

317006-4

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

농생명산업기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003555-01

# 사과, 복숭아, 감귤, 배, 포도의 유 묘 바이러스 진단 기술 개발

2021. 6 . 9 .

주관연구기관 / 한국생명공학연구원  
협동연구기관 / 경북대학교  
전남대학교  
국립종자원  
(주)넥스바이오

사과, 복숭아, 감귤, 배, 포도의 유묘 바이러스 진단 기술 개발

2021

농림축산식품부  
농림식품기술기획평가원

농림축산식품부  
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

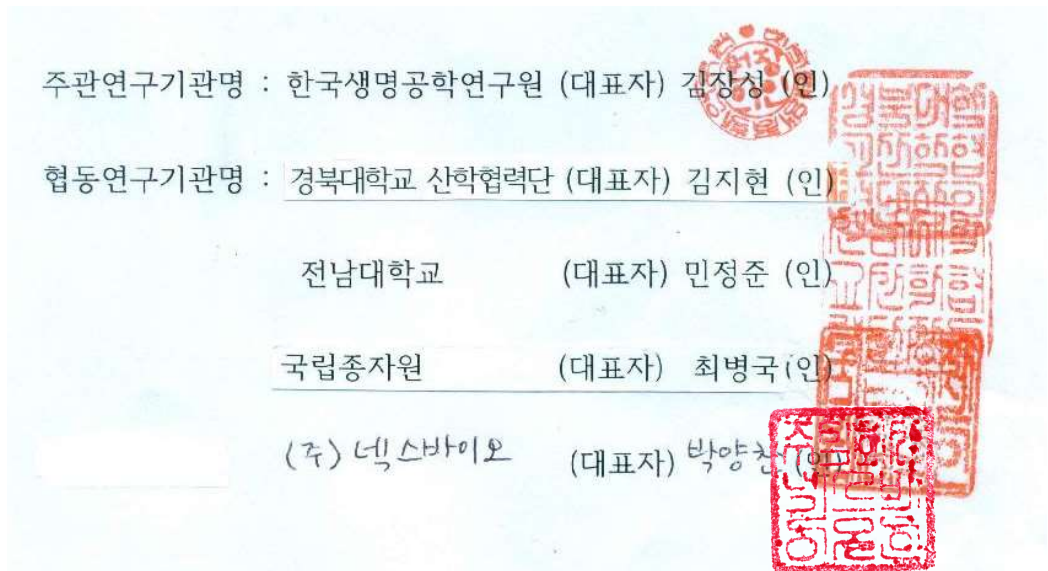
<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “사과, 복숭아, 감귤, 배, 포도의 유묘 바이러스 진단 기술 개발”(개발기간 : 2017 . 4 . 21 ~ 2020 . 12 . 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021. 6 . 9 .



주관연구책임자 : 문 제 선

협동연구책임자 : 이 수 헌

정 래 동

김 홍 섭

박 양 찬

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	317006-4	해 당 단 계 연 구 기 간	2020.01.01. ~2020.12.31	단 계 구 분	4/4
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	사과, 복숭아, 감귤, 배, 포도의 유묘 바이러스 진단 기술 개발			
연구책임자	문 제 선	해당단계 참여연구원 수	총: 26명 내부: 22명 외부: 4명	해당단계 연구개발비	정부: 300,000천원 민간: 100,000천원 계: 400,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 43명 내부: 37명 외부: 6명	총 연구개발비	정부:1,100,000천원 민간: 366,700천원 계:1,466,700천원
연구기관명 및 소속부서명	한국생명공학연구원 식물시스템공학연구센터			참여기업명 (주)넥스바이오	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과의 보안등급 및 사유	해당사항 없음				

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시 설·장비	기술요 약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명정보	생물자원	정보	실물
등록· 기탁 번호		10-2019-00293 69,10-2019-01 08959,10-2020 -0046090,10-2 018-0092501						LC475148.1,LC 475151.1,LC47 6839.1,LC4751 50.1,LC475149. 1,LC367336,LC 367337,LC3673 38,LC367339,L C367340,LC367 341,LC367342, MG602681,LC4 27230,LC42723 8,LC427237,LC 427239,LC4768 39,LC475148,L C475149,LC475 152,LC475150, LC367338,MK3 36184			

국가과학기술중합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

- |   |               |
|---|---------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 종자산업법에 의하여 과수 무병묘 생산 및 유통 활성화를 위해 과수 바이러스·바이로이드 검정 정책의 지원을 위하여 수행된 연구 과제</li> <li>○ 5대 과종(사과, 배, 복숭아, 포도, 감귤)과 사과대목에 대한 바이러스·바이로이드 발생 현황 조사, 진단법 개발, 과수 묘목 유통 관리 시스템 구축</li> <li>○ 과제 수행 결과를 바탕으로 과수 바이러스·바이로이드의 검사 대상에 대한 종자 요강을 개정하기 위한 정책 시행 및 정책 건의</li> <li>○ 농림부 원예경영과 및 국립중자원과의 협의에 의하여 시급한 검사 대상을 중심으로 진단법 개발이 이루어졌으며 현재 과수 묘목 바이러스·바이로이드 검정에 활용되고 있음</li> <li>○ 과수 바이러스·바이로이드 발생 현황 조사를 통하여 다수의 신·변종 확인 및 추후 종자 요강 개정에 반영 정책 건의</li> <li>○ 과제 수행의 결과물로 논문(6건), 특허(4건), 제품화(4건), 등 기술이전, 정책시행 및 정책건의, 인력양성, 고용창출, 학술발표의 정량적 연구 성과를 달성하여 연구 계획대비 정량적 연구 성과 목표를 달성하였음</li> </ul> | <p>보고서 면수</p> |
|---|---------------|

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>과수 바이러스의 감염 실태 조사에 근거한 신속한 현장 진단 기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 5대 과종 바이러스 감염 현황 조사</li> <li>- 유전자 분석에 의한 과수 바이러스 표준 진단법 개발</li> <li>- 주요 5개 과종 바이러스 신속 현장 진단 기술 개발</li> <li>- 묘목 생산 및 공급 체계 개선 정책 방안 마련</li> <li>- 검사대상 바이러스 종자관리요강 현행화</li> </ul>																																																																																																																				
<p>연구개발성과</p>	<p>○ 특허/산업재산권: 특허출원 4건, 특허등록 3건</p> <table border="1" data-bbox="438 539 1425 893"> <thead> <tr> <th></th> <th>구분</th> <th>특허명</th> <th>출원/등록번호</th> <th>출원/등록일</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>특허출원</td> <td>사과 및 배에 발생하는 바이러스 및 바이로이드 감염 다중 진단을 위한 프라이머 세트 및 진단방법</td> <td>10-2018-0092501</td> <td>2018. 08. 08</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>특허출원</td> <td>포도에서 발생하는 3종의 바이러스 검출을 위한 프라이머 세트 및 이를 이용하는 바이러스 검출 방법</td> <td>10-2019-0029369</td> <td>2019. 03. 14</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>특허출원</td> <td>사과줄기혹바이러스 검출용 프라이머 세트 및 이를 이용한 사과줄기 바이러스병 진단방법</td> <td>10-2019-0108959</td> <td>2019. 09. 03.</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>특허등록</td> <td>배 바이러스를 검출하기 위한 재조합-중합효소 증폭 반응용 프라이머 조성물 및 이의 이용</td> <td>10-2020-0046090</td> <td>2020. 4. 16.</td> </tr> </tbody> </table> <p>○ 제품화 (사업화)</p> <table border="1" data-bbox="438 947 1431 1232"> <thead> <tr> <th></th> <th>사업화명</th> <th>제품명</th> <th>업체명</th> <th>사업화형태</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>포도바이러스 진단키트</td> <td>PCheckIM Virus Detection kit(Grape)</td> <td>(주)넥스바이오</td> <td>상품화</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>사과 및 배 바이러스 진단 키트</td> <td>PCHEK virus detection kit(A&amp;P)</td> <td>(주)넥스바이오</td> <td>상품화</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>복숭아 바이러스 진단키트</td> <td>PCHEK Virus Detection kit(Peach)</td> <td>(주)넥스바이오</td> <td>상품화</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>감귤 바이러스 동시 진단키트</td> <td>PCHEK Virus Detection kit(Mandarin)</td> <td>(주)넥스바이오</td> <td>상품화</td> </tr> </tbody> </table> <p>○ 기술이전</p> <table border="1" data-bbox="438 1285 1431 1379"> <thead> <tr> <th></th> <th>사업화명</th> <th>제품명</th> <th>업체명</th> <th>사업화형태</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>사과바이러스 5종 진단 RT-PCR kit</td> <td>PCHEK Virus/viroid Detection Kit(A&amp;P)</td> <td>(주)넥스바이오</td> <td>상품화</td> </tr> </tbody> </table> <p>○ 기술실시</p> <table border="1" data-bbox="438 1433 1431 1800"> <thead> <tr> <th></th> <th>기술명</th> <th>실시기관</th> <th>기술 실시일</th> <th>기술실시권 유형</th> <th>유무상 여부</th> <th>기술유형</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>사과 및 배에 발생하는 바이러스 및 바이로이드 감염 다중 진단을 위한 프라이머 세트 및 진단방법</td> <td>(주)미소진</td> <td>2018.08.31</td> <td>통상실시권</td> <td>유상</td> <td>특허출원</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>상동</td> <td>(주)넥스바이오</td> <td>2018.09.01</td> <td>통상실시권</td> <td>유상</td> <td>특허출원</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>상동</td> <td>(주)캔서롭</td> <td>2018.09.01</td> <td>통상실시권</td> <td>유상</td> <td>특허출원</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>상동</td> <td>(주)넥스바이오</td> <td>2018.11.01</td> <td>통상실시권</td> <td>유상</td> <td>특허출원</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>상동</td> <td>(주)미소진</td> <td>2018.11.01</td> <td>통상실시권</td> <td>유상</td> <td>특허출원</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>상동</td> <td>(주)캔서롭</td> <td>2018.11.06</td> <td>통상실시권</td> <td>유상</td> <td>특허출원</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>포도에서 발생하는 3종의 바이러스 검출을 위한 프라이머 세트 및 이를 이용하는 바이러스 검출 방법</td> <td>(주)미소진</td> <td>2019.04.04</td> <td>통상실시권</td> <td>유상</td> <td>특허출원</td> </tr> </tbody> </table> <p>○ 학술대회 발표: 32건          ○ 논문 : 6건          ○ 인력양성 : 5명          ○ 정책시행 1건, 정책건의 3건          ○ 홍보 및 전시 : 홍보 2건</p>		구분	특허명	출원/등록번호	출원/등록일	1	특허출원	사과 및 배에 발생하는 바이러스 및 바이로이드 감염 다중 진단을 위한 프라이머 세트 및 진단방법	10-2018-0092501	2018. 08. 08	2	특허출원	포도에서 발생하는 3종의 바이러스 검출을 위한 프라이머 세트 및 이를 이용하는 바이러스 검출 방법	10-2019-0029369	2019. 03. 14	3	특허출원	사과줄기혹바이러스 검출용 프라이머 세트 및 이를 이용한 사과줄기 바이러스병 진단방법	10-2019-0108959	2019. 09. 03.	4	특허등록	배 바이러스를 검출하기 위한 재조합-중합효소 증폭 반응용 프라이머 조성물 및 이의 이용	10-2020-0046090	2020. 4. 16.		사업화명	제품명	업체명	사업화형태	1	포도바이러스 진단키트	PCheckIM Virus Detection kit(Grape)	(주)넥스바이오	상품화	2	사과 및 배 바이러스 진단 키트	PCHEK virus detection kit(A&P)	(주)넥스바이오	상품화	3	복숭아 바이러스 진단키트	PCHEK Virus Detection kit(Peach)	(주)넥스바이오	상품화	4	감귤 바이러스 동시 진단키트	PCHEK Virus Detection kit(Mandarin)	(주)넥스바이오	상품화		사업화명	제품명	업체명	사업화형태	1	사과바이러스 5종 진단 RT-PCR kit	PCHEK Virus/viroid Detection Kit(A&P)	(주)넥스바이오	상품화		기술명	실시기관	기술 실시일	기술실시권 유형	유무상 여부	기술유형	1	사과 및 배에 발생하는 바이러스 및 바이로이드 감염 다중 진단을 위한 프라이머 세트 및 진단방법	(주)미소진	2018.08.31	통상실시권	유상	특허출원	2	상동	(주)넥스바이오	2018.09.01	통상실시권	유상	특허출원	3	상동	(주)캔서롭	2018.09.01	통상실시권	유상	특허출원	4	상동	(주)넥스바이오	2018.11.01	통상실시권	유상	특허출원	5	상동	(주)미소진	2018.11.01	통상실시권	유상	특허출원	6	상동	(주)캔서롭	2018.11.06	통상실시권	유상	특허출원	7	포도에서 발생하는 3종의 바이러스 검출을 위한 프라이머 세트 및 이를 이용하는 바이러스 검출 방법	(주)미소진	2019.04.04	통상실시권	유상	특허출원
	구분	특허명	출원/등록번호	출원/등록일																																																																																																																	
1	특허출원	사과 및 배에 발생하는 바이러스 및 바이로이드 감염 다중 진단을 위한 프라이머 세트 및 진단방법	10-2018-0092501	2018. 08. 08																																																																																																																	
2	특허출원	포도에서 발생하는 3종의 바이러스 검출을 위한 프라이머 세트 및 이를 이용하는 바이러스 검출 방법	10-2019-0029369	2019. 03. 14																																																																																																																	
3	특허출원	사과줄기혹바이러스 검출용 프라이머 세트 및 이를 이용한 사과줄기 바이러스병 진단방법	10-2019-0108959	2019. 09. 03.																																																																																																																	
4	특허등록	배 바이러스를 검출하기 위한 재조합-중합효소 증폭 반응용 프라이머 조성물 및 이의 이용	10-2020-0046090	2020. 4. 16.																																																																																																																	
	사업화명	제품명	업체명	사업화형태																																																																																																																	
1	포도바이러스 진단키트	PCheckIM Virus Detection kit(Grape)	(주)넥스바이오	상품화																																																																																																																	
2	사과 및 배 바이러스 진단 키트	PCHEK virus detection kit(A&P)	(주)넥스바이오	상품화																																																																																																																	
3	복숭아 바이러스 진단키트	PCHEK Virus Detection kit(Peach)	(주)넥스바이오	상품화																																																																																																																	
4	감귤 바이러스 동시 진단키트	PCHEK Virus Detection kit(Mandarin)	(주)넥스바이오	상품화																																																																																																																	
	사업화명	제품명	업체명	사업화형태																																																																																																																	
1	사과바이러스 5종 진단 RT-PCR kit	PCHEK Virus/viroid Detection Kit(A&P)	(주)넥스바이오	상품화																																																																																																																	
	기술명	실시기관	기술 실시일	기술실시권 유형	유무상 여부	기술유형																																																																																																															
1	사과 및 배에 발생하는 바이러스 및 바이로이드 감염 다중 진단을 위한 프라이머 세트 및 진단방법	(주)미소진	2018.08.31	통상실시권	유상	특허출원																																																																																																															
2	상동	(주)넥스바이오	2018.09.01	통상실시권	유상	특허출원																																																																																																															
3	상동	(주)캔서롭	2018.09.01	통상실시권	유상	특허출원																																																																																																															
4	상동	(주)넥스바이오	2018.11.01	통상실시권	유상	특허출원																																																																																																															
5	상동	(주)미소진	2018.11.01	통상실시권	유상	특허출원																																																																																																															
6	상동	(주)캔서롭	2018.11.06	통상실시권	유상	특허출원																																																																																																															
7	포도에서 발생하는 3종의 바이러스 검출을 위한 프라이머 세트 및 이를 이용하는 바이러스 검출 방법	(주)미소진	2019.04.04	통상실시권	유상	특허출원																																																																																																															
<p>연구개발성과의</p>	<p>- 과수 무병묘 생산 유통의 현대화에 활용</p>																																																																																																																				

<p>활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 새로운 과수 바이러스 동정으로 신규 진단법 개발에 활용</li> <li>- 과수 바이러스의 복합 유전체 분석 기술의 개발로 농임업 분야 지원에 활용</li> <li>- 신종 또는 미기록 바이러스 효율적인 탐색 효과</li> <li>- 농산물 수출입 관련 정책 지원 효과</li> </ul>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	바이러스	과수	검출	유묘	바이로이드
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	VIRUS	FRUIT TREE	DETECTION	SEEDLING	VIROID

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....	1
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	5
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	190
4. 연구결과의 활용 계획 등 .....	196
붙임. 참고 문헌 .....	197

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

<본문작성 양식>

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- 과수류(사과, 포도, 감귤, 배, 복숭아 등) 바이러스 감염실태 조사에 근거한 바이러스 신속 진단 기술 개발을 통한 산업 경쟁력 제고
- 과종별 주요 바이러스 진단용 키트(현장진단용 및 정밀진단용) 개발
- 과수 바이러스 발생 및 피해현황 분석에 의한 바이러스 무병묘 생산-공급 체계 개선 방안 도출
- 과수 바이러스 감염실태 조사, 피해현황 분석, 바이러스 정밀 및 현장 검사법 개발을 통한 과수 묘목 검사대상 바이러스의 현행화 기반 조성



1-2. 연구개발의 필요성

가. 연구의 배경

○ 지금까지 바이러스 무병 과수묘목 생산 방식은 열처리, 조직배양, 항바이러스제 처리 등을 기반으로 이루어져 왔으나, 실제로 농가에 공급되는 묘목은 대부분 바이러스에 감염된 것으로 최근 확인되고 있음.



○ 전 세계적으로 과수류에서 많은 신종 및 변종 바이러스들이 최근에 보고되고 있으며, 국내 과수 유전자원에서도 이러한 신종 및 변종 바이러스에 대부분 감염된 것으로 최근 확인되었음.

○ 과수 묘목의 바이러스 감염은 국내 무병묘 생산시스템의 문제점, 바이러스 정밀진단기술의 부재, 감염 바이러스 종류 및 피해해석의 미비, 과수묘목 인증시스템의 부재 등에 기인하고 있음.

## 나. 연구개발 대상의 국내·외 현황

### (1) 국내 기술 수준 및 시장 현황

#### (가) 기술현황

○ 국내 과수 바이러스병은 30여종 이상이 보고되어 있으며 모자이크, 점목불친화, 착색불량, 기형과 등의 이상증상을 일으켜 과실의 품질과 수량을 저하시킴.

○ 과수 바이러스 감염률('09~'13) : 사과 47.6%, 배 29%, 포도 47.3%, 복숭아 65.1%, 단감 0.4%

○ 포도잎말림바이러스(GLRaV-3) 감염피해 : 2.7°Bx 당도 저하, 안토시아닌 50% 감소

○ 과수 바이러스 진단용 DNA칩 개발을 위해 사과, 포도, 복숭아 바이러스 유전정보를 시퀀싱한 결과 바이러스 47종, 바이로이드 7종이 분석됨. 하지만 이때 사용한 시료는 유전자원의 소수 시료를 대상으로 조사한 내용으로 바이러스 유전정보만을 분석하여 DNA칩에 활용함('14~'16, 국립원예특작과학원, 한국생명공학연구원 공동연구 수행).

○ 식물검역 금지급인 PPV 발생을 NGS기술을 이용하여 동정하였으며 바이러스 감염 개체는 국가관리 병해충 규정에 의거하여 공적 방제를 실시하고 있음('15, 경북대)

○ 국내 복숭아 과원에서 2종의 바이로이드, PLMVd, HSVd 동정하고 보고함('15~'16, 서울대)

○ 농촌진흥청과 한국생명공학연구원의 공동연구로 바이러스 진단용 대용량·다목적 올리고 칩을 개발되었으며, 이 진단용 칩은 식물바이러스 430종을 하나의 칩으로 동시 진단할 수 있음

#### (나) 지식재산권 현황

○ 바이러스 진단법과 관련하여 국내 연구진은 PCR, DNA 칩, 혈청학적 진단법, 차세대염기서열 분석 기술(NGS) 등의 지식재산권을 확보하고 있어, 세계 최고의 바이러스 진단기술을 갖추고 있음.

#### (다) 표준화현황

○ 과수 바이러스 무병묘 인증을 위한 바이러스 진단관련 표준 검사법은 지정되어 있지 않음

○ 과수 바이러스에 대한 개별적 진단법은 기관 및 연구실에 따라 제각기 사용되고 있음

○ 과수 무병묘 인증에 필요한 검사대상 바이러스의 종류와 진단법은 표준화되어 있지 않은 실정임

#### (라) 기타현황

○ 정부는 FTA 대응전략으로 과수산업 경쟁력을 강화하기 위한 과수 무병묘 생산·유통 활성화 방안을 추진하고 있음('16, 농림축산식품부)

○ 국내 무병묘 공급 : ('15) 3.8% → ('20) 30 → ('25) 80

## (2) 국외 기술 수준 및 시장 현황

### (가) 기술현황

○ 국외에서는 2009년 식물 바이러스 연구에 NGS분석을 도입한 이후 과수에서도 일본, 미국, 이탈리아 등에서 신종 바이러스 동정 및 피해해석 관련 연구를 수행하고 있음

○ 특히 포도의 경우 NGS 분석 연구가 가장 많이 되고 있는데 미국에서 포도 잎붉은 반점을 일으키고 당도, 산도를 저하시키는 주요 원인 바이러스 GRBaV를 '12년 최초로 동정하였고 현재 캘리포니아 주의 포도원에서는 GLRaV를 지속적으로 예찰하고 박멸하기 위한 프로그램을 실시하고 있음

○ 과수 바이러스의 NGS는 핵산추출 방법에 따라 total RNA, small RNA, dsRNA로 사용할 수 있으며, 최근에는 infectious clone을 만들어 식물체에 접종한 후 병원성 검정 및 피해해석에 대한 연구도 활발히 수행되고 있음

○ 미국의 ARS 및 FPS (Foundation Plant Services)는 수입된 과수 묘목류 등의 검역과 무병묘 생산을 위한 진단 방법의 일환으로 NGS 분석기술을 도입하고 있음

○ 현장진단 기술로 감귤바이러스(ASGV), 핵과류 바이러스(PPV)의 면역 크로마토그래피 카세트와 복숭아 바이로이드(PLMVd) LAMP 진단 기술이 보고됨('09, 일본, 그리스)

○ 현장진단 키트는 과수작물의 경우 ArMV, GLRaV-3, PPV 3종에 대해 Agdia와 Bioreba에서 판매되고 있음

### (나) 기타현황

○ 국가기관과 민간기관과의 역할 분담 및 상호협력시스템으로 무병묘 생산공급체계를 구축함 (네델란드 낙탄바우와 VNL, 이탈리아 라임부르그시험장과 KSB)

## 1-3. 연구개발의 중요성

### ○ 과수재배 농업현장

- 농업현장에서 바이러스 감염에 의한 경제적 피해는 수세 약화에 따른 생육 부진 및 생산량 감소, 과실의 이상증상에 따른 품질저하, 병해충 저항성 약화, 다양한 이상증상으로 인한 불필요한 영양제 및 작물보호제의 살포 등으로 나타남.

- 다년생 작물인 과수에서 바이러스의 피해는 수령이 올라갈수록 점차적으로 증가하는 경향이 있으며, 농업인은 재배초기에 바이러스 감염여부를 알지 못하고 본격적인 수확기에 접어들면 다양한 이상증상의 출현으로 큰 경제적 피해를 입게 됨.

- 과채류 작물과는 달리 다년생 작물의 특성으로 바이러스 감염주를 쉽게 제거하지 못하고, 제거하더라도 본격적인 수확까지 수년의 시간이 소요되어 이중적인 피해를 입게 됨.

- 농업인이 재배 중에 바이러스 병의 피해를 막는 것은 바이러스의 특성으로 불가능하며, 반드시 무병묘가 공급되어야만 이러한 피해를 예방할 수 있음. 현재는 농업인이 정부 또는 특정 기관이 인증하는 바이러스 무병묘를 공급 받을 수 없는 실정에 있음.

### ○ 과수 바이러스 무병묘 생산 및 유통

- 과수 바이러스 무병묘 생산을 위해서는 바이러스 free 유전자원에서 출발되어야 하며, 이러한 유전자원의 확보는 정부차원에서 지원이 이루어져야 함.

- 바이러스 무병묘 생산을 위해서는 과수묘목 유전자원으로부터 감염된 바이러스의 종류와 특성을 조사하여 무병묘 생산 과정에 도입되어야 함.
- 현재는 생산된 묘목으로부터 열처리, 조직배양, 항바이러스제 처리 등을 통하여 무병묘를 선발하는 방식을 취하고 있으나, 바이러스의 특성으로 볼 때 이러한 무병묘 생산방식은 바이러스를 불활성화시키기 어려운 큰 문제점을 가지고 있음.
- 과수 바이러스 무병묘 생산시스템을 개선하여 바이러스에 감염되지 않은 유전자원 및 대목을 먼저 육성하고 격리하여 관리하면서, 이들 바이러스 무병 과수 유전자원들로부터 품종을 육성하고, 증식한 다음 인증대상 바이러스의 검사를 통하여 바이러스 무병묘를 생산하는 체계로 개선이 필요함.
- 과수 무병묘의 유통은 유전자원, 원원종, 원종, 보급종 각 단계별로 적정 수준의 검사 및 인증시스템이 도입되어야 함.

○ 과수 바이러스 무병묘 인증시스템 도입

- 과수 바이러스 무병묘 인증시스템 도입을 위하여 인증대상 바이러스의 선정이 이루어져야 함.
- 인증대상 바이러스의 선정은 농가에서 경제적 피해가 크거나, 검역적으로 중요한 바이러스 등을 우선적으로 고려하여 이루어져야 함.
- 그러나 현재는 이러한 인증대상 바이러스의 선정을 위한 바이러스의 종류와 특성 분석이 제대로 되어 있지 않음.

○ 과수 바이러스 신속진단 기술 개발

- 과수류에 감염되어 있는 바이러스의 종류 조사가 완료되고, 개별 바이러스에 진단법이 확보되어야 하며, 효율적인 진단을 위한 작물별 및 단계별 진단시스템이 개발되어야 함.
- 과수 바이러스 진단의 목적에 따라, 가장 정밀한 수준의 진단법, 효율적 사용을 위한 과종별 통합 진단법, 대량 시료에 대한 진단법, 현장간이진단법 등의 개발이 이루어져야 함.

**1-4. 연구개발 범위**

- 5대 과종, 사과(대목), 배, 복숭아, 포도, 감귤의 바이러스 및 바이로이드 발생 현황 조사
- 과수 바이러스 및 바이로이드의 신속 현장 진단 기술 개발
- 과수 바이러스 및 바이로이드 정밀 진단 키트 개발
- 과수 바이러스 및 바이로이드 무병묘 인증 시스템 도입
- 검사 대상 바이러스 및 바이로이드 종자관리 요강 현행화를 위한 정책 제안

## 2. 연구수행 내용 및 결과

<주관연구기관 - 한국생명공학연구원>

### ○ 1차 사과 대목 시료의 수집

사과 생산 주산 지역으로부터 사과대목 시료를 무작위로 수집하였음. 사과대목은 야생형으로써 실제 바이러스에 감염된 경우에도 병징이 관찰하기 매우 곤란하기 때문에 무작위로 수집하였음. 56개 시료를 사과 재배 포장이 산재한 충청북도, 경상북도, 강원도에서 수집하였음. 사과 재배 농민들에게 품종을 문의하였으나 확인이 불가능하였음. 56개 시료로부터 핵산을 추출하여 paired-end RNA sequencing 약 30Gb의 데이터를 생산하였음. 전체적인 결과를 요약하면 사과 품종에서 발생하는 바이러스와 중 수준에서 비슷한 양상을 나타내었음. 그러나 기존에 전 세계적으로 보고되지 않은 신종 바이러스로 추정되는 바이러스가 존재하는 것으로 확인되었음.

표 1. 56개 사과 대목의 NGS (paired-end RNA sequencing) 방법에 의하여 확보된 데이터의 전체적인 개요.

Statistics or Features	Data
Yield (Gbp)	36.32
No. of raw reads	359,632,374
Total bases (bp)	36,322,869,774
GC rate (%)	44.0
Base rate more than Q30 (%)	91.5

표 2. 56개 사과 대목의 paired-end RNA sequencing 방법에 의하여 확보된 데이터 가공 결과의 전체적인 개요.

Summary	Data
Number of reads	359,632,374
Number of reads after cleaning	359,011,988
Number of reads for assembly after initial filtering of plant mRNAs	61,828,618
Number of contigs assembled	267,825
Max length of contigs (bp)	16,999
Min length of contigs (bp)	201
Average length of contig (bp)	811
Total length of contigs (bp)	217,171,190

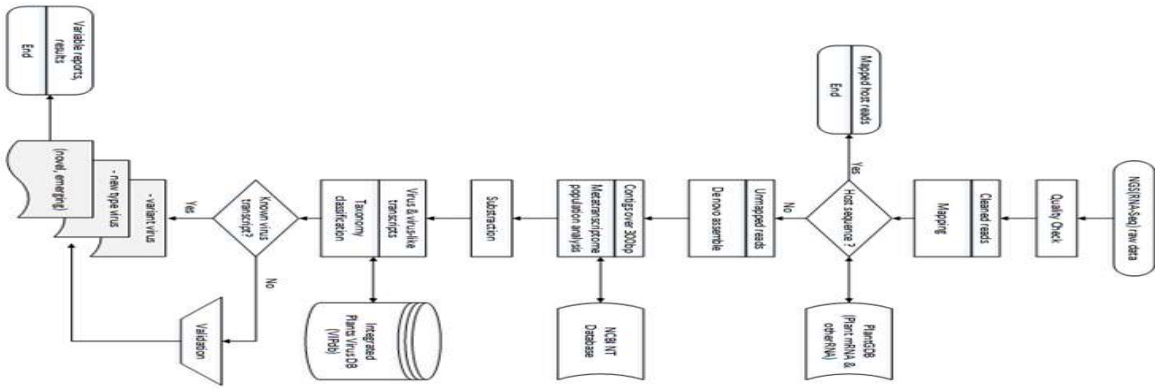


그림 1. Work flow for paired-end RNA sequencing.

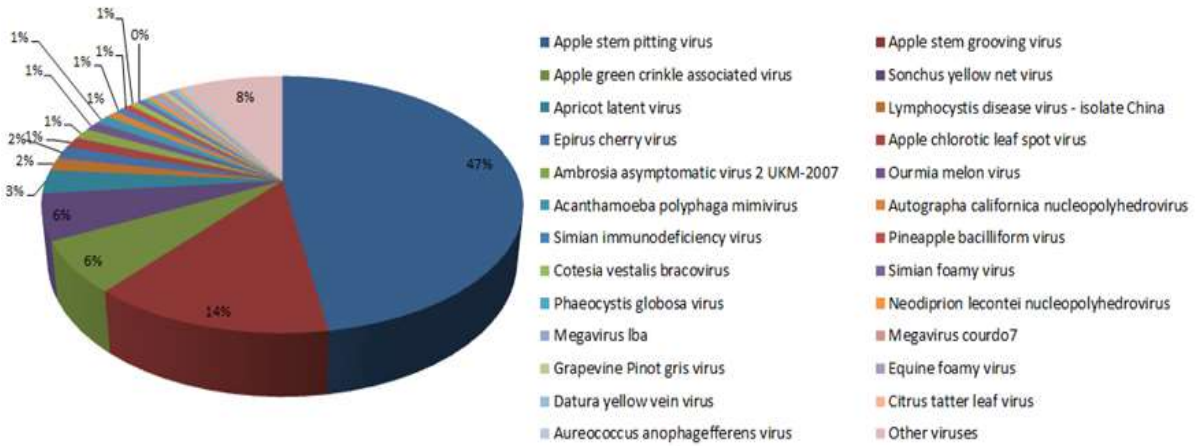


그림 2. Family level에서 분석된 contigs의 비율. 대부분 사과 및 배에서 발생하는 바이러스인 *betaflexiviridae*의 비율이 74%로 예상과 유사한 결과가 나타났음.

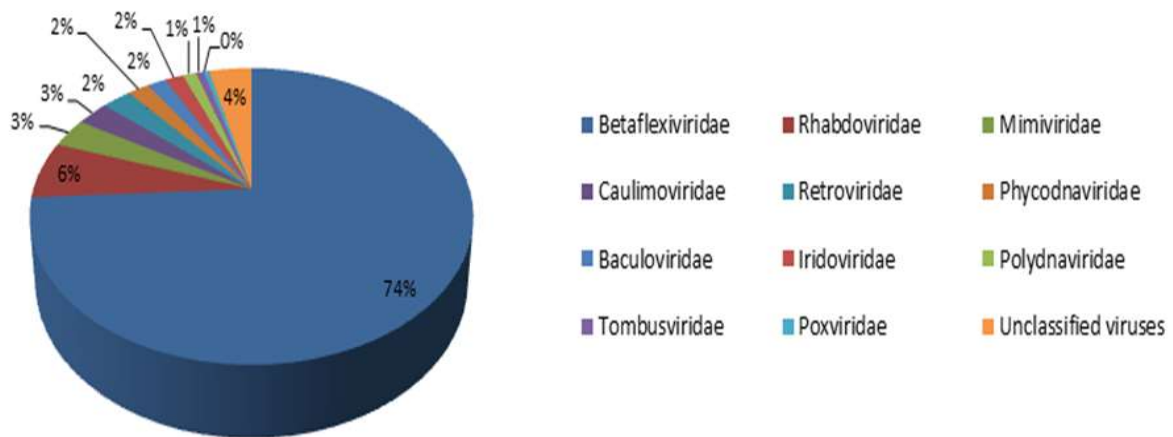


그림 3. Genus level에서 분석된 contigs의 비율. 대부분 사과 및 배에서 발생하는 바이러스인 *betaflexivirus*의 비율이 57%로 예상과 유사한 결과가 나타났음.

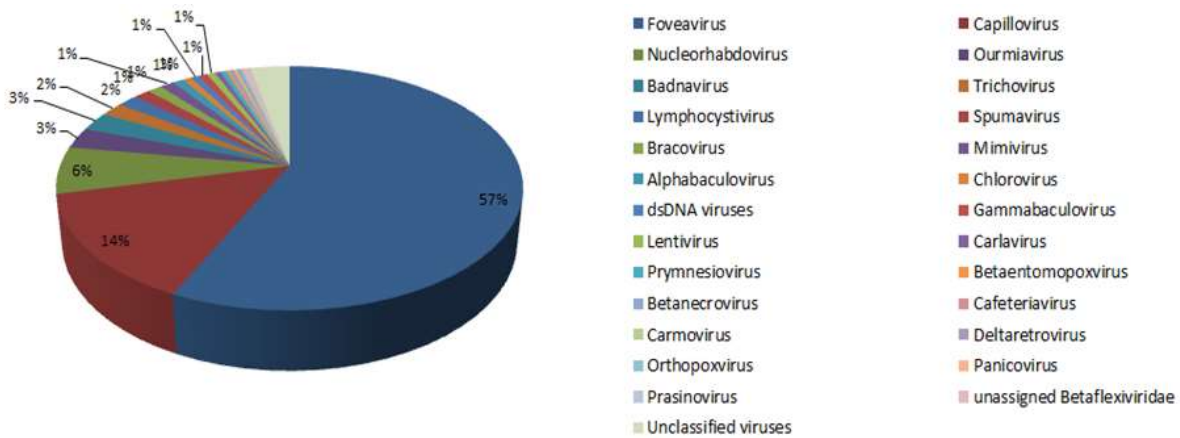


그림 4. Species level에서 분석된 contigs의 비율. *Apple stem pitting virus*, *apple stem grooving virus*, *apple green crinkle associated virus*, *apricot latent virus*, *apple chlorotic leaf spot virus*의 비중이 약 70%로 예상과 유사한 결과가 나타났음. *Nucleorhabdovirus*인 *sonchus yellow net virus*는 신종 바이러스로 추정됨.

#### ○ 사과 대목 감염 신종 바이러스의 전체 게놈 서열 확인

사과 생산 주산 지역으로부터 수집된 사과대목 시료를 분석하여 확보된 11kb 크기의 contig을 blastx 또는 blastn 조사 결과 *sonchus yellow net nucleorhabdovirus*로 annotation 되었으며 아미노산 수준에서 66%의 상동성을 나타냈음. 11kb 크기의 contig의 전체 coverage는 15%로 매우 낮아서 전 세계적으로 보고되지 않은 신종 바이러스로 확인 될 것으로 추정됨. 전체 56개 시료 가운데 3개의 시료에서 상기 신종 바이러스가 감염된 것을 RT-PCR로 확인하였음.

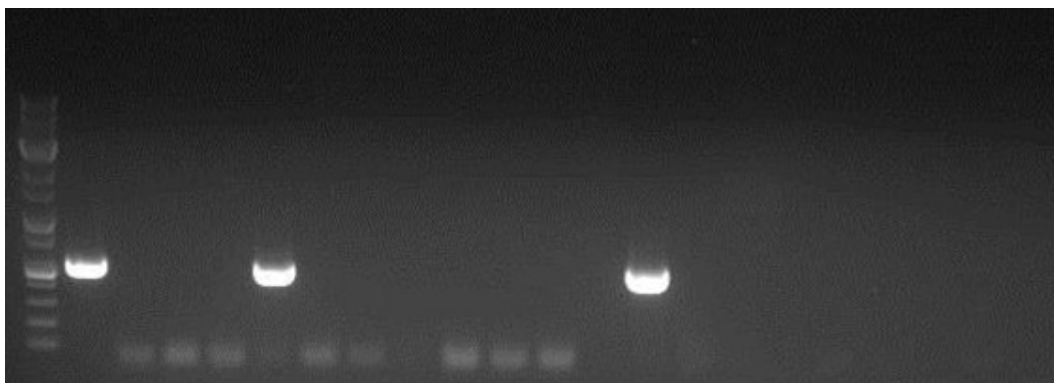


그림 5. 56개 시료를 RT-PCR에 의하여 진단한 결과 3개의 시료가 감염된 것으로 최종 확인되었음.

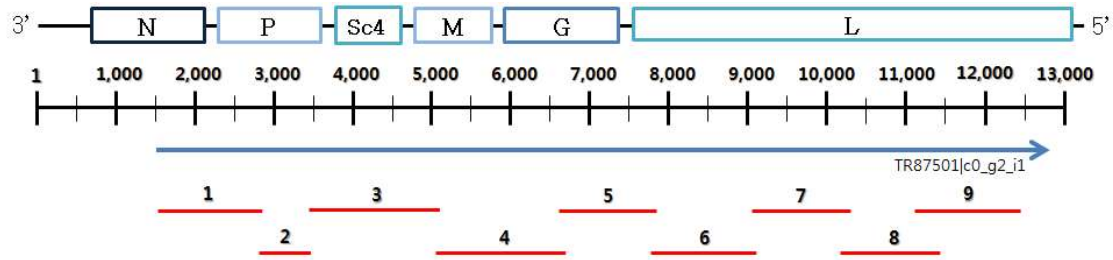


그림 6. 11kb contig를 중복된 9개 영역으로 나누어 RT-PCR product를 sequencing하여 염기서열을 모두 확인하였으며 양 말단 서열은 RACE 실험을 수행하여 전체 게놈의 염기서열을 결정할 예정이다.

표 3. 각 식물 감염 virus별 contig의 분포.

Species	Number of contigs (bigger than 0.5kb)
Apple stem pitting virus	205
Apple stem grooving virus	59
Apple green crinkle associated virus	28
Sonchus yellow net virus	25
Apricot latent virus	13
Epirus cherry virus	7
Apple chlorotic leaf spot virus	6
Pineapple bacilliform virus	3
Grapevine pinot gris virus	1
Datura yellow vein virus	1
Tobacco necrosis virus D	1
Pear black necrotic leaf spot virus	1
Cherry rusty mottle associated virus	1

### ○ 2차 사과 대목 시료의 수집

사과 생산 주산 지역으로부터 사과대목으로 가장 널리 사용되는 M9 대목시료 21개를 충청남북도, 전라북도, 경상북도, 강원도 포장에서 수집하였음. 또한 국립원예특작과학원 사과연구소 시험 포장에서 재배되는 10개 서로 다른 대목 품종을 수집하였음. 이들 31개 시료로부터 핵산을 추출하여 paired-end RNA sequencing 약 30Gb의 데이터를 생산하고 있음. 현재 데이터의 생산 및 분석이 완료되면 사과대목 바이러스의 종류 및 분포를 확인할 계획임.



그림 7. 국립원예특작과학원 사과연구소에서 재배되는 서로 다른 사과대목 품종 사진.

## ○ 2차 사과 대목 시료의 수집 및 사과 대목 바이러스 진단

### 1. 사과 대목의 시료 수집

1차년도 사과 대목 (ottawa11, ottawa13, ottawa5M, P1, MM10, MM102, MM115, JM7, M5, M7) 수집에 더하여 당해 연도인 2018년 2차년도에는 국내 사과 재배에 널리 활용되는 사과 대목인 M9 및 M26 사과 대목을 사과연구소 유전자원 포장 및 충청남북도, 전라북도, 경상북도, 강원도 일대 포장에서 추가로 무작위로 20점을 수집하였음(그림 1). 사과대목은 야생형으로써 실제 바이러스에 감염된 경우에도 병징이 관찰하기 매우 곤란하기 때문에



무작위로 수집하였음. 전년도에 보고된 paired-end RNA sequencing 약 30Gb의 데이터를 활용하여 각 개별 시료의 바이러스 감염 실태를 조사하였음.

Contig ID	Annotation (BLASTn)	Primer	Sequence (5'-3')	Expected size (bp)
726702	ACLSV	726702_For	GTCTCTTACCCAACTTTTGA	410
		726702_Rev	ATGCTGACGAACAAGCAGTC	
1012480	AGCaV	1012480_For	GAAGTTCAGCCCGATTGT	510
		1012480_Rev	GGTGGAAATAGCTGAATCTC	
93549	AGCaV	93549_For	AAGTGTAAGTCAACTGCAG	720
		93549_Rev	CTGTATGAGACATTGATTGT	
281674	ASGV	281674_For	AGACTTGGGTCAITGGCAATAAT	630
		281674_Rev	TGGCTCCTTGIAAAGCTCCGAT	
540265	ASGV	540265_For	TCTTGACATGGAAAAGAATG	430
		540265_Rev	ACATGCTAGAGTTTGGCCAG	
846750	ASGV	846750_For	AATCTCTGGG CATGTACAAT	760
		846750_Rev	GACACGTCAA AGTCGTCCCT	
34776	ASGV	34776_For	CACCATCAAGCTTCAGATGACGT	403
		34776_Rev	TCAACATGGGACCAAATCTGAAC	
121616	ASPV	121616_For	GGAATCAGATTATGAGGCAT	680
		121616_Rev	CACATATCTGAAATTGAGAT	
271566	ASPV	271566_For	TCACTCAACTGGAAGGATGACTT	840
		271566_Rev	GTCAAGGAAGACTAGGTTACCATGA	
273023	ASPV	273023_For	GTAATGGCTCCACTTCGGCTCTT	490
		273023_Rev	TCATGTCCAGGCACACTTTCAAC	
307196	ASPV	307196_For	AGTACACCCTTTGGGACAGCATAAC	644
		307196_Rev	ACTGCTCTGTGGTGATATCACCA	
320605	ASPV	320605_For	GAATGTGAATTGTCAGATTGAC	420
		320605_Rev	TATTACACATCCATTACGG GC	
343250	ASPV	343250_For	GAGTCTGATTATGAGGCTTTTGAT	456
		343250_Rev	CCAGATTCTTAGTCTCTCTGGC	
417032	ASPV	417032_For	CAATCCGTGGTGCTATACCTTC	493
		417032_Rev	GTCGGCAACATATTTGTGTTCA	
188422	ASPV	188422_For	GATGATCACAGCAAGAATAG	710
		188422_Rev	TTGATGAAAGTGTAATCGGC	
89192	ASPV	89192_For	GGTCTTCTTTCATGATGAG	700
		89192_Rev	ACCACTTTAAAGTTTCTAGA	
136415	ASPV	136415_For	TATAGCCTTCCCAGGGGATT	530
		136415_Rev	CAGTTCTAGGTAAACCAGCC	
141873	ASPV	141873_For	TATTATGGGCTTGAGGCTGTGCG	580
		141873_Rev	ATACCTCATGTATGGAGCAAATC	
204809	ASPV	204809_For	TGGATGTGTGATAAGAGCAATCGC	530
		204809_Rev	CGAATGTACCCAGAATCATTATCA	
302849	ASPV	302849_For	GAAGTCTAAAGGCTGCAACATTG	634
		302849_Rev	CCGGGAGATTTTTGATGAA	
305081	ASPV	305081_For	GAA GCTGTGAGAG CTCAATGGGT	353
		305081_Rev	GCATGCACTGCATCACTCATCA	
86056	ASPV	86056_For	TGGGATCGTCTCAAGATCTATC	580
		86056_Rev	ATGATCAGGGTCAATAATATCCT	
281854	ASPV	281854_For	ACTTGGTCGTGCG CGAAGTTGAC	372
		281854_Rev	TGGAAGCTCGATCAATTGATGGT	
65587	ApLV	65587_For	GGCTGAGAGGTATGAGTCCA	650
		65587_Rev	CGATCAAGTCTGGAGGGAGC	
116777	ApLV	116777_For	AGATCATCCTTCCAGTTGAG	430
		116777_Rev	TCTTCAAATGGATTTCGAGGCT	

그림 8. 사과에 발생하는 바이러스로부터 제작된 5종 바이러스 진단용 프라이머 24세트. 바이러스 검출 결과 apple stem pitting virus는 P1, ottawa11, ottawa5M, MM115, M10, M5에서 검출되었음. apricot latent virus는 ottawa5M, MM115, M10, M5에서 검출됨. 따라서 사과에 발생하는 바이러스의 일부는 사과 대목에서도 동일하게 발생하고 있음을 확인할 수 있었음.

2. 사과 대목 유래 바이러스의 진단

표 3. 사과 대목 NGS 정보를 바탕으로 사과 대목 감염 11종 바이러스 진단 프라이머 세트.

No	Virus	Primer name	sequence	Expect size	No	Virus	Primer name	sequence	Expect size
1	ACLSV	DN6050-ACLSV For	ACAGAACGCCACAAGAAGAAC	212bp	7	ChALV	DN31223-ChALV For	CAAATCGAGCAAGAGGAGGC	443bp
		DN6050-ACLSV Rev	GCAACCAGGGTGAGAGTGAT				DN31223-ChALV Rev	TTTGCCAGTCCAACAAGTCG	
2	ApLV	DN36385-ApLV For	TAGTGCGATGAGGTTCTGG	101bp	8	CTLaV	DN64080-CTLaV For	AAAAGCTGGCAAACCTCTGG	71bp
		DN36385-ApLV Rev	TGGCACCCATCTCGAAACTA				DN64080-CTLaV Rev	TGTACCGCATGTAAGGAGCA	
3	ASGV	DN3696-ASGV For	GCCCACCAGAGTAGATGAGT	500bp	9	CTLV	DN42887-CTLV For	GCAGGCGTTCAAAGAGGAT	88bp
		DN3696-ASGV Rev	CCGGGTCAACTTCTTCCTCA				DN42887-CTLV Rev	GTAGTCTCTTCTTGATTCTCA	
4	ASPV	DN31625-ASPV For	GGTTAGTATGGGCCCTACC	486bp	10	ARWV	DN29028-For	CCACTTGCTTACTGTTTCTGC	617bp
		DN31625-ASPV Rev	GTACACCCCTCAGTCTGCTT				DN29028-Rev	TGGACCATGCAGCATATGAA	
5	PSV	DN170-PSV For	AGGTTAATTCCTCCCGCA	526bp	11	CTLV	DN53145-For	TGCCTTCCAAGCTGAATCCA	231bp
		DN170-PSV Rev	TGTACCCAGGACGACACTTC				DN53145-Rev	TTGTAGGACCTGCAGCTTGA	
6	AGCa	DN35017-AGCaV For	ACTTGATCGCCGTACCTTCA	497bp					
		DN35017-AGCaV Rev	ATGCTCCCTCTGAAACCCAA						

사과연구소 유전자원 포장에서 수집된 12계통의 사과 대목에서 발생하는 바이러스 진단 결과 11종의 바이러스 모두가 검출되었으며, 각 계통별 바이러스의 감염 바이러스는 현재 실험이 진행되고 있음. 각 지역으로부터 수집된 사과 대목 M9 및 M26 시료에서도 11종의 바이러스가 모두 검출되었음. 따라서 사과에 발생하는 바이러스 모두 사과 대목에서 발생 하였으며 사과에서는 발생하지 않고 사과 대목에서만 발생하는 바이러스는 신종 nucleorhabdovirus, apple rubbry wood virus, cherry associated luteovirus, cherry twisted leaf associated virus인 것으로 나타났음(그림 2)

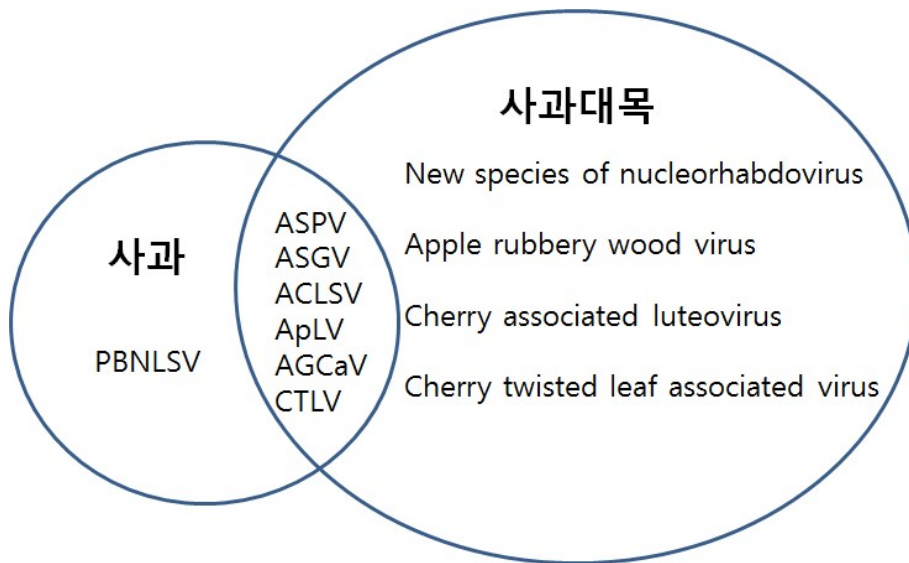


그림 9. 사과에 발생하는 바이러스 및 본 연구에서 확인된 사과 대목에 발생하는 바이러스의 비교. 사과 및 사과 대목에서 공통적으로 발생하는 바이러스는 6종으로 ASPV, ASGV, ACLSV, ApLP, AGCaV, CTLV이며 사과에서만 발생하는 바이러스는 배에서 발생하는 바이러스인 PBNLSV이며 사과 대목에서만 발생하는 바이러스는 신종, ARWV, ChAV, CTLaV인 것으로 나타났음.

### 3. 사과 대목으로부터 종자 전염 바이러스의 확인

사과연구소 유전자원 포장에서 수집된 계통들 가운데 종자의 확보가 가능한 8계통 (P1, ottawa11, ottawa13, ottawa5M, JM7, MM10, M5, MM102)를 활용하여 약 100여개의 종자를 받아시켜 발아된 사과 대목 유묘 시료를 확보하였음. 표1에 기재된 프라이머 세트를 활용하여 종자 전염 바이러스를 확인한 결과 JM7 계통의 유묘에서 AGCaV가 검출되었음. 따라서 최소한 JM7 계통의 AGCaV는 종자 전염을 통하여 후대에 감염을 일으키는 것으로 나타났음.

### 4. 사과 대목 감염 신종 바이러스의 전체 게놈 서열 완성

전년도에 사과 생산 주산 지역으로부터 수집된 사과대목 시료를 분석하여 확보된 11kb 크기의 contig을 blastx 또는 blastn 조사 결과 sonchus yellow net nucleorhabdovirus로 annotation 되었으며 아미노산 수준에서 66%의 상동성을 나타냈음 (그림 3). 11kb 크기의 contig의 전체 coverage는 15%로 매우 낮아서 전 세계적으로 보고되지 않은 신종 바이러스로 확인 될 것으로 추정됨. 1차년도에 전체 56개 시료 가운데 3개의 시료에서 상기 신종 바이러스가 감염된 것을 RT-PCR로 확인하였음. 따라서 당해 연도에는 11kb 크기의 contig를 활용하여 RACE 및 inverse PCR 기법으로 최종적으로 14,043bp의 전체 게놈을 완성하였음.

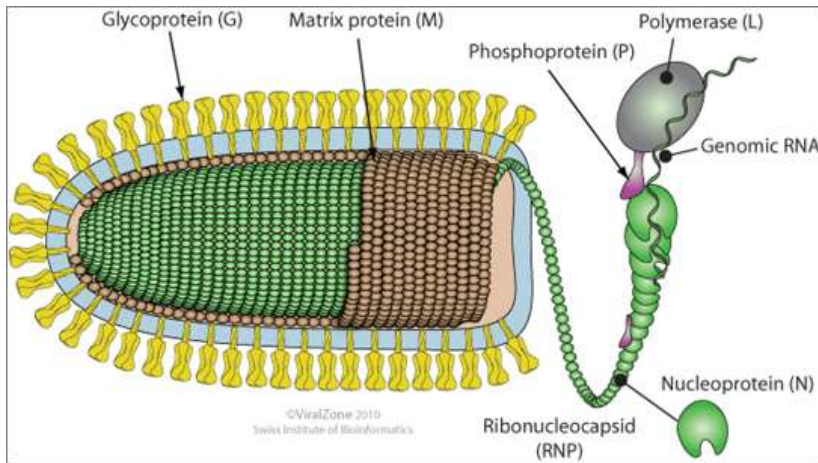


그림 10. 사과 대목에 발생하는 nucleorhabdovirus의 모식도. 동물 및 식물을 감염하는 바이러스로 11~15kb negative single-stranded RNA 게놈을 가지고 있으며 외피 단백질은 glycoprotein으로 구성된 envelope로 덮여 있음.

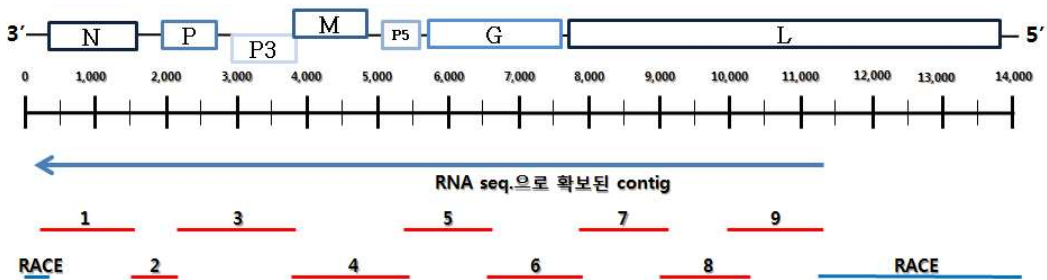


그림 11. 사과 대목에서 확보된 11kb contig를 RT-PCR로 재확인한 이후 RACE에 의하여 14kb 전체 게놈이 완성되었음.

전체 게놈을 분석한 결과 기존에 알려진 nucleorhabdovirus가 가진 6개의 ORF에 더하여 ORR M과 ORF G의 사이에 추가적인 ORF가 하나 더 존재하는 것으로 확인하였음. 또한 nucleorhabdovirus의 공통적인 특징인 nuclear targeting sequence를 가지고 있는 것으로 나타났음.

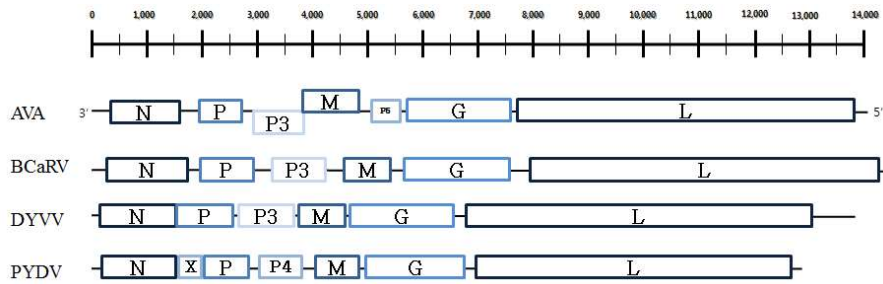


그림 12. 사과 대목에서 분리된 신종 바이러스 apple rootstock virus A(AVA) 및 기존에 알려진 nucleorhabdovirus의 게놈 구성의 비교. AVA의 경우 ORF P5가 추가로 존재하는 것으로 확인됨.

표 3. AVA와 기존에 알려진 nucleorhabdovirus가 가진 ORF와의 비교. 알려진 모든 nucleorhabdovirus 각각의 ORF 아미노산 서열의 크기는 유사하지만, AVA의 경우 각각의 ORF는 상동성 비교에서 coverage가 16%로 매우 낮게 나타나 신종으로 판명되었음.

