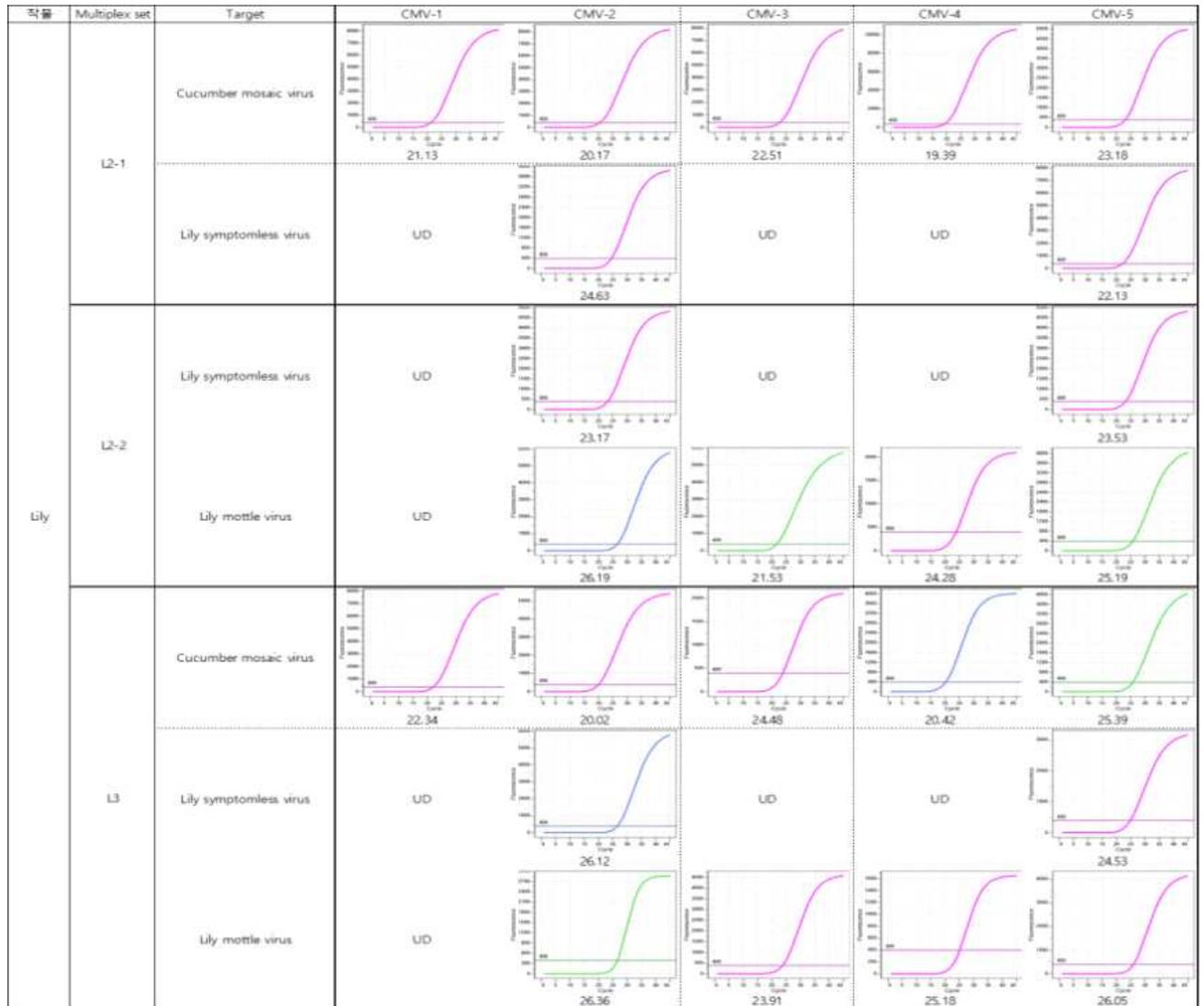
작물	Multiplex set	Target	NYSV-1	NYSV-2	NYSV-3	NYSV-N
			 15.83	 27.12	 14.99	UD
Narcissus	N2-1	Narcissus yellow stripe virus	 15.83	 27.12	 14.99	UD
		Narcissus mosaic virus	UD	UD	UD	UD
	N3	Narcissus yellow stripe virus	 16.67	 29.72	 14.38	UD
N3	Narcissus latent virus	UD	UD	UD	UD	
	Narcissus mosaic virus	UD	UD	UD	UD	

작물	Multiplex set	Target	NLV-1	NLV-2	NLV-3	NLV-N
Narcissus	N2-1	Narcissus yellow stripe virus		ND	ND	ND
		Narcissus mosaic virus	ND	ND	ND	ND
	Narcissus yellow stripe virus		UD	UD	UD	
	N3	Narcissus latent virus				UD
		Narcissus mosaic virus	UD	UD	UD	UD

작물	Multiplex set	Target	NMV-1	NMV-2	NMV-3	NMV-N
Narcissus	N2-1	Narcissus yellow stripe virus		UD	UD	UD
		Narcissus mosaic virus				UD
	Narcissus yellow stripe virus		UD	UD	UD	
	N3	Narcissus latent virus		UD	UD	UD
		Narcissus mosaic virus				UD

그림 22. 백합에 대한 다중진단법 검사결과

작물	Multiplex set	Target	Sample															
			CMV-1	CMV-2	CMV-3	CMV-4	CMV-5	LSV-K1	LSV-K2	LSV-K3	LSV-K4	LSV-K5	LMoV-1	LMoV-2	LMoV-3	LMoV-4	LMoV-5	
Lily	L2-1	Cucumber mosaic virus	21.13	20.17	22.51	19.39	23.18	UD	UD	21.75	21.05	UD	UD	UD	23.19	21.57	UD	
		Lily symptomless virus	UD	24.63	UD	UD	22.13	20.15	23.47	24.54	22.43	20.13	UD	24.57	UD	UD	UD	
	L2-2	Lily symptomless virus	UD	23.17	UD	UD	23.53	21.42	23.94	24.17	21.53	19.94	UD	25.03	UD	UD	UD	
		Lily mottle virus	UD	26.19	21.53	24.28	25.19	UD	20.11	20.45	UD	23.52	18.51	25.24	22.45	22.63	21.61	
	L3	Cucumber mosaic virus	22.34	20.02	24.48	20.42	25.39	UD	UD	22.64	22.45	UD	UD	UD	UD	25.18	22.93	UD
		Lily symptomless virus	UD	26.12	UD	UD	24.53	23.16	24.98	26.15	23.79	21.63	UD	27.42	UD	UD	UD	UD
		Lily mottle virus	UD	26.36	23.91	25.18	26.05	UD	21.46	21.73	UD	25.31	19.91	26.53	23.51	24.18	23.01	

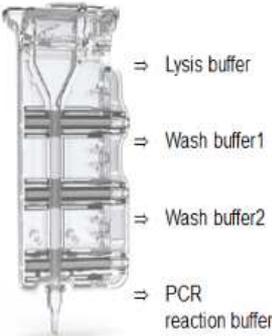


작업	Multiplex set	Target	LSV-K1	LSV-K2	LSV-K3	LSV-K4	LSV-K5
Lily	L2-1	Cucumber mosaic virus		UD			UD
		Lily symptomless virus					
	L2-2	Lily symptomless virus					
		Lily mottle virus				UD	
	L3	Cucumber mosaic virus		UD			UD
		Lily symptomless virus					
		Lily mottle virus				UD	
		Lily symptomless virus					

작업	Multiplex set	Target	LMoV-1	LMoV-2	LMoV-3	LMoV-4	LMoV-5
Lily	L2-1	Cucumber mosaic virus		UD			UD
		Lily symptomless virus			UD	UD	UD
	L2-2	Lily symptomless virus			UD	UD	UD
		Lily mottle virus					
	L3	Cucumber mosaic virus		UD			UD
		Lily symptomless virus			UD	UD	UD
		Lily mottle virus					
		Lily symptomless virus					

○ 현장진단용 구근 화훼류 다중유전자진단법의 디자인 및 시제품 제작

- 3종의 각 화훼구근류를 대상으로 2종의 타겟(IPC 포함 3종 타겟)을 검출하는 진단카틸리지를 제작하였음.
- 현장용으로 검사가능한 POC 리얼타임피씨알 장비는 포스트바이오가 OEM 형식으로 자체 제작하여 확보하였음.
- 진단카틸리지의 경우 샘플전처리액을 카틸리지 상단에 넣고 핵산추출을 위한 마그네틱비드만 넣으면 되는 방식으로 기기의 자동구동에 의해서 핵산의 추출과 RT 그리고 PCR과정을 자동으로 수행하여 정량, 정성적인 결과를 산출할 수 있음.

구성	POC 진단기기	POC 진단카틸리지	검사결과(실시간확인)
<p>대상기기 (키트)사진</p>			
<p>스펙 및 기능</p>	<p>4개의 시료를 각각 로딩할 수 있는 장비로 한 개의 슬롯당 4개의 형광으로 최대 3개의 타겟유전자를 검출할 수 있음</p>	<p>샘플주입과 라이시스, 세척 1, 2 그리고 피씨알이 진행되는 4개의 구역으로 나누어져 있고 중력에 의해 샘플이 이동하고 핵산의 추출 후에는 가장 하단의 PCR tube에서 리얼타임피씨알 반응이 진행되고 결과가 산출됨</p>	<p>일반 리얼타임피씨알과 마찬가지로 1번째 사이클에서 45번째 사이클까지 형광의 강도가 정량적으로 체크되어 그래프로 그려서 실시간 유전자의 증폭정도와 실험 후 각 유전자별 검사결과를 확인할 수 있음</p>

○ 최종 다중진단키트 패널의 구성

- 3종의 각 구근화훼류(튤립, 수선화, 백합)를 대상으로 1-2차년도에 개발한 각각의 바이러스에 대한 프라이머-프로브 패널에 대한 개발하였음.
- 1-2세부과제의 각 구근화훼류에서의 각 바이러스의 발생빈도 및 검출의 중요성 등을 고려하여 최종적으로 실험실에서 사용할 수 있는 Triplex qPCR Kit와 현장에서 사용할 수 있는 Triplex qPCR키트를 구성하였음.
- 각 구근화훼류별 주요 3종의 바이러스와 실험의 검증을 위해 추가된 Internal Control의 구성은 다음과 같음.

진단키트명칭	진단 대상 구근 화훼류	바이러스	형광 구성	비고
POBGEN™ Tulip Virus Detection Kit	튤립(Tulip)	LSV	FAM	Lab qPCR (별도핵산추출필요)
		IPC	HEX	
		OMMV	ROX	
		TVX	Cy5	
POBGEN™ XQ Tulip Virus Detection Kit	튤립(Tulip)	LSV	FAM	POC qPCR (핵산추출_유전자검출 통합)
		IPC	HEX	
		OMMV	ROX	
		TVX	Cy5	
POBGEN™ Narcissus Virus Detection Kit	수선화(Narcissus)	NYSV	FAM	Lab qPCR (별도핵산추출필요)
		IPC	HEX	
		TRV	ROX	
		NMV	Cy5	
POBGEN™ XQ Narcissus Virus Detection Kit	수선화(Narcissus)	NYSV	FAM	POC qPCR (핵산추출_유전자검출 통합)
		IPC	HEX	
		TRV	ROX	
		NMV	Cy5	
POBGEN™ Lily Virus Detection Kit	백합(Lily) 글라디올러스 (Gladiolus)	CMV	FAM	Lab qPCR (별도핵산추출필요)
		IPC	HEX	
		LSV	ROX	
		LMoV	Cy5	
POBGEN™ XQ Lily Virus Detection Kit	백합(Lily) 글라디올러스 (Gladiolus)	CMV	FAM	POC qPCR (핵산추출_유전자검출 통합)
		IPC	HEX	
		LSV	ROX	
		LMoV	Cy5	

- 1단계 및 2단계의 연구개발 과정을 거쳐 총 3년간 구근 화훼류에서 주요하게 문제가 될 수 있는 바이러스에 대한 3개의 다중 진단키트(실험실 진단키트 3개 및 현장진단용 진단키트 3개)을 개발하였음.
- 경북대학교와 강원대학교의 수행을 통해 확보한 구근 화훼류 바이러스에 대한 양성과 음성 시료를 이용하여 진단키트에 대한 실험실 임상적 민감도, 특이도 등에 대한 성능을 검증하였음.



현장용 리얼타임 피씨알기기(4CH.)



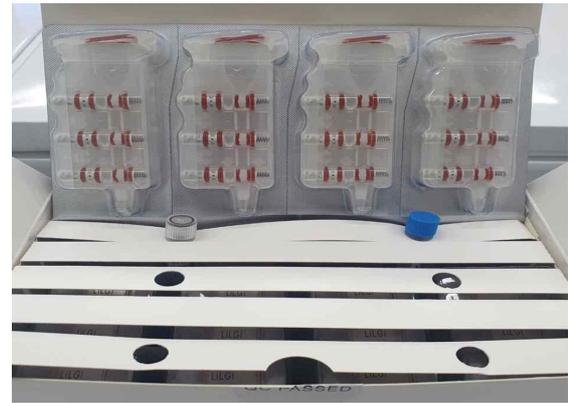
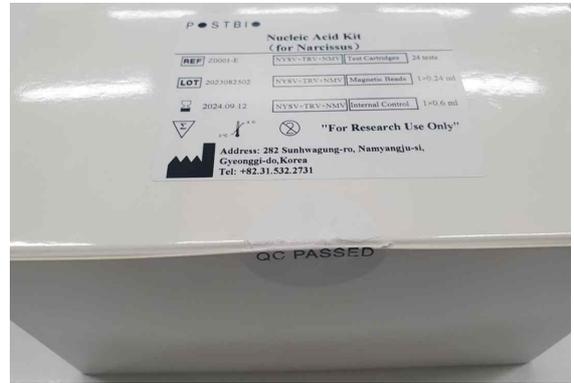
현장용 리얼타임 피씨알기기(1CH.)



(POBGEN Tulip virus Detection Kit)



(POBGEN XQ Tulip virus Detection Kit)



(POBGEN Narcissus virus Detection Kit)

(POBGEN XQ Narcissus virus Detection Kit)



(POBGEN Lily virus Detection Kit)

(POBGEN XQ Lily virus Detection Kit)

- 최종 다중진단키트에 대한 분석적 성능검증(실험실 사용을 위한 분자진단키트)
  - 본 과제를 통해 개발된 3종의 구근 화훼류에 대한 3종의 분자진단키트(Taqman Probe 기반 실험실 진단키트)에 대해서 농도를 알고 있는 바이러스 양성 시료를 활용하여 민감도를 분석하였음.
  - ‘POBGEN Tulip virus Detection Kit’의 민감도를 분석하였음(표 7).
  - 최종적으로 확인된 시험법을 이용하여 튜립에 감염될 수 있는 주요한 바이러스 중 바이러스의 농도를 알고 있는 3개의 바이러스 감염검체를 이용하여 10배 단계 희석한 후 각각의 바이러스에 대한 분석적 민감도(최소검출한계, LOD)를 산출함.
  - 분석결과와 양성의 분별을 위한 최적의 역치(Threshold)를 고려하였을 때 POBGEN Tulip virus Detection Kit의 진단타겟인 LSV, OMMV, TVX는 모두  $10^2$ copies equivalent /Rx으로 확인되었음.

표 7. POBGEN Tulip virus Detection Kit에 대한 튜립 바이러스 3종에 대한 민감도 분석

Target Virus	$10^6$ copies/Rx	$10^5$ copies/Rx	$10^4$ copies/Rx	$10^3$ copies/Rx	$10^2$ copies/Rx	$10^1$ copies/Rx	LOD
LSV	24.79	28.28	32.03	34.76	37.66	40.11	$10^2$ copies/Rx (Ct 38)
OMMV	20.65	24.89	28.39	31.74	35.64	UD	$10^2$ copies/Rx (Ct 36)
TVX	16.98	21.18	24.88	28.50	31.93	34.86	$10^2$ copies/Rx (Ct 32)

- POBGEN Narcissus virus Detection Kit의 민감도를 분석하였음(표 8).
- 최종적으로 확인된 시험법을 이용하여 수선화에 감염될 수 있는 주요한 바이러스 중 바이러스의 농도를 알고 있는 3개의 바이러스 감염검체를 이용하여 10배 단계 희석한 후 각각의 바이러스에 대한 분석적 민감도(최소검출한계, LOD)를 산출함
- 분석결과와 양성의 분별을 위한 최적의 역치(Threshold)를 고려하였을 때 POBGEN Narcissus virus Detection Kit의 진단타겟인 TRV, NMV는  $10^2$ copies equivalent /Rx으로 NYSV의 경우  $10^3$ copies equivalent /Rx로 확인되었음

표 8. POBGEN Narcissus virus Detection Kit에 대한 튜립 바이러스 3종에 대한 민감도 분석 결과

Target Virus	$10^6$ copies/Rx	$10^5$ copies/Rx	$10^4$ copies/Rx	$10^3$ copies/Rx	$10^2$ copies/Rx	$10^1$ copies/Rx	LOD
NYSV	25.95	29.61	33.16	36.35	40.15	UD	$10^3$ copies/Rx (Ct 40)
TRV	20.55	23.95	27.61	31.16	34.35	UD	$10^2$ copies/Rx (Ct 35)
NMV	21.66	25.98	29.74	33.42	36.20	39.02	$10^2$ copies/Rx (Ct 38)

- POBGEN Lily virus Detection Kit의 민감도를 분석하였음(표 9).
- 최종적으로 확인된 시험법을 이용하여 백합에 감염될 수 있는 주요한 바이러스 중 바이러스의 농도를 알고 있는 3개의 바이러스 감염검체를 이용하여 10배 단계 희석한 후 각각의 바이러스에 대한 분석적 민감도(최소검출한계, LOD)를 산출함.
- 분석결과와 양성의 분별을 위한 최적의 역치(Threshold)를 고려하였을 때 POBGEN Lily virus Detection Kit의 진단타겟인 CMV, LSV, LMoV 모두  $10^2$ copies equivalent /Rx으로 확인되었음.

표 9. POBGEN Lily virus Detection Kit에 대한 튜립 바이러스 3종에 대한 민감도 분석<sup>a</sup>

Target Virus	$10^6$ copies/Rx	$10^5$ copies/Rx	$10^4$ copies/Rx	$10^3$ copies/Rx	$10^2$ copies/Rx	$10^1$ copies/Rx	LOD
CMV	20.56	23.92	27.85	30.99	34.78	39.02	$10^2$ copies/Rx (Ct 35)
LSV	22.55	26.05	29.62	33.00	36.91	UD	$10^2$ copies/Rx (Ct 38)
LMoV	22.77	26.95	30.66	34.37	38.14	41.01	$10^2$ copies/Rx (Ct 40)

- 최종 다중진단키트에 대한 분석적 성능검증(현장진단을 위한 분자진단키트 3종)
  - 본 과제를 통해 개발된 3종의 구근화훼류에 대한 3종의 분자진단키트(핵산추출과 유전자검출이 통합된 현장진단용 진단키트)에 대해서 농도를 알고 있는 바이러스 양성 시료를 활용하여 분석적 민감도를 확인하였음.
  - POBGEN XQ Tulip virus Detection Kit의 민감도를 분석하였음(표 10).
  - 최종적으로 확인된 시험법을 이용하여 튜립에 감염될 수 있는 주요한 바이러스 중 바이러스의 농도를 알고 있는 3개의 바이러스 감염검체를 이용하여 10배 단계 희석한 후 각각의 바이러스에 대한 분석적 민감도(최소검출한계, LOD)를 산출함

표 10. POBGEN XQ Tulip virus Detection Kit에 대한 튜립바이러스 3종에 대한 민감도 분석 결과

Target Virus	$10^6$ copies/Rx	$10^5$ copies/Rx	$10^4$ copies/Rx	$10^3$ copies/Rx	$10^2$ copies/Rx	$10^1$ copies/Rx	LOD
LSV	13.59	18.26	23.25	25.82	29.45	34.15	$10^2$ copies/Rx (Ct 30)
OMMV	15.54	19.20	22.89	27.48	32.31	34.33	$10^1$ copies/Rx (Ct 35)
TVX	17.01	20.54	23.98	28.31	31.26	UD	$10^2$ copies/Rx (Ct 32)

- 분석결과와 양성 분별을 위한 최적의 역치(Threshold)를 고려하였을 때 POBGEN XQ Tulip virus Detection Kit의 진단타켓인 LSV, TVX는  $10^2$ copies equivalent /Rx으로 OMMV는  $10^1$ copies equivalent /Rx으로 확인되었음.
- POBGEN XQ Narcissus virus Detection Kit의 민감도를 분석하였음(표 11).
- 최종적으로 확인된 시험법을 이용하여 수선화에 감염될 수 있는 주요한 바이러스 중 바이러스의 농도를 알고 있는 3개의 바이러스 감염검체를 이용하여 10배 단계 희석한 후 각각의 바이러스에 대한 분석적 민감도(최소검출한계, LOD)를 산출함.
- 분석결과와 양성 분별을 위한 최적의 역치(Threshold)를 고려하였을 때 POBGEN XQ Narcissus virus Detection Kit의 진단타켓인 NYSV, TRV, NMV 모두  $10^2$ copies equivalent /Rx으로 확인되었음.

표 11. POBGEN XQ Narcissus virus Detection Kit에 대한 수선화 바이러스 3종에 대한 민감도 분석 결과

Target Virus	$10^6$ copies/Rx	$10^5$ copies/Rx	$10^4$ copies/Rx	$10^3$ copies/Rx	$10^2$ copies/Rx	$10^1$ copies/Rx	LOD
NYSV	14.67	18.39	22.14	25.60	29.02	33.76	$10^2$ copies/Rx (Ct 30)
TRV	13.94	17.92	22.53	25.52	29.12	UD	$10^2$ copies/Rx (Ct 30)
NMV	13.87	18.39	21.75	25.55	28.97	33.91	$10^2$ copies/Rx (Ct 30)

- POBGEN XQ Lily virus Detection Kit의 민감도를 분석하였음(표 12).
- 최종적으로 확인된 시험법을 이용하여 백합에 감염될 수 있는 주요한 바이러스 중 바이러스의 농도를 알고 있는 3개의 바이러스 감염검체를 이용하여 10배 단계 희석한 후 각각의 바이러스에 대한 분석적 민감도(최소검출한계, LOD)를 산출함.
- 분석결과와 양성 분별을 위한 최적의 역치(Threshold)를 고려하였을 때 POBGEN XQ Lily virus Detection Kit의 진단타켓인 CMV, LSV는  $10^2$ copies equivalent/Rx으로 LMoV  $10^1$ copies equivalent /Rx으로 확인되었음.

표 12. POBGEN XQ Lily virus Detection Kit에 대한 백합바이러스 3종에 대한 민감도 분석 결과

Target Virus	$10^6$ copies/Rx	$10^5$ copies/Rx	$10^4$ copies/Rx	$10^3$ copies/Rx	$10^2$ copies/Rx	$10^1$ copies/Rx	LOD
CMV	16.67	20.86	23.83	26.83	29.71	34.76	$10^2$ copies/Rx (Ct 30)
LSV	12.94	16.72	20.64	25.66	28.57	UD	$10^2$ copies/Rx (Ct 30)
LMoV	12.87	16.25	20.55	23.98	27.11	29.91	$10^2$ copies/Rx (Ct 30)

○ 최종 다중진단키트에 대한 임상적 성능검증 (실험실 사용을 위한 분자진단키트 3종)

- 본 과제를 통해 개발된 3종의 구근화훼류에 대한 3종의 분자진단키트 (Taqman Probe 기반의 실험실진단키트)에 대해서 각각의 바이러스가 감염된 양성시료와 감염되지 않은 음성시료를 기준으로 임상적 성능검증(임상적 민감도, 특이도)을 실시하였음.
- POBGEN Tulip virus Detection Kit의 민감도 및 특이도를 분석하였음(표 13-15).
- 최종적으로 확인된 시험법을 이용하여 튜립에 감염될 수 있는 주요한 바이러스 중 3 개의 바이러스 감염검체와 비감염검체를 이용하여 각 바이러스의 진단법에 대한 임상적 민감도와 특이도를 분석하였음.
- 검사를 위해 복수의 검사방법을 통해 LSV 양성으로 확인된 검체 34개, 음성으로 확인된 검체 50개를 사용하였고, OMMV의 경우 동일하게 복수의 검사방법을 통해 양성으로 확인된 검체 23개, 음성으로 확인된 검체 50개를 사용하였으며, 마지막으로 TVX에 대해서도 두바이러스와 마찬가지로 복수의 검사방법을 통해 TVX 양성으로 확인된 검체 43개, 음성으로 확인된 검체 50개를 사용하였음.

표 13. POBGEN Tulip virus Detection Kit에 대한 LSV에 대한 임상적 성능평가(민감도, 특이도)

		POBGEN Tulip virus Detection Kit (LSV)				
		양성	음성	합계	민감도	특이도
검사기준 (복수의 검사로 확인)	양성	33	1	34	33/34*100	50/50*100
	음성	0	50	50	97.06%	100%
합계		33	51	84		

표 14. POBGEN Tulip virus Detection Kit에 대한 OMMV에 대한 임상적 성능평가(민감도, 특이도)

		POBGEN Tulip virus Detection Kit (OMMV)				
		양성	음성	합계	민감도	특이도
검사기준 (복수의 검사로 확인)	양성	17	6	23	17/23*100	50/50*100
	음성	0	50	50	73.91%	100%
합계		17	56	73		

표 15. POBGEN Tulip virus Detection Kit에 대한 TVX에 대한 임상적 성능평가(민감도, 특이도)

		POBGEN Tulip virus Detection Kit (TVX)				
		양성	음성	합계	민감도	특이도
검사기준 (복수의 검사로 확인)	양성	43	0	43	43/43*100	50/50*100
	음성	0	50	50	100%	100%
합계		43	50	93		

- 분석결과와 복수의 검사를 통해 각각의 바이러스 양성인 시료에 대한 임상적 검출성능을 위한 민감도의 경우 LSV에서는 97.06%, OMMV는 73.91%, 그리고 TVX의 경우 100%로 확인되었으며 각각의 바이러스 음성인 시료에 대해서는 모두 100%의 특이도를 보이는 것으로 확인되었음.