Virus (accession number)	Genome (nt)	Length				
		Nucleoprotein (N) (aa)	Phosphoprotein(P) (aa)	Matrix protein (M) (aa)	Glycoprotein (G) (aa)	RdRp(L) (aa)
AVA	14,043	450	317	321	649	2,057
BCaRV (MF543022)	14,432	468	326	276	641	2,106
DYVV (NC028231)	13,188	450	327	284	642	2,106
PYDV (NC016136)	12,875	472	280	253	607	1,931

### ○ 3차 사과 대목 시료의 수집

#### 1. 사과 대목의 시료 수집

1차 년도 사과 대목 (ottawa11, ottawa13, ottawa5M, P1, MM10, MM102, MM115, JM7, M5, M7) 수집에 더하여 2018년 2차 년도에는 국내 사과 재배에 널리 활용되는 사과 대목인 M9 및 M26 사과 대목을 사과연구소 유전자원 포장 및 충청남북도, 전라북도, 경상북도, 강원도 포장에서 추가로 무작위로 20점을 수집하였음(그림 1). 당해 연도인 2019년 3차 년도에는 군위, 청송, 봉화 등 경북지역, 강원지역인 홍천, 춘천, 전북지역인 장수 무주 등의 일반농가, 사과연구소, 일반농가, 및 백두대간 국립수목원 인근 사과대목을 추가로 수집하였음(그림 2). 1, 2차 년도 사과 대목 바이러스 조사를 위하여 RT-PCR 및 차세대염기서열 분석에 의하여 사과보다 더 많은 총 17종의 바이러스 및 바이로이드를

검출하였음. 3, 4차 년도에는 기존에 검출된 바이러스의 및 바이로이드 가운데 어떠한 바이러스 및 바이로이드가 우점종인지 분석하고 대목으로 사용되고 있지 않은 꽃 사과에서 발생하는 바이러스 및 바이로이드에 대해서도 차세대염기서열 방식으로 분석할 예정임.

## 2. 사과 대목 바이러스 진단

3차년도에 수집된 약 500개체의 꽃 사과 시료는 대목 및 사과에 발생하는 22종 바이러스 및 바이로이드 primer를 활용하여 개별 RT-PCR에 의한 검출 반응이 10,000 이상의 반응이 요구되므로 시간 및 비용을 고려하여 전체 시료를 pooling 방식으로 처리하고 next generation sequencing(Illumina platform : Nova-seq.)분석을 위하여 시료를 준비하여 차년도 상반기에 이르기까지 분석할 예정임. 2차 년도까지 협동기관인 경북대학교와 협력 연구를 통하여 각각 사과 또는 사과대목 감염 바이러스 및 바이로이드와 사과와 사과 대목에 공통적으로 감염하는 바이러스 및 바이로이드의 양상을 보면 실제 사과대목에서 더욱 많은 바이러스 및 바이로이드가 검출되고 있음. 따라서 본 연구를 통하여 사과 및 사과 대목에 공통적으로 발생하는 바이러스 및 바이로이드는 8종으로 나타났으며 사과에만 발생하는 것은 14종, 사과대목에만 발생하는 것은 17종으로 나타났음 (그림 3). 따라서 실제 대목으로 활용되는 M9 등의 사과대목에 대한 바이러스 및 바이로이드 양상을 깊이 있게 조사하여 grafting을 통하여 대목으로부터 사과로 전염되는 통로를 미연에 방지할 필요성이 있음.

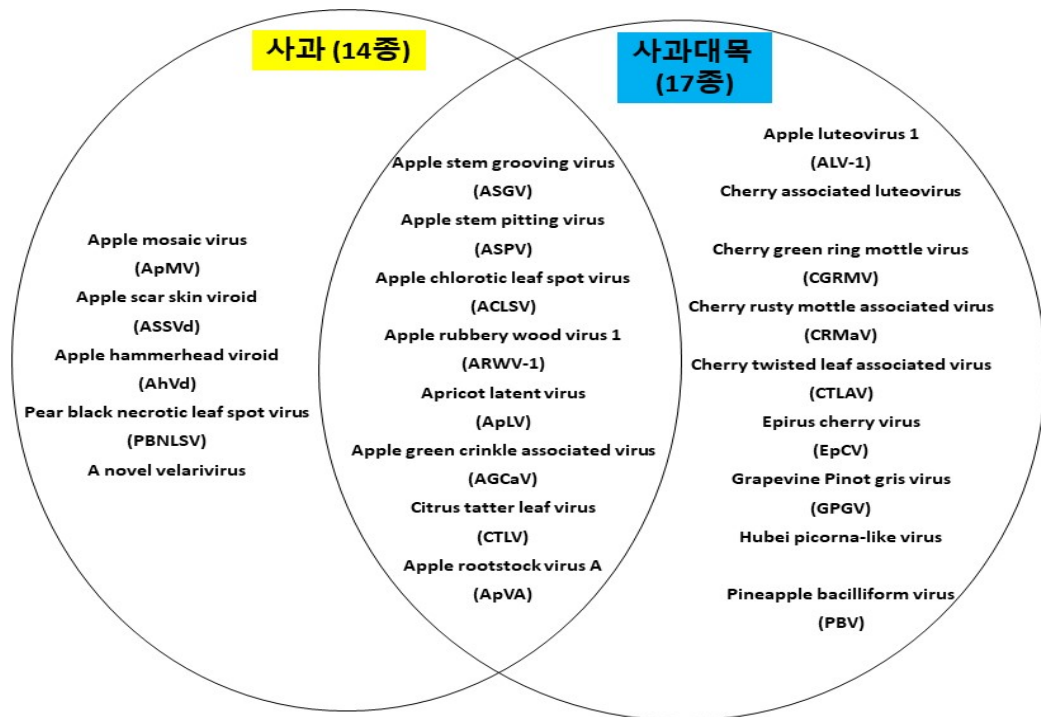


그림 13. 국내에 분포하는 사과 및 사과대목 바이러스 및 바이로이드. 17~20년도에 걸쳐 수집된 사과와 사과대목을 개별 시료 진단 및 차세대 염기서열 방법에 의하여 분석한 결과 각각 또는 공통으로 발생하는 바이러스는 총 8종이며 특이한 점은 사과에서 2종이 보고된

바이로이드, ASSVd 및 AhVd, 는 사과대목에서는 검출되고 있지 않음.

○ 사과(대목) 바이러스의 신속 현장 진단

사과(대목)에 발생하는 바이러스 3종에 대하여 신속 현장 진단 기술을 개발하였음. 기존에 개발된 진단 기술은 핵산 증폭 반응과 발색의 과정이 단계별로 분리되어 수행되었으나, 최근 개발된 Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 방식은 한 단계로 통합되어 수행되고 있음. 일반 PCR과 다르게 등온에서 양 말단 고리를 형성하여 증폭이 가능한 LAMP 방식의 핵심 요소는 가닥을 치환 할 수 있는 DNA 중합효소이며 최근에 진보된 PCR 대응 방법인 Recombinase Polymerase Amplification (RPA) 방식이 활용되기 시작하고 있음. 반응을 위한 방법 및 반응에 사용된 6개의 프라이머 염기서열은 특허 출원 중으로 보고서에 기재하지 않았음.

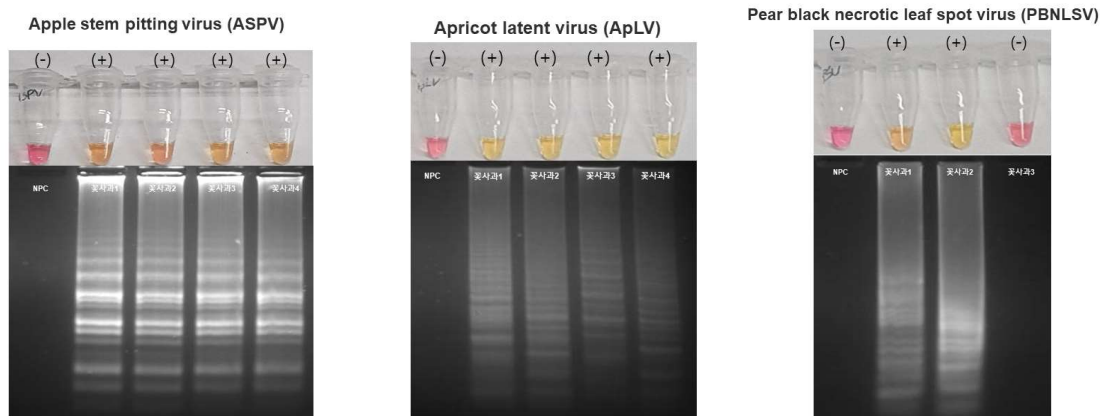


그림 14. 사과(대목)에 많이 발생하는 바이러스 3종 신속 현장 진단. NPC:No primer control. 등온 50°C에서 60분간 반응한 결과. 기존의 방식은 반응 종료 후 dye를 추가로 첨가하여 발색 반응으로 양성 또는 음성으로 판정하였으나 그림에서 보이는 반응 용액은 반응 종료와 동시에 변색 반응으로 양/음성 시료를 판별

## ○포도 전국 주산지 주요 바이러스 감염주 채집 및 바이러스 진단

### 1. 포도 전국 주산지 주요 바이러스 감염주 채집

- 2018년 6월부터 8월까지 경산, 영동, 김천, 안성, 화성, 춘천 6곳에서 다양한 이상증상을 보이는 포도 시료 53점을 확보함(표 1).

표 4. 포도 채집지역, 채집일자 및 품종별 채집시료 수<sup>1</sup>

채집지역	주소	채집일자	품종명	포도 채집시료 수	
				잎	계
경산	경산시 농업기술센터 (A농장)	18.06.27	거봉	4	4
			샤인머스켓	4	4
			자옥	4	4
			캠벨얼리	4	4
			흑보석	4	4
			MBA	4	4
영동	(B농장)	18.08.24	알 수 없음	5	5
김천	(C농장)	18.08.30	샤인머스켓	13	13
안성	(D농장)	18.08.31	거봉	1	1
			스켓오브알렉산드리아	1	1
화성	(E농장)	18.08.31	캠벨얼리	2	2
			알 수 없음	2	2
춘천	(F농장)	18.09.1	샤인머스켓	2	2
			알 수 없음	3	3
<b>계</b>	<b>6개 농장</b>		<b>7품종</b>	<b>53</b>	<b>53</b>

<sup>1</sup>채집된 시료는 감염 바이러스 및 바이로이드의 RT-PCR 진단과 집단전사체 분석의 시료로 사용하기 위하여 용도별로 포장하여 초저온냉동 보관중임.

### 2. 포도 주요 바이러스 진단법 확보 및 감염 실태 조사

- 포도 26종에 대한 바이러스 및 바이로이드 RT-PCR 진단을 실시함(표 2).

표 5. 포도에서 진단대상 바이러스 및 바이로이드 목록<sup>1</sup>



진단대상 바이러스 및 바이로이드	약어
<i>Australian grapevine viroid</i>	AGVd
<i>Citrus viroid VI</i>	CVd-VI
<i>Citrus yellow mosaic virus</i>	CIYMV
<i>Hop stunt viroid</i>	HSVd
<i>Grapevine fanleaf virus</i>	GFLV
<i>Grapevine fleck virus</i>	GFKV
<i>Golden shiner virus</i>	GsV
<i>Grapevine Syrah virus-1</i>	GSyV-1
<i>Grapevine red blotch-associated virus</i>	GRBaV
<i>Grapevine rupestris stem pitting-associated virus</i>	GRSPAV
<i>Grapevine rupestris vein feathering virus</i>	GRVfV
<i>Grapevine Leafroll-associated Virus-1</i>	GLRaV-1
<i>Grapevine Leafroll-associated Virus-2</i>	GLRaV-2
<i>Grapevine Leafroll-associated Virus-3</i>	GLRaV-3
<i>Grapevine yellow speckle viroid-1</i>	GYSVd-1
<i>Grapevine yellow speckle viroid-1B</i>	GYSVd-1B
<i>Grapevine virus A</i>	GVA
<i>Grapevine virus B</i>	GVB
<i>Grapevine virus D</i>	GVD
<i>Grapevine virus E</i>	GVE
<i>Grapevine virus F</i>	GVF
<i>Grapevine virus Q</i>	GVQ
<i>Rupestris stem pitting associated virus</i>	RSPaV
<i>Rupestris stem pitting associated virus-1</i>	RSPaV-1
<i>Tobacco bushy top virus</i>	TBTV
<i>Tobacco mosaic virus</i>	TMV

<sup>1</sup>포도는 국내 발생하고 있는 주요 병원체 및 집단전사체 분석에서 검출된 26종의 병원체에 대하여 RT-PCR 진단을 실시하였음.

- 포도를 재배하는 전국 6개 지역에서(경기 화성, 안성; 강원 춘천; 충북 영동; 경북 경산, 김천) 에서 채집한 포도 53점에 대하여 RT-PCR 진단을 실시한 결과, AGVd 13점, CIYMV 21점, HSVd 53점, GFKV 28점, GSyV-1 46점, GRSPAV 13점, GRVfV 1점, GLRaV-2 2점, GLRaV-3 25점, GYSVd-1 39점, GVE 16점, RSPaV 19점, RSPaV-1 23점이 검출되었음. 결과적으로 53점 모두 바이러스가 검출되었으며, 품종별로 감염된 바이러스 및 바이로이드의 차이를 보임(표 3).

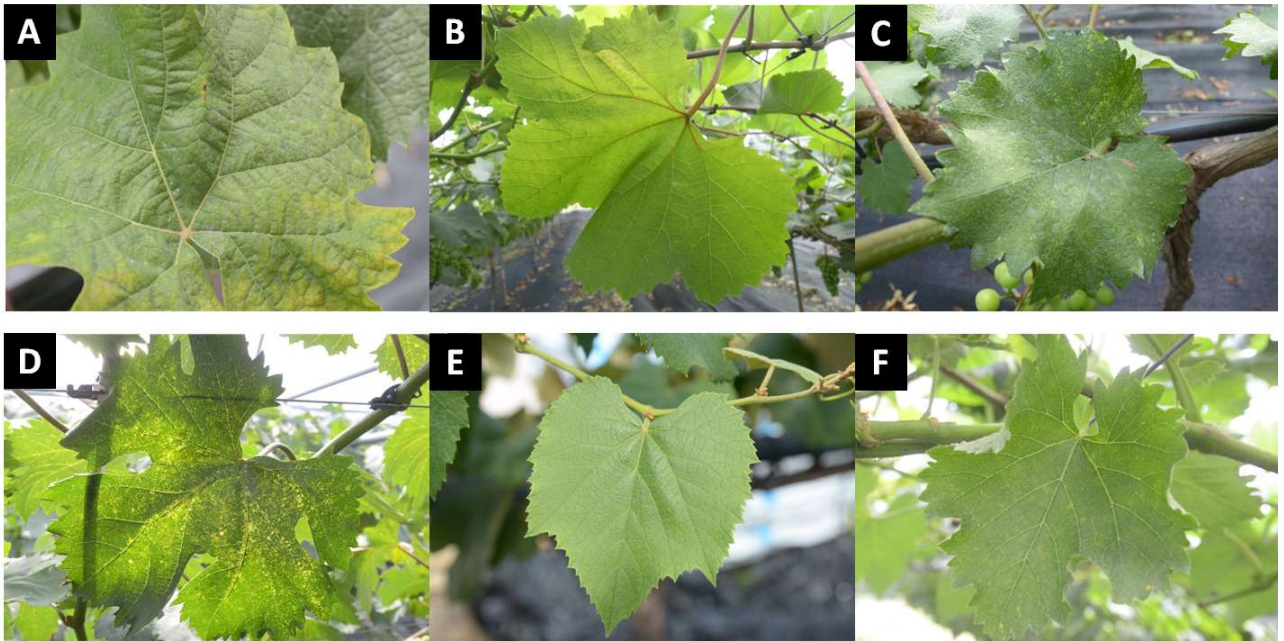


그림 15. 경산에서 채집한 다양한 포도품종에서 발견되는 바이러스 병으로 의심되는 증상. A: 샤인머스켓에서 보이는 황화; B: MBA에서 보이는 황화; C: 거봉에서 보이는 흰색반점; D: 자옥에서 보이는 노란반점; E: 캠벨얼리에서 보이는 위축; F: 흑보석에서 보이는 흰색반점.



그림 16. 경기 화성, 안성 강원 춘천, 충북 영동, 경북 김천에서 채집한 다양한 포도 품종에서 수집된 바이러스 이병 의심 증상.

표 6. 지역별 채집한 포도 품종별 바이러스 및 바이로이드 RT-PCR 진단결과<sup>1</sup>

	지역														계 6지역
	안성		화성		춘천		영동		경산				김천		
	거 봉	알 수 없 음	캠 벨 얼 리	알 수 없 음	샤 인 머 스 켓	알 수 없 음	알 수 없 음	거 봉	자 옥	샤 인 머 스 켓	캠 벨 얼 리	흑 보 석	M B A	샤 인 머 스 켓	
채집시료수	1	1	2	2	2	3	5	4	4	4	4	4	4	13	53
검출시료수	1	1	2	2	2	3	5	4	4	4	4	4	4	13	53
AGVd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	12	13
CIYMV	1	-	1	-	1	3	5	1	3	4	4	3	-	-	21
HSVd	1	1	2	2	2	3	5	4	4	4	4	4	4	13	53
GFKV	1	-	-	-	2	3	2	-	3	-	-	2	2	13	28
GSyV-1	1	1	2	2	2	3	5	4	4	3	4	4	4	7	46
GRSPAV	-	-	1	-	2	2	-	-	-	4	3	-	-	1	13
GRVfV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
GLRaV-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	2
GLRaV-3	1	1	-	-	2	2	1	-	1	3	-	-	2	12	25
GYSVd-1	1	1	1	-	2	3	4	4	4	4	4	4	4	13	39
GVE	-	1	-	-	1	1	-	-	-	2	-	-	-	11	16
RSPaV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	2	-	13	19
RSPaV-1	-	-	1	-	2	2	-	-	-	4	-	1	-	13	23

<sup>1</sup>AGVd: Australian grapevine viroid; CIYMV: Citrus yellow mosaic virus; HSVd: Hop stunt viroid; GFKV: Grapevine fleck virus; GSyV-1: Grapevine Syrah virus-1; GRSPAV: Grapevine rupestris stem pitting-associated virus; GRVfV: Grapevine rupestris vein feathering virus; GLRaV-2: Grapevine leafroll-associated virus-2; GLRaV-3: Grapevine Leafroll-associated virus-3; GYSVd-1: Grapevine yellow speckle viroid-1; GVE: Grapevine virus E; RSPaV: Rupestris stem pitting associated virus; RSPaV-1: Rupestris stem pitting associated virus-1.

표 7. 포도 품종별 바이러스 및 바이로이드 RT-PCR 진단결과<sup>1, 2</sup>

	품종명							계
	거봉	자옥	샤인머스켓	캠벨얼리	흑보석	MBA	알 수 없음	
채집시료수	5	4	19	6	4	4	11	53
검출시료수	5	4	19	6	4	4	11	53
AGVd	-	-	13	-	-	-	-	13
CIYMV	2	3	5	5	3	-	5	21
HSVd	5	4	19	6	4	4	11	53
GFKV	1	3	17	-	2	2	5	28
GSyV-1	5	4	12	6	4	4	11	46
GRSPAV	-	-	7	4	-	-	2	13
GRVfV	-	-	1	-	-	-	-	1
GLRaV-2	-	-	-	-	2	-	-	2
GLRaV-3	1	1	17	-	-	2	4	25
GYSVd-1	5	4	19	5	4	4	8	39
GVE	-	-	14	-	-	-	2	16
RSPaV	-	-	17	-	2	-	-	19
RSPaV-1	-	-	19	1	1	-	2	23

<sup>1</sup>샤인머스켓 품종이 다른 품종보다 검출된 바이러스 및 바이로이드 종류가 현저히 많음.

<sup>2</sup>AGVd: Australian grapevine viroid; CIYMV: Citrus yellow mosaic virus; HSVd: Hop stunt viroid; GFKV: Grapevine fleck virus; GSyV-1: Grapevine Syrah virus-1; GRSPAV: Grapevine rupestris stem pitting-associated virus; GRVfV: Grapevine rupestris vein feathering virus; GLRaV-2: Grapevine leafroll-associated virus-2; GLRaV-3: Grapevine Leafroll-associated virus-3; GYSVd-1: Grapevine yellow speckle viroid-1; GVE: Grapevine virus E; RSPaV: Rupestris stem pitting associated virus; RSPaV-1: Rupestris stem pitting associated virus-1.

### ○포도 시료의 수집 및 분석

전년도에 이어서 농가 포장에서 재배되는 포도 시료를 수집하였음. 포도의 품종, 병징의 수준을 고려하지 않고 포도 주산지 옥천, 영동, 및 송산 지역을 중심으로 지역별 약 200점을 수집하였음. 이들 가운데 15~20점을 선발하여 27종의 포도 바이러스에 대해 RT-PCR 방법으로 바이러스를 검출하였음(표 2, 3). 포도 바이러스 및 바이로이드 검출에 사용되지 않은 시료들은 next generation sequencing(Illumina platform : Nova-seq.)분석을 위하여 활용되고 있음.

표 8. 국내에서 발생하는 포도 바이러스 및 바이러이드 27종 및 진단 바이러스 및 바이로이드 리스트

No.	Virus	Abb.	Primer	size (bp)
1	<i>Australian grapevine viroid</i>	AGVd	AGVd-like-For/Rev	242
2	<i>Citrus viroid VI</i>	CVd-VI	CVd-VI-like-For/Rev	176
3	<i>Citrus yellow mosaic virus</i>	CIYMV	CIYMV-like-G207-F/R	424
4	<i>Hop stunt viroid</i>	HSVd	HSVd-like-For/Rev	185
5	<i>Grapevine fanleaf virus</i>	GFLV	GRL-C30/N120	699
6	<i>Grapevine fleck virus</i>	GFkV	GFkV-like-G283-F/R	349
7	<i>Golden shiner virus</i>	GsV	GsV-like-322-F/R	448
8	<i>Grapevine Syrah virus-1</i>	GSyV-1	GSyV-1-G311-F/R	425
9	<i>Grapevine red blotch-associated virus</i>	GRBaV	GRBaV-like-G125-F/R	436
10	<i>Grapevine rupestris stem pitting-associated virus</i>	GRSPAV	GRSPAV-like-G309-F/R	474
11	<i>Grapevine rupestris vein feathering virus</i>	GRVfV	GRVfV-like-G225-F/R	151
12	<i>Grapevine leafroll-associated virus-1</i>	GLRaV-1	GLRaV-like-G122-F/R	477
13	<i>Grapevine leafroll-associated virus-2</i>	GLRaV-2	GLRaV-like-G355-F/R	439
14	<i>Grapevine leafroll-associated virus-3</i>	GLRaV-3	GLRaV-like-G213-F/R	413
15	<i>Grapevine yellow speckle viroid-1</i>	GYSVd-1	GYSVd-1-like-For/Rev	243
16	<i>Grapevine yellow speckle viroid-1B</i>	GYSVd-1B	GYSVd-1B-like-For/Rev	215
17	<i>Grapevine virus A</i>	GVA	GVA-like-G174-F/R	486
18	<i>Grapevine virus B</i>	GVB	GVB-like-G213-F/R	423
19	<i>Grapevine virus D</i>	GVD	GVD-like-G145-F/R	158
20	<i>Grapevine virus E</i>	GVE	GVE-like-G128-F/R	165
21	<i>Grapevine virus F</i>	GVF	GVF-like-G288-F/R	173
22	<i>Grapevine virus Q</i>	GVQ	GVQ-like-G32-F/R	373
23	<i>Rupestris stem pitting associated virus</i>	RSPaV	RSPaV-like-G305-F/R	457
24	<i>Rupestris stem pitting associated virus-1</i>	RSPaV-1	RSPaV-1-like-G307-F/R	498
25	<i>Tobacco bushy top virus</i>	TBTv	TBTv-like-322-F/R	425
26	<i>Tobacco mosaic virus</i>	TMV	TMV-like-191-F/R	451
27	<i>Tomato spotted wilt virus</i>	TSWv	TSW-CI/N1	1,019

표 9. 국내에서 발생하는 포도 바이러스 진단 결과. 옥1~20:옥천에서 수집된 포도 시료, 영1~20:영동에서 수집된 포도 시료, 송1~15:송산에서 수집된 포도 시료, 범머1~2:범전면에서 수집된 야생머루, 춘머:춘양면에서 수집된 야생머루, 김유1~2:김천에서 수집된 포도 유묘, 청옥:평창 청옥산에서 수집된 자생머루. 재배포도의 경우 최소 3종, 최대 7종의 바이러스 및 바이로이드 감염 양상을 보이고 있음. 김천에서 수집된 포도 유묘는 9종의 바이러스 및 바이로이드에 복합 감염되어 있었음. 해발 500~1,000m 지역의 범전, 춘양, 및 평창 청옥산에서 수집된 자생머루의 경우 1~3종의 바이러스 및 바이로이드에 감염되어 재배 포도 대비 상대적으로 복합 감염률이 매우 낮은 것으로 나타났음.

	GRSPAV	GLRaV1	GLRaV2	GLRaV3	GVA	GVB	TSWV	GVD	GVE
옥1	-	-	-	○	-	-	-	-	-
옥2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
옥3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
옥4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
옥5	-	-	-	○	-	-	-	-	-
옥6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
옥7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
옥8	-	-	-	○	-	-	-	-	-
옥9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
옥10	-	-	-	○	-	-	-	-	-
옥11	-	-	-	○	-	-	-	-	-
옥12	-	-	-	○	-	-	-	-	-
옥13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
옥14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
옥15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
옥16	-	-	-	○	-	-	-	-	-
옥17	-	-	-	○	-	-	-	-	-
옥18	-	-	-	-	-	-	-	-	-
옥19	-	-	-	-	-	-	-	-	-
옥20	-	-	-	○	-	-	-	-	-
영1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
영2	-	-	-	○	-	-	-	-	-
영3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
영4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
영5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
영6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
영7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
영8	-	-	-	○	-	-	-	-	-
영9	-	-	-	○	-	-	-	-	-
영10	-	-	-	○	-	-	-	-	-
영11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
영12	-	-	-	○	-	-	-	-	-
영13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
영14	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	GRSPAV	GLRaV1	GLRaV2	GLRaV3	GVA	GVB	TSWV	GVD	GVE
영15	-	-	-	○	-	-	-	-	-
영16	-	-	-	○	-	-	-	-	-
영17	-	-	-	○	-	-	-	-	-
영18	-	-	-	○	-	-	-	-	-
영19	-	-	-	-	-	-	-	-	-
영20	-	-	-	○	-	-	-	-	-
송1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
송2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
송3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
송4	-	-	-	○	-	-	-	-	-
송5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
송6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
송7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
송8	-	-	-	○	-	-	-	-	-
송9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
송10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
송11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
송12	-	-	-	○	-	-	-	-	-
송13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
송14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
송15	-	-	○	-	-	-	-	-	-
법머1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
법머2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
춘머	-	-	○	-	-	-	-	-	-
김유1	○	-	-	○	-	-	-	-	-
김유2	○	-	-	-	-	-	-	-	-
청옥	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	GVP	GVQ	GSyV1	GFKV	RSPaV	GRVfV	GsV	RSPaV1	TBTv
옥1	-	-	-	○	-	-	-	-	-
옥2	-	-	○	○	-	-	-	-	-
옥3	-	-	-	○	-	-	-	-	-
옥4	-	-	○	○	-	-	-	-	-
옥5	-	-	-	○	-	-	-	-	-
옥6	-	-	-	○	-	-	-	-	-
옥7	-	-	-	○	-	-	-	-	-
옥8	-	-	○	○	○	-	-	-	-
옥9	-	-	-	○	-	-	-	-	-
옥10	-	-	-	○	-	-	-	-	-
옥11	-	-	-	-	○	-	-	-	-
옥12	-	-	○	○	-	-	-	-	-
옥13	-	-	-	○	-	-	-	-	-
옥14	-	-	-	○	-	-	-	○	-
옥15	-	-	-	○	-	-	-	○	-
옥16	-	-	-	○	-	-	-	-	-
옥17	-	-	-	○	-	-	-	-	-
옥18	-	-	○	○	-	-	-	-	-
옥19	-	-	-	○	-	-	-	-	-
옥20	-	-	-	○	-	-	-	-	-
영1	-	-	-	○	-	-	-	-	-
영2	-	-	-	○	-	-	-	-	-
영3	-	-	○	○	-	-	-	-	-
영4	-	-	-	-	○	-	-	-	-
영5	-	-	-	○	-	-	-	-	-
영6	-	-	○	○	-	-	-	-	-
영7	-	-	-	○	-	-	-	-	-
영8	-	-	-	○	○	-	-	-	-
영9	-	-	-	○	○	-	-	-	-
영10	-	-	-	○	-	-	-	-	-
영11	-	-	-	○	-	-	-	○	-
영12	-	-	-	○	-	-	-	-	-
영13	-	-	-	○	-	-	-	-	-
영14	-	-	○	○	-	-	-	-	-



	GvF	GvQ	GSyV1	GfKV	RSPaV	GRVfV	GsV	RSPaV1	TBTv
영15	-	-	-	○	-	-	-	-	-
영16	-	-	-	○	-	-	-	-	-
영17	-	-	-	○	-	-	-	-	-
영18	-	-	-	○	-	-	-	-	-
영19	-	-	-	○	-	-	-	-	-
영20	-	-	-	○	○	-	-	-	-
송1	-	-	-	○	-	-	-	-	-
송2	-	-	○	○	-	-	-	-	-
송3	-	-	-	○	-	-	-	-	-
송4	-	-	-	○	-	-	-	○	-
송5	-	-	-	○	-	-	-	-	-
송6	-	-	-	○	-	-	-	-	-
송7	-	-	○	○	-	-	-	-	-
송8	-	-	○	-	○	-	-	-	-
송9	-	-	-	○	-	-	-	-	-
송10	-	-	-	○	-	-	-	-	-
송11	-	-	-	○	-	-	-	-	-
송12	-	-	-	○	-	-	-	-	-
송13	-	-	-	○	-	-	-	-	-
송14	-	-	-	○	○	-	-	-	-
송15	-	-	-	○	-	-	-	-	-
법머1	-	-	-	○	-	-	-	-	-
법머2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
춘머	-	-	-	-	-	-	-	-	-
김유1	-	-	-	○	○	-	-	○	-
김유2	-	-	-	-	○	-	-	○	-
청옥	-	-	○	○	-	-	-	-	-

	TMV	AGVd	CVd-VI	HSVd	GYSVd1	GYSVd1B	CYIMV	GRBaV	PCV
옥1	-	-	-	○	○	-	○	-	-
옥2	-	-	-	○	-	-	○	-	-
옥3	-	-	-	○	-	-	○	○	-
옥4	-	-	-	○	○	-	○	-	-
옥5	-	-	-	○	○	-	○	-	-
옥6	-	-	-	○	○	-	○	-	-
옥7	-	-	-	○	○	-	○	-	-
옥8	-	-	-	○	○	-	○	-	-
옥9	-	-	-	○	○	-	○	-	-
옥10	-	-	-	○	○	-	○	-	-
옥11	-	-	-	-	○	○	○	-	-
옥12	-	-	-	○	○	-	○	-	-
옥13	-	-	-	○	○	-	○	-	-
옥14	-	-	-	○	○	-	○	-	-
옥15	-	-	-	○	○	○	-	-	-
옥16	-	-	-	○	○	-	○	-	-
옥17	-	-	-	○	○	-	○	-	-
옥18	-	-	-	○	○	-	○	-	-
옥19	-	-	-	○	○	-	○	-	-
옥20	-	-	-	○	○	-	○	-	-
영1	-	-	-	○	○	-	○	-	-
영2	-	-	-	○	○	-	○	-	-
영3	-	-	-	○	○	-	○	-	-
영4	-	-	-	○	○	-	○	-	-
영5	-	-	-	○	-	-	○	-	-
영6	-	-	-	○	○	-	○	-	-
영7	-	-	-	○	○	-	○	-	-
영8	-	-	-	○	○	-	○	-	-
영9	-	-	-	-	-	-	○	-	-
영10	-	-	-	-	○	-	○	-	-
영11	-	-	-	○	○	-	○	-	-
영12	-	-	-	○	○	-	○	-	-
영13	-	-	-	○	○	-	○	-	-
영14	-	-	-	○	○	-	○	-	-

	TMV	AGVd	Cvd-VI	HSVd	GYSVd1	GYSVd1B	CYIMV	GRBaV	PCV
영15	-	-	-	-	○	-	○	-	-
영16	-	-	-	○	○	-	○	-	-
영17	-	-	-	○	○	-	○	-	-
영18	-	-	-	○	○	-	○	-	-
영19	-	-	-	○	○	-	○	-	-
영20	-	-	-	○	○	-	○	-	-
송1	-	-	-	○	○	-	○	-	-
송2	-	-	-	○	○	-	○	-	-
송3	-	-	-	○	○	-	○	-	-
송4	-	-	-	○	○	-	-	-	-
송5	-	-	-	○	-	○	○	-	-
송6	-	-	-	○	○	-	○	-	-
송7	-	-	-	○	○	-	○	-	-
송8	-	-	-	○	○	-	○	-	-
송9	-	-	-	○	○	-	○	-	-
송10	-	-	-	○	○	-	○	-	-
송11	-	-	-	○	-	○	○	-	-
송12	-	-	-	-	○	-	○	-	-
송13	-	-	-	○	○	-	○	-	-
송14	-	-	-	○	○	-	○	-	-
송15	-	-	-	○	○	-	○	-	-
법머1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
법머2	-	-	○	-	-	-	-	-	○
춘머	-	-	-	-	-	○	○	-	-
김유1	-	-	-	○	○	-	○	○	-
김유2	-	-	-	○	-	-	○	-	-
청옥	-	-	-	-	-	○	-	○	-

재배 포도의 진단 결과 27종의 바이러스 및 바이로이드 가운데 바이러스 5종(GLRaV-3, GSYV-1, GFKV, RSPaV, CIYMV), 바이로이드 2종(HSVd, GYSVd-1)이 국내 포도에서 가장 빈번하게 분포하는 것으로 나타났다. 9종의 바이러스 및 바이로이드에 감염된 김천 유묘의 경우 심각한 수준의 병징을 관찰할 수 있음. 특징적으로 해발 고도가 높은 장소에서 자생하는 야생 포도의 경우 1~3종의 바이러스 및 바이로이드에만 감염되어 있었으며 재배 포도와 비교하면 매우 낮은 수준의 감염 수준을 나타내었음.(그림 4). 국내에서 약 30종의 바이러스 및 바이로이드가 발생하고 2018~2019년 조사에서 분석한 결과 포장에서는 우점적으로 발생하는 약 8종의 바이러스 및 바이로이드와 달리 높은 해발 지역에서 자생하는 머루의 경우 매우 낮은 감염률

을 보이고 있음. 따라서 해발 1,000고지 이상의 지역에서 자생하는 머루의 조사를 통하여 국내 토착균에 대한 분석을 할 예정임.

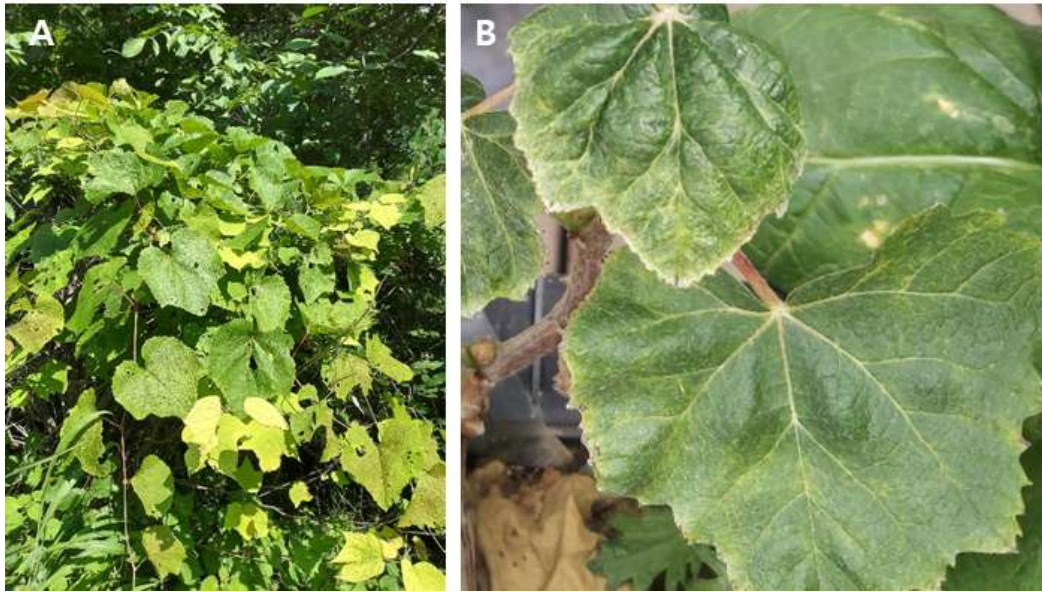


그림 17. A:평창군 소재 청옥산 해발 1,100m에서 수집된 자생머루, B:김천에서 수집된 9종의 바이러스 및 바이로이드 감염 포도 유묘.

### ○ 특징적인 바이러스 의심 증상 포도의 분석

영천 A농가에서 발생한 포도 과실에 나타나는 윤문형 바이러스 의심증상이 보고되어 추가적인 분석을 실시하였음(그림 5). 윤문 증상은 흔한 바이러스 감염 증상의 일종이지만 포도에서는 흔하게 관찰되는 바이러스 증상은 아닌 것으로 추정됨. 6종의 바이러스 및 바이로이드에 대한 검출 결과 윤문 증상을 나타내는 시료와 건전으로 보이는 시료에서 예상과 달리 건전 과실에서 더 높은 감염 양상을 보였음(표 4). 따라서 윤문 증상을 나타내는 포도 과실의 원인균인 바이러스 및 바이로이드 분석을 위하여 next generation sequencing(Illumina platform : Nova-seq.) 분석을 진행할 예정임.



그림 18. 영천 A농가에서 수집된 윤문 증상 포도 과실 및 건전 과실.

표 10. 영천 A농가에서 수집된 윤문 증상 포도(품종 NB)와 건전 과실의 비교.

시료번호	CIYMV	HSVd	GFkV	GSyV-1	GLRaV-3	GYSVd-1
발병1-잎	-	-	-	-	-	-
발병1-과실1	-	-	-	-	-	+
발병1-과실2	-	-	-	-	-	-
발병2-잎	-	-	-	-	-	+
발병2-과실1	-	-	+	-	-	+
발병2-과실2	-	-	-	-	-	-
발병3-잎	-	-	-	-	-	-
발병3-과실1	-	-	+	-	-	+
발병3-과실2	-	-	+	-	-	+
건전1-잎	-	-	-	-	-	+
건전1-과실1	-	-	-	-	-	+
건전1-과실2	+	+	+	+	-	+
건전2-잎	-	-	-	-	-	-
건전2-과실1	-	+	+	+	+	+
건전2-과실2	-	+	+	+	+	+
건전3-잎	-	-	-	-	-	+
건전3-과실1	-	+	+	+	+	+
건전3-과실2	-	+	+	+	+	+
계	1	5	8	5	4	13

영동 B농가에서 수집된 포도의 경우 이웃한 두 개체 포도 과실에서 나타나는 상이한 증상을 확인하기 위하여 바이러스 및 바이로이드 검출을 실시하였음(그림 6). 서로 이웃한 개체이지만 상품성이 없는 과실(전체 포장의 약 10%)을 생산하는 개체와 상품성이 있는 개체를 선발하여 진단을 하였음. 포장에서 다발하는 6종의 바이러스 및 바이로이드 진단 결과 원인균은 확인되지 않았음. 두 개체가 서로 이웃한 개체로써 생리장애에 의하여 이러한 비정상적인 숙성이 발생할 가능성이 낮은 것으로 판단되어 포도의 상품성을 완전하게 제거하는 포도 과실의 원인균인 바이러스 및 바이로이드 분석을 위하여 next generation sequencing(Illumina platform : Nova-seq.) 분석을 진행할 예정임.



그림 19. 영동 B농가에서 수집된 이병 증상 포도 과실 및 건전 과실

표 10. 영동 B농가에서 수집된 윤문 증상 포도(품종 NB)와 건전 과실의 비교.

시료번호	HSVd	GSyV-1	GLRaV-3	TSWV	Tospovirus
발병1-잎	+	+	-	-	-
발병1-과실1	+	+	-	-	-
발병1-과실2	+	+	-	-	-
발병2-잎	-	+	-	-	-
발병2-과실1	+	+	-	-	-
발병2-과실2	+	+	-	-	-
건전1-잎	+	+	+	-	-
건전1-과실1	+	+	-	-	-
건전1-과실2	+	+	-	-	-
건전2-잎	+	+	-	-	-
계	9	10	1	0	0

영천 및 김천 일대 농가에서 수집한 바이러스 의심 증상을 나타내는 시료 가운데 증상이 매우 뚜렷한 시료 13점을 선별하여 바이러스 및 바이로이드의 복합 감염 수준을 확인하였음. 최소5종, 최대 14종의 바이러스 및 바이로이드에 복합 감염되어 있었으며, GFKV, GYSVd-1, HSVd, RSPaV의 경우 모든 시료에서 검출되었음. GLRaV-2, RSPaV-1SMS 8번 시료를 제외한 나머지 12개 시료에서 검출되었음.

시료 번호	검출된 바이러스 및 바이로이드 목록 <sup>1, 2</sup>															검출 바이러스 수
	AGVd	CiYMV	GFKV	GFLV	GLRaV-2	GLRaV-3	GRSPaV	GSyV-1	GVB	GVE	GYSVd-1	GYSVd-1B	HSVd	RSPaV	RSPaV-1	
1	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	10
2	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14
3	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	7
4	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	7
5	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	10
6	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13
7	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	8
8	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	5
9	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	9
10	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	7
11	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12
12	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	13
13	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	10

<sup>1</sup>AGVd: Australian grapevine viroid; CiYMV: Citrus yellow mosaic virus; GFKV: Grapevine fleck virus; GFLV: Grapevine fanleaf virus; GLRaV-2: Grapevine leafroll-associated virus 2; GLRaV-3: Grapevine leafroll-associated virus 3; GRSPaV: Grapevine rupestris stem pitting-associated virus; GSyV-1: Grapevine Syrah virus 1; GVB: Grapevine virus B; GVE: Grapevine virus E; GYSVd-1: Grapevine yellow speckle viroid 1; GYSVd-1B: Grapevine yellow speckle viroid 1B; HSVd: Hop stunt viroid; RSPaV: Rupestris stem pitting associated virus; RSPaV-1: Rupestris stem pitting associated virus 1.

<sup>2</sup>모든 시료에서 GFKV, GYSVd-1, HSVd, RSPaV 4종이 검출됨. 바이러스 및 바이로이드 10종은(Citrus viroid VI, Golden shiner virus, Grapevine rupestris vein feathering virus, Grapevine leafroll-associated virus 1, Grapevine virus A, Grapevine virus D, Grapevine virus F, Grapevine virus Q, Tobacco bushy top virus, Tobacco mosaic virus) 검출되지 않음.

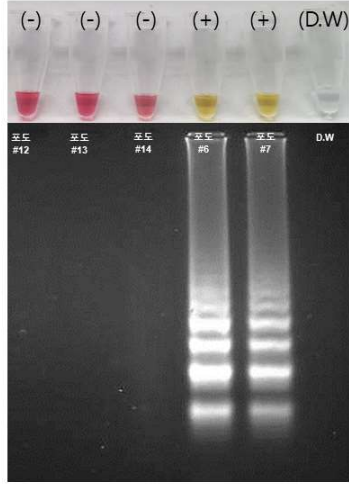
그림 20. 영천 및 김천 일대에서 증상이 크게 드러나는 포도 시료로부터 바이러스 및 바이로이드의 검출.

영천 3-4차년도에 수집된 바이러스 감염 의심 시료 107점을 차세대 염기서열 분석법으로 분석한 결과 표 2에 기재된 27종의 바이러스 및 바이로이드 외에 2종의 바이러스가 추가적으로 국내에 분포하고 있는 것으로 나타났음. Grapevine pinot gris virus 및 Grapevine geminivirus A는 국내에서 보고되지 않는 국내 미보고종으로써 본 과제에서 포도에 발생하는 바이러스 및 바이로이드는 29종으로 확인되었음.

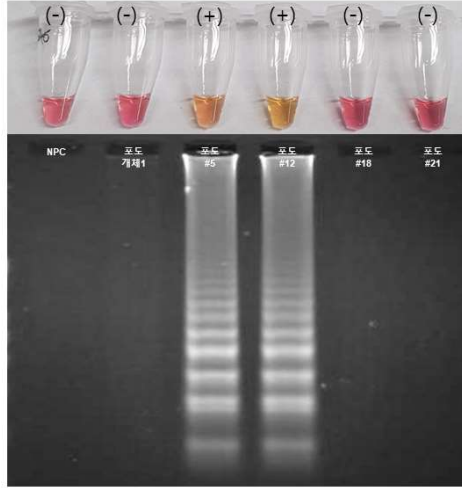


○포도 바이러스 및 바이로이드의 신속 현장 진단 기술 개발

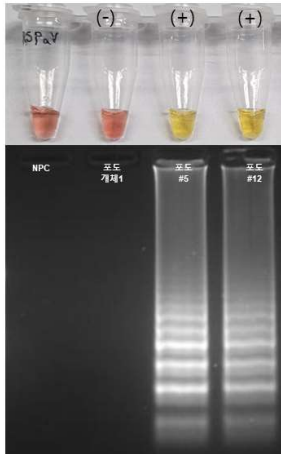
Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV3)



Grapevine yellow speckle viroid 1 (GySV1)



Grapevine rupestris stem pitting-associated virus -1 (GRSPaV-1)



Grapevine rupestris stem pitting-associated virus -2 (GRSPaV-2)

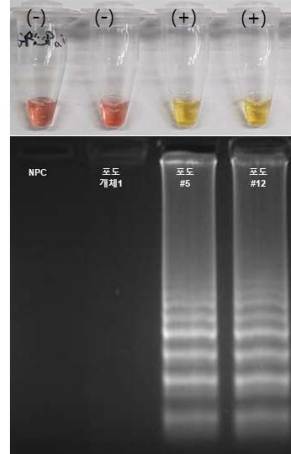


그림 21. 포도에 많이 발생하는 바이러스 3종 및 바이로이드 신속 현장 진단. NPC:No primer control. D.W:Distilled water. 등은 50°C에서 60분간 반응한 결과. 기존의 방식은 반응 종료 후 dye를 추가로 첨가하여 발색 반응으로 양성 또는 음성으로 판정하였으나 그림에서 보이는 반응 용액은 반응 종료와 동시에 변색 반응으로 양/음성 시료를 판별

<제1협동연구기관 - 경북대학교>

- 사과 및 복숭아 전국 주산지 주요 바이러스 감염주 채집 및 RT-PCR 진단
  - 2017년부터 2019년까지 사과 및 복숭아 주산지에서 다양한 이상증상을 보이는 과수 품종별 잎, 줄기, 과실 시료를 채집하였으며 농가에서 의뢰받은 과수 민원시료를 수집함.
  - 채집된 시료는 실험용도에 맞게 소분한 뒤 초저온냉동보관함.

표 1. 사과 채집지역, 채집일자 및 품종별 확보한 시료 수

채집지역	주소 (농가)	채집일자	품종명	채집시료 수			
				잎	줄기	과실	계
영천	영천시 신녕면 (A농장)	17.07.26	홍로	7	2	-	9
			후지	7	0	-	7
군위	군위군 소보면 (사과연구소)	17.08.07	M7대목	3	0	-	3
청송	청송군 현서면 (C농장)	17.08.08	자홍	7	7	-	14
	청송군 현서면 (D농장)	17.09.02	산사	0	20	-	20
	청송군 현서면 (E농장)	17.11.08	감홍	0	20	-	20
	청송군 현서면 (F농장)	17.11.08	로열후지 (8년생)	12	0	-	12
	청송군 현서면 (G농장)	17.11.08	미시마 (5년생)	5	0	-	5
	청송군 현서면 (H농장)	17.11.08	산사	10	0	-	10
	가평	가평군 조종면 (I농장)	18.04.12	미확인	-	5	-
18.05.25			아리수	5	1	-	6
			홍로	15	9	-	24
			후지	6	6	-	12
의성	- (J농장)	18.04.18	미확인	-	-	29	29
		의성군 단밀면 (K농장)	18.05.17	미안마 로얄후지	4 24	- -	- -
청송	청송군 현서면 (L농장)	18.09.07	홍로	-	-	25	25
문경	문경시 문경읍 (M농장)	18.10.15	홍로	-	1	-	1
			감홍	-	1	-	1
양구	양구군 해안면 (N농장)	18.10.17	미확인	-	-	2	2
	양구군 해안면 (O농장)	18.10.17	미확인	-	1	1	2
보은	보은군 삼승면 (P농장)	18.12.21	미시마	-	10	-	10
			기꾸	-	7	-	7
			자홍	-	7	-	7
			홍로	-	6	-	6
			시나노골드	-	5	-	5
봉화	봉화군 춘양면 (Q농장)	19.07.05	아오리	-	-	1	1
		19.07.18	부사	-	-	2	2
			부사	7	-	7	14
			미확인	9	-	14	23
청송	청송군 현서면 (R농장)	19.07.23	홍로	2	-	2	4
			19.08.04	홍로	13	-	13
예천	예천군 풍양면 (S농장)	19.08.21	미확인	31	-	-	31
거창	거창군 주상면 (T농장)	19.08.21	수홍	6	-	6	12
			천주	9	-	9	18
			홍옥	2	-	-	2
			후지	5	-	-	5
			자홍	6	-	-	6
			자후	12	-	12	24
			후지후브락스	5	-	5	10
			미안마후지	5	-	5	10
<b>계</b>	<b>20개 농장</b>		<b>21품종</b>	<b>217</b>	<b>108</b>	<b>133</b>	<b>458</b>

채집한 시료는 실험용도에 맞게 소분한 뒤, 초저온 냉동보관(-80℃)함.

표 2. 복숭아 채집지역, 채집일자 및 품종별 확보한 시료 수

채집지역	주소 (농가)	채집일자	품종명	채집시료 수		
				잎	과실	계
경산	경산시 와촌면 (A농장)	17.07.25	털복숭아	4	3	7
			선프레	4	2	6
			매끈한복숭아	2	3	5
	경산시 와촌면 (B농장)	17.07.25	천홍	1	3	4
			미확인	3	-	3
	경산시 와촌면 (D농장)	17.07.25	털복숭아	1	-	1
미확인			1	1	2	
천홍			3	-	3	
영천	영천시 신녕면 (E농장)	17.07.26	미확인	8	-	8
경산	경산시 농업기술센 터 (F농장)	18.06.27	영봉	4	-	4
			홍금향	4	-	4
			찌요마루	3	-	3
			수홍(천도)	3	-	3
			마도카	4	-	4
			선프레	4	-	4
			하모니	4	-	4
수원	- (G농장)	18.05.29	미확인	33	-	33
영천	영천시 신녕면 (H농장)	18.07.16	사쿠라-9	3	-	3
			천도-4	10	-	10
	영천시 임고면 (I농장)	18.08.28	천도	-	10	10
음성	음성군 감곡면 (J농장)	18.08.02	백도	-	10	10
세종	세종시 연서면 (K농장)	18.08.02	대육계	-	10	10
영덕	(L농장)	18.08.04	털복숭아	-	5	5
청주	청주시 서원구 (M농장)	18.08.25	천중도	-	10	10
이천	이천시 장호원읍 (N농장)	18.08.28	백도	-	9	9
청도	(O농장)	18.08.28	천도	-	5	5
무안	무안군 삼향읍 (P농장)	18.09.05	천하제일도	-	10	10
충주	- (Q농장)	19.08.17	미확인	50	-	50
영천	- (R농장)	19.08.25	대명	-	10	10
<b>계</b>	<b>18개 농장</b>			<b>149</b>	<b>91</b>	<b>240</b>

채집한 시료는 실험용도에 맞게 소분한 뒤, 초저온 냉동보관(-80℃)함.

- 사과에서 검출되는 바이러스 및 바이로이드 9종에 대한 진단용 프라이머를 확보하였음.

- RT-PCR 진단결과, 검출율이 높은 순서로 병원체를 나열함.

표 3. 사과에서 검출된 바이러스 및 바이로이드 진단용 프라이머 목록 및 염기서열 정보

바이러스 또는 바이로이드 (약칭)	프라이머 이름	프라이머 염기서열	산물 (bp)
<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> (ACLSV) <sup>a</sup>	ACLSV-F31	GCAGACCCCTTCATGGAAAGA	509
	ACLSV-R31	CGCAAAGATCAGTCGTAACAGA	
<i>Apple stem pitting virus</i> (ASPV) <sup>a</sup>	ASPV-F001	AAGCATGTCTGGAACCTCATG	367
	ASPV-R001-2	GATCAACTTTACTAAAAAGCATAAGT	
<i>Apple stem grooving virus</i> (ASGV) <sup>a</sup>	ASGV-sence	GCCACTTCTAGGCAGAACTCTTTGAA	273
	ASGV-antisense	AACCCCTTTTTGTCCCTTCAGTACGAA	
<i>Apple scar skin viroid</i> (ASSVd) <sup>a</sup>	ASSVd-F91	ACGAAGGCCGGTGAGAAAG	202
	ASSVd-R291	CCGCTGCGTCAAAGAAAAAG	
<i>Apple mosaic virus</i> (ApMV) <sup>a</sup>	ApMV-F5	CTCCAAACACAACCTTTTGATGACTT	123
	ApMV-antisense	GTAACCTCACTCGTTATCACGTACAA	
<i>Apple green crinkle associated virus</i> (AGCaV)	AGCaV-kribb-F	ACTTGATCGCCGTACCTTCA	497
	AGCaV-kribb-R	ATGCTCCCTCTGAAACCCAA	
<i>Apricot latent virus</i> (ApLV)	ApLV-kribb-F	TAGTGCGATGAGGTTCCCTGG	101
	ApLV-kribb-R	TGGCACCCATCTCGAAACTA	
<i>Apple rubbery wood virus</i> (ApRWV)	ApRWV-kribb-F	CCACTTGCTTACTGTTTCTGC	617
	ApRWV-kribb-R	TGGACCATGCAGCATATGAA	
<i>Cherry associated luteovirus</i> (ChALV)	ChALV-kribb-F	CAAATCGAGCAAGAGGAGGC	443
	ChALV-kribb-R	TTTGCCAGTCCAACAAGTCG	

<sup>a</sup>Bae, Y. S. 2015. Development of multiplex RT-PCR for apple viruses and viroid and the incidence of apple viral disease in Gyeongsangbuk-du. Masters dissertation. Kyungpook National University. Daegu. Republic of Korea.

표 4. 전국 사과 농가에서 채집 및 확보한 시료의 바이러스 및 바이로이드 RT-PCR 진단결과<sup>1, 2, 3</sup>

진단대상 바이러스 및 바이로이드	약칭	검출수	검출율 (%)
<i>Apple stem grooving virus</i>	ASGV	288	82.05
<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>	ACLSV	137	39.03
<i>Apple stem pitting virus</i>	ASPV	119	33.9
<i>Apricot latent virus</i>	ApLV	20	8.1
<i>Apple scar skin viroid</i>	ASSVd	19	5.41
<i>Apple mosaic virus</i>	ApMV	15	4.27
<i>Apple green crinkle associated virus</i>	AGCaV	2	0.81
<i>Apple rubbery wood virus</i>	ApRWV	0	0
<i>Cherry associated luteovirus</i>	ChALV	0	0

<sup>1</sup>표 3에 기재된 프라이머 서열정보를 이용하여 전국 복숭아 농가에서 채집한 잎, 줄기 또는 과실 시료 351점을 RT-PCR 진단하여 그 결과를 검출율 순으로 나열함.

<sup>2</sup>진한 글씨: 「종자관리요강」에 사과 특정병으로 지정된 바이러스 및 바이로이드.

<sup>3</sup>ApLV, ApRWV, AGCaV, ChALV의 경우 잎, 줄기 또는 과실시료 247점을 RT-PCR 진단하여 그 결과를 검출율 순으로 나열함

- 2017년 사과나무 줄기의 조피 유무에 따라 잎 시료를 각각 5점씩 채집하여 바이러스 감염과의 관계를 알아보기 위하여 RT-PCR 진단한 결과, ACLSV의 감염정도에 차이가 있는 것으로 파악됨. 추후 시료를 추가로 확보하여 이에 대한 추가적인 분석이 필요할 것으로 사료됨.



그림 1. 사과나무 줄기에서 보이는 증상. 좌: 조피있음, 우: 조피없음.

표 5. 줄기 조피 유무와 바이러스 감염과의 관계<sup>a, b</sup>

시료	조피 O			조피X		
	ACLSV	ASPV	ASGV	ACLSV	ASPV	ASGV
1	+	-	+	-	+	+
2	-	+	+	-	+	+
3	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	-	+	+
5	-	+	+	-	+	+

<sup>a</sup>조피 유무와 관계없이 ASGV가 검출되었으며, 유의미한 결과로 ACLSV의 검출차이가 1번, 4번시료에서 나타남. ACLSV: *Apple chlorotic leaf spot virus*, ASPV: *Apple stem pitting virus*, ASGV: *Apple stem grooving virus*.

<sup>b</sup>RT-PCR 진단에서 해당 바이러스 및 바이로이드가 검출되면 +, 검출되지 않으면 - 표기함.

- 사과나무의 상단 및 하단 조직의 바이러스 감염상태를 파악하기 위하여 같은 나무에서 상단부 및 하단부에서 각 1점씩 총 28점을 채집하여 RT-PCR 진단한 결과, 같은 나무에서 상단부와 하단부 잎의 바이러스 검출이 다르게 나타나는 것을 확인함. 이는 과수내 조직별 바이러스 분포 및 농도가 다를 수 있을 가능성이 있으며, 잎, 과실, 줄기, 꽃 등에서도 바이러스 분포가 다르게 나타날 것으로 판단됨.

표 6. 사과나무 상단 및 하단조직의 바이러스 감염상태<sup>a, b</sup>

시료	상단부 잎			하단부 잎		
	ACLSV	ASPV	ASGV	ACLSV	ASPV	ASGV
1	+	+	+	-	+	+
2	+	+	+	-	+	+
3	-	+	+	-	+	+
4	-	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+
7	-	+	+	-	+	+
8	-	-	+	-	+	+
9	+	+	+	-	+	+
10	-	+	+	-	+	+
11	+	-	+	-	+	+
12	-	+	+	-	+	+
13	-	+	+	-	+	+
14	+	+	+	-	+	+

<sup>a</sup>상단부 잎과 하단부 잎에서 ACLSV의 감염정도의 차이가 드러남. ACLSV: *Apple chlorotic leaf spot virus*, ASPV: *Apple stem pitting virus*, ASGV: *Apple stem grooving virus*.

<sup>b</sup>RT-PCR 진단에서 해당 바이러스 및 바이로이드가 검출되면 +, 검출되지 않으면 - 표기함.

- 사과나무의 수세에 차이점을 알아보기 위해 세력이 약하고 고사한 것, 세력이 약하지만 생존한 것, 세력이 강한 것 3가지로 나누어 잎과 과실을 채집, 총 14점을 채집하여 RT-PCR 진단한 결과, 수세가 약한 나무일수록 ACLSV가 검출된다는 것을 확인함.

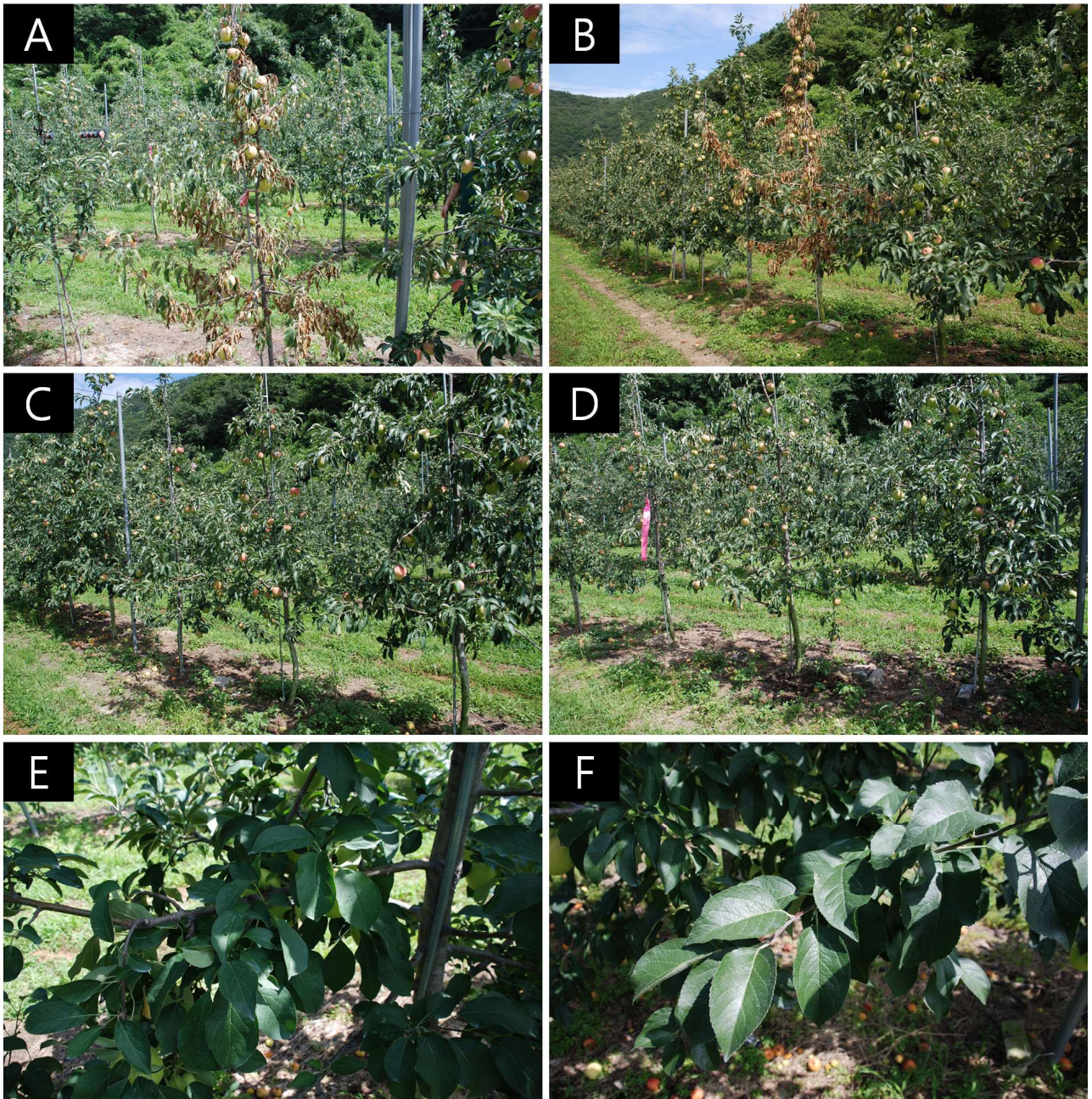


그림 2. 수세에 따른 사과나무의 상태. A, B: 수세가 약하며 갑자기 고사함, C, D: 수세가 주변 나무에 비해 약함, E, F: 수세가 강하며 비교적 건전함.



표 7. 사과나무 수세에 따른 바이러스 검출의 비교<sup>a, b</sup>

시료	잎			과실		
	ACLSV	ASPV	ASGV	ACLSV	ASPV	ASGV
수세 약함	18	-	+	+	-	+
	20	-	+	+	-	+
	21	-	+	+	-	+
고사함	23	-	+	+	-	+
	24	+	+	+	-	+
수세 강함	19	-	+	-	-	+
	22	-	+	+	-	-

<sup>a</sup>수세와 관계없이 잎과 과실에서 모두 ASGV가 검출되었으며, ASPV는 잎에서만 검출되었음. 수세가 강하면 잎과 과실에서 ACLSV가 검출되지 않는 것을 알 수 있었으며, 수세가 약할수록 ACLSV가 검출될 가능성이 높으며, 고사한 나무에서는 잎과 과실에서 모두 ACLSV가 검출되었음. ACLSV: *Apple chlorotic leaf spot virus*, ASPV: *Apple stem pitting virus*, ASGV: *Apple stem grooving virus*.

<sup>b</sup>RT-PCR 진단에서 해당 바이러스 및 바이로이드가 검출되면 +, 검출되지 않으면 - 표기함.

- 사과 과실표면에 얼룩, 녹색 띠, 기형, 착색불량, 곰보 자국 등 다양한 이상증상에 대하여 RT-PCR 진단한 결과, 진단시료 모두 바이러스 3종에 단독 또는 복합감염이 확인되었으며, 특히 ACLSV와 ASGV가 대부분의 시료에서 검출되는 특징이 있음을 확인함.

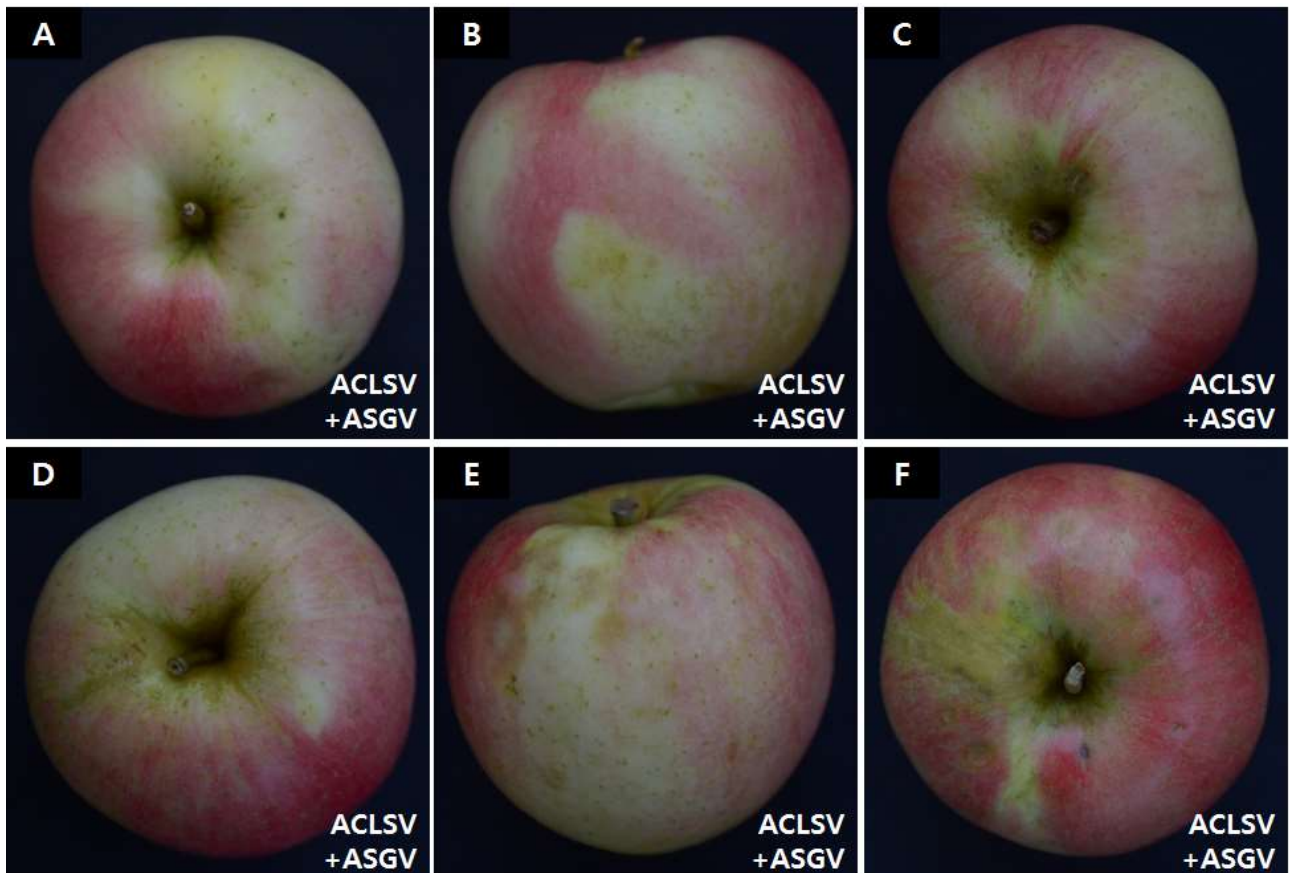


그림 3. ACLSV와 ASGV에 감염된 사과 과실에서 보이는 다양한 이상증상. 대부분 표면에 얼룩이 형성되어있으며 착색이 불량한 것으로 보임. 특히 C에서는 둥글지 않고 찌그러진 과실도 관찰가능함.

- 2018년 가평소재 농가에서 바이러스 감염증상을 보이는 아리수, 홍로, 후지 3품종의 잎과 줄기 시료를 채집하여 진단함. 진단결과 아리수에서는 ASGV만 검출되었으며, 홍로에서는 ACLSV, ASPV, ASGV가 검출되었으며, 후지에서는 ACLSV, ASPV, ASGV, ApMV가 검출되었음.



그림 4. 아리수 품종에서 보이는 이상증상. A: 황화; B~D: 잎말림; E: 생육위축(빨간색 화살표).

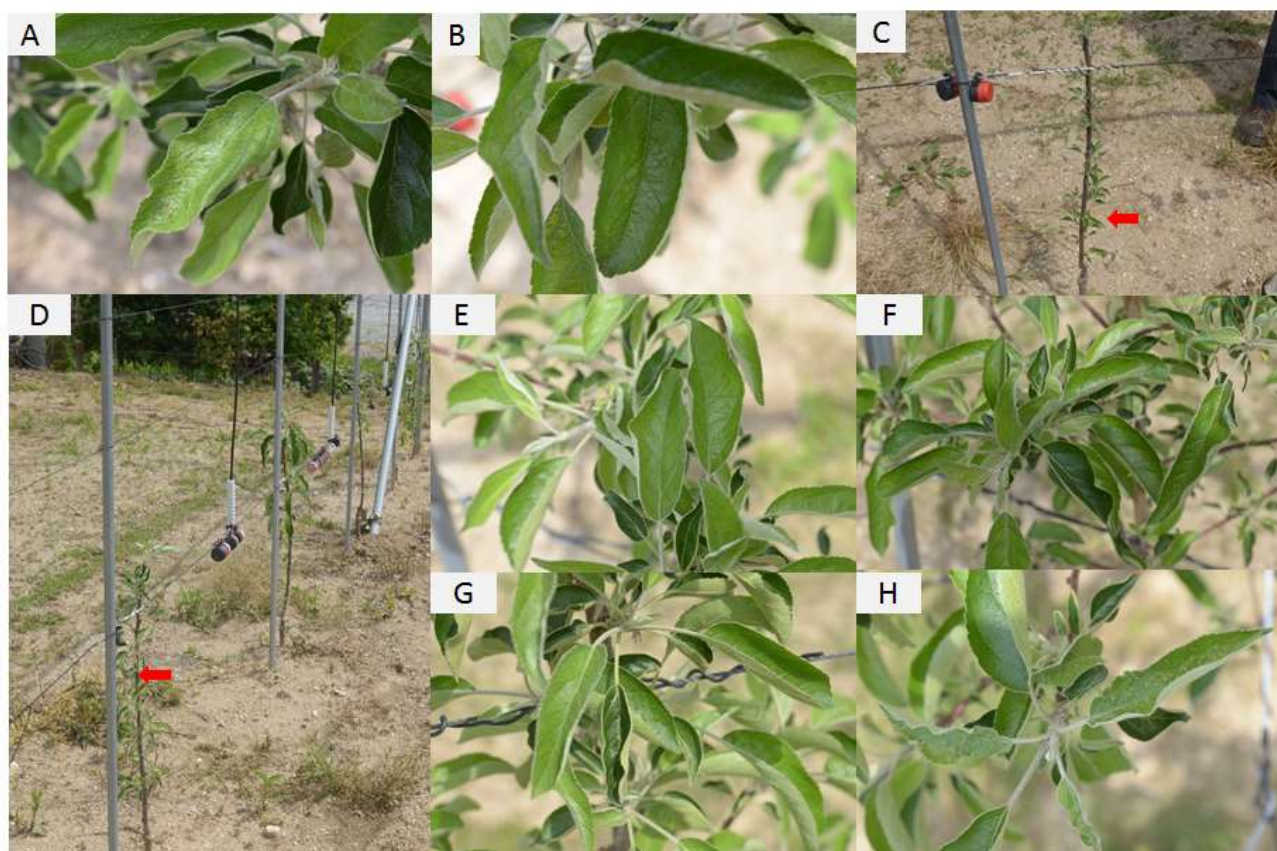


그림 5. 홍로 품종에서 보이는 이상증상. A, B: 황화; C, D: 생육불량, E~H: 잎말림.

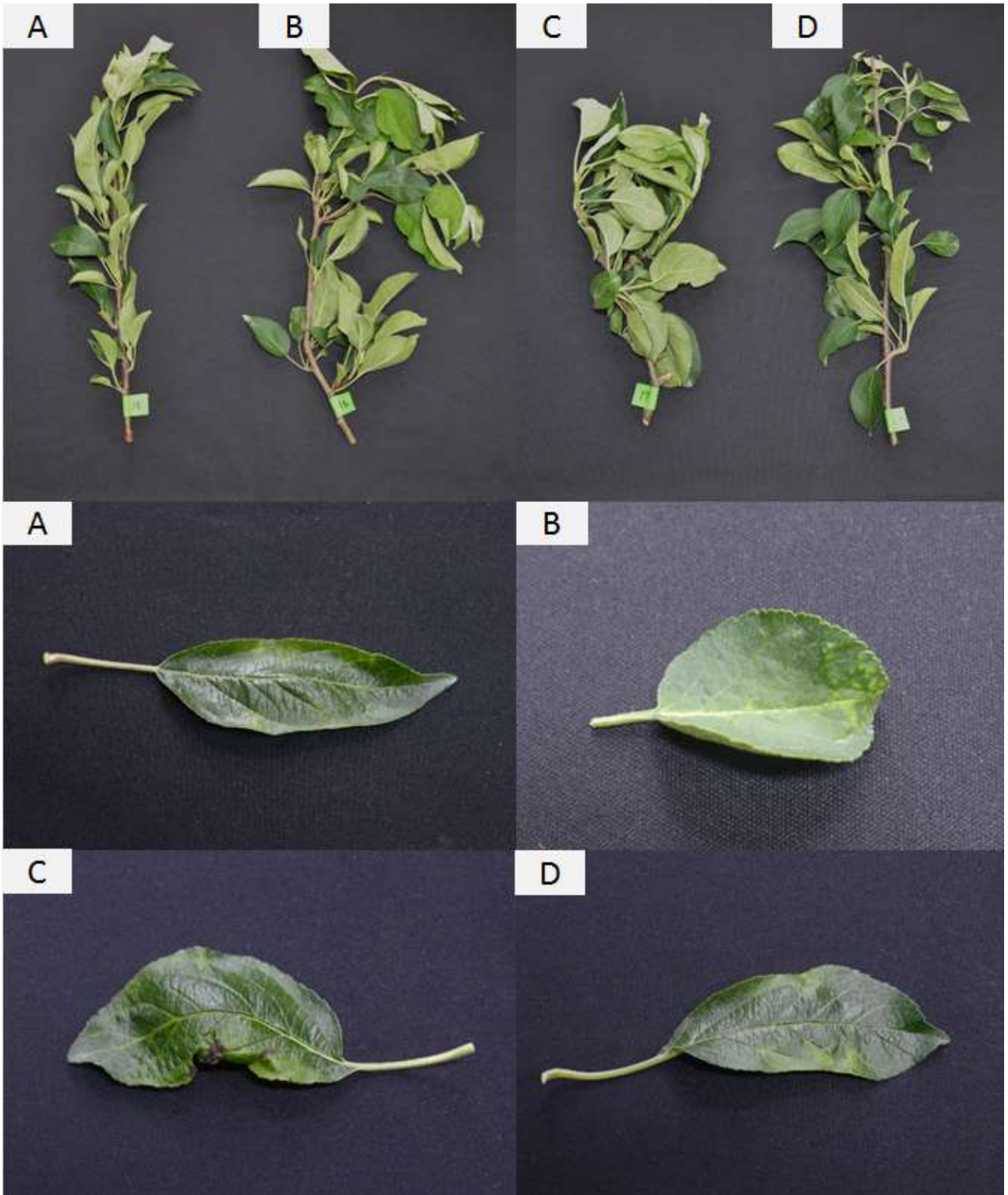


그림 6. 가평 홍로품종에서 의뢰받은 줄기 및 잎 시료. 나무 두 그루에서 가지 2개씩 의뢰를 받았으며, 각 줄기마다 잎 1점씩 채집하여 잎과 줄기를 대상으로 RT-PCR 진단을 실시함.



그림 7. 가평 홍로품종에서 의뢰받은 줄기 및 잎 시료. A, B: 외관상 병이 보이지 않은 나무; C~E: 죽은 나뭇가지.



그림 8. 가평에서 의뢰받은 줄기 5점. 최초(좌) 의뢰받은 줄기에서 위치별로 다르게 3점씩 채집하여(우) RT-PCR 진단을 실시함.

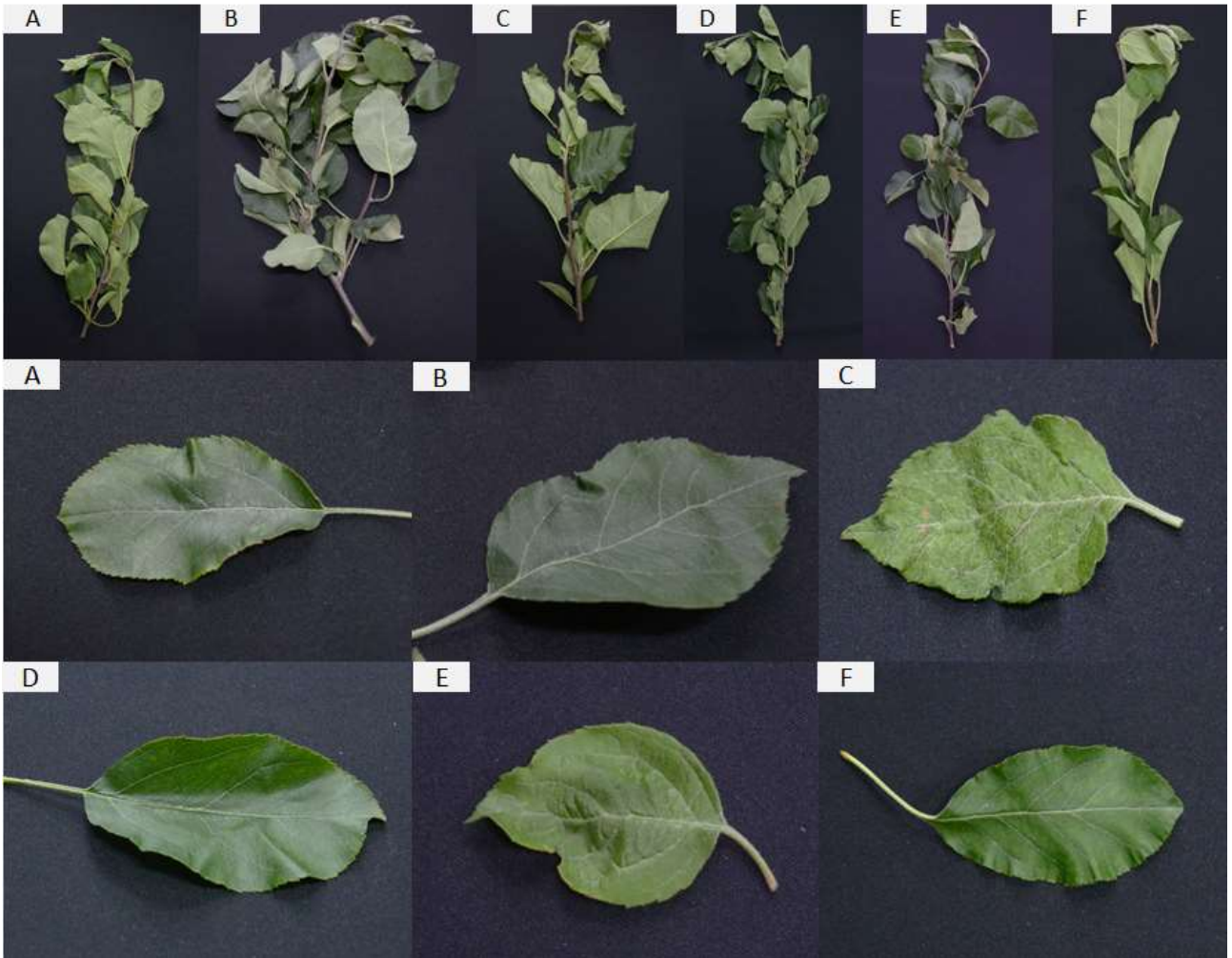


그림 9. 가평 후지품종에서 의뢰받은 줄기 및 잎 시료. 수세가 약하고 착색불량인 나무에서 줄기 6점을 채집했으며, 각 줄기마다 잎 1점씩 채집하여 잎과 줄기를 대상으로 RT-PCR 진단을 실시함.

표 8. 가평에서 채집한 4개 품종의 잎과 줄기시료에서 진단된 바이러스 비교<sup>1</sup>

품종명	시료	채집 시료 수	바이러스			
			ACLSV	ASPV	ASGV	ApMV
알 수 없음	줄기	5	1	0	2	5
아리수	잎	5	-	-	5	-
	줄기	1		-	1	-
홍로	잎	15	4	9	11	-
	줄기	9	2	5	7	-
후지	잎	6	1	6	6	1
	줄기	6	5	6	6	-

<sup>1</sup>ACLSV: Apple chlorotic leaf spot virus, ASPV: Apple stem pitting virus, ASGV: Apple stem grooving virus, ApMV: Apple mosaic virus.

- 영천소재 농가 4곳에서 열과된 과실시료 25점의 바이러스 진단을 의뢰받음. 시료는 과피, 과육으로 나누어서 진단하였으며, 진단결과 ACLSV, ASPV, ASGV, ASSVd가 검출됨. 특히 과피에서 ASSVd가 검출되었으며, 과육에서 ASPV 검출감도가 동일한 과실의 과피보다 높게 나타남.



그림 10. 청송에서 채집한 열과된 사과 과실. 4개 농가에서 의뢰받았으며, 각 과실마다 과피와 과육을 채집하여 이를 RT-PCR 진단함.

표 9. 청송에서 채집한 열과 25점의 과피와 과육을 RT-PCR 진단한 결과 비교<sup>1, 2</sup>

시료	바이러스 및 바이로이드			
	ACLSV	ASPV	ASGV	ASSVd
과피	25	6	25	1
과육	25	22	25	-

<sup>1</sup>25점을 진단한 결과, 과피에서 ASSVd가 검출되었으며, 과육이 과피보다 ASPV에 대한 검출감도가 높게 나오는 것으로 나타남. 채집시료에 따라 검출감도가 높은 바이러스가 다른 것을 알 수 있음.

<sup>2</sup>ACLSV: *Apple chlorotic leaf spot virus*, ASPV: *Apple stem pitting virus*, ASGV: *Apple stem grooving virus*, ApMV: *Apple mosaic virus*.

- 의성소재 농가에서 미얀마, 로얄후지 품종에서 나무별 잎 시료 28점을 채집함. 진단결과 ACLSV, ASPV, ASGV, ASSVd, ApMV가 검출됨.

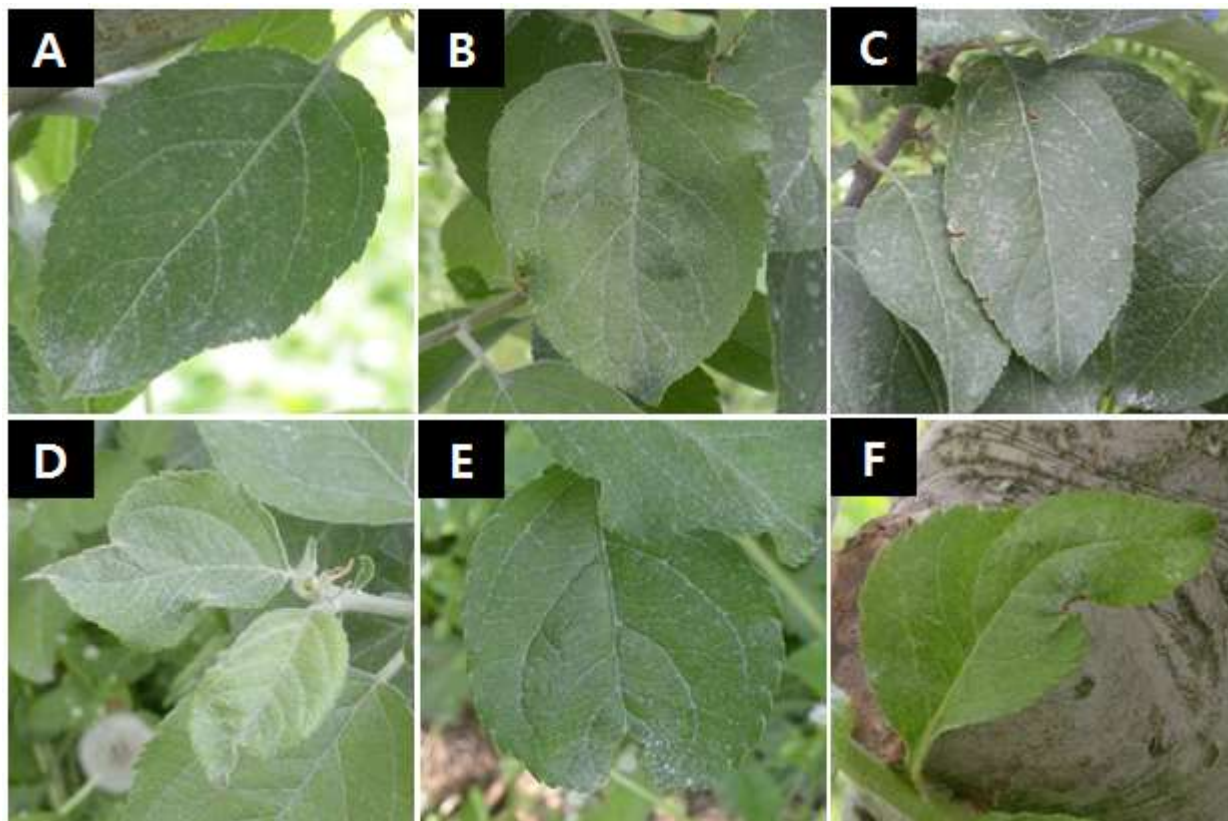


그림 11. 의성소재 농가에서 채집한 미얀마 품종(A~C) 및 로얄후지 품종(D~F).

표 10. 의성에서 채집한 미얀마, 로얄후지 품종 잎 시료의 RT-PCR 진단결과<sup>1, 2</sup>

품종	시료수	바이러스 및 바이로이드				
		ACLSV	ASPV	ASGV	ASSVd	ApMV
미얀마	4	3	4	4	4	3
로얄후지	24	20	24	24	24	3

<sup>1</sup>품종과 관계없이 ASPV, ASGV, ASSVd가 모든 시료에서 검출되었음.

<sup>2</sup>ACLSV: *Apple chlorotic leaf spot virus*, ASPV: *Apple stem pitting virus*, ASGV: *Apple stem grooving virus*, ApMV: *Apple mosaic virus*.

- 의성소재 농가에서 저장사과 29점의 바이러스 진단을 의뢰받음. 진단결과 ACLSV, ASPV, ASGV, ApMV를 검출함.



그림 12. 의성소재 농가에서 의뢰받은 고품질 사과(A~D) 및 저품질 사과(D~G). 농가에서 색깔을 기준으로 품질을 정하였으며 과피를 채집하여 RT-PCR 진단을 실시함. 진단결과, 품질과 관계없이 모든 시료에서 바이러스가 검출됨.

표 11. 의성소재 농가 저장사과의 품질별 바이러스 진단결과 비교<sup>1, 2</sup>

시료 수	바이러스			
	ACLSV	ASPV	ASGV	ApMV
29	15	7	28	3

<sup>1</sup>품질과 관계없이 ACLSV, ASPV, ASGV, ApMV가 검출되었으나, 저품질 사과에서 ACLSV가 고품질보다 더 많이 검출됨.

<sup>2</sup>ACLSV: *Apple chlorotic leaf spot virus*, ASPV: *Apple stem pitting virus*, ASGV: *Apple stem grooving virus*, ApMV: *Apple mosaic virus*.



- 2019년 보은 소재 농가에서 확보한 묘목 가지 35점(미시마, 기꾸, 자홍, 홍로, 시나노골드 5개 품종)을 종자관리요강에 기재된 병원체(ACLSV, ASPV, ASGV, ASSVd, ApMV) 5종을 대상으로 RT-PCR 진단한 결과 ACLSV, ASPV, ASGV가 검출되었음(그림 10; 표 6, 7).



그림 13. 보은 소재한 농가에서 확보한 사과 묘목시료. 1-10: 미시마, 11-17: 기꾸, 18-24: 자홍, 25-30: 홍로, 31-35: 시나노골드. 각 가지마다 신초, 꽃눈, 표피 속 녹색부분을 떼어내어 Total RNA를 추출하였으며, 이를 RT-PCR 진단에 사용함.

표 12. 5종 병원체의 RT-PCR 진단에 의한 사과 묘목 품종별 바이러스 및 바이로이드 검출율\*

품종명	바이러스 및 바이로이드				
	ACLSV	ASPV	ASGV	ASSVd	ApMV
미시마	0/10	0/10	10/10	0/10	0/10
기꾸	1/7	0/7	7/7	0/7	0/7
자홍	3/7	5/7	5/7	0/7	0/7
홍로	1/6	1/6	6/6	0/6	0/6
시나노골드	4/5	2/5	5/5	0/5	0/5
계	9/35	8/35	33/35	0/35	0/35

\*ACLSV: *Apple chlorotic leaf spot virus*, ASPV: *Apple stem pitting virus*, ASGV: *Apple stem grooving virus*, ASSVd: *Apple scar skin viroid*, ApMV: *Apple mosaic virus*.

- 봉화에서 확보한 아오리품종 과실 1점, 부사품종 과실 2점에 대하여 RT-PCR 진단한 결과, ACLSV, ASPV, ASGV, ApLV가 검출됨. 아오리에서는 ASPV, ASGV, ApLV가 검출되었으며, 부사에서는 ACLSV, ASGV가 검출되었음. 과피와 과육으로 나누어 진단한 결과, 과피에서는 ASGV 1종만 검출되었으며. 과육에서는 ACLSV, ASPV, ASGV, ApLV가 검출되었음. 특히 ASGV가 모든 시료에서 검출된 것으로 미루어 보아 곰보무늬가 ASGV와 연관이 있을 것으로 추정할 수 있음(그림 11; 표 8, 9).



그림 14. 봉화에서 채집한 사과시료. 사과 표면에 곰보자국과 같은 무늬가 보임. 진단결과, ACLSV, ASPV, ASGV, ApLV가 검출되었음. 특히 모든시료에서 공통적으로 ASGV가 검출된 것으로 보아, 곰보 무늬가 발생한 것이 ASGV와 연관이 있을 것이라 추정할 수 있음.

표 13. 봉화에서 채집한 아오리, 부사품종에서의 RT-PCR 진단결과\*

	*ACLSV	ASPV	ASGV	ApLV
아오리	0/1	1/1	1/1	1/1
부사	1/2	0/2	2/2	0/2

\*ACLSV: *Apple chlorotic leaf spot virus*, ASPV: *Apple stem pitting virus*, ASGV: *Apple stem grooving virus*, ApLV: *Apricot latent virus*.

표 14. 봉화에서 채집한 아오리, 부사품종 과실의 과피, 과육에서의 RT-PCR 진단결과\*

	ACLSV	ASPV	ASGV	ApLV
과피	0/3	0/3	3/3	0/3
과육	2/3	1/3	2/3	1/3

\*ACLSV: *Apple chlorotic leaf spot virus*, ASPV: *Apple stem pitting virus*, ASGV: *Apple stem grooving virus*, ApLV: *Apricot latent virus*.

- 봉화에서 확보한 부사품종 잎 7점, 과실 7점에 대하여 RT-PCR 진단한 결과, ACLSV, ASPV, ASGV, ASSVd, ApMV가 검출됨. 시료의 종류와 관계없이 ASGV가 검출됨(그림 12; 표 10, 11). 각 시료마다 검출된 바이러스가 다르게 나타나는 것을 확인하였으며, 이를 통해 ASGV 이외에 병원체와의 복합적인 요인에 의해 발생한 것으로 추정할 수 있음.



그림 15. 봉화에서 확보한 부사품종 시료. 아직 미성숙한 단계임에도 불구하고 과실에서 착색이 진행되고 있었으며, 과실 표면에 반점이 관찰됨.

표 15. RT-PCR 진단에 의한 사과 묘목 품종별 바이러스 및 바이로이드 검출율\*

	바이러스 및 바이로이드				
	ACLSV	ASPV	ASGV	ASSVd	ApMV
잎	2/7	3/7	7/7	0/7	0/7
과실	4/7	0/7	7/7	1/7	3/7
계	6/14	3/14	14/14	1/14	3/14

\*ACLSV: *Apple chlorotic leaf spot virus*, ASPV: *Apple stem pitting virus*, ASGV: *Apple stem grooving virus*, ASSVd: *Apple scar skin viroid*, ApMV: *Apple mosaic virus*.

- 봉화에서 확보한 사과 잎 9점, 과실 14점에 대하여 RT-PCR 진단한 결과, ACLSV, ASPV, ASGV, ApLV가 검출됨. 모든 시료에서 ASGV가 검출됨(그림 13; 표 12, 13). 확보한 사과 과실 표면에서 곰보무늬와 같은 바이러스에 의한 병징이 관찰됨.



그림 16. 봉화에서 확보한 사과시료. 품종은 부사, 아오리, 홍로이며, 과실에 곰보무늬, 기형증상을 보이며, 총 23점을 확보함.

표 16. RT-PCR 진단에 의한 사과 부위별 바이러스 및 바이로이드 검출율\*

	바이러스 및 바이로이드			
	ACLSV	ASPV	ASGV	ApLV
잎	1/9	4/9	9/9	4/9
과실	7/14	6/14	14/14	5/14
계	8/23	10/23	23/23	9/23

\*ACLSV: *Apple chlorotic leaf spot virus*, ASPV: *Apple stem pitting virus*, ASGV: *Apple stem grooving virus*, ApLV: *Apricot latent virus*.

- 청송에서 확보한 사과 잎 6점, 과실 6점에 대하여 RT-PCR 진단한 결과, ACLSV, ASPV, ASGV, ApLV가 검출됨. 이 시료는 특정 과수에서 과실 표면에 특정 무늬가 발생하였으며 그 이외의 과수에서는 발견되지 않음(그림 14; 표 14, 15). RT-PCR 진단결과, 바이러스가 검출되었으나, 특정 과실에서만 발견되는 병징과 병원체간의 관련정도가 지금까지의 진단방법에서는 낮은 것으로 추정할 수 있음.

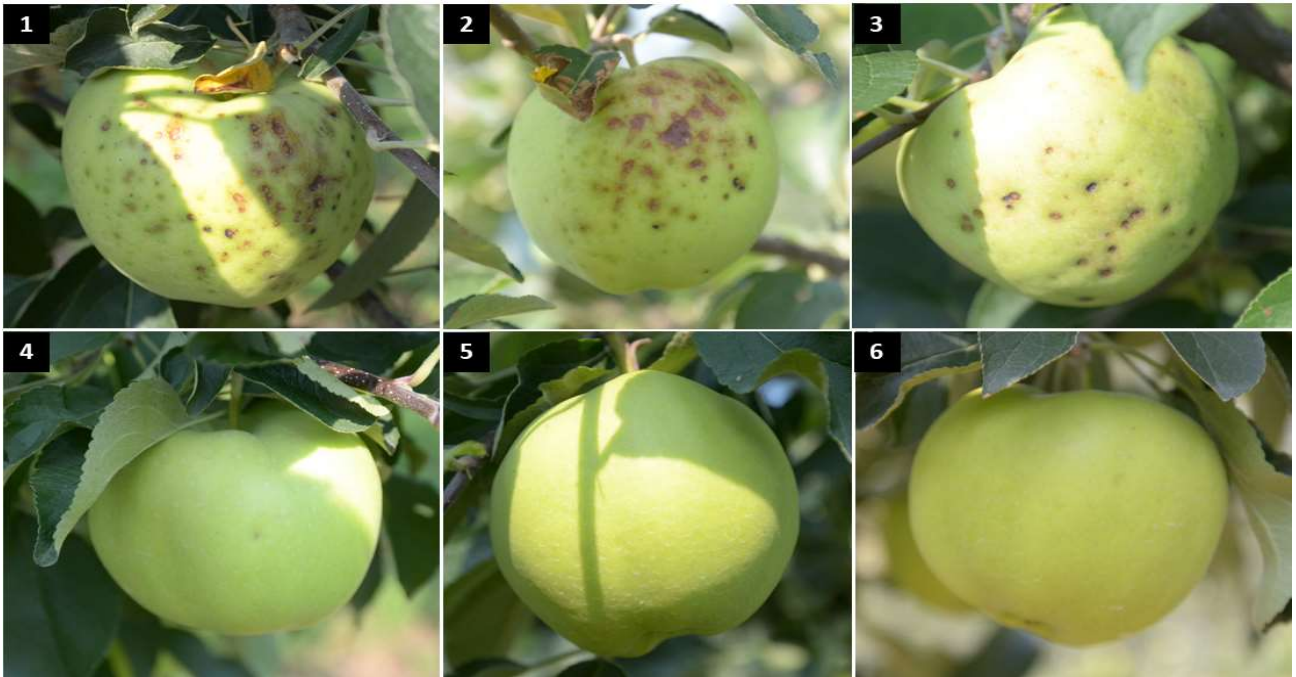


그림 17. 청송에서 확보한 사과시료. 품종은 홍로이며, 특정한 장소에 있는 사과(1, 2, 3번)에서만 괴저병 반이 생겼으며, 그 이외의 사과에서는(4, 5, 6번) 특정한 무늬가 없었음. 병징무늬는 앞면에만 있었으며, 뒷면에는 없었음.

표 17. RT-PCR 진단에 의한 사과 병징 및 종류별 바이러스 및 바이로이드 검출율\*

시료	바이러스 및 바이로이드*			
	ACLSV	ASPV	ASGV	ApLV
곰보-잎	0/3	3/3	3/3	3/3
곰보-과실	2/3	1/3	3/3	3/3
무병-잎	0/3	2/3	3/3	1/3
무병-과실	0/3	0/3	3/3	1/3
계	2/12	6/12	12/12	8/12

\*ACLSV: Apple chlorotic leaf spot virus, ASPV: Apple stem pitting virus, ASGV: Apple stem grooving virus, ApLV: Apricot latent virus.

- 예천에서 확보한 사과 잎 31점 ACLSV, ASPV, ASGV, ASSVd, ApMV 5종에 대하여 RT-PCR 진단한 결과, ACLSV, ASGV가 검출됨(표 16). A그룹에서는 ACLSV가, B그룹에서는 ASGV만 검출된 것이 특징임.

표 18. RT-PCR 진단에 의한 사과 그룹별 바이러스 및 바이로이드 검출율\*

시료	바이러스 및 바이로이드	
	ACLSV	ASGV
A그룹	8/19	0/19
B그룹	0/12	1/12
계	8/31	1/31

\*ACLSV: *Apple chlorotic leaf spot virus*, ASGV: *Apple stem grooving virus*.

- 거창에서 확보한 사과 잎 42점 ACLSV, ASPV, ASGV, ASSVd, ApMV 5종에 대하여 RT-PCR 진단한 결과, ASPV, ASGV가 검출됨(그림 15; 표 17). 이곳에서 확보한 품종은 수홍, 천주, 홍옥, 후지, 자홍, 자후, 후지후브락스, 미안마후지이며, 과실 표면의 수침상 병반과 줄무늬, 얼룩무늬 등이 관찰됨.

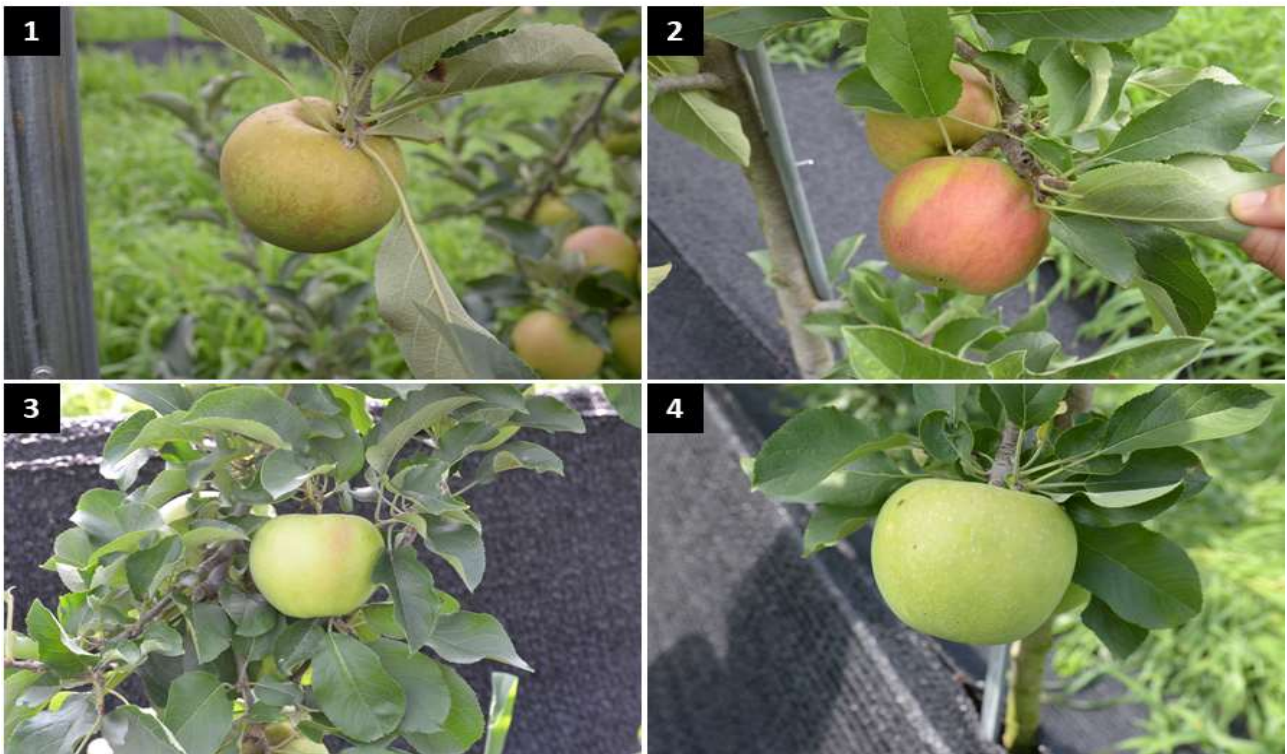


그림 18. 거창에서 채집한 사과. 1, 2: 수홍; 3, 4: 천주품종. 과실에 이상증상이 보여 RT-PCR 진단을 실시함.

표 19. RT-PCR 진단에 의한 사과 품종별 바이러스 및 바이로이드 검출율\*

품종명	바이러스 및 바이로이드	
	ASPV	ASGV
수홍	0/12	0/23
천주	0/18	0/18
홍옥	0/2	0/2
후지	0/5	0/5
자홍	2/6	3/6
자후	0/12	0/12
후지후브락스	0/10	2/10
미얀마후지	5/10	10/10
계	<b>8/31</b>	<b>1/31</b>

\*ASPV: *Apple stem pitting virus*, ASGV: *Apple stem grooving virus*.

- 복숭아에서 검출되는 바이러스 및 바이로이드 23종에 대한 진단용 프라이머를 확보하였음.
- RT-PCR 진단결과, 검출율이 높은 순서로 병원체를 나열함.

표 20. 복숭아에서 검출된 바이러스 및 바이로이드 진단용 프라이머 목록 및 염기서열 정보

바이러스 또는 바이로이드 (약칭)	프라이머 이름	프라이머 염기서열	산물 (bp)
<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> (ACLSV)	ACLSV-P389-For ACLSV-P389-Rev	CACAAGACCACACCATCCTG GGCGAATGAAAATTCCAAGA	479
<i>Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus</i> (APCLSV)	APCLSV-P480-For APCLSV-P480-Rev	CAATGCAGCTCTTGTCCAAA CCCACAGTCACCTTCCACTT	484
<i>Asian prunus virus 1</i> (APV1)	APV1-P305-For APV1-P305-Rev	GGAATTGGCTTCCATTCTGA ACCAAGTAAAGCACCCATGC	420
<i>Asian prunus virus 2</i> (APV2)	APV2-P294-For APV2-P294-Rev APV2_CP_F1 APV2_CP_R1	TAATAATTATTAGTGGAGAGTC GCCCTCGACTTTGGAAGTCTCGAC AAAATTGTTTTGGAACATCATGCTG TCAGTCCATCTCCTTTCCCTTCAA	221 318
<i>Asian prunus virus 3</i> (APV3)	APV3-F2 APV3-R2	ACTCTACAGGTACATTCCGGAC CCATCAAGAACATGGTGCAGA	489
<i>Cherry virus A</i> (CVA)	CVA-TR10-F CVA-TR10-R	GGTCCACCACGCTCAACAAG TTCCAAGGCCCTTCTTATCTC	296
<i>Cherry green ring mottle virus</i> (CGRMV)	CGSp-F CGSp-R	GCGCAAACGGACCCTAAG CGCCAGTCACTTCAGTCAIT	650
<i>Cherry necrotic rusty mottle virus</i> (CNRMV)	CNRMV-P419-For CNRMV-P419-Rev	TCCTCAATCAGATCCCTTGG CTTTGAAGAGGCAAGGAACG	453
<i>Dapple plum and peach fruit disease viroid</i> (DPPFDd)	DPPFDd-P140-For DPPFDd-P140-Rev	CTCTGCCTTCGAAACACCAT GGCGCAGATAGAACAAAAGC	122
<i>Hop stunt viroid</i> (HSVd)	HSVd-P139-For HSVd-P139-Rev	TCTCAGAATCCAGCGAGAGG GGCGCAGATAGAACAAAAGC	177
<i>Little cherry virus 1</i> (LChV1)	LChV1-865F LChV1-1164R	TGGCAAAGAGGTCCAGTGAC TCCTTTTCGAGCTAGTCGTATCA	300
<i>Little cherry virus 2</i> (LChV2)	LChV2-P449-For LChV2-P449-Rev	AAATGGATGAAGGGCAAGTG CGTGTGAGTAACAGGGCTCA	471
<i>Nectarine stem pitting-associated virus</i> (NSPaV)	NSPaV-P57-For NSPaV-P57-Rev	GCCGAACCTCTGACTGGAC CCGATCCGAGACCCTATAAA	453
<i>Peach associated luteovirus</i> (PaLV) <sup>a</sup>	BLRV-P450-like For BLRV-P450-like Rev	TCCCTAGGAAGAGTCGTAGT TCCATCTTGAGAAATGCAGT	363
<i>Peach latent mosaic viroid</i> (PLMVd)	PLMVd-P93-For PLMVd-P93-Rev	CCGCCGTAGAAACAGGATTA TTCAGGAACCTCGCAGTGTGC	107
<i>Peach leaf pitting-associated virus</i> (PLPaV)	PLPaV-RNA1-F PLPaV-RNA1-R	AACATCTTGTGTGTGATTATCCAGGT TGCAACTGTTCCATCCGGTCTT	419
<i>Peach virus D</i> (PeVD) <sup>b</sup>	GAMaV-P38-For GAMaV-P38-Rev CSDaV-P152-For CSDaV-P152-Rev OBDV-P178-For OBDV-P178-Rev	TGCTGACTAGTAGGGCGATG TGACGGATCAATTGACGAGA GTTTCGAAAATGTCGGAGTGGT GCTTCGAAAATCCAGCAGAGAG AAACCCAGCACAAGGTCAAC GTAGAGACGCGGGTTTTGAG	431 341 361
<i>Peach virus T</i> (PeVT) <sup>c</sup>	GFKV-P358-For GFKV-P358-Rev GSyV1-P41-For GSyV1-P41-Rev MRFV-P40-For MRFV-P40-Rev	CTGGCGCATCTCCACCTGGGA ATGCGGCGGCTCCAAAGGCAG CACTCCAAGGACGAAATCC GGTGGCTTGGGTTTTAGATG ACTCAGCTCCTCCAACCTCA GAGATCTCAAACGGCTCGTC	261 160 522
<i>Peanut stunt virus</i> (PSV)	PSV-P211-For PSV-P211-Rev	TCAGAAGGGCCATAGTTTCG CCAGGAGGCAACTTTCTGAG	153
<i>Plum bark necrosis stem pitting-associated virus</i> (PBNSPaV)	PBNSPaV-P161-For PBNSPaV-P161-Rev	TTTGTGGTGCCTGGAAAATA ACAATAAGTGCCACCGAAG	478
<i>Plum pox virus</i> (PPV)	PPV-P36-For PPV-P36-Rev	ATGGCGAAGTCTCAGTTGCT AATTTGCGTGTGTTTCGTTCC	437
<i>Prunus necrotic ringspot virus</i> (PNRSV)	PNRSV-P208-For PNRSV-P208-Rev	TCCGCCTGTGTATGTGTCAT CCGCGATGGAGTTAAGAGAG	460
<i>Prune dwarf virus</i> (PDV)	PDV-CpF PDV-CpR	CTTCCAACCTTCGATGTTTG TCATCCACTGACTATTTTATCC	650

<sup>a</sup>PeVT를 검출하기 위하여 GFKV, GSyV1, MRFV 유사종 진단용 프라이머를 사용함.

<sup>b</sup>PeVD를 검출하기 위하여 CSDaV, GAMaV, OBDV 유사종 진단용 프라이머를 사용함.

<sup>c</sup>PaLV를 검출하기 위하여 BLRV 유사종 진단용 프라이머를 사용함.



표 21. 전국 복숭아 농가에서 채집 및 확보한 시료의 바이러스 및 바이로이드 RT-PCR 진단결과<sup>1, 2, 3</sup>

진단대상 바이러스 및 바이로이드	약칭	검출수	검출율 (%)
<i>Peach latent mosaic viroid</i>	PLMVd	173	74.57
<i>Peach virus T<sup>a</sup></i>	PeVT	111	47.84
<b><i>Apple chlorotic leaf spot virus</i></b>	<b>ACLSV</b>	<b>83</b>	<b>35.78</b>
<i>Peach virus D<sup>b</sup></i>	PeVD	79	34.05
<i>Asian prunus virus 2</i>	APV2	42	24.28
<i>Plum bark necrosis stem pitting-associated virus</i>	PBNSPaV	49	21.12
<b><i>Hop stunt viroid</i></b>	<b>HSVd</b>	<b>48</b>	<b>20.69</b>
<i>Nectarine stem pitting-associated virus</i>	NSPaV	42	18.01
<i>Prunus necrotic ringspot virus</i>	PNRSV	31	13.36
<i>Asian prunus virus 1</i>	APV1	30	12.93
<i>Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus</i>	APCLSV	28	12.07
<i>Peach leaf pitting-associated virus</i>	PLPaV	14	8.09
<i>Little cherry virus 2</i>	LChV2	13	5.60
<i>Asian prunus virus 3</i>	APV3	7	4.05
<i>Little cherry virus 1</i>	LChV1	7	4.05
<i>Cherry virus A</i>	CVA	3	1.72
<i>Peach associated luteovirus<sup>c</sup></i>	PaLV	2	0.86
<i>Cherry green ring mottle virus</i>	CGRMV	0	0
<i>Cherry necrotic rusty mottle virus</i>	CNRMV	0	0
<i>Peanut stunt virus</i>	PSV	0	0
<i>Plum pox virus</i>	PPV	0	0
<i>Prune dwarf virus</i>	PDV	0	0

<sup>1</sup>표 3에 기재된 프라이머 서열정보를 이용하여 전국 복숭아 농가에서 채집한 잎 또는 과실 시료 232점을 RT-PCR 진단하여 그 결과를 검출율 순으로 나열함.

<sup>2</sup>진한 글씨: 「종자관리요강」에 복숭아 특정병으로 지정된 바이러스 및 바이로이드.

<sup>3</sup>APV2, APV3, CVA, CGRMV, LChV1, PLPaV의 경우 잎 또는 과실시료 173점을 RT-PCR 진단하여 그 결과를 검출율 순으로 나열함

<sup>a</sup>PeVT를 검출하기 위하여 GFkV, GSyV1, MRFV 유사종 진단용 프라이머를 사용함.

<sup>b</sup>PeVD를 검출하기 위하여 CSDaV, GAMaV, OBDV 유사종 진단용 프라이머를 사용함.

<sup>c</sup>PaLV를 검출하기 위하여 BLRV 유사종 진단용 프라이머를 사용함.

- 2017년 영천, 경산에서 채집한 복숭아 39점에 대하여 RT-PCR 진단을 실시한 결과, ACLSV 8점, PNRSV 16점, HSVd 13점, PLMVd 37점이 검출되었음. 결과적으로 39점 모두 바이러스가 검출되었으며, PLMVd, PNRSV, HSVd, ACLSV 순으로 감염율의 차이를 보임.

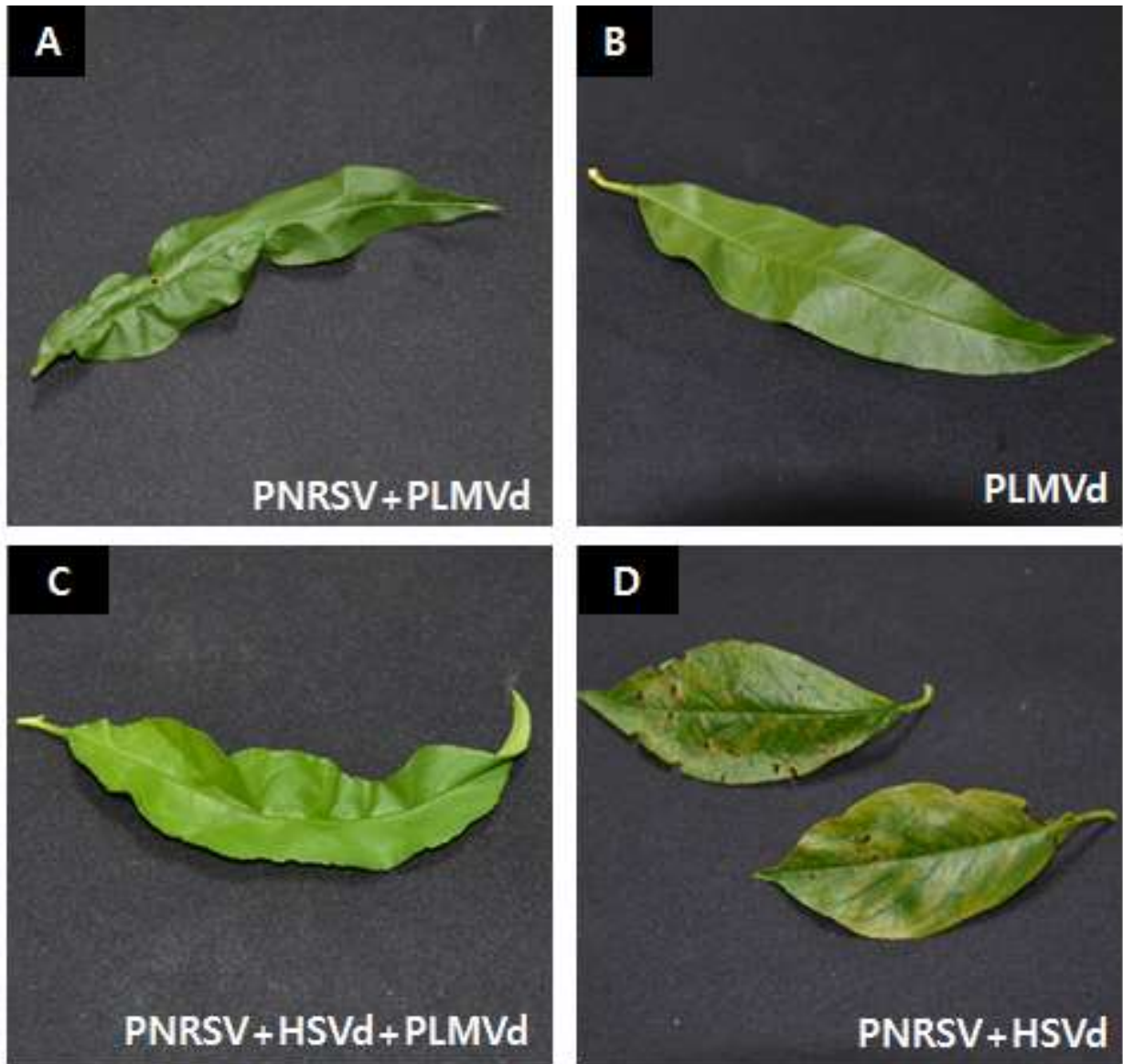


그림 19. 복숭아 잎에서 나타나는 다양한 이상증상. A: 뒤틀림, B: 약한 황화, C: 뒤틀림 및 약한황화, D: 엽맥황화 및 곰보자국.