POBGEN Tulip Virus Detection Kit (LSV)				
Serial No	ID	Lab qPCR (Tulipvirus)	Lab qPCR (Tulipvirus)	Criteria
		LSVcp(Ct)	LSVcp(Results)	LSVcp
1	T7	38	Pos	Pos
2	T9	-	Neg	Pos
3	T11	23.59	Pos	Pos
4	T12	23.8	Pos	Pos
5	T13	23.45	Pos	Pos
6	T14	25.46	Pos	Pos
7	T15	25.47	Pos	Pos
8	T16	25.35	Pos	Pos
9	T17	23.4	Pos	Pos
10	T18	24.65	Pos	Pos
11	T19	23.59	Pos	Pos
12	T20	22.56	Pos	Pos
13	T41	23.21	Pos	Pos
14	T42	25.56	Pos	Pos
15	T43	26.74	Pos	Pos
16	T44	25.14	Pos	Pos
17	T45	26.06	Pos	Pos
18	T46	25.75	Pos	Pos
19	T47	24.19	Pos	Pos
20	T48	26.73	Pos	Pos
21	T49	26.2	Pos	Pos
22	T50	27.55	Pos	Pos
23	T81	27.26	Pos	Pos
24	T82	27.89	Pos	Pos
25	T83	25.14	Pos	Pos
26	T84	25.52	Pos	Pos
27	T85	23.42	Pos	Pos
28	T86	27.59	Pos	Pos
29	T87	26.8	Pos	Pos
30	T88	26.73	Pos	Pos
31	T89	26.97	Pos	Pos
32	T90	26.61	Pos	Pos
33	T93	26.75	Pos	Pos
34	T109	36.69	Pos	Pos
35	T1	-	Neg	Neg
36	T2	-	Neg	Neg
37	T3	-	Neg	Neg
38	T4	-	Neg	Neg
39	T5	-	Neg	Neg
40	T6	-	Neg	Neg
41	T8	-	Neg	Neg
42	T10	-	Neg	Neg
43	T21	-	Neg	Neg
44	T22	-	Neg	Neg
45	T23	-	Neg	Neg
46	T24	-	Neg	Neg
47	T25	-	Neg	Neg
48	T26	-	Neg	Neg
49	T27	-	Neg	Neg
50	T28	-	Neg	Neg
51	T29	-	Neg	Neg
52	T30	-	Neg	Neg
53	T31	-	Neg	Neg
54	T32	-	Neg	Neg
55	T33	-	Neg	Neg
56	T34	-	Neg	Neg
57	T35	-	Neg	Neg
58	T36	-	Neg	Neg
59	T37	-	Neg	Neg
60	T38	-	Neg	Neg
61	T39	-	Neg	Neg
62	T40	-	Neg	Neg
63	T51	-	Neg	Neg
64	T52	-	Neg	Neg
65	T53	-	Neg	Neg
66	T54	-	Neg	Neg
67	T55	-	Neg	Neg
68	T56	-	Neg	Neg
69	T57	-	Neg	Neg
70	T58	-	Neg	Neg
71	T59	-	Neg	Neg
72	T60	-	Neg	Neg
73	T61	-	Neg	Neg
74	T62	-	Neg	Neg
75	T63	-	Neg	Neg
76	T64	-	Neg	Neg
77	T65	-	Neg	Neg
78	T66	-	Neg	Neg
79	T67	-	Neg	Neg
80	T68	-	Neg	Neg
81	T69	-	Neg	Neg
82	T70	-	Neg	Neg
83	T71	-	Neg	Neg
84	T72	-	Neg	Neg

POBGEN Tulip Virus Detection Kit (OMMV)				
Serial No	ID	Lab qPCR (Tulipvirus)	Lab qPCR (Tulipvirus)	Criteria
		OMMV(Ct)	OMMV(Results)	OMMV
1	T41	25.25	Pos	Pos
2	T42	26.21	Pos	Pos
3	T43	25.18	Pos	Pos
4	T44	24.13	Pos	Pos
5	T45	-	Neg	Pos
6	T46	24.15	Pos	Pos
7	T47	25.11	Pos	Pos
8	T48	25.12	Pos	Pos
9	T49	27.3	Pos	Pos
10	T50	27.15	Pos	Pos
11	T81	28.3	Pos	Pos
12	T82	-	Neg	Pos
13	T83	27.31	Pos	Pos
14	T84	26.17	Pos	Pos
15	T85	29.19	Pos	Pos
16	T86	-	Neg	Pos
17	T87	28.12	Pos	Pos
18	T88	28.13	Pos	Pos
19	T89	29.33	Pos	Pos
20	T90	29.41	Pos	Pos
21	T92	-	Neg	Pos
22	T93	-	Neg	Pos
23	T109	-	Neg	Pos
24	T1	-	Neg	Neg
25	T2	-	Neg	Neg
26	T3	-	Neg	Neg
27	T4	-	Neg	Neg
28	T5	-	Neg	Neg
29	T6	-	Neg	Neg
30	T7	-	Neg	Neg
31	T8	-	Neg	Neg
32	T9	-	Neg	Neg
33	T10	-	Neg	Neg
34	T11	-	Neg	Neg
35	T12	-	Neg	Neg
36	T13	-	Neg	Neg
37	T14	-	Neg	Neg
38	T15	-	Neg	Neg
39	T16	-	Neg	Neg
40	T17	-	Neg	Neg
41	T18	-	Neg	Neg
42	T19	-	Neg	Neg
43	T20	-	Neg	Neg
44	T21	-	Neg	Neg
45	T22	-	Neg	Neg
46	T23	-	Neg	Neg
47	T24	-	Neg	Neg
48	T25	-	Neg	Neg
49	T26	-	Neg	Neg
50	T27	-	Neg	Neg
51	T28	-	Neg	Neg
52	T29	-	Neg	Neg
53	T30	-	Neg	Neg
54	T31	-	Neg	Neg
55	T32	-	Neg	Neg
56	T33	-	Neg	Neg
57	T34	-	Neg	Neg
58	T35	-	Neg	Neg
59	T36	-	Neg	Neg
60	T37	-	Neg	Neg
61	T38	-	Neg	Neg
62	T39	-	Neg	Neg
63	T40	-	Neg	Neg
64	T51	-	Neg	Neg
65	T52	-	Neg	Neg
66	T53	-	Neg	Neg
67	T54	-	Neg	Neg
68	T55	-	Neg	Neg
69	T56	-	Neg	Neg
70	T57	-	Neg	Neg
71	T58	-	Neg	Neg
72	T59	-	Neg	Neg
73	T60	-	Neg	Neg

POBGEN Tulp Virus Detection Kit (TVX)				
Serial No	ID	Lab qPCR (Tulipvirus) TVX(Ct)	Lab qPCR (Tulipvirus) TVX(Results)	Criteria TVX
1	T20	21.81	Pos	Pos
2	T41	18.43	Pos	Pos
3	T42	18.2	Pos	Pos
4	T43	18.6	Pos	Pos
5	T44	18.44	Pos	Pos
6	T45	18.62	Pos	Pos
7	T46	18.05	Pos	Pos
8	T47	18.84	Pos	Pos
9	T48	17.93	Pos	Pos
10	T49	18.13	Pos	Pos
11	T50	18.31	Pos	Pos
12	T51	14.52	Pos	Pos
13	T52	14.54	Pos	Pos
14	T53	14.51	Pos	Pos
15	T54	14.59	Pos	Pos
16	T55	15	Pos	Pos
17	T56	15.08	Pos	Pos
18	T57	14.73	Pos	Pos
19	T58	14.9	Pos	Pos
20	T59	14.89	Pos	Pos
21	T60	14.91	Pos	Pos
22	T61	21.44	Pos	Pos
23	T81	17.97	Pos	Pos
24	T82	20.62	Pos	Pos
25	T83	19.45	Pos	Pos
26	T84	17.57	Pos	Pos
27	T85	18.53	Pos	Pos
28	T86	19.41	Pos	Pos
29	T87	17.75	Pos	Pos
30	T88	19.43	Pos	Pos
31	T89	19	Pos	Pos
32	T90	19.67	Pos	Pos
33	T91	14.75	Pos	Pos
34	T92	14	Pos	Pos
35	T93	15.65	Pos	Pos
36	T94	14.87	Pos	Pos
37	T95	14.41	Pos	Pos
38	T96	14.71	Pos	Pos
39	T97	14.93	Pos	Pos
40	T98	14.8	Pos	Pos
41	T99	15.23	Pos	Pos
42	T100	14.74	Pos	Pos
43	T109	20.42	Pos	Pos
44	T1	-	Neg	Neg
45	T2	-	Neg	Neg
46	T3	-	Neg	Neg
47	T4	-	Neg	Neg
48	T5	-	Neg	Neg
49	T6	-	Neg	Neg
50	T7	-	Neg	Neg
51	T8	-	Neg	Neg
52	T9	-	Neg	Neg
53	T10	-	Neg	Neg
54	T11	25.55	Neg	Neg
55	T12	26.05	Neg	Neg
56	T13	24.44	Neg	Neg
57	T14	22.67	Neg	Neg
58	T15	-	Neg	Neg
59	T16	-	Neg	Neg
60	T17	27.46	Neg	Neg
61	T18	24.88	Neg	Neg
62	T19	25.89	Neg	Neg
63	T21	27.42	Neg	Neg
64	T22	-	Neg	Neg
65	T23	-	Neg	Neg
66	T24	26.87	Neg	Neg
67	T25	27.25	Neg	Neg
68	T26	-	Neg	Neg
69	T27	-	Neg	Neg
70	T28	-	Neg	Neg
71	T29	27.2	Neg	Neg
72	T30	-	Neg	Neg
73	T31	27.25	Neg	Neg
74	T32	27.31	Neg	Neg
75	T33	27.25	Neg	Neg
76	T34	-	Neg	Neg
77	T35	-	Neg	Neg
78	T36	27.38	Neg	Neg
79	T37	-	Neg	Neg
80	T38	-	Neg	Neg
81	T39	-	Neg	Neg
82	T40	-	Neg	Neg
83	T62	27.45	Neg	Neg
84	T63	26.16	Neg	Neg
85	T64	25.92	Neg	Neg
86	T65	26.05	Neg	Neg
87	T66	25.26	Neg	Neg
88	T67	25.19	Neg	Neg
89	T68	26.33	Neg	Neg
90	T69	27.08	Neg	Neg
91	T70	24.15	Neg	Neg
92	T71	-	Neg	Neg
93	T72	26.94	Neg	Neg

- POBGEN Narcissus virus Detection Kit의 민감도 및 특이도를 분석하였음(표 16-18).
- 최종적으로 확인된 시험법을 이용하여 수선화에 감염될 수 있는 주요한 바이러스 중 3개의 바이러스 감염검체와 비감염검체를 이용하여 각 바이러스의 진단법에 대한 임상적 민감도와 특이도를 분석하였음.
- 검사를 위해 복수의 검사방법을 통해 NYSV 양성으로 확인된 검체 30개, 음성으로 확인된 검체 50개를 사용하였고, TRV의 경우 동일하게 복수의 검사방법을 통해 양성으로 확인된 검체 30개, 음성으로 확인된 검체 50개를 사용하였으며, 마지막으로 NMV에 대해서도 두 바이러스와 마찬가지로 복수의 검사방법을 통해 양성으로 확인된 검체 41개, 음성으로 확인된 검체 50개를 사용하였음.

**표 16. POBGEN Narcissus virus Detection Kit에 대한 NYSV에 대한 임상적 성능평가(민감도, 특이도)**

		POBGEN Narcissus virus Detection Kit (NYSV)				
		양성	음성	합계	민감도	특이도
검사기준 (복수의 검사로 확인)	양성	21	9	30	21/30*100	50/50*100
	음성	0	50	50	70%	100%
합계		21	59	80		

**표 17. POBGEN Narcissus virus Detection Kit에 대한 TRV에 대한 임상적 성능평가(민감도, 특이도)**

		POBGEN Narcissus virus Detection Kit (TRV)				
		양성	음성	합계	민감도	특이도
검사기준 (복수의 검사로 확인)	양성	30	0	30	30/30*100	50/50*100
	음성	0	50	50	100%	100%
합계		30	50	80		

**표 18. POBGEN Narcissus virus Detection Kit에 대한 TVX에 대한 임상적 성능평가(민감도, 특이도)**

		POBGEN Narcissus virus Detection Kit (NMV)				
		양성	음성	합계	민감도	특이도
검사기준 (복수의 검사로 확인)	양성	40	1	41	40/41*100	50/50*100
	음성	0	50	50	97.56%	100%
합계		40	51	91		

- 분석결과와 복수의 검사를 통해 각각의 바이러스 양성인 시료에 대한 임상적 검출성능을 위한 민감도의 경우 NYSV에서는 70%, TRV는 100%, 그리고 NMV의 경우 97.56%로 확인되었으며 각각의 바이러스 음성인 시료에 대해서는 모두 100%의 특이도를 보이는 것으로 확인되었음.

POBGEN Narcissus Virus Detection Kit (NYSV)				
Serial No	ID	Lab qPCR (Narcissusvirus)	Lab qPCR (Narcissusvirus)	Criteria
		NYSV(Ct)	NYSV(Results)	NYSV
1	N28	-	Neg	Pos
2	N41	34.18	Pos	Pos
3	N42	26	Pos	Pos
4	N43	30.33	Pos	Pos
5	N44	30.71	Pos	Pos
6	N45	30.89	Pos	Pos
7	N46	31.11	Pos	Pos
8	N47	34.73	Pos	Pos
9	N48	34.83	Pos	Pos
10	N49	31.47	Pos	Pos
11	N50	29.22	Pos	Pos
12	N51	38.7	Pos	Pos
13	N52	-	Neg	Pos
14	N53	-	Neg	Pos
15	N54	36.01	Pos	Pos
16	N55	39.88	Pos	Pos
17	N56	-	Neg	Pos
18	N57	39.34	Pos	Pos
19	N59	-	Neg	Pos
20	N60	-	Neg	Pos
21	N81	-	Neg	Pos
22	N82	40.23	Neg	Pos
23	N83	36.01	Pos	Pos
24	N84	32.62	Pos	Pos
25	N85	31.93	Pos	Pos
26	N86	40.04	Neg	Pos
27	N87	31.33	Pos	Pos
28	N88	33.5	Pos	Pos
29	N89	37.14	Pos	Pos
30	N90	32.9	Pos	Pos
31	N1	42.81	Neg	Neg
32	N2	-	Neg	Neg
33	N3	44.92	Neg	Neg
34	N4	-	Neg	Neg
35	N5	44.64	Neg	Neg
36	N6	43.21	Neg	Neg
37	N7	42.2	Neg	Neg
38	N8	44.57	Neg	Neg
39	N9	44.24	Neg	Neg
40	N10	44.82	Neg	Neg
41	N11	-	Neg	Neg
42	N12	42.54	Neg	Neg
43	N13	-	Neg	Neg
44	N14	40.23	Neg	Neg
45	N15	-	Neg	Neg
46	N16	-	Neg	Neg
47	N17	-	Neg	Neg
48	N18	-	Neg	Neg
49	N19	-	Neg	Neg
50	N20	42.13	Neg	Neg
51	N21	-	Neg	Neg
52	N22	-	Neg	Neg
53	N23	-	Neg	Neg
54	N24	-	Neg	Neg
55	N25	43.58	Neg	Neg
56	N26	-	Neg	Neg
57	N27	-	Neg	Neg
58	N29	-	Neg	Neg
59	N30	42.19	Neg	Neg
60	N31	-	Neg	Neg
61	N32	42.32	Neg	Neg
62	N33	41.95	Neg	Neg
63	N34	43.58	Neg	Neg
64	N35	-	Neg	Neg
65	N36	-	Neg	Neg
66	N37	-	Neg	Neg
67	N38	-	Neg	Neg
68	N39	-	Neg	Neg
69	N40	42.3	Neg	Neg
70	N58	-	Neg	Neg
71	N61	-	Neg	Neg
72	N62	42.71	Neg	Neg
73	N63	-	Neg	Neg
74	N64	44.53	Neg	Neg
75	N65	43.69	Neg	Neg
76	N66	-	Neg	Neg
77	N67	43.12	Neg	Neg
78	N68	-	Neg	Neg
79	N69	-	Neg	Neg
80	N70	-	Neg	Neg

POBGEN Narcissus Virus Detection Kit (TRV)				
Serial No	ID	Lab qPCR (Narcissusvirus)	Lab qPCR (Narcissusvirus)	Criteria
		TRV(Ct)	TRV(Results)	TRV
1	N41	20.79	Pos	Pos
2	N42	19.73	Pos	Pos
3	N43	20.9	Pos	Pos
4	N44	20.65	Pos	Pos
5	N45	19.84	Pos	Pos
6	N46	21.18	Pos	Pos
7	N47	20.19	Pos	Pos
8	N48	20.37	Pos	Pos
9	N49	20.47	Pos	Pos
10	N50	20.27	Pos	Pos
11	N51	17.19	Pos	Pos
12	N52	18.11	Pos	Pos
13	N53	18.22	Pos	Pos
14	N54	17.65	Pos	Pos
15	N55	18.85	Pos	Pos
16	N56	19.06	Pos	Pos
17	N57	19.35	Pos	Pos
18	N58	19.17	Pos	Pos
19	N59	18.43	Pos	Pos
20	N60	19.08	Pos	Pos
21	N81	19.74	Pos	Pos
22	N82	20.81	Pos	Pos
23	N83	19.63	Pos	Pos
24	N84	20.02	Pos	Pos
25	N85	19.88	Pos	Pos
26	N86	21.65	Pos	Pos
27	N87	20.6	Pos	Pos
28	N88	20.22	Pos	Pos
29	N89	21.22	Pos	Pos
30	N90	20.49	Pos	Pos
31	N1	-	Neg	Neg
32	N2	-	Neg	Neg
33	N3	-	Neg	Neg
34	N4	-	Neg	Neg
35	N5	-	Neg	Neg
36	N6	-	Neg	Neg
37	N7	-	Neg	Neg
38	N8	-	Neg	Neg
39	N9	-	Neg	Neg
40	N10	-	Neg	Neg
41	N11	-	Neg	Neg
42	N12	-	Neg	Neg
43	N13	-	Neg	Neg
44	N14	-	Neg	Neg
45	N15	-	Neg	Neg
46	N16	-	Neg	Neg
47	N17	-	Neg	Neg
48	N18	-	Neg	Neg
49	N19	-	Neg	Neg
50	N20	-	Neg	Neg
51	N21	-	Neg	Neg
52	N22	-	Neg	Neg
53	N23	-	Neg	Neg
54	N24	-	Neg	Neg
55	N25	-	Neg	Neg
56	N26	-	Neg	Neg
57	N27	-	Neg	Neg
58	N28	-	Neg	Neg
59	N29	-	Neg	Neg
60	N30	-	Neg	Neg
61	N31	-	Neg	Neg
62	N32	-	Neg	Neg
63	N33	-	Neg	Neg
64	N34	-	Neg	Neg
65	N35	-	Neg	Neg
66	N36	-	Neg	Neg
67	N37	-	Neg	Neg
68	N38	-	Neg	Neg
69	N39	-	Neg	Neg
70	N40	-	Neg	Neg
71	N61	-	Neg	Neg
72	N62	-	Neg	Neg
73	N63	-	Neg	Neg
74	N64	-	Neg	Neg
75	N65	-	Neg	Neg
76	N66	-	Neg	Neg
77	N67	-	Neg	Neg
78	N68	-	Neg	Neg
79	N69	-	Neg	Neg
80	N70	-	Nea	Nea

POBGEN Narcissus Virus Detection Kit (NMV)				
Serial No	ID	Lab qPCR (Nardssusvirus) NMV(Ct)	Lab qPCR (Nardssusvirus) NMV(Results)	Criteria NMV
1	N41	22.25	Pos	Pos
2	N42	21.25	Pos	Pos
3	N43	22.58	Pos	Pos
4	N44	22.62	Pos	Pos
5	N45	21.19	Pos	Pos
6	N46	22.92	Pos	Pos
7	N47	21.47	Pos	Pos
8	N48	22.29	Pos	Pos
9	N49	22.15	Pos	Pos
10	N50	21.63	Pos	Pos
11	N51	36.99	Pos	Pos
12	N52	22.71	Pos	Pos
13	N53	23.15	Pos	Pos
14	N54	35.61	Pos	Pos
15	N55	35.85	Pos	Pos
16	N56	24.63	Pos	Pos
17	N57	24.56	Pos	Pos
18	N58	24.99	Pos	Pos
19	N59	24.54	Pos	Pos
20	N60	37.17	Pos	Pos
21	N81	21.33	Pos	Pos
22	N82	22.47	Pos	Pos
23	N83	21.35	Pos	Pos
24	N84	20.8	Pos	Pos
25	N85	20.96	Pos	Pos
26	N86	22.97	Pos	Pos
27	N87	21.81	Pos	Pos
28	N88	21.09	Pos	Pos
29	N89	22.81	Pos	Pos
30	N90	22.22	Pos	Pos
31	N91	23.74	Pos	Pos
32	N92	23.72	Pos	Pos
33	N93	24.15	Pos	Pos
34	N94	24.27	Pos	Pos
35	N95	23.95	Pos	Pos
36	N96	23.67	Pos	Pos
37	N97	25.31	Pos	Pos
38	N98	23.62	Pos	Pos
39	N99	23.21	Pos	Pos
40	N100	21.99	Pos	Pos
41	N105	-	Neg	Pos
42	N1	-	Neg	Neg
43	N2	-	Neg	Neg
44	N3	-	Neg	Neg
45	N4	-	Neg	Neg
46	N5	-	Neg	Neg
47	N6	-	Neg	Neg
48	N7	-	Neg	Neg
49	N8	-	Neg	Neg
50	N9	-	Neg	Neg
51	N10	-	Neg	Neg
52	N11	-	Neg	Neg
53	N12	-	Neg	Neg
54	N13	-	Neg	Neg
55	N14	-	Neg	Neg
56	N15	-	Neg	Neg
57	N16	-	Neg	Neg
58	N17	-	Neg	Neg
59	N18	-	Neg	Neg
60	N19	-	Neg	Neg
61	N20	-	Neg	Neg
62	N21	-	Neg	Neg
63	N22	-	Neg	Neg
64	N23	-	Neg	Neg
65	N24	-	Neg	Neg
66	N25	-	Neg	Neg
67	N26	-	Neg	Neg
68	N27	-	Neg	Neg
69	N28	-	Neg	Neg
70	N29	-	Neg	Neg
71	N30	-	Neg	Neg
72	N31	-	Neg	Neg
73	N32	-	Neg	Neg
74	N33	-	Neg	Neg
75	N34	-	Neg	Neg
76	N35	-	Neg	Neg
77	N36	-	Neg	Neg
78	N37	-	Neg	Neg
79	N38	-	Neg	Neg
80	N39	-	Neg	Neg
81	N40	-	Neg	Neg
82	N61	-	Neg	Neg
83	N62	-	Neg	Neg
84	N63	-	Neg	Neg
85	N64	-	Neg	Neg
86	N65	-	Neg	Neg
87	N66	-	Neg	Neg
88	N67	-	Neg	Neg
89	N68	-	Neg	Neg
90	N69	-	Neg	Neg
91	N70	-	Neg	Neg

- POBGEN Lily virus Detection Kit의 민감도 및 특이도를 분석하였음(표 19-21).
- 최종적으로 확인된 시험법을 이용하여 백합에 감염될 수 있는 주요한 바이러스 중 3 개의 바이러스 감염검체와 비감염검체를 이용하여 각 바이러스의 진단법에 대한 임상적 민감도와 특이도를 분석하였음.
- 검사를 위해 복수의 검사방법을 통해 CMV 양성으로 확인된 검체 35개, 음성으로 확인된 검체 50개를 사용하였고, LSV의 경우 동일하게 복수의 검사방법을 통해 양성으로 확인된 검체 34개, 음성으로 확인된 검체 50개를 사용하였으며, 마지막으로 LMoV에 대해서도 두 바이러스와 마찬가지로 복수의 검사방법을 통해 양성으로 확인된 검체 22개, 음성으로 확인된 검체 50개를 사용하였음.

**표 19. POBGEN Lily virus Detection Kit에 대한 CMV에 대한 임상적 성능평가(민감도, 특이도)**

		POBGEN Lily virus Detection Kit (CMV)					
		양성	음성	합계		민감도	특이도
검사기준 (복수의 검사로 확인)	양성	33	2	35		33/35*100	40/40*100
	음성	0	40	40		94.29%	100%
합계		33	42	75			

**표 20. POBGEN Lily virus Detection Kit에 대한 LSV에 대한 임상적 성능평가(민감도, 특이도)**

		POBGEN Lily virus Detection Kit (LSV)					
		양성	음성	합계		민감도	특이도
검사기준 (복수의 검사로 확인)	양성	32	2	34		32/34*100	31/31*100
	음성	0	31	31		94.18%	100%
합계		32	33	65			

**표 21. POBGEN Lily virus Detection Kit에 대한 TVX에 대한 임상적 성능평가(민감도, 특이도)**

		POBGEN Lily virus Detection Kit (LMoV)					
		양성	음성	합계		민감도	특이도
검사기준 (복수의 검사로 확인)	양성	21	1	22		21/22*100	40/40*100
	음성	0	40	40		95.45%	100%
합계		21	41	62			

- 분석결과와 복수의 검사를 통해 각각의 바이러스 양성인 시료에 대한 임상적 검출성능을 위한 민감도의 경우 CMV에서는 94.29%, LSV는 94.12%, 그리고 LMoV의 경우 95.45%로 확인되었으며 각각의 바이러스 음성인 시료에 대해서는 모두 100%의 특이도를 보이는 것으로 확인되었음.

POBGEN Lily Virus Detection Kit (CMV)				
Serial No	ID	Lab qPCR (Lilyvirus) CMV(Ct)	Lab qPCR (Lilyvirus) CMV(Results)	Criteria CMV
1	L1	27.35	Pos	Pos
2	L6	21.72	Pos	Pos
3	L9	21.82	Pos	Pos
4	L10	25.79	Pos	Pos
5	L14	25.79	Pos	Pos
6	L17	25.78	Pos	Pos
7	L18	26.48	Pos	Pos
8	L33	29.87	Pos	Pos
9	L35	25.31	Pos	Pos
10	L36	21.86	Pos	Pos
11	L39	27.93	Pos	Pos
12	L40	26.45	Pos	Pos
13	L41	27.96	Pos	Pos
14	L42	25.31	Pos	Pos
15	L43	28.07	Pos	Pos
16	L44	32.03	Pos	Pos
17	L50	21.75	Pos	Pos
18	L51	28.65	Pos	Pos
19	L54	24.23	Pos	Pos
20	L55	17.76	Pos	Pos
21	L56	18.66	Pos	Pos
22	L58	34.87	Pos	Pos
23	L63	24.8	Pos	Pos
24	L64	28.58	Pos	Pos
25	L65	27.82	Pos	Pos
26	L66	24.4	Pos	Pos
27	L67	25.45	Pos	Pos
28	L70	28.11	Pos	Pos
29	L71	28.11	Pos	Pos
30	L75	22.09	Pos	Pos
31	L76	27.42	Pos	Pos
32	L79	24.1	Pos	Pos
33	L80	22.54	Pos	Pos
34	L8	-	Neg	Pos
35	L34	-	Neg	Pos
36	L2	39.81	Neg	Neg
37	L5	-	Neg	Neg
38	L7	37.14	Neg	Neg
39	L11	-	Neg	Neg
40	L12	-	Neg	Neg
41	L13	-	Neg	Neg
42	L15	-	Neg	Neg
43	L16	-	Neg	Neg
44	L19	43.84	Neg	Neg
45	L20	36.69	Neg	Neg
46	L21	35.33	Neg	Neg
47	L22	36.23	Neg	Neg
48	L23	-	Neg	Neg
49	L24	-	Neg	Neg
50	L25	-	Neg	Neg
51	L26	-	Neg	Neg
52	L27	-	Neg	Neg
53	L28	-	Neg	Neg
54	L29	-	Neg	Neg
55	L30	39.15	Neg	Neg
56	L31	-	Neg	Neg
57	L32	-	Neg	Neg
58	L37	-	Neg	Neg
59	L38	-	Neg	Neg
60	L45	-	Neg	Neg
61	L46	-	Neg	Neg
62	L47	-	Neg	Neg
63	L49	-	Neg	Neg
64	L52	-	Neg	Neg
65	L57	35.67	Neg	Neg
66	L59	-	Neg	Neg
67	L60	38.06	Neg	Neg
68	L61	-	Neg	Neg
69	L68	38.99	Neg	Neg
70	L69	-	Neg	Neg
71	L72	37.76	Neg	Neg
72	L73	-	Neg	Neg
73	L74	-	Neg	Neg
74	L77	38.04	Neg	Neg
75	L78	-	Neg	Neg

POBGEN Lily Virus Detection Kit (LSV)				
Serial No	ID	Lab qPCR (Lilyvirus) LSV(Ct)	Lab qPCR (Lilyvirus) LSV(Results)	Criteria LSV
1	L1	35	Pos	Pos
2	L2	32.14	Pos	Pos
3	L3	35.6	Pos	Pos
4	L6	20.82	Pos	Pos
5	L7	20.14	Pos	Pos
6	L11	36.1	Pos	Pos
7	L14	13.72	Pos	Pos
8	L17	33.66	Pos	Pos
9	L18	34.64	Pos	Pos
10	L19	32.76	Pos	Pos
11	L21	37.27	Pos	Pos
12	L22	37.66	Pos	Pos
13	L23	19.65	Pos	Pos
14	L26	18.27	Pos	Pos
15	L28	36.01	Pos	Pos
16	L31	36.97	Pos	Pos
17	L32	33.15	Pos	Pos
18	L33	30.78	Pos	Pos
19	L35	19.19	Pos	Pos
20	L36	16.13	Pos	Pos
21	L37	31.68	Pos	Pos
22	L39	20.61	Pos	Pos
23	L40	23.18	Pos	Pos
24	L41	19.09	Pos	Pos
25	L42	20.01	Pos	Pos
26	L43	20.63	Pos	Pos
27	L45	36.86	Pos	Pos
28	L48	18.92	Pos	Pos
29	L50	23.41	Pos	Pos
30	L63	37.44	Pos	Pos
31	L65	36.87	Pos	Pos
32	L80	37.72	Pos	Pos
33	L38	-	Neg	Pos
34	L44	39.71	Neg	Pos
35	L8	-	Neg	Neg
36	L12	-	Neg	Neg
37	L13	-	Neg	Neg
38	L20	-	Neg	Neg
39	L24	-	Neg	Neg
40	L29	-	Neg	Neg
41	L30	-	Neg	Neg
42	L34	40.42	Neg	Neg
43	L51	-	Neg	Neg
44	L52	-	Neg	Neg
45	L53	-	Neg	Neg
46	L54	-	Neg	Neg
47	L55	-	Neg	Neg
48	L56	-	Neg	Neg
49	L57	39.55	Neg	Neg
50	L58	-	Neg	Neg
51	L59	39.51	Neg	Neg
52	L60	39.96	Neg	Neg
53	L62	-	Neg	Neg
54	L64	-	Neg	Neg
55	L66	-	Neg	Neg
56	L67	-	Neg	Neg
57	L68	-	Neg	Neg
58	L69	-	Neg	Neg
59	L70	-	Neg	Neg
60	L73	-	Neg	Neg
61	L74	-	Neg	Neg
62	L75	-	Neg	Neg
63	L76	-	Neg	Neg
64	L77	-	Neg	Neg
65	L78	-	Neg	Neg

POBGEN Lily Virus Detection Kit (LMoV)				
Serial No	ID	Lab qPCR (Lilyvirus)	Lab qPCR (Lilyvirus)	Criteria
		LMoV(Ct)	LMoV(Results)	LMoV
1	L3	20.62	Pos	Pos
2	L5	23.47	Pos	Pos
3	L8	24.61	Pos	Pos
4	L9	37.78	Pos	Pos
5	L10	22.09	Pos	Pos
6	L12	24.32	Pos	Pos
7	L13	22.82	Pos	Pos
8	L14	22.85	Pos	Pos
9	L21	35.64	Pos	Pos
10	L22	35.48	Pos	Pos
11	L23	30.12	Pos	Pos
12	L25	27.78	Pos	Pos
13	L31	22.55	Pos	Pos
14	L32	22.93	Pos	Pos
15	L34	24.48	Pos	Pos
16	L37	23.33	Pos	Pos
17	L48	38.96	Pos	Pos
18	L55	31.6	Pos	Pos
19	L60	36.22	Pos	Pos
20	L73	26.38	Pos	Pos
21	L78	37.68	Pos	Pos
22	L1	-	Neg	Pos
23	L2	-	Neg	Neg
24	L11	-	Neg	Neg
25	L15	-	Neg	Neg
26	L16	-	Neg	Neg
27	L17	-	Neg	Neg
28	L18	-	Neg	Neg
29	L19	-	Neg	Neg
30	L20	-	Neg	Neg
31	L24	-	Neg	Neg
32	L26	-	Neg	Neg
33	L27	-	Neg	Neg
34	L29	-	Neg	Neg
35	L30	-	Neg	Neg
36	L33	-	Neg	Neg
37	L35	-	Neg	Neg
38	L36	-	Neg	Neg
39	L38	-	Neg	Neg
40	L39	-	Neg	Neg
41	L40	-	Neg	Neg
42	L41	-	Neg	Neg
43	L42	-	Neg	Neg
44	L43	-	Neg	Neg
45	L44	-	Neg	Neg
46	L46	-	Neg	Neg
47	L47	-	Neg	Neg
48	L49	-	Neg	Neg
49	L50	-	Neg	Neg
50	L52	-	Neg	Neg
51	L53	-	Neg	Neg
52	L54	-	Neg	Neg
53	L56	-	Neg	Neg
54	L58	-	Neg	Neg
55	L59	-	Neg	Neg
56	L61	-	Neg	Neg
57	L62	-	Neg	Neg
58	L63	-	Neg	Neg
59	L64	-	Neg	Neg
60	L65	-	Neg	Neg
61	L66	-	Neg	Neg
62	L67	-	Neg	Neg

- 최종 다중진단키트에 대한 임상적 성능검증(현장사용을 위한 분자진단키트 3종)
  - 본 과제를 통해 개발된 3종의 구근화훼류에 대한 3종의 분자진단키트 (핵산추출과 유전자 검출이 통합된 현장진단용 진단키트)에 대해서 각각의 바이러스가 감염된 양성시료와 감염되지 않은 음성시료를 기준으로 임상적 성능검증(임상적 민감도, 특이도)을 실시하였음.
  - POBGEN XQ Tulip virus Detection Kit 민감도 및 특이도를 분석하였음(표 22-24).
  - 최종적으로 확인된 시험법을 이용하여 튜립에 감염될 수 있는 주요한 바이러스 중 3 개의 바이러스 감염검체와 비감염검체를 이용하여 각 바이러스의 진단법에 대한 임상적 민감도와 특이도를 분석하였음.
  - 검사를 위해 복수의 검사방법을 통해 LSV 양성으로 확인된 검체 34개, 음성으로 확인된 검체 50개를 사용하였고, OMMV의 경우 동일하게 복수의 검사방법을 통해 양성으로 확인된 검체 23개, 음성으로 확인된 검체 50개를 사용하였으며, 마지막으로 TVX에 대해서도 두바이러스와 마찬가지로 복수의 검사방법을 통해 TVX 양성으로 확인된 검체 43개, 음성으로 확인된 검체 50개를 사용하였음.