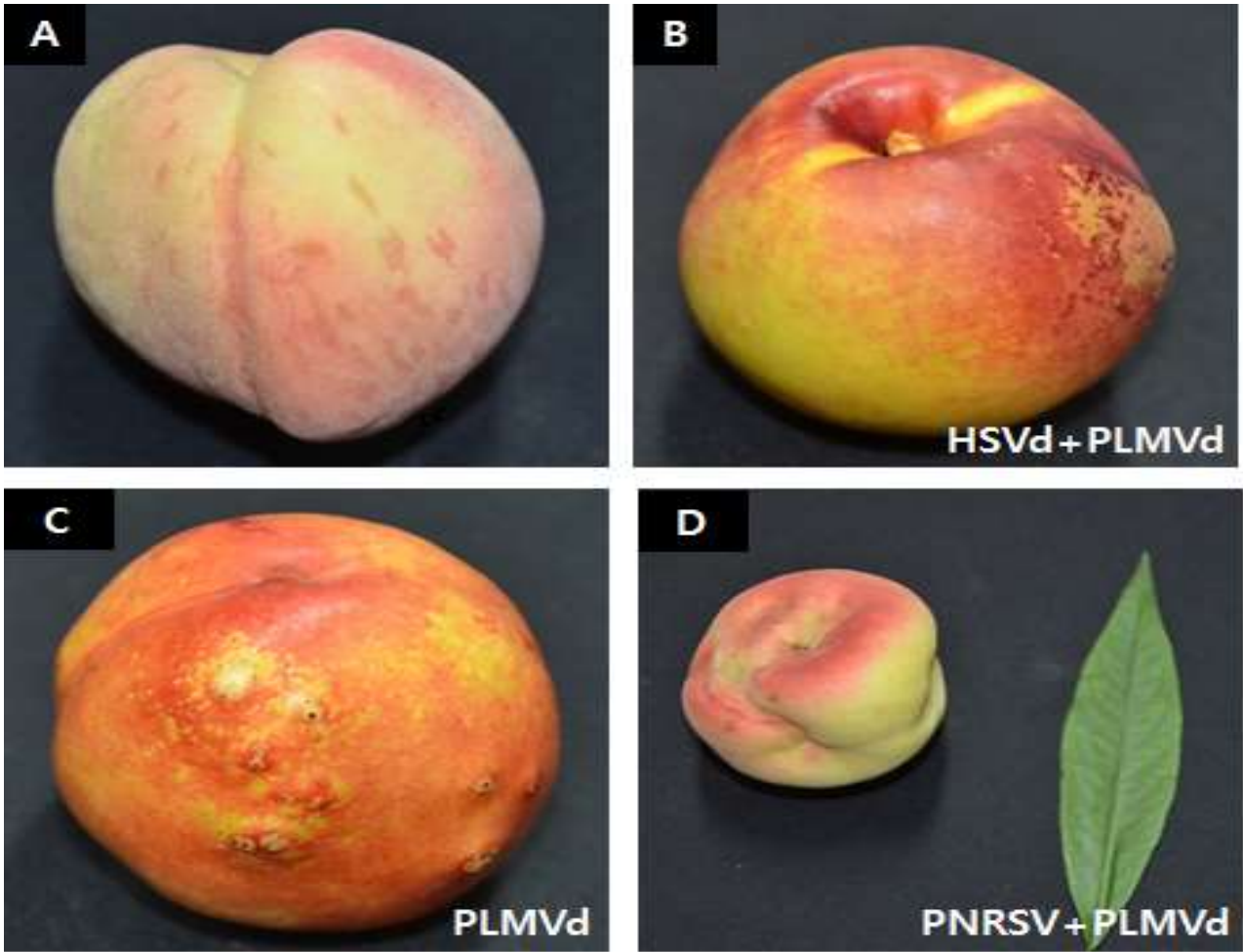


그림 20. 복숭아 과실에서 보이는 다양한 이상증상. A: 할킨 자국같은 무늬, B, C, D: 기형과

표 22. 복숭아 채집지역 및 바이러스 및 바이로이드 진단결과\*

채집지역	품종명	채집 시료	채집 시료 수	검출된 시료 수	RT-PCR 진단결과			
					ACLSV	PNRSV	HSVd	PLMVd
경산	털복숭아	잎	5	5	1	5	3	4
		과실	3	3	3	1	2	3
	선프레	잎	4	4	1	1	0	4
		과실	2	2	0	1	0	2
	매끈한복숭아	잎	2	2	0	2	1	2
		과실	3	3	1	1	2	3
	천홍	잎	4	4	0	1	1	4
		과실	3	3	0	0	2	3
-	잎	4	4	1	2	2	3	
	과실	1	1	0	1	0	1	
영천	털복숭아	잎	8	8	1	1	1	8
<b>계</b>			<b>39</b>	<b>39</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>13</b>	<b>37</b>
<b>감염율(%)</b>				<b>100.0</b>	<b>20.5</b>	<b>41.0</b>	<b>33.3</b>	<b>94.9</b>

\*전 시료에서 바이러스가 검출되었으며, PLMVd가 가장 높았으며(94.9%), PNRSV(41%), HSVd(33.3%), ACLSV(20.5%) 순으로 나왔다. ACLSV: Apple chlorotic leaf spot virus, PNRSV: Peach necrotic ringspot virus, HSVd: Hop stunt viroid, PLMVd: Peach latent mosaic viroid.

- 2018년 복숭아를 재배하는 전국 9개 지역에서(경기 이천; 충청 음성, 청주; 충남 세종; 경북 영덕, 청도, 영천, 경산; 전남 무안) 에서 채집한 복숭아 39점에 대하여 RT-PCR 진단을 실시한 결과, 아래와 같이 검출됨.

표 23. 복숭아 채집지역별 바이러스 및 바이로이드 진단결과\*

지역	경기도	충청북도		충청남도	경상북도				전라남도	계 9지역
	이천	음성	청주	세종	경산	영천	영덕	청도	무안	
채집시료수	9	10	10	10	22	23	5	5	10	104
검출시료수	9	10	10	10	22	20	5	5	10	101
ACLSV	8	-	-	9	11	16	-	5	6	55
APCLSV	3	-	-	-	16	9	-	-	-	28
APV1	-	-	-	-	5	9	-	2	8	24
APV2	-	4	1	2	-	9	-	5	10	31
APV3	-	-	-	-	-	6	-	1	-	7
CVA	-	-	-	-	-	-	3	-	-	3
CGRMV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CNRMV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HSVd	2	-	-	-	3	15	-	-	10	30
LChV1	-	4	-	1	-	-	2	-	-	7
LChV2	-	-	-	1	3	5	-	-	-	9
NSPaV	8	-	4	1	10	13	-	1	1	38
PBNPaV	1	-	-	2	14	13	-	5	10	45
PDV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PaLV	-	-	-	-	2	-	-	-	-	2
PLPaV	1	-	-	-	-	9	-	-	-	10
PeVD	9	10	-	9	16	12	-	5	10	71
PeVT	9	10	10	10	22	19	5	5	10	100
PLMVd	-	10	10	10	19	8	5	-	10	72
PNRSV	-	-	-	-	15	2	-	-	-	17
PPV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\*ACLSV: Apple chlorotic leafspot virus; APCLSV: Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus; APV1: Asian prunus virus 1; APV2: Asian prunus virus 2; APV3: Asian prunus virus 3; CVA: Cherry virus A; CGRMV: Cherry green ring mottle virus; CNRMV: Cherry necrotic rusty mottle virus; HSVd: Hop stunt viroid; LChV1: Little cherry virus 1; LChV2: Little cherry virus 2; NSPaV: Nectarine stem pitting-associated virus; PBNPaV: Plum bark necrosis stem pitting-associated virus; PDV: Prune dwarf virus; PaLV: Peach associated luteovirus; PLPaV: Peach leaf pitting-associated virus; PeVD: Peach virus D; PeVT: Peach virus T; PLMVd: Peach latent mosaic viroid; PNRSV: Prunus necrotic ringspot virus; PPV: Plum pox virus.

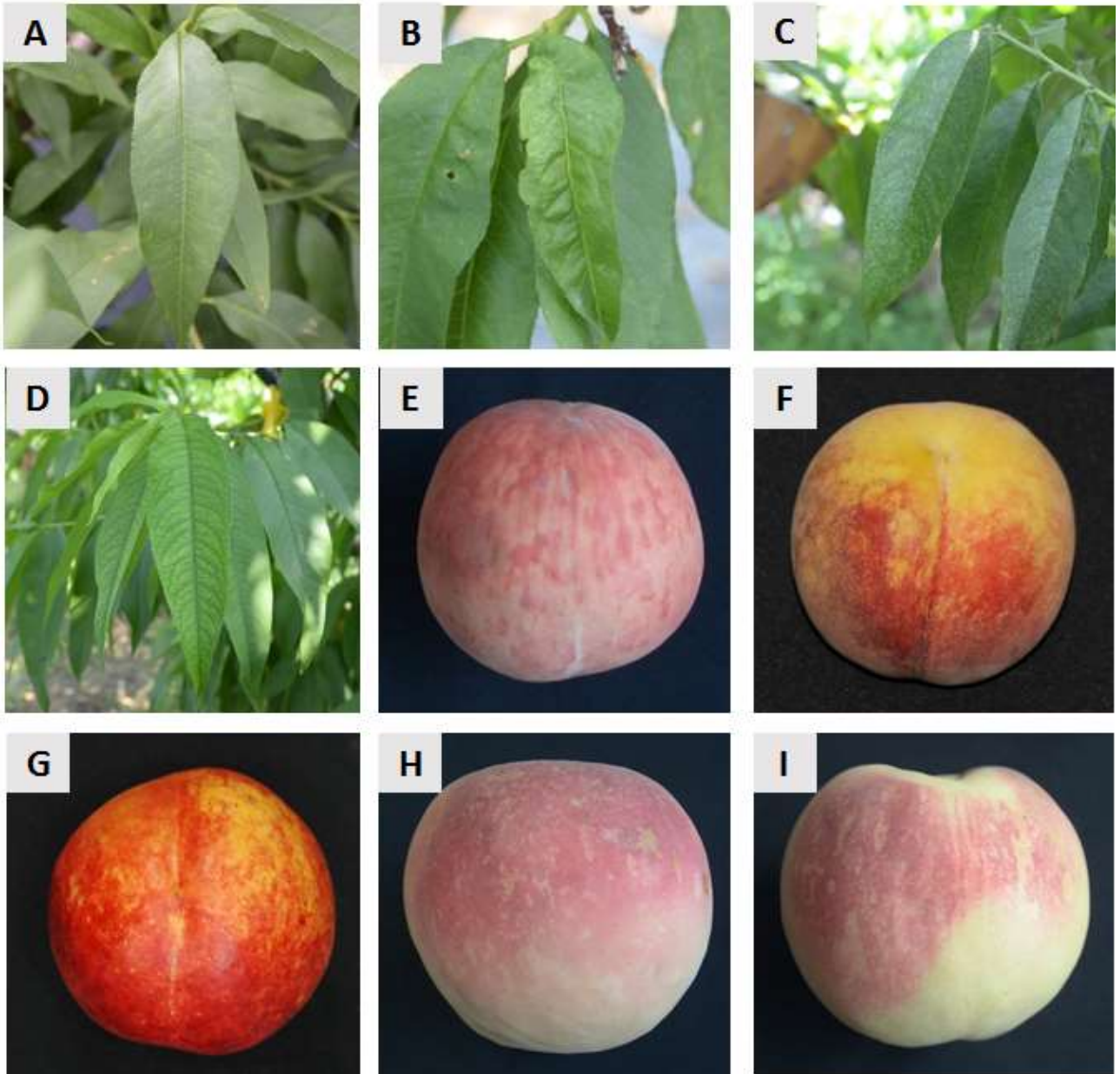


그림 21. 복숭아 잎과 과실에서 나타나는 다양한 이상증상. A: 황화 반점; B: 잎 기형; C: 황화 반점; D: 엽맥녹대; E~I: 착색불량.

품질 : 상



품질 : 하



그림 22. 청주에서 채집한 복숭아 과실시료. 품종은 천중도이며, 상품 5점, 하품 5점을 진단함. 진단결과, 품질과 바이러스 및 바이로이드 감염간 상관관계는 없는 것으로 보임.

품질 : 하



그림 23. 영덕에서 채집한 복숭아 과실시료. 품종은 털복숭아이며, 하품 5점을 채집함.

품질 : 상



품질 : 하



그림 24. 이천에서 채집한 복숭아 과실시료. 품종은 백도이며 상품 9점, 하품 4점을 진단함. 진단결과, 품질과 바이러스 및 바이로이드 감염간 상관관계는 없는 것으로 보임.

품질 : 하



그림 25. 청도에서 채집한 복숭아 과실시료. 품종은 천도이며, 하품 5점을 진단함.

품질 : 상



품질 : 하



그림 26. 음성에서 채집한 복숭아 과실시료. 품종은 백도이며, 상품 5점, 하품 5점을 진단함. 진단결과와 관계없이 바이러스 및 바이로이드가 모두 검출됨.

품질 : 상



품질 : 하



그림 27. 세종에서 채집한 복숭아 과실시료. 품종은 대육계(털복숭아)이며, 상품 5점, 하품 5점을 진단함.



품질 : 하



그림 28. 무안에서 채집한 복숭아 과실시료. 품종은 천하제일도이며, 하품 10점을 진단함.



그림 29. 경산에서 채집한 복숭아 잎 시료. 영봉 4점, 홍금향 4점, 찌요마루 3점, 수홍 3점, 마도카 4점, 썬프레 4종을 RT-PCR 진단함.

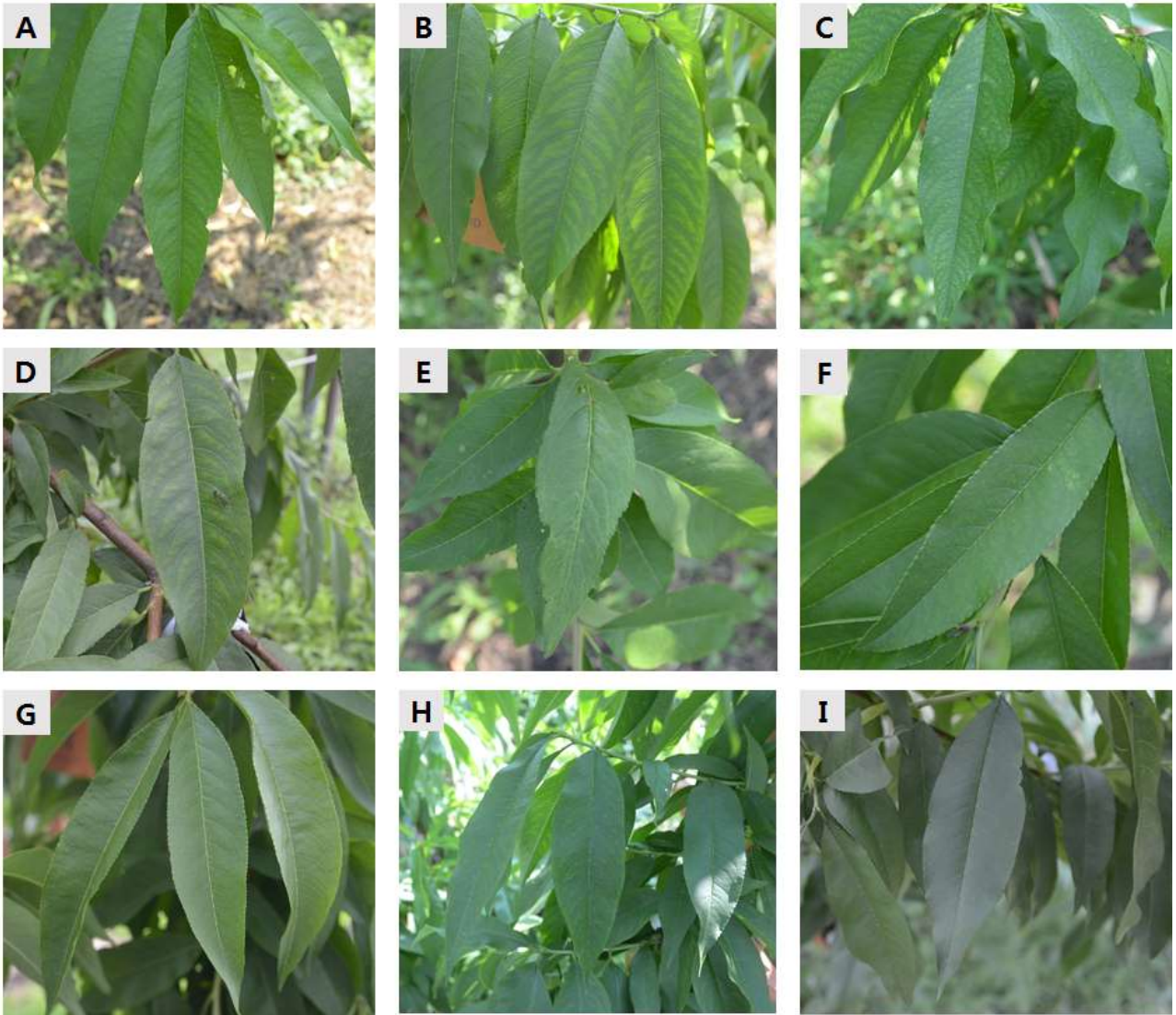


그림 30. 영천에서 채집한 복숭아 잎 시료. 품종은 사쿠라이며, 수세가 약하고 열매를 잘 맺지 못하는 나무에서 이상증상을 보이는 잎 시료 7점(A~G), 생육이 상대적으로 양호한 나무에서 잎 시료 2점(H, I)을 채집함.

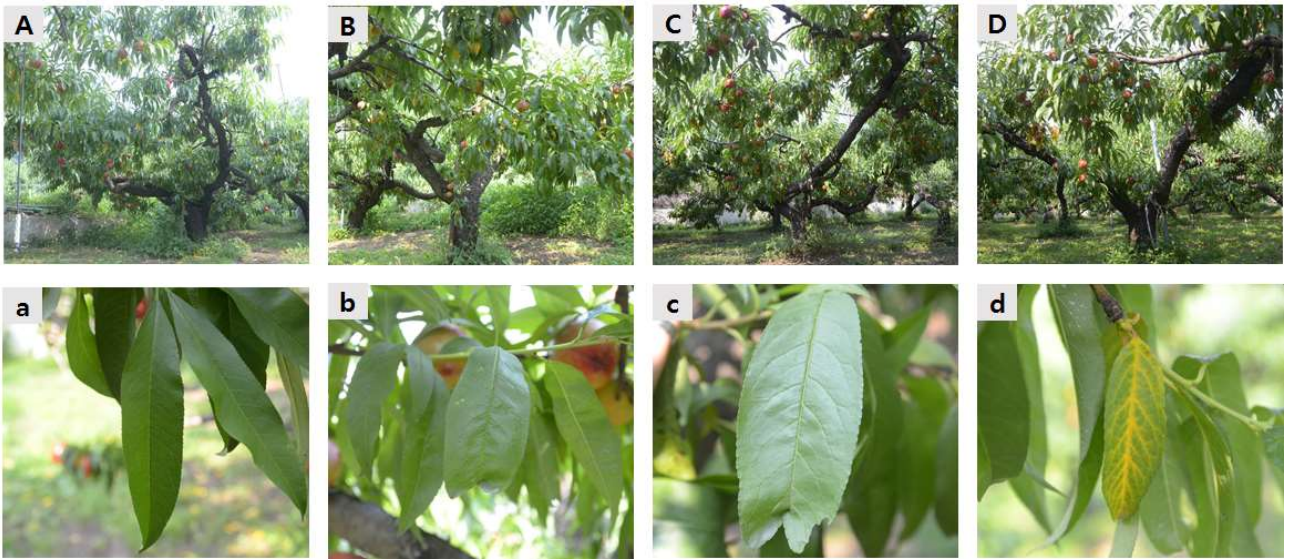


그림 31. 영천에서 채집한 복숭아 잎 시료. 품종은 천도이며, 수세가 가장 좋고 건전한 열매가 많은 나무에서 잎 시료 1점(A, a), 열매상태가 좋지 않은 나무(B~D, b~d)에서 이상증상을 보이는 잎 시료 3점을 채집함.

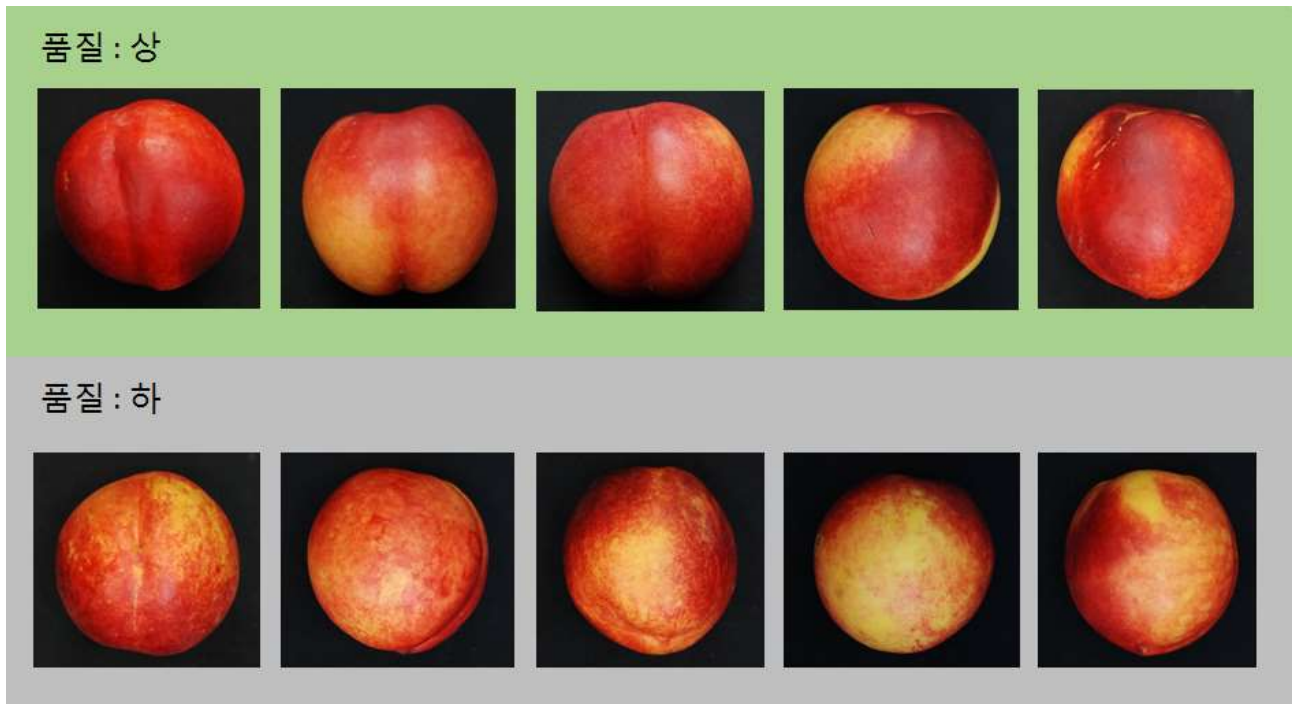


그림 32. 영천에서 채집한 복숭아 과실시료. 품종은 천도이며 상품 5점, 하품 5점을 진단함.

- 2019년 김천에서 채집한 자두 잎 11점, 과실 4점을 RT-PCR 진단한 결과, ACLSV, HSVd, MRFV, LChV2, PBNSPaV가 검출됨. 특히 과실 표면에 얼룩무늬가 다수 관찰됨. 특정한 병징을 보이는 과실을 포함하여 잎을 무작위로 채집함.



그림 33. 김천에서 채집한 자두. 1, 2, 3번 과실 모두 과실표면에 얼룩무늬가 관찰됨.

표 24. 김천에서 채집한 자두 바이러스 및 바이로이드 RT-PCR 진단결과\*

	바이러스 및 바이로이드				
	ACLSV	HSVd	LChV2	PeVT	PBNSPaV
잎	0/11	10/11	7/11	4/11	3/11
과실	3/4	4/4	0/4	1/4	1/4
계	3/15	14/15	7/15	5/15	4/15

\*ACLSV: *Apple chlorotic leaf spot virus*; HSVd: *Hop stunt viroid*; LChV2: *Little cherry virus 2*; PeVT: *Peach virus T*; PBNSPaV: *Plum bark necrosis stem pitting-associated virus*.

- 의성에서 채집한 자두에서 각각 잎 5점, 과실 6점을 확보함. RT-PCR 진단결과, PBNSPaV, HSVd가 검출되었음. 특히 시료의 종류와 관계없이 HSVd가 검출되었으나 PBNSPaV는 과실에서만 검출됨.



그림 34. 의성에서 채집한 자두. 품종명은 알 수 없었음. 과실 표면에 얼룩무늬가 발생함

표 25. 의성에서 채집한 자두 바이러스 및 바이로이드 RT-PCR 진단결과\*

	바이러스 및 바이로이드	
	HSVd	PBNSPaV
잎	5/5	0/5
과실	6/6	6/6
계	11/11	6/11

\*HSVd: *Hop stunt viroid*; PBNSPaV: *Plum bark necrosis stem pitting-associated virus*.

- 충주에서 확보한 복숭아 잎 49점을 RT-PCR 진단한 결과, ACLSV, LChV2, NSPaV, PBNSPaV, PLPaV, PeVT, PLMVd가 검출됨(표 20).

표 26. 충주에서 채집한 자두 바이러스 및 바이로이드 RT-PCR 진단결과\*

	바이러스 및 바이로이드						
	ACLSV	LChV2	NSPaV	PBNSPaV	PLMVd	PLPaV	PeVT
잎	7/49	4/49	1/49	3/49	49/49	4/49	1/49

\*ACLSV: *Apple chlorotic leafspot virus*; LChV2: *Little cherry virus 2*; NSPaV: *Nectarine stem pitting-associated virus*; PBNSPaV: *Plum bark necrosis stem pitting-associated virus*; PLMVd: *Peach latent mosaic viroid*; PLPaV: *Peach leaf pitting-associated virus*; PeVT: *Peach virus T*.

- 영천에서 복숭아 과실 10점을 확보함. 과실이 짓무르고 기형과가 많았음. RT-PCR 진단한 결과, ACLSV, APV1, APV2, HSVd, NSPaV, PeVD, PeVT, PLMVd가 검출됨. 기형과의 발생원인이 PLMVd에 의한 것이라 추정할 수 있음.



그림 35. 영천에서 확보한 복숭아 과실. 품종은 대명(백도)이며, 기형과 9점을 확보하여 RT-PCR 진단을 실시함.

표 27. 영천에서 채집한 복숭아 바이러스 및 바이로이드 RT-PCR 진단결과\*

	바이러스 및 바이로이드							
	ACLSV	APV1	APV2	HSVd	NSPaV	PeVD	PeVT	PLMVd
과실	7/10	6/10	10/10	5/10	2/9	8/10	10/10	10/10

\*ACLSV: Apple chlorotic leafspot virus; APV1: Asian prunus virus 1; APV2: Asian prunus virus 2; HSVd: Hop stunt viroid; NSPaV: Nectarine stem pitting-associated virus; PeVD: Peach virus D; PeVT: Peach virus T; PLMVd: Peach latent mosaic viroid.

- 사과 및 복숭아 RT-PCR 진단 및 NGS 분석결과를 바탕으로 검출된 병원체 중 일반농가에서 RT-PCR 진단에서 검출되는 병원체를 중심으로 무병묘 보증시 검사해야할 진단대상 병원체를 사과 6종, 복숭아 15종으로 제안하고자 함. 지속적인 모니터링과 추가적인 진단 및 병원체 동정을 통해 국내 사과 및 복숭아에 발생하는 바이러스 및 바이로이드를 구명하고 이를 바탕으로 무병묘 인증시 진단대상 병원체 후보를 수정 및 보완할 예정임.

표 28. 사과 무병묘 보증을 위한 병원체 진단대상 병원체 후보 목록<sup>1</sup>

분류	종명
바이러스	<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>
	<i>Apple geminivirus</i>
	<i>Apple green crinkle associated virus</i>
	<i>Apple luteovirus 1</i>
	<b><i>Apple mosaic virus</i></b>
	<i>Apple rootstock virus A</i>
	<i>Apple rubbery wood virus 1</i>
	<i>Apple rubbery wood virus 2</i>
	<b><i>Apple stem grooving virus</i></b>
	<b><i>Apple stem pitting virus</i></b>
	<b><i>Apricot latent virus</i></b>
	<i>Citrus concave gum-associated virus</i>
	<i>Cherry associated luteovirus</i>
	<i>Cherry green ring mottle virus</i>
	<i>Cherry rusty mottle associated virus</i>
	<i>Cherry twisted leaf associated virus</i>
	<i>Epirus cherry virus</i>
	<i>Grapevine pinot gris virus</i>
	<i>Hubei picorna-like virus</i>
	<i>Pineapple bacilliform virus</i>
	바이로이드
<i>Apple hammerhead viroid</i>	

<sup>1</sup>국내 사과 NGS 분석으로 검출된 병원체(바이러스, 바이로이드)는 22종으로 확인됨. 이중 농가에서 검출되는 바이러스는 *Apple chlorotic leaf spot virus*, *Apple mosaic virus*, *Apple stem grooving virus*, *Apple stem pitting virus*, *Apricot latent virus* 5종이며, 바이로이드는 *Apple scar skin viroid* 1종임.

표 29. 복숭아 무병묘 보증을 위한 병원체 진단대상 병원체 후보 목록<sup>1</sup>

분류	종명
바이러스	<b><i>Apple chlorotic leaf spot virus</i></b>
	<i>Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus</i>
	<i>Asian prunus virus 1</i>
	<i>Asian prunus virus 2</i>
	<i>Asian prunus virus 3</i>
	<i>Cherry green ring mottle virus</i>
	<i>Cherry necrotic rusty mottle virus</i>
	<i>Cherry virus A</i>
	<i>Little cherry virus 1</i>
	<i>Little cherry virus 2</i>
	<i>Nectarine stem pitting-associated virus</i>
	<i>Peach associated luteovirus</i>
	<i>Peach leaf pitting-associated virus</i>
	<i>Peach virus D</i>
	<i>Peach virus T</i>
	<i>Peanut stunt virus</i>
	<i>Plum bark necrosis stem pitting-associated virus</i>
	<i>Plum pox virus</i>
	<i>Prune dwarf virus</i>
<i>Prunus necrotic ringspot virus</i>	
바이로이드	<b><i>Hop stunt viroid</i></b>
	<b><i>Peach latent mosaic viroid</i></b>

<sup>1</sup>국내 복숭아 NGS 분석으로 검출된 병원체(바이러스, 바이로이드)는 22종으로 확인됨. 이중 농가에서 검출되는 바이러스는 *Apple chlorotic leaf spot virus*, *Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus*, *Asian prunus virus 1*, *Asian prunus virus 2*, *Little cherry virus 2*, *Nectarine stem pitting-associated virus*, *Peach associated luteovirus*, *Peach leaf pitting-associated virus*, *Peach virus D*, *Peach virus T*, *Plum bark necrosis stem pitting-associated virus*, *Prunus necrotic ringspot virus* 13종이며, 바이로이드는 *Hop stunt viroid*, *Peach latent mosaic viroid* 2종임.



- 사과에서 검출되는 *Apple chlorotic leaf spot virus*, *Apple mosaic virus* 2종, 복숭아에서 검출되는 *Apple chlorotic leaf spot virus*의 현장진단을 위하여 RT-LAMP PCR 프라이머를 설계함.
- 복숭아 RT-PCR 진단결과를 바탕으로 검출율이 높은 바이러스 8종에 대하여 진단용 프라이머를 설계함.

표 30. 사과 및 복숭아 현장진단용 RT-LAMP PCR 프라이머 목록 및 염기서열 정보

바이러스(약칭)	프라이머	프라이머 염기서열	길이	위치
<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> (ACLSV)	ACLSV-F3	GCAGATCTGAAAGCGTTCCT	20	37-56
	ACLSV-R3	ACCACCTCCTTCAGGTTGA	19	242-224
	ACLSV-FIP	TCGCTATGTTTCGCGAAGATGGC(tttt) CTTCATGGAAAGACAGGGGC	46 (42)	139-118 76-95
	ACLSV-RIP	GACCTCGGAGCAGACGGAGT(tttt) AGGAGCCTATCACCTTCTGG	44 (40)	147-166 223-204
<i>Apple mosaic virus</i> (ApMV)	ApMV-F3	TGGATCTTGCGCTGGATG	18	42-59
	ApMV-R3	CCTGTGGCCCTTTAGGAATT	20	243-224
	ApMV-FIP	GCTTGACGAGCAACCGCTCG(tttt) CAAGTGGTGTACAGTACGA	44 (40)	119-100 60-79
	ApMV-RIP	ATCCCCGTGAGTGTATCCCCGT(tttt) CCCCTAACCTCCCAAGCT	43 (39)	139-159 205-188

<sup>1</sup>RT-LAMP PCR 프라이머 설계는 다음 프로그램을 사용함(<https://primerexplorer.jp/e/>).

<sup>2</sup>프라이머의 위치는 다음 서열을 참고함(ACLSV: MH534903; ApMV: AF548367).

<sup>3</sup>Loopamp RNA Amplification Kit (Eiken Chemical Co., Ltd., Japan)을 사용하여 RT-LAMP PCR 진단을 실시함.

표 31. 복숭아에서 검출율이 높은 바이러스 8종 진단용 프라이머 목록 및 염기서열 정보

바이러스(약칭)	프라이머	프라이머 염기서열	산물 (bp)
<i>Asian prunus virus 1</i> (APV1)	APV1-F1	CCACACTCACACCCTGTTTG	448
	APV1-R3	CTTGAGCACCAGCAAGAATC	
	APV1-F2	CAATCCAGGGTTAGTTCAACA	
<i>Asian prunus virus 2</i> (APV2)	APV1-R3	CTTGAGCACCAGCAAGAATC	592
	APV2-P294-F	TAATAATTATTAGTGGAGAGTC	
	APV2-P294-R	GCCTCGACTTTGGAAGTCTCGAC	
<i>Apricot pseudo chlorotic leaf spot virus</i> (APCLSV)	APCLSV-F2	CAGAAGGGGATATTCCAATCG	223
	APCLSV-R1	CAACCAATTATGTGCATTGGG	
<i>Nectarine stem pitting-associated virus</i> (NSPaV)	NSPaV-F1	GAAACCTTCCAAGAGGAGGTG	239
	NSPaV-R1	CTGACACGGCCTCTTCCATG	
	NSPaV-F2	GGAAGTGCACAACCCCTACC	
<i>Peach virus D</i> (PeVD)	NSPaV-R2	GGCACGACACTTCATCCGTG	599
	PeVD-F	CTGCCCTTTGGAGCCGCCGC	
<i>Peach virus T</i> (PeVT)	PeVD-R	TGAGGTTGGAGGAGCTGAGT	350
	PeVT-F	CATCGACGATCCTGCCCCC	
<i>Humbark necrosis stem pitting-associated virus</i> (PBNSPaV)	PeVT-R	CGAGGATTGGCTCGGAACCG	176
	PBNSPaV-P161-F	TTTGTGGTGCCTGGAAAATA	
<i>Prunus necrotic ringspot virus</i> (PNRSV)	PBNSPaV-P161-R	ACAATAAGTGCCACCCGAAG	478
	PNRSV-P208-F	TCCGCCTGTGTATGTGTCAT	
	PNRSV-P208-R	CCGCGATGGAGTTAAGAGAG	460

<sup>1</sup>RT-PCR 진단하여 프라이머의 특이성을 확인중에 있으며, 그 외 바이러스 및 바이로이드에 대한 진단용 프라이머를 설계중에 있음.

○ 국내 및 국제학술회의 발표 - 7건

No	회의명칭	제목	발표자	발표일시	장소	국명
1	The 2019 KSPP Fall International Conference & Symposium for Smart Crop Protection	First report of little cherry virus 2 in plum in Korea	김소연 등 7명 (경북대학교)	2019.10.16	나주	대한민국
2	2018 International Joint Conference on Plant Protection	First report of <i>Little cherry virus 2</i> in peach ( <i>Prunus persica</i> ) in Korea	김소연 등 9명 (경북대학교)	2018.10.24	광주	대한민국
3	2018 International Joint Conference on Plant Protection	Investigation of correlation between apple cracking damage in 'Hongro' cultivar and apple viruses or viroid	김소연 등 9명 (경북대학교)	2018.10.24	광주	대한민국
4	2018 International Joint Conference on Plant Protection	Survey of virus occurrence in peach ( <i>Prunus persica</i> ) in Korea	김소연 등 9명 (경북대학교)	2018.10.24	광주	대한민국
5	2018 International Joint Conference on Plant Protection	Occurrence of viruses and viroid in grapevine ( <i>Vitis vitifera</i> L.) in Korea	권보람 등 9명 (경북대학교)	2018.10.24	광주	대한민국
6	2018 International Joint Conference on Plant Protection	Analysis of the monthly change in the infection rate of apple viruses and viroids in Uiseong	권보람 등 9명 (경북대학교)	2018.10.24	광주	대한민국
7	2018 KSPP Spring Meeting and Conference	Survey of viral disease occurrence in <i>Malus pumila</i> and <i>Prunus persica</i> .	김소연 등 9명 (경북대학교)	2018.04.26.	충북대학교	대한민국

○ 생명자원(생물자원)/화합물 - 4건

No	생명자원(생물자원)/화합물명	등록/기탁번호	등록/기탁기관	발생년도
1	Little cherry virus 2 YC gene for p182 protein, partial cds	LC427230	NCBI	2018
2	Little cherry virus 2 GS gene for p182 protein, partial cds	LC427238	NCBI	2018
3	Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus peach gene for RNA-directed RNA polymerase, partial cds	LC427237	NCBI	2018
4	Nectarine stem pitting-associated virus GS gene for RNA-directed RNA polymerase, partial cds	LC427239	NCBI	2018

○ 전문 연구 인력 양성 - 3건(석사 3명)


No	분류	기준 년도	현 황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
		2020		3				3				3		


○ 기술거래(이전) 등 - 4건, 12,100,000원

No	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수현황
1	기술이전	포도에서 발생하는 3종의 바이러스 검출을 위한 프라이머 세트 및 이를 이용하는 바이러스 검출 방법	주식회사 미소진	2019.04.04	2,200,000	
2	기술이전	사과 및 배에 발생하는 바이러스 및 바이로이드 감염 다중 진단을 위한 프라이머 세트 및 진단방법	주식회사 캔서롭	2018.11.06	1,100,000	
3	기술이전	사과 및 배에 발생하는 바이러스 및 바이로이드 감염 다중 진단을 위한 프라이머 세트 및 진단방법	주식회사 넥스바이오	2018.11.02	4,400,000	
4	기술이전	사과 및 배에 발생하는 바이러스 및 바이로이드 감염 다중 진단을 위한 프라이머 세트 및 진단방법	주식회사 미소진	2018.11.02	4,400,000	

○ 정책건의 - 2건

- 「종자관리요강」 복숭아 특정병 진단대상 병원체의 추가 건의(국립농업과학원)
- 검역병해충 *Little cherry virus 1*과 *Little cherry virus 2*의 발생보고 및 검역 관리급 병해충 제외 건의(농림축산검역본부)

양식		연구결과활용계획서			
<b>정책건의</b> Policy Application (PA)		과제분류	농생명산업기술개발사업   연도   2020		
		과제코드	317006-4		
		기술코드	국가과학기술표준분류체계 : LB0304		
		제안부서	국립농업과학원 종자검정연구실		
1. 과제명	사과, 복숭아, 갈매, 배, 포도의 유묘 바이러스 진단 기술개발				
2. 제목	「종자관리요강」 복숭아 특정병 진단대상 병원체의 추가 건의				
3. 연구원	성명	직급	기관	소속부서	참여율(%)
a. 주담당자	이수현	부교수	경북대학교	응용생물학전공	30
b. 담당자	문계선	책임연구원	한국생명공학연구원	식품시스템공학과	20
b. 담당자	정래동	부교수	전남대학교	응용생물학과	10
b. 담당자	김종섭	농업연구사	국립농자원	종자검정연구실	10
b. 담당자	이흥규	박사후유	경북대학교	응용생물학전공	10
b. 담당자	박상민	박사과정	경북대학교	응용생물학전공	10
b. 담당자	남경화	연구원	경북대학교	응용생물학전공	6
b. 담당자	한승주	학사과정	경북대학교	응용생물학전공	6
4. 정책건의사항	○ 복숭아 무병묘 생산의 유통을 위하여 상업적으로 판매되는 복숭아에 발생하고 있는 주요 병원체를 「종자관리요강」에 복숭아 특정병에 추가할 것을 건의함.				
5. 정책건의 내용요약	○ 현재 「종자관리요강」에서 복숭아의 특정병으로 관리되는 병원체는 2종임. - Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV), Hop stunt viroid (HSVd) ○ 그러나 본 과제의 연구결과, 국내 복숭아에서는 약 20여종의 바이러스 및 바이로이드가 발생하고 있어, 현재의 제도로는 무병 복숭아 묘목의 생산, 관리, 유통이 불가능한 실정임. ○ 무병 복숭아 묘목의 생산과 유통을 위하여 농가에 발생하고 있는 주요 병원체를 「종자관리요강」에 특정병으로 추가되어야 할 것으로 판단됨. ○ 본 연구과제의 결과를 종합하여, 「종자관리요강」에 복숭아 특정병으로 농가에서 높은 감염율을 나타내고 있는 아래의 14종을 추가할 것을 건의함. ① Peach latent mosaic viroid ② Peach virus T ③ Peach virus D ④ Asian prunus virus 2 ⑤ Plum bark necrosis stem pitting-associated virus ⑥ Nectarine stem pitting-associated virus ⑦ Prunus necrotic ringspot virus ⑧ Asian prunus virus 1 ⑨ Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus ⑩ Peach leaf pitting-associated virus ⑪ Little cherry virus 2 ⑫ Asian prunus virus 3 ⑬ Little cherry virus 1 ⑭ Cherry virus A ○ 아울러 국립농자원에서 복숭아 특정병을 고감도로 효율적으로 검출하기 위한 진단시스템 개발이 필요함. 이를 위하여 2021년부터 복숭아 특정병 진단시스템 개발 관련 연구과제의 추진을 건의함.				
6. 책임유머	종자관리요강, 복숭아, 특정병, 바이러스, 바이로이드, 무병묘				
정책건의 주담당자	이수현 				
	2020년 9월 15일 본 연구과제 성과를 국가 정책 반영 사항으로 건의합니다. 국립농자원장 귀하				

양식		연구결과활용계획서			
<b>정책건의</b> Policy Application (PA)		과제분류	농생명산업기술개발사업   연도   2020		
		과제코드	317006-4		
		기술코드	국가과학기술표준분류체계 : LB0304		
		제안부서	농림축산검역본부 위험관리과		
1. 과제명	사과, 복숭아, 갈매, 배, 포도의 유묘 바이러스 진단 기술개발				
2. 제목	검역병해충 <i>Little cherry virus 1</i> 과 <i>Little cherry virus 2</i> 의 발생보고 및 검역 관리급 병해충 제외 건의				
3. 연구원	성명	직급	기관	소속부서	참여율(%)
a. 주담당자	이수현	부교수	경북대학교	응용생물학전공	30
b. 담당자	문계선	책임연구원	한국생명공학연구원	식품시스템공학과	20
b. 담당자	정래동	부교수	전남대학교	응용생물학과	10
b. 담당자	김종섭	농업연구사	국립농자원	종자검정연구실	10
b. 담당자	이흥규	박사후유	경북대학교	응용생물학전공	10
b. 담당자	박상민	박사과정	경북대학교	응용생물학전공	10
b. 담당자	남경화	연구원	경북대학교	응용생물학전공	6
b. 담당자	한승주	학사과정	경북대학교	응용생물학전공	6
4. 정책건의사항	○ 복숭아에서 검출된 검역병원체 <i>Little cherry virus 1</i> 과 <i>Little cherry virus 2</i> 의 발생보고 및 검역 관리급 병해충 제외를 건의함.				
5. 정책건의 내용요약	○ 2017년부터 2020년까지 농림수산식품기술기획평가원 '사과, 복숭아, 갈매, 배, 포도의 유묘 바이러스 진단 기술개발' 과제 수행 결과, LChV1과 LChV2가 복숭아 무산지에서 널리 발생하는 것으로 확인됨. ○ <i>Little cherry virus 1</i> (LChV1)은 <i>Closteroviridae</i> 과, <i>Velarivirus</i> 속에 속하는 (+)ssRNA 바이러스로 2011년 영덕에서 채집한 복숭아에서 첫 발생보고가 있음(Lim et al. 2016) ○ <i>Little cherry virus 2</i> (LChV2)는 <i>Closteroviridae</i> 과, <i>Ampelovirus</i> 속에 속하는 (+)ssRNA 바이러스로 2012년 서울, 진해, 제주지역에서 채집한 밤나무에서 첫 발생보고가 있음(Cheong et al. 2016). ○ 전국 7개도 37지역에서 채집한 복숭아, 양앵두, 데실에서 LChV1이 검출되었으며, 많은 지역에서 현재까지 지속적으로 발생하는 것으로 확인됨(Chung et al. 2018). ○ 제주에서 채집한 양앵두에서 LChV1, LChV2가 검출된 것으로 확인됨(Cho et al. 2018). ○ 서울, 진해, 제주지역 밤나무에서 LChV1(검출율 12%), LChV2(검출율 47%)가 검출된 것으로 확인됨(Cheong et al. 2016). ○ 이를 토대로 위 바이러스는 국내에 전국적으로 분포하는 바이러스로 판단되며, LChV1과 LChV2에 대하여 검역 관리급 병해충 제외를 건의함.				
6. 책임유머	복숭아, 바이러스, 검역병해충, <i>Little cherry virus 1</i> , <i>Little cherry virus 2</i>				
정책건의 주담당자	이수현 				
	2021년 01월 11일 본 연구과제 성과를 국가 정책 반영 사항으로 건의합니다. 농림축산검역본부 귀하				

○ 배 바이러스 발생실태 분석 및 신속 현장 진단 기술 개발

1. 배 바이러스 발생 모니터링 및 분리 동정

가. 2017년 배 묘목 바이러스 발생 모니터링

(1) 재료 및 방법

전국의 배 묘목 판매처 중 옥천, 대구, 성남 3곳의 판매처에서 가장 많이 판매되는 1~2품종을 선별하고, 품종 당 5~10그루 총 40그루의 묘목을 구매하였다. 묘목의 접수와 대목 부분에서 꺾질을 채취하여 바이러스 검정에 사용하였다. 배 묘목 바이러스 발생 모니터링은 표 1.과 같은 바이러스를 대상으로 실행하였다. 대상 바이러스 검출에 사용된 primer는 표 2.와 같다. 배 묘목 꺾질을 액체질소와 막자사발을 사용하여 곱게 간 후 RNA Extraction Mini kit (iNtRON)로 total RNA를 추출하여 SuPrimeScript RT-PCR Premix (GeNet Bio)로 다중 유전자 진단(multiplex RT-PCR)방법으로 수행하였다.

과 종	바 이 러 스 명
배 묘목	ACLSV (Apple chlorotic leafspot virus), ASGV (Apple stem grooving virus), ASPV (Apple stem pitting virus)

<표 1. 배 진단대상 바이러스 종류>

바이러스		염기서열(5'-3')	산물크기
ACLSV	F	GCAGACCCCTTCATGGAAGA	509
	R	CGCAAAGATCAGTCGTAACAGA	
ASPV	F	AAGCATGTCTGGAACCTCATG	367
	R	GATCAACTTTACTAAAAAGCATAAGT	
ASGV	F	GCCACTTCTAGGCAGAACTCTTTGAA	273
	R	AACCCCTTTTTGTCCTTCAGTACGAA	
ASSVd	F	ACGAAGGCCGGTGAGAAAG	202
	R	CCGCTGCGTCAAAGAAAAAG	
ApMV	F	CTCCAAACACAACCTTTTGATGACTT	123
	R	GTAACCTCACTCGTTATCACGTACAA	

<표 2. 배 바이러스 유전자 복합진단용 프라이머 염기서열>

Multiplex RT-PCR 조성		RT-PCR 조건		
Premix	10 ul	1.	50℃	30min
Forward, Reverse	1.5 x 5 ul	2.	95℃	10min

primer(20pmol)		3.	95℃	30sec	38 cycle
Template(Total RNA)	2.5 ul	4.	58℃	30sec	
Total	20 ul	5.	72℃	1min	
		6.	72℃	5min	

<표 3. 배 바이러스 검출을 위한 RT-PCR 조성 및 조건>

(2) 내용 및 결과

전국의 배 묘목 판매처 중 옥천, 대구, 성남 판매처에서 배 묘목을 구매하여, 배 바이러스 3종 (ACLSV, ASGV, ASPV)을 대상으로 바이러스 검정을 수행한 결과, 전체시료 40점 중 40점에서 ACLSV, ASPV, ASGV 3종 바이러스가 100%의 감염률을 보였다. 바이러스 종류별 발생률은 ASGV 82.5%, ASPV 37.5%, ACLSV 10.0%였고 ASGV가 3종 바이러스 중 가장 높은 검출 빈도를 보였다. 복합감염은 55.0%로 ASPV와 ASGV 2종 바이러스가 복합된 형태, ASGV와 ACLSV 2종 바이러스가 복합된 형태와 ASGV, ASPV, ACLSV 3종 바이러스가 복합된 형태로 발생하였다.

구분	계	배 묘목					
		3지역	옥 천		대 구		성 남
			품종	신 고	화 산	신 고	추 황
시료 수	40	10	5	5	10	10	

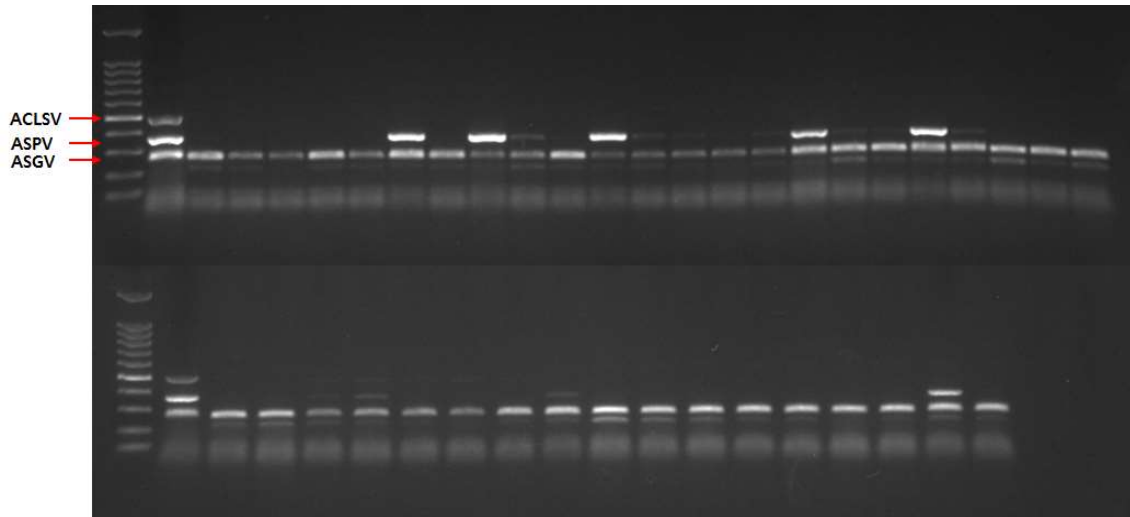
<표 4. 배 묘목 바이러스 검정을 위한 조사시료>

조사지역	RT-PCR 양성반응주 수(감염률,%)					진단주수
	ACLSV	ASGV	ASPV	복합감염	감염주수	
옥 천	4	13	4	6	15	15
대 구	0	10	6	6	14	15
성 남	0	10	5	10	10	10
계	4 (10.0%)	33 (82.5%)	15 (37.5%)	22 (55.0%)	39 (97.5%)	40

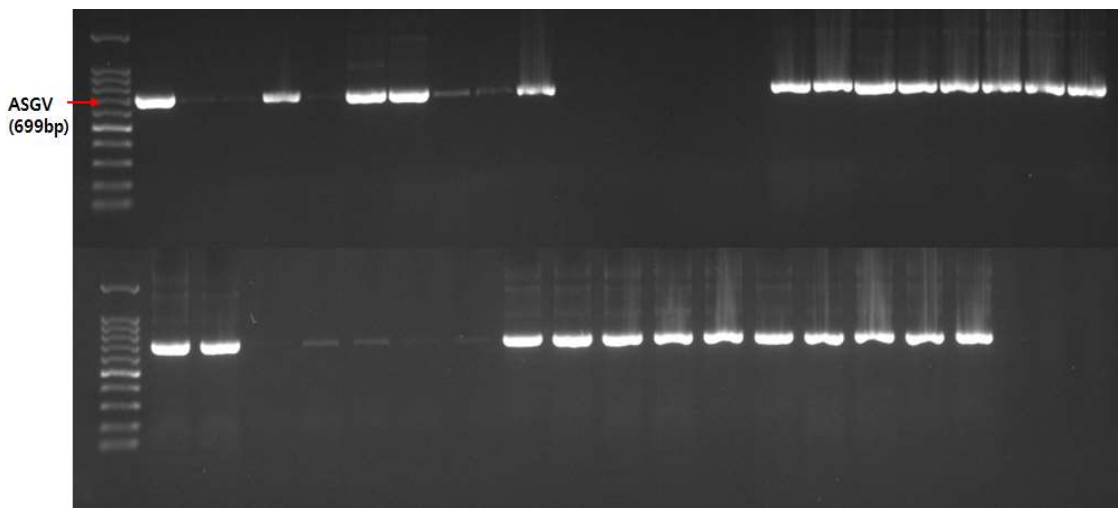
<표 5. 배 묘목 바이러스 감염률>

품종	RT-PCR 양성반응주 수(감염률,%)					진단주수
	ACLSV	ASGV	ASPV	복합감염	감염주수	
신 고	0	25	7	7	25	25
추 황	0	10	6	6	10	10
화 산	4	5	2	4	5	5
계	4 (10.0%)	40 (100%)	15 (37.5%)	17 (42.5%)	40 (100%)	40

<표 6. 배 묘목 품종별 바이러스 감염률>



<그림 1. 배 묘목 바이러스 RT-PCR 다중 진단>



<그림 2. 배 묘목 ASGV RT-PCR 진단>

#### 나. 2017년 주산지별 배 바이러스 발생 모니터링

##### (1) 재료 및 방법

배 주산지역인 전남 나주, 충남 천안, 경북 상주, 울산광역시, 경기도 남양주 5지역 47농가에 서 재배 농가별로 진단할 나무를 무작위로 선발하고, 나무 1그루당 1-3점의 잎을 채집하여 바이러스 검정에 사용하였다. 총 859점('16-'17)을 채집하였고, 그 중 158점의 시료를 무작위 로 선발해 바이러스 검정을 수행하였다. 배 바이러스 발생 모니터링은 표 7.과 같은 바이러스 를 대상으로 실행하였다. 배 잎을 액체질소와 막자사발을 사용하여 곱게 간 후 RNA Extraction Mini kit (iNtRON)로 total RNA를 추출하여 SuPrimeScript RT-PCR Premix (GeNet Bio)로 다중 유전자 진단(multiplex RT-PCR)방법으로 수행하였다.

바이러스		염기서열(5'-3')	산물크기
ACLSV	F	GCAGACCCCTTCATGGAAGA	509
	R	CGCAAAGATCAGTCGTAACAGA	
ASPV	F	AAGCATGTCTGGAACCTCATG	367
	R	GATCAACTTTACTAAAAAGCATAAGT	
ASGV	F	GCCACTTCTAGGCAGAACTCTTTGAA	273
	R	AACCCCTTTTTGTCCTTCAGTACGAA	
ASSVd	F	ACGAAGGCCGGTGAGAAAG	202
	R	CCGCTGCGTCAAAGAAAAAG	
ApMV	F	CTCCAAACACAACCTTTTGATGACTT	123
	R	GTAACCTCACTCGTTATCACGTACAA	

<표 7. 배 바이러스 유전자 복합진단용 프라이머 염기서열>

## (2) 내용 및 결과

배 주산지역인 상주, 남양주, 울산, 천안, 나주 5지역에서 재배 농가별로 배나무를 무작위로 선 발하고 잎을 채집하여, 배 바이러스 3종(ACLSV, ASGV, ASPV)을 대상으로 바이러스 검정을 수행한 결과, 전체시료 158점 중 151점에서 ACLSV, ASPV, ASGV 3종 바이러스가 95.6%의 감염률을 보였다. 바이러스 종류별 발생률은 ASGV 95.6%, ASPV 34.2%, ACLSV 19.0%였고 ASGV가 3종 바이러스 중 가장 높은 검출 빈도를 보였다. 복합감염은 34.2%로 ASPV와 ASGV 2종 바이러스가 복합된 형태로 발생하였다. 지역별 바이러스 감염률은 상주 92.5%, 남양주 100%, 울산 93.3%, 천안 94.1%, 나주 100%를 보였다. ASGV에 감염된 배 잎에서는 부정형의 검은 반점 증상을 보였다. 대부분의 농가에서 ASGV에 감염되어 검은 반점 증상을 보이는 나무들이 많았는데 그림 3.과 같은 관리가 양호한 농가에서는 검은 반점 증상이 드물게 관찰되었다.

구분	계	배				
		상 주	남양주	울 산	천 안	나 주
지역	5지역					
	농가수	8	7	10	9	7
시료 수	158	40	44	45	17	12

<표 8. 배 바이러스 검정을 위한 조사시료>

조사지역	RT-PCR 양성반응주 수(감염률,%)					진단주수
	ACLSV	ASGV	ASPV	복합감염	감염주수	
상 주	7	37	6	6	37 (92.5)	40
남양주	23	44	23	23	44	44

					(100)	
울 산	1	42	17	17	42 (93.3)	45
천 안	0	16	6	6	16 (94.1)	17
나 주	0	12	2	2	12 (100)	12
계	30 (19.0)	151 (95.6)	54 (34.2)	54 (34.2)	151 (95.6)	158

<표 11. 조사지역별 배 바이러스 감염률>



<그림 3. ASGV에 의한 배 검은 반점 증상>

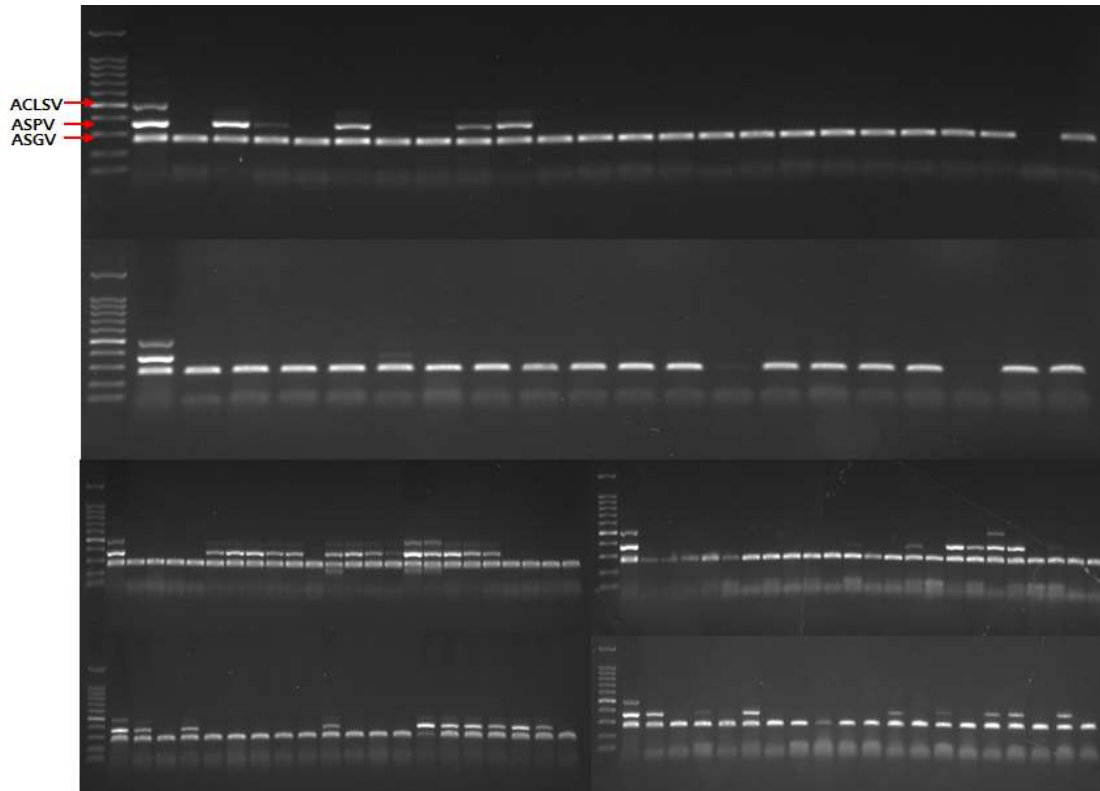




<그림 4. 남양주 지역의 관리가 양호한 농가>

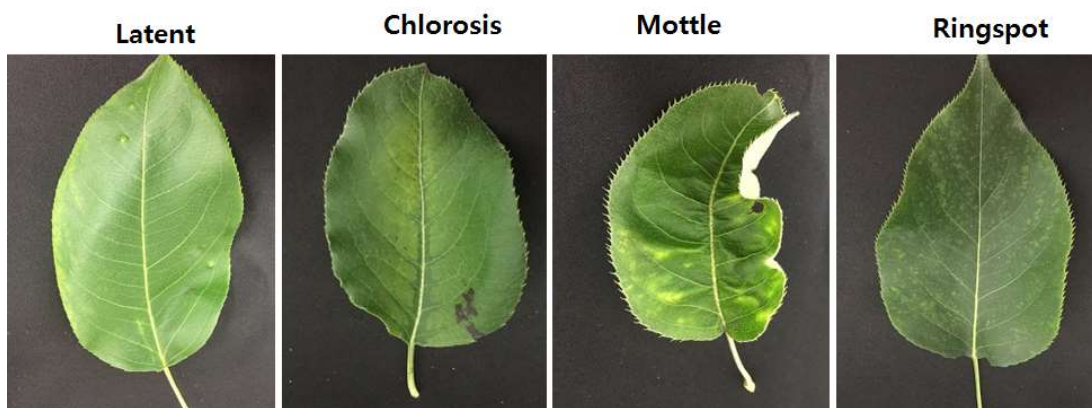


<그림 5. 배 바이러스의 다양한 병징>

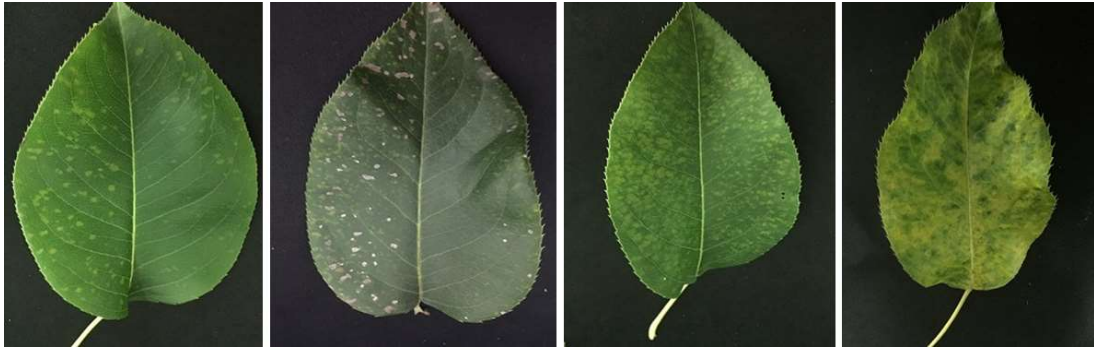


<그림 6. 배 바이러스 RT-PCR 다중 진단>

RT-PCR 결과를 바탕으로 배 바이러스에 의해 잎에서 나타나는 병징을 역 추적한 결과 ASGV의 단독감염 된 잎에서는 Latent, Chlorosis, Mottle, Ringspot 등의 병징이 나타났고, ASGV, ASPV에 복합감염 된 잎, ASGV, ASPV, ACLSV에 복합감염 된 잎에서는 다양한 병징이 나타났다.



<그림 7. ASGV 단독감염 병징>



<그림 8. ASGV, ASPV 복합감염 병징>



<그림 9. ASGV, ASPV ACLSV 복합감염 병징>

#### 다. 2017년 배 과실 바이러스 발생 모니터링

##### (1) 재료 및 방법

배 주산지역인 전남 나주, 충남 천안, 경북 상주, 울산광역시, 경기도 남양주 5지역 10농가에서 배 과실을 채집하여 바이러스 검정에 사용하였다. 총 35점('16-'17)을 채집하여, 바이러스 검정을 수행하였다. 또한 시중에서 판매 중인 과실도 구매하여 바이러스 검정에 사용하였다. 배 과실 바이러스 발생 모니터링은 표 12.과 같은 바이러스를 대상으로 실행하였다. 배 과실 껍질을 액체질소와 막자사발을 사용하여 곱게 간 후 RNA Extraction Mini kit (iNtRON)로 total RNA를 추출하여 SuPrimeScript RT-PCR Premix (GeNet Bio)로 다중 유전자 진단 (multiplex RT-PCR)방법으로 수행하였다.

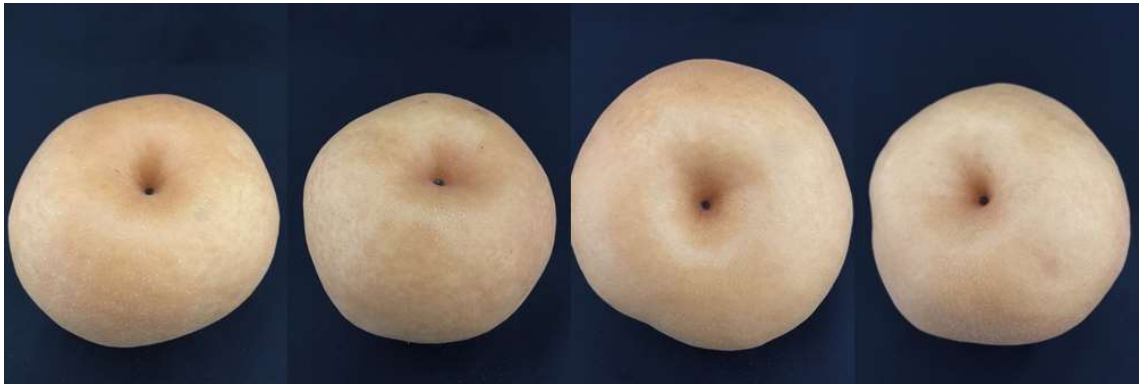
##### (2) 내용 및 결과

배 주산지역인 상주, 남양주, 울산, 천안, 나주 5지역 10농가에서 배 과실을 채집하여, 배 바이러스 3종(ACLSV, ASGV, ASPV)을 대상으로 바이러스 검정을 수행한 결과, 전체시료 35점 중 35점에서 ACLSV, ASPV, ASGV 3종 바이러스가 100%의 감염률을 보였다. 바이러스 종류별 발생률은 ASGV 100%, ASPV 31.4%, ACLSV 0%였고 ASGV가 3종 바이러스 중 가장 높

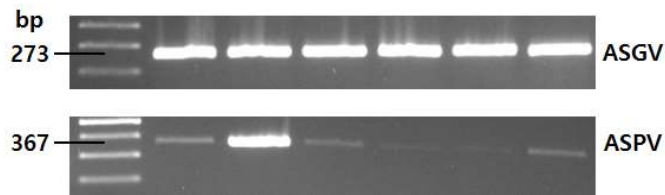
은 검출 빈도를 보였다. 복합감염은 31.4%로 ASPV와 ASGV 2종 바이러스가 복합된 형태로 발생하였다. 시중에 판매 중인 과실에서도 특별한 병징이 관찰되지 않았지만 ASGV가 모두 검출되었다.

조사지역	RT-PCR 양성반응주 수(감염률,%)					진단주수
	ACLSV	ASGV	ASPV	복합감염	감염주수	
5지역	0 (0%)	35 (100%)	11 (31.4%)	11 (31.4%)	35 (100%)	35

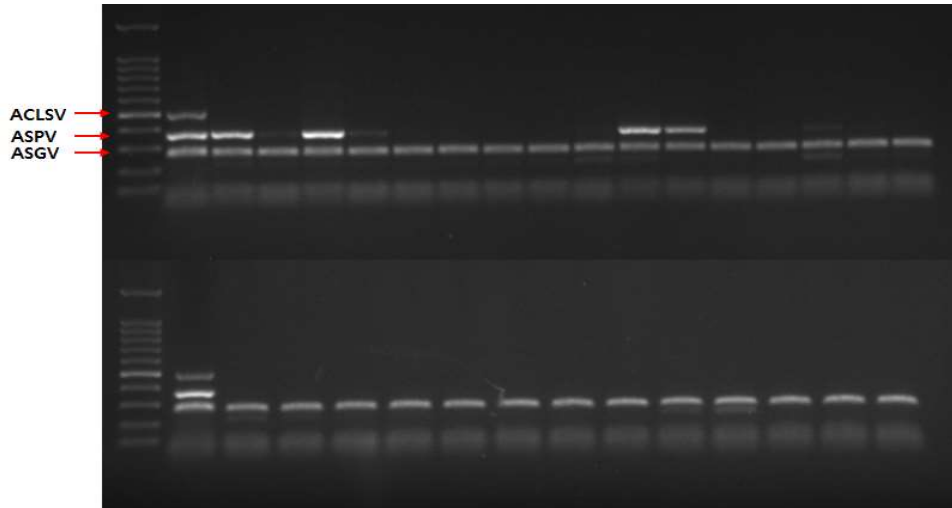
<표 12. 배 과실 바이러스 감염률>



<그림 10. 배 과실 ASGV, ASPV 복합감염 병징>



<그림 11. 배 과실 병징 사진 및 RT-PCR 결과>



<그림 12. 배 과실 바이러스 RT-PCR 다중 진단>



<그림 13. ASGV, ASPV 복합감염 배 과실>



<그림 14. ASGV 감염 배 과실>

라. 2018년 주산지별 배 바이러스 발생 모니터링

○ 2018년 5월부터 8월까지 배 주산지인 경북 상주, 충남 천안, 전남 나주, 울산광역시, 경기도 남양주 5지역 35농가에서 재배 농가별로 진단할 나무를 무작위로 선발하고 잎을 채집함. 지역별로 각각 35-45점의 잎을 채집하여 총 205점의 배 시료를 확보하였음. 대부분의 농가가 신고 품종을 재배하고 있었으며, 몇 농가는 적은 수의 원황, 황금 품종을 재배하고 있었음.

채집지역	주소 (농가)	채집일자	품종명	배 채집시료 수
				있
상주	상주시 사벌면 (A농가)	18.05.17	신고	4
	상주시 사벌면 (B농가)	18.05.17	신고	4
	상주시 사벌면 (C농가)	18.05.17	신고	5
	상주시 사벌면 (D농가)	18.05.17	신고	3
	상주시 공검면 (E농가)	18.05.17	신고	4
	상주시 공검면 (F농가)	18.05.17	신고	3
	상주시 공검면 (G농가)	18.05.17	신고	3
	상주시 공검면 (H농가)	18.06.23	신고	7
	상주시 공검면 (I농가)	18.06.23	신고	5
				38
천안	천안시 성환읍 (A농가)	18.05.24	신고	5
	천안시 성환읍 (B농가)	18.05.24	신고	6
	천안시 성환읍 (C농가)	18.05.24	신고	5
	천안시 성환읍 (D농가)	18.05.24	신고	4
	천안시 성환읍 (E농가)	18.05.24	신고	6
	천안시 성환읍 (F농가)	18.08.08	신고	5
	천안시 성환읍 (G농가)	18.08.08	신고	7
	천안시 성환읍 (H농가)	18.08.08	신고	7
				45
나주	나주시 금천면 (A농가)	18.06.07	신고	5
	나주시 대기동 (B농가)	18.06.07	신고	4
	나주시 노안면 (C농가)	18.06.07	신고	5
	나주시 삼포면 (D농가)	18.06.07	신고	5
	나주시 봉황면 (E농가)	18.08.02	신고 원항	8 9
	나주시 왕곡면 (F농가)	18.08.02	신고	7
				43
울산	울주군 삼남면 (A농가)	18.07.11	신고	5
	울주군 삼남면 (B농가)	18.07.11	신고	4
	울주군 청량면 (C농가)	18.07.11	신고	7
	울주군 삼남면 (D농가)	18.07.11	신고	6
	울주군 청량면 (E농가)	18.07.11	신고 황금	7 8
	울주군 삼남면 (F농가)	18.07.11	신고	4
	울주군 삼남면 (G농가)	18.07.11	신고	2
				41
남양주	남양주시 와부읍 (A농가)	18.08.08	신고	5
	남양주시 진건읍 (B농가)	18.08.08	신고	8
	남양주시 진건읍 (C농가)	18.08.08	신고	9
	남양주시 진건읍 (D농가)	18.08.09	신고	8
	남양주시 진건읍 (E농가)	18.08.09	신고	8
				38
계				205

<표 13. 배 바이러스 감염실태 조사를 위한 채집 결과>

○ 상주, 천안, 나주, 울산, 남양주에서 채집한 배 205점에 대하여 RT-PCR 진단을 실시한 결과, ACLSV 20점, ASPV 61점, ASGV 195점, ASSVd 9점이 검출되었음. 결과적으로 205점 중 197점에서 바이러스가 검출되었으며(96.0%), ASGV, ASPV, ACLSV, ASSVd 순으로 감염율의 차이를 보임. 현재 대부분 농가에서 신고를 재배하며, 몇 농가에서는 작은 수의 원황, 황금을 재배함. 신고 품종에 비해 원황은 바이러스 감염율이 낮았으며, 황금은 모든 시료에서 바이러스가 검출되었으나, ASGV만 검출되었음.

채집지역	품종명	채집시료	시료 수	바이러스 검출 시료 수	RT-PCR 진단결과			
					ACLSV	ASPV	ASGV	ASSVd
상주	신고	있	38	35	0	5	35	3
천안	신고	있	45	45	5	12	44	2
나주	신고	있	34	32	4	12	32	3
	원황	있	9	6	3	2	5	0
울산	신고	있	33	33	6	22	33	0
	황금	있	8	8	0	0	8	0
남양주	신고	있	38	38	2	8	38	1
계			205	197	20	61	195	9
감염율 (%)				96.0	9.7	29.7	95.1	4.3

<표 14. 배 채집지역 및 바이러스 및 바이로이드 진단결과>

○ 대부분의 시료에서 바이러스가 검출되었음(96.0%). 바이러스 감염율은 ASGV가 가장 높았으며(95.1%), ASPV(29.7%), ACLSV(9.7%), ASSVd(4.3%)순으로 나타났음.

	상주	천안	나주		울산		남양주	계
	신고	신고	신고	원황	신고	황금	신고	
단독감염								
ASGV	27	28	17	1	8	8	27	116
ASPV		1		1				2
복합감염								
ACLSV+ASGV		5	1	3	3		2	14
ASPV+ASGV	5	9	9	1	19		8	51
ASGV+ASSVd	3		1				1	5
ASPV+ASGV+ASSVd		2	1					3
ACLSV+ASPV+ASGV			2		3			5
ACLSV+ASGV+ASSVd			1					1

<표 15. 배 채집시료별 바이러스 및 바이로이드 감염양상>

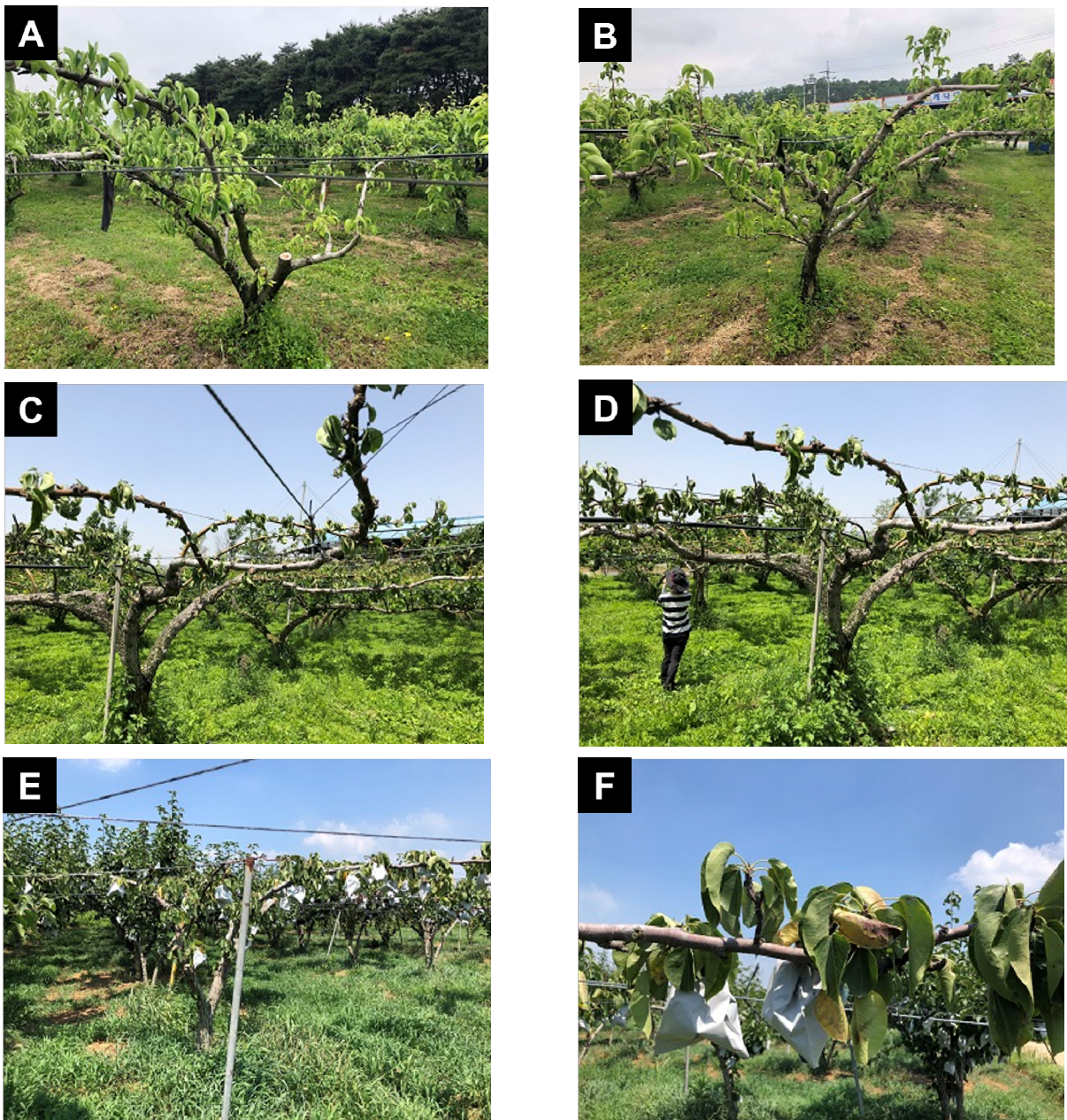
○ ASGV의 감염율이 가장 높았음. ASGV의 단독감염이 가장 많았으며, 복합감염은 ASPV와 ASGV의 감염 양상이 많이 검출되었음.

○ 배나무의 생육상태에 따라 바이러스 감염양상을 분석하기 위하여 신고 품종에서 수세가 약하고 생육이 불량한 나무의 잎을 채집하여 RT-PCR로 진단한 결과, 수세가 약하고 생육이 불량한 나무의 경우 ASGV가 공통적으로 검출된다는 것을 확인함.

시료 (생육불량, 수세 약함)	ACLSV	ASPV	ASGV	ASSVd
상주 D농가	-	-	+	-
천안 E농가	-	+	+	+
천안 H농가	-	+	+	-

<표 16. 생육상태가 불량하고 수세가 약한 배나무 바이러스 감염양상 RT-PCR 분석>

○ 생육이 불량하고 수세가 약한 나무에서 모두 ASGV가 검출되었으며, ACLSV는 검출되지 않았음. 그러나 표 6의 생육이 양호한 많은 시료에서도 바이러스 검출되었음. 이러한 결과로 볼 때 배나무의 생육상태와 수세에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단됨.



<그림 15. 배나무 생육상태 및 수세에 따른 바이러스 감염양상을 분석하기 위한 신고 시료.

A,B: 상주 D농가, C,D: 천안 E농가, E,F: 천안 H농가>



마. 2018년 배 과실 주요 바이러스 발생 모니터링

○ 2018년 7월부터 10월까지 배 주산지인 경북상주와 경남울산 2지역 7농가에서 재배 농가별로 진단할 나무를 무작위로 선발하고 과실을 채집함. 지역별로 각각 10-30개의 과실을 채집하여 총 50점의 배 시료를 확보하였음. 많이 판매되고 있는 신고와 황금 품종을 확보하여 바이러스를 진단함.

채집지역	주소 (농가)	채집일자	품종명	배 채집시료 수 과실
상주	상주시 사벌면 (A농가)	18.09.19	신고	5
	상주시 사벌면 (G농가)	18.09.19	신고	9
	상주시 사벌면 (I농가)	18.09.19	신고	6
				20
울산	울산시 청량면 (E농가)	18.07.11	신고	10
	울산시 삼남면 (A농가)	18.10.01	황금	4
	울산시 삼남면 (B농가)	18.10.01	신고	6
	울산시 청량면 (C농가)	18.10.01	신고	4
	울산시 청량면 (E농가)	18.10.01	황금	6
				30
계				50

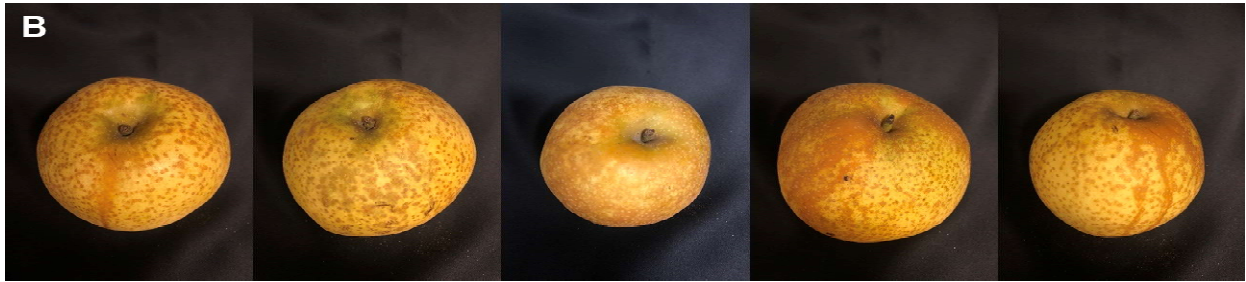
<표 17. 배 과실 바이러스 감염실태 조사를 위한 분석시료 채집>

채집지역	품종명	채집시료	시료 수	바이러스 검출 시료 수	RT-PCR 진단결과			
					ACLSV	ASPV	ASGV	ASSVd
상주	신고	과실	20	20	0	2	20	1
울산	신고	과실	20	20	0	5	20	7
	황금	과실	10	10	0	4	10	0
계			50	50	0	11	50	8
감염율 (%)				100	0	22.0	100	16.0

<표 18. 배 과실 지역 및 바이러스 및 바이로이드 진단>

○ 바이러스의 감염율은 ASGV가 가장 높았으며(100%), ASPV(22%), ASSVd(16%) 순으로 나타났다. 묘목, 잎과는 다르게 ACLSV는 과실에서 발견되지 않았음.



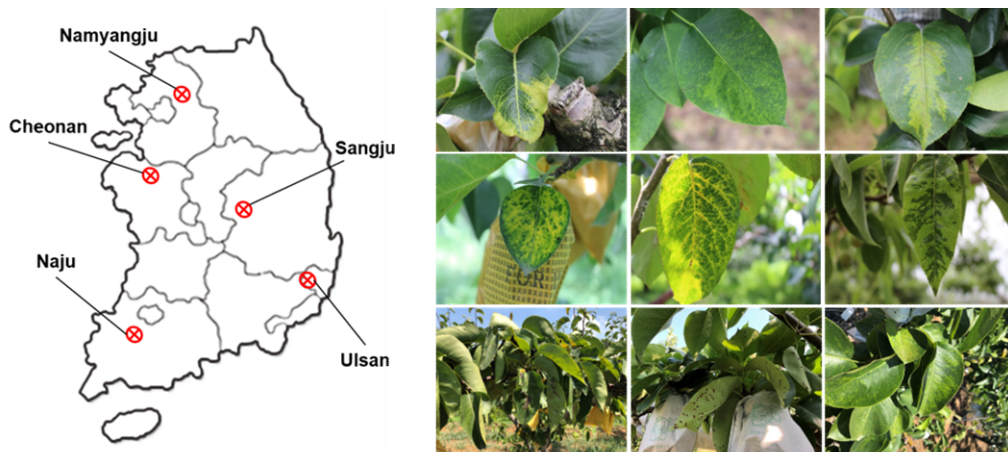


<그림 16. 품종별 바이러스 감염 과실. A: 신고, B: 황금>

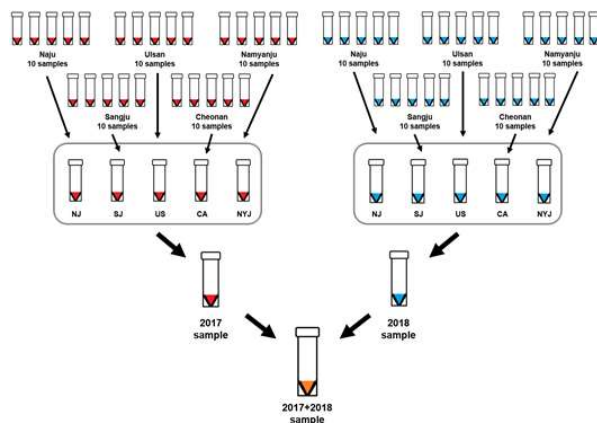
## 2. 바이롬 분석을 통한 배 바이러스 종 분석

가. 배 NGS 분석을 위한 시료 준비

○ 배 NGS 분석을 위하여 2017년 배 주산지 5지역에서 각 지역별로 10점의 채집한 잎, 2018년 배 주산지 5지역에서 각 지역별로 10점의 채집한 잎, 총 100점의 잎을 pooling 함 (그림 14). pooling한 시료로부터 핵산을 추출하여 NGS library 제작을 위해 total RNA의 quality를 측정하였으며, 측정된 RNA 샘플은 Illumina사의 Ribo-zero rRNA(plant용) remove kit를 사용하여 rRNA를 제거한 후 cDNA library를 제작함 (그림 17).

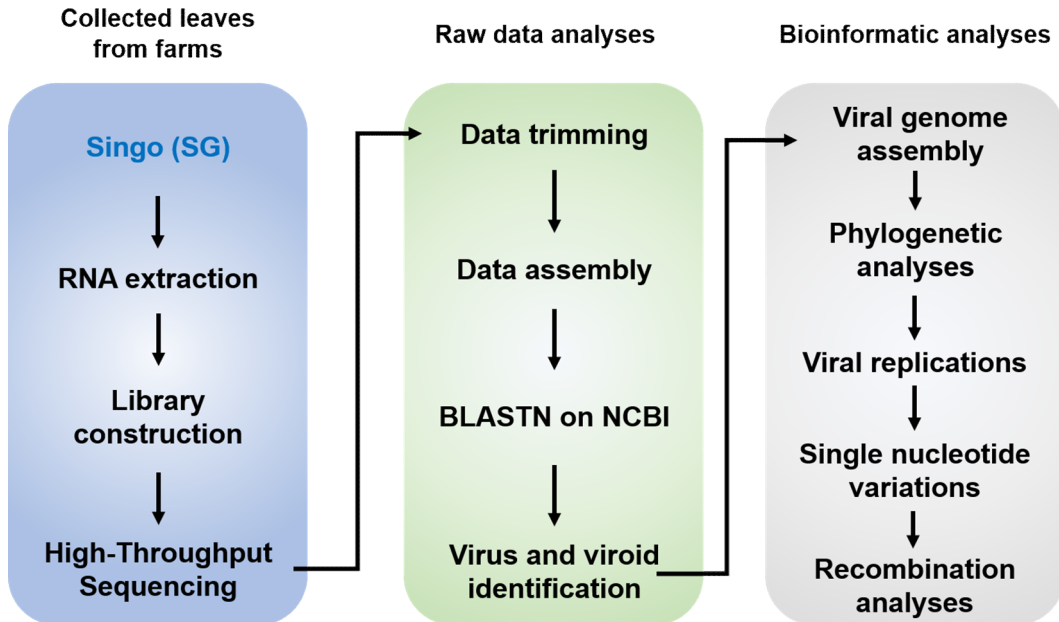


<그림 17. 배 바이롬 분석 시료 채집지역 및 배 잎 병징>

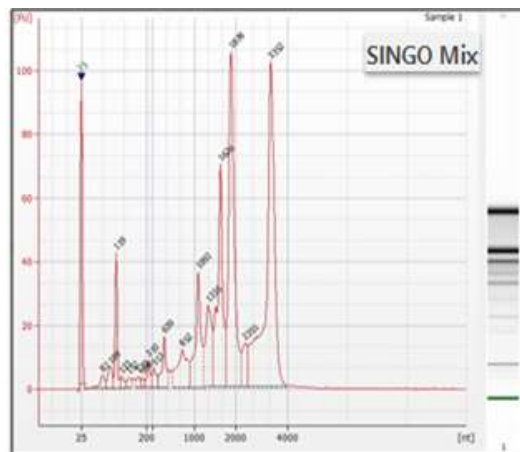


<그림 18. 배 바이롬 분석을 위한 샘플 pooling>

○ 배 바이러스 동정하기 위하여 차세대 염기서열 분석을 하였고, 생산 된 데이터를 분석하여 바이러스를 동정한 후 메타지노믹스 분석을 통하여 계통분석, 유전자 변이 분석 등을 진행하였 음 (그림 19). 첫 번째로 pooling한 시료로부터 핵산을 추출하여 NGS library 제작을 위해 total RNA의 quality를 측정하였음 (그림 20).



<그림 19. NGS 기반 배 바이러스 종 분석 개념도>

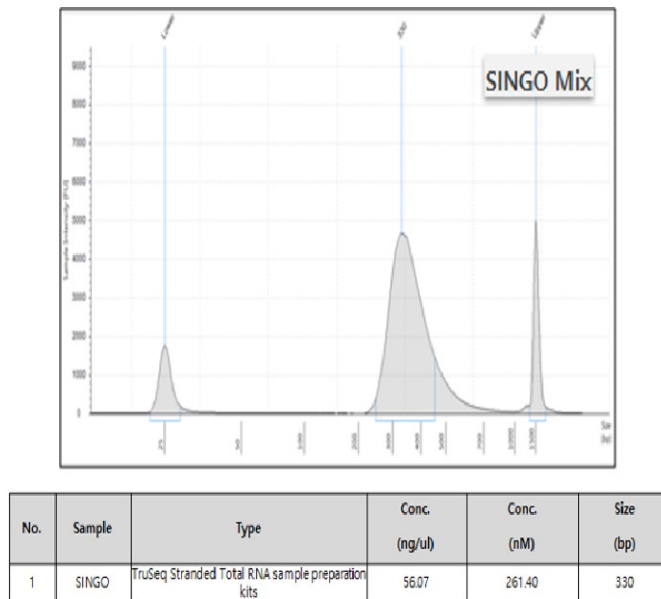


\*BioAnalyzer 2100 RNA nano 6000 chip 사용

Sample	Conc. (ng/ul)	Vol. (ul)	Total (ug)	RIN	rRNA ratio
SINGO	277.258	27	7.486	7.1 (Pass)	1.2

<그림 20. Agilent RNA Bioanalyzer nano 6000으로 RNA QC 확인>

○ 측정된 RNA 샘플은 Illumina사의 Ribo-zero rRNA(plant용) remove kit를 사용하여 rRNA를 제거한 후 cDNA library를 제작함. 분리한 total RNA로부터 oligo dT magnetic bead를 사용하여 mRNA만을 추출하여 cDNA를 합성 한 후 end repairing을 하고, A-tailing mix를 사용하여 3' 말단에 adenyl기를 붙여 준 후, RNA adapter를 ligation하고 AMPure XP beads를 사용하여 washing 하였음. RNA adapter를 ligation 한 후 PCR primer cocktail과 PCR master mix를 넣고 표와 같이 PCR 하였음. PCR이 끝나면 AMPure XP bead로 washing 하고, qPCR control template를 함께 qPCR을 진행하여 제작된 library의 농도를 정량하였음. Agilent D1000 ScreenTape system을 사용하여 library의 size와 purity를 확인함 (그림 21).



<그림 21. 배 RNA로부터 library 제작 원리>

○ qPCR 과정을 통해 적당한 농도로 희석한 library를 denaturation 과정을 거쳐 oligonucleotides가 깔려 있는 flow cell로 옮김. Denaturation 된 DNA fragments는 oligonucleotides와 결합하여 3' 으로 extension 되어 double strand를 형성하게 되고, 끝 말단은 다시 primer와 hybridize 되어 U-Shaped bridge template를 형성하게 됨. DNA bridge는 primer로부터 copy 되어 double strand DNA bridge를 형성하고 다시 denaturation 과정을 반복하면서 새로운 bridge template를 형성함. 이 과정을 35회 반복하여 2,000 molecules 이상의 cluster를 만든 후 Reverse strand specific primer를 cleavage 시켜 forward strand만 남게 한 후 sequencing primer를 hybridization 함. Clonal cluster가 형성된 flow cell은 illumina sequencing 장비로 옮겨져 sequencing 하였음.

○ 확보된 library는 clustering 과정을 거친 후, Illumina Hiseq 4000을 사용하여 paired-end RNA sequencing 방법으로 약 11Gb의 데이터를 생산하였음. 이후 확보된 데이터를 NGS sequence data 분석하였음.

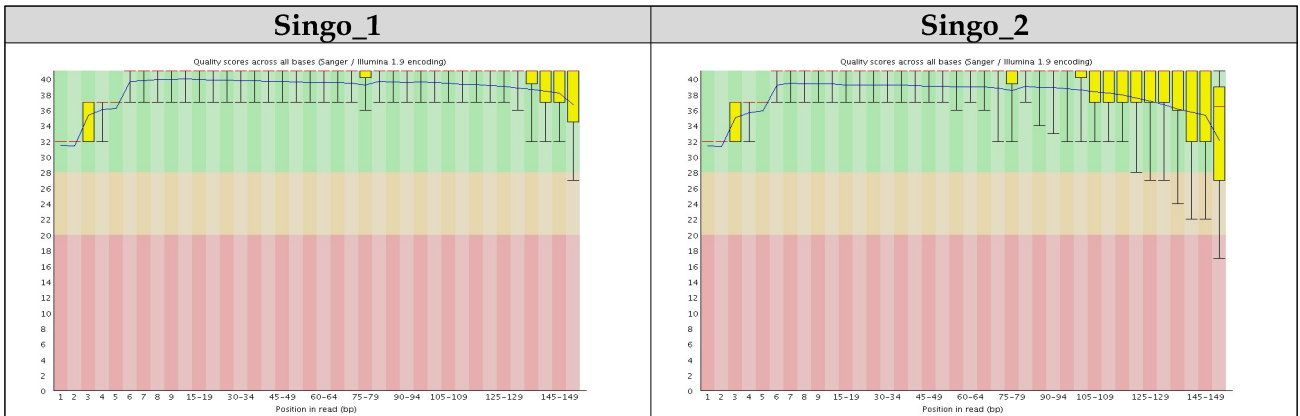
Sample ID	Total reads based(bp)	Total reads	GC (%)	AT (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
Pear	11,872,265,072	78,624,272	45.98	54.02	97.06	93.57

<표 19. 확보된 raw data 양>

○ 생산된 raw data를 Trim galore 프로그램을 이용하여 리드 말단의 low quality data ( $\leq$  Q20)와 adapter를 제거하였음 (표 20). 이후 FastQC 프로그램으로 Pre-processing data의 base quality score를 확인하였음 (표 21).

Sample name	Raw data		Pre-processing data	
	Sum reads	Sum Bases(bp)	Sum reads	Sum Bases(bp)
Singo	78,624,272	11,872,265,072	78,600,344	11,559,989,325

<표 20. Data 정보>



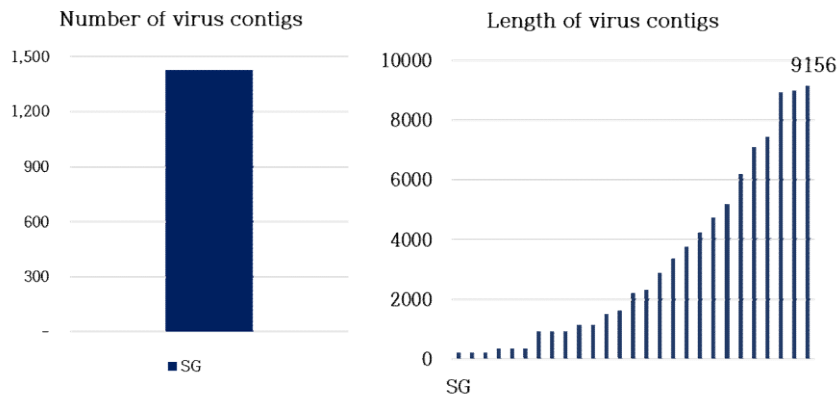
<표 21. Per base quality score 결과>

○ gsAssembler(v2.8) 프로그램을 이용하여 전사체를 조립하였음. 그 결과 163,137개의 contig를 확보하였다 (표 22). 이 중 200 bp 이상의 contig를 사용하여 메타지노믹스 분석을 진행하였음. 111,724개의 contig를 NCBI virus DB에 BLAST한 결과 약 1300개의 virus-associated contig가 발견되었음 (그림 8).

Contig length	신코				
	$\geq 100$ bp	$\geq 200$ bp	$\geq 500$ bp	$\geq 1000$ bp	$\geq 2000$ bp
Number of contigs	163,137	111,724	35,725	12,826	2,589
Number of bases	68,029,134	60,059,198	37,196,614	21,318,496	7,391,668
Avg contig size	417	537	1,041	1,662	2,855
N50 contig size	576	685	1,126	1,658	2,715
Largest contig size	21,154	21,154	21,154	21,154	21,154

<표 22. gsAssembler 프로그램을 이용해 raw data를 assembly한 결과>

나. 배 바이롬 분석 결과



<그림 22. Blast 결과 virus contig 수와 길이>

○ 총 4개의 바이러스가 동정되었으며, 기존에 보고 된 바이러스인 ASGV와 ASPV, 더불어 새로 발견 된 바이러스인 AGCaV와 CMV가 발견되었음 (표 23).

Identified viruses	Abbreviations	No. of contigs	Minimum contig length (bp)	Maximum contig length (bp)
Apple green crinkle associated virus	AGCaV	6	236	2331
Apple stem grooving virus	ASGV	101	201	3237
Apple stem pitting virus	ASPV	384	200	9156
Cucumber mosaic virus	CMV	10	212	388

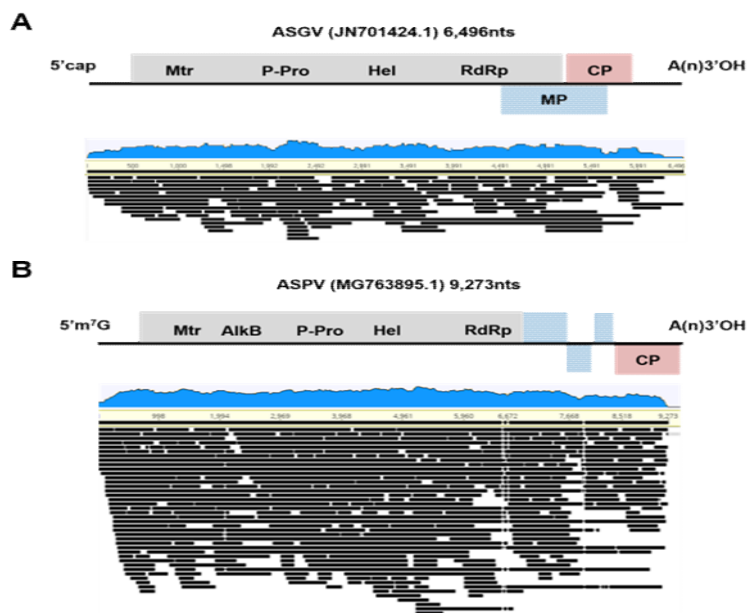
<표 23. 배 감염 바이러스 동정 결과>

Contig No.	Length	Subject No.	Name of virus	identity (%)	Matches (bp)	Evalue
contig01650	2331	NC_018714.1	AGCaV	83.6	2267	0
contig05157	1557	NC_018714.1	AGCaV	84.8	1554	0
contig06457	1415	NC_018714.1	AGCaV	85.0	1205	0
contig00525	3237	LC184611.1	ASGV	83.1	3234	0
contig00903	2772	LC184610.1	ASGV	92.4	2772	0
contig06155	1443	LC084659.1	ASGV	91.3	1443	0
contig08925	1211	JN701424.1	ASGV	91.8	1210	0
contig10228	1128	KX686100.1	ASGV	97.1	1128	0
contig19295	780	KX668488.1	ASGV	98.9	780	0
contig19797	767	LC143387.1	ASGV	94.9	767	0
contig24315	666	KX668488.1	ASGV	92.9	666	0
contig26938	620	JQ308181.1	ASGV	92.5	620	0
contig35348	504	LT160740.1	ASGV	98.0	504	0
contig47959	394	KU198289.1	ASGV	84.7	393	1.79408E-80

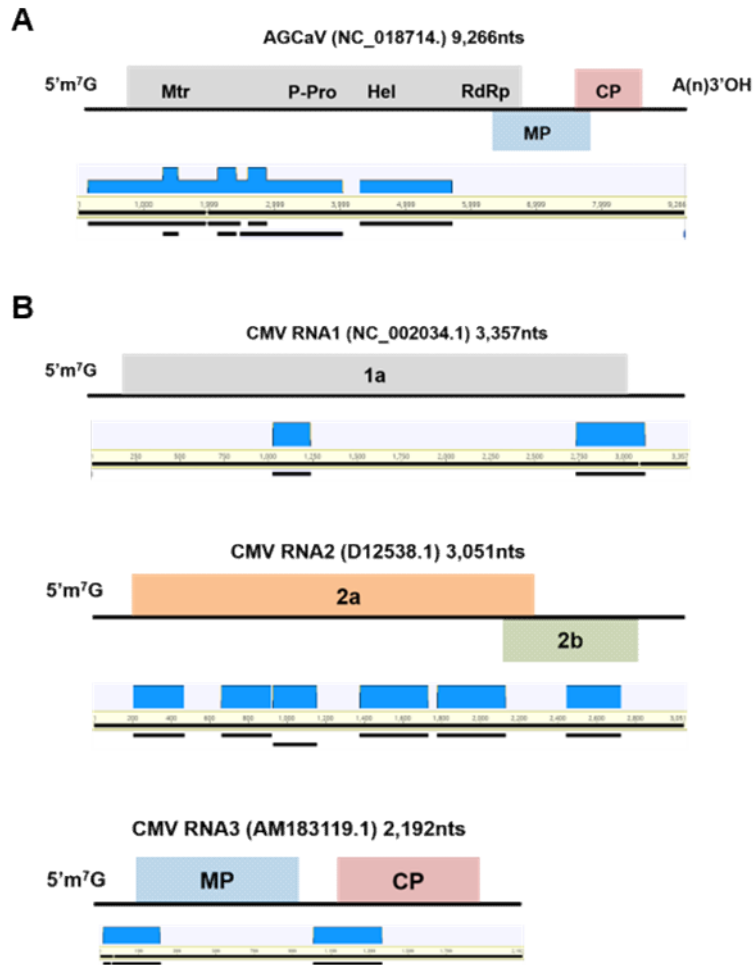
contig00018	8976	MG763895.1	ASPV	86.9	7646	0
contig00030	7439	KU308398.1	ASPV	82.8	4652	0
contig00035	7104	KF321967.1	ASPV	81.0	3827	0
contig00061	5954	KY798310.1	ASPV	88.5	5936	0
contig00470	3354	NC_003462.2	ASPV	88.7	3289	0
contig00905	2772	LC143387.1	ASPV	94.1	2768	0
contig01244	2548	KU308398.1	ASPV	95.0	2548	0
contig04361	1662	JF946772.1	ASPV	91.1	1646	0
contig11214	1076	NC_003462.2	ASPV	90.0	1045	0
contig13174	984	KU308398.1	ASPV	95.0	979	0
contig15820	883	KY798310.1	ASPV	97.0	883	0
contig21355	729	MG763895.1	ASPV	89.5	727	0
contig37727	478	MG763895.1	ASPV	89.5	478	5.6019E-155
contig48783	388	KP165580.1	CMV	99.7	388	0
contig54506	356	AM183119.1	CMV	100	355	0
contig54918	354	D12538.1	CMV	100	354	0
contig54927	354	D12538.1	CMV	99.4	354	0
contig68853	296	NC_001440.1	CMV	100	296	6.1222E-166

<표 24. 배(신교)에서 동정된 바이러스 contig의 BLAST 결과>

○ 이후 동정된 바이러스들의 contig들을 각 바이러스의 genome에 assemble을 진행하였음. 그 결과 기준에 보고된 바이러스인 ASGV와 ASPV의 경우 거의 모든 genome에 assemble 되었으며 (그림 23), 새로 발견된 AGCaV와 CMV의 경우 약 60%의 genome에 assemble 되었음 (그림 24).



<그림 23. ASGV와 ASPV 관련 contig의 genome assemble 결과>



<그림 24. AGCaV와 CMV 관련 contig의 genome assemble 결과>

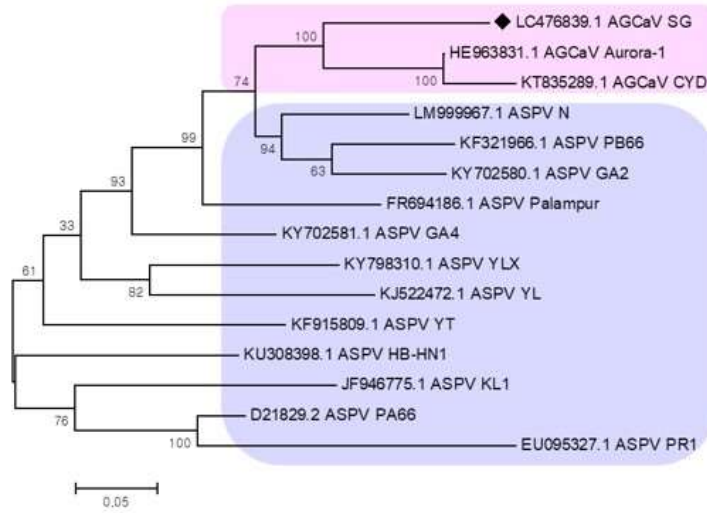
○ Assemble 된 data를 바탕으로 배에서 발견된 바이러스들의 complete 혹은 nearly complete sequence를 확보하여 NCBI GenBank에 deposit하였음 (표 8).

Name of virus	Abbreviations	Accession No.
Apple green crinkle associated virus	AGCaV isolate SG	LC476839
Apple stem grooving virus	ASGV isolate SG	LC475148
Apple stem pitting virus	ASPV isolate SG	LC475150

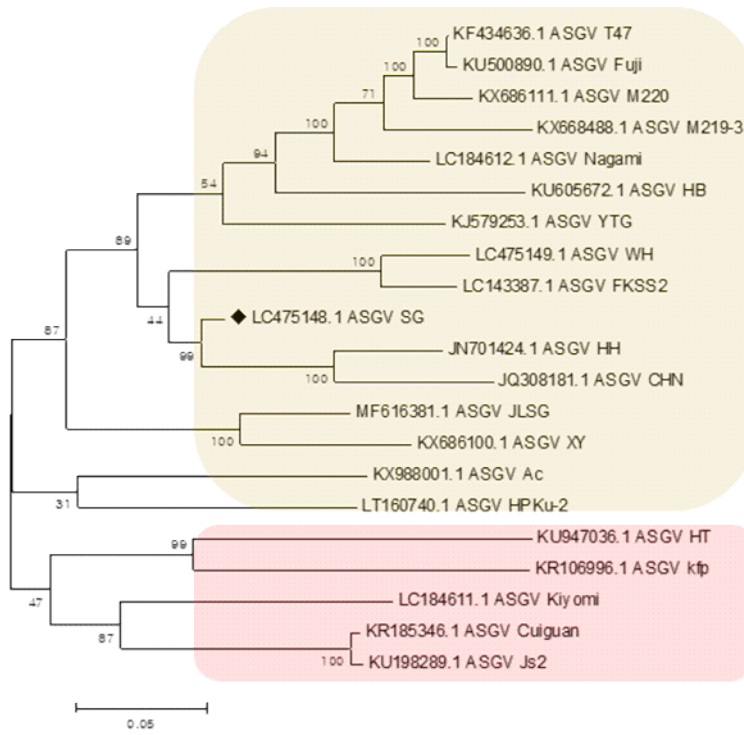
<표 25. 배에서 확보한 virus의 Accession Number>

○ 확보한 바이러스의 complete 혹은 nearly complete sequence를 활용하여 기존에 보고된 다른 나라의 여러 isolate들과 phylogenetic tree 분석을 하였음. 그 결과 우리나라 배에서 동정된 AGCaV의 경우 ASPV와 분리되어 AGCaV와 한 그룹에 속하는 것을 확인하였고 (그림 25), 우리나라 배에서 동정된 ASGV의 경우 중국의 복숭아와 사과에서 동정된 isolate들과 같은 그룹을 형성하는 것을 확인하였음 (그림 26). 또한 ASPV의 phylogenetic tree는 크게 두 그룹으로 나뉘었는데 우리나라 배에서 동정된 isolate의 경우 중국의 사과와 배에서 동정된 isolate들과 같은 그룹을 형성하는 것을 확인하였음 (그림 27).

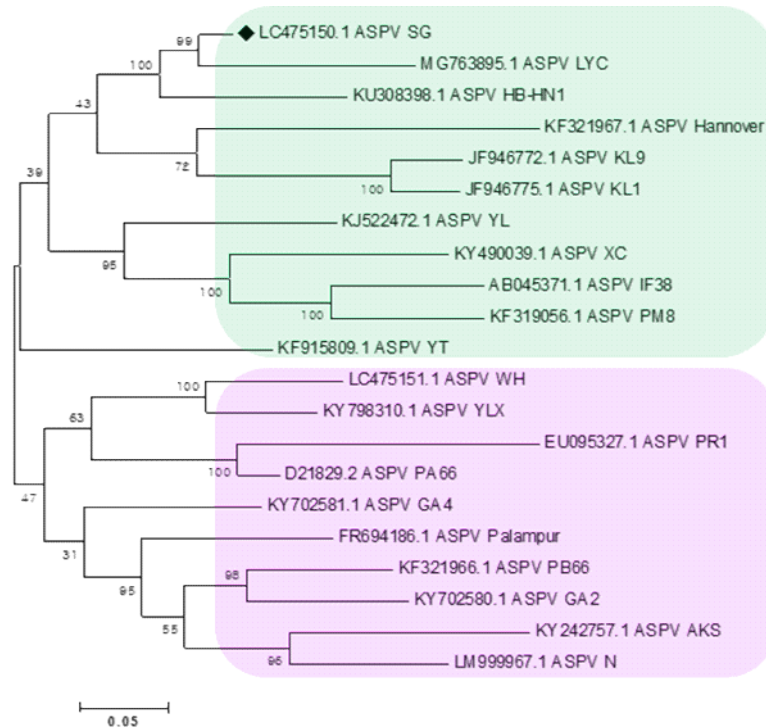




<그림 25. AGCaV Phylogenetic tree를 이용한 분자유전계통분석>

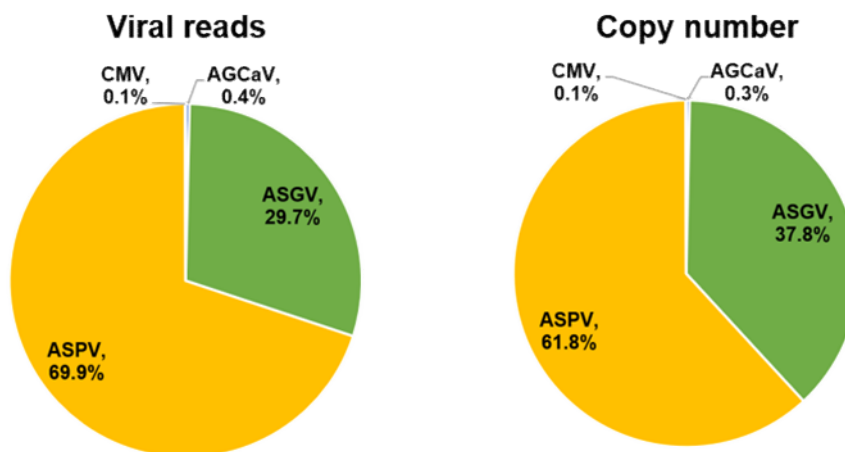


<그림 26. ASGV Phylogenetic tree를 이용한 분자유전계통분석>



<그림 27. ASPV Phylogenetic tree를 이용한 분자유전계통분석>

○ 배에서 동정된 바이러스들의 population을 보기위해 raw data를 활용하여 read 수와 copy number를 분석하였음 (그림 28). 분석 결과 52,945개의 ASGV read 수가 발견되었으며, 124,492개의 ASPV read수가 발견되었음. 발견된 read 수를 각 바이러스의 genome으로 나눈 결과 AGCaV (0.3%), ASGV (37.8%), ASPV (61.8%)와 CMV (0.1%)의 copy number가 존재하는 것을 확인하였으며, 배에는 여러 바이러스 중 ASGV와 ASPV가 우점종으로 존재한다는 것을 확인함.