표 22. POBGEN XQ Tulip virus Detection Kit에 대한 LSV에 대한 임상적 성능평가(민감도, 특이도)

		POBGEN XQ Tulip virus Detection Kit (LSV)					
		양성	음성	합계		민감도	특이도
검사기준 (복수의 검사로 확인)	양성	34	0	34		34/34*100	50/50*100
	음성	0	50	50		100%	100%
합계		34	50	84			

표 23. POBGEN XQ Tulip virus Detection Kit에 대한 OMMV에 대한 임상적 성능평가(민감도, 특이도)

		POBGEN XQ Tulip virus Detection Kit (OMMV)					
		양성	음성	합계		민감도	특이도
검사기준 (복수의 검사로 확인)	양성	23	0	23		23/23*100	50/50*100
	음성	0	50	50		100%	100%
합계		23	50	73			

표 24. POBGEN XQ Tulip virus Detection Kit에 대한 TVX에 대한 임상적 성능평가(민감도, 특이도)

		POBGEN XQ Tulip virus Detection Kit (TVX)					
		양성	음성	합계		민감도	특이도
검사기준 (복수의 검사로 확인)	양성	42	1	43		42/43*100	50/50*100
	음성	0	50	50		97.67%	100%
합계		42	51	93			

- 분석결과와 복수의 검사를 통해 각각의 바이러스 양성인 시료에 대한 임상적 검출성능을 위한 민감도의 경우 LSV와 OMMV는 100%, 그리고 TVX의 경우 97.67%로 확인되었으며 각각의 바이러스 음성인 시료에 대해서는 모두 100%의 특이도를 보이는 것으로 확인되었음.

POBGEN XQ Tulip Virus Detection Kit (LSV)				
Serial No	ID	POC qPCR (Tulipvirus) LSVcp(Ct)	POC qPCR (Tulipvirus) LSVcp(Results)	Criteria LSVcp
1	T7	28.23	Pos	Pos
2	T9	29.12	Pos	Pos
3	T11	14.29	Pos	Pos
4	T12	14.26	Pos	Pos
5	T13	14.24	Pos	Pos
6	T14	15.2	Pos	Pos
7	T15	14.26	Pos	Pos
8	T16	14.21	Pos	Pos
9	T17	14.27	Pos	Pos
10	T18	15.28	Pos	Pos
11	T19	14.21	Pos	Pos
12	T20	14.23	Pos	Pos
13	T41	12.26	Pos	Pos
14	T42	12.32	Pos	Pos
15	T43	15.5	Pos	Pos
16	T44	13.25	Pos	Pos
17	T45	15.29	Pos	Pos
18	T46	13.29	Pos	Pos
19	T47	14.29	Pos	Pos
20	T48	13.31	Pos	Pos
21	T49	18	Pos	Pos
22	T50	19.22	Pos	Pos
23	T81	16.49	Pos	Pos
24	T82	16.26	Pos	Pos
25	T83	14.29	Pos	Pos
26	T84	14.24	Pos	Pos
27	T85	14.3	Pos	Pos
28	T86	14.23	Pos	Pos
29	T87	15.24	Pos	Pos
30	T88	15.26	Pos	Pos
31	T89	14.3	Pos	Pos
32	T90	14.25	Pos	Pos
33	T93	20.22	Pos	Pos
34	T109	23.13	Pos	Pos
35	T1	-	Neg	Neg
36	T2	31.24	Neg	Neg
37	T3	-	Neg	Neg
38	T4	-	Neg	Neg
39	T5	-	Neg	Neg
40	T6	32.24	Neg	Neg
41	T8	35.06	Neg	Neg
42	T10	-	Neg	Neg
43	T21	-	Neg	Neg
44	T22	-	Neg	Neg
45	T23	-	Neg	Neg
46	T24	-	Neg	Neg
47	T25	-	Neg	Neg
48	T26	-	Neg	Neg
49	T27	-	Neg	Neg
50	T28	-	Neg	Neg
51	T29	-	Neg	Neg
52	T30	-	Neg	Neg
53	T31	-	Neg	Neg
54	T32	-	Neg	Neg
55	T33	-	Neg	Neg
56	T34	-	Neg	Neg
57	T35	-	Neg	Neg
58	T36	-	Neg	Neg
59	T37	-	Neg	Neg
60	T38	-	Neg	Neg
61	T39	-	Neg	Neg
62	T40	-	Neg	Neg
63	T51	-	Neg	Neg
64	T52	-	Neg	Neg
65	T53	-	Neg	Neg
66	T54	-	Neg	Neg
67	T55	-	Neg	Neg
68	T56	-	Neg	Neg
69	T57	-	Neg	Neg
70	T58	-	Neg	Neg
71	T59	-	Neg	Neg
72	T60	-	Neg	Neg
73	T61	-	Neg	Neg
74	T62	-	Neg	Neg
75	T63	-	Neg	Neg
76	T64	-	Neg	Neg
77	T65	-	Neg	Neg
78	T66	-	Neg	Neg
79	T67	-	Neg	Neg
80	T68	-	Neg	Neg
81	T69	-	Neg	Neg
82	T70	-	Neg	Neg
83	T71	-	Neg	Neg
84	T72	-	Neg	Neg

POBGEN XQ Tulip Virus Detection Kit (OMMV)				
Serial No	ID	POC qPCR (Tulipvirus)	POC qPCR (Tulipvirus)	Criteria
		OMMV(Ct)	OMMV(Results)	OMMV
1	T41	17.72	Pos	Pos
2	T42	18.51	Pos	Pos
3	T43	18.24	Pos	Pos
4	T44	18.07	Pos	Pos
5	T45	18.16	Pos	Pos
6	T46	18.12	Pos	Pos
7	T47	18.06	Pos	Pos
8	T48	18.18	Pos	Pos
9	T49	17.73	Pos	Pos
10	T50	18.12	Pos	Pos
11	T81	18.53	Pos	Pos
12	T82	21.45	Pos	Pos
13	T83	18.88	Pos	Pos
14	T84	17.18	Pos	Pos
15	T85	19.31	Pos	Pos
16	T86	19.9	Pos	Pos
17	T87	17.28	Pos	Pos
18	T88	18.79	Pos	Pos
19	T89	18.61	Pos	Pos
20	T90	19.12	Pos	Pos
21	T92	32.38	Pos	Pos
22	T93	29.82	Pos	Pos
23	T109	27.16	Pos	Pos
24	T1	-	Neg	Neg
25	T2	-	Neg	Neg
26	T3	-	Neg	Neg
27	T4	-	Neg	Neg
28	T5	-	Neg	Neg
29	T6	-	Neg	Neg
30	T7	-	Neg	Neg
31	T8	-	Neg	Neg
32	T9	-	Neg	Neg
33	T10	-	Neg	Neg
34	T11	-	Neg	Neg
35	T12	-	Neg	Neg
36	T13	-	Neg	Neg
37	T14	-	Neg	Neg
38	T15	-	Neg	Neg
39	T16	-	Neg	Neg
40	T17	-	Neg	Neg
41	T18	-	Neg	Neg
42	T19	-	Neg	Neg
43	T20	-	Neg	Neg
44	T21	-	Neg	Neg
45	T22	-	Neg	Neg
46	T23	-	Neg	Neg
47	T24	-	Neg	Neg
48	T25	-	Neg	Neg
49	T26	-	Neg	Neg
50	T27	-	Neg	Neg
51	T28	-	Neg	Neg
52	T29	-	Neg	Neg
53	T30	-	Neg	Neg
54	T31	-	Neg	Neg
55	T32	-	Neg	Neg
56	T33	-	Neg	Neg
57	T34	-	Neg	Neg
58	T35	-	Neg	Neg
59	T36	-	Neg	Neg
60	T37	-	Neg	Neg
61	T38	-	Neg	Neg
62	T39	-	Neg	Neg
63	T40	-	Neg	Neg
64	T51	-	Neg	Neg
65	T52	-	Neg	Neg
66	T53	-	Neg	Neg
67	T54	-	Neg	Neg
68	T55	-	Neg	Neg
69	T56	-	Neg	Neg
70	T57	-	Neg	Neg
71	T58	-	Neg	Neg
72	T59	-	Neg	Neg
73	T60	-	Neg	Neg

POBGEN XQ Tulp Virus Detection Kit (TVX)				
Serial No	ID	POC qPCR (Tulipvirus) TVX(Ct)	POC qPCR (Tulipvirus) TVX(Results)	Criteria TVX
1	T20	-	Neg	Pos
2	T41	19.26	Pos	Pos
3	T42	18.88	Pos	Pos
4	T43	17.24	Pos	Pos
5	T44	19.28	Pos	Pos
6	T45	19.5	Pos	Pos
7	T46	18.25	Pos	Pos
8	T47	19.3	Pos	Pos
9	T48	19.29	Pos	Pos
10	T49	24.56	Pos	Pos
11	T50	28.18	Pos	Pos
12	T51	17.82	Pos	Pos
13	T52	17.19	Pos	Pos
14	T53	18.05	Pos	Pos
15	T54	16.17	Pos	Pos
16	T55	17.07	Pos	Pos
17	T56	18.81	Pos	Pos
18	T57	14.48	Pos	Pos
19	T58	15.3	Pos	Pos
20	T59	15.29	Pos	Pos
21	T60	16.59	Pos	Pos
22	T61	81.2	Pos	Pos
23	T81	19.47	Pos	Pos
24	T82	21.17	Pos	Pos
25	T83	21.24	Pos	Pos
26	T84	19.82	Pos	Pos
27	T85	19.26	Pos	Pos
28	T86	19.25	Pos	Pos
29	T87	19.17	Pos	Pos
30	T88	19.24	Pos	Pos
31	T89	19.82	Pos	Pos
32	T90	20.66	Pos	Pos
33	T91	15.99	Pos	Pos
34	T92	14.52	Pos	Pos
35	T93	15.42	Pos	Pos
36	T94	15.33	Pos	Pos
37	T95	15.25	Pos	Pos
38	T96	15.21	Pos	Pos
39	T97	19.5	Pos	Pos
40	T98	16.81	Pos	Pos
41	T99	17.77	Pos	Pos
42	T100	17.85	Pos	Pos
43	T109	81.11	Pos	Pos
44	T1	-	Neg	Neg
45	T2	-	Neg	Neg
46	T3	-	Neg	Neg
47	T4	-	Neg	Neg
48	T5	-	Neg	Neg
49	T6	-	Neg	Neg
50	T7	-	Neg	Neg
51	T8	-	Neg	Neg
52	T9	-	Neg	Neg
53	T10	-	Neg	Neg
54	T11	-	Neg	Neg
55	T12	-	Neg	Neg
56	T13	-	Neg	Neg
57	T14	-	Neg	Neg
58	T15	-	Neg	Neg
59	T16	-	Neg	Neg
60	T17	-	Neg	Neg
61	T18	-	Neg	Neg
62	T19	-	Neg	Neg
63	T21	-	Neg	Neg
64	T22	-	Neg	Neg
65	T23	-	Neg	Neg
66	T24	-	Neg	Neg
67	T25	-	Neg	Neg
68	T26	-	Neg	Neg
69	T27	-	Neg	Neg
70	T28	-	Neg	Neg
71	T29	-	Neg	Neg
72	T30	-	Neg	Neg
73	T31	-	Neg	Neg
74	T32	-	Neg	Neg
75	T33	-	Neg	Neg
76	T34	-	Neg	Neg
77	T35	-	Neg	Neg
78	T36	-	Neg	Neg
79	T37	-	Neg	Neg
80	T38	-	Neg	Neg
81	T39	-	Neg	Neg
82	T40	-	Neg	Neg
83	T62	-	Neg	Neg
84	T63	-	Neg	Neg
85	T64	-	Neg	Neg
86	T65	-	Neg	Neg
87	T66	-	Neg	Neg
88	T67	-	Neg	Neg
89	T68	-	Neg	Neg
90	T69	-	Neg	Neg
91	T70	-	Neg	Neg
92	T71	-	Neg	Neg
93	T72	-	Neg	Neg

- POBGEN XQ Narcissus virus Detection Kit의 민감도 및 특이도를 분석하였음(25-27).
- 최종적으로 확인된 시험법을 이용하여 수선화에 감염될 수 있는 주요한 바이러스 중 3 개의 바이러스 감염검체와 비감염검체를 이용하여 각 바이러스의 진단법에 대한 임상적 민감도와 특이도를 분석하였음.
- 검사를 위해 복수의 검사방법을 통해 NYSV 양성으로 확인된 검체 30개, 음성으로 확인된 검체 50개를 사용하였고, TRV의 경우 동일하게 복수의 검사방법을 통해 양성으로 확인된 검체 30개, 음성으로 확인된 검체 50개를 사용하였으며, 마지막으로 NMV에 대해서도 두 바이러스와 마찬가지로 복수의 검사방법을 통해 양성으로 확인된 검체 41개, 음성으로 확인된 검체 50개를 사용하였음.

표 25. POBGEN XQ Narcissus virus Detection Kit에 대한 NYSV에 대한 임상적 성능평가(민감도, 특이도)

		POBGEN XQ Narcissus virus Detection Kit (NYSV)					
		양성	음성	합계		민감도	특이도
검사기준 (복수의 검사로 확인)	양성	30	0	30		30/30*100	50/50*100
	음성	0	50	50		100%	100%
합계		30	50	80			

표 26. POBGEN XQ Narcissus virus Detection Kit에 대한 TRV에 대한 임상적 성능평가(민감도, 특이도)

		POBGEN XQ Narcissus virus Detection Kit (TRV)					
		양성	음성	합계		민감도	특이도
검사기준 (복수의 검사로 확인)	양성	30	0	30		30/30*100	50/50*100
	음성	0	50	50		100%	100%
합계		30	50	80			

표 27. POBGEN XQ Narcissus virus Detection Kit에 대한 TVX에 대한 임상적 성능평가(민감도, 특이도)

		POBGEN XQ Narcissus virus Detection Kit (NMV)					
		양성	음성	합계		민감도	특이도
검사기준 (복수의 검사로 확인)	양성	41	0	41		41/41*100	50/50*100
	음성	0	50	50		100%	100%
합계		41	50	91			

- 분석결과와 복수의 검사를 통해 각각의 바이러스 양성인 시료에 대한 임상적 검출성능을 위한 민감도의 경우 세가지바이러스에서 모두 100%, 그리고 각각의 바이러스 음성인 시료에 대해서는 모두 100%의 특이도를 보이는 것으로 확인되었음.

POBGEN XQ Narcissus Virus Detection Kit (NYSV)				
Serial No	ID	POC qPCR (Narcissusvirus) NYSV(Ct)	POC qPCR (Narcissusvirus) NYSV(Results)	Criteria NYSV
1	N28	27.52	Pos	Pos
2	N41	16.14	Pos	Pos
3	N42	17.17	Pos	Pos
4	N43	17.14	Pos	Pos
5	N44	17.14	Pos	Pos
6	N45	17.21	Pos	Pos
7	N46	18.15	Pos	Pos
8	N47	18.13	Pos	Pos
9	N48	17.12	Pos	Pos
10	N49	16.18	Pos	Pos
11	N50	16.17	Pos	Pos
12	N51	17.14	Pos	Pos
13	N52	18.13	Pos	Pos
14	N53	19.28	Pos	Pos
15	N54	16.67	Pos	Pos
16	N55	18.68	Pos	Pos
17	N56	18.93	Pos	Pos
18	N57	18.16	Pos	Pos
19	N59	18.17	Pos	Pos
20	N60	18.13	Pos	Pos
21	N81	19.13	Pos	Pos
22	N82	20.13	Pos	Pos
23	N83	16.16	Pos	Pos
24	N84	19.18	Pos	Pos
25	N85	18.12	Pos	Pos
26	N86	20.13	Pos	Pos
27	N87	19.15	Pos	Pos
28	N88	20.19	Pos	Pos
29	N89	20.13	Pos	Pos
30	N90	17.14	Pos	Pos
31	N1	-	Neg	Neg
32	N2	-	Neg	Neg
33	N3	-	Neg	Neg
34	N4	-	Neg	Neg
35	N5	-	Neg	Neg
36	N6	-	Neg	Neg
37	N7	-	Neg	Neg
38	N8	-	Neg	Neg
39	N9	-	Neg	Neg
40	N10	-	Neg	Neg
41	N11	-	Neg	Neg
42	N12	-	Neg	Neg
43	N13	-	Neg	Neg
44	N14	-	Neg	Neg
45	N15	-	Neg	Neg
46	N16	-	Neg	Neg
47	N17	-	Neg	Neg
48	N18	-	Neg	Neg
49	N19	-	Neg	Neg
50	N20	-	Neg	Neg
51	N21	-	Neg	Neg
52	N22	-	Neg	Neg
53	N23	-	Neg	Neg
54	N24	-	Neg	Neg
55	N25	-	Neg	Neg
56	N26	-	Neg	Neg
57	N27	-	Neg	Neg
58	N29	-	Neg	Neg
59	N30	-	Neg	Neg
60	N31	-	Neg	Neg
61	N32	-	Neg	Neg
62	N33	-	Neg	Neg
63	N34	-	Neg	Neg
64	N35	-	Neg	Neg
65	N36	-	Neg	Neg
66	N37	-	Neg	Neg
67	N38	-	Neg	Neg
68	N39	-	Neg	Neg
69	N40	-	Neg	Neg
70	N58	-	Neg	Neg
71	N61	-	Neg	Neg
72	N62	-	Neg	Neg
73	N63	-	Neg	Neg
74	N64	-	Neg	Neg
75	N65	-	Neg	Neg
76	N66	-	Neg	Neg
77	N67	-	Neg	Neg
78	N68	-	Neg	Neg
79	N69	-	Neg	Neg
80	N70	-	Nea	Nea

POBGEN XQ Narcissus Virus Detection Kit (TRV)				
Serial No	ID	POC qPCR (Narcissusvirus) TRV(Ct)	POC qPCR (Narcissusvirus) TRV(Results)	Criteria TRV
1	N41	14.23	Pos	Pos
2	N42	14.2	Pos	Pos
3	N43	14.2	Pos	Pos
4	N44	14.18	Pos	Pos
5	N45	14.21	Pos	Pos
6	N46	15.25	Pos	Pos
7	N47	14.16	Pos	Pos
8	N48	14.21	Pos	Pos
9	N49	15.18	Pos	Pos
10	N50	15.28	Pos	Pos
11	N51	13.21	Pos	Pos
12	N52	13.19	Pos	Pos
13	N53	11.79	Pos	Pos
14	N54	11.89	Pos	Pos
15	N55	12.03	Pos	Pos
16	N56	11.19	Pos	Pos
17	N57	12.28	Pos	Pos
18	N58	10.59	Pos	Pos
19	N59	12.26	Pos	Pos
20	N60	12.24	Pos	Pos
21	N81	14.21	Pos	Pos
22	N82	15.19	Pos	Pos
23	N83	14.17	Pos	Pos
24	N84	15.19	Pos	Pos
25	N85	14.12	Pos	Pos
26	N86	15.2	Pos	Pos
27	N87	15.21	Pos	Pos
28	N88	15.18	Pos	Pos
29	N89	14.17	Pos	Pos
30	N90	14.14	Pos	Pos
31	N1	32.18	Neg	Neg
32	N2	-	Neg	Neg
33	N3	-	Neg	Neg
34	N4	35.61	Neg	Neg
35	N5	-	Neg	Neg
36	N6	-	Neg	Neg
37	N7	-	Neg	Neg
38	N8	-	Neg	Neg
39	N9	-	Neg	Neg
40	N10	-	Neg	Neg
41	N11	-	Neg	Neg
42	N12	-	Neg	Neg
43	N13	-	Neg	Neg
44	N14	-	Neg	Neg
45	N15	-	Neg	Neg
46	N16	-	Neg	Neg
47	N17	-	Neg	Neg
48	N18	-	Neg	Neg
49	N19	-	Neg	Neg
50	N20	-	Neg	Neg
51	N21	-	Neg	Neg
52	N22	-	Neg	Neg
53	N23	-	Neg	Neg
54	N24	-	Neg	Neg
55	N25	-	Neg	Neg
56	N26	-	Neg	Neg
57	N27	-	Neg	Neg
58	N28	-	Neg	Neg
59	N29	-	Neg	Neg
60	N30	-	Neg	Neg
61	N31	-	Neg	Neg
62	N32	-	Neg	Neg
63	N33	-	Neg	Neg
64	N34	-	Neg	Neg
65	N35	-	Neg	Neg
66	N36	-	Neg	Neg
67	N37	-	Neg	Neg
68	N38	-	Neg	Neg
69	N39	-	Neg	Neg
70	N40	-	Neg	Neg
71	N61	31.15	Neg	Neg
72	N62	-	Neg	Neg
73	N63	31.25	Neg	Neg
74	N64	-	Neg	Neg
75	N65	-	Neg	Neg
76	N66	-	Neg	Neg
77	N67	-	Neg	Neg
78	N68	-	Neg	Neg
79	N69	-	Neg	Neg
80	N70	-	Neg	Neg

POBGEN XQ Narcissus Virus Detection Kit (NMV)				
Serial No	ID	POC qPCR (Nardssusvirus) NMV(Ct)	POC qPCR (Nardssusvirus) NMV(Results)	Criteria NMV
1	N41	13.34	Pos	Pos
2	N42	13.27	Pos	Pos
3	N43	12.23	Pos	Pos
4	N44	13.29	Pos	Pos
5	N45	12.31	Pos	Pos
6	N46	13.3	Pos	Pos
7	N47	12.22	Pos	Pos
8	N48	12.2	Pos	Pos
9	N49	14.34	Pos	Pos
10	N50	14.26	Pos	Pos
11	N51	28.14	Pos	Pos
12	N52	28.16	Pos	Pos
13	N53	29.02	Pos	Pos
14	N54	26	Pos	Pos
15	N55	26.4	Pos	Pos
16	N56	26.29	Pos	Pos
17	N57	28.17	Pos	Pos
18	N58	25.18	Pos	Pos
19	N59	28.17	Pos	Pos
20	N60	28.14	Pos	Pos
21	N81	13.28	Pos	Pos
22	N82	14.41	Pos	Pos
23	N83	12.2	Pos	Pos
24	N84	12.17	Pos	Pos
25	N85	13.25	Pos	Pos
26	N86	14.28	Pos	Pos
27	N87	13.27	Pos	Pos
28	N88	13.29	Pos	Pos
29	N89	12.21	Pos	Pos
30	N90	13.31	Pos	Pos
31	N91	13.37	Pos	Pos
32	N92	12.21	Pos	Pos
33	N93	13.26	Pos	Pos
34	N94	13.23	Pos	Pos
35	N95	14.04	Pos	Pos
36	N96	14.54	Pos	Pos
37	N97	14.2	Pos	Pos
38	N98	14.23	Pos	Pos
39	N99	14.69	Pos	Pos
40	N100	13.26	Pos	Pos
41	N105	28.44	Pos	Pos
42	N1	-	Neg	Neg
43	N2	-	Neg	Neg
44	N3	-	Neg	Neg
45	N4	-	Neg	Neg
46	N5	-	Neg	Neg
47	N6	-	Neg	Neg
48	N7	-	Neg	Neg
49	N8	-	Neg	Neg
50	N9	-	Neg	Neg
51	N10	-	Neg	Neg
52	N11	-	Neg	Neg
53	N12	-	Neg	Neg
54	N13	-	Neg	Neg
55	N14	-	Neg	Neg
56	N15	-	Neg	Neg
57	N16	-	Neg	Neg
58	N17	-	Neg	Neg
59	N18	-	Neg	Neg
60	N19	-	Neg	Neg
61	N20	-	Neg	Neg
62	N21	-	Neg	Neg
63	N22	-	Neg	Neg
64	N23	-	Neg	Neg
65	N24	-	Neg	Neg
66	N25	-	Neg	Neg
67	N26	-	Neg	Neg
68	N27	-	Neg	Neg
69	N28	-	Neg	Neg
70	N29	-	Neg	Neg
71	N30	-	Neg	Neg
72	N31	-	Neg	Neg
73	N32	-	Neg	Neg
74	N33	-	Neg	Neg
75	N34	-	Neg	Neg
76	N35	-	Neg	Neg
77	N36	-	Neg	Neg
78	N37	-	Neg	Neg
79	N38	-	Neg	Neg
80	N39	-	Neg	Neg
81	N40	-	Neg	Neg
82	N61	-	Neg	Neg
83	N62	-	Neg	Neg
84	N63	-	Neg	Neg
85	N64	-	Neg	Neg
86	N65	-	Neg	Neg
87	N66	-	Neg	Neg
88	N67	-	Neg	Neg
89	N68	-	Neg	Neg
90	N69	-	Neg	Neg
91	N70	-	Neg	Neg

- POBGEN XQ Lily virus Detection Kit의 민감도 및 특이도를 분석하였음(표. 28-30).
- 최종적으로 확인된 시험법을 이용하여 백합에 감염될 수 있는 주요한 바이러스 중 3 개의 바이러스 감염검체와 비감염검체를 이용하여 각 바이러스의 진단법에 대한 임상적 민감도와 특이도를 분석하였음.
- 검사를 위해 복수의 검사방법을 통해 CMV 양성으로 확인된 검체 35개, 음성으로 확인된 검체 50개를 사용하였고, LSV의 경우 동일하게 복수의 검사방법을 통해 양성으로 확인된 검체 34개, 음성으로 확인된 검체 50개를 사용하였으며, 마지막으로 LMoV에 대해서도 두 바이러스와 마찬가지로 복수의 검사방법을 통해 양성으로 확인된 검체 22개, 음성으로 확인된 검체 50개를 사용하였음.

**표 28. POBGEN XQ Lily virus Detection Kit에 대한 CMV에 대한 임상적 성능평가(민감도, 특이도)**

		POBGEN XQ Lily virus Detection Kit (CMV)					
		양성	음성	합계		민감도	특이도
검사기준 (복수의 검사로 확인)	양성	35	0	35		35/35*100	40/40*100
	음성	0	40	40		100%	100%
합계		35	40	75			

**표 29. POBGEN Lily virus Detection Kit에 대한 LSV에 대한 임상적 성능평가(민감도, 특이도)**

		POBGEN XQ Lily virus Detection Kit (LSV)					
		양성	음성	합계		민감도	특이도
검사기준 (복수의 검사로 확인)	양성	33	1	34		34/35*100	31/31*100
	음성	0	31	31		97.14%	100%
합계		33	32	65			

**표 30. POBGEN Lily virus Detection Kit에 대한 TVX에 대한 임상적 성능평가(민감도, 특이도)**

		POBGEN XQ Lily virus Detection Kit (LMoV)					
		양성	음성	합계		민감도	특이도
검사기준 (복수의 검사로 확인)	양성	22	0	22		22/22*100	40/40*100
	음성	0	40	40		100%	100%
합계		22	40	62			

- 분석결과와 복수의 검사를 통해 각각의 바이러스 양성인 시료에 대한 임상적 검출성능을 위한 민감도의 경우 CMV에서는 100%, LSV는 97.06%, 그리고 LMoV의 경우 100%로 확인되었으며 각각의 바이러스 음성인 시료에 대해서는 모두 100%의 특이도를 보이는 것으로 확인되었음.

POBGEN XQ Lily Virus Detection Kit (CMV)				
Serial No	ID	POC qPCR (Lilyvirus) CMV(Ct)	POC qPCR (Lilyvirus) CMV(Results)	Criteria CMV
1	L1	22.18	Pos	Pos
2	L6	19.2	Pos	Pos
3	L9	18.19	Pos	Pos
4	L10	20.22	Pos	Pos
5	L14	21.16	Pos	Pos
6	L17	21.17	Pos	Pos
7	L18	22.25	Pos	Pos
8	L33	26.24	Pos	Pos
9	L35	23.16	Pos	Pos
10	L36	21.18	Pos	Pos
11	L39	21.14	Pos	Pos
12	L40	24.31	Pos	Pos
13	L41	23.31	Pos	Pos
14	L42	22.18	Pos	Pos
15	L43	21.07	Pos	Pos
16	L44	28.36	Pos	Pos
17	L50	19.24	Pos	Pos
18	L51	25.11	Pos	Pos
19	L54	23.19	Pos	Pos
20	L55	19.18	Pos	Pos
21	L56	19.19	Pos	Pos
22	L58	28.56	Pos	Pos
23	L63	24.22	Pos	Pos
24	L64	20.18	Pos	Pos
25	L65	23.72	Pos	Pos
26	L66	21.12	Pos	Pos
27	L67	20.1	Pos	Pos
28	L70	26.21	Pos	Pos
29	L71	22.16	Pos	Pos
30	L75	20.15	Pos	Pos
31	L76	27.2	Pos	Pos
32	L79	22.17	Pos	Pos
33	L80	21.17	Pos	Pos
34	L8	27.36	Pos	Pos
35	L34	26.44	Pos	Pos
36	L2	-	Neg	Neg
37	L5	30.13	Neg	Neg
38	L7	30.11	Neg	Neg
39	L11	-	Neg	Neg
40	L12	-	Neg	Neg
41	L13	31.2	Neg	Neg
42	L15	-	Neg	Neg
43	L16	-	Neg	Neg
44	L19	33.74	Neg	Neg
45	L20	33	Neg	Neg
46	L21	31.24	Neg	Neg
47	L22	31.27	Neg	Neg
48	L23	-	Neg	Neg
49	L24	-	Neg	Neg
50	L25	-	Neg	Neg
51	L26	-	Neg	Neg
52	L27	31.18	Neg	Neg
53	L28	-	Neg	Neg
54	L29	31.12	Neg	Neg
55	L30	31.09	Neg	Neg
56	L31	-	Neg	Neg
57	L32	31.15	Neg	Neg
58	L37	31.13	Neg	Neg
59	L38	-	Neg	Neg
60	L45	32.25	Neg	Neg
61	L46	-	Neg	Neg
62	L47	31.14	Neg	Neg
63	L49	30.09	Neg	Neg
64	L52	31.18	Neg	Neg
65	L57	-	Neg	Neg
66	L59	-	Neg	Neg
67	L60	-	Neg	Neg
68	L61	-	Neg	Neg
69	L68	33.08	Neg	Neg
70	L69	-	Neg	Neg
71	L72	-	Neg	Neg
72	L73	-	Neg	Neg
73	L74	-	Neg	Neg
74	L77	31.16	Neg	Neg
75	L78	-	Neg	Neg

POBGEN XQ Lily Virus Detection Kit (LSV)				
		POC qPCR (Lilyvirus)	POC qPCR (Lilyvirus)	Criteria
Serial No	ID	LSV(Ct)	LSV(Results)	LSV
1	L1	27.16	Pos	Pos
2	L2	28.13	Pos	Pos
3	L3	28.14	Pos	Pos
4	L6	11.34	Pos	Pos
5	L7	10.43	Pos	Pos
6	L11	27.15	Pos	Pos
7	L14	8.32	Pos	Pos
8	L17	24.2	Pos	Pos
9	L18	27.13	Pos	Pos
10	L19	24.55	Pos	Pos
11	L21	27.71	Pos	Pos
12	L22	26.79	Pos	Pos
13	L23	10.45	Pos	Pos
14	L26	9.29	Pos	Pos
15	L28	27.14	Pos	Pos
16	L31	26.19	Pos	Pos
17	L32	30.14	Neg	Pos
18	L33	24.23	Pos	Pos
19	L35	11.29	Pos	Pos
20	L36	10.34	Pos	Pos
21	L37	22.22	Pos	Pos
22	L39	9.31	Pos	Pos
23	L40	11.36	Pos	Pos
24	L41	10.41	Pos	Pos
25	L42	8.91	Pos	Pos
26	L43	10.65	Pos	Pos
27	L45	29.39	Pos	Pos
28	L48	9.58	Pos	Pos
29	L50	13.29	Pos	Pos
30	L63	26.16	Pos	Pos
31	L65	26.86	Pos	Pos
32	L80	28.15	Pos	Pos
33	L38	27.14	Pos	Pos
34	L44	28.33	Pos	Pos
35	L8	30.11	Neg	Neg
36	L12	30.09	Neg	Neg
37	L13	30.1	Neg	Neg
38	L20	31.25	Neg	Neg
39	L24	30.14	Neg	Neg
40	L29	31.2	Neg	Neg
41	L30	31.17	Neg	Neg
42	L34	30.13	Neg	Neg
43	L51	31.15	Neg	Neg
44	L52	31.25	Neg	Neg
45	L53	31.21	Neg	Neg
46	L54	31.13	Neg	Neg
47	L55	-	Neg	Neg
48	L56	31.23	Neg	Neg
49	L57	30.17	Neg	Neg
50	L58	30.14	Neg	Neg
51	L59	30.1	Neg	Neg
52	L60	30.11	Neg	Neg
53	L62	-	Neg	Neg
54	L64	30.21	Neg	Neg
55	L66	31.26	Neg	Neg
56	L67	30.38	Neg	Neg
57	L68	31.5	Neg	Neg
58	L69	-	Neg	Neg
59	L70	31.27	Neg	Neg
60	L73	30.14	Neg	Neg
61	L74	-	Neg	Neg
62	L75	31.31	Neg	Neg
63	L76	31.3	Neg	Neg
64	L77	31.24	Neg	Neg
65	L78	-	Neg	Neg

POBGEN XQ Lily Virus Detection Kit (LMoV)				
Serial No	ID	POC qPCR (Lilyvirus)	POC qPCR (Lilyvirus)	Criteria
		LMoV(Ct)	LMoV(Results)	LMoV
1	L3	11.61	Pos	Pos
2	L5	13.51	Pos	Pos
3	L8	13.43	Pos	Pos
4	L9	26.26	Pos	Pos
5	L10	12.52	Pos	Pos
6	L12	14.42	Pos	Pos
7	L13	12.51	Pos	Pos
8	L14	13.44	Pos	Pos
9	L21	25.81	Pos	Pos
10	L22	24.86	Pos	Pos
11	L23	19.25	Pos	Pos
12	L25	14.48	Pos	Pos
13	L31	11.44	Pos	Pos
14	L32	11.49	Pos	Pos
15	L34	12.39	Pos	Pos
16	L37	11.38	Pos	Pos
17	L48	26.29	Pos	Pos
18	L55	19.28	Pos	Pos
19	L60	23.19	Pos	Pos
20	L73	17.36	Pos	Pos
21	L78	27.17	Pos	Pos
22	L1	28.18	Pos	Pos
23	L2	-	Neg	Neg
24	L11	-	Neg	Neg
25	L15	-	Neg	Neg
26	L16	-	Neg	Neg
27	L17	-	Neg	Neg
28	L18	-	Neg	Neg
29	L19	31.13	Neg	Neg
30	L20	-	Neg	Neg
31	L24	31.27	Neg	Neg
32	L26	-	Neg	Neg
33	L27	-	Neg	Neg
34	L29	30.18	Neg	Neg
35	L30	31.26	Neg	Neg
36	L33	30.12	Neg	Neg
37	L35	30.12	Neg	Neg
38	L36	31.28	Neg	Neg
39	L38	-	Neg	Neg
40	L39	-	Neg	Neg
41	L40	-	Neg	Neg
42	L41	-	Neg	Neg
43	L42	30.6	Neg	Neg
44	L43	30.25	Neg	Neg
45	L44	-	Neg	Neg
46	L46	31.25	Neg	Neg
47	L47	31.22	Neg	Neg
48	L49	31.25	Neg	Neg
49	L50	30.13	Neg	Neg
50	L52	-	Neg	Neg
51	L53	-	Neg	Neg
52	L54	31.28	Neg	Neg
53	L56	30.15	Neg	Neg
54	L58	30.14	Neg	Neg
55	L59	31.13	Neg	Neg
56	L61	-	Neg	Neg
57	L62	-	Neg	Neg
58	L63	-	Neg	Neg
59	L64	-	Neg	Neg
60	L65	-	Neg	Neg
61	L66	-	Neg	Neg
62	L67	-	Neg	Neg

○ 3종의 현장 적용 유전자진단키트의 임상평가

- (주) 포스트바이오에서 개발한 3종의 현장진단용 구근 화훼류 바이러스 진단키트(표. 31)를 자체평가와 더불어 유전자 분석기관에 의뢰하여 임상적인 평가를 수행하였음.
- 본 시험은 경기도 남양주시 순화궁로 282 소재 (주)포스트바이오에서 제공한 구근 화훼류 (튤립, 수선화, 백합, 글라디올러스 등) 시료를 이용하여 각 구근 화훼류에서 문제가 되는 다양한 바이러스 등에 대한 3종의 바이러스 진단키트에 대해 구근 화훼류 야외시료에 대한 검사를 수행하고 각 진단키트에 대한 민감도와 특이도 등 진단키트의 분석적 성능을 평가할 목적으로 실시하였음.
- 이동형 qRT-PCR 장비를 이용한 구근 화훼류 바이러스 현장 진단법 3건(POBGEN™ XQ Narcissus Virus Detection Kit, POBGEN™ XQ Tulip Virus Detection Kit, POBGEN™ XQ Lily Virus Detection Kit)에 대하여 외부인증기관 (주) 코스모진텍에 시험의뢰하였으며, 민감도 및 특이도가 90% 이상임을 실증함(첨부).

표 31. 진단키트의 명칭 및 검사대상 구근 화훼류, 바이러스종 등의 개요

진단키트명칭	적용가능 구근화훼류	바이러스	형광구성	비고
POBGEN™ XQ Tulip Virus Detection Kit	튤립(Tulip)	LSV	FAM	POC qPCR (핵산추출_유전자검출 통합)
		IPC	HEX	
		OMMV	ROX	
		TVX	Cy5	
POBGEN™ XQ Narcissus Virus Detection Kit	수선화 (Narcissus)	NYSV	FAM	POC qPCR (핵산추출_유전자검출 통합)
		IPC	HEX	
		TRV	ROX	
		NMV	Cy5	
POBGEN™ XQ Lily Virus Detection Kit	백합(Lily) 글라디올러스 (Gladiolus)	CMV	FAM	POC qPCR (핵산추출_유전자검출 통합)
		IPC	HEX	
		LSV	ROX	
		LMoV	Cy5	

- 대상이 되는 구근화훼류 바이러스 양성, 음성을 포함한 야외시료 각 60건을 대상으로 검사를 수행하여 각 표적 바이러스에 대한 임상적 민감도, 특이도를 분석한 결과 검사 대상이 되는 3종의 현장용 진단키트에 대해서 POBGEN™XQ Tulip Virus Detection Kit 검사의 TVX에 대한 항목과 POBGEN™XQ Lily Virus Detection Kit LSV에 대한 항목에서의 민감도가 30개의 양성시료 중 29개를 검출하여 96.7%로 확인되었으며 그 외의 모든 항목은 민감도와 특이도에서 100%의 결과로 확인되었음.

- 시험기기 개요

- 시험기기

(1) 명칭 (2) 배치번호 :

진단키트명칭	적용가능 구근화훼류	진단키트배치번호
POBGEN™ XQ Tulip Virus Detection Kit	튤립(Tulip)	2023083001 (REF Z0001-E)
POBGEN™ XQ Narcissus Virus Detection Kit	수선화 (Narcissus)	2023083001 (REF Z0002-E)
POBGEN™ XQ Lily Virus Detection Kit	백합(Lily) 글라디올러스 (Gladiolus)	2023083001 (REF Z0003-E)

- (3) 보관조건: 냉장보관
- (4) 공급원: 포스트바이오 (주)
- (5) 검사대상병원체 : 표 31 참고

첨부. 구근화훼류 바이러스 현장진단 3종키트에 대한 성능평가서.

## 구근화훼류 바이러스 진단키트 3종에 대한 현장용 유전자 분석기기 성능평가

시험의뢰기관: 포스트바이오 (주)

주식회사 코스모진핵

주식회사 코스모진핵

포스트바이오(주) 구근화훼류 바이러스 진단키트 3종에 대한 현장용 유전자 분석기기 성능평가

### 시험개요

**시험제목** 구근화훼류 3종 바이러스 진단키트 3종에 대한 현장용 유전자 분석기기 성능평가

**시험목적** 본 시험은 의뢰에서 제공된 구근화훼류 시료를 이용하여 구근화훼류 시료에 감염될 수 있는 다양한 바이러스를 검출하기 위한 바이러스 진단키트 3종에 대한 유전자검출결과를 바탕으로 시험의뢰된 진단키트에 대한 분석적 성능검 사를 위한 민감도, 특이도를 수행하여 시험결과에 대한 신뢰성을 평가할 목적 으로 실시하였다.

**시험의뢰처** 명 칭 : 포스트바이오 (주)  
소 지 자 : 경기도 남양주시 송학동로 282번지 1303호  
연 락 처 : [REDACTED]

**시험기관** 명 칭 : 주식회사 코스모진핵  
소 지 자 : 서울시 영등포구 영수동 10길 재석로24길100동 3층  
연 락 처 : [REDACTED]

**시험일정** 2023 년 9월 15 일 : 임상평가시험 평가 개시일  
2023 년 12 월 20 일 : 임상평가시험 종료일  
2023 년 12 월 30 일 : 최종보고서 제출일

**시험책임자** 호 명 구 : [REDACTED] 2024년 1월 31일

---

포스트바이오(주) 구근화훼류 바이러스 진단키트 3종에 대한 현장용 유전자 분석기기 성능평가

### 목차

시험개요 ..... 1

1. 의뢰시험요약 ..... 3

2. 시험기기 개요 ..... 4

3. 재료 및 방법 ..... 6

4. 시험결과 ..... 7

5. 발췌데이터 ..... 12

포스트바이오(주) 구근화훼류 바이러스 진단키트 3종에 대한 현장용 유전자 분석기기 성능평가

### 1. 의뢰시험 요약

본 시험은 경기도 남양주시 송학동로 282 소재 포스트바이오 (주)에서 제공된 구근화훼류 (튤립, 수선화, 백합, 글라디올러스 등) 시료를 이용하여 각 구근화훼류에서 존재가 되는 다양한 바이러스 종에 대한 3종의 바이러스 진단키트에 대해 구근화훼류 의뢰시료에 대한 검사를 수행하고 각 진단키트에 대한 민감도와 특이도 등 진단키트의 분석적 성능을 평가할 목적으로 실시하였 다.

표 1. 진단키트의 명칭 및 검사대상 구근화훼류, 바이러스종 등의 개요

진단키트명칭	적용가능 구근화훼류	바이러스	항원구성	비고
POBGEN™ XQ Tulip Virus Detection Kit	튤립(Tulip)	LSV	FAM	POC qPCR (핵산추출, 유전자검출 포함)
		IPC	HEX	
		CMNV	ROX	
		TVX	Cy5	
POBGEN™ XQ Narcissus Virus Detection Kit	수선화 (Narcissus)	NVSV	FAM	POC qPCR (핵산추출, 유전자검출 포함)
		IPC	HEX	
		TVX	ROX	
		NMVV	Cy5	
POBGEN™ XQ Lily Virus Detection Kit	백합(Lily) 글라디올러스 (Gladiolus)	CMV	FAM	POC qPCR (핵산추출, 유전자검출 포함)
		IPC	HEX	
		LSV	ROX	
		LMNV	Cy5	

대상이 되는 구근화훼류 바이러스, 양분, 통발을 포함한 채로서로 각 40관을 대상으로 검사를 수행하여 각 표적바이러스에 대한 임상적 민감도, 특이도를 분석한 결과 검사대상자 되는 3종의 현장용 진단키트에 대해서 POBGEN™ XQ Tulip Virus Detection Kit 검사시 TVX에 대한 정확도 POBGEN™ XQ Lily Virus Detection Kit LSV에 대한 정확도의 민감도가 30개의 양성시료 중 29개를 검출하여 96.7%로 확인되었으며 그 외의 모든 양성시료 민감도와 특이도에서 100%의 결과로 확인되었다.

## 2. 시험기기 개요

### 1) 시험기기

- (1) 종류
- (2) 배치번호

진단키트종류	적용가능 구균핵색류	진단키트제조회사
POBGEN™ XQ Tulpa Virus Detection Kit	툴입(Tulpa)	2023083001 (REF 20001-E)
POBGEN™ XQ Narcissus Virus Detection Kit	수선화 (Narcissus)	2023083001 (REF 20002-E)
POBGEN™ XQ Lily Virus Detection Kit	백합(Lily) 글라디올러스 (Gladiolus)	2023083001 (REF 20003-E)

- (3) 보관조건: 냉장보관
- (4) 공급원: 포스트바이옴
- (5) 검사대상병명: 표 1 참조

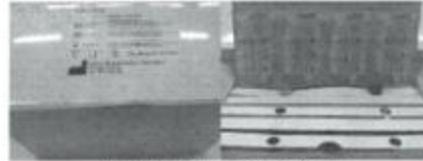
4

유이덱스 포스트바이옴

XQ Station (Instrument 1 SW/ 40min)



POBGEN™ XQ Tulpa Virus Detection Kit (POSTBIO)



POBGEN™ XQ Narcissus Virus Detection Kit (POSTBIO)



POBGEN™ XQ Lily Virus Detection Kit (POSTBIO)

5

유이덱스 포스트바이옴

## 3. 재료 및 방법

### 1) 의뢰사항

- (1) 진단용 의뢰기기

통합형 진단기기 (XQ Station 4 Lot11E)

구균핵색 검출키트 3종

- ① POBGEN™ XQ Tulpa Virus Detection Kit (POSTBIO)
- ② POBGEN™ XQ Narcissus Virus Detection Kit (POSTBIO)
- ③ POBGEN™ XQ Lily Virus Detection Kit (POSTBIO)

- (2) 샘플의 종류

2-1) 표준 바이러스 시료

의뢰에서 수집한 표준의 시료를 PBS 등의 버퍼에 희석하여 시험시까지 냉동보관하였으며, 시험재공기가 복수의 시험법으로 결과확인한 후 각 바이러스별로 양성시료, 음성시료를 포함하여 60건을 제공받았다.

2-2) 수선화 바이러스 시료

의뢰에서 수집한 수선화의 시료를 PBS 등의 버퍼에 희석하여 시험시까지 냉동보관하였으며, 시험재공기가 복수의 시험법으로 결과확인한 후 각 바이러스별로 양성시료, 음성시료를 포함하여 60건을 제공받았다.

2-3) 백합 바이러스 시료

의뢰에서 수집한 백합의 시료를 PBS 등의 버퍼에 희석하여 시험시까지 냉동보관하였으며, 시험재공기가 복수의 시험법으로 결과확인한 후 각 바이러스별로 양성시료, 음성시료를 포함하여 60건을 제공받았다.

6

유이덱스 포스트바이옴

### 2) 실험방법 및 검사

- (1) 구균핵색을 바이러스를 이용한 유전자진단키트 검사

의뢰자로부터 공급받은 각 구균핵색에 대한 바이러스를 검사해보조(총량부 1.0g)에 바이러스 용액의 전처리를 거쳐 각 진단키트에 적용한 후 검사용유체 검사결과를 확보하고 이를 검교의 분석에 활용한다. 동일한 미생물을 포함하고 있는 표준주 세포를 이용하여 각 시료를 일정한 PBS를 이용하여 10배 희석한 후 100μl를 정확히 이를 전처리기 제시된 표준검사시료 포트용 (첨부 1)에 정확히 검사를 수행하였다.

## 4. 시험결과

### 1) POBGEN™ XQ Tulpa Virus Detection Kit (POSTBIO)에 대한 임상적 성능평가결과

의뢰자로부터 총합될 수 있는 대표적한 3종의 바이러스인 LIV, GMNV, TVNV에 대한 양성 및 음성시료 각각 60건의 바이러스를 이용하여 평가용인 총합된 진단장서에 POBGEN™ XQ Tulpa Virus Detection Kit (POSTBIO)를 적용하여 검사를 진행하는 기준의 평가 방법에 의해 노출된 양성 및 음성적인 검교와 비교하여 일반적 평가방법으로 최종 결과 대비 임상적인 민감도와 특이도를 평가하였다.

표 1 LIV검사항목에 대한 POBGEN™ XQ Tulpa Virus Detection Kit (POSTBIO) 평가결과

		POBGEN™ XQ Tulpa Virus Detection Kit (POSTBIO)				
		양성	음성	합계	민감도	특이도
검사건	양성	31	0	31	100%	100%
	음성(의뢰자 확인)	0	32	32	100%	100%
합계		31	32	63		

LIV에 대한 키트의 평가결과 민감도와 특이도 모두에서 100%의 성능을 보이는 것을 확인 하였다. 각 시료에 대한 일과리스크는 일부자로부터 확인할 수 있다.

7

유이덱스 포스트바이옴

포스트테라미드 구급환복 바이러스 진단키트 3종에 대한 현장을 통한 분석기 성능평가

표. CMV검사용특에 대한 FORGEN™ XQ Silyurus Detection Kit (POSTSCO)의 평가결과

		FORGEN™ XQ Silyurus Detection Kit (POSTSCO)				
		EIA			전검	특이도
		양성	음성	양성	전검	특이도
검사종	양성	30	0	30	100%	100%
특이도 검사(예외 확인)	음성	0	30	30	100%	100%
합계		30	30	60		

CMV에 대한 키트의 평가결과 민감도와 특이도 모두에서 100%의 성능을 보이는 것을 확인하였다. 각 시료에 대한 결과리포트는 첨부자료에서 확인할 수 있다.

표. TVB검사용특에 대한 FORGEN™ XQ Silyurus Detection Kit (POSTSCO)의 평가결과

		FORGEN™ XQ Silyurus Detection Kit (POSTSCO)				
		TVB			전검	특이도
		양성	음성	양성	전검	특이도
검사종	양성	30	1	31	100%	100%
특이도 검사(예외 확인)	음성	0	30	30	100%	100%
합계		30	31	61		

TVB에 대한 키트의 평가결과 민감도는 100%로 특이도는 100%의 성능을 보이는 것을 확인하였다. 각 시료에 대한 결과리포트는 첨부자료에서 확인할 수 있다.

2) FORGEN™ XQ NucleoSense Detection Kit (POSTSCO)에 대한 임상적 성능평가결과

외과치료부위 수선하기 곤란할 수 있는 대표적인 3종의 바이러스인 HSV-1, TVB, CMV에 대한 양성 및 음성시료 각각 60건의 미량시료를 이용하여 평가되도록 동일한 진단용특에 FORGEN™ XQ NucleoSense Detection Kit (POSTSCO)를 적용하여 검사를 진행하고 기존의 평가방법에 의해 동일한 양성/음성의 임상적인 결과와 비교하여 임상적인 평가방법으로 표준결과 대비 임상적인 민감도와 특이도를 평가하였다.

포스트테라미드 구급환복 바이러스 진단키트 3종에 대한 현장을 통한 분석기 성능평가

표. HSV검사용특에 대한 FORGEN™ XQ NucleoSense Detection Kit (POSTSCO)의 평가결과

		FORGEN™ XQ NucleoSense Detection Kit (POSTSCO)				
		EIA			전검	특이도
		양성	음성	양성	전검	특이도
검사종	양성	30	0	30	100%	100%
특이도 검사(예외 확인)	음성	0	30	30	100%	100%
합계		30	30	60		

표. TVB검사용특에 대한 FORGEN™ XQ NucleoSense Detection Kit (POSTSCO)의 평가결과

		FORGEN™ XQ NucleoSense Detection Kit (POSTSCO)				
		TVB			전검	특이도
		양성	음성	양성	전검	특이도
검사종	양성	30	1	31	100%	100%
특이도 검사(예외 확인)	음성	0	30	30	100%	100%
합계		30	31	61		

표. CMV검사용특에 대한 FORGEN™ XQ NucleoSense Detection Kit (POSTSCO)의 평가결과

		FORGEN™ XQ NucleoSense Detection Kit (POSTSCO)				
		EIA			전검	특이도
		양성	음성	양성	전검	특이도
검사종	양성	30	0	30	100%	100%
특이도 검사(예외 확인)	음성	0	30	30	100%	100%
합계		30	30	60		

3종의 바이러스에 대한 키트의 평가결과 민감도와 특이도 모두에서 100%의 성능을 보이는 것을 확인하였다. 각 시료에 대한 결과리포트는 첨부자료에서 확인할 수 있다.

포스트테라미드 구급환복 바이러스 진단키트 3종에 대한 현장을 통한 분석기 성능평가

표. FORGEN™ XQ Silyurus Detection Kit (POSTSCO)에 대한 임상적 성능평가결과

외과치료부위 재연이 곤란할 수 있는 대표적인 3종의 바이러스인 CMV, HSV, CMV에 대한 양성 및 음성시료 각각 60건의 미량시료를 이용하여 평가되도록 동일한 진단용특에 FORGEN™ XQ Silyurus Detection Kit (POSTSCO)를 적용하여 검사를 진행하고 기존의 평가방법에 의해 동일한 양성/음성의 임상적인 결과와 비교하여 임상적인 평가방법으로 표준결과 대비 임상적인 민감도와 특이도를 평가하였다.

표. CMV검사용특에 대한 FORGEN™ XQ Silyurus Detection Kit (POSTSCO)의 평가결과

		FORGEN™ XQ Silyurus Detection Kit (POSTSCO)				
		EIA			전검	특이도
		양성	음성	양성	전검	특이도
검사종	양성	30	0	30	100%	100%
특이도 검사(예외 확인)	음성	0	30	30	100%	100%
합계		30	30	60		

CMV에 대한 키트의 평가결과 민감도와 특이도 모두에서 100%의 성능을 보이는 것을 확인하였다. 각 시료에 대한 결과리포트는 첨부자료에서 확인할 수 있다.

표. HSV검사용특에 대한 FORGEN™ XQ Silyurus Detection Kit (POSTSCO)의 평가결과

		FORGEN™ XQ Silyurus Detection Kit (POSTSCO)				
		EIA			전검	특이도
		양성	음성	양성	전검	특이도
검사종	양성	30	1	31	100%	100%
특이도 검사(예외 확인)	음성	0	30	30	100%	100%
합계		30	31	61		

HSV에 대한 키트의 평가결과 민감도는 100%로 특이도는 100%의 성능을 보이는 것을 확인하였다. 각 시료에 대한 결과리포트는 첨부자료에서 확인할 수 있다.