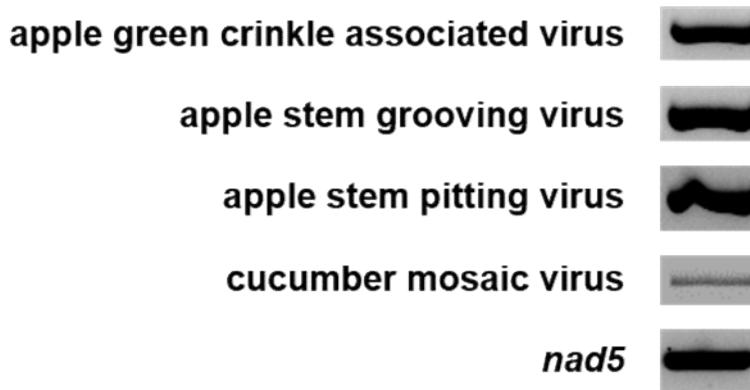


<그림 28. 배 바이러스 read 수 및 copy number>

○ 메타지노믹스 분석을 통해 동정한 바이러스들의 존재여부를 검정하기 위해 기존에 여러 논문에서 사용한 primer와 새로 제작한 primer를 사용하여 RT-PCR 반응을 진행함 (표 9). 그 결과 발견된 바이러스들 모두 증폭이 되는 것을 확인함 (그림 15).

Viruses	Target gene	Size	Primer	Sequences
AGCaV	RdRp	320	AGCaV-F	ACCACAGTTGGATGTAATG
AGCaV	RdRp	320	AGCaV-R	TTCCTCATTATCCTTG TG
ASGV	CP	714	ASGV-F	ATGAGTTTGG AAGACGTGCTTCAA
ASGV	CP	714	ASGV-R	CTAACCTCCAGTTCCAAGTACT
ASPV	CP	367	ASPV-F001	AAGCATGTCTGGAACCTCATG
ASPV	CP	367	ASPV-R001-2	GATCAACTTTACTAAAAAGCATAAGT
CMV	CP	321	CMV-F	TGGTCGTCCA ACTATTAACCAC
CMV	CP		CMV-R	TACTGATAAACCAGTACCGGTGA
<i>nad5</i>		181	<i>nad5</i> -F	GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT
<i>nad5</i>			<i>nad5</i> -R	CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA

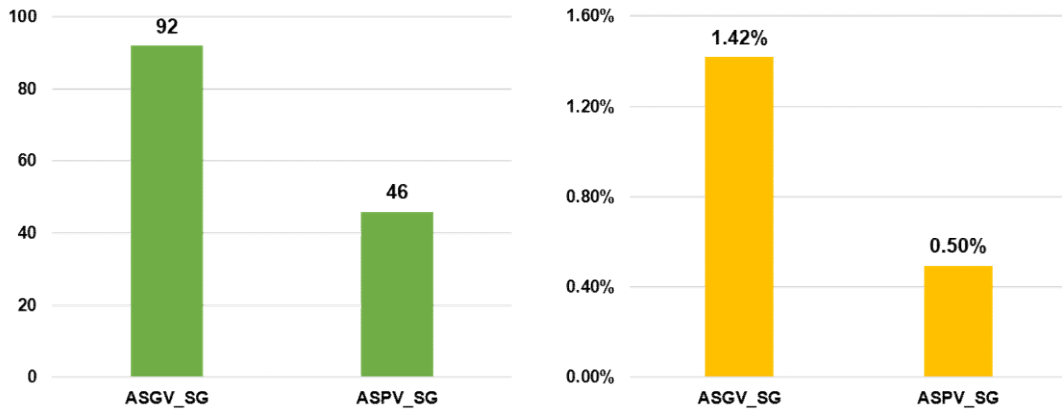
<표 26. RT-PCR 검정을 위해 사용한 primer 정보>



<그림 29. 바이러스 존재 유무 확인을 위한 RT-PCR 검정 결과>

#### 다. 메타지놈 분석을 이용한 배 바이러스 유전자 변이분석

○ 동정된 바이러스들의 유전자 변이 분석을 위해 raw data를 활용하여 single nucleotide variations (SNV) 분석을 진행함. 분석에는 complete 혹은 nearly complete sequence가 확보된 바이러스들을 사용하였음. 그 결과 AGCaV에서는 SNV가 발견되지 않았으며 ASGV와 ASPV에서 각각 92개와 46개의 SNV가 발견되었음 (그림 30). 이를 각 바이러스의 genome 크기로 나누었을 경우, ASGV와 ASPV에서 각각 1.42%와 0.5%의 SNV가 발생했다는 것을 확인하였음.



<그림 30. 배 바이러스 SNV 분석 결과>

○ 식물 바이러스는 대부분 ssRNA 바이러스로 알려져 있는데, ssRNA 바이러스는 새로운 환경과 기주에 적응하기 위해 recombination을 가장 중요한 방법으로 사용해왔으며, 따라서 많은 연구자들이 바이러스의 recombination을 연구하고 있음. 배에서 동정된 바이러스들의 recombination 분석을 위해 Recombination Detection Program v.4.16 (RDP4)를 사용하였으며, 그 결과 총 4개의 recombination event가 발견됨 (표 27). AGCaV에서 1개, ASGV에서 2개, ASPV에서 1개가 발견되었으며, 각 recombination event는 최소 4개 이상의 detection methods에서 검증된 결과를 나타냄 (표 11).

Recombinant sequence	Event number	Breakpoint position		Detection methods in RDP4
		Begin	End	
LC476839 (AGCaV)	1	4168	4558	RDP, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan
LC475148 (ASGV)	1	1087	1995	RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan
LC475148 (ASGV)	2	5462	6509	RDP, BootScan, MaxChi, SiScan
LC475150 (ASPV)	1	8359	8900	RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan

<표 27. Recombination 분석 결과>

Detection methods	Daughter	Major parent	Minor parent	Av. <i>P</i> -Val
RDP	LC476839 (AGCaV)	EU095327	KF321966	$1.325 \times 10^{-03}$
	LC475148 (ASGV)	KX686111	LC143387	$6.176 \times 10^{-13}$
	LC475148 (ASGV)	KU198289	KX686111	$2.095 \times 10^{-03}$
	LC475150 (ASPV)	EU095327	JF946775	$8.390 \times 10^{-09}$
GENECONV	LC475148 (ASGV)	KX686111	LC143387	$3.278 \times 10^{-12}$
	LC475150 (ASPV)	EU095327	JF946775	$1.312 \times 10^{-06}$

BootScan	LC476839 (AGCaV)	EU095327	KF321966	$2.850 \times 10^{-04}$
	LC475148 (ASGV)	KX686111	LC143387	$1.626 \times 10^{-10}$
	LC475148 (ASGV)	KU198289	KX686111	$2.194 \times 10^{-04}$
	LC475150 (ASPV)	EU095327	JF946775	$3.316 \times 10^{-11}$
MaxChi	LC476839 (AGCaV)	EU095327	KF321966	$4.433 \times 10^{-02}$
	LC475148 (ASGV)	KX686111	LC143387	$8.057 \times 10^{-07}$
	LC475148 (ASGV)	KU198289	KX686111	$1.195 \times 10^{-02}$
	LC475150 (ASPV)	EU095327	JF946775	$1.452 \times 10^{-06}$
Chimaera	LC476839 (AGCaV)	EU095327	KF321966	$6.216 \times 10^{-05}$
	LC475148 (ASGV)	KX686111	LC143387	$4.806 \times 10^{-08}$
	LC475150 (ASPV)	EU095327	JF946775	$3.867 \times 10^{-05}$
SiScan	LC476839 (AGCaV)	EU095327	KF321966	$1.065 \times 10^{-16}$
	LC475148 (ASGV)	KX686111	LC143387	$1.969 \times 10^{-25}$
	LC475148 (ASGV)	KU198289	KX686111	$6.867 \times 10^{-06}$
	LC475150 (ASPV)	EU095327	JF946775	$8.665 \times 10^{-16}$

<표 28. Recombination event 분석 결과>

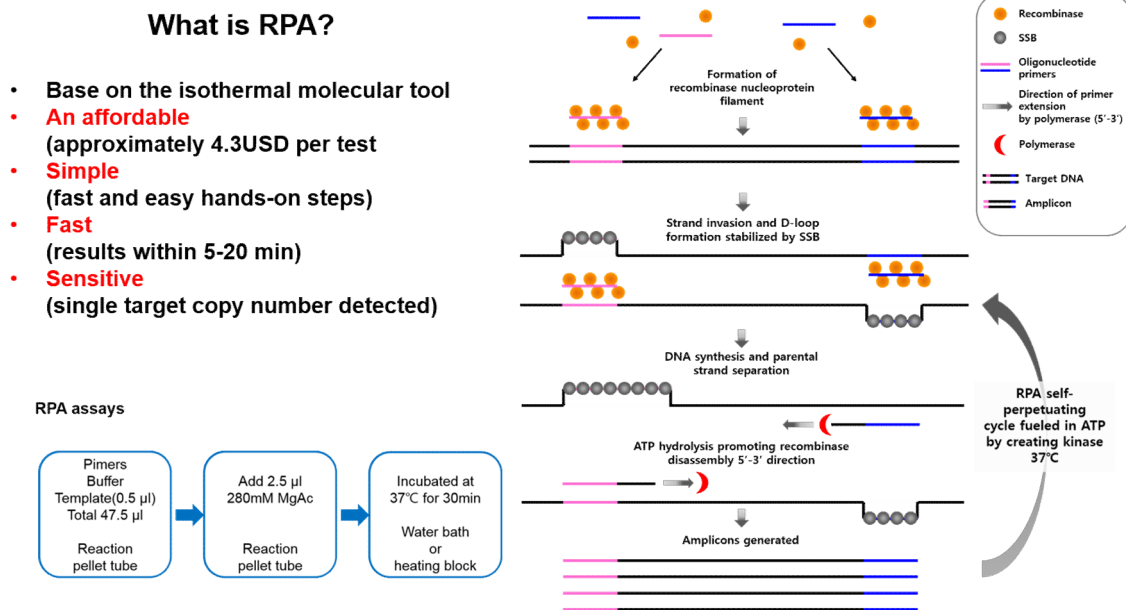
### 3. 배 바이러스 현장신속진단법 개발

○ 기존의 배 바이러스 검출 방법은 변성(denaturation), 접합(annealing), 신장(extension) 등의 세 가지 단계를 거치면서 온도의 변화가 필요한 PCR법임. PCR법은 값비싼 증폭장비, 실험자의 방법이해 및 숙련도, 긴 반응시간 등 신속한 바이러스 진단으로는 효율적이지 못함. 이러한 단점을 극복하고 배 바이러스의 신속한 검출을 위하여 Recombinase Polymerase Amplification (RPA) 기법을 활용하였음. RPA는 PCR과는 달리, 등온에서 특정 유전자의 염기 서열을 증폭시키는 실험법이며, 보다 빠른 유전자 증폭을 기대할 수 있는 실험법으로 개발이 진행되고 있음. RPA는 recombinase, single strand binding protein (SSBP), strand displacing DNA polymerase, 그리고 specific primer 등의 조성으로, 보통 37~42℃ 등온에서 반응이 진행되며, 반응시간은 30 내외가 추천되고 있음. 근래 이 RPA에 의한 다양한 병원체의 검색법들이 계속 보고되고 있으며, 우수한 유전자 진단법으로 점차 적용범위를 넓혀 나아가고 있음 (표 29). 그러나 배 병원성 바이러스의 검출에 대하여 RPA 기술이 접목 된 것은 찾아 볼 수 없었음.

Organism	Target	Sample	Amplification time (min)	Temperature (°C)	Limit of detection
HIV	dsRNA	Plasmid template	15	37	10 copies
<i>Plum pox virus</i>	ssRNA	Peach, apricot, plum, cherry tree leaves	15	39	1.0 fg
Human cancer cells	Met-DNA	Cell cultures and whole blood	30	37	0.5 ng
Dengue Virus	RNA	Plasma	3-8	42	14-241 copies
<i>Zika virus</i>	RNA	Urine	12	40	5 PFU/ml
<i>Rose rosette virus</i>	RNA	Rose leaves	5	42	1 fg

<표 29. RPA법을 이용한 다양한 병원체의 검출>

○ Recombinase를 사용한 등온증폭법 (Recombinase polymerase amplification assay, RPA)은 기존의 PCR법과 유사하지만 변성(denaturation), 접합(annealing), 신장(extension) 등의 세 가지 단계를 거치면서 온도의 변화를 주어야 하는 반면, RPA를 포함한 등온증폭법은 일정한 온도에서 접합 및 신장이 가능함. 검사하는 병원체마다 다르지만 증폭반응을 위하여 등온 조건으로 약 37 내지 42°C 정도 범위 내에서 한 가지 온도가 사용되며 기존 PCR법과 같이 1쌍의 primer를 사용하지만 RPA 법은 30 내지 35 bp 길이의 primer를 사용함. 두 가지 중요 단백질 중 recombinase는 primer와 결합하여 template의 상보적인 부분에 결합하여 D-loop 구조를 형성하는 것을 도우며, single-strand binding protein은 D-loop 구조 형성 시 template의 상보적인 부분에 결합하여 구조를 안정화 시키는 역할을 함. 이후 DNA는 polymerase에 의해 합성되며, 새로 만들어진 DNA strand는 새로운 RPA 반응에 활용됨 (그림 31).



<그림 31. Recombinase polymerase amplification (RPA) cycle>

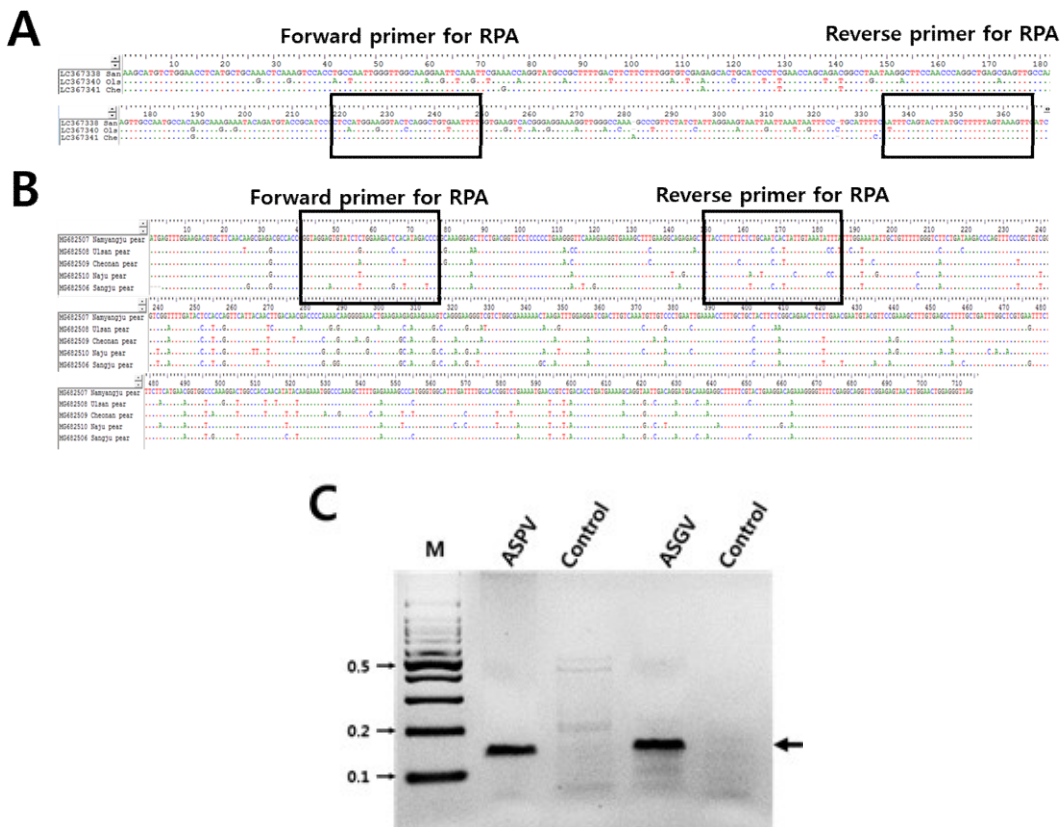
### 가. RT-RPA를 이용한 ASGV와 ASPV 진단법 개발

○ 배 주요 바이러스인 ASPV와 ASGV의 검출을 위하여 우리나라 5지역에서 검출된 각 바이러스 coat protein의 염기서열을 확보하였으며, 염기서열 분석을 통하여 보존된 서열에서 RPA용

primer를 design 함 (표 30). Design한 primer를 사용하여 ASPV와 ASGV가 감염된 배 안에서 RNA를 추출한 후 RT-RPA반응을 진행한 결과 각 바이러스의 감염 앞에서는 증폭산물을 확인할 수 있었고, 바이러스가 감염되지 않은 앞에서는 증폭산물을 확인할 수 없었음 (그림 32).

Target virus	Primer pair	Sequence 5'-3'	Product size (nt)
ASPV	ASPV1F	TCAATGGAGGGTACCCAGGCTGTTAATTTT	146
	ASPV1R	TCAACTTTACTAAAAAGCATAAGTACTGAA	
ASGV	ASGV1F	GTAGGAGTGTATCTCTGGAAGACTCATAGACCC	143
	ASGV1R	AAATATTTACAATAGTGATTGCAGAGAAGAAGGTA	

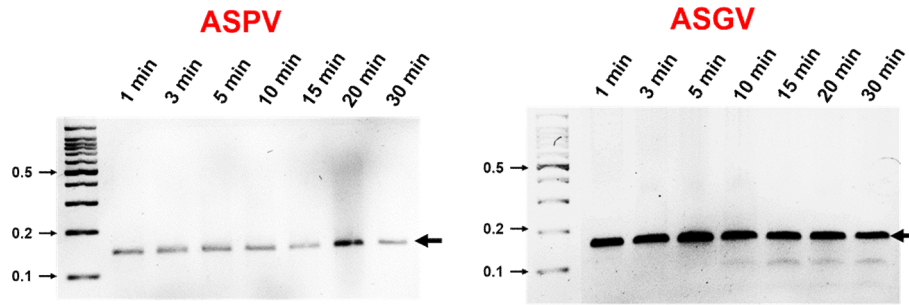
<표 30. ASPV와 ASGV 검출을 위한 RT-RPA primers>



<그림 32. RT-RPA primer position within the coat protein of ASPV (A) and ASGV (B)>

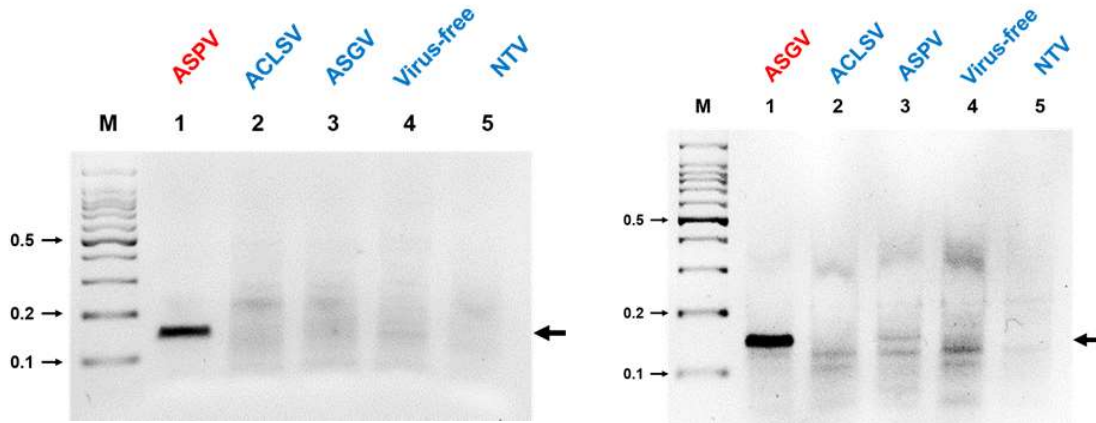
○ ASPV와 ASGV의 검출을 위한 최적화된 RT-RPA 반응시간을 찾기 위하여 ASPV 또는 ASGV가 감염된 배에서 total RNA를 추출하여 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30분 RT-RPA 반응을 진행함. 그 결과 ASPV와 ASGV 모두 RT-RPA 반응을 1분만 진행하였다도 증폭산물을 확인할 수 있었음 (그림 33)

○ 디자인한 primer의 특이도 확인을 위하여 배에서 발생하는 다른 바이러스가 감염된 배에서 total RNA를 추출한 후 RT-RPA반응을 진행함. 그 결과 ASPV 검출을 위한 primer를 사용했



<그림 33. Optimization of RT-RPA reaction time>

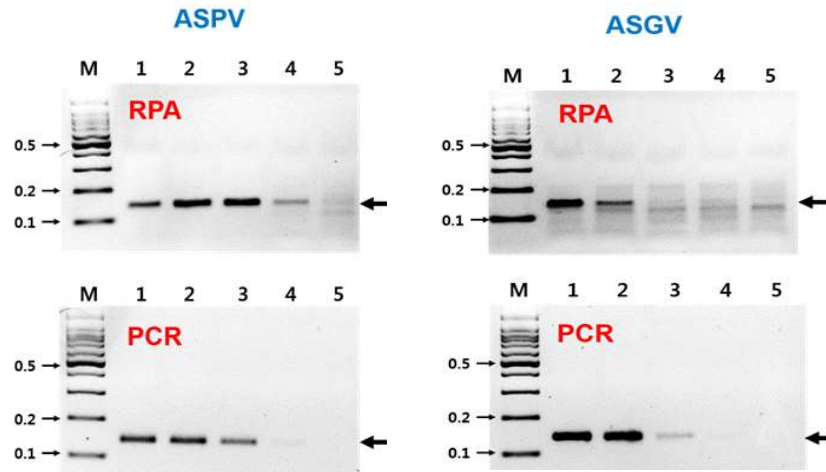
을 경우 ACLSV 또는 ASGV가 감염 된 잎, virus가 감염되지 않은 잎과 primer를 넣지 않은 NTC에서는 증폭산물을 확인할 수 없었고, ASPV가 감염 된 잎에서는 증폭산물을 확인함. 또한 ASGV 검출을 위한 primer를 사용했을 경우 ACLSV 또는 ASPV가 감염 된 잎, virus가 감염되지 않은 잎과 NTC에서는 증폭산물을 확인할 수 없었고, ASGV가 감염 된 잎에서는 증폭산물을 확인함 (그림 34).



<그림 34. ASGV와 ASPV RT-RPA 특이성 결과>

○ 디자인한 primer의 민감도를 확인하기 위하여 ASPV 또는 ASGV가 감염된 잎에서 total RNA를 추출하여 10-fold dilution을 하였으며, RT-RPA 반응과 RT-PCR 반응을 진행함. 그 결과 ASPV의 경우 RT-RPA 반응에서는 3번의 dilution한 sample에서도 증폭산물의 확인이 가능하였으나 RT-PCR 반응에서는 2번의 dilution한 sample까지만 증폭산물의 확인이 가능하였음. ASGV의 경우 RT-RPA 반응에서는 1번의 dilution한 sample에서만 증폭산물의 확인이 가능하였으나 RT-PCR 반응에서는 2번의 dilution한 sample에서도 증폭산물이 희미하게 확인 가능하였음. 결과적으로 ASPV의 경우 기존 RT-PCR 반응보다 RT-RPA 반응이 10배 더 민감하다는 것을 확인하였고, ASGV의 경우 기존 RT-PCR반응이 RT-RPA 반응보다 조금 민감하다는 것을 확인하였음 (그림 35).

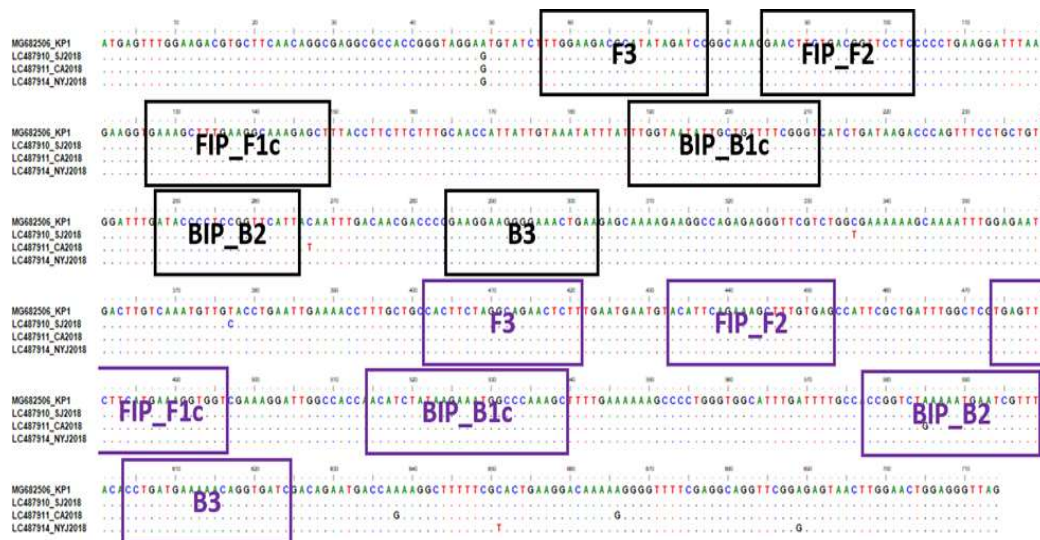




<그림 35. ASGV와 ASPV RT-RPA 민감도 결과>

### 나. RT-LAMP를 이용한 ASGV 진단법 개발

○ 배에서 발견된 ASGV의 신속 진단을 위해 Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)법을 개발함. 루프를 사용한 등온증폭법인 RT-LAMP는 기존의 RT-PCR법과 다르게 일정한 온도에서 접합 및 신장이 가능하며, 약 60 내지 65°C 정도 범위 내에서 한 가지 온도가 사용되며, 기존 RT-PCR법과 달리 4개의 primer를 사용하여 선택성이 높음. RT-LAMP 기법으로 ASGV를 검출하기 위하여 우리나라 배에서 발견된 ASGV의 외피 단백질(Coat protein) 전체 염기서열을 확보하였고, 국내 다른 isolate들과 염기서열 비교를 통하여 보존적인 지역에서 LAMP primer 제작 software인 PrimerExplorerV4 (<https://primerexplorer.jp/e/>)를 사용해서 LAMP primer를 제작함(그림 36)(표 1).



<그림 36> ASGV 검출을 위한 RT-LAMP 프라이머 위치

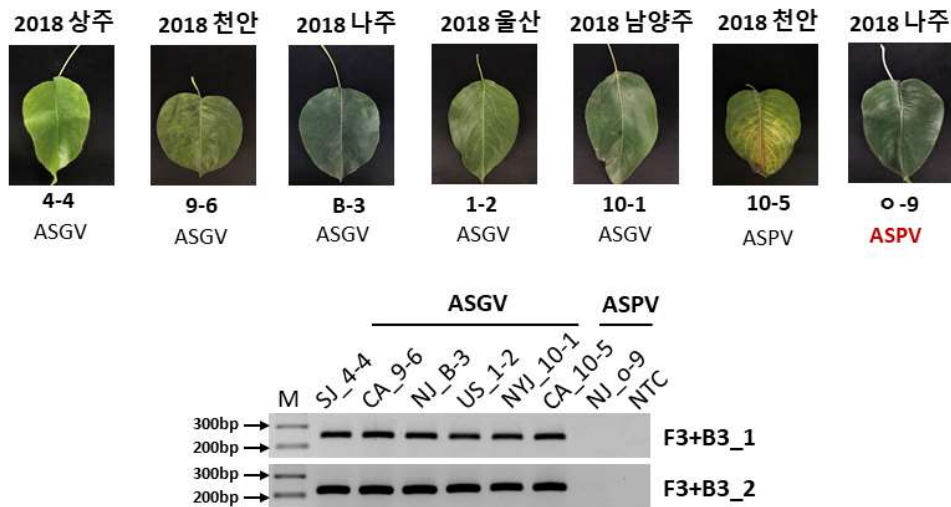
Primer sets	Primer type	Sequence 5'-3'	Length	Target position <sup>a</sup>
ASGV1	F3	TTGGAAGACGCATATAGATCC	21 bp	57-77
	B3	TTCAGTTTCCCCTTCCTTC	19 bp	285-303

	FIP	AGCTCTTTGCCTTCAAAGCTTTCTTTTGA	46 bp	127-149
	(F1c-F2)	ACTTCTGACGGTTCCTC		85-103
	BIP	TTGGTAATATTGCTGTTTTTCGGGTTTTTA	46 bp	188-211
	(B1c-B2)	ATGAACCGGAGGGGTAT		248-265
	F3	CACTTCTAGGCAGAACTCTT	20 bp	402-421
	B3	GATCACCTGTTTTTCATCAGG	21 bp	604-624
ASGV2	FIP	ACCACCTTTCATGAAGAAACTCATTTTAC	48 bp	474-496
	(F1c-F2)	ATTCAGAAAGCTTTGTGAG		433-453
	BIP	ACATCTATAAGAAATGGCCCAAAGCTTTT	50 bp	515-539
	(B1c-B2)	AACGATTCATTTTTAGACCGG		578-599

<sup>a</sup> Relative to the reference sequence (GenBank Accession No. MG682506)

<표 31> ASGV RT-LAMP primer 목록

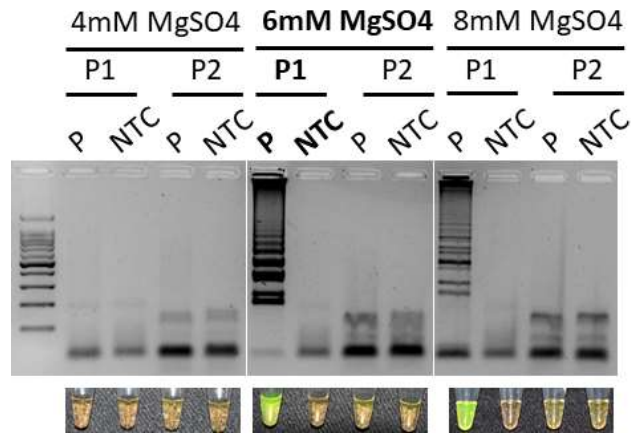
○ RT-LAMP 반응을 하기 전에 F3, B3 primer를 사용해서 ASGV 감염 시료에서 증폭이 되는지 RT-PCR로 확인함. SuPrimeScript RT-PCR Premix (2X) (GeNet Bio) 제품의 protocol를 따라서 RNA premixture가 담긴 PCR tube에 F3(10pmol), B3(10pmol)를 각각 1ul, RNA 추출물 (template)을 2ul 분주 후 DEPC water로 총량 20ul를 맞춤. 그림 2와 같이 ASGV가 감염된 배 잎 시료와 ASPV가 감염된 시료를 사용해서 RT-PCR를 수행한 결과, ASGV에 대한 LAMP primer 2 sets 모두 사용 가능함.



<그림 37> F3와 B3 primer를 사용해서 ASGV RT-PCR 결과

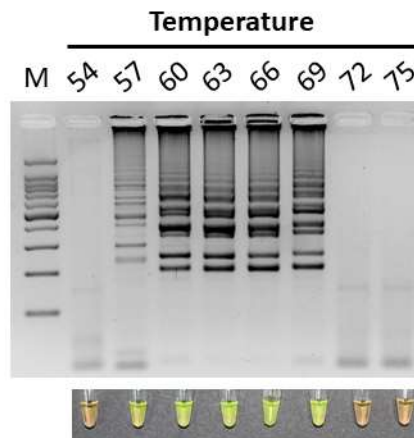
○ RT-LAMP 반응은 2.5ul의 10X LAMP buffer, 6ul의 dNTP(10mM), 5ul의 betaine, 4ul의 RT-LAMP primer [F3(10pmol), B3(10pmol), FIP(40pmol), BIP(40pmol)], 1ul의 *bst* polymerase, 0.5ul의 AMV RTase, 4ul의 DEPC water를 넣어 총 25ul의 반응액으로 조성함. 반응 시간은 60 min, 반응 온도는 63 °C의 항온수조에서 반응함. 반응 후, 10000X SYBR Green I (invitrogen)를 100배 희석한 100X의 SYBR Green I을 10ul 넣어서 증폭 여부를 판단함. 형광등에서 육안 관찰 시에는 RT-LAMP 반응이 된 product는 노란색이고 반응이 안 된 product는 오렌지색을 띰. 반응이 끝난 후 2% agarose gel 전기영동으로 확인함. ASGV 검출을 위한 2개의 LAMP primer sets에 적합한 10X LAMP buffer를 확인하기 위해서 ASGV 감염시료(P)와 NTC(Non-template control)를 사용해서 RT-LAMP 실험을 수행함. 그 결과,

6mM와 8mM MgSO<sub>4</sub>가 함유된 10X LAMP buffer가 LAMP primer 1 sets에서 모두 증폭되는 것을 확인함(그림37). 이 후 실험에서는 증폭 정도가 더 강한 6mM MgSO<sub>4</sub>의 LAMP buffer를 사용함.



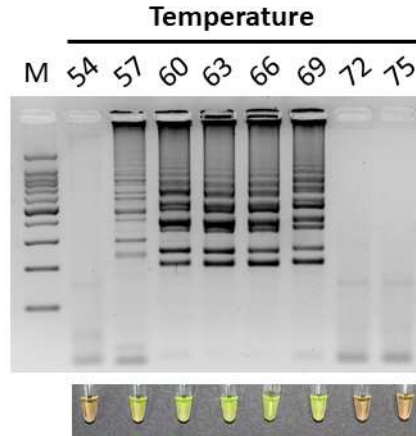
<그림 38> 10× LAMP buffer의 조건 확립

○ RT-LAMP 최적 반응 온도 조건을 확립하기 위해 54-75℃의 온도 조건에서 반응을 진행함. 반응 결과 57℃부터 69℃ 사이에서 증폭을 확인 할 수 있었음(그림 39). 이후 진행된 모든 반응은 63℃의 등온 조건에서 실시함.



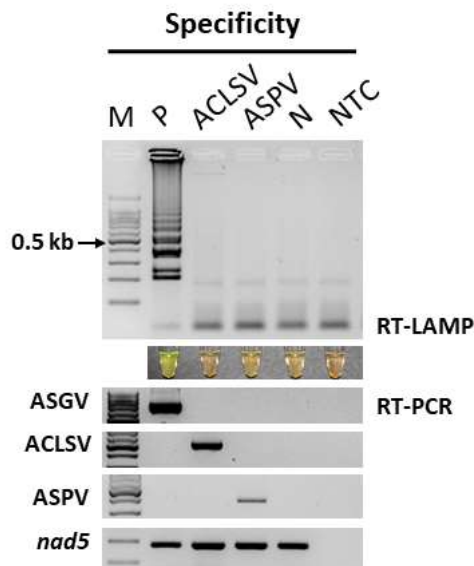
<그림 39> ASGV에 대한 RT-LAMP 방법의 최적 온도 조건 확립

○ RT-LAMP 최적 반응 시간을 확립하기 위해 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min의 시간 조건에서 반응을 진행함. 반응 결과 30 min부터 약하게 증폭이 확인 됨 (그림 40). 50 min을 최적 시간으로 판단하였으며, 이후 진행된 모든 반응시간은 50 min으로 실시함.



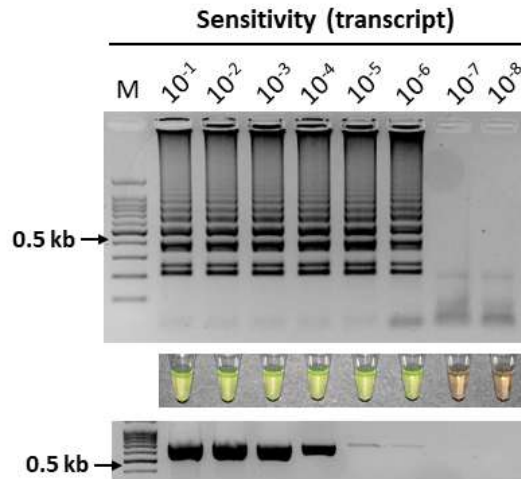
<그림 40> ASGV에 대한 RT-LAMP 방법의 최적 온도 조건 확립

○ RT-LAMP의 primer 특이성 확인을 위하여 배에서 발생하는 다른 바이러스가 감염된 잎에서 total RNA를 추출한 후 RT-LAMP 반응을 진행함. 그 결과, ACLSV와 ASPV가 감염된 시료에서는 비특이적인 반응이 나타나지 않았고 오직 ASGV에 감염된 시료에서만 증폭산물을 확인함(그림 41). 결과적으로 ASSV에 대한 RT-LAMP primer가 ASGV에 대해 특이성을 나타내는 것을 확인함.



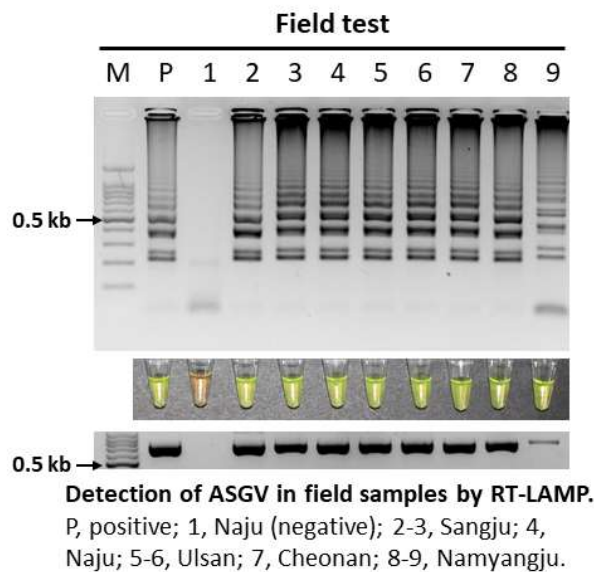
<그림 41> ASGV에 대한 RT-LAMP primer의 특이성 확인

○ RT-LAMP의 민감도 확인을 위하여 ASGV-transcript를 합성하여 10-fold dilution을 하였으며, RT-LAMP와 RT-PCR 반응을 진행함. 전기영동과 SYBR Green 반응결과 RT-LAMP 반응에서는  $10^{-6}$ 까지 검출이 가능하였고, RT-PCR 반응에서도  $10^{-6}$ 까지 약하게 검출됨. 동일한 희석 시료까지 검출되었지만 RT-LAMP 방법이 증폭강도가 100배 정도 더 높은 것으로 확인됨(그림 42).



<그림 42> ASGV 검출을 위한 RT-LAMP와 RT-PCR 민감도 비교

○ ASGV가 감염된 다양한 isolate 시료에서도 RT-LAMP 방법으로 검출이 되는지를 확인함. 국내 배주산지인 나주, 상주, 울산, 천안, 남양주에서 ASGV가 감염된 배 시료를 확보한 후, total RNA를 추출하였고 이를 template로 사용함. 그 결과, 여러 isolates에서 ASGV 검출이 가능한 것을 확인함.

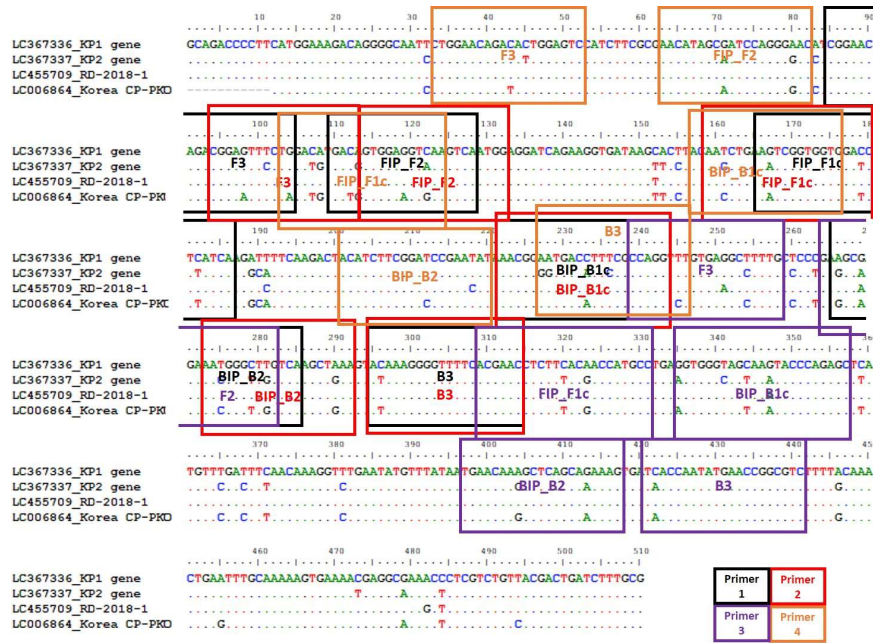


<그림 43> ASGV RT-LAMP의 현장 시료 진단

#### 다. RT-LAMP를 이용한 ACLSV 진단법 개발

○ 배에서 검출된 ACLSV의 신속 진단을 위해 Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)법을 개발함. 루프를 사용한 등온증폭법인 RT-LAMP는 기존의 RT-PCR법과 다르게 약 60 내지 65°C 정도 범위 내의 일정한 온도에서 접합 및 신장이 가능하며, 4개의 primer를 사용하여 선택성이 높음. RT-LAMP 기법으로 ACLSV를 검출하기 위하여 우리나라 배에서 발견된 ACLSV의 외피 단백질(Coat protein) 전체 염기서열을 확보하였고, 국내 다른 isolate들과 염기서열 비교를 통하여 보존적인 지역에서 LAMP primer 제작 software인 PrimerExplorerV4(<https://primerexplorer.jp/e/>)를 사용해서 LAMP primer를

제작함(그림 44)(표 4).



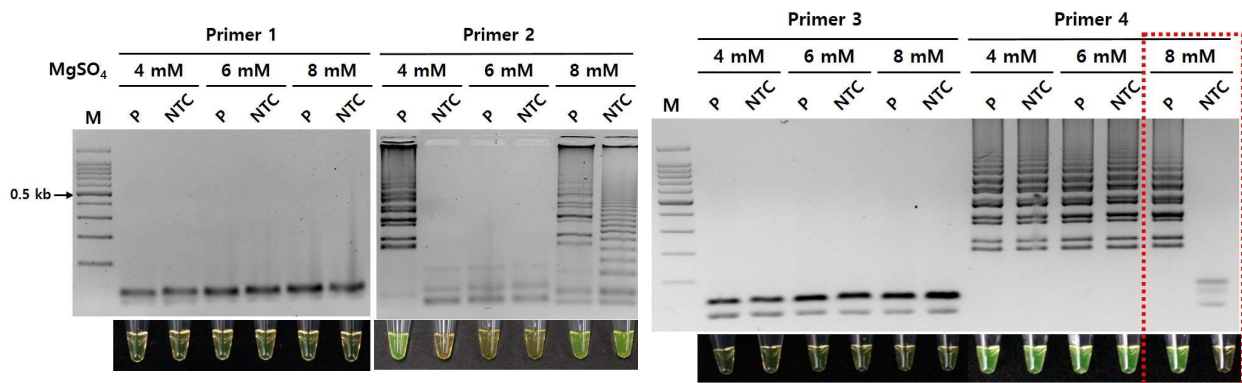
<그림 44> ACLSV RT-LAMP 프라이머 위치

Primer sets	Primer type	Sequence 5'-3'	Length	Target position <sup>a</sup>
ACLSV1	F3	CGGAACAGACGGAGTTTCTG	20 bp	85-104
	B3	GTTCGTGAAAACCCCTTGT	20 bp	295-314
	FIP (F1c-F2)	TGATGAGGTCCACCACCGACTTTTTGACAG TGGAGGTCAAGTCA	44 bp	166-186 110-128
	BIP (B1c-B2)	AACGGAATGACCTTTCGCCAGGTTTTTGA CAAGCCCATTTCTCGCT	46 bp	222-243 266-285
ACLSV2	F3	CGGAGTTTCTGGACATGACA	20 bp	94-113
	B3	GTTCGTGAAAACCCCTTGT	20 bp	295-314
	FIP (F1c-F2)	GGTCCACCACCGACTTCAGATTTTTTGTGG AGGTCAAGTCAATGG	45 bp	159-180 114-132
	BIP (B1c-B2)	AACGGAATGACCTTTCGCCAGGTTTTTTT AGCTTGACAAGCCCATT	46 bp	222-243 273-292
ACLSV3	F3	CCAGGTTTGTGAGGCCTTTG	20 bp	239-258
	B3	GACGCCGTTTCATATTGGTTA	21 bp	421-441
	FIP (F1c-F2)	GGCATGGTCGTAAAGAGTTTCGTTTTTGA GGCAAGAAACGGGTTGG	46 bp	309-331 264-282
	BIP (B1c-B2)	AGTGGGCAGTAAATACCCAGAGCTTTTCT TTTTGCTGAGCCTTGTTCA	48 bp	335-357 397-417
ACLSV4	F3	CTGGAACAGACACTGGAGTC	20 bp	33-52
	B3	ACCTGGCGAAAGGTCATT	18 bp	227-244
	FIP (F1c-F2)	TTGACCTCCACTGTCATGTCCATTTTAAC ATAGCGATCCAGGGAAC	46 bp	103-124 63-82
	BIP (B1c-B2)	ACAATCTGAAGTCGGTGGTGGATTTTATG TTCGATCCGAAGATGT	46 bp	157-178 201-220

<sup>a</sup> Relative to the reference sequence (GenBank Accession No. LC367336)

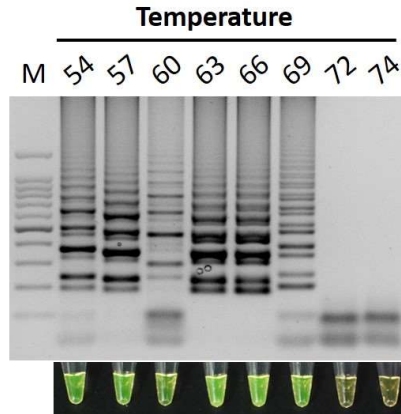
<표 32> RT-LAMP primer 목록

○ RT-LAMP 반응은 2.5 ul의 10X LAMP buffer, 6 ul의 dNTP(10 mM), 5 ul의 betaine, 4 ul의 RT-LAMP primer [F3(10 pmol), B3(10 pmol), FIP(40 pmol), BIP(40 pmol)], 1 ul의 *bst* polymerase, 0.5 ul의 AMV RTase, 4 ul의 DEPC water를 넣어 총 25 ul의 반응액으로 조성함. 반응 시간은 60 min, 온도는 63°C의 항온수조에서 수행함. 반응 후, 10,000X SYBR Green I (invitrogen)를 100배 희석한 100X의 SYBR Green I을 10 ul 넣어서 증폭 여부를 판단함. 형광등에서 육안 관찰 시에는 증폭된 product는 노란색, 증폭되지 않은 product는 오렌지색을 나타냄. 반응이 끝난 후 2% agarose gel 전기영동으로 확인함. ACLSV 검출을 위한 2개의 LAMP primer sets에 적합한 10X LAMP buffer를 확인하기 위해서 ACLSV 감염 시료(P)와 NTC(Non-template control)를 사용해서 RT-LAMP 실험을 수행함. 그 결과, 4 mM과 8 mM MgSO<sub>4</sub>가 함유된 10X LAMP buffer를 이용했을 때 각각 LAMP primer 2와 4에서 증폭되는 것을 확인함(그림 30). 이후 실험에서는 증폭 정도가 더 강한 8 mM(Primer 4) MgSO<sub>4</sub>의 LAMP buffer를 사용함.



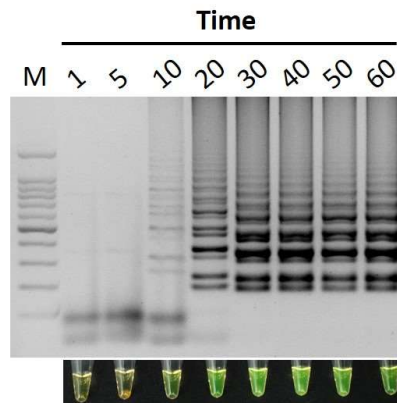
<그림 45> 10× RT-LAMP buffer의 조건 확립

○ RT-LAMP 최적 반응 온도 조건을 확립하기 위해 54-75°C의 여러 온도 조건에서 반응을 진행함. 반응 결과 54°C부터 69°C 사이에서 증폭되었으며, 63°C에서 가장 강하고 뚜렷한 증폭을 확인함 (그림 46). 따라서 이후 진행된 모든 실험은 63°C 등온 조건에서 수행함.



<그림 46> ACLSV에 대한 RT-LAMP 방법의 최적 온도 조건 확립

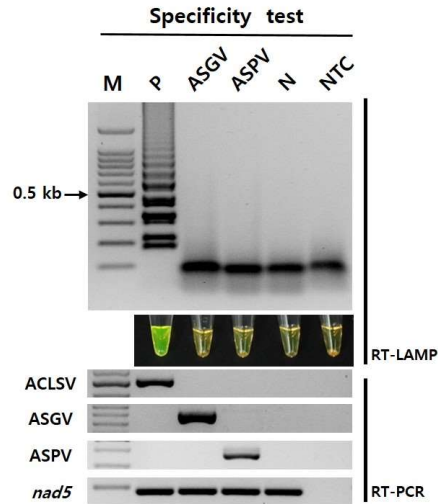
- RT-LAMP 최적 반응 시간을 확립하기 위해 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min의 시간 조건에서 반응을 진행함. 반응 결과 10분부터 약한 증폭이 확인됨 (그림 47). 따라서 30분을 최적 시간으로 판단하였으며, 이후 진행된 모든 실험은 30분간 반응함.



<그림 47> ACLSV에 대한 RT-LAMP 방법의 최적 시간 조건 확립

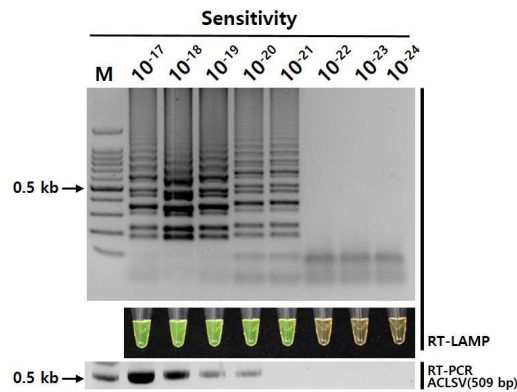
- RT-LAMP의 primer 특이성 확인을 위하여 배에서 발생하는 다른 바이러스가 감염된 잎에서 total RNA를 추출한 후 RT-LAMP 반응을 진행함. ASGV와 ASPV가 감염된 시료와 virus가 감염되지 않은 시료(N)에서는 비특이적인 반응이 나타나지 않았고, 오직 ACLSV가 감염된 잎에서만 증폭된 것으로 나타남(그림 48). 결과적으로 ACLSV에 대한 RT-LAMP primer가 ACLSV에 대해 특이성을 나타내는 것을 확인함.





<그림 48> ACLSV에 대한 RT-LAMP primer의 특이성 확인

- RT-LAMP의 민감도 확인을 위하여 ACLSV-transcript를 합성하여 10-fold serial dilution하여 RT-LAMP와 RT-PCR 반응을 진행함. 전기영동과 SYBR Green 반응 결과, RT-PCR 반응에서는  $10^{-20}$ 까지 검출되었고, RT-LAMP 반응에서는  $10^{-21}$ 까지 검출됨. 따라서 RT-LAMP 방법이 증폭강도가 약 10배 더 높은 것으로 확인됨(그림 49).

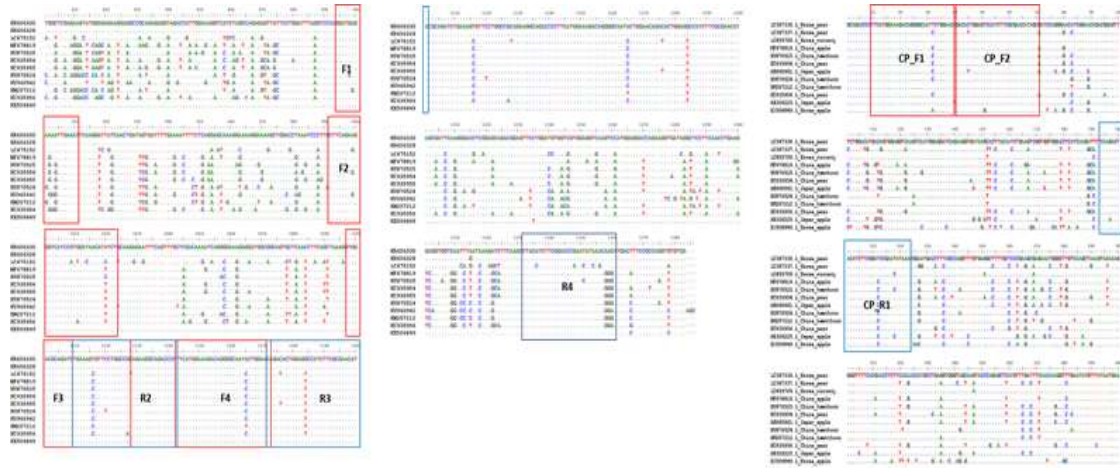


<그림 49> RT-LAMP와 RT-PCR 민감도 비교

#### 라. RT-RPA를 이용한 ACLSV 현장 신속 진단법 개발

- 배에서 검출된 ACLSV의 신속 진단을 위해 Reverse transcript recombinase polymerase amplification (RT-RPA) 검출기법을 개발함. RT-RPA는 Recombinase protein을 이용한 등온 핵산 증폭법으로 기존 RT-PCR에서 수행되는 초기 DNA 분리과정이 필요 없이 37°C에서 42°C 정도의 일정한 온도 범위 내에서 최소 5-10분 만에 바이러스를 검출할 수 있는 방법임. RT-RPA 기법으로 ACLSV를 검출하기 위해서 우리나라 배에서 발견된 ACLSV의 이동단백질 (movement protein)과 외피단백질 (Coat protein)의 밝혀진 염기서

열과 다른 국가의 ACLSV isolate들을 이용하여 염기서열을 비교분석 하여 보존된 지역에서 RPA primer를 메뉴얼로 제작하여 실험에 이용함 (그림 50).



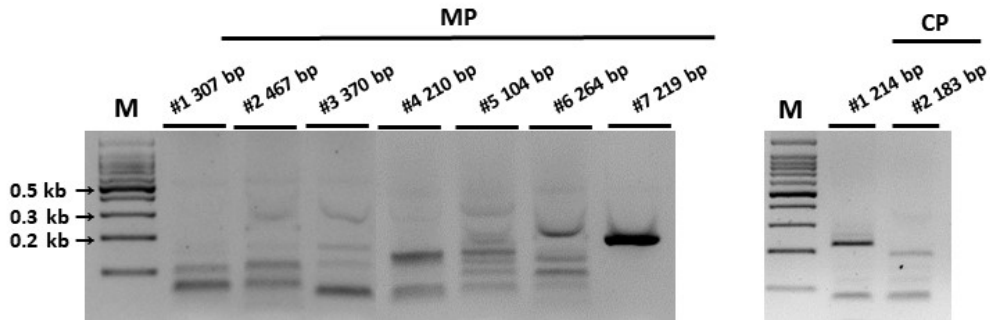
<그림 50> ACLSV RT-RPA 프라이머 위치

Primer sets	Primer type	Sequence 5'-3'	bp	Amplicon size
ACLSV_MP1	F	GATGAGAAAATTGAACATCAAGGATTATCAAC	32	307 bp
	R	TATGTTTCGCGAAGATGGCCTCCAGTGTCTG	30	
ACLSV_MP2	F	GATGAGAAAATTGAACATCAAGGATTATCAA	32	467 bp
	R	TGTTGTTTATATTCGGGTCCGAAGATGTAG	30	
ACLSV_MP3	F	CTTCAGAAGGGTCATCCGTGGATAACATATCT	32	370 bp
	R	TGTTGTTTATATTCGGGTCCGAAGATGTAG	30	
ACLSV_MP4	F	CTTCAGAAGGGTCATCCGTGGATAACATATCT	32	210 bp
	R	TATGTTTCGCGAAGATGGCCTCCAGTGTCTG	30	
ACLSV_MP5	F	TGGACGCAGATCTGAAAGTGTTCCTGGCCG	30	104 bp
	R	TATGTTTCGCGAAGATGGCCTCCAGTGTCTG	30	
ACLSV_MP6	F	TGGACGCAGATCTGAAAGTGTTCCTGGCCG	30	264 bp
	R	TGTTGTTTATATTCGGGTCCGAAGATGTAG	30	
ACLSV_MP7	F	TTCATGGAAAGACAGGGGCAATACTGGAAC	30	219 bp
	R	TGTTGTTTATATTCGGGTCCGAAGATGTAG	30	
ACLSV_CP1	F	TTCATGGAAAGACAGGGGCAATTCTGGAAC	30	214 bp
	R	TTTATATTCGGATCCGAAGATGTAGTCTTG	30	
ACLSV_CP2	F	GACACTGGAGTCCATCTTCGCGAACATAGC	30	183 bp
	R	TTTATATTCGGATCCGAAGATGTAGTCTTG	30	

<표 33> ACLSV RT-RPA primer 목록

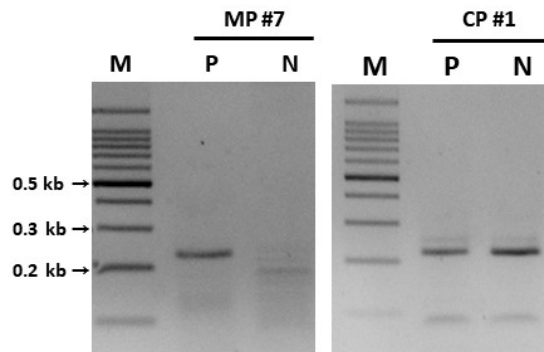
- RT-RPA 반응에 적합한 프라이머 세트를 찾기 위해서 ACLSV 감염 시료에서 TwistAmp® Basic kit를 이용하여 RT-RPA 프라이머가 작동되는지 확인하였음. RT-RPA 반응은 2.5ul의 시료 total RNA와 2.4ul의 forward primer, reverse primer (5pmol), 29.5ul의 rehydration buffer, 1ul의 M-MLV RTase, 1.2ul의 RNase inhibitor를

넣어 vortexing하여 잘 혼합함. 2.5ul의 MgOAc를 넣고 vortexing 하여 잘 혼합해주고 42°C의 항온수조에 넣어 10분 동안 반응함. 반응이 끝난 product는 3% agrose gel에 30분간 loading하여 증폭여부를 확인함. 그 결과, MP부분의 7번 프라이머와 CP 부분의 1번 프라이머 set가 예상 하는 증폭 크기에서 증폭되어 실험에 사용함 (그림 51).