포스트테라미드 구급환복 바이러스 진단키트 3종에 대한 현장을 통한 분석기 성능평가

표. CMV검사용특에 대한 FORGEN™ XQ Silyurus Detection Kit (POSTSCO)의 평가결과

		FORGEN™ XQ Silyurus Detection Kit (POSTSCO)				
		EIA			전검	특이도
		양성	음성	양성	전검	특이도
검사종	양성	30	0	30	100%	100%
특이도 검사(예외 확인)	음성	0	30	30	100%	100%
합계		30	30	60		

CMV에 대한 키트의 평가결과 민감도와 특이도 모두에서 100%의 성능을 보이는 것을 확인하였다. 각 시료에 대한 결과리포트는 첨부자료에서 확인할 수 있다.

5. 별첨 자료

1) 검사프로토콜 (신용 검사키트)

POBANILAB

### XQ-Station 간편 사용 설명서

**검사 키트**

- 검사용: 1000개 / 100개 / 10개
- 가극내장 키트 용량량: 100개
- Internal Control 용량량: 100개
- 요청 받은 것 용량량, 검사 키트 제작 100개

→ 제조일자: 2020.12  
→ 연도/주별 별도구매

**검사 장비**

- 키트/키트의 유효기간을 확인한 후 또는 유효기간 유효함을 이용하여 수명을 줄인 후 균일한 샘플 100μl씩 6개 샘플 채취 후 10μl Internal Control 용량을 넣습니다.
- 표지판은 적외선 키트/키트의 부품을 넣은 후 중심에 샘플용 카트리지를 넣습니다.

**검사 방법**

- 키트의 전원을 켜고 메인화면 화면인 Apple Run 버튼을 클릭합니다.
 
- 가급 가능한 낮은 온도에서 100μl 채취 후 100μl의 샘플을 입력, 100μl Sample 용액, 100μl 용액을 입력한 후 키트/키트에 부속되어 있는 CR2032를 교환합니다.
 
- 키트 기기가 실패 정보/부품이 입력되지 않은 경우, 뒤쪽의 검은 색의 원이 나오면 Caution을 클릭한 다음 키트/키트가 들어있는 케이스 부속되어 있는 CR2032를 교환하여 오류/부품을 입력한 후 진행합니다.
 
- 테스트를 진행할 때 샘플을 선택한 후 키트/키트를 넣습니다.
 

Assay on Demand P●STBI

**검사 방법**

- 제품 상에 주어진 지침을 따라가거나 키트 용량량을 확인하여 검사를 시작합니다.
 
- 가급 가능한 낮은 온도를 유지하고 100μl씩 샘플 채취를 시작합니다.
 
- 뒤쪽의 검은 Running interface에서 실패 정보/부품을 확인할 수 있습니다.
 

**결과 확인**

- 결과가 올바른 Data analysis 페이지의 결과는 결과를 확인할 수 있습니다. 자동, Auto-Analysis를 클릭하면 (Results) Start cycle, End cycle의 표시가 나타나며 (Results) Start cycle, End cycle의 표시가 나타나면 Manual 버튼을 클릭하여 확인할 수 있습니다.
 
- 결과를 Input 하기 위해서는 메인화면의 Results 버튼을 클릭 후 원하는 결과/데이터를 입력할 수 있습니다.
 

Assay on Demand P●STBI

2) 검사결과표(후지쯔의)

2-1) FORGEN™ XQ Isipirax Detection Kit (POSTBI)에 관한 검사결과표

No.	40 µl/20 µl (Fluorescence) (Sample/Control)				Reference Gene (Reference)			
	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
1	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
2	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
3	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
4	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
5	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
6	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
7	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
8	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
9	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
10	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
11	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
12	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
13	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
14	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
15	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
16	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
17	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
18	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
19	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
20	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
21	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
22	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
23	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
24	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
25	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
26	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
27	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
28	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
29	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
30	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
31	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
32	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
33	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
34	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
35	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
36	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
37	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
38	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
39	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
40	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
41	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
42	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
43	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
44	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
45	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
46	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
47	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
48	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
49	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
50	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
51	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
52	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
53	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
54	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
55	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
56	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
57	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
58	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
59	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
60	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor

2-2) FORGEN™ XQ Narboxus Detection Kit (POSTBI)에 대한 검사결과표

No.	40 µl/20 µl (Fluorescence) (Sample/Control)				Reference Gene (POSTBI)			
	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
1	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
2	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
3	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
4	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
5	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
6	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
7	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
8	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
9	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
10	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
11	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
12	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
13	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
14	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
15	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
16	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
17	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
18	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
19	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
20	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
21	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
22	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
23	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
24	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
25	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
26	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
27	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
28	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
29	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
30	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
31	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
32	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
33	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
34	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
35	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
36	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
37	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
38	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
39	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
40	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
41	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
42	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
43	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
44	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
45	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
46	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
47	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
48	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
49	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
50	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
51	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
52	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
53	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
54	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
55	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
56	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
57	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
58	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
59	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor
60	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor	Fluor

2-2) FORBET<sup>TM</sup> IQ (Lyrius Detection Kit (QSTR))에 대한 검사결과서

No.	No. of Virus Detection (copies/mL)				Reference Data (copies/mL)			
	1	2	3	4	1	2	3	4
1	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100	100	100	100
6	100	100	100	100	100	100	100	100
7	100	100	100	100	100	100	100	100
8	100	100	100	100	100	100	100	100
9	100	100	100	100	100	100	100	100
10	100	100	100	100	100	100	100	100
11	100	100	100	100	100	100	100	100
12	100	100	100	100	100	100	100	100
13	100	100	100	100	100	100	100	100
14	100	100	100	100	100	100	100	100
15	100	100	100	100	100	100	100	100
16	100	100	100	100	100	100	100	100
17	100	100	100	100	100	100	100	100
18	100	100	100	100	100	100	100	100
19	100	100	100	100	100	100	100	100
20	100	100	100	100	100	100	100	100
21	100	100	100	100	100	100	100	100
22	100	100	100	100	100	100	100	100
23	100	100	100	100	100	100	100	100
24	100	100	100	100	100	100	100	100
25	100	100	100	100	100	100	100	100
26	100	100	100	100	100	100	100	100
27	100	100	100	100	100	100	100	100
28	100	100	100	100	100	100	100	100
29	100	100	100	100	100	100	100	100
30	100	100	100	100	100	100	100	100
31	100	100	100	100	100	100	100	100
32	100	100	100	100	100	100	100	100
33	100	100	100	100	100	100	100	100
34	100	100	100	100	100	100	100	100
35	100	100	100	100	100	100	100	100
36	100	100	100	100	100	100	100	100
37	100	100	100	100	100	100	100	100
38	100	100	100	100	100	100	100	100
39	100	100	100	100	100	100	100	100
40	100	100	100	100	100	100	100	100
41	100	100	100	100	100	100	100	100
42	100	100	100	100	100	100	100	100
43	100	100	100	100	100	100	100	100
44	100	100	100	100	100	100	100	100
45	100	100	100	100	100	100	100	100
46	100	100	100	100	100	100	100	100
47	100	100	100	100	100	100	100	100
48	100	100	100	100	100	100	100	100
49	100	100	100	100	100	100	100	100
50	100	100	100	100	100	100	100	100
51	100	100	100	100	100	100	100	100
52	100	100	100	100	100	100	100	100
53	100	100	100	100	100	100	100	100
54	100	100	100	100	100	100	100	100
55	100	100	100	100	100	100	100	100
56	100	100	100	100	100	100	100	100
57	100	100	100	100	100	100	100	100
58	100	100	100	100	100	100	100	100
59	100	100	100	100	100	100	100	100
60	100	100	100	100	100	100	100	100

의 유전자검사기관 신고확인증 (포스보텍, 질병관리청발령)

제 394 호

### 유전자검사기관 신고확인증

- 기 관 명 : (주)포스보텍
- 소 계 지 : 대전광역시 동성구 동성대로 794
- 기관장 성명 : 이 영 준
- 신고유형

1. 질병의 진단 및 치료를 위한 유전자검사

「생물윤리 및 안전에 관한 법률」 제48조 및 같은 법 시행규칙 제45조제4항에 따라 위와 같이 유전자검사기관으로 신고하였음을 증명합니다.

2022년 2월 23일

질병관리청



### 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

#### 1) 연구수행 결과

##### (1) 정성적 연구개발성과

##### 1. 주관연구기관(경북대학교) 연구개발과제 수행결과

- 툴립, 수선화에서 등 구근 화훼류에서 바이러스 분석 시료 채집
  - 구근 화훼류 진단체계 확립 및 빅데이터 분석시스템 구축을 위하여 다양한 이상증상을 보이는 툴립 85점과 수선화 75점을 채집하였음.
  - 분석 시료를 기반으로 이상 증상 및 바이러스 병징관련 육안적 특성 정보를 파악하였음.
- RT-PCR 기반 구근 화훼류 바이러스의 탐색 및 동정
  - 채집한 시료의 바이러스를 진단하기 위하여 국내외 툴립과 수선화에 보고된 바이러스 목록을 작성하였으며, 이를 바탕으로 작물별 진단 대상 바이러스의 진단법을 확보하였음.
  - 기존 연구를 통하여 확보된 진단법 및 본 연구를 위하여 설계한 종 특이적 진단법을 확보하였음.
  - 검역병해충으로 지정된 바이러스의 경우 농림축산검역본부에서 고시한 진단법을 확보하였음.
  - 툴립 20종 : BYMV, CIYMV, CMV, LMoV, LSV, OLV-1, PLCV, ReTBV, TMV, TBV, TMMMV, TuIMV, TVX, TuMV, ArMV, TNV, TRV, TRSV, TBRV, TBSV.
  - 수선화 23종 : BYMV, BBWV, CLV, CMV, CEVA, LMoV, NCLV, NDV, NLSYV, NLV, NMV, NYSV, NeLV, OYDV, OrMV, ArMV, RpRSV, SLRSV, TNV, TRV, TRSV, TBRV ToRSV.
  - 채집한 툴립 시료 86점 중 67점에서 3종의 바이러스(LSV, TBV, TVX)가 검출되었음.
  - 수선화는 채집 시료 75점 모두 바이러스가 검출되었으며, 검출된 바이러스는 7종(CEVA, NLSYV, NLV, NMV, NYSV, NeLV, SVY)임.
  - 국내 검역병해충으로 지정된 바이러스는 검출되지 않음.
- 전사체 분석을 통하여 바이러스 탐색 및 동정
  - RT-PCR 기반 검정에서 예측할 수 없는 바이러스를 탐색하기 위하여 차세대염기서열분석법(Next generation sequencing, NGS) 기반 메타전사체 분석을 수행하였음
  - 툴립에서는 기존 RT-PCR 진단으로 검출된 3종을 포함하여 메타전사체 분석으로 새롭게 1종 (*Olive mild mosaic virus*, OMMV)의 바이러스 관련 contig가 탐색 되었음.
  - 수선화에서는 기존 RT-PCR 진단으로 검출된 7종을 포함하여 메타전사체 분석으로 새롭게 3종의 바이러스(*Snowdrop virus Y*, SVY; *Japanses iris necrotic ring virus*, JINRV, *Turinp yellows virus*, TuYV)가 탐색 되었음.
  - 메타전사체를 통하여 새롭게 탐색 된 바이러스 contig와 NCBI Genebank에 기보고된 염기서열을 기반으로 종 특이적 프라이머를 설계하여 RT-PCR 분석을 수행하였으며, 염기서열 분석 및 동정을 수행하였음.
- 툴립 바이러스의 발생실태 조사
  - RT-PCR 진단 및 메타전사체 분석 결과를 기반으로 검출된 바이러스를 대상으로 채집한 툴립의 개별 시료 86점에 대하여 RT-PCR 진단을 수행하였음.
  - 채집한 구근 화훼류 시료의 RT-PCR 진단 결과를 기반으로 바이러스 발생 양상을 분석하였음.
  - 작물별 바이러스의 발생 양상과 생태적 영향 등을 고려하여 툴립과 수선화에 발생하는 주요 바이러스를 선정하였음.
  - 툴립에서 검출된 바이러스는 LSV, TBV, TVX, 및 OMMV 4종이며, OMMV와 TBV의 검출률이 30.2%이고 LSV는 17.4%, TVX는 15.1%로 나타남.
  - LSV를 제외한 TBV, TVX, OMMV는 본 과제 수행을 통하여 국내에 처음으로 보고되는 바이러스임.

- OMMV는 LSV, TBV와 복합감염 되었을 때 튨립의 생육을 매우 불량하게 함.
- 튨립에 주요 바이러스는 LSV, TBV, TVX 및 OMMV 4종으로 판단됨.

○ 수선화 바이러스의 발생실태 조사

- RT-PCR 진단 및 메타전사체 분석 결과를 기반으로 검출된 바이러스를 대상으로 채집한 수선화의 개별 시료 75점에 대하여 RT-PCR 진단을 수행하였음.
- 수선화 바이러스는 10종이 검출되었으며 검출률은 NeLV가 100%로 모든 수선화에서 검출되었으며, 다음으로 NLSYV(97.3%), NLV(52%), NYSV(32%), JINRV(29.3%), NMV(18.7%), TRV(14.7%), TuYV(14.7%), SVY(13.3%), CEVA(1.3%) 순으로 바이러스가 검출되었음.
- 모든 수선화 시료에서 최소 2종 이상의 바이러스가 검출되었으며, 다수의 바이러스가 복합감염의 형태로 수선화의 생육을 불량하게 함.
- NLSYV, NLV, NYSV, 및 NeLV 4종은 모든 지역에서 검출되었으며 높은 검출률을 나타냄.
- CEVA, JINRV, 및 SVY는 본 과제 수행을 통하여 국내에 처음으로 보고되는 바이러스임.
- NMV와 NLV는 다른 바이러스와 복합적으로 발생하였을 때 수선화의 생육을 불량하게 하는 것으로 판단됨.
- 수선화에 주요 바이러스는 NLSYV, NLV, NYSV, 및 NeLV로 판단됨.

○ 구근 화훼류 바이러스 유전자 개별진단법 개발

- RT-PCR 및 메타전사체 분석을 통하여 튨립과 수선화에 총 14종의 바이러스가 검출되었으며, 각각의 바이러스를 동정하고 유전자 개별진단법을 개발하였음.
- 튨립에 발생하는 바이러스 4종에 대한 개별 유전자진단법을 설계하였음.
  - *Lily symptomless virus*(LSV)
  - *Tulip breaking virus*(TBV)
  - *Tulip virus X*(TVX)
  - *Olive mild mosaic virus*(OMMV)
- 수선화에 발생하는 바이러스 9종에 대한 개별 유전자진단법을 설계하였음.
  - *Cyrtanthus elatus virus A*(CEVA)
  - *Narcissus late season yellows virus*(NLSYV)
  - *Narcissus latent virus*(NLV)
  - *Narcissus yellow stripe virus*(NYSV)
  - *Narcissus mosaic virus*(NMV)
  - *Nerine latent virus*(NeLV)
  - Snowdrop virus Y(SVY)
  - *Japanese iris necrotic ring virus*(JINRV)
  - *Turnip yellows virus*(TuYV)

○ 튨립 및 수선화 바이러스 다중진단법 개발

- 튨립 바이러스 4종의 유전자 개별진단법 조합을 이용하여 유전자 다중진단법을 개발하고 특허로 출원하였음(출원번호: 10-2023-0071420).

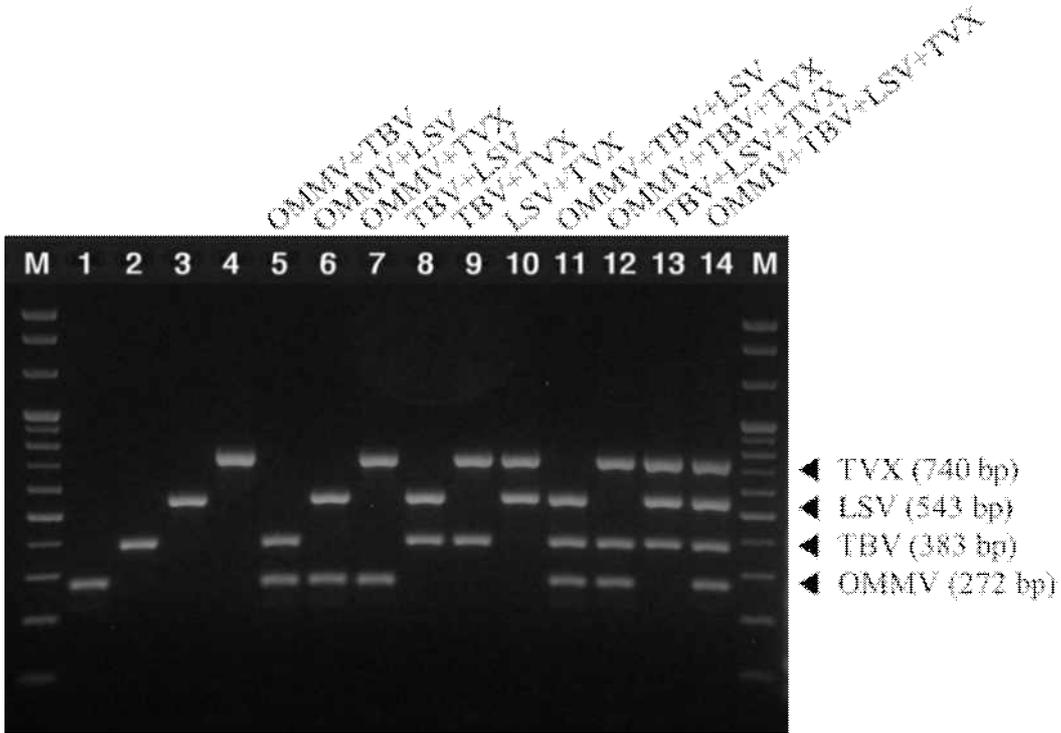


그림 1. 튨립에 발생하는 바이러스 4종의 다중 진단용 조성물 및 이의 이용(Composition for multiple detection of four viruses infecting Daffodil and its use)

- 수선화 바이러스 4종의 유전자 개별진단법 조합을 이용하여 유전자 다중진단법을 개발하였음(출원번호: 10-2022-0159131).

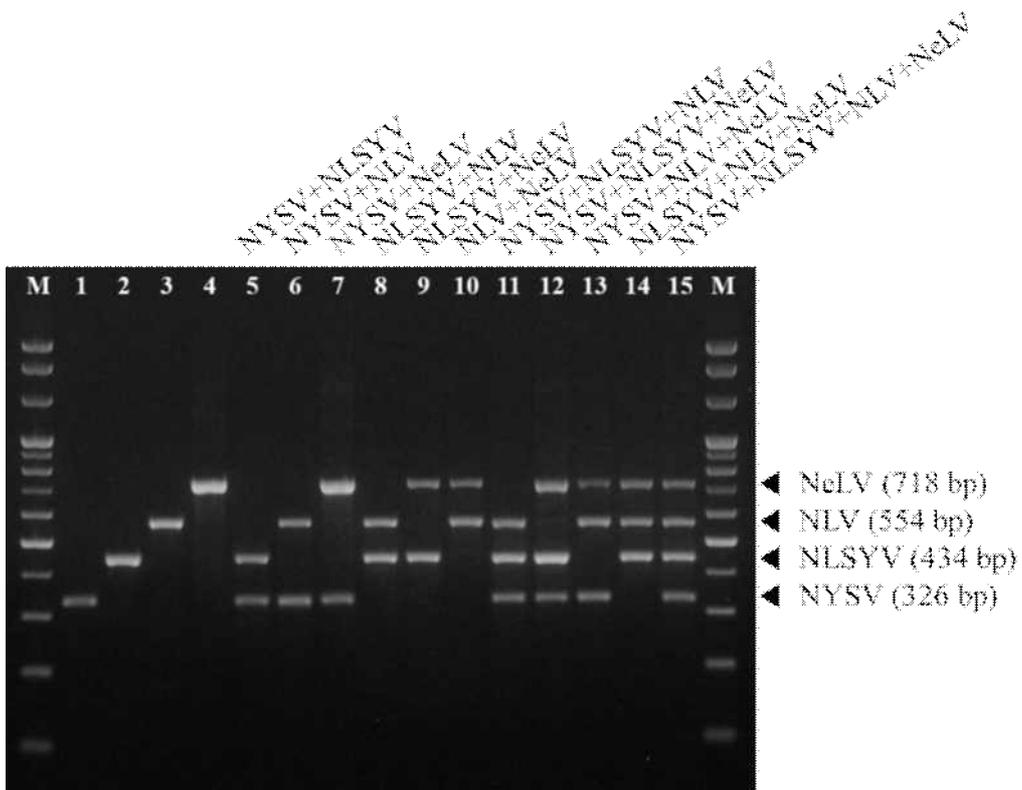


그림 2. 수선화에 발생하는 바이러스 4종의 다중 진단용 조성물 및 이의 이용(Composition for multiple detection of four viruses infecting Daffodil and its use)

○ 구근 화훼류 진단체계 확립을 위한 채집방법 표준화

- 채집 방법의 표준화를 위하여 틀립 및 수선화 구근을 격리온실에 재배하여 조직별 및 시기별로 분석 시료를 확보하였음.
- 바이러스가 감염된 구근 화훼류의 조직별(구근, 잎, 꽃) 및 시기별(생육 초기, 중기, 후기)로 분석 시료를 채집하여 바이러스 RT-PCR 진단 및 qRT-PCR 진단을 수행하였음.
- RT-PCR 및 qRT-PCR 분석 결과에 따르면 구근 화훼류에서 발생하는 바이러스는 대부분 생육 초기에 잎에서 가장 높은 농도로 검출되었음.
- 바이러스에 감염된 구근 화훼류 시료에서는 바이러스 농도의 차이는 있으나 조직 및 시기에 상관없이 바이러스가 검출됨을 확인함.
- 다양한 핵산추출 키트를 사용하여 구근 화훼류에서 효율적인 RNA 추출 방식을 조사하였음.
- 식물에서 RNA를 추출할 때 흔히 사용되는 phenol 및 trizol을 등의 다양한 방법을 이용하여 효율적인 RNA 추출 방식을 조사하였음.
- Phenol을 이용하여 RNA 추출 시 구근 화훼류에서 효과적으로 RNA를 추출할 수 있음.
- Phenol을 사용하여 추출한 RNA에서는 구근 화훼류 조직에 상관없이 바이러스의 검출이 가능하였음.
- 조직별 및 시기별로 바이러스의 검출 양상을 보았을 때 진단 환경 및 목적에 따라 구근 화훼류 시료를 채집하고 진단을 수행하여야 할 것으로 판단됨.
- 영양 생식을 하는 구근 화훼류의 특성상 구근 조직에서 바이러스의 진단을 수행하는 것이 중요할 것으로 판단됨.

○ 현장현시 진단(POC)을 위한 신속 및 정밀 진단기술 개발

- Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification(RT-LAMP) 진단법을 이용한 현장 진단법 개발하였음.
- RT-LAMP 진단법은 현장에서 바이러스가 감염된 시료의 즙액을 이용하여 바이러스 감염 여부를 확인할 수 있으며, 기존의 RT-PCR 진단과 상대적으로 인력과 시간, 장소의 제한을 적게 받으며 효율적인 증폭과 높은 특수성, 신속성, 간편성의 특징을 가짐.
- 개발한 RT-LAMP 진단법은 틀립 바이러스 4종(LSV, TBV, TVX, OMMV)과 수선화 바이러스 2종(NLSYV, NLV)을 30분 내외에 효과적으로 진단할 수 있음.

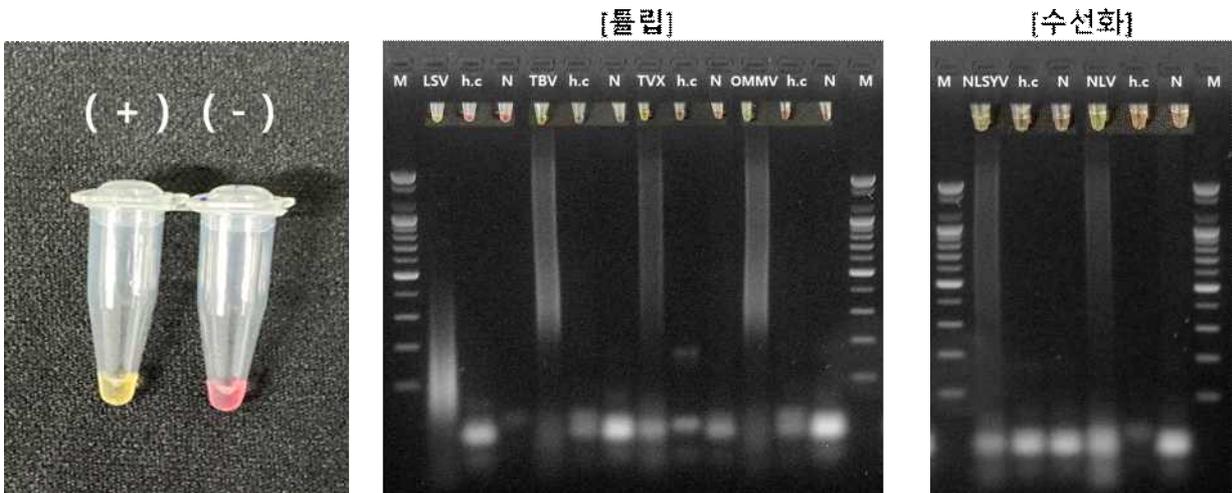


그림 3. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification(RT-LAMP) 진단법을 이용한 틀립 및 수선화 바이러스 현장 진단법 개발

## 2. 제1공동 연구기관(강원대학교) 연구개발과제 수행결과

- 백합, 글라디올러스 등 구근 화훼류에서 바이러스 분석 시료 채집
  - 구근 화훼류 진단체계 확립 및 빅데이터 분석시스템 구축을 위하여 다양한 이상증상을 보이는 백합 53점과 글라디올러스 99점을 채집하였음.
  - 확보한 분석 시료를 기반으로 이상 증상 및 바이러스 병징관련 육안적 특성 정보를 파악하였음.
  
- RT-PCR 기반 구근 화훼류 바이러스의 탐색 및 동정
  - 채집한 시료의 바이러스를 진단하기 위하여 국내외 백합 및 글라디올러스에 보고된 바이러스 목록을 작성하였으며, 이를 바탕으로 작물별 진단 대상 바이러스의 진단법을 확보하였음.
  - 기존 연구를 통하여 확보된 진단법과 본 연구를 위하여 종 특이적으로 설계된 진단법을 확보하였음.
  - 검역병해충으로 지정된 바이러스의 경우 농림축산검역본부에서 고시한 진단법을 확보하였음.
  - 백합 바이러스 22종 : CMV, LMoV, LSV, PIAMV, ArMV, CLLV, NMV, TRV, TSWV, ATNVA, SLRSV, ASGV, TRSV, TuMV, BBWV, IYSV, SYSV, ReTBV, LVX, TBV, ZaMMV.
  - 글라디올러스 바이러스 21종 : CMV, LMoV, LSV, PIAMV, ArMV, CLLV, TRV, BCMV, CIYVV, CNSV, INSV, OrMV, TBRV, TNVA, BYMV, TSV, TRSV, ToRSV, TMV, TSWV, BBWV, TAV.
  - 진단 결과, 백합은 5종의 바이러스(LMoV, CMV, LSV, PIAMV, TNVA)가 검출되었으며, 글라디올러스는 7종 바이러스(BYMV, LMoV, CMV, TSV, BBWV2, TMV, BCMV)가 검출되었음.
  
- 전사체 분석을 통하여 바이러스 탐색 및 동정
  - RT-PCR 기반 검정에서 예측할 수 없는 바이러스를 탐색하기 위하여 차세대염기서열분석법(Next Generation Sequencing, NGS) 기반 메타전사체 분석을 수행하였음
  - 메타전사체를 통하여 탐색된 바이러스 contig를 기반으로 종 특이적 프라이머를 설계하여 RT-PCR 분석을 수행하고 염기서열 분석 및 동정을 수행하였음.
  
- 백합, 글라디올러스 구근 화훼류 바이러스 발생실태 조사
  - 전국적으로 채집한 구근 화훼류 시료의 RT-PCR 진단 결과를 기반으로 바이러스 발생 양상을 분석하였음.
  - 작물별 바이러스의 발생 양상과 생태적 영향 등을 고려하여 백합과 글라디올러스에 발생하는 주요 바이러스를 선정하였음.
  - 백합에 발생하는 주요 바이러스 : Cucumber mosaic virus(CMV), Lily mottle virus(LMoV), Plantago asiatica mosaic virus(PIAMV).
  - 글라디올러스에 발생하는 주요 바이러스 : Bean yellow mosaic virus(BYMV), Cucumber mosaic virus(CMV), Lily mottle virus(LMoV).

○ 글라디올러스 바이러스 다중진단법 개발

- 글라디올러스 바이러스 4종의 유전자 개별진단법 조합을 이용하여 유전자 다중진단법을 개발하고 특허로 출원하였음(출원 번호: 10-2023-0155099).

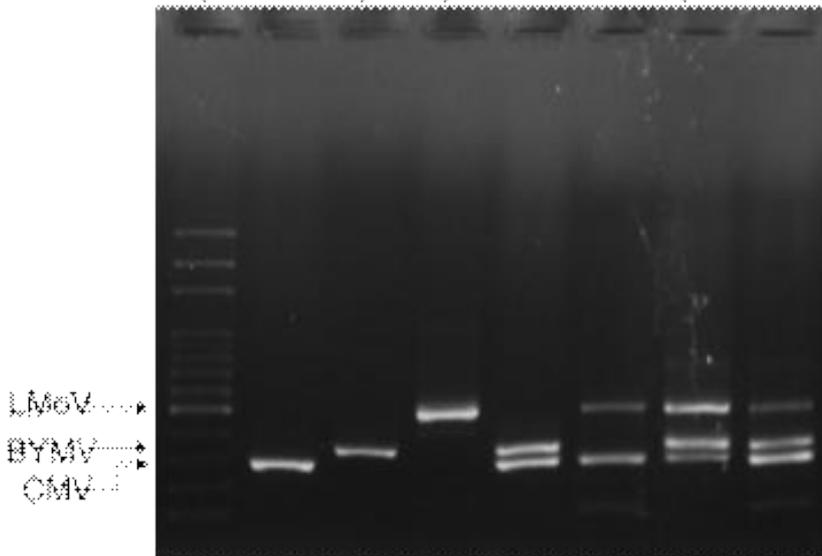


그림 4. 글라디올러스 감염 바이러스의 다중 진단용 프라이머 및 이의 용도(Primers for multiplex diagnosis of gladiolus infection virus and use).

○ 구근 화훼류 진단체계 확립을 위한 채집방법 표준화

- 채집 방법의 표준화를 위하여 튜립 및 수선화 구근을 격리온실에 재배하여 조직별 및 시기별로 분석 시료를 확보하였음.
- 바이러스가 감염된 구근 화훼류의 조직별(구근, 잎, 꽃) 및 시기별(생육 초기, 중기, 후기)로 분석 시료를 채집하여 바이러스 RT-PCR 진단 및 qRT-PCR 진단을 수행하였음.
- RT-PCR 및 qRT-PCR 분석 결과에 따르면 구근 화훼류에서 발생하는 바이러스는 대부분 생육 초기에 잎에서 가장 높은 농도로 검출되었음.
- 바이러스에 감염된 구근 화훼류 시료에서는 바이러스 농도의 차이는 있으나 조직 및 시기에 상관없이 바이러스가 검출됨을 확인함.
- 다양한 핵산추출 키트를 사용하여 구근 화훼류에서 효율적인 RNA 추출 방식을 조사하였음.
- 식물에서 RNA를 추출할 때 흔히 사용되는 phenol 및 trizol을 등의 다양한 방법을 이용하여 효율적인 RNA 추출 방식을 조사하였음.
- Phenol을 이용하여 RNA 추출 시 구근 화훼류에서 효과적으로 RNA를 추출할 수 있음.
- Phenol을 사용하여 추출한 RNA에서는 구근 화훼류 조직에 상관없이 바이러스의 검출이 가능하였음.

○ 현장현시 진단(POC)을 위한 신속 및 정밀 진단기술 개발

- Recombinase polymerase amplification with lateral flow dipstick (RPA-LFD) 방법을 이용한 현장 진단법을 개발하였음.
- RPA-LFD는 40도의 온도로 약 15분간 정치한 뒤, 스트립을 반응시키면 즉시 바이러스의 감염을 진단할 수 있어 매우 빠르고, Taqman probe 기법을 사용하기에 매우 정밀하게 바이러스를 진단할 수 있음.
- 제작된 RPA-LFD 용 프라이머를 사용하여 바이러스를 검정하였을 때, 백합과 글라디올러스에서 모든 바이러스가 검정되는 것을 확인하였음.

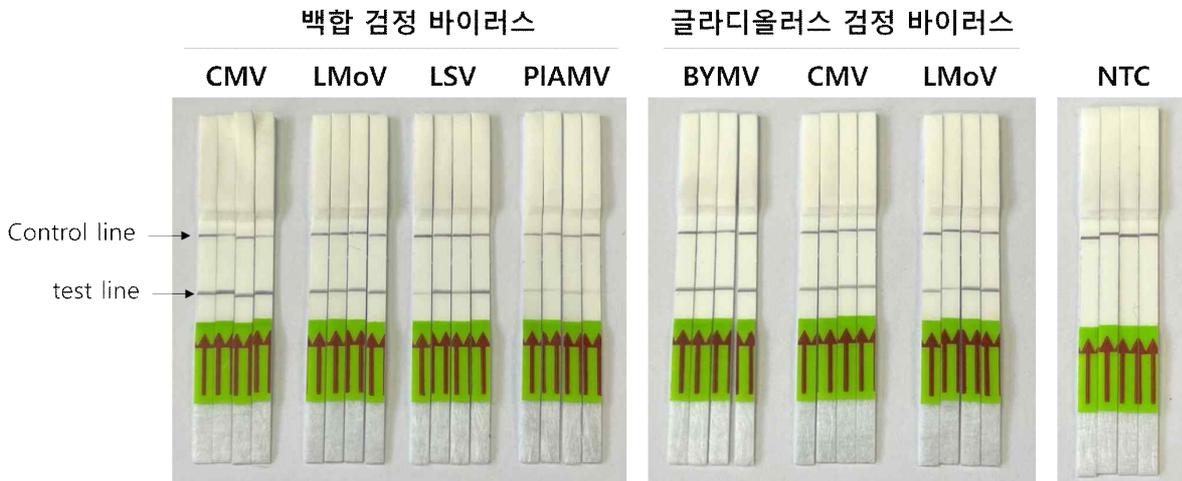


그림 5. Recombinase polymerase amplification with lateral flow dipstick(RPA-LFD) 방법을 이용한 백합 및 글라디올러스 바이러스 현장 진단법을 개발

### 3. 제2공동 연구기관(씨더스 농업회사법인) 연구개발과제 수행결과

- 백합, 글라디올러스 등 구근화훼류 작물에 최적화된 분석 파이프라인 알고리즘 개발
  - 바이러스 서열을 확보를 위한 파이프라인은 Sequencing reads의 pre-processing 단계, Filtering plant sequences 단계, de novo Transcriptome assembly 단계, 식물 contig 서열 filtering 단계, 바이러스 contig 서열 검출 및 annotation 단계로 구성했으며, 감염된 구근화훼류 식물체 내 바이러스 서열의 비율을 측정함으로써 우점 종을 확인하고 복합감염의 경우 바이러스 종류 및 감염 양상에 대해 판단할 수 있음.
- NGS를 통한 백합, 글라디올러스 발생 바이러스 전사체 분석 및 동정
  - 글라디올러스, 백합 2품종 3개체에 대하여 최적화된 RNA 분석 파이프라인으로 분석한 결과, 글라디올러스는 95종의 바이러스에 감염되었음.
  - 이 외에도 다양한 바이러스가 감염되어 있는 것을 확인함으로써, 해당 파이프라인 적용이 향후 구근화훼류 뿐만 아니라 식물체와 연관된 바이러스를 동정하고, 정밀진단 및 현장신속 진단으로 연결되는 통합 관리 시스템 개발에 기여할 수 있음을 보여줌.
- 웹 기반의 DATA BASE 설계 및 개발
  - 재배현장과 재배농가로부터 확보한 구근화훼류 4종의 3,908장의 이미지 데이터와 일반식물 6,320장의 데이터를 누적하여 총 10,228장의 누적데이터 셋을 확보함.
  - 구근화훼류 4종은 1종당 최소 700장 이상의 데이터가 확보되었으며, 일반 식물의 경우 316종의 식물에 대해 20장씩 데이터를 확보하여 높은 다양성일 가진 광범위한 데이터베이스 구축에 활용함.
  - 구축한 10,228장의 데이터 셋을 기반으로 구현한 웹 기반 데이터베이스 (<http://fvirus.seeders.co.kr>)는 사용자 편의성을 고려하여 메인페이지, 병징 별 이미지 검색 기능, 병질 별 대표사진 구현, 바이러스 상세정보 페이지를 제공함. 이를 통해 질병 진단, 모니터링, 감염 패턴 분석과 같은 실용적 연구 분야에서 기초 자료로 활용할 수 있음.

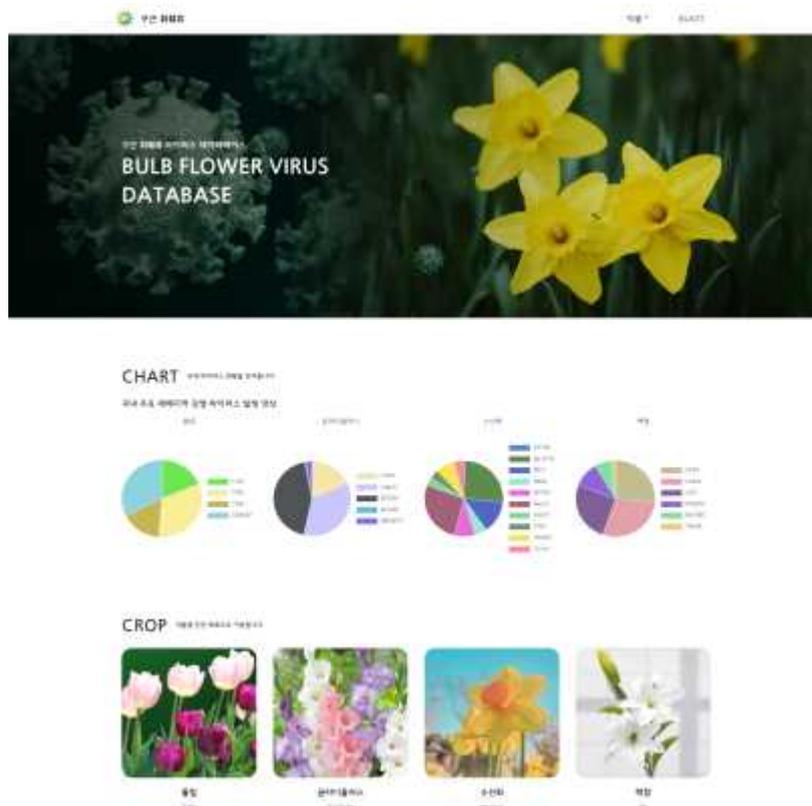


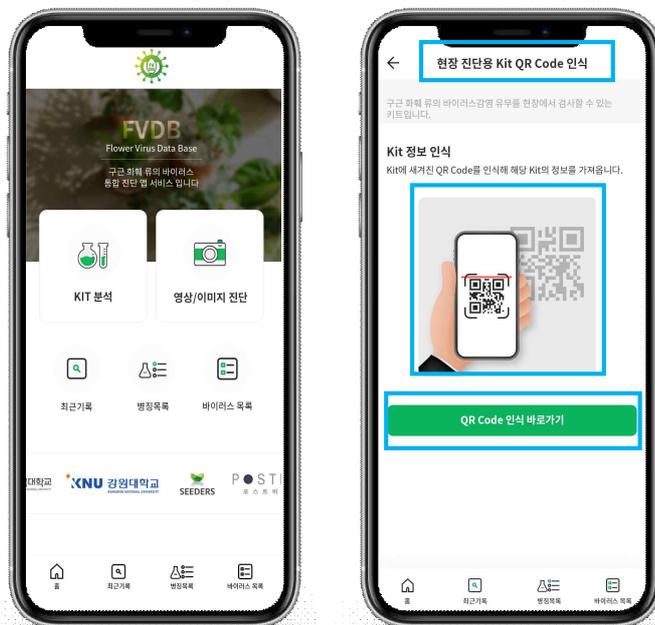
그림 6. 구근화훼류 바이러스 현장진단을 지원하는 웹 페이지 구현 구근화훼류에서 발생하는 바이러스를 현장에서 최대한 빠르게 확인하고 관련된 데이터를 수집, 보관, 관리하기 위해서 활용할 수 있는 웹 페이지를 구축함.

○ 현장 AI 진단 모듈 개발

- 구근화훼류 4종(튤립, 수선화, 백합, 글라디올러스)의 이미지 구분을 위해 웹DB에 구축한 누적 데이터셋 10,228장을 전이학습 기법과 사전 학습된 MobileNet 모델을 사용한 CNN 기반의 이미지 진단 모델에 활용함.
- 이미지 진단 모델 학습에서 8,182장의 데이터가 분류 모델 학습에 사용되었으며, 2,046장의 데이터가 모델 평가에 사용되었음. 에포크는 50, 배치크기 64, 학습률 0.0005를 적용하여 정확도 0.9098, 손실률 0.2586의 결과를 얻고 총 12개의 병징을 구분할 수 있는 모델을 구축함.
- 학습된 모델을 웹과 앱의 통합 관리시스템과 연동하여, 실시간 이미지 분석과 진단을 가능하게 함. 사용자는 현장에서 촬영한 이미지를 앱을 통해 업로드하면, 인공지능모델이 분석을 하고 관련된 정보와 조치 방법을 제공하고, 웹DB에 데이터가 누적되어 향후 연구분석에 활용할 수 있는 지식 통합 워크플로우를 생성함.
- 주관기관 및 제1공동 연구기관에서 제공한 이미지 영상을 기반으로 구근 화훼류의 작기에 따라 발생하는 주요 바이러스 병징 이미지를 확보하였음.
- 구근 화훼류 4종(튤립, 수선화, 백합, 글라디올러스)의 이미지 구분을 위하여 여러 종의 식물 이미지를 수집하고 인공지능 훈련을 진행하였음.

○ 현장진단 ICT 앱 개발

- GPS를 이용하여 촬영장소의 위치정보를 추출할 수 있는 기능을 구현하였음.
- 스마트폰에 설치된 카메라 설정값을 조정할 수 있는 제어 기능을 검토하고 있음.
- 현장진단 키트를 사용하여 수행한 바이러스 진단 결과를 저장 및 전송할 수 있는 QR 코드 인식기를 개발하였음.
- 구근화훼류에 발생하는 바이러스 통합 진단을 위한 데이터 관리를 위해 현장과 실험실의 유기적 연결하는 맞춤형 웹을 제작함. 수집한 데이터셋을 통합적으로 관리하고 검색할 수 있는 기능을 구현하고 BLAST와 NGS 분석 결과를 제공하여 유전체 분석과 결과와 하나의 웹에 통합함.
- 현장에서 구근화훼류에 대한 바이러스를 진단하고 확보한 데이터를 웹과 연동하여 데이터베이스에 실시간으로 통합하기 위한 현장진단용 앱을 제작함. 휴대폰 내장카메라, GPS 위치정보, QR코드를 통한 KIT 정보 입력 기능을 제공함으로써 데이터 분석의 편리성과 휴대성을 제공함.
- ICT기술을 접목한 웹과 앱의 통합 시스템 구축은 구근화훼류 바이러스의 특성과 확산 패턴을 더 정밀하게 모니터링하고 분석할 수 있도록 도움. 또한 해당 시스템은 다른 식물 병원체의 진단 및 관리에도 적용될 수 있어, 농업 분야 전반의 생산성과 효율성을 향상시키는데 원천 기술의 역할을 할 것으로 기대됨.



**그림 7. 스마트폰용 APP 개발.** 현장에서 구근 화훼류에 대한 바이러스를 진단하고 확보한 데이터를 웹 DB와 연동하여 실시간으로 통합하기 위한 현장진단용 앱을 제작함.

#### 4. 제3공동 연구기관(포스트바이오) 연구개발과제 수행결과

- 국내 구근 화훼류 작물에 발생하는 주요 바이러스 선정
  - 톨립에 발생하는 주요 바이러스 : LSV, TBV, OMMV
  - 수선화에 발생하는 주요 바이러스: NLSYV, NLV, NYSV, NeLV,
  - 백합에 발생하는 주요 바이러스: CMV, LMoV, PIAMV
  - 글라디올러스에 발생하는 주요 바이러스: BYMV, CMV, LMoV
  
- 구근 화훼류 바이러스 항원 및 특이항체 생산
  - 클로닝 벡터 시스템을 통하여 3종 바이러스(CMV, LMoV, PIAMV)의 특이항체를 확보함.
  - 표적 바이러스 항원을 3-4회 마우스에 주입하여 면역 후 클로닝과정을 거쳐 항원 특이항체를 선별하였음.
  - 바이러스 항원을 토끼에 4회 이상 주입하여 생성된 항원특이 항체를 원심분리과정을 통해 항혈로 제작하였음.
  - 구근 화훼류 바이러스 다중진단법 개발을 위해서 1차년도에 각 바이러스에 대해 특이적으로 반응하는 프라이머-프로브셋을 기초로 3종의 구근류에 대해서 Duplex 또는 Triplex의 다중 진단법을 확립하였음
  
- 목표 바이러스 특이 프라이머-프로브(Taqman) 개발
  - 주관 및 제1공동연구기관으로부터 제공받은 식물바이러스 시료에 특이적으로 반응하는 프라이머-프로브(Taqman) 셋트를 바이러스당 2세트 이상 설계함.
  - 설계된 프라이머-프로브 셋트 후보를 양성 및 음성 시료를 이용하여 유효성 평가를 수행함.
  - 유효성 평가 결과를 바탕으로 민감도가 가장 높은 진단용 프라이머-프로브 셋트를 선정하였음
  - 구근 화훼류 바이러스 다중진단법의 임상적인 성능검증을 위해 주관 및 제1 공동연구기관으로부터 제공된 양성 및 음성 시료에 대해 반응성을 확인하여 성능을 검증함.
  - qRT-PCR 기반의 구근 화훼류 바이러스 9종의 진단법 개발을 위한 프라이머-프로브 셋트를 설계하였음.

○ 바이러스 특이 염기서열에 반응하는 고감도 분자진단법 기반 다중 유전자진단법(multiplex qPCR) 개발

- qRT-PCR 기반의 구근 화훼류 바이러스 multiplex 조건 최적화 과정(2-3 targets/reaction)을 수행하였음.
- 1-2세부과제의 각 구근화훼류에서의 각 바이러스의 발생빈도 및 검출의 중요성 등을 고려하여 최종적으로 실험실에서 사용할 수 있는 Triplex qPCR Kit와 현장에서 사용할 수 있는 Triplex qPCR키트를 구성하였음.
- 각 구근화훼류별 주요 3종의 바이러스와 실험의 검증을 위해 추가된 Internal Control의 구성은 다음과 같음.
- qRT-PCR 기반 실험실 진단용 다중 유전자진법 개발(제품화)

No.	사업화형태	사업화명	제품명	업체명	진단 바이러스
1	제품화	수선화 바이러스 현장용 동시 진단키트	POBGENTM XQ Narcissus Virus Detection Kit	(주) 포스트바이오	LSV, TVX, OMMV
2	제품화	튤립 바이러스 현장용 동시 진단키트	POBGENTM XQ Tulip Virus Detection Kit	(주) 포스트바이오	NYSV, NMV, TRV
3	제품화	백합 바이러스 현장용 동시 진단키트	POBGENTM XQ Lily Virus Detection Kit	(주) 포스트바이오	CMV, LSV, LMoV



[POBGEN Tulip virus Detection Kit] [POBGEN Narcissus virus Detection Kit] [POBGEN Lily virus Detection Kit]

- 이동형 qRT-PCR 장비를 이용한 현장 진단용 개발(제품화)
- 개발한 현장 진단법은 외부인증기관인 (주) 코스모진텍에 시험의뢰하였으며, 민감도 및 특이도가 90% 이상으로 나타남.

No.	구분	사업화명	제품명	업체명	진단 바이러스
1	제품화	수선화 바이러스 실험실용 동시 진단키트	POBGENTM Narcissus Virus Detection Kit	(주) 포스트바이오	LSV, TVX, OMMV
2	제품화	튤립 바이러스 실험실용 동시 진단키트	POBGENTM Tulip Virus Detection Kit	(주) 포스트바이오	NYSV, NMV, TRV
3	제품화	백합 바이러스 실험실용 동시 진단키트	POBGENTM Lily Virus Detection Kit	(주) 포스트바이오	CMV, LSV, LMoV



[POBGEN XQ Tulip virus Detection Kit] [POBGEN XQ Narcissus virus Detection Kit] [POBGEN XQ Lily virus Detection Kit]

○ 바이러스 다중진단법 확립 및 임상적 검증 (2차년도)

- 총 3년간 구근 화훼류에서 주요하게 문제가 될 수 있는 바이러스에 대한 다중진단키트를 6종(실험실 진단키트 3종 및 현장진단용 진단키트 3종)을 개발하였으며 경북대학교와 강원대학교 과제의 수행을 통해 확보한 구근 화훼류 중 각 바이러스에 대한 양성과 음성 시료(각 50 시료)를 이용하여 진단키트에 대한 임상적 민감도, 특이도 등에 대한 성능을 검증하였음.
- 더불어 현장진단용 진단키트 3종은 유전자 분석기관인 (주) 코스모진텍에 의뢰하여 임상적인 평가를 수행한 결과, 모두 90% 이상의 민감도를 보였음.

5. 구근 화훼류에 발생하는 바이러스 통합 진단시스템 구축

○ 튨립 바이러스의 통합 진단체계 구축

- [최적 진단 시기 및 조직] 튨립 바이러스는 생육 초기의 잎에서 진단하는 것이 효과적이나, 본 연구개발과제에서 개발한 다양한 진단 기술을 활용하여 진단 목적 및 환경에 따라 적절히 바이러스 진단을 수행할 것을 권장함.
- [주요 진단 대상 바이러스] 튨립 주요 바이러스 4종(LSV, TBV, TVX, 및 OMMV)을 대상으로 우선적으로 진단해야 할 것으로 판단되며, 특히 OMMV는 다른 바이러스와 복합감염 되었을 때 튨립의 생육을 크게 불량하게 함.
- [현장 진단] 현장에서 바이러스 감염이 의심되는 튨립 시료는 이동형 qPCR 장치 기반 다중진단 키트 및 RT-LAMP 진단법을 이용하여 현장에서 바이러스의 감염을 정성 혹은 정량적으로 확인할 수 있음. 또한 개발한 스마트폰 APP에서 제공하는 튨립 바이러스 병징 데이터를 이용하여 현장에서 튨립에 나타난 이상 증상과 비교하고, 분석 결과를 웹 기반 데이터베이스에 저장할 수 있음.
- [실험실 진단] 개발한 RT-PCR 및 qRT-PCR 기반 유전자진단법을 이용하여 실험실에서 정밀 진단을 수행할 수 있으며, 웹 기반 데이터베이스에 진단 및 동정 결과를 웹 기반 데이터베이스에 저장할 수 있음. 또한, 국내외로 보고된 튨립 바이러스 20종의 유전자진단법을 확보하였기에 튨립 주요 바이러스를 포함하여 다양한 바이러스를 진단할 수 있음.
- [Big data 구축] 웹페이지 및 스마트폰 APP을 이용하여 현장 및 실험실에서 검출된 바이러스에 대한 데이터를 지속해서 저장할 수 있음. 현장과 실험실의 유기적 연결을 통하여 사용자가 쉽게 접근할 수 있는 ICT 기술을 접목한 바이러스 진단시스템을 구축하였으며, 이를 통하여 현장에서 튨립 바이러스의 간편한 진단을 제공하고 빅데이터 구축의 기반을 마련하였음.

○ 수선화 바이러스의 통합 진단체계 구축

- [진단 시기 및 조직] 수선화 바이러스는 생육 초기의 잎에서 진단하는 것이 효과적이나, 본 연구개발과제에서 개발한 다양한 진단 기술을 활용하여 진단 목적 및 환경에 따라 적절히 바이러스 진단을 수행할 것을 권장함.
- [주요 진단 대상 바이러스] 수선화 바이러스 4종(NLSYV, NLV, NYSV, 및 NeLV)은 복합감염의 형태로 발생하여 수선화의 품질 가치를 저하하기에 우선적으로 진단할 필요가 있음. 본 연구에서 채집한 수선화는 최소 2종 이상의 바이러스에 복합 감염된 것을 확인하였으며 여

러 가지 바이러스의 복합감염 여부를 고려하여야 함.

- [현장 진단] 바이러스 감염이 의심되는 수선화 시료는 이동형 qPCR 장치 기반 다중진단 키트 및 RT-LAMP 진단법을 이용하여 바이러스 감염을 정성 혹은 정량적으로 확인할 수 있음. 또한, 개발한 스마트폰 APP에서 제공하는 수선화 바이러스 병징 데이터를 이용하여 현장 수선화에 나타난 이상 증상과 비교하고 그 분석 결과를 웹 기반 데이터베이스에 저장할 수 있음.
  - [실험실 진단] 개발한 RT-PCR 및 qRT-PCR 기반 유전자진단법을 이용하여 정밀 진단을 수행할 수 있으며, 웹 기반 데이터베이스에 진단 및 동정 결과를 웹 기반 데이터베이스에 저장할 수 있음. 국내외로 보고된 수선화 바이러스 23종의 유전자진단법을 확보하였기에 수선화 주요 바이러스를 포함하여 다양한 바이러스를 진단할 수 있음.
  - [Big data 구축] 웹페이지 및 스마트폰 APP을 이용하여 현장 및 실험실에서 검출된 바이러스에 대한 데이터를 지속해서 저장할 수 있음. 현장과 실험실의 유기적 연결을 통한 사용자가 쉽게 접근할 수 있는 ICT 기술을 접목한 바이러스 진단시스템을 구축하였으며, 이를 통하여 현장에서 수선화 바이러스의 간편한 진단을 제공하고 빅데이터 구축의 기반을 마련하였음.
- 백합 바이러스의 통합 진단체계 구축
- [진단 시기 및 조직] 백합 바이러스는 생육 초기의 잎에서 진단하는 것이 효과적이거나, 본 연구개발과제에서 개발한 다양한 진단 기술을 활용하여 진단 목적 및 환경에 따라 적절히 바이러스 진단을 수행할 것을 권장함.
  - [주요 진단 대상 바이러스] 백합 주요 바이러스 4종(CMV, LMoV, LSV, PIAMV)을 대상으로 우선 진단해야 할 것으로 판단되며 바이러스가 복합적으로 감염될수록 백합의 생육을 불량하게 함.
  - [현장 진단] 바이러스 감염이 의심되는 백합 시료는 이동형 qPCR 장치 기반 다중진단 키트 및 RPA-LFD 진단법을 이용하여 현장에서 바이러스 감염 여부를 확인할 수 있음. 또한, 개발한 스마트폰 APP에서 제공하는 백합 바이러스 병징 데이터를 이용하여 현장 수선화에 나타난 이상 증상과 비교하고 그 분석 결과를 웹 기반 데이터베이스에 저장할 수 있음.
  - [실험실 진단] 개발한 RT-PCR 및 qRT-PCR 기반 유전자진단법을 이용하여 실험실에서 정밀 진단을 수행할 수 있으며, 웹 기반 데이터베이스에 진단 및 동정 결과를 웹 기반 데이터베이스에 저장할 수 있음. 국내외로 보고된 백합 바이러스 23종의 유전자진단법을 확보하였기에 백합 주요 바이러스를 포함하여 다양한 바이러스를 진단할 수 있음.
  - [Big data 구축] 웹페이지 및 스마트폰 APP을 이용하여 현장 및 실험실에서 검출된 바이러스에 대한 데이터를 지속해서 저장할 수 있음. 현장과 실험실의 유기적 연결을 통한 사용자가 쉽게 접근할 수 있는 ICT 기술을 접목한 바이러스 진단시스템을 구축하였으며, 이를 통하여 현장에서 백합 바이러스의 간편한 진단을 제공하고 빅데이터 구축의 기반을 마련하였음.
- 글라디올러스 바이러스의 통합 진단체계 구축
- [진단 시기 및 조직] 글라디올러스 바이러스는 생육 초기의 잎에서 진단하는 것이 효과적이거나, 본 연구개발과제에서 개발한 다양한 진단 기술을 활용하여 진단 목적 및 환경에 따라 적절히 바이러스 진단을 수행할 것을 권장함.
  - [주요 진단 대상 바이러스] 글라디올러스의 주요 바이러스는 BYMV, CMV, LMoV로 단일감염뿐 아니라 이중, 삼중으로 다양한 형태로 복합 감염하는 것을 확인함.
  - [현장 진단] 바이러스 감염이 의심되는 글라디올러스 시료는 이동형 qPCR 장치 기반 다중진단 키트 및 RPA-LFD 진단법을 이용하여 현장에서 바이러스 감염 여부를 확인할 수 있음. 또한, 개발한 스마트폰 APP에서 제공하는 백합 바이러스 병징 데이터를 이용하여 현장 글라디올러스에 나타난 이상 증상과 비교하고 그 분석 결과를 웹 기반 데이터베이스에 저장할 수 있음.
  - [실험실 진단] 개발한 RT-PCR 및 qRT-PCR 기반 유전자진단법을 이용하여 실험실에서 정밀 진단을 수행할 수 있으며, 웹 기반 데이터베이스에 진단 및 동정 결과를 웹 기반 데이터베이스에 저장할 수 있음. 국내외로 보고된 백합 바이러스 16종의 유전자진단법을 확보하였기에 글라디올러스 주요 바이러스를 포함한 다양한 바이러스를 진단할 수 있음.
  - [Big data 구축] 웹페이지 및 스마트폰 APP을 이용하여 현장 및 실험실에서 검출된 바이러스

에 대한 데이터를 지속해서 저장할 수 있음. 현장과 실험실의 유기적 연결을 통한 사용자가 쉽게 접근할 수 있는 ICT 기술을 접목한 바이러스 진단시스템을 구축하였으며, 이를 통하여 현장에서 글라디올러스 바이러스의 간편한 진단을 제공하고 빅데이터 구축의 기반을 마련하였음.