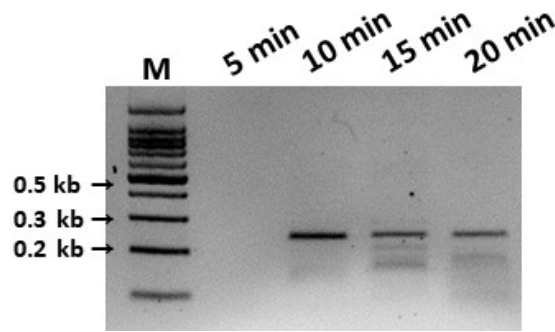
<그림 51> 적합한 ACLSV primer 선정을 위한 RT-RPA

- ACLSV 검출하기 위한 2개의 primer set(MP#7, CP#1)를 선택한 후 ACLSV 감염시료(P)와 비 감염시료(N) 에서 증폭되는지 확인하는 실험을 함. 그 결과, 두 primer set 모두 감염시료에서는 증폭되었고, MP#7 primer에서는 비 감염시료에서 증폭되지 않았지만, CP#1 primer에서는 비 감염 시료에서 증폭되었음. 따라서 MP#7 primer를 사용하여 실험을 진행하였음 (그림 52).



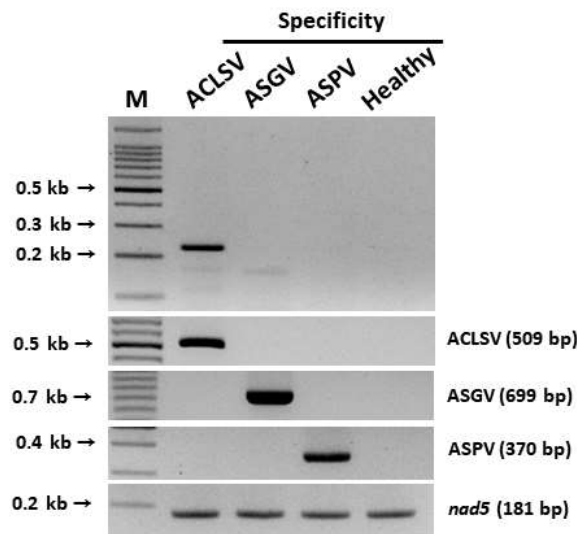
<그림 52> ACLSV에 대한 RT-RPA 프라이머 선택

- RT-RPA의 최적 반응 시간을 확립하기 위해 1, 5, 10, 20 min의 시간 조건에서 반응을 진행함. 반응 결과 10min에서 증폭이 시작 되었으며 20min 이상 반응 시 비 특이적인 반응이 발생하였고 (그림 53) 따라서 10 min을 최적 시간으로 판단하였음. 이후 진행된 모든 반응 시간은 10 min으로 실시함.



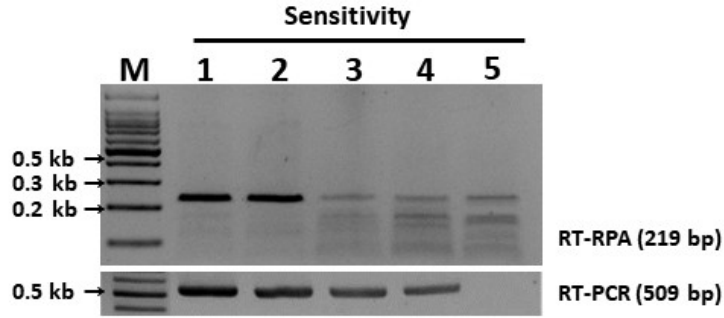
<그림 53> ACLSV에 대한 RT-RPA 방법의 최적 온도 조건 확립

○ RT-RPA의 primer 특이성 확인을 위해 배에서 발생하는 다른 바이러스가 감염된 시료에서 total RNA를 추출 후 MP#7 primer set로 RT-RPA를 수행하였음. 그 결과, 오직 ACLSV감염 시료에서만 증폭산물을 확인할 수 있었고 ASGV와 ASPV가 복합 감염된 시료에서는 증폭되지 않았음 (그림54). 따라서 ACLSV에 대한 RT-RPA primer가 ACLSV에 대해 특이성을 나타낸다는 것을 확인함.



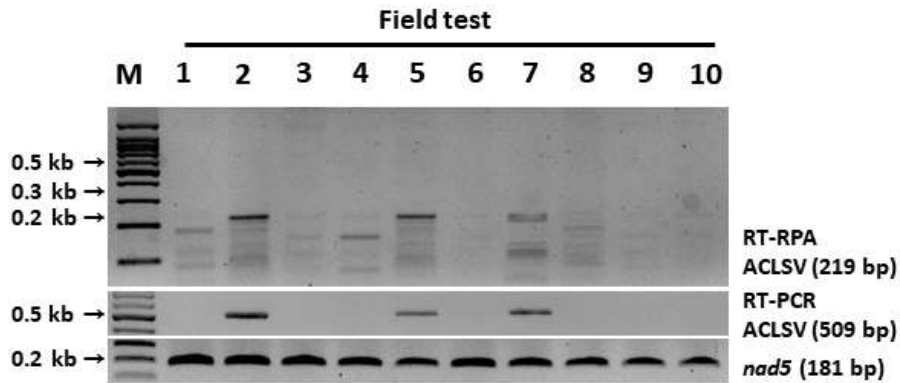
<그림 54> ACLSV에 대한 RT-RPA primer의 특이성 확인

○ RT-RPA의 민감도 비교를 위하여 ACLSV-transcript를 합성하여 10-fold dilution을 하였으며, 각각의 transcript를 RT-RPA와 RT-PCR 반응을 진행함. 그 결과 RT-RPA는  $10^{-3}$ 까지 검출이 가능하였고, RT-PCR은  $10^{-5}$ 까지 검출이 가능하였다. RT-RPA가  $10^{-6}$ 까지 증폭산물이 약하게 확인되긴 하였으나 비 특이적인 반응도 함께 발생하였으므로 따라서 RT-PCR이 RT-RPA보다 약 100배 정도 더 높은 것으로 확인됨 (그림 55).



<그림 55> ACLSV에 대한 RT-RPA와 RT-PCR의 민감도 비교

○ ACLSV가 감염된 다양한 isolate를 가진 배 시료에서도 RT-RPA의 primer로 검출이 되는지 확인하기 위하여 나주, 대구, 상주의 배 시료의 total RNA를 추출한 후 이를 template로 사용하여 RT-RPA를 진행함. 그 결과, 여러 isolate의 ACLSV positive 시료에서 ACLSV 검출이 가능한 것을 확인함 (그림 56).



<그림 56> ACLSV RT-RPA의 현장 시료 진단

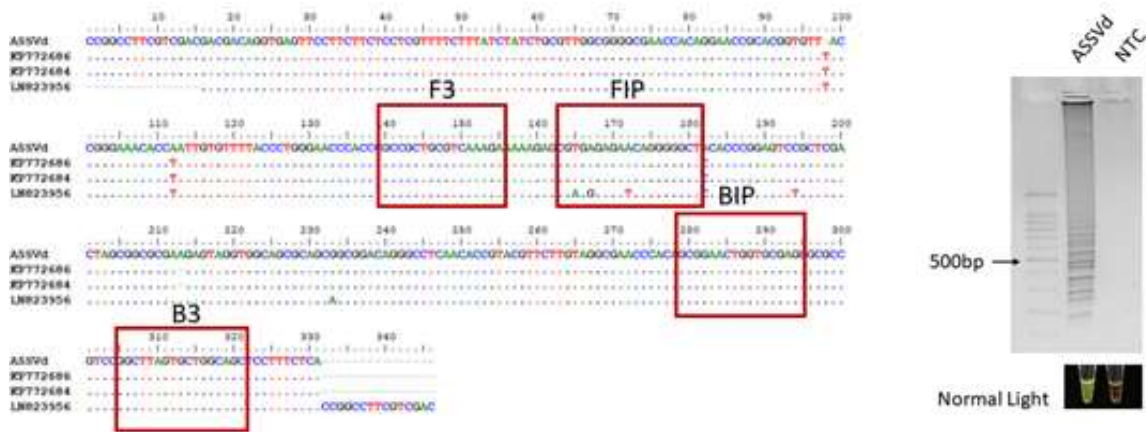
#### 마. RT-LAMP를 이용한 배 Apple scar skin viroid (ASSVd) 현장 신속 진단법 개발

○ 배에서 발견된 ASSVd의 신속 진단을 위해 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)법을 개발함. 루프를 사용한 등온증폭법인 LAMP는 기존의 PCR법과 다르게 일정한 온도에서 접합 및 신장이 가능하며, 약 60 내지 65°C 정도 범위 내에서 한 가지 온도가 사용되며, 기존 PCR법과 달리 2-3쌍의 primer를 사용하여 선택성이 높음. ASSVd LAMP 검출을 위하여 우리나라 배에서 발견된 ASSVd의 전체 염기서열을 확보하였고, NCBI의 다른 isolate들과 염기서열 비교를 통하여 보존적인 지역에서 primer를 디자인 함 (표 34).

Target	Primers	Sequence 5'-3'
ASSVd	F3	GCCGCTGCGTCAAAGA
	B3	GCTGCCAGCACTAACGCC
	FIP	ACCTACTCTTCGCGCCGCTTTTTTCGTGAGAGAACAGGGGGCTA
	BIP	CGGACAGGGCCTCAACACCTTTTCTCGCACCAGTTCCGC

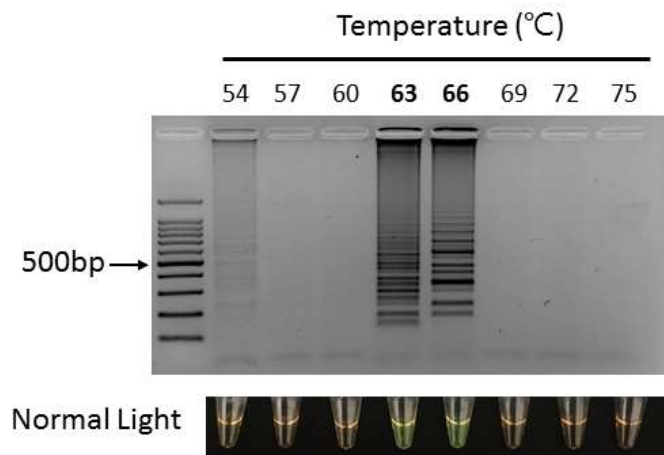
<표 34. ASSVd RT-LAMP primers>

○ RT-LAMP 반응은 RT-LAMP kit (Optigen)을 사용하여 진행하였으며, 반응액 조성은 ASSVd에 감염된 시료의 total RNA 2 ul, 40pM inner primers(FIP, BIP), 10pM outer primers (F3, B3)를 각각 1 ul, Isothermal Master Mix 12.5 ul, AMV Reverse transcriptase (Promega) 0.5 ul, 5X buffer 1 ul와 DEPC water 5 ul를 넣어 총 25 ul의 반응액으로 조성함. 반응 시간은 60 min, 반응 온도는 63°C에서 반응함. 반응이 끝난 후 SYBR Green I X10000 (invitrogen)를 100배 희석하여 10 ul 넣음. 형광등에서 육안 관찰 시에는 RT-LAMP 반응이 된 product는 노란색이고 반응이 안 된 product는 오렌지색을 띰. 반응이 끝난 후 2% agarose gel 전기영동으로 확인함 (그림 57).



<그림 57. LAMP primer position and RT-LAMP assays>

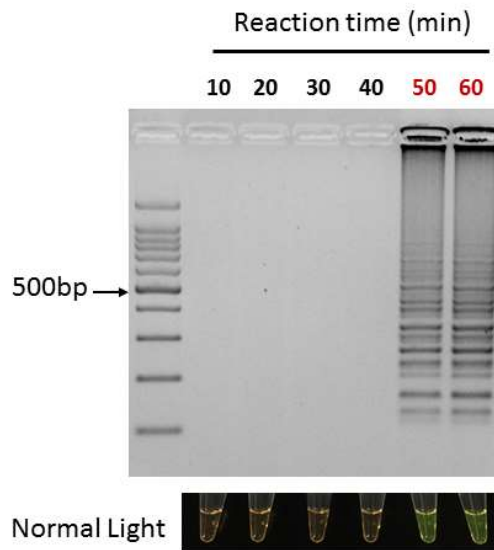
○ RT-LAMP 최적 반응 온도 조건을 확립하기 위해 54-72°C의 여러 온도 조건에서 반응을 진행함. 반응 결과 54°C에서 약하게 증폭되었지만, 63°C에서 강하고 뚜렷한 증폭을 확인 할 수 있었음 (그림 58). 이후 진행된 모든 반응은 63°C 등온 조건에서 실시함.



<그림 58. ASSVd RT-LAMP 반응 온도 확립 >

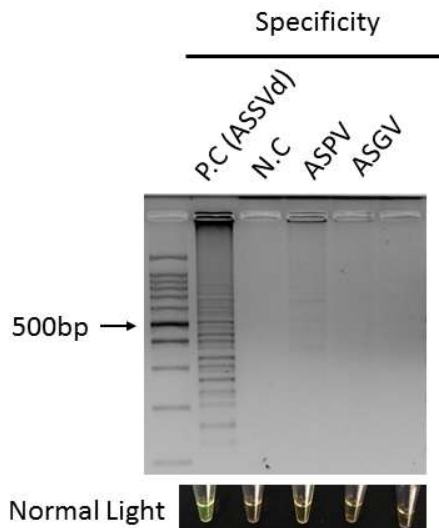
○ RT-LAMP 최적 반응 시간을 확립하기 위해 10-60 min의 여러 시간 조건에서 반응을 진행함. 반응 결과 50, 60 min에서 증폭이 확인 됨 (그림 59). 50 min을 최적 시간으로 판단하

였으며, 이후 진행된 모든 반응 시간은 50 min 실시함.



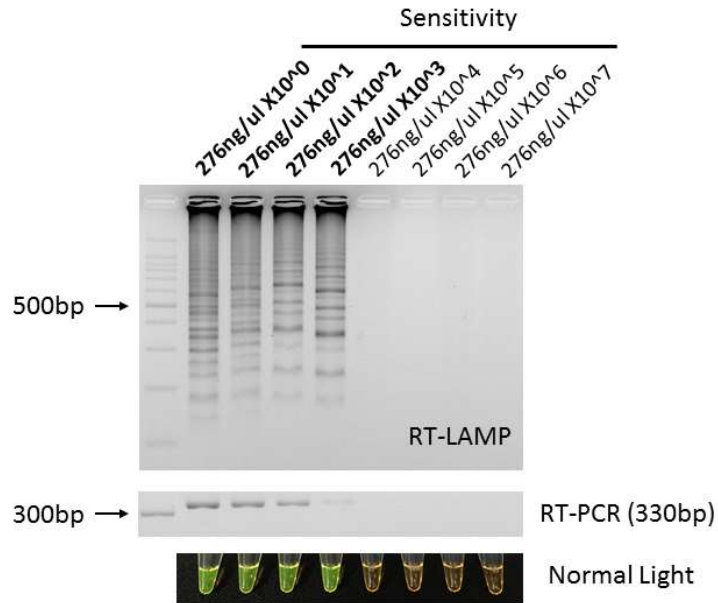
<그림 59. ASSVd RT-LAMP 반응 시간 확립>

○ RT-LAMP의 특이도 확인을 위하여 배에서 발생하는 다른 바이러스가 감염된 잎에서 total RNA를 추출한 후 RT-LAMP 반응을 진행함. 그 결과 ASSVd 검출을 위한 primer를 사용했을 경우 ASPV, ASGV 또는 ACLSV가 감염된 잎과 virus가 감염되지 않은 잎에서는 증폭산물을 확인할 수 없었고, 오직 ASSVd가 감염된 잎에서는 증폭산물을 확인함 (그림 60). 결과적으로 ASSVd에 대한 RT-LAMP primer가 ASSVd에 대해 특이성을 나타내는 것을 확인함.



<그림 60. ASSVd RT-LAMP 반응 특이성 검정>

○ RT-LAMP의 민감도 확인을 위하여 ASSVd가 감염된 배 잎에서 total RNA를 추출하여 10-fold dilution을 하였으며, RT-LAMP와 RT-PCR 반응을 진행함. 전기영동과 SYBR Green 반응결과 RT-LAMP 반응에서는 3번의 dilution sample까지 검출이 가능하였으나, RT-PCR 반응에서는 2번의 dilution sample까지 검출됨. ASSVd의 검출반응에서 RT-LAMP 반응이 기존의 RT-PCR 반응보다 10배 민감하다는 것을 확인함 (그림 61).



<그림 61. ASSVd RT-LAMP 반응 RT-PCR과 민감도 비교>

#### 바. Apple stem grooving virus 초정밀진단 기술 검토

○ 우리나라 배에서 가장 많이 검출된 ASGV의 초민감 진단법 개발을 위해 digital PCR (dPCR) 기법을 활용함. Digital PCR은 3세대 PCR 방식으로 기존 2세대 PCR인 real-time PCR (qPCR)과 다르게 표준물질 없이도 검출목표 유전자의 실시간 절대정량이 가능한 새로운 접근 방식의 PCR 범임 (그림 24). 검출 민감도가 매우 높아 기존 PCR 적용분야 뿐 아니라 다양한 범위에서 응용이 가능함.

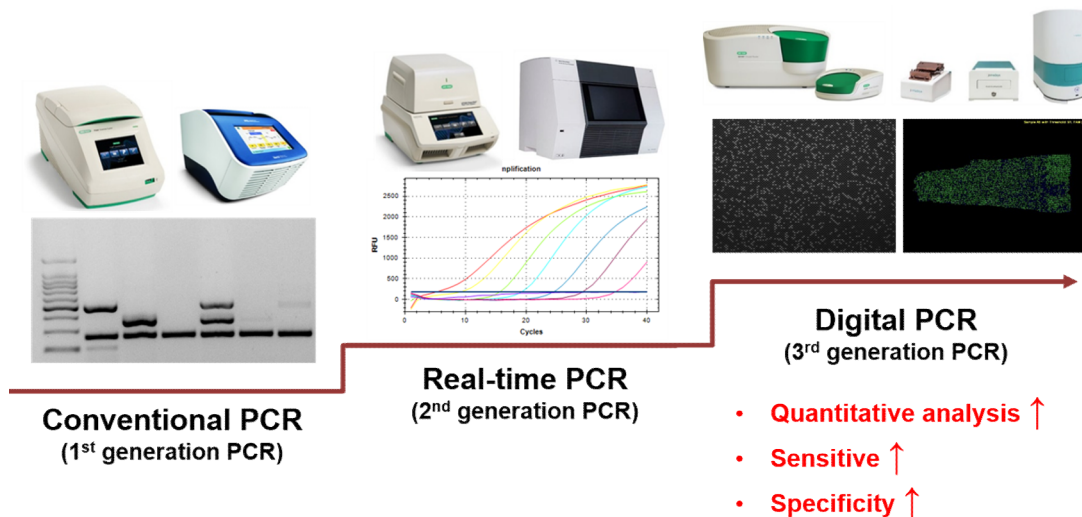


그림 62. Digital PCR 모식도

○ ASGV의 dPCR 검출을 위하여 우리나라 배에서 발견된 ASGV의 전체 염기서열을 확보하였고, NCBI의 다른 isolate들과 염기서열 비교를 통하여 보존적인 지역에서 primer와 probe를



design함 (그림 63).

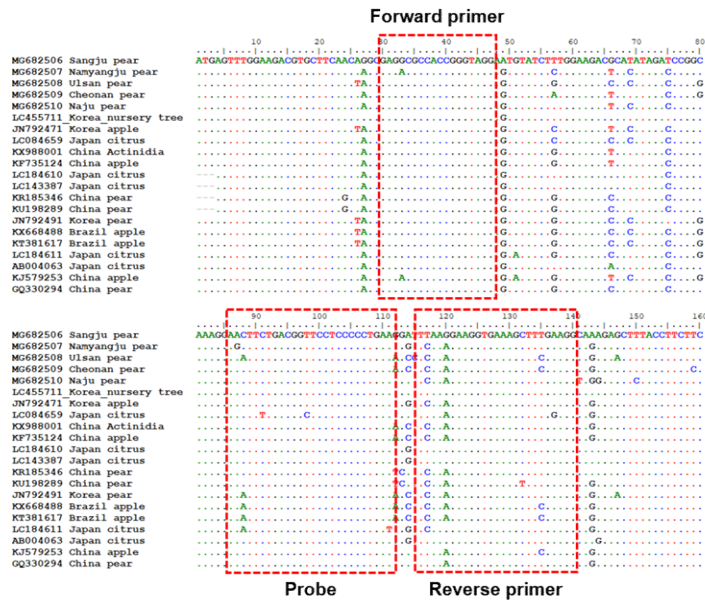
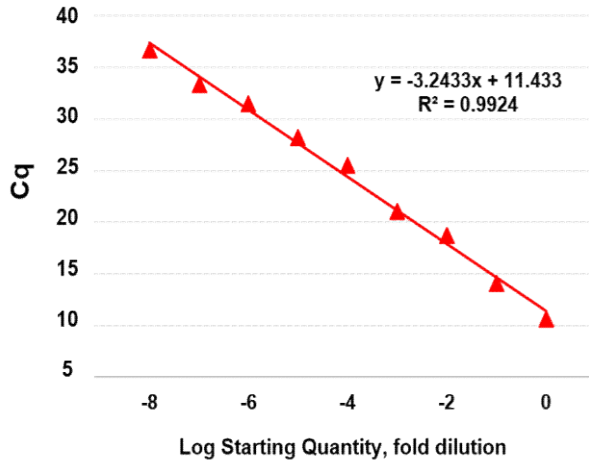


그림 63. ASGV 디지털 PCR 프라이머 위치

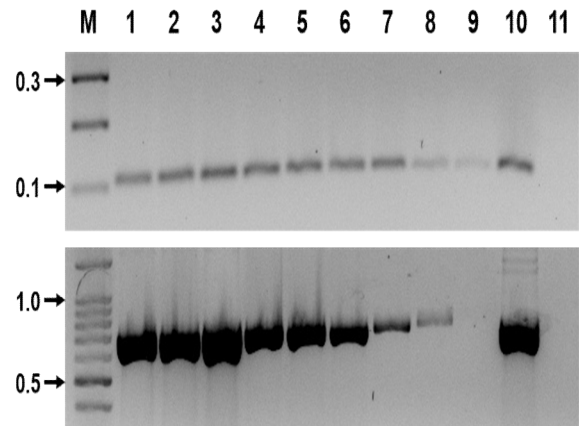
Assay	Target gene	Position	Size	Primer	Sequence 5'-3'	References
RT-qPCR and RT-dPCR	ASGV CP	5671-5688	100	ASGV-CNU-F	AGRCGCCACCGGGTAGG	This study
	ASGV CP	5726-5751		ASGV-CNU-R	CCTTCRAARCTTTCACCTTCTTTRA	
	ASGV CP	5756-5780		ASGV-CNU-P	FAM-ARVTTCTGACGGTTCTCCCCCTGAA-BHQ	
RT-PCR	ASGV CP	5641-5664	714	ASGV-F	ATGAGTTTGGAAAGACGTGCTTCAA	Shim et al., 2004
	ASGV CP	6329-6354		ASGV-R	CTAACCTCCAGTTCCAAGTTACT	

<표 35. ASGV RT-qPCR과 디지털 PCR 사용 프라이머 및 프로브>

○ Digital PCR 반응을 진행하기 전, 제작한 primer와 probe의 민감도와 특이성 확인을 위해 qPCR 반응을 진행하였음. 반응액 조성은 ASGV에 감염된 시료의 total RNA 2 ul, forward primer, reverse primer 각각 1 ul, probe 0.5 ul, mixture (SolGent), DEPC 넣어 총 25 ul의 반응액으로 조성함. 반응 시간은 50 °C 30분, 95°C 15분, 40 cycles (95°C 20초, 61°C 40초, 72°C 30초) 반응하였음. Standard curve는 ASGV transcripts를 활용하여 반응하였음 (그림 64). 그 결과 -3.244의 기울기와  $R^2 = 0.992$ 를 나타내었음. 이후 민감도는 기존 RT-PCR 기법과 비교하였는데, 약 10배정도 더 민감한 결과를 나타내었음 (그림 65).

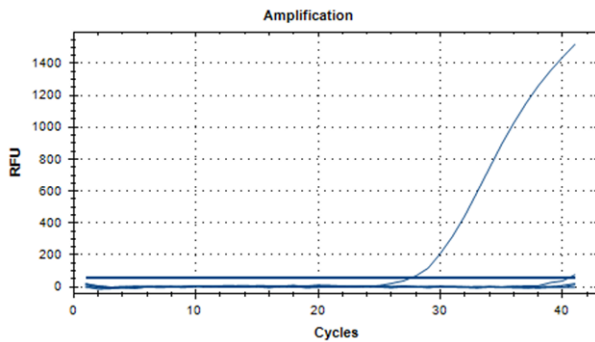


<그림 64. RT-qPCR standard curve>



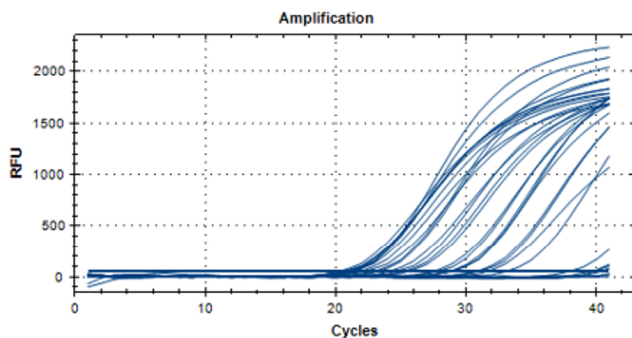
<그림 65. ASGV 민감도 분석>

○ 이후 특이성 테스트와 실제 채집한 여러 배 샘플에서 반응을 진행하였음. 특이성 테스트 결과 ASGV가 감염된 샘플에서는 증폭이 되었지만, ACLSV, ASPV가 감염된 샘플과, 건강한 샘플, NTC에서는 반응이 일어나지 않았음 (그림 66). 우리나라 5지역에서 채집한 배 앞에서 filed 테스트를 진행한 결과 5지역 모두 감염샘플에서 잘 검출이 되는 것을 확인하였음 (그림 67). 추가로 ASGV에 감염된 사과 샘플에서도 검출이 잘 되는 것을 확인하였음 (그림 68).



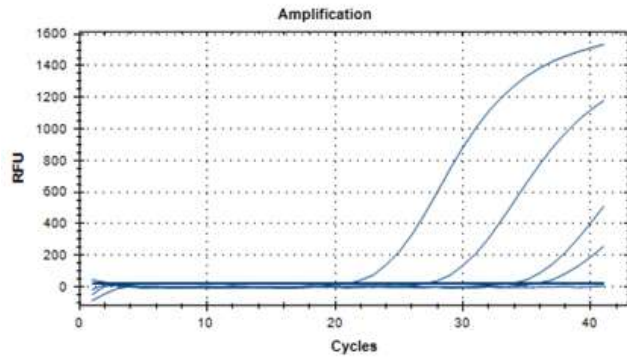
Sample	Cq
ASGV infected sample (RNA)	27.71
ACLSV infected sample (RNA)	N/A
ASPV infected sample (RNA)	N/A
Virus-free sample (RNA)	N/A
NTC	N/A

<그림 66. ASGV 프로브 특이성 분석>



Sample	Cq
Sangju 5 samples	Detected
Chonan 5 samples	Detected
Naju 5 samples	Detected
Ulsan 5 samples	Detected
Namyangju 5 samples	Detected
Positive sample	27.71
Negative 7 sample	N/A
NTC	N/A

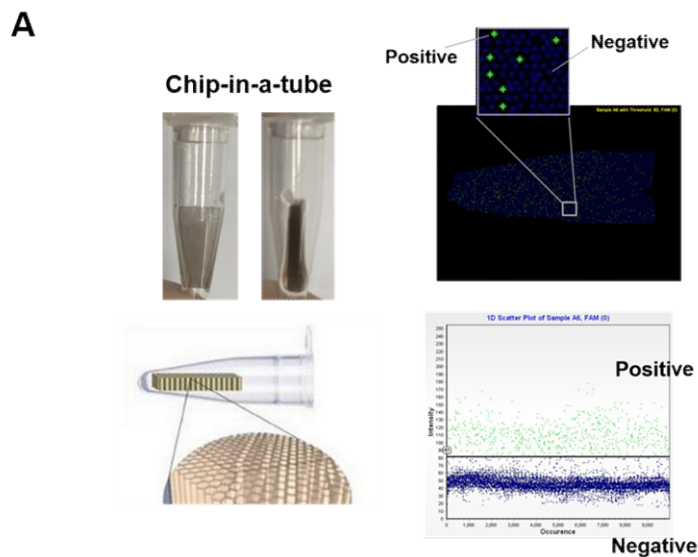
<그림 67. ASGV 프로브를 이용한 Field test>



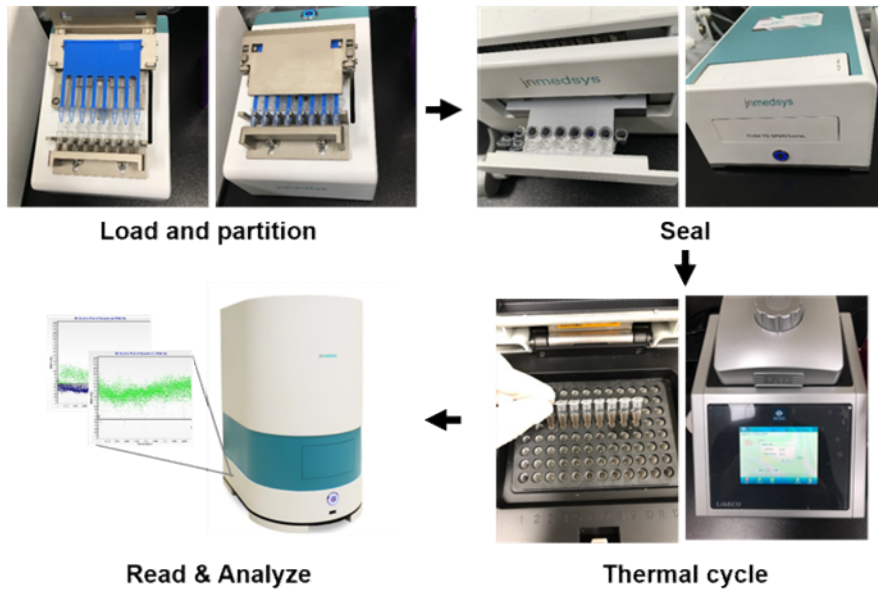
Sample	Cq
Apple 1	27.02
Apple 2	33.49
Apple 3	35.54
Positive	21.04
NTC	N/A

<그림 68. 사과 ASGV 시료 프로브 반응 결과>

○ Digital PCR은 크게 두가지 방식으로 나뉘는데, droplet-based partitioning 방식과 chip-based partitioning 방식으로 나뉜다. 이 중 droplet-based 방식은 검출결과 분석단계에서 product가 버려지기 때문에 product를 재확인이 어렵다는 단점이 있음. 그러나 chip-based 방식은 분석 후에도 product를 회수할 수 있고, 시퀀스 분석을 통해 재확인이 가능함. 따라서 ASGV의 초민감 검출을 위하여 chip-based 방식을 사용하였음 (그림 69).

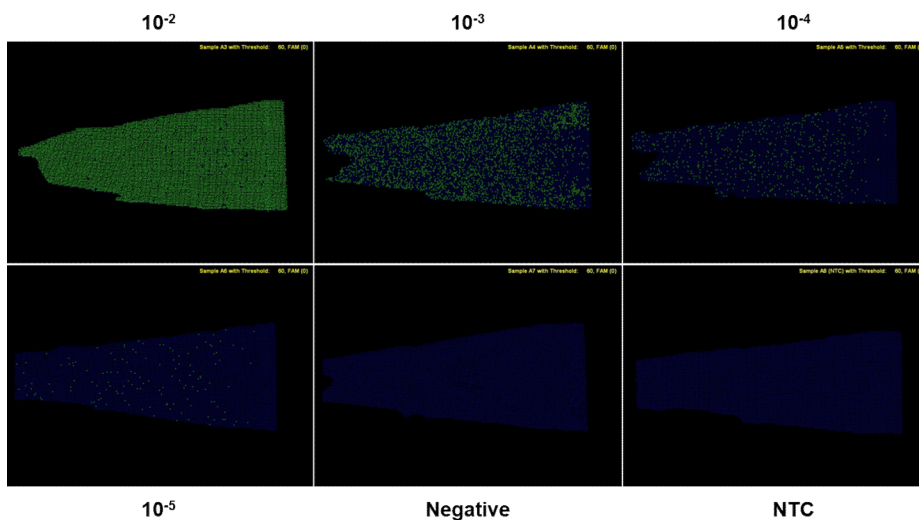


**B**



<그림 69. Chip-in-a-tube 기반 digital PCR>

○ Real-time PCR (RT-qPCR)을 활용해 특이성과 field test를 통해 사용 가능성을 확인한 primer와 probe를 digital PCR에 적용하였음. ASGV에 감염된 시료에서 RNA를 추출하고 reverse-transcription 반응을 진행하여 cDNA를 합성하였음. 이후 serial dilution을 하여 qPCR과 dPCR 반응을 진행하였음. 반응액은 2 x iTaq™ universal probe reation mix(BioRad), 20 x JN solution (JN medsys), 10-30 ng의 cDNA, 250 nM의 각 primer와 175 nM Probe를 총 15 ul로 조성하였음. 반응 시간은 95℃ 5분, 40 cycles (95℃ 50초, 56℃ 90 초), 72℃ 5분동안 Clarity™를 사용하여 반응하였음. 그 결과 negative와 NTC에서는 반응이 일어나지 않았고, ASGV에 감염된 시료에서만 반응되었음 (그림 70). 또한 qPCR과 비교결과 10배정도 민감한 결과를 나타내었으며, 바로 정량이 가능하다는 장점이 있었음 (표 12).



<그림 70. ASGV-CP Position plot>

Sample	RT-qPCR	RT-dPCR	
	Detection	Detection	DNA copies/ul (mean±SE <sup>a</sup> )
10 <sup>-0</sup>	+	+	18799.43±835.07
10 <sup>-1</sup>	+	+	18115.25±1489.8
10 <sup>-2</sup>	+	+	16618±923.05
10 <sup>-3</sup>	+	+	3464.25±261.7
10 <sup>-4</sup>	+	+	268.1±8.1
10 <sup>-5</sup>	-	+	24.25±1.75
Healthy control	-	-	-
NTC	-	-	-

<sup>a</sup>Average number of copies per microliter and standard error

<표 36. ASGV 검출을 위한 RT-qPCR과 RT-dPCR 민감도 비교>

## [배 바이러스 신속진단기법 매뉴얼]

### 가. 배 시료에서 핵산 추출

○ IQeasy™ Plus Plant RNA Extraction Mini Kit (iNtRON Biotechnology, Inc.) 제품의 'Protocol A : Plant Leaf and Seed'를 따름.

1. 1.5ml tube에 **25~100mg** 정도의 시료를 넣음. (액체질소를 사용하여 1.5ml tube를 미리 얼려 줘서 시료의 온도를 낮게 유지해주는 것이 중요함.)
2. 시료가 담긴 1.5ml tube에 **450ul의 Buffer RLE**와 **4.5ul의  $\beta$ -mercaptoethanol** (따로 구매)를 분주 후, vortex 해줌.
3. **Sieve Spin Column** 에 vortex 해준 액체를 옮겨주고, 13,000rpm에서 1분 동안 원심분리를 해줌.
4. 원심분리 후, 아래로 떨어진 액체를 **gDNA Remover Spin Column**에 분주 후에 13,000rpm에서 1분 동안 원심분리를 해줌.
5. 원심분리 후, 아래로 떨어진 액체와 **300ul의 Buffer RB**를 pipetting 한 후에 **Binding Column**에 분주 후에 13,000rpm에서 1분 동안 원심분리를 해줌.
6. 원심분리 후, 아래로 떨어진 액체는 버리고 다시 binding column를 끼운 후에 **600ul의 Buffer RW1**를 분주한 후에 13,000rpm에서 30초 동안 원심분리를 해줌.
7. 원심분리 후, 아래로 떨어진 액체는 버리고 다시 binding column를 끼운 후에 **800ul의 Buffer RW2**를 분주한 후에 13,000rpm에서 30초 동안 원심분리를 해줌.
8. 원심분리 후, 아래로 떨어진 액체는 버리고 다시 binding column를 끼운 후에 13,000rpm에서 1분 동안 원심분리를 해줌.
9. 원심분리 후, 새로운 1.5ml tube에 binding column를 끼운 후에 **30~50ul의 DEPC water** (또는 Buffer RE)를 분주 후에 상온에서 1분 동안 기다림.
10. 1분 후에 13,000rpm에서 1분 동안 원심분리를 해줌.
11. column를 제거 후 -20℃에서 보관함.

## 나. RT-RPA를 이용한 ASGV와 ASPV 검출 매뉴얼

○ TwistAmp Basic kit 제품의 Protocol를 따름.

1. Kit에 제공되는 0.2ml PCR tube에 RNA 2.5ul, DEPC 8.5ul, 5pmol의 primer Forward와 Reverse를 각각 2.4ul, primer free rehydration buffer를 29.5ul, RNase inhibitor 1.2ul와 M-MLV RTase 1ul를 넣고 vortex한 후 2.5ul의 280mM Magnesium Acetate (MgOAc)를 넣고 vortex 해줌.
2. Vortex 후 spindown한 0.2ml tube를 42℃ waterbath에서 5분간 incubation 하고 꺼낸 후, 다시 inverting하여 잘 섞어주고 spin down 한 후 42℃ waterbath에서 5분간 incubation 함.
3. 반응 후에 3%의 agarose gel에서 30분간 전기영동 하여 결과를 확인함.

Target virus	Primer pair	Sequence 5'-3'	Product size (nt)
ASPV	ASPV1F	TCAATGGAGGGTACCCAGGCTGTTAATTTT	146
	ASPV1R	TCAACTTTACTAAAAAGCATAAGTACTGAA	
ASGV	ASGV1F	GTAGGAGTGTATCTCTGGAAGACTCACATAGACCC	143
	ASGV1R	AAATATTTACAATAGTGATTGCAGAGAAGAAGGTA	

< RT-RPA primer 목록 >

#### 다. RT-RPA를 이용한 ACLSV 검출 매뉴얼

○ TwistAmp Basic kit 제품의 Protocol를 따름.

1. Kit에 제공되는 0.2ml PCR tube에 RNA 2.5ul, DEPC 8.5ul, 5pmol의 primer Forward와 Reverse를 각각 2.4ul, primer free rehydration buffer를 29.5ul, RNase inhibitor 1.2ul와 M-MLV RTase 1ul를 넣고 vortex한 후 2.5ul의 280mM Magnesium Acetate (MgOAc)를 넣고 vortex 해줌.
2. Vortex 후 spindown한 0.2ml tube를 42°C waterbath에서 5분간 incubation 하고 꺼낸 후, 다시 inverting하여 잘 섞어주고 spin down 한 후 42°C waterbath에서 5분간 incubation 함.
3. 반응 후에 3%의 agarose gel에서 30분간 전기영동 하여 결과를 확인함.

Primer sets	Primer type	Sequence 5'-3'	bp	Amplicon size
ACLSV_MP1	F	GATGAGAAAATTGAACATCAAGGATTATCAAC	32	307 bp
	R	TATGTTCGCGAAGATGGCCTCCAGTGTCTG	30	
ACLSV_MP2	F	GATGAGAAAATTGAACATCAAGGATTATCAAC	32	467 bp
	R	TGTTGTTTATATTCGGGTCCGAAGATGTAG	30	
ACLSV_MP3	F	CTTCAGAAGGGTCATCCGTGGATAACATATCT	32	370 bp
	R	TGTTGTTTATATTCGGGTCCGAAGATGTAG	30	
ACLSV_MP4	F	CTTCAGAAGGGTCATCCGTGGATAACATATCT	32	210 bp
	R	TATGTTCGCGAAGATGGCCTCCAGTGTCTG	30	
ACLSV_MP5	F	TGGACGCAGATCTGAAAGTGTTCTGGCCG	30	104 bp
	R	TATGTTCGCGAAGATGGCCTCCAGTGTCTG	30	
ACLSV_MP6	F	TGGACGCAGATCTGAAAGTGTTCTGGCCG	30	264 bp
	R	TGTTGTTTATATTCGGGTCCGAAGATGTAG	30	
ACLSV_MP7	F	TTCATGGAAAGACAGGGGCAATACTGGAAC	30	219 bp
	R	TGTTGTTTATATTCGGGTCCGAAGATGTAG	30	
ACLSV_CP1	F	TTCATGGAAAGACAGGGGCAATTCTGGAAC	30	214 bp
	R	TTTATATTCGGATCCGAAGATGTAGTCTTG	30	
ACLSV_CP2	F	GACACTGGAGTCCATCTTCGCGAACATAGC	30	183 bp
	R	TTTATATTCGGATCCGAAGATGTAGTCTTG	30	

< RT-RPA primer 목록 >



## 라. RT-LAMP를 이용한 ASGV 검출 매뉴얼

1. PCR tube에 2.5ul의 10X LAMP buffer, 6ul의 dNTP(10mM), 5ul의 betaine, 4ul의 RT-LAMP primer-1 [F3(10pmol), B3(10pmol), FIP(40pmol), BIP(40pmol)], 1ul의 *bst* polymerase, 0.5ul의 AMV RTase, 4ul의 DEPC water를 넣어줌.
1. RNA 추출물을 2ul 분주한 후 총량 25ul에 맞추고 vortex하여 잘 혼합함.  
\* RNA 농도에 따라 DEPC water와 RNA의 양이 달라질 수 있음.  
\* AMV RTase와 같은 높은 온도에서 활성이 가능한 RTase를 별도로 구매해야함.
7. vortex 후 spindown한 PCR tube를 63°C waterbath에서 60분간 incubation함.
8. 반응 후에 100X SYBR Green I를 10ul 분주한 후 vortex하여 잘 혼합함.
9. UV를 통해 형광을 관찰하거나 육안으로 색 변화를 확인하여 검출 결과를 확인함. 또는 2% agarose gel에서 30분간 전기영동하여 결과를 확인함.

Primer sets	Primer type	Sequence 5'-3'	Length	Target position <sup>a</sup>
ASGV1	F3	TTGGAAGACGCATATAGATCC	21 bp	57-77
	B3	TTCAGTTTCCCCTTCCTTC	19 bp	285-303
	FIP (F1c-F2)	AGCTCTTTGCCTTCAAAGCTTTCTTTTG AACTTCTGACGGTTCCTC	46 bp	127-149 85-103
	BIP (B1c-B2)	TTGGTAATATTGCTGTTTTCGGGTTTT AATGAACCGGAGGGGTAT	46 bp	188-211 248-265
	F3	CACTTCTAGGCAGAACTCTT	20 bp	402-421
ASGV2	B3	GATCACCTGTTTTTCATCAGG	21 bp	604-624
	FIP (F1c-F2)	ACCACCTTTCATGAAGAACTCATTTT ACATTCAGAAAGCTTTGTGAG	48 bp	474-496 433-453
	BIP	ACATCTATAAGAAATGGCCCAAAGCTT	50 bp	515-539
	(B1c-B2)	TTAACGATTCATTTTTAGACCGG		578-599

<sup>a</sup> Relative to the reference sequence (GenBank Accession No. MG682506)

<RT-LAMP primer 목록>

**바. RT-LAMP를 이용한 ACLSV 검출 매뉴얼**

1. PCR tube에 2.5ul의 10X LAMP buffer, 6ul의 dNTP(10mM), 5ul의 betaine, 4ul의 RT-LAMP primer-4 [F3(10pmol), B3(10pmol), FIP(40pmol), BIP(40pmol)], 1ul의 *bst* polymerase, 0.5ul의 AMV RTase, 4ul의 DEPC water를 넣어줌.
2. RNA 추출물을 2ul 분주한 후 총량 25ul에 맞추고 vortex하여 잘 혼합함.  
\* RNA 농도에 따라 DEPC water와 RNA의 양이 달라질 수 있음.  
\* AMV RTase와 같은 높은 온도에서 활성이 가능한 RTase를 별도로 구매해야 함.
3. vortex 후 spin down한 PCR tube를 63°C water bath에서 30분간 incubation함.
4. 반응 후에 100X SYBR Green I를 10ul 분주한 후 vortex하여 잘 혼합함.
5. UV를 통해 형광을 관찰하거나 육안으로 색 변화를 확인하여 검출 결과를 확인함. 또는 2% agarose gel에서 30분간 전기영동하여 결과를 확인함.

Primer sets	Primer type	Sequence 5'-3'	Length	Target position <sup>a</sup>
ACLSV1	F3	CGGAACAGACGGAGTTTCTG	20 bp	85-104
	B3	GTTCGTGAAAACCCCTTTGT	20 bp	295-314
	FIP (F1c-F2)	TGATGAGGTCCACCACCGACTTTTTGACAG TGGAGGTCAAGTCA	44 bp	166-186 110-128
	BIP (B1c-B2)	AACGGAATGACCTTTCGCCAGGTTTTGAC AAGCCCATTTCTCGCT	46 bp	222-243 266-285
ACLSV2	F3	CGGAGTTTCTGGACATGACA	20 bp	94-113
	B3	GTTCGTGAAAACCCCTTTGT	20 bp	295-314
	FIP (F1c-F2)	GGTCCACCACCGACTTCAGATTTTTTGTGG AGGTCAAGTCAATGG	45 bp	159-180 114-132
	BIP (B1c-B2)	AACGGAATGACCTTTCGCCAGGTTTTTTTA GCTTGACAAGCCCAT	46 bp	222-243 273-292
ACLSV3	F3	CCAGGTTTGTGAGGCCTTTG	20 bp	239-258
	B3	GACGCCGGTTCATATIGGTTA	21 bp	421-441
	FIP (F1c-F2)	GGCATGGTCGTAAAGAGGTTTCGTTTTGAG GCAAGAAACGGGTTGG	46 bp	309-331 264-282
	BIP (B1c-B2)	AGTGGGCAGTAAATACCCAGAGCTTTTCTT TTTGCTGAGCCTTGTTCA	48 bp	335-357 397-417
ACLSV4	F3	CTGGAACAGACACTGGAGTC	20 bp	33-52
	B3	ACCTGGCGAAAGGTCATT	18 bp	227-244
	FIP (F1c-F2)	TTGACCTCCACIGTCATGTCCATTTTAACAT AGCGATCCAGGGAAC	46 bp	103-124 63-82
	BIP (B1c-B2)	ACAATCTGAAGTCGGTGGTGGATTTTATGT TCGGATCCGAAGATGT	46 bp	157-178 201-220

<sup>a</sup> Relative to the reference sequence (GenBank Accession No. LC367336)  
<RT-LAMP primer 목록>

#### 사. RT-LAMP를 이용한 ASSVd 검출 매뉴얼

1. PCR tube에 2.5ul의 10X LAMP buffer, 6ul의 dNTP(10mM), 5ul의 betaine, 4ul의 RT-LAMP primer [F3(10pmol), B3(10pmol), FIP(40pmol), BIP(40pmol)], 1ul의 *bst* polymerase, 0.5ul의 AMV RTase, 4ul의 DEPC water를 넣어줌.
2. RNA 추출물을 2ul 분주한 후 총량 25ul에 맞추고 vortex하여 잘 혼합함.  
\* RNA 농도에 따라 DEPC water와 RNA의 양이 달라질 수 있음.  
\* AMV RTase와 같은 높은 온도에서 활성이 가능한 RTase를 별도로 구매해야 함.
3. vortex 후 spin down한 PCR tube를 63°C waterbath에서 30분간 incubation함.
4. 반응 후에 100X SYBR Green I를 10ul 분주한 후 vortex하여 잘 혼합함.
5. UV를 통해 형광을 관찰하거나 육안으로 색 변화를 확인하여 검출 결과를 확인함. 또는 2% agarose gel에서 30분간 전기영동하여 결과를 확인함.

Target	Primers	Sequence 5'-3'
ASSVd	F3	GCCGCTGCGTCAAAGA
	B3	GCTGCCAGCACTAACGCC
	FIP	ACCTACTCTTCGCGCCGCTTTTTCGTGAGAGAACAGGGGGCTA
	BIP	CGGACAGGGCCTCAACACCTTTTCTCGCACCAGTTCCGC

## ○ 과수 바이러스 피해현황 DB 구축 및 무병묘 이력 추적시스템 개발

### 1. 서론

국내 주요 5대 과종의 재배면적은 2020. 10월 기준(국가통계포털)으로 사과(31,598 ha, 21.4%), 배(9,091 ha, 6.2%), 복숭아(20,450 ha, 13.9%), 포도(10,582 ha, 7.2%), 감귤(16,160 ha, 11%), 기타(59,317 ha, 40%)로 전체 과수의 약 60%를 차지하고 있다. 감귤의 경우 사과, 배 다음으로 재배면적이 많으며 주요 재배지역으로는 제주지역이 96.9%(2019년 기준)로 대부분을 차지하며 전남, 경남 진주 등에서 일부 재배되고 있는 추세이다. 국내 과수 바이러스에 의한 피해 현황은 사과(47.6%), 배(29), 포도(47.3), 복숭아(65), 감(30), 감귤(25.4) 보고되어져 있다('09~'13, 원예원). 과수 바이러스 감염 시 생산량 감소, 생육불량, 결실지연, 과일 착색 불량, 기형과 발생 및 과일 당·산도 저하 등 과수 전체의 생육에 지장을 초래한다고 보고되어져 있다.

국내 5대 과종의 대상 바이러스·바이로이드는 사과는 바이러스 4종 ACLSV(*Apple chlorotic leaf spot virus*), ASPV(*Apple stem pitting virus*), ASGV(*Apple stem grooving virus*), ApMV(*Apple mosaic virus*)와 바이로이드 1종 ASSVd(*Apple scar skin viroid*), 배는 바이러스 2종 ACLSV(*Apple chlorotic leaf spot virus*), ASGV(*Apple stem grooving virus*)과 바이로이드 1종 ASSVd(*Apple scar skin viroid*), 복숭아는 바이러스 1종 ACLSV(*Apple chlorotic leaf spot virus*), 바이로이드 1종 HSVd(*Hop Stunt Viroid*), 포도는 바이러스 3종 GFkV(*Grapevine fleck virus*), GFkV-1(*Grapevine leafroll-associated virus-1*), GFkV-3(*Grapevine leafroll-associated virus-3*), 감귤은 바이러스 4종 CTV(*Citrus tristeza virus*), CiMV(*Citrus mosaic sadwasvirus*), SDV(*Satsuma dwarf virus*), CTLV(*Citrus tatter leaf virus*) 등이 특정병으로 지정되어 있다(종자관리요강).

과수 선진국인 네덜란드, 이태리, 미국 등은 국내 대상 바이러스·바이로이드 뿐만 아니라 추가적으로 과수에 피해를 주는 바이러스·바이로이드를 지정하여 관리하고 있다.

국내 과수 묘목 유통 체계는 일부 업체를 제외하고는 이력관리가 제대로 이루어지지 않고 있다. 과수 바이러스의 특성상 묘목에 감염이 되었어도 단시간 내에 증상이 나타나기 어렵고 실제 재배농가에 몇 년을 재배한 후 문제가 발생할 확률이 높기 때문에 무병묘를 공급하는 것이 가장 좋은 방법일 것이다.

본 연구과제에서는 첫 번째로 과수에 피해를 주는 바이러스의 종류에 대해 알아보고 현재 보고되어져 있는 바이러스뿐만 아니라 본 연구를 통해 알아낸 바이러스들에 대한 데이터베이스 구축 및 진단법을 개발하는 것이다. 두 번째로는 대부분의 과수 바이러스들이 접목을 통해 전염되기 때문에 재배농가에서 피해가 발생하였을 때 어느 묘목에서 유래되었는지를 추적할 수 있는 이력 체계를 마련하는 것이다.

### 2. 감귤 바이러스 의심시료 수집 및 실태 조사

#### 가. 재료 및 방법

##### 1) 국내에 보고되어져 있는 감귤 바이러스·바이로이드 종류 조사

기존에 국내에 보고되어 있는 감귤 바이러스·바이로이드의 종류와 진단 프라이머를 조사하

였다. 국내에 보고되어져 있는 감귤 바이러스는 4종으로 SDV(Satusma dwarf virus), CiMV(Citrus mosaic virus), CTV(Citrus tristeza virus), CTLV(Citrus tatter leaf virus) (원예원, 2013)등 이 있으며 바이로이드의 경우는 7종으로 CEVd(Citrus exocortis viroid), CBLVd(Citrus bent leaf viroid), HSVd(Citrus bent leaf viroid), CVd-III(Citrus III viroid), CVd-IV(Citrus IV viroid), CVd-OS(Citrus OS viroid), CVd-I-LSS(Citrus I LSS viroid) (Ito et al., 2001)에 의해 보고 되어져 있으며 현재 국내에는 6개가 보고 되어져 있다.

## 2) 감귤 주산지 바이러스·바이로이드 의심 시료 수집

시료 수집 지역은 국내에 감귤 주산지로 잘 알려져 있는 제주도 서귀포일대(강정동, 남원읍), 전라도(영암) 일대를 2년(2017~2018년)에 걸쳐 조사하였다. 실험에 사용된 감귤 잎은 바이러스 감염 증상이 나타나기 시작한 시점인 7월과 9월 각각 2차에 걸쳐서 잎 기형(malformation), 황화(yellowing), 황백화(chlorosis) 증상을 보이는 시료를 각각 채집하였다. 1차년도에 각각 1, 2차에 걸쳐서 바이러스 유사증상을 보이는 총 77점을 수집하였고 그 중 상호 감염특성이 다르다고 생각되는 대표시료를 총 30점을 선발하였다(그림 1). 2차년도에는 유사한 증상을 보이는 시료를 제외한 총 19점의 시료를 선발하였다. 주요 감귤 품종은 조생종인 하례조생, 궁천조생, 한라봉, 레드향, 천혜향, 노지 밀감을 주로 수집하였다.



그림 1. 감귤 바이러스 감염에 따른 증상들(제주)

### 3) 감귤 주산지 유통묘목 시료 수집

감귤의 주산지인 제주도, 전라도, 경상도에서 유통되고 있는 감귤 묘목을 구입하여 묘목에 감염되어 있는 바이러스 감염 실태를 조사하였다. 감귤 묘목 품종은 제주도 4품종(레드향, 한라봉, 황금향, 천혜향), 전라도 5품종(노지 감귤, 한라봉, 황금향, 천혜향, 레드향), 경상도 6품종(조생귤, 천혜향, 황금향, 한라봉, 레드향, 상보감)을 선정하였으며 각각 20주 내외씩 구입하여 잎 시료를 확보하였다(그림 2).

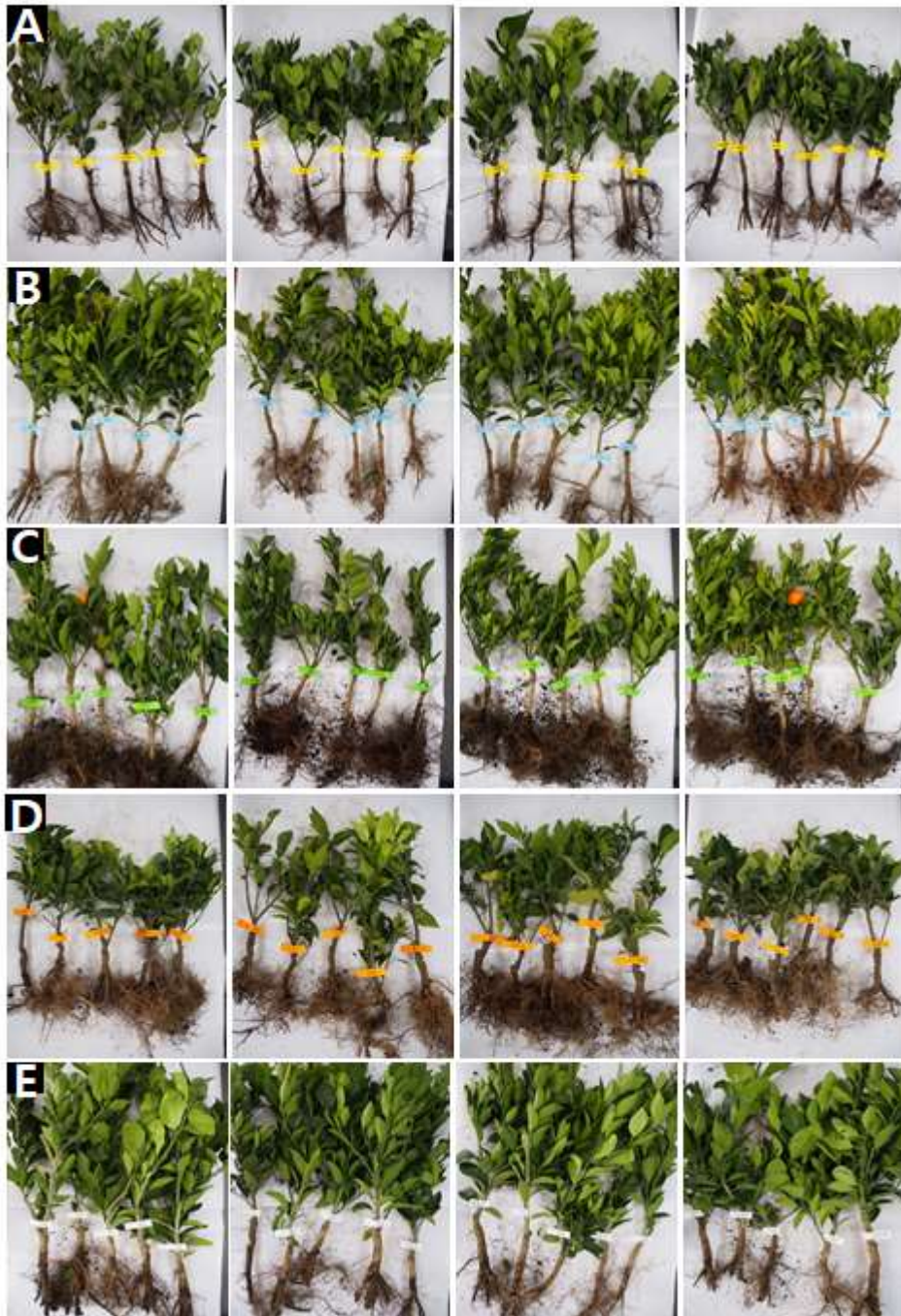


그림 2. 감귤 유통 주요 묘목들. A. 레드향, B. 한라봉, C. 천혜향, D. 황금향, E. 노지감귤

#### 4) 감귤 유통 과일 시료 수집

시중에 유통·판매되고 있는 일부 감귤 과일에 바이러스 감염 실태를 조사하기 위해 전라도 2품종(한라봉, 천혜향) 과일을 구매하였다(그림 3). 육안으로 일부 바이러스 감염이 의심되는 오갈, 모자이크, 위축 증상의 시료를 확보하였다.

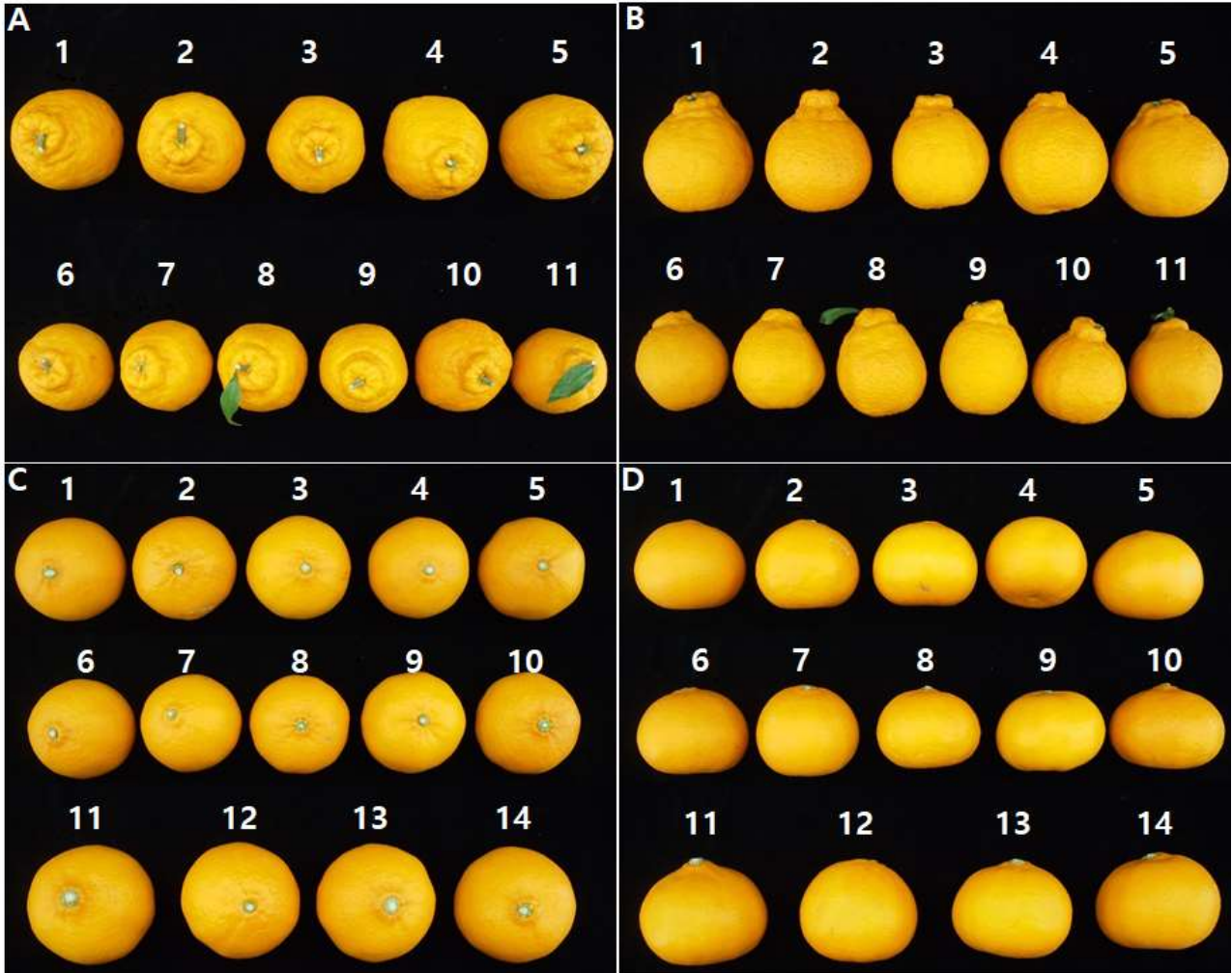


그림 3. 감귤 유통 과일들(전라도). A와 B. 한라봉, C와 D. 천혜향

#### 5) 감귤 바이러스 분석 및 진단을 위한 RNA 추출

##### ① 차세대염기서열분석(NGS)을 위한 RNA 추출

각 시료를 액체질소를 이용하여 곱게 마쇄한 후 초저온냉동고(-80℃)에 보관 후 자동핵산추출 장비(NucliSENS easyMAG, BioMerieux SA)이용하여 Total RNA를 추출에 사용하였다. 리보솜 RNA 제거, 이중가닥 cDNA 합성, 라이브러리 제작 및 시퀀싱은 테라젠이텍스(Theragenetex, Suwon)에 의뢰하였다.

##### ② RT-PCR 진단을 위한 RNA 추출

과일의 껍질 부분 및 잎 시료 전체를 마쇄하여 그림 4의 방법으로 Total RNA를 추출하였다. 차세대염기서열분석법(NGS)으로 분석된 바이러스들을 확인하기 위하여 제작되어진 진단용 프

라이머를 가지고 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR은 다음의 조건으로 50℃, 30분(1 cycle) → 95℃, 15분(1cycle) → 95℃, 20초 → 58℃, 30~60초 → 72℃, 60초(40 cycle) → 72℃, 5분(1cycle)으로 수행하였다.

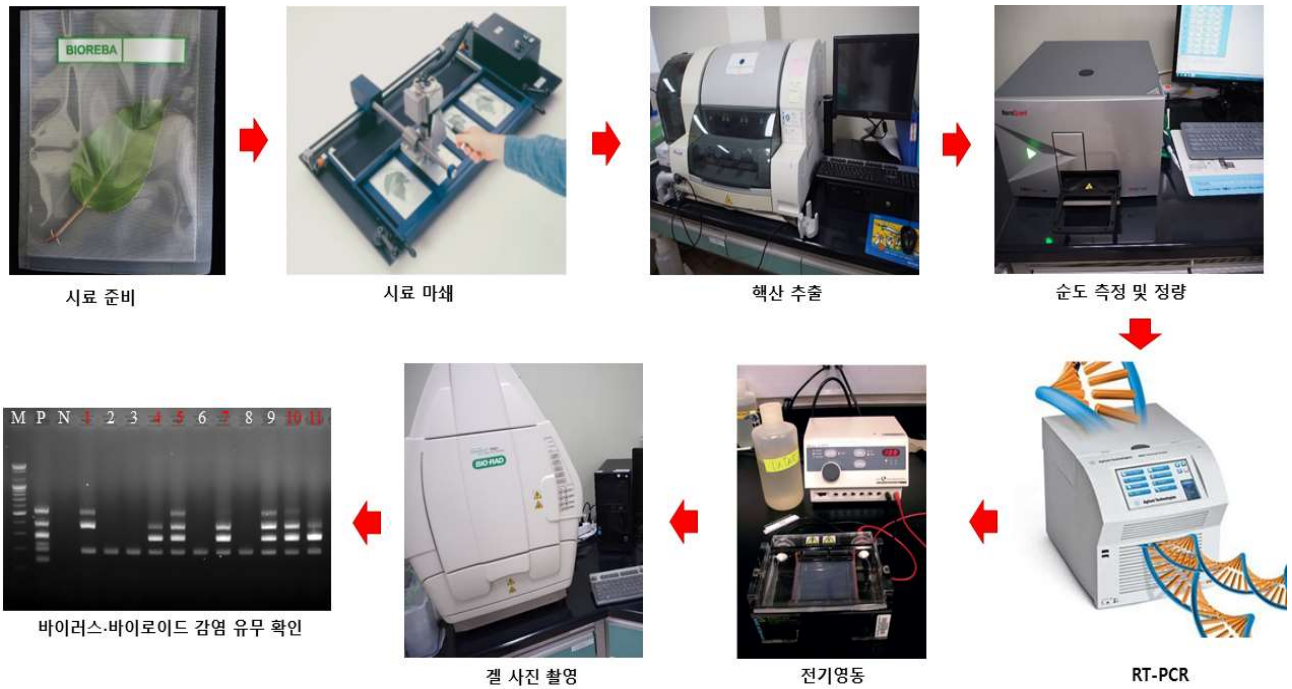


그림 4. 감귤 바이러스 진단 과정

## 나. 결과 및 고찰

### 1) 차세대염기서열분석(NGS)을 이용한 감귤 시료 분석

채집된 감귤 시료에서 바이러스 감염 여부를 확인하기 위하여 2017-2018년 2년에 걸쳐 채집한 시료 60점을 차세대염기서열(Next Generation Sequencing, NGS) 방법으로 분석하였다(표 1).

표 1. RNA-Sequencing Run information 정보 및 Sequencing 결과

Name of Sample	Citrus
Average Library Size (bp)	313
Average Library Insert Size (bp)	193
Kit Information	TruSeq Stranded Total RNA Kit with Ribo-Zero Plant
RNA-seq Platform	Illumina Hiseq 2500 platform 100bp Pair End
Statistics or Features	Data
Yield (Gbp)	30.45
Total bases (bp)	30,450,098,524
No. of raw reads	301,486,124
GC rate (%)	29.82
Bases rate more than Q30 (%)	91.67



RNA-sequencing 결과 전체 301,486,124 리드(reads)를 확보하였으며 이를 이용하여 드노보 합성 전사체 분석(de novo transcription analysis)을 실시하여 콘택(contig)를 제작하였다. RNA-sequencing 분석은 시크 제네시스(SeqGenesis, Daejeon)에 구축한 SG-de novo Assembler를 이용하여 mapping을 수행하였다. 전체 리드(raw reads) 중에서 필터링을 거쳐 일부 리드 제거를 수행한 후 297,922 개의 콘택을 생산하였다. 이 중에서 식물 바이러스 및 바이로이드 관련 콘택 1,741개를 최종적으로 확보한 뒤 NCBI nt database와 virus RNA 및 virus protein database를 대상으로 BLAST 서열 유사성 검색을 수행하였다. 콘택 e-value cut-off e-10을 기준으로 하나 이상의 subject sequence에 match하였다(표 2).

표 2. RNA-Sequencing raw reads assembly 결과

Summary	Data
Number of raw reads	301,486,124
Number of reads for assembly after initial filtering of plant mRNAs	184,523,040
Number of contigs assembled	297,922
Max length of contigs (bp)	37,899
Average length of contig (bp)	1,341.1
Total length of contigs (bp)	399,557,231

분석 결과, 6개 과의 바이러스(*Betaflexiviridae*, *Closteroviridae*, *Luteoviridae*, *Secoviridae*, *Tymoviridae*, *Retroviridae*)와 1과의 바이로이드(*Pospiviroidae*)를 확인하였다. 종 단위 분석 결과 10종의 바이러스와 3종의 바이로이드가 검출 되었다(표 3-4).

표 3. 차세대염기서열(RNA-Sequencing) 결과 분석된 바이러스와 바이로이드 목록

	Order	Family	Subfamily	Genus	Species
Virus	<i>Tymovirales</i>	<i>Betaflexiviridae</i>	<i>Trivirinae</i>	<i>Capillovirus</i>	<i>Apple stem grooving virus</i>
	<i>Tymovirales</i>	<i>Betaflexiviridae</i>	<i>Trivirinae</i>	<i>Citrivirus</i>	<i>Citrus leaf blotch virus</i>
	Unassigned	<i>Closteroviridae</i>	-	<i>Closterovirus</i>	<i>Citrus tristeza virus</i>
	Unassigned	<i>Luteoviridae</i>	-	<i>Enamovirus</i>	<i>Citrus vein enation virus</i>
	<i>Picornavirales</i>	<i>Secoviridae</i>	-	<i>Sadwavirus</i>	<i>Satsuma dwarf virus</i>
	<i>Tymovirales</i>	<i>Tymoviridae</i>	-	<i>Marafivirus</i>	<i>Grapevine asteroid mosaic associated virus</i>
	<i>Tymovirales</i>	<i>Tymoviridae</i>	-	<i>Marafivirus</i>	<i>Nectarine marafivirus M</i>
	<i>Tymovirales</i>	<i>Tymoviridae</i>	-	<i>Marafivirus</i>	<i>Olive latent virus 3</i>
	<i>Tymovirales</i>	<i>Tymoviridae</i>	-	<i>Tymovirus</i>	<i>Turnip yellow mosaic virus</i>
<i>Ortervirales</i>	<i>Retroviridae</i>	-	-	<i>Citrus endogenous pararetrovirus</i>	
Viroid	Unassigned	<i>Pospiviroidae</i>	-	<i>Apscaviroid</i>	<i>Citrus bent leaf viroid</i>
	Unassigned	<i>Pospiviroidae</i>	-	<i>Apscaviroid</i>	<i>Citrus dwarfing viroid</i>
	Unassigned	<i>Pospiviroidae</i>	-	<i>Hostuviroid</i>	<i>Hop stunt viroid</i>

표 4. 지도제작(mapping) 후 분석된 바이러스 종명 및 콘텍트 개수 목록

	Species	No. of Contig
Viroid	<i>Citrus bent leaf viroid</i>	3
	<i>Citrus dwarfing viroid</i>	1
	<i>Hop stunt viroid</i>	1
Virus	<i>Apple stem grooving virus</i>	9
	<i>Citrus endogenous pararetrovirus</i>	827
	<i>Citrus leaf blotch virus</i>	74
	<i>Citrus tristeza virus</i>	618
	<i>Citrus vein enation virus</i>	4
	<i>Grapevine asteroid mosaic associated virus</i>	5
	<i>Nectarine marafivirus M</i>	1
	<i>Olive latent virus 3</i>	1
	<i>Satsuma dwarf virus</i>	31
	<i>Turnip yellow mosaic virus</i>	1

바이러스의 경우 국내 미보고 2종(*Citrus leaf blotch virus*, *Citrus vein enation virus*)과 신종으로 추정되는 4종(*Grapevine asteroid mosaic associated virus*, *Nectarine marafivirus M*, *Olive latent virus 3*, *Turnip yellow mosaic virus*)를 확인하였다(그림 5-7).

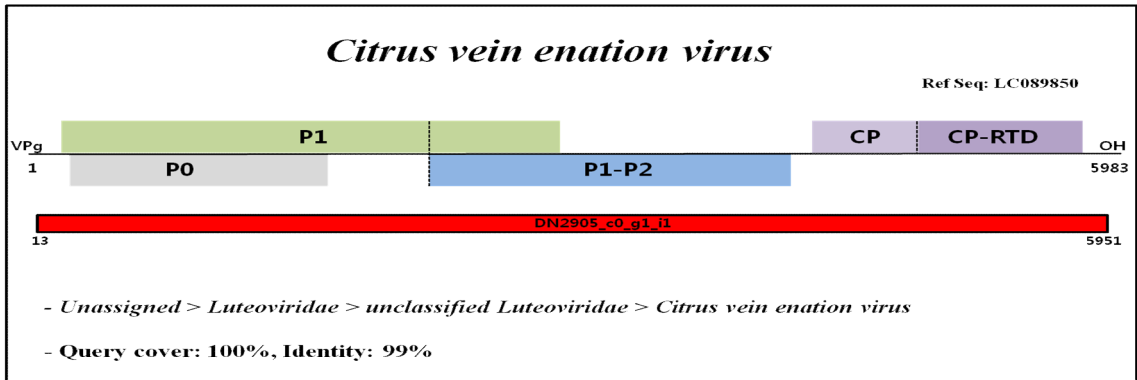
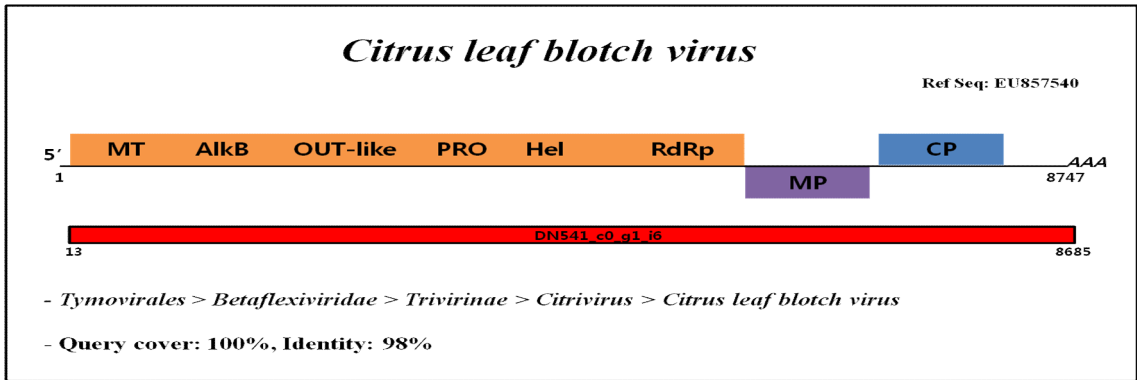
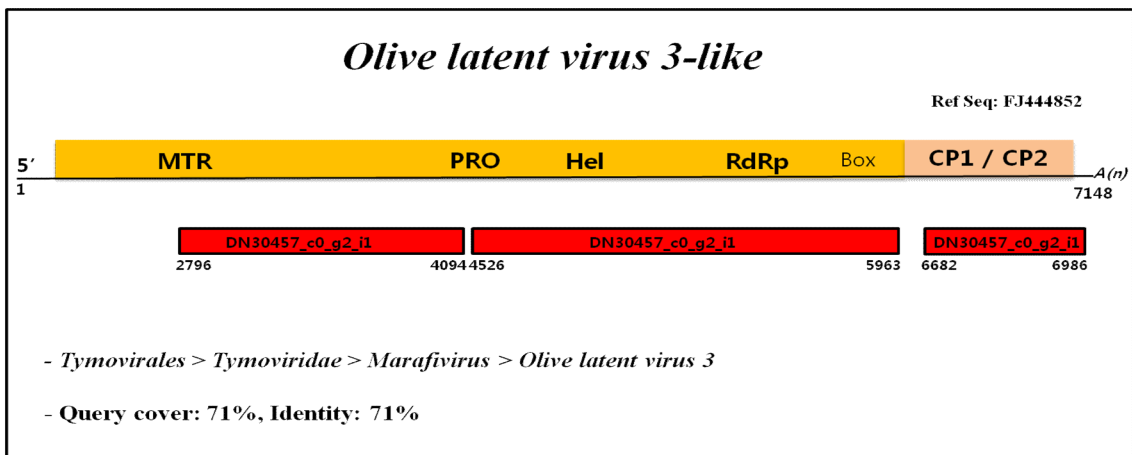
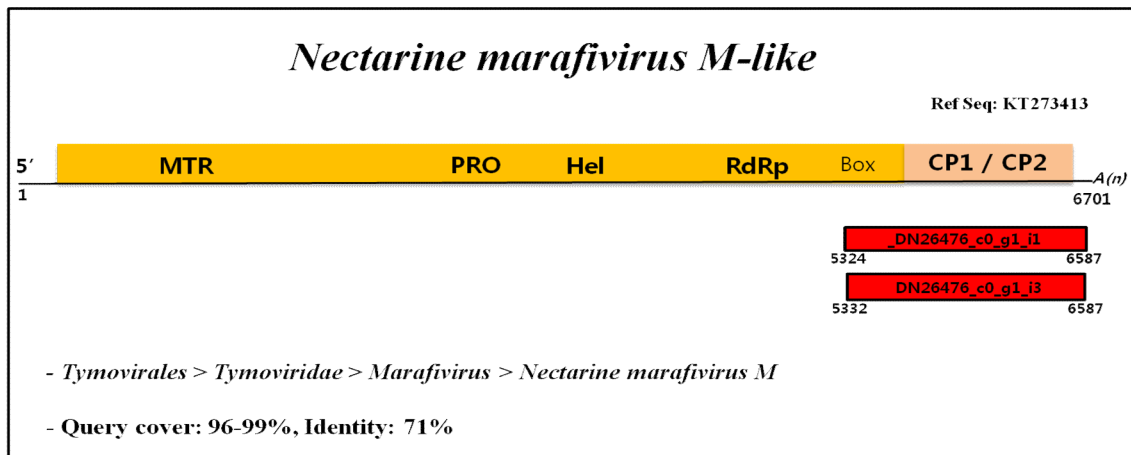


그림 5. 국내 감귤 미보고 바이러스 2종(*Citrus leaf blotch virus*, CLB; *Citrus vein enation virus*, CVEV) 검출 콘택 모식도. 빨간색: 콘택 위치.



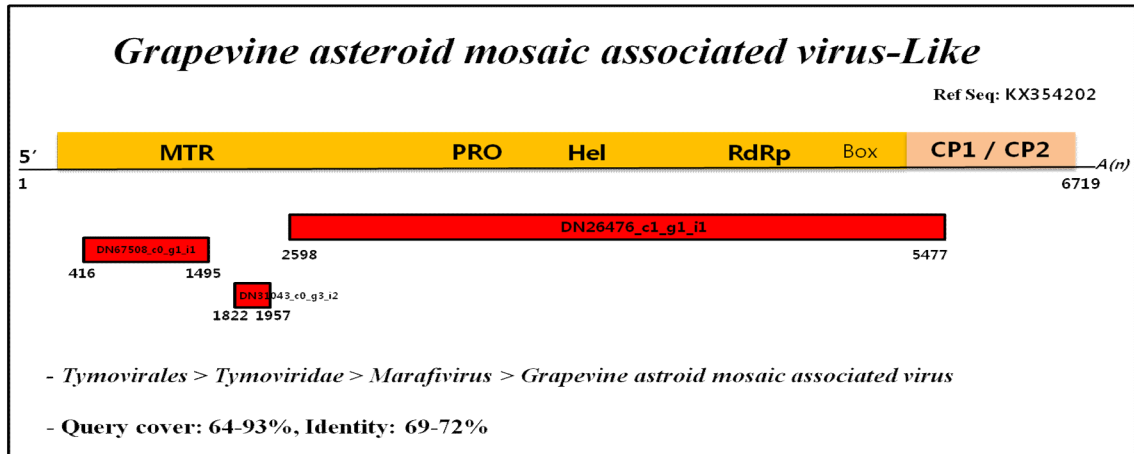


그림 6. 감귤시료에서 검출된 신종바이러스(Marafivirus genus)로 추정되는 바이러스 3종 콘택 모식도. 빨간색: 콘택 위치.

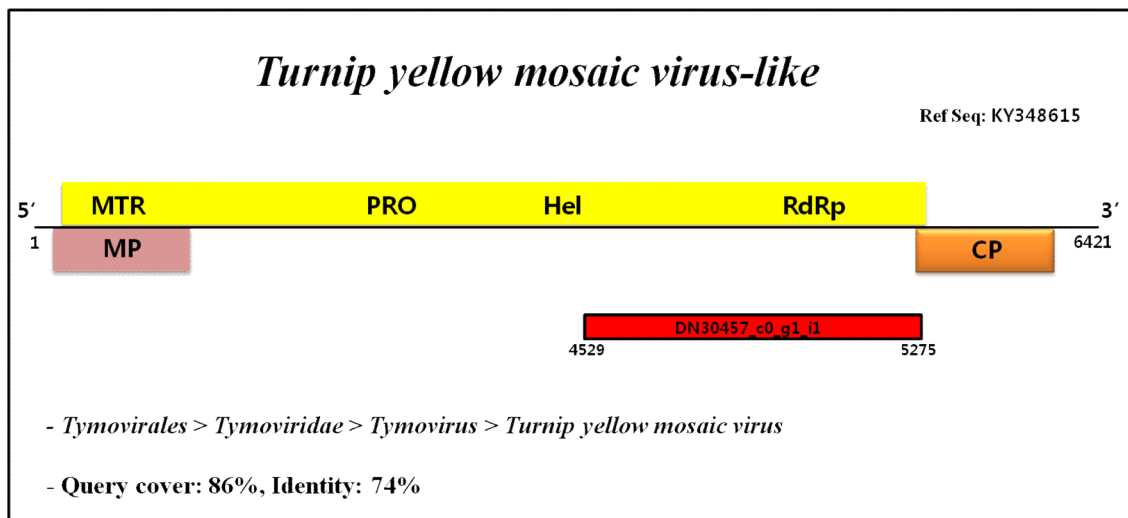


그림 7. 감귤 시료에서 검출된 신종바이러스(Tymovirus genus)로 추정되는 바이러스 1종 콘택 모식도. 빨간색: 콘택 위치.

## 2) 진단용 프라이머를 이용한 바이러스 동정 및 염기서열 등록

### ① *Citrus leaf blotch virus*(CLBV)

차세대염기서열 분석 결과와 증상을 바탕으로 국내에서 첫 확인된 *Citrus leaf blotch virus*(CLBV)를 확인 할 수 있는 진단용 프라이머를 제작하여 바이러스를 확인하였다(그림 8, 표 5).



그림 8. 감귤(제주) *Citrus leaf blotch virus*(CLBV) 증상

RT-PCR 진단을 수행한 결과 2017년 전남 일대에서 수집한 감귤 시료 7점과 2018년 제주도에서 채집한 시료 2점에서 양성 반응을 보였으며 이는 염기서열분석을 통해 최종적으로 바이러스를 동정하였다(그림 9).

표 5. 감귤 바이러스 진단에 사용된 프라이머 정보

Primer name	Oligonucleotide sequence (5' to 3')	Size (bp)
CLBV-F	GCAAGACACTCTGTCTCAAAT	213
CLBV-R	CCTTTTTGGAGTAGATACCTAT	
CTV-F	CCGACTAACGCCCTTCGAG	439
CTV-R	GCACTACCGTCTGCTATGATG	
CVEV-F	AATTACGGCGTATCTATGGTGAGTCG	391
CVEV-R	AATGAGATAGCCCGTTGTCCAG	
ASGV-F1	AAGTATAAAGGCAGGCATGTC	535
ASGV-R1	AAGTATAAAGGCAGGCATGTC	
CiMV-F	TCTCACTCAAGGAAGATATTCA	298
CiMV-R	TGAATCAATAATTTCAAAGGCTG	
Actin-F	TCCACCATGTTCCAGGTAT	210
Actin-R	CATCTCTGTCTGCCACCTGA	

(내재유전자)

추가적으로 국내에서 첫 보고된 CLBV 전남 시료와 제주 시료 각 1점씩을 이용하여 일부 유전자인 외피단백질(coat protein, CP), 이동 단백질(movement protein, MP)의 전체 게놈을 결정하고 유연관계분석을 수행하였다. 그 결과 CLBV 전남과 영암 분리주는 기 보고된 CLBV citrus 분리주들과 90% 이상의 높은 상동성을 보인 반면 *Actinidia starain*, *Prunus* strain과는 명확하게 구분이 되었다(그림 10). 위 결과를 바탕으로 국내에서 첫 확인된 CLBV 전남과 영암 분리주들은 NCBI GenBank에 염기서열을 등록하였다(외피단백질: LC416591, LC421489, 이동단백질: 416592, 421490).

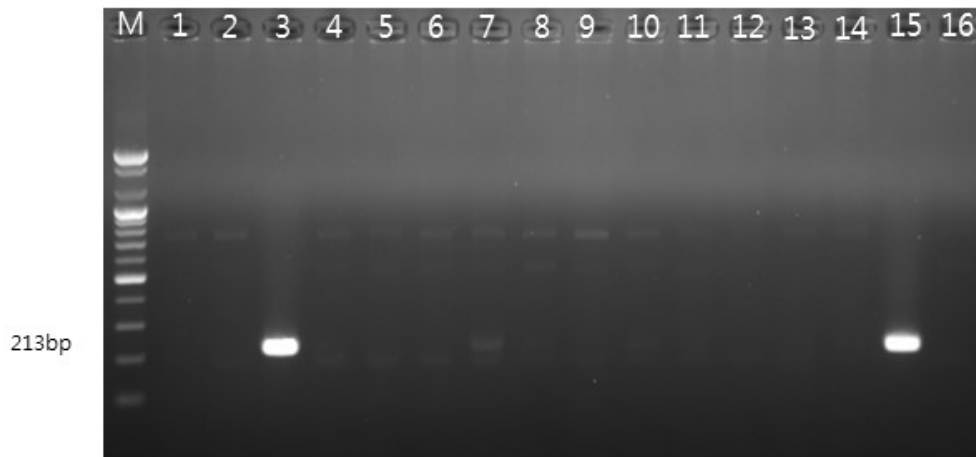


그림 9. 국내 감귤에서 검출된 *Citrus leaf blotch virus*(CLBV) RT-PCR 진단 결과. 감염 시료 3, 15번

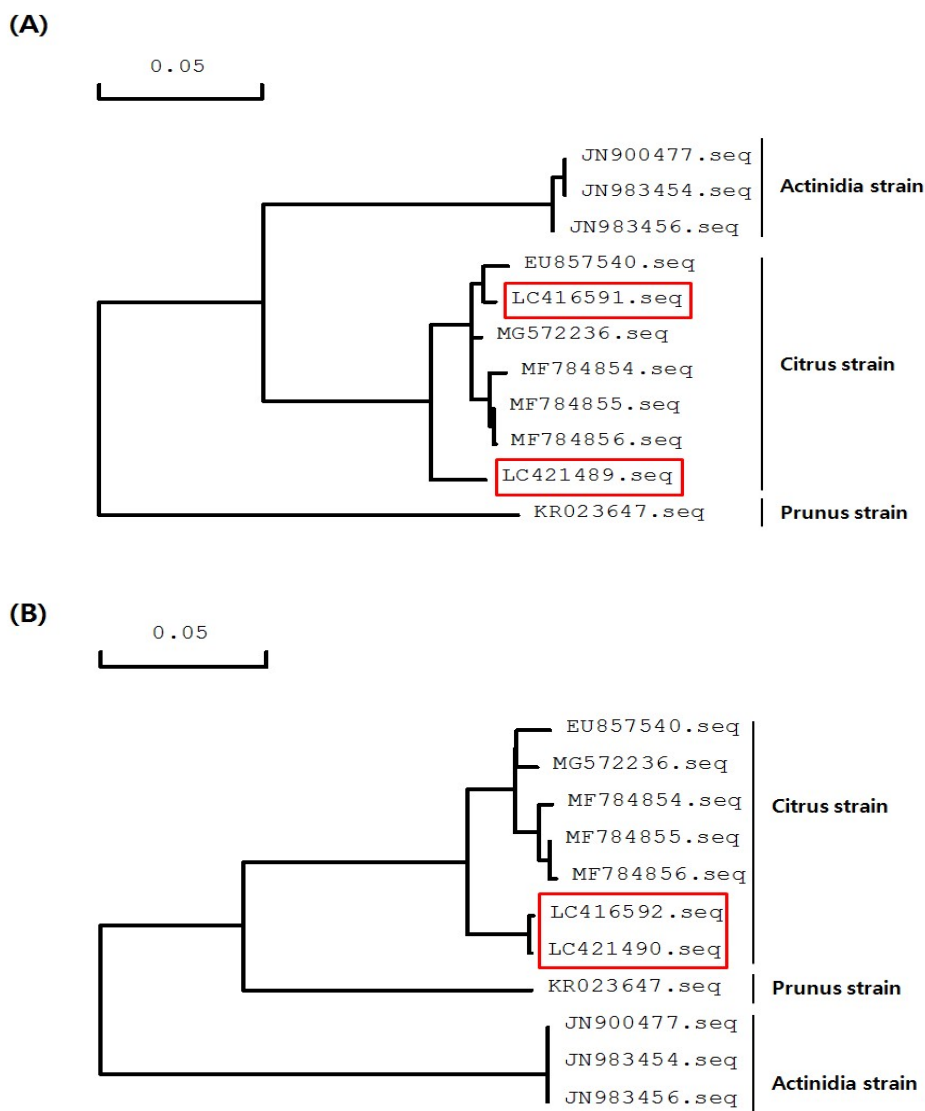


그림 10. 국내 감귤에서 검출된 *Citrus leaf blotch virus* (CLBV)와 기보고된 CLBV 분리주의 유연 관계 분석. (A) 외피단백질(CP), (B) 이동단백질.

## ② *Citrus vein enation virus* (CVEV)

*Citrus vein enation virus*(CVEV)는 제주 대천동 3점 시료(1,2,3)와 제주 위미리 시료에서는 11점 중 5점이 감염되어 있는 것을 확인하였다(그림 11). *Citrus tristeza virus*(CTV)의 경우 2차년도 채집 시료에서도 16점 중 10점에서 검출이 되었다. PCR 반응이 신뢰성을 위해 내재유전자인 actin을 이용하여 최종적으로 같이 확인하였다.

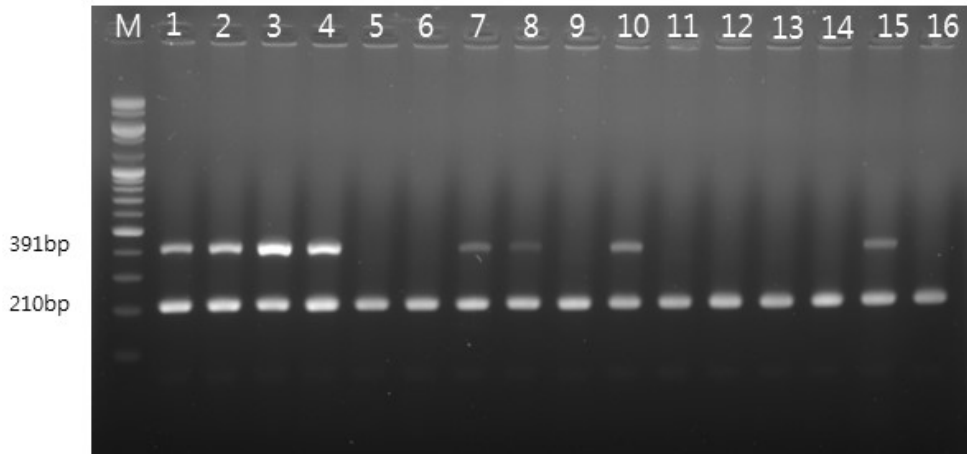


그림 11. 2018년 제주도 감귤 바이러스 의심 시료 CVEV RT-PCR 검출 결과. 감염시료 1, 2, 3, 4, 7, 8, 10, 15. CVEV(391 bp), 내재유전자(Actin) 210 bp.

### 3) 감귤 주산지 유통묘목 및 과일 시료 바이러스 감염률 조사

주요 감귤 주산지인 전라도(5품종), 경상도(6품종), 제주도(4품종)에서 유통·판매되고 있는 감귤 묘목과 과일의 바이러스 전체 감염률은 77.4%로 나타났으며 전라도 시료의 감염률은 100%, 경상도 52%, 제주도 98%로 조사되었다(표 6). 바이러스별 감염양상은 CTV 69.8%, CVEV 35%, CiMV 17.6%, CLB 38.9%로 나타났으며 ASGV는 검출되지 않았다(표 6).

각 시료별로 바이러스 감염 조합을 분석하여 본 결과 단독 감염률은 27.5%, 복합 감염률 중 2종 감염률은 27.5%, 3종은 10.2%, 4종은 12.2%, 총 복합(2종+3종+4종)은 49.9% 나타났으며 미검출률은 22.6%로 나타났다(표 7).

표 6. 묘목 및 과실의 바이러스 감염률

지역	품종명	시료	시료수	검출시료수	RT-PCR 진단결과				
					CTV	CVEV	CiMV	CLBV	ASGV
전라도	노지감귤	잎	40	40	20	40	0	13	0
	천혜향	잎	10	10	10	6	0	4	0
	천혜향	과일	14	14	14	0	1	1	0
	한라봉	잎	10	10	10	0	0	3	0
	한라봉	과일	11	11	11	2	0	0	0
	황금향	잎	20	20	20	0	6	16	0
	레드향	잎	20	20	20	20	18	16	0
경상도	감귤(조생귤)	잎	20	18	18	6	3	9	0
	천혜향	잎	40	5	0	5	0	0	0
	황금향	잎	20	20	20	0	0	12	0
	레드향	잎	40	27	25	25	23	23	0
	한라봉	잎	40	23	22	0	0	3	0
	상보감	잎	20	1	0	0	0	1	0
제주	천혜향	잎	20	19	19	9	0	17	0
	황금향	잎	20	20	20	2	0	16	0
	한라봉	잎	20	20	20	2	0	1	0
	레드향	잎	20	20	20	18	17	15	0
계			385	298	269	135	68	150	0
감염률(%)				77.4	69.8	35.0	17.6	38.9	0.0



표 7. 시료별 바이러스 감염양상

품종명	지역	전라도							경상도					제주도				계	
		노지 감귤 (원)	천혜향 (원)	천혜향 (과일)	한라봉 (원)	한라봉 (과일)	황금향 (원)	레드향 (원)	조생감귤 (원)	천혜향 (원)	황금향 (원)	레드향 (원)	한라봉 (원)	상보감 (원)	천혜향 (원)	황금향 (원)	한라봉 (원)		레드향 (원)
감염 조합		40	10	14	10	11	20	20	20	40	20	40	40	20	20	20	20	20	385
단독 감염	CTV		1	2	7	9	3		5	8		20		18		4	2	79	
	CVEV	18								5	2							25	
복합 감염	CiMV											1	1					2	
	CLBV																		
	ASGV																		
	CTV+	18	5			2		1	4		1			1				32	
	CVEV+				1										1			3	
	CTV+						1												
	CiMV			3	11	3		11	5	12		2					14	8	69
	CLBV																		
	CVEV+	2																	2
	CLBV																		
	CTV+																		
	CVEV+							3			1					4		8	
	CiMV																		
	CTV+																		
	CVEV+	2	1					1	1		1			1	3	2	9	21	
	CLBV																		
CTV+																			
CiMV+						5		2		2					1		10		
CLBV																			
CTV+																			
CVEV+								15	1		20				11		47		
CiMV+																			
CLBV																			
미검출								2	35	13	17	19					1	87	

\* CTV: *Citrus tristeza virus*, CVEV: *Citrus vein enation virus*, CLBV: *Citrus leaf blotch virus* CiMV: *Citrus mosaic virus*, ASGV: *Apple stem grooving virus*

\* 묘목년생: 2년생

### 3. 상위 단계 묘목의 바이러스 검정 이력관리 체계 구축

과수(사과·배·포도·복숭아·감귤) 상위 단계 묘목(원종, 모수)의 바이러스 검정 이력 추적 관리를 위해서는 이력 등록이 필요하고 이력번호를 부여받아야 한다.

(방안 1) 「종자검사요령」(고시) 보증표시의 분류번호를 이용하는 것으로 작물번호와 종류번호를 부여하고 원종은 계통별 주수가 많지 않아 각 기관이 관리하도록 한다. 과수 묘목의 소집단 번호는 최초 1회 부여하여 소집단 소멸 시까지 사용한다. 또한 모수 또는 보급종에 대해서는 직 상위단계의 번호를 함께 표기하여 이력 추적이 가능하도록 하였다.

표 8. 이력번호 생성방법

생산단계	원종	모수	보급종	예시
표시방법	작물류 번호- 작물종 번호- 기관번호- *작물번호: 과수(묘목) 18번 *종류번호: 사과(01), 배(02), 복숭아(03), 포도(04), 감귤(05)	작물류 번호- 작물종 번호- 생산자 지정번호- 모수일련번호- *생산자 지정번호 (업체별 고유번호)는 발급기관에서 부여	작물류 번호- 작물종 번호- 생산자 지정번호- 모수일련번호- 보급묘 생산년도- 소집단 일련번호- *소집단 일련번호는 업체에서 자체 부여	(18-01)110-018-20-001 과수-사과-서울농원-18계통 모수-20년 생산-첫번째 보급묘

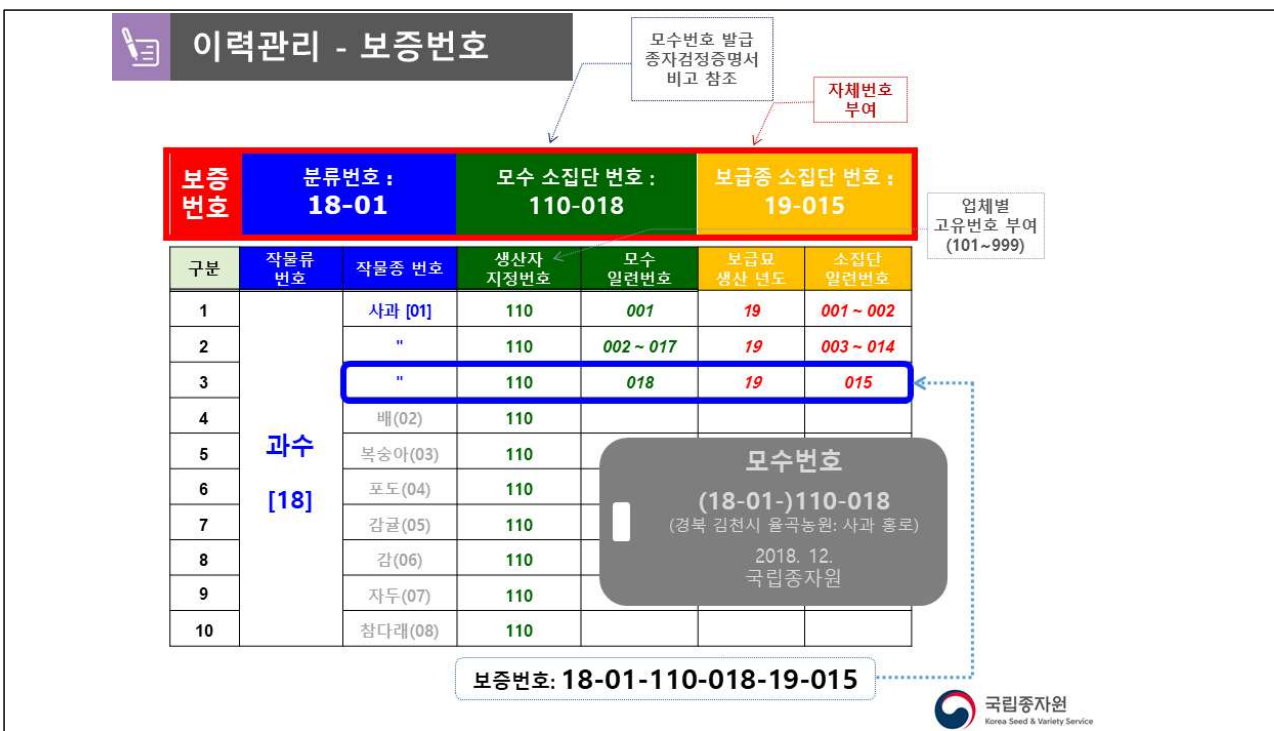


그림 12. 과수 묘목 이력관리 체계 및 모수번호(예)

#### 4. 과수 주요 바이러스별 검사 매뉴얼 구축

기관별 차세대염기서열분석(NGS) 결과, 해외사례 및 정책제안을 바탕으로 우선적으로 피해를 주는 바이러스 및 바이로이드를 선정하여 진단방법을 구축하였다. 기존 단일 진단법에서 동시다중진단을 할 수 있는 방법으로 개선하였다.

표 9. 사과·배 RT-PCR 프라이머 및 진단조건

과종	바이러스·바이로이드	염기서열(5'→3')	밴드 크기
사과, 배	ACLSV ( <i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> )	F: GCAGACCCCTTCATGGAAAGA R: CGCAAAGATCAGTCGTAACAGA	509 bp
사과	ASPV ( <i>Apple stem pitting virus</i> )	F: AAGCATGTCTGGAACCTCATG R: GATCAACTTTACTAAAAAGCATAAGT	367 bp
사과, 배	ASGV ( <i>Apple stem grooving virus</i> )	F: AATGAGTTTGGAAAGACGTGCTTC R: TGAACCGGAGGGGTATCAAATCC	264 bp
사과, 배	ASSVd ( <i>Apple scar skin viroid</i> )	F: ACGAAGGCCGGTGAGAAAAG R: CCGCTGCGTCAAAGAAAAG	202 bp
사과	APMV ( <i>Apple mosaic virus</i> )	F: CTCCAAACACAACCTTTGATGACTT R: GTAACCTCACTCGTTATCACGTACAA	123 bp
사과	ApNMV ( <i>Apple necrotic mosaic virus</i> )	F: CTTGCGTGCAATCGATATGG R: TCATCTCAACCTAGACATCC	650 bp
사과, 배	<i>nad5</i> (반응 대조구)	F: GATGCTTCTGGGGCTTCTTGTT R: CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA	181 bp

\* 사과·배 고유 유전자(*nad5*)를 증폭 대조구로 사용

\*\* 각각의 검정 처리구에 양성, 음성, 무처리 시료를 함께 포함하여 실시

\*\*\* 전기영동시, 해당 바이러스의 고유 증폭크기가 검출되는 시료를 감염주로 판정

○ 반응 조건(one-step RT-PCR 전용)

50℃, 30분 → 95℃, 10분 → 95℃, 30초 → 58℃, 30초 → 72℃, 1분(35cycles) → 72℃, 5분 → 4℃

표 10. 포도 RT-PCR 프라이머 및 진단조건

과종	바이러스 및 대조구	염기서열(5'→3')	밴드 크기
	GLRaV-3 ( <i>Grapevine leafroll associated virus-3</i> )	F: GCCCGAAAAATACGTATTCGCCA R: CTTCTTACACAGCTCCATCAATGC	310 bp
	GLRaV-1 ( <i>Grapevine leafroll associated virus-1</i> )	F: TATGTGCTGAAGTGATGGGTAAT R: GTGTCTGGTGACGTGCTAAACG	100 bp
	GfKV ( <i>Grapevine fleck virus</i> )	F: ATGCCGCCTCTCCGTCTGCTGACCA R: GTGATGTCATACCACAGGAAC	166 bp
포도	<i>18s rRNA</i> (반응 대조구)	F: TCCAATAGCGTATATTTAAGTTGT R: AAGTTTCAGCCTTGCGACCATACT	550 bp
	GFLV ( <i>Grapevine fanleaf virus</i> )	F: TCCCGGGGTGTATGTGGAAG R: GCTCCCACTGCTCTT(A/G)CCAA	451 bp
	HSVd ( <i>Hop Stunt viroid</i> )	F: TGAGCCCTCTGGGGAATTC R: AGAGAGGATCCGCGGCAGA	302 bp
	GYSVd-2 ( <i>Grape vine yellow speckle viroid-2</i> )	F: ACTAGTACTTTCTTCTATCTCCGAAGC R: CGGAGGCCTCCGAGGTG	229 bp
	GYSVd-1 ( <i>Grape vine yellow speckle viroid-2</i> )	F: CAAAGCCCTTTTCTTTCAACTGAG R: CGGAGGCCTCCGAGGTG	126 bp

\* 포도 고유 유전자(18S rRNA)를 증폭 대조구로 사용

○ 반응 조건(one-step RT-PCR 전용)

50℃, 30분 → 95℃, 10분 → 95℃, 30초 → 55℃, 30초 → 72℃, 1분(35cycles) → 72℃, 5분 → 4℃

표 11. 복숭아 RT-PCR 프라이머 및 진단조건

과종	바이러스·바이로이드	염기서열(5'→3')	밴드 크기
복숭아	ACLSV ( <i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> )	F: GCAGACCCCTTCATGGAAAGA R: CGCAAAGATCAGTCGTAACAGA	509 bp
	HSVd ( <i>Hop stunt viroid</i> )	F: CTGGGGAAT TCTCGAGTTGC R: AGGGGCTCAAGAGAGGATC	296 bp
	<i>nad5</i> (반응 대조구)	F: GATGCTTCTGGGGCTTCTTGTT R: CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA	181 bp

\* 사과·배 고유 유전자(*nad5*)를 증폭 대조구로 사용

○ 반응 조건(one-step RT-PCR 전용)

50°C, 30분 → 95°C, 10분 → 95°C, 30초 → 58°C, 30초 → 72°C, 1분(35cycles) → 72°C, 5분 → 4°C

표 12. 감귤 RT-PCR 프라이머 및 진단조건

과종	바이러스 및 대조구	염기서열(5'→3')	밴드 크기
감귤	CTLV ( <i>Citrus tatter leaf virus</i> )	F: CCCGCTGTTGATTTGATACACCT R: TGCGAATTTACACGACTCCTAA	503 bp
	CTV ( <i>Citrus tristeza virus</i> )	F: CCGTACTAACGCCCTTCGAG R: GCACTACCGTCTGCTATGATG	439 bp
	CLBV ( <i>Citrus leaf blotch virus</i> )	F: GCAAGACACTCTGTCTCAAAT R: CCTTTTTGGAGTAGATACCTAT	213 bp
	CVEV ( <i>Citrus vein enation virus</i> )	F: AATTACGGCGTATCTATGGTGAGTCG R: AATGAGATAGCCCGTTGTCCAG	391 bp
	ASGV ( <i>Apple stem grooving virus</i> )	F: AAGTATAAAGGCAGGCATGTC R: AAGTATAAAGGCAGGCATGTC	535 bp
	CaMV ( <i>Citrus mosaic virus</i> )	F: TCTCACTCAAGGAAGATATTCA R: TGAATCAATAATTTCAAAGGCTG	298 bp
	actin (반응 대조구)	F: TCCACCATGTTCCCAGGTAT R: CATCTCTGTCTGCCACCTGA	210 bp

\* 감귤 고유 유전자(actin)를 증폭 대조구로 사용

○ 반응 조건(one-step RT-PCR 전용)

50°C, 30분 → 95°C, 10분 → 95°C, 30초 → 58°C, 30초 → 72°C, 1분(35cycles) → 72°C, 5분 → 4°C

## 5. 연구개발 성과

○ 논문게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일
1	First report of <i>citrus leaf blotch virus</i> in <i>Satsuma mandarin</i> in Korea	Journal of Plant Pathology	박종열, 박정란, 김홍섭, 이승인, 문제선	101: 1229	Italia	S.I.Pa.V	SCIE	1 April 2019

○ 학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2018한국원예학회 임시 총회 및 제109차 추계학술발표회(구두발표)	이승인	2018. 10. 19.	여수	대한민국
2	2019 춘계한국식물병리학회 (포스터 발표)	박충열, 박정란, 백다솜, 이근식, 이승인, 나채선, 김진기, 김혜경, 이수현, 김홍섭	2019. 4. 25-26	부산	대한민국
3	2019 추계한국식물병리학회 (포스터 발표)	이근식, 백다솜, 박정란, 이진영, 김민순, 정은선, 김홍섭	2019. 10. 16-19	나주	대한민국
4	2019 추계한국식물병리학회 (포스터 발표)	백다솜, 이진영, 박정란, 이근식, 김미순, 박충열, 정은선, 김홍섭	2019. 10. 16-19	나주	대한민국
5	2019 춘계한국식물병리학회 (포스터 발표)	백다솜, 박충열, 박정란, 이진영, 김미순, 이근식, 정은선, 김홍섭	2019. 10. 16-19	나주	대한민국

○ 지식재산권

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	사과 및 배에 발생하는 바이러스 및 바이로이드 감염 다중 진단을 위한 프라이머 세트 및 진단방법	대한민국	국립종자원장, 경북대 산학협력단	18.08.08.	10-2018-0092501	국립종자원장, 경북대 산학협력단	20.10.06	10-2165043	100%

○ 기술이전

No	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)
1	「출원중인 직무발명」의 통상실시권 실시계약 (국립종자원)	사과 및 배에 발생하는 바이러스 및 바이로이드 감염 다중 진단을 위한 프라이머 세트 및 진단방법	미소진	2018.09.01.	2,250,000(3년)
2			넥스바이오	2018.09.01.	1,962,000(3년)
3			캔서롭	2018.09.01.	3,150,000(3년)

○ 홍보

No	유형	매체명	홍보내용	홍보일자
1	잡지기고	농경과원에	<p>「사과·바이러스 한번에 잡는다! 다중검정기술 특허출원, 진단키트 국산화 성공」</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 국립중자원은 사과·배 묘목에서 여러 개의 바이러스를 한 번에 검정할 수 있는 다중검정 진단 기술을 경북대학교(이수현 교수)와 공동 개발하고, 이를 국내 업체에 기술이전하여 진단키트로 제품화 하였다. 이번에 개발된 진단기술은 바이로이드까지 동시에 진단할 수 있어 기존 진단법에 비해 사용이 간편하고 저렴하다. 또한 정밀도와 안정성을 획기적으로 개선하여 우리나라 과수 바이러스 진단기술을 한 단계 끌어올렸다고 평가받고 있음</li> <li>- 공공분야의 연구개발이 산업경쟁력뿐만 아니라 중소기업의 매출 확대에 기여한 상생협력의 사례임</li> </ul>	2018. 11월호 (pp. 58-59)

## ○과수 바이러스 검출 기술 개발

### 1. 연구내용 및 연구결과

#### 가. 과수 바이러스·바이로이드 진단 RT-PCR kit 개발 및 상용화

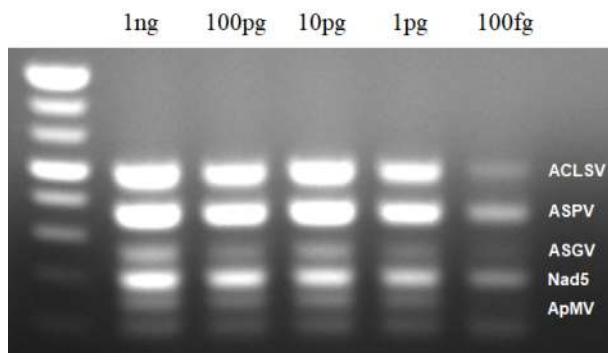
##### 1) 개발목적

- 종자요강에 제시한 과실수의 바이러스 및 바이로이드를 선제적으로 진단할 수 있는 분자진단키트 개발
- 사과/배(4종 바이러스, 1종 바이로이드), 포도(3종 바이러스), 복숭아(1종 바이러스, 1종 바이로이드), 감귤(3종 바이러스) 진단키트 상용화

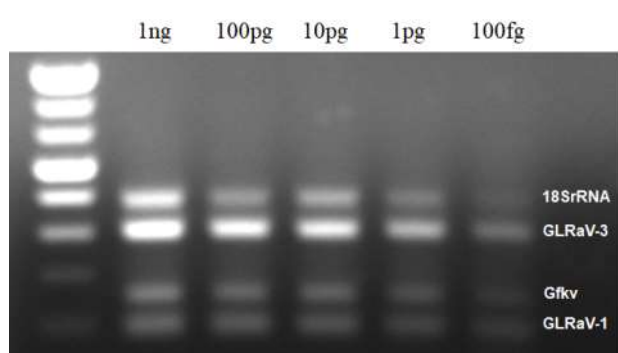
##### 2) 성능평가

- 각 키트의 control DNA 혼합물을 이용하여 1ng ~ 100fg 범위에서 진단성능을 평가하였음.
- 사과·배, 포도, 복숭아 및 감귤 진단키트는 100fg DNA에서 증폭량이 감소하였음. 그래서 100fg이 검출한계선임.

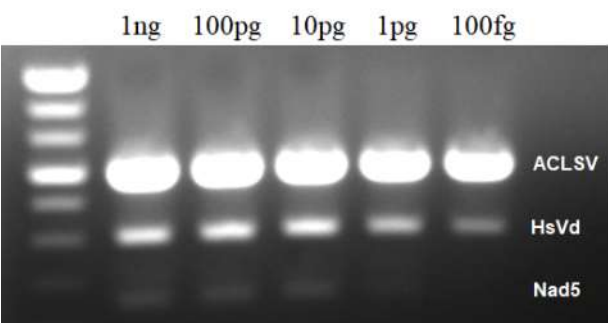
#### ■ 사과·배



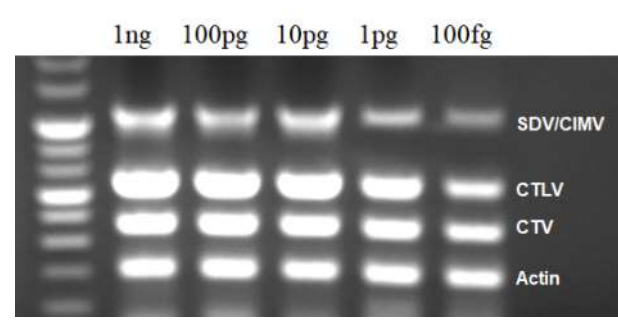
#### ■ 포도



#### ■ 복숭아



#### ■ 감귤