(2) 정량적 연구개발성과

성과지표명		연도	1단계	2단계	계	가중치 (%)	
			(2021~2022)	(2023)			
전담기관 등록·기탁 지표	논문	목표(단계별)	1	2	3	-	
		실적(누적)	1	3	4	-	
	특허	목표(단계별)	1	2	3	30	
		실적(누적)	1	2	3	30	
	학술발표	목표(단계별)	2	1	3	10	
		실적(누적)	8	3	11	10	
	생명자원 (생명정보)	목표(단계별)	4	2	6	5	
		실적(누적)	10	3	13	5	
	연구개발과제 특성 반영 지표	기술실시 (이전)	목표(단계별)	0	1	1	10
			실적(누적)	0	1	1	10
사업화 (제품화)		목표(단계별)	0	4	4	20	
		실적(누적)	0	6	6	20	
인력양성		목표(단계별)	1	2	3	10	
		실적(누적)	1	2	3	10	
고용창출		목표(단계별)	4	2	6	10	
		실적(누적)	4	3	7	10	
정책활용		목표(단계별)	1	1	2	5	
		실적(누적)	1	2	3	5	
계		목표(단계별)	14	17	31	100	
		실적(누적)	26	25	51	100	

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	First report of Tulip Virus X infecting tulip (Tulipa gesneriana) in Korea	Plant disease	박상민	-	국내 튤립에서 발생하는 Tulip virus X의 첫 보고	경북대학교	SCIE	2022-06-06	0191-2917	100
2	Report of Olive Mild Mosaic Virus in Imported Tulips (Tulipa gesneriana) in Korea	Plant disease	박상민	-	국내 튤립에서 발생하는 Olive mild mosaic virus의 첫 보고	경북대학교	SCIE	2023-08-23	0191-2917	100
3	First report of cucumber mosaic virus infecting Cryptotania japonica Hassk. In Korea	Journal of Plant Pathology	민경근	105	-	강원대학교	SCIE	2023-08-22	1125-4653	100
4	First report of cucumber mosaic virus infecting lettuce (Lactuca sativa) in South Korea	Journal of Plant Pathology	민경근	105	-	강원대학교	SCIE	2023-05-02	1125-4653	100

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2021 한국원예학회 추계 학술발표회	김민석, 박상민, 김학주, 이흥규, 마기윤 송지건, 이수현	2021-10-21	온라인 학술발표	대한민국
2	2021 한국원예학회 추계 학술발표회	김학주, 박상민 김민석, 이흥규, 마기윤, 송재건, 이수현	2021-10-21	온라인 학술발표	대한민국
3	2021 한국식물병리학회 추계 온라인 국제 학술대회	김학주, 박상민, 김민석, 이흥규, 강동현, 권민아, 주영광, 마기윤, 송재건	2021-11-10	온라인 학술발표	대한민국
4	2021 한국식물병리학회 추계 온라인 국제 학술대회	민동주, 박지수, 박태선, 홍진성	2021-11-10	온라인 학술발표	대한민국
5	2022 한국식물병리학회 춘계 국제 학술대회	민동주, 박지수, 박태선, 홍진성	2022-04-20	변산소노벨	대한민국
6	2022 한국식물병리학회 추계 국제 학술대회	김민석, 박상민, 김학주, 이흥규, 권민아, 정원영, 임태건, 마기윤 송재건, 이수현	2022-10-18	순천대학교	대한민국
7	2022 한국식물병리학회 추계 국제 학술대회	김학주, 박상민, 김민석, 정원영, 이흥규, 김민희, 이수현	2022-10-18	순천대학교	대한민국
8	2022 한국식물병리학회 추계 국제 학술대회	민동주, 박태선, 홍진성	2022-10-18	순천대학교	대한민국
9	2023 한국식물병리학회 추계 국제 학술대회	김민석, 임태건, 박상민, 이흥규, 민진경, 백승빈, 양민주, 이수현	2023-10-17	제주 휘닉스 섬지코지	대한민국
10	2023 한국식물병리학회 추계 국제 학술대회	임태건, 김민석, 박상민, 이흥규, 민진경, 백승빈, 양민주, 이수현	2023-10-17	제주 휘닉스 섬지코지	대한민국
11	2023 한국식물병리학회 추계 국제 학술대회	민동주, 박지수, 박태선, 홍진성	2023-10-17	제주 휘닉스 섬지코지	대한민국

□ 생명자원(생명정보)

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	<i>Nerine latent virus</i> isolate SA59	MZ927427	NCBI GenBank	2021
2	<i>Nerine latent virus</i> isolate YS6	MZ927425	NCBI GenBank	2021
3	<i>Tulip virus X</i> isolate YS24	LC664027	NCBI GenBank	2021
4	<i>Narcissus late season yellows virus</i> isolate YS1	OP716854	NCBI GenBank	2022
5	<i>Narcissus late season yellows virus</i> isolate WJ20	OP716855	NCBI GenBank	2022
6	<i>Cucumber mosaic virus</i> 20-1-1	LC781590	NCBI GenBank	2023
7	<i>Cucumber mosaic virus</i> 20-1-19	LC781591	NCBI GenBank	2023
8	<i>Cucumber mosaic virus</i> KL1	LC781944	NCBI GenBank	2023

□ 생명자원(생물자원)

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	<i>Nerine latent virus</i> isolate SA59	CV211126-4	국립농업과학원	2021
2	<i>Nerine latent virus</i> isolate YS6	CV211126-2	국립농업과학원	2021
3	<i>Tulip virus X</i> isolate YS24	CV211126-17	국립농업과학원	2021
4	<i>Narcissus late season yellows virus</i> isolate YS1	CV221114-04	국립농업과학원	2022
5	<i>Narcissus late season yellows virus</i> isolate WJ20	CV221114-05	국립농업과학원	2022

[기술적 성과]

□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	특허	수선화에 발생하는 바이러스의 다중 진단용 조성물	경북대학교 산학협력단	2022. 11.24.	10-2022-0159131	-	-	-	-	100	기술 이전
2	특허	톨립에 발생하는 바이러스의 다중 진단용 조성물	경북대학교 산학협력단	2023. 06.02.	10-2023-0071420	-	-	-	-	100	-
3	특허	글라디올러스 감염 바이러스의 다중 진단용 프라이머 및 이의 용도	강원대학교 산학협력단		10-2023-0155099	-	-	-	-	100	-

[경제적 성과]

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)			합계	
			2021년	2022년	2023		
1	구근 화훼류 발생 바이러스 통합 진단시스템 개발	(주) 씨더스		1	2	2	5
2	구근 화훼류 발생 바이러스 통합 진단시스템 개발	(주) 포스트바이오		1	0	1	2
합계				2	2	3	7

□ 고용 효과

(씨더스)

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	0
		생산인력	0
	개발 후	연구인력	3 (1차년도1+2차년도2+3차년도2)
		생산인력	0

(포스트바이오)

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	0
		생산인력	0
	개발 후	연구인력	2 (1차년도1+3차년도1)
		생산인력	0

[사회적 성과]

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도
1	제안	수선화에서 국내 미모고바이러스, Nerine latent virus(NeLV)의 발생 보고 및 국내 분포종 취급 건의	농림축산검역본부 위험관리과	2022-03-21
2	제안	수선화에서 국내 미모고바이러스, Narcissus latent virus(NLV)의 검출 보고 및 위험평가 건의	농림축산검역본부 위험관리과	2023-01-27
3	제안	튤립에서 국내 미모고바이러스, Olive mild mosaic virus(OMMV)의 검출 보고 및 위험평가 건의	농림축산검역본부 위험관리과	2023-01-05

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	인력 양성	2022		1				1			1		
2	인력 양성	2023		2			1	1		1	1		

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	POBGEN Lily virus Detection Kit	2023-09-22	(주) 포스트바이오	(주) 포스트바이오	식물바이러스 의 진단기술	1		
2	POBGEN XQ Lily virus Detection Kit	2023-09-22	(주) 포스트바이오	(주) 포스트바이오	식물바이러스 의 진단기술	1	(주) 코스모진텍	2024.04.31
3	POBGEN Narcissus virus Detection Kit	2023-09-22	(주) 포스트바이오	(주) 포스트바이오	식물바이러스 의 진단기술	1		
4	POBGEN XQ Narcissus virus Detection Kit	2023-09-22	(주) 포스트바이오	(주) 포스트바이오	식물바이러스 의 진단기술	1	(주) 코스모진텍	2024.04.31
5	POBGEN Tulip virus Detection Kit	2023-09-22	(주) 포스트바이오	(주) 포스트바이오	식물바이러스 의 진단기술	1		
6	POBGEN XQ Tulip virus Detection Kit	2023-09-22	(주) 포스트바이오	(주) 포스트바이오	식물바이러스 의 진단기술	1	(주) 코스모진텍	2024.04.31

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	특허출원	수선화에 발생하는 바이러스의 다중 진단용 조성물	(주) 엠비파트너스	2023-04-18	2,200,000	-

\* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

[사회적 성과]

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	박람회	AFTER 2023! 농림축산식품 과학기술대전	구근화훼류에 발생하는 바이러스 통합 진단시스템 개발	2023-11-27

## 2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 툴립, 수선화, 백합 및 글라디올러스 등 바이러스 감염 시료 채집	○ 툴립, 수선화, 백합, 글라디올러스 각각 다양한 이상증상을 보이는 시료를 50점 이상 확보하였음(툴립 86점, 수선화 75점, 백합 53점, 글라디올러스 99점). ○ 분석 시료를 기반으로 이상 증상 및 바이러스 병징관련 육안적 특성 정보를 파악하였음.	○ 100
○ RT-PCR 기반 구근 화훼류 바이러스의 탐색 및 동정	○ 전 세계적으로 구근 화훼류(툴립, 수선화, 백합, 글라디올러스)에 보고된 바이러스 83종의 유전자진단법을 확보하고 RT-PCR 진단을 수행하였음. ○ 검출된 바이러스의 생물학적 및 분자생물학적 특성을 규명하였음.	○ 100
○ 구근 화훼류 전사체 분석을 통하여 바이러스 탐색 및 동정	○ 전사체 분석을 통하여 바이러스 관련 염기서열 탐색하고 획득한 염기서열 정보를 바탕으로 바이러스 유전자 탐색하였음. ○ 전사체 분석을 통해 검출된 염기서열 기반 구근류에서의 RT-PCR 분석을 진행하였으며, 증폭산물의 염기서열을 분석하였음.	○ 100
○ 구근 화훼류 바이러스 유전자 개별진단법 개발	○ RT-PCR 및 메타전사체 분석을 통하여 총 23종의 바이러스가 검출되었으며, 각각의 바이러스를 동정하고 개별 유전자진단법을 개발하였음.	○ 100
○ 구근 화훼류별 바이러스 다중진단법 개발	○ 확보한 개별 유전자진단법을 이용하여 구근화훼류에 발생하는 바이러스를 다중 진단할 수 있는 프라이머 조합을 설계하였음. ○ 툴립, 수선화, 글라디올러스 3개 구근 화훼류 각각의 바이러스 다중진단법을 개발하였으며, 특허 출원을 하였음.	○ 100
○ 바이러스 염기서열 분석을 통한 확진 기술 개발	○ 검출된 바이러스의 염기서열을 분석하고 유연관계 분석을 수행하였음. ○ 염기서열 비교·분석을 통하여 바이러스를 특이적으로 진단할 수 있는 확진 기술(유전자 개별 및 다중진단법, qPCR 기반 다중진단법, RT-LAMP 진단법, RPA-LFD 진단법)을 개발하였음.	○ 100
○ 현장현시 진단(POC)용 바이러스 항원 생산	○ 검정된 CMV, LMoV와 PIAMV를 T/A cloning vector에 ligation 하여 항원 단백질 생산하기 위한 클로닝을 수행하였음. ○ 생산한 항원 단백질은 제3 공동연구기관(포스트 바이오)에 전달하여 특이항체를 생산하였음.	○ 100

○ 구근 화훼류 바이러스 발생 양상 및 위험 순위 분류	○ 작물별로 검출된 바이러스의 기주범위, 매개체 등 생태적 영향을 평가하여 위험 순위를 분류하였음. ○ RT-PCR 분석 결과를 기반으로 바이러스의 감염 양상을 분석하였으며 주요 바이러스를 대상화하였음.	○ 100
○ 바이러스 항원 특이항체 생산	○ 제1 공동연구기관(강원대)에서 전달받은 클로닝 벡터를 이용하여 마우스 면역을 통한 바이러스 항원 특이항체를 확보하였음. ○ 항체페어링을 통하여 바이러스 검출법 세팅하였음(면역크로마토그래피법 기반).	○ 100
○ 구근 화훼류 진단체계 확립을 위한 채집방법 표준화	○ 바이러스가 감염된 구근 화훼류의 조직별(구근, 잎, 꽃) 및 시기별(생육 초기, 중기, 후기)로 분석 시료를 채집하여 바이러스 RT-PCR 진단 및 qRT-PCR 진단을 수행하였음. ○ 다양한 핵산추출 방식을 통하여 바이러스의 검출양상을 비교하고 최적 핵산 추출 방식을 선정함.	○ 100
○ 바이러스 분석 시스템 및 DB 구축	○ 구근 화훼류에 최적화된 분석 파이프라인 알고리즘을 개발하여 바이러스 분석 시스템을 구축하였음. ○ 전사체 및 RT-PCR 분석을 통하여 구근 화훼류에 발생하는 바이러스를 탐색하고 획득한 염기서열 정보를 바탕으로 데이터를 구현하였음. ○ 전사체 분석을 통하여 백합과 글라디올라스에 발생하는 바이러스를 탐색하고 획득한 염기서열 정보를 바탕으로 데이터를 구현하였음.	○ 100
○ 현장 SI 진단 모듈 개발	○ 주관기관(경북대) 및 제1공동 연구기관(강원대)에서 제공한 이미지 영상을 기반으로 구근 화훼류의 작기에 따라 발생하는 주요 바이러스 병징 이미지를 확보하였음. ○ 조직별 및 시기별로 이미지 영상을 확보하여 인공지능 훈련에 사용하였음.	○ 100
○ 이동형 정량적 유전자진단법 (qRT-PCR) 개발	○ 이동형 qRT-PCR 장비를 이용한 구근 화훼류 바이러스 8종(LSV, TVX, OMMV, NYSV, NMV, TRV, CMV, LSV, LMoV)의 현장 진단법 개발을 위한 프라이머-프로브 세트를 선별하였음. ○ 프라이머-프로브 세트를 이용하여 qRT-PCR 기반의 구근 화훼류 바이러스 다중진단 조건의 최적화 과정을 수행하고 시제품을 제작하였음.	○ 100

○ 현장진단 ICT 앱 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 스마트폰 카메라 제어를 통해 현장에서 스마트폰으로 찍은 사진을 검사 결과와 같이 저장하는 기능을 개발하였음.</li> <li>○ 현장진단 키트 검사 결과를 입력해 최종 결과를 서버에 저장할 수 있는 기능을 개발하였음.</li> <li>○ GPS를 이용하여 촬영 장소의 위치정보를 추출할 수 있는 기능을 구현하였음.</li> <li>○ 현장진단 키트를 사용하여 수행한 바이러스 진단 결과를 저장 및 전송할 수 있는 QR 코드 인식기를 개발하였음.</li> </ul>	○ 100
○ 구근화훼류별 통합 진단 시스템 구축 및 실증	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 유전자진단법 및 전사체 분석을 이용하여 국내 구근 화훼류 바이러스 목록을 최신화하고 감염 실태를 조사하였음.</li> <li>○ 구근화훼류 작물별로 시기별 및 조직별 특성 및 감염 바이러스 특성을 고려하여 채집방법을 표준화하였음.</li> <li>○ 정량적 유전자 정밀 진단키트 및 혈청학적 현장 신속 진단키트를 이용한 현장용 진단체계 구축</li> <li>○ ICT 기술 접목한 첨단 진단시스템을 이용하여 현장과 실험실의 유기적 연결을 도모하고 앱을 통한 현장 진단 및 바이러스 생물정보의 빅데이터화 시스템을 구축하였음.</li> <li>○ 경북대학교와 강원대학교 과제의 수행을 통해 확보한 구근 화훼류 중 각 바이러스에 대한 양성 과 음성 시료(각 50 시료)를 이용하여 진단키트에 대한 임상적 민감도, 특이도 등에 대한 성능을 검증하였음.</li> <li>○ 이동형 qRT-PCR 기반 현장 진단키트 3종은 유전자 분석기관인 (주) 코스모진텍에 의뢰하여 임상적인 평가를 수행한 결과, 모두 90% 이상의 민감도를 보였음.</li> </ul>	○ 100

## 4. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- [구근 화훼류 바이러스병 구명] 구근 화훼류는 일부 주요 작물과 달리 바이러스에 대한 조사가 미비하여 농가에서는 바이러스병을 인지하지 못해 제대로 대처하지 못하고 있음. 이러한 배경에서 본 과제의 메타전사체 및 RT-PCR 분석을 통하여 백합, 글라디올러스, 튤립, 수선화에서 총 26종의 바이러스병을 구명하였으며, 구근 화훼류 바이러스의 실태를 조사하고 위험 순위를 분류하였음. 또한 이러한 구근 화훼류 바이러스의 정보를 사용자가 스마트폰을 통하여 쉽게 접근할 수 있는 APP을 개발함으로써 농가 현장에서 쉽게 구근 화훼류 바이러스를 파악할 수 있는 시스템을 구축하였음. 이와 같은 연구 성과는 학술대회발표, 논문, 정책건의(농림축산검역본부), 박람회(AFTER 2023! 농림축산식품 과학기술대전) 등의 방법으로 구근 화훼류 바이러스병의 관리와 통합 진단시스템의 필요성을 알리고자 하였음.
- [외래병해충 유입 및 확산 방지] 본 과제의 연구 결과를 보았을 때 국내에 수입되는 구근 화훼류에는 다수의 바이러스가 감염된 상태로 유입되고 있을 것으로 판단되나, 국내에서는 대부분의 구근 화훼류를 네덜란드, 호주와 같은 해외에서 무분별하게 수입하여 재배하고 있음. 국내에서는 구근 화훼류의 수입 과정에서 검역병해충의 유입을 차단하기 위하여 국경검역을 실시하고 있지만, 한정적인 바이러스를 대상으로 검사를 하고 있어 세계적으로 구근 화훼류에 발생하고 있는 다양한 바이러스에 대한 검사는 미비함. 국내로 유입된 바이러스는 매개충 등의 다양한 전염경로로 다른 식물체에 전염될 수 있기에, 수입하는 구근에 감염된 바이러스를 파악하고 그 유입과 확산을 막는 것이 중요함. 이러한 배경에 수입되는 구근 화훼류에 검사를 필요로 하는 주요 바이러스를 지정하였으며, 구근 화훼류 바이러스의 유입 및 확산을 막을 수 있는 기반 체계를 마련하였음.
- [구근 화훼류 바이러스 정밀진단 기술 개발] 본 연구과제를 통하여 구근 화훼류 바이러스의 RT-PCR, qRT-PCR, RT-LAMP, 및 RPA-LFD 방법을 이용한 다양한 진단 기술을 개발하였음. 개발한 진단 기술은 국내 구근 화훼류 재배 농가 혹은 관련 실험실에서 다양한 용도로 사용할 수 있는 검사법으로 활용될 수 있음. 또한 qRT-PCR 기반 현장 및 실험실용 유전자 분석 진단키트의 시제품을 제작하였으며, 추후 제품화한 진단키트를 보급한다면 국내 구근 화훼류에서 바이러스병의 피해를 사전 예방하거나 최소화에 도움이 될 것으로 기대됨.
- [무병 구근 화훼류 품종 확보를 위한 시스템 구축] 튤립, 수선화, 백합 및 글라디올러스와 같은 구근 화훼류는 지난 10년간 6-10배가량 수입 및 재배량이 증가하고 있음. 국내 구근 화훼류 시장의 성장을 위해서는 무병주 확보가 시급하며, 본 연구과제에서 구축한 구근 화훼류 바이러스 통합 진단시스템은 무병 구근 화훼류 품종의 선별을 위한 기반 시스템이 될 수 있음. 구근 화훼류 무병주 확보를 통하여 경쟁력 있는 세계 수준 품질의 구근 화훼류 생산으로 국내 구근 화훼류 수출 시장의 개척을 기대함.
- [국제 구근 화훼류 바이러스 정밀진단 국가로 위상 상승] 구근 화훼류는 국제 무역이 증가하면서 한국을 포함하여 아프리카, 아시아, 및 유럽 등에 걸쳐 넓게 분포하고 있음. 이에 따라 구근 화훼류의 바이러스병 관리가 국제적으로 중요한 상황임. 또한, 현재까지 국내에서는 구근 화훼류를 대부분 수입에 의존하여 재배 및 유통하였지만, 높아지는 구근 화훼류 가치에 따라 국내에서는 고품질의 구근 화훼류 품종의 생산 및 수출을 도모하고 있음. 이러한 배경에서 본 과제를 통하여 구축한 통합 진단시스템을 이용한다면 국제 시장에서 구근 화훼류 바이러스의 정밀진단 국가로서 위상을 제고할 수 있음.
- [ICT 기술을 이용한 첨단 진단시스템의 구축] ICT 기술을 접목한 웹과 앱을 이용한 통합 시스템은 구근 화훼류 바이러스의 특성과 확산 패턴을 더 정밀하게 모니터링하고 분석할 수 있는 기반을 제공하였음. 또한 해당 시스템은 구근 화훼류뿐만 아니라 다른 식물 병원체의 진단 및 관리에도 적용될 수 있어, 농업 분야 전반의 생산성과 효율성을 향상하는데 원천

기술의 역할을 할 것으로 기대됨.

○ 기술 기여도

(단위 : 백만원, %)

총괄과제명	세부과제명		기관명	유형	총 연구 개발비 (A)	정부지원 연구개발비 (B)	정부지원 연구개발비 비율 (C=B/A)	성과 유형	기술 기여도	
									산정 근거	비율
	제2공동 연구기관	구근 화훼류에 발생하는 바이러스 통합 진단 시스템 개발	(주) 씨더스	농업회사 법인(영 리)	300	240	0.80	신규 기술개발	①-①	80
	제3공동 연구기관	구근 화훼류에 발생하는 바이러스 통합 진단 시스템 개발	(주) 포스트바 이오	중소기업 (영리)	294	220	0.75	신규 기술개발	①-①	75
<b>계</b>					<b>594</b>	<b>460</b>	-	-	-	-

## 5. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

○ 본 과제 수행을 통한 연구개발성과는 다음과 같음.

- 특허 출원 : 3건(특허 등록 예정)
  - 튤립에 발생하는 바이러스의 다중 진단용 조성물(출원 번호 : 10-2023-0071420)
  - 수선화에 발생하는 바이러스의 다중 진단용 조성물(출원 번호 : 10-2022-0159131)
  - 글라디올러스 감염 바이러스의 다중진단용 프라이머 및 이의 용도(출원 번호 : 10-2023-0155099)
- 제품개발 : 6건
  - 수선화 바이러스 실험실용 동시 진단키트(POBGEN™ Narcissus Virus Detection Kit)
  - 튤립 바이러스 실험실용 동시 진단키트(POBGEN™ Tulip Virus Detection Kit)
  - 백합 바이러스 실험실용 동시 진단키트(POBGEN™ Lily Virus Detection Kit)
  - 수선화 바이러스 현장용 동시 진단키트(POBGEN™ XQ Narcissus Virus Detection Kit)
  - 튤립 바이러스 현장용 동시 진단키트(POBGEN™ XQ Tulip Virus Detection Kit)
  - 백합 바이러스 현장용 동시 진단키트(POBGEN™ XQ Lily Virus Detection Kit)
- 논문(SCI) : 4편
  - First report of Tulip Virus X infecting tulip (*Tulipa gesneriana*) in Korea
    - 게재지 : Plant disease
  - First Report of Olive Mild Mosaic Virus in Imported Tulips (*Tulipa gesneriana*) in Korea
    - 게재지 : Plant disease
  - First report of cucumber mosaic virus infecting *Cryptotaenia japonica* Hassk. In Korea
    - 게재지 : Journal of Plant Pathology
  - First report of cucumber mosaic virus infecting lettuce (*Lactuca sativa*) in South Korea
    - 게재지 : Journal of Plant Pathology
- 정책건의 : 3건
  - 수선화에서 국내 미보고바이러스, *Nerine latent virus*(NeLV)의 발생 보고 및 국내분포종 취급 건의(농림축산검역본부 위험관리과)
  - 수선화에서 국내 미보고바이러스, *Narcissus latent virus*(NLV)의 검출 보고 및 위험평가 건의(농림축산검역본부 위험관리과)
  - 튤립에서 국내 미보고바이러스, *Olive mild mosaic virus*(OMMV)의 검출 보고 및 위험평가 건의(농림축산검역본부 위험관리과)
- 학술발표 : 11건
  - Development of a Diagnostic Method for Potyvirus in Bulbous Ornamentals
    - 학술대회 : 2021 한국원예학회 추계학술발표회
  - Development of RT-PCR Diagnosis for Viral-disease in *Tulipa* spp.
    - 학술대회 : 2021 한국원예학회 추계학술발표회
  - First report of *Narcissus yellow stripe virus* on daffodil in South Korea
    - 2021 한국식물병리학회 추계국제학술발표회
  - Occurrence of viruses infecting *gladiolus* in Korea
    - 2021 한국식물병리학회 추계국제학술발표회
  - Development of multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of viruses infecting daffodils (*Narcissus* spp.)
    - 2022 The KSPP 60th Annual Meeting & Fall International Conference
  - Characterization of the putative member of genus *Ophiovirus* found in tulips
    - 2022 The KSPP 60th Annual Meeting & Fall International Conference
  - Occurrence pattern of viral diseases on lily in 2020-2021
    - The 2022 KSPP spring conference; current topics of plant pathology in Korea
  - Detection and monitoring stage of major viruses infecting *gladiolus*
    - the 2022 KSPP 60th annual meeting & fall international conference

- Development of RT-LAMP assays for the rapid detection of viruses infecting daffodils in Korea
  - 2023 KSPP Fall Meeting and International Conference
- Development of diagnostic system for rapid and specific detection of viruses infecting tulip
  - 2023 KSPP Fall Meeting and International Conference
- Estimation of origin of satellite RNA support by cucumber mosaic virus according to host
  - 2023 KSPP Fall Meeting and International Conference
- 고용창출 : 7명
- 인력양성 : 3명
- 기타(생물자원 수집 및 생명정보 등록) : 13건
- 본 연구개발과제 종료 후 예상되는 성과는 다음과 같음.
  - 논문(SCI 및 KCI) : 1편(구근 화훼류 바이러스 감염실태 및 진단법)
  - 학술발표 : 1건(구근 화훼류 바이러스 감염실태 및 진단법)
- 사업화 계획: 정책건의(활용) 선행
  - 국내 구근 화훼류(나리, 글라디올러스, 프리지아, 구근아이리스, 튜립)의 재배 및 유통과정에서는 「종자산업법」 「종자관리요강」에 따라 포장 및 종자검사를 시행하고 있으며, 바이러스는 7종(LSV, CMV, BYMV, FMV, TuMV, IMMV, TBV)을 대상으로 검사하고 있음. 본 연구과제 수행 결과에 따르면 국내 튜립, 백합(나리), 글라디올러스에서는 앞서 언급한 바이러스를 포함하여 TVX, OMMV, LMoV, TSV, BBWV2, TMV, BCMV, PIAMV, ReTBV, LVA 등 최소 14종 이상 바이러스병이 발생하고 있을 것으로 판단되며 이로 볼 때 「종자관리요강」에서는 한정적인 구근 화훼류 바이러스를 대상으로 검사를 수행하고 있음.
  - 아울러 본 연구에 따르면 수선화는 바이러스 감염률이 100%로 그 피해가 막심함에도 「종자관리요강」에 포함되지 않아 적절한 바이러스병 관리 방안이 없음. 정책건의를 통하여 「종자관리요강」에 검사대상 바이러스를 지정하여 적절한 관리가 이루어져야 함.
  - 「종자관리요강」의 구근 화훼류 검사규격에 따르면 바이러스병의 최고한도를 2%(구근아이리스는 1%)로 제시하고 있음. 본 연구를 수행하며 주산지에서 채집한 국내 구근 화훼류의 바이러스 감염률은 최소 61.6%에서 최대 100%로 나타남. 이로 볼 때 「종자관리요강」은 바이러스병으로 인한 구근 화훼류에 피해를 반영하지 못한 검사규격을 제시하고 있음.
  - 이러한 배경에서 정책건의를 통하여 「종자관리요강」에 구근 화훼류 검사대상 바이러스를 지정하고 무병묘 검정을 위한 통합 진단시스템을 제공하고자 함. 본 연구에서 개발한 다양한 진단 기술(monoplex and multiplex RT-PCR, real time RT-PCR, 현장용 real time RT-PCR, RT-LAMP, RPA-LFD, 영상진단 및 데이터베이스)은 「종자관리요강」의 검사대상 바이러스 진단을 위한 검사법으로 활용 및 보급될 수 있으며 진단 기술의 사업화로 이어질 수 있음.

〈종자산업법 : 종자관리요강 (화훼 구근류)〉

1. 포장검사 - 검사규격

작물명	구분	최저한도(%)		최고한도(%)				
		맹아율	이 품종주	블라스팅 및 블라인드	특정병			
					바이러스 <sup>a</sup>	잎마름병	목썩음병	갈색반점병
나리		85	무	-	2.0	0.5	-	-
글라디올러스		85	무	-	2.0	-	무	-
프리시아		85	무	-	2.0	-	2.0	-
구근아이리스		85	무	-	1.0	-	-	-
튤립		85		-	2.0	-	-	2.0

<sup>a</sup> LSV : lily symptomless virus, CMV : cucumber mosaic virus, BYMV : bean yellow mosaic virus, FMV : freesia mosaic virus, TuMV : turnip mosaic virus, IMMV : iris mild mosaic virus, TBV : tulip breaking virus.

2. 종자검사 - 검사규격

작물명	구분	최저한도(%)		최고한도(%)					
		구근상태		구근상태		특정병			
		건전외피	밀뿌리충실도	싹 또는 발근	블라스팅 및 블라인드	바이러스 <sup>a</sup>	뿌리썩음병	목썩음병	갈색반점병
나리		90	90	5.0	-	2.0	1.0	-	-
글라디올러스		90	-	3.0	-	2.0	-	5.0	-
프리시아		90	-	3.0	-	2.0	-	2.0	-
구근아이리스		90	-	5.0	-	1.0	-	-	-
튤립		90	-	0.0	-	2.0	-	-	2.0

<sup>a</sup> LSV : lily symptomless virus, CMV : cucumber mosaic virus, BYMV : bean yellow mosaic virus, FMV : freesia mosaic virus, TuMV : turnip mosaic virus, IMMV : iris mild mosaic virus, TBV : tulip breaking virus.

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내				
		2024	2025	2026	2027	2028
국외논문	SCIE		1			
	비SCIE					
국내논문	SCIE					
	비SCIE					
특허출원	국내					
	국외					
특허등록	국내		1	2		
	국외					
인력양성	학사					
	석사					
	박사					
사업화	시제품개발					
	상품출시					
	기술이전					
	공정개발					
	매출액(단위 : 천원)		15,000	40,000	75,000	150,000
	기술료(단위 : 천원)					
비임상시험 실시						
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상				
		2상				
		3상				
	의료기기					
진료지침개발						
신의료기술개발						
성과홍보						
포상 및 수상실적						
정성적 성과 주요 내용						

### 주 의

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

< 별첨 자료 >

[별첨 1]

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

		과제번호	321106-3		
사업구분	작물바이러스 및 병해충대응사업				
연구분야	2021. 04. 01 - 2023. 12. 31(2년 9개월)		과제구분	단위	
사업명	진단기술 사업화			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	구근 화훼류에 발생하는 바이러스 통합 진단시스템 개발		과제유형	(기초, 개발)	
연구개발기관	경북대학교 산학협력단		연구책임자	이수헌	
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2021. 04. 01 - 2021. 12. 31(9개월)	255,000		255,000
	2차년도	2022. 01. 01 - 2022. 12. 31(1년)	340,000		340,000
	3차년도	2023. 01. 01 - 2023. 12. 31(1년)	340,000		340,000
	계	2021. 04. 04 - 2023. 12. 31(2년 9개월)	935,000		935,000
참여기업	(주) 씨더스, (주) 포스트바이오				
상대국		상대국연구개발기관			

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

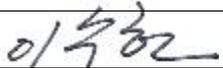
2. 평가일 : 2024. 02. 01.

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
경북대학교 산학협력단	교수	이수헌

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

국제 무역이 증가하면서 구근 화훼류는 한국을 포함하여 전 세계에 넓게 분포하고 있으며 구근 화훼류의 바이러스병 관리가 국제적으로 중요한 상황임. 이러한 배경에서 본 과제에서 개발한 구근 화훼류 통합 진단시스템은 한국을 국제 시장에서 구근 화훼류 바이러스의 정밀진단 국가로 위상을 제고할 수 있음.

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

ICT 기술을 접목한 웹과 앱을 이용한 통합 시스템은 구근 화훼류 바이러스의 특성과 확산 패턴을 더 정밀하게 모니터링하고 분석할 수 있는 기반을 제공하였음. 또한 해당 시스템은 구근 화훼류 뿐만 아니라 다른 식물 병원체의 진단 및 관리에도 적용될 수 있어, 농업 분야 전반의 생산성과 효율성을 향상하는데 원천 기술의 역할을 할 것으로 기대됨.

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

본 과제를 통하여 국내 구근 화훼류 바이러스의 다양한 진단 기술을 개발하였음. 개발한 구근 화훼류 바이러스를 진단 기술은 국내 구근 화훼류 재배 농가에서 바이러스병의 피해를 정확히 파악할 수 있는 검사법으로 활용될 것으로 판단됨. 또한 ICT 기술을 접목한 빅데이터 구축 시스템 구축은 구근 화훼류뿐만 아니라 다른 식물 병원체의 진단 및 관리에도 적용될 수 있음.

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

본 연구개발과제의 4개의 기관(경북대, 강원대, (주)씨더스, (주)포스트바이오)은 각자의 과제업무를 성실하게 수행하고 서로 협력하여, 구근 화훼류에 발생하는 바이러스를 동정하고 다양한 진단 기술을 개발하였으며, ICT와 접목을 통하여 생산자 및 소비자가 쉽게 접근할 수 있는 빅데이터 및 분석시스템을 개발하였음.

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

■ 등급 : 우수

본 과제의 연구개발성과는 SCI 논문 4편, 국내 및 국제 학술회의 발표 11회, 특허 출원 3건, 박람회 참여 등을 통하여 구근 화훼류 바이러스의 통합 진단시스템의 중요성과 필요성을 알리고자 하였음.

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
○ 툴립, 수산화, 백합 및 글라디올러스 등 바이러스 감염 시료 채집	5	5	○ 툴립, 수산화, 백합, 글라디올러스 각각 다양한 이상증상을 보이는 시료를 50점 이상 확보하였음(툴립 86점, 수산화 75점, 백합 53점, 글라디올러스 99점). ○ 분석 시료를 기반으로 이상 증상 및 바이러스 병징관련 육안적 특성 정보를 파악하였음.
○ RT-PCR 기반 구근 화훼류 바이러스의 탐색 및 동정	5	5	○ 전 세계적으로 구근 화훼류(툴립, 수산화, 백합, 글라디올러스)에 보고된 바이러스 83종의 유전자진단법을 확보하고 RT-PCR 진단을 수행하였음. ○ 검출된 바이러스의 생물학적 및 분자생물학적 특성을 규명하였음.
○ 구근 화훼류 전사체 분석을 통하여 바이러스 탐색 및 동정	5	5	○ 전사체 분석을 통하여 바이러스 관련 염기서열 탐색하고 획득한 염기서열 정보를 바탕으로 바이러스 유전자 탐색하였음. ○ 전사체 분석을 통해 검출된 염기서열 기반 구근류에서의 RT-PCR 분석을 진행하였으며, 증폭 산물의 염기서열을 분석하였음.
○ 구근 화훼류 바이러스 유전자 개별진단법 개발	5	5	○ RT-PCR 및 메타전사체 분석을 통하여 총 23종의 바이러스가 검출되었으며, 각각의 바이러스를 동정하고 개별 유전자진단법을 개발하였음.
○ 구근 화훼류별 바이러스 다중진단법 개발	5	5	○ 확보한 개별 유전자진단법을 이용하여 구근화훼류에 발생하는 바이러스를 다중 진단할 수 있는 프라이머 조합을 설계하였음. ○ 툴립, 수산화, 글라디올러스에 발생하는 바이러스의 다중진단법을 개발하였으며, 각각 특허 출원을 하였음.

○ 바이러스 염기서열 분석을 통한 확진 기술 개발	5	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 검출된 바이러스의 염기서열을 분석하고 유연관계 분석을 수행하였음.</li> <li>○ 염기서열 비교·분석을 통하여 바이러스를 특이적으로 진단할 수 있는 확진 기술(유전자 개별 및 다중진단법, qPCR 기반 다중진단법, RT-LAMP 진단법, RPA-LFD 진단법)을 개발하였음.</li> </ul>
○ 현장현시 진단(POC)용 바이러스 항원 생산	5	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 검정된 CMV, LMoV와 PIAMV를 T/A cloning vector에 ligation 하여 항원 단백질 생산하기 위한 클로닝을 수행하였음.</li> <li>○ 생산한 항원 단백질은 제3 공동연구기관(포스트바이오)에 전달하여 특이항체를 생산하였음.</li> </ul>
○ 구근 화훼류 바이러스 발생양상 및 위험 순위 분류	10	10	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 작물별로 검출된 바이러스의 기주범위, 매개체 등 생태적 영향을 평가하여 위험 순위를 분류 하였음.</li> <li>○ RT-PCR 분석 결과를 기반으로 바이러스의 감염 양상을 분석하였으며 주요 바이러스를 대상화하였음.</li> </ul>
○ 바이러스 항원 특이항체 생산	5	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 제1 공동연구기관(강원대)에서 전달받은 클로닝 벡터를 이용하여 마우스 면역력을 통한 바이러스 항원 특이항체를 확보하였음.</li> <li>○ 항체페어링을 통하여 바이러스 검출법 세팅하였음(면역크로마토그래피법 기반).</li> </ul>
○ 구근 화훼류 진단체계 확립을 위한 채집방법 표준화	5	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 바이러스가 감염된 구근 화훼류의 조직별(구근, 잎, 꽃) 및 시기별(생육 초기, 중기, 후기)로 분석 시료를 채집하여 바이러스 RT-PCR 진단 및 qRT-PCR 진단을 수행하였음.</li> <li>○ 다양한 핵산추출 방식을 통하여 바이러스의 검출양상을 비교하고 최적 핵산추출 방식을 선정함.</li> </ul>

○ 바이러스 분석 시스템 및 DB 구축	5	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 구근 화훼류에 최적화된 분석 파이프라인 알고리즘을 개발하여 바이러스 분석 시스템을 구축하였음.</li> <li>○ 전사체 및 RT-PCR 분석을 통하여 구근 화훼류에 발생하는 바이러스를 탐색하고 획득한 염기서열 정보를 바탕으로 데이터를 구현하였음.</li> <li>○ 전사체 분석을 통하여 백합과 글라디올라스에 발생하는 바이러스를 탐색하고 획득한 염기서열 정보를 바탕으로 데이터를 구현하였음.</li> </ul>
○ 현장 AI 진단 모듈 개발	5	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 주관기관(경북대) 및 제1공동 연구기관(강원대)에서 제공한 이미지 영상을 기반으로 구근 화훼류의 작기에 따라 발생하는 주요 바이러스 병징 이미지를 확보하였음.</li> <li>○ 조직별 및 시기별로 이미지 영상을 확보하여 인공지능 훈련에 사용하였음.</li> </ul>
○ 현장진단 ICT 앱 개발	10	10	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 스마트폰 카메라 제어를 통해 현장에서 스마트폰으로 찍은 사진을 검사 결과와 같이 저장하는 기능을 개발하였음.</li> <li>○ 현장진단 키트 검사 결과를 입력해 최종 결과를 서버에 저장할 수 있는 기능을 개발하였음.</li> <li>○ GPS를 이용하여 촬영 장소의 위치정보를 추출할 수 있는 기능을 구현하였음.</li> <li>○ 현장진단 키트를 사용하여 수행한 바이러스 진단 결과를 저장 및 전송할 수 있는 QR 코드 인식기를 개발하였음.</li> </ul>
○ 이동형 정량적 유전자진단법 (qRT-PCR) 개발	10	10	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 이동형 qRT-PCR 장비를 이용한 구근 화훼류 바이러스 8종(LSV, TVX, OMMV, NYSV, NMV, TRV, CMV, LMoV)의 현장 진단법 개발을 위한 프라이머-프로브 세트를 선별하였음.</li> <li>○ 프라이머-프로브 세트를 이용하여 qRT-PCR 기반의 구근 화훼류 바이러스 다중진단 조건의 최적화 과정을 수행하고 시제품을 제작하였음.</li> </ul>

<p>○ 구근화훼류별 통합 진단 시스템 구축</p>	<p>15</p>	<p>15</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 유전자진단법 및 전사체 분석을 이용하여 국내 구근 화훼류 바이러스 목록을 최신화하고 감염실태를 조사하였음.</li> <li>○ 구근화훼류 작물별로 시기별 및 조직별 특성 및 감염 바이러스 특성을 고려하여 채집방법을 표준화하였음.</li> <li>○ 정량적 유전자 정밀 진단키트 및 혈청학적 현장신속 진단키트를 이용한 현장용 진단체계 구축</li> <li>○ ICT 기술 접목한 첨단 진단시스템을 이용하여 현장과 실험실의 유기적 연결을 도모하고 앱을 통한 현장 진단 및 바이러스 생물정보의 빅데이터화 시스템을 구축하였음.</li> <li>○ 경북대학교와 강원대학교 과제의 수행을 통해 확보한 구근 화훼류 중 각 바이러스에 대한 양성과 음성 시료(각 50 시료)를 이용하여 진단키트에 대한 임상적 민감도, 특이도 등에 대한 성능을 검증하였음.</li> <li>○ 이동형 qRT-PCR 기반 현장 진단키트 3종은 유전자 분석기관인 (주) 코스모진텍에 의뢰하여 임상적인 평가를 수행한 결과, 모두 90% 이상의 민감도를 보였다.</li> </ul>
<p>합계</p>	<p>100%</p>	<p>100%</p>	

### III. 종합의견

#### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구개발과제의 추진을 위하여 4개의 기관(경북대, 강원대, (주)씨더스, (주)포스트바이오)은 공동 연구개발 체계를 구성하여 각자의 과제업무를 성실하게 수행하였음. 그리하여 최종 목표인 구근 화훼류에 발생하는 바이러스를 동정하고 다양한 진단 기술을 개발하였으며, ICT와 접목하여 생산자 및 소비자가 쉽게 접근할 수 있는 빅데이터 및 분석시스템을 개발하였음. RT-PCR, qRT-PCR, RT-LAMP, 및 RPA-LFD 방법을 이용한 다양한 진단 기술을 개발하였으며, 개발한 기술은 국내 구근 화훼류 재배 농가 혹은 관련 실험실에서 다양한 용도로 사용할 수 있는 검사법으로 활용될 수 있음. 개발한 통합 진단시스템은 국내에 구근 화훼류에서 바이러스병의 피해를 사전 예방하거나 최소화에 도움이 될 것으로 기대됨. 또한, 국내 구근 화훼류 시장의 성장을 위해서는 무병주 확보가 시급하며, 본 연구과제에서 구축한 구근 화훼류 바이러스 통합 진단시스템은 무병 구근 화훼류 품종의 선별을 위한 기반 시스템이 될 수 있음. 높아지는 구근 화훼류 가치에 따라 국내에서는 고품질의 구근 화훼류 품종의 생산 및 수출을 도모하고 있으며, 구축한 통합 진단시스템을 이용한다면 국제 시장에서 구근 화훼류 바이러스의 정밀진단 국가로서 위상을 제고할 수 있음.

#### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

본 연구개발과제에서 개발한 진단 기술은 구근 화훼류 바이러스의 개별 및 다중진단법을 포함하여 약 35건 이상일 것으로 추정되나, 외부 인증기관을 통한 개발된 진단법의 실증은 연구개발비의 한계로 인하여 대표적인 일부 진단법에 국한될 수밖에 없었음. 이에 따라, 대표적인 진단법이라고 할 수 있는 이동형 qRT-PCR 장비를 이용한 구근 화훼류 바이러스 현장 진단법 3건(POBGEN™ XQ Narcissus Virus Detection Kit, POBGEN™ XQ Tulip Virus Detection Kit, POBGEN™ XQ Lily Virus Detection Kit)에 대하여 외부인증기관 (주) 코스모진텍에 시험의뢰하였으며, 민감도 및 특이도가 90% 이상으로 나타남.

#### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 연구개발기간 동안 출원한 특허 3건에 대하여, 연구개발 종료 후 3년 이내 특허 등록을 하고자 함. 또한, 제품화한 6건의 진단 기술을 포함하여 본 과제에서 개발한 다양한 진단법을 구근 화훼류 바이러스 검사법으로 활용하여 재배 농가에 바이러스의 유입 및 피해를 사전 예방할 수 있을 것으로 기대됨. 또한, 구근 화훼류 무병주의 확보 및 보급을 위한 진단시스템으로 활용될 것으로 기대됨. 또한, ICT 기술을 접목한 웹과 앱을 이용한 통합 시스템은 구근 화훼류 바이러스의 특성과 확산 패턴을 더 정밀하게 모니터링하고 분석할 수 있는 기반을 제공하였음. 해당 시스템은 구근 화훼류뿐만 아니라 다른 식물 병원체의 진단 및 관리에도 적용될 수 있어, 농업 분야 전반의 생산성과 효율성을 향상하는데 원천 기술의 역할을 할 것으로 기대됨. 그리하여, 연구개발과제 종료 이후에도 논문, 학술대회발표, 박람회 등과 같은 방법을 통하여 개발한 구근 화훼류 바이러스 통합 진단시스템의 중요성과 필요성을 알리고자 함.

## 연구성과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	사업화
연구과제명	구근 화훼류에 발생하는 바이러스 동정 및 통합 진단시스템 개발		
주관연구개발기관	경북대학교 산학협력단	주관연구책임자	이수현
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타
	935,000,000	134,000,000	총연구개발비 1,069,000,000
연구개발기간	2021. 04. 01 - 2023. 12. 31(2년 9개월)		
주요활용유형	<input checked="" 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
① 구근 화훼류 바이러스 동정 및 유전자진단법 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 전 세계적으로 구근 화훼류(튤립, 수선화, 백합, 글라디올러스)에 보고된 바이러스 82종의 유전자진단법을 확보하고 RT-PCR 진단을 수행하였음.</li> <li>○ RT-PCR 및 메타전사체 분석을 통하여 총 26종의 바이러스가 검출되었으며, 각각의 바이러스를 동정하고 유전자 개별 및 다중진단법을 개발하였음.</li> </ul>
② 현장현시 진단(POC)을 위한 신속 및 정밀 진단기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 이동형 qRT-PCR 장비를 이용한 구근 화훼류 바이러스 현장 진단법을 개발하였음.</li> <li>○ Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification(RT-LAMP) 진단법을 이용한 현장 진단법 개발하였음.</li> <li>○ Recombinase polymerase amplification with lateral flow dipstick (RPA-LFD) 방법을 이용한 현장 진단법 개발하였음.</li> </ul>
③ 구근 화훼류 바이러스 진단을 위한 Big Data 및 분석시스템 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 웹 기반 데이터베이스를 구현하여 구근 화훼류 바이러스의 Big data 구축 시스템을 개발하였음.</li> <li>○ 현장에서 구근 화훼류에 대한 바이러스를 진단하고, 확보한 데이터를 웹 DB와 연동하여 실시간으로 통합하기 위한 현장진단용 앱을 제작함.</li> </ul>
④ 구근 화훼류 바이러스 위험 순위 분류 및 채집방법 표준화	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 작물별 바이러스의 발생실태를 분석하고 위험 순위를 분류하였음.</li> <li>○ 바이러스가 감염된 구근 화훼류의 조직별(구근, 잎, 꽃) 및 시기별(생육 초기, 중기, 후기)로 분석 시료를 채집하여 바이러스 RT-PCR 진단 및 qRT-PCR 진단을 통하여, 작물별 채집 방법을 표준화하였음.</li> </ul>
⑤ 현장현시 진단키트 제품화	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ qRT-PCR 기반 구근 화훼류 바이러스 실험실 진단법을 개발하고 제품화하였음.</li> <li>○ 이동형 qRT-PCR 장비를 이용한 구근 화훼류 바이러스 현장 진단법을 개발하고 제품화하였음.</li> </ul>
⑥ 구근 화훼류 바이러스 통합 진단시스템 구축 및 실증	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 작물별로 적절한 바이러스 최적 진단 체계를 구축하였음.</li> <li>○ 작물별 실험실 및 현장에서 사용할 수 있는 진단 기술을 구축하였음.</li> <li>○ ICT 기술을 접목하여 구근 화훼류 바이러스 진단을 위한 현장 및 실험실의 유기적 연결 시스템을 구축하였음.</li> <li>○ 인증기관을 통하여 개발한 진단법을 실증하였음.</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 (타연구활용등)	
	특허출원	특허등록	품종등록	S M A R T	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출		투자유치	논문				학술 발표	정책 활용		홍보 전시
													SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	건	건			
가중치	30				10		20			10				10	10	5		5		
최종 목표	3				1		4			6				3	3	2		6		
당해 년도	목표	3			1		4			6				3	3	2		6		
	실적	3			1		6			7				4	11	3	3	13		
달성률 (%)	100				100		100			100				100	100	100		100		

### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	구근 화훼류(튤립, 백합, 수선화, 글라디올러스)에 발생하는 바이러스 동정 및 통합 진단시스템 구축
②	튤립에 발생하는 바이러스의 다중 진단용 조성물
③	수선화에 발생하는 바이러스의 다중 진단용 조성물
④	글라디올러스 감염 바이러스의 다중 진단용 프라이머 및 이의 용도
⑤	수선화 바이러스 실험실용 동시 진단키트(POBGENTM Narcissus Virus Detection Kit)
⑥	튤립 바이러스 실험실용 동시 진단키트(POBGENTM Tulip Virus Detection Kit)
⑦	백합 바이러스 실험실용 동시 진단키트(POBGENTM Lily Virus Detection Kit)
⑧	수선화 바이러스 실험실용 동시 진단키트(POBGENTM XQ Narcissus Virus Detection Kit)
⑨	튤립 바이러스 실험실용 동시 진단키트(POBGENTM XQ Tulip Virus Detection Kit)
⑩	백합 바이러스 실험실용 동시 진단키트(POBGENTM XQ Lily Virus Detection Kit)

### 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)	현장에로 해	정책 자료	기타
①의 기술		√						√		
②의 기술		√				√		√		
③의 기술		√				√		√		
④의 기술		√				√		√		
⑤의 기술		√					√	√		
⑥의 기술		√					√	√		
⑦의 기술		√					√	√		
⑧의 기술		√					√	√		
⑨의 기술		√					√	√		
⑩의 기술		√					√	√		

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	본 과제를 통하여 개발한 구근 화훼류(튤립, 수선화, 백합, 글라디올러스)에서 발생하는 바이러스 통합 진단시스템은 국내 바이러스병의 피해를 사전 예방하거나 최소화하며, 무병 구근 화훼류 생산의 기반 구축에 활용될 수 있음. 특히, 국제 무역이 증가하면서 구근 화훼류는 한국을 포함하여 전 세계에 넓게 분포하고 있으며 다양한 구근 화훼류의 바이러스병 관리가 국제적으로 중요한 상황임. 이러한 배경에서 본 과제에서 개발한 구근 화훼류 통합 진단시스템은 한국을 국제 시장에서 구근 화훼류 바이러스의 정밀진단 국가로서 위상을 제고할 수 있음.
②의 기술	해당 기술은 튤립 바이러스 4종(LSV, TBV, TVX, OMMV)을 동시 진단 할 수 있는 진단법으로 특허로 출원하였고 연구개발 종료 후 특허등록을 하고자 함. 아울러 튤립의 수입 과정에 해당 진단 기술을 바이러스 검사법으로 활용한다면 재배 농가에 바이러스의 유입 및 피해를 사전 예방할 수 있을 것으로 기대됨. 또한, 튤립 무병주의 확보 및 보급을 위한 진단시스템으로 활용될 것으로 기대됨.
③의 기술	해당 기술은 수선화 바이러스 4종(NLSYV, NLV, NYSV, NeLV)을 동시 진단 할 수 있는 진단법으로 특허로 출원하였고 연구개발 종료 후 특허등록을 하고자 함. 아울러 수선화의 수입 과정에 해당 진단 기술을 바이러스 검사법으로 활용한다면 재배 농가에 바이러스의 유입 및 피해를 사전 예방할 수 있을 것으로 판단됨. 또한, 수선화 무병주의 생산 및 보급을 위한 진단시스템으로 활용될 것으로 기대됨.
④의 기술	해당 기술은 글라디올러스 바이러스 4종(NLSYV, NLV, NYSV, NeLV)을 동시 진단 할 수 있는 진단법으로 특허로 출원하였고 연구개발 종료 후 특허등록을 하고자 함. 글라디올러스의 수입 과정에 해당 진단 기술을 바이러스 검사법으로 활용한다면 재배 농가에 바이러스의 유입 및 피해를 사전 예방할 수 있을 것으로 판단됨. 또한, 글라디올러스 무병주의 생산 및 보급을 위한 진단시스템으로 활용될 것으로 기대됨.
⑤의 기술	해당 기술은 qRT-PCR 기반 수선화 바이러스 3종(NYSV, NMV, TRV)을 동시 진단할 수 있는 진단키트이며 시제품으로 제작하였음. 해당 기술을 상품화하여 관련 실험실 및 재배 농가에 보급하고자 하며, 해당 진단 기술을 사용한다면 수선화를 대상으로 정성 및 정량적으로 바이러스를 효과적으로 진단할 수 있을 것으로 기대됨.
⑥의 기술	해당 기술은 qRT-PCR 기반 튤립 바이러스 3종(LSV, TBV, OMMV)을 동시 진단할 수 있는 진단키트이며 시제품으로 제작하였음. 해당 기술을 상품화하여 관련 실험실 및 재배 농가에 보급하고자 하며, 해당 진단 기술을 사용한다면 튤립을 대상으로 정성 및 정량적으로 바이러스를 효과적으로 진단할 수 있을 것으로 기대됨.
⑦의 기술	해당 기술은 qRT-PCR 기반 글라디올러스 바이러스 3종(BYMV, CMV, LMoV)을 동시 진단할 수 있는 진단키트이며 시제품으로 제작하였음. 해당 기술을 상품화하여 관련 실험실 및 재배 농가에 보급하고자 하며, 해당 진단 기술을 사용한다면 글라디올러스를 대상으로 정성 및 정량적으로 바이러스를 효과적으로 진단할 수 있을 것으로 기대됨.
⑧의 기술	해당 기술은 이동형 qRT-PCR 장치를 기반으로 튤립 바이러스 3종(NYSV, NMV, TRV)을 동시 진단할 수 있는 진단키트이며 시제품으로 제작하였음. 해당 기술을 상품화하여 관련 실험실 및 재배 농가에 보급하고자 하며, 해당 진단 기술을 사용한다면 현장에서 튤립 바이러스를 신속하고 정확하게 분석할 수 있을 것으로 기대됨.
⑨의 기술	해당 기술은 이동형 qRT-PCR 장치를 기반으로 수선화 바이러스 3종(NYSV, NMV, TRV)을 동시 진단할 수 있는 진단키트이며 시제품을 제작하였음. 해당 기술을 상품화하여 관련 실험실 및 재배 농가에 보급하고자 하며, 해당 진단 기술을 사용한다면 현장에서 수선화 바이러스를 신속하고 정확하게 분석할 수 있을 것으로 기대됨.
⑩의 기술	해당 기술은 이동형 qRT-PCR 장치를 기반으로 글라디올러스 바이러스 3종(BYMV, CMV, LMoV)을 동시 진단할 수 있는 진단키트이며 시제품을 제작하였음. 해당 기술을 상품화하여 관련 실험실 및 재배 농가에 보급하고자 하며, 해당 진단 기술을 사용한다면 현장에서 글라디올러스 바이러스를 신속하고 정확하게 분석할 수 있을 것으로 기대됨.

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(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 활용) (명)
	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	SCI	비 SCI			논 문 평 판 I F	학 술 발 표	
												건				건	건			건
단위	건	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	15	15			10		20		10					10		10	5		5	
최종목표	3	3			1		4		6			3		3		3	2		6	
연구기간내 달성실적	3				1		6		7			4		11		3	3		13	
연구종료후 성과창출 계획		3					280					1		1						

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 <sup>1)</sup>	툴립에 발생하는 바이러스의 다중 진단용 조성물		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	2,200 천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간	2년	실용화에상시기 <sup>3)</sup>	2027
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>	분자생물학적 기술(장치) 및 전문인력 요구(프라이머 설계, 염기서열 분석 등)		

핵심기술명 <sup>1)</sup>	글라디올러스 감염 바이러스의 다중 진단용 프라이머 및 이의 용도		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	2,200 천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간	2년	실용화에상시기 <sup>3)</sup>	2027
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>	분자생물학적 기술(장치) 및 전문인력 요구(프라이머 설계, 염기서열 분석 등)		

- 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) 실용화에상시기 : 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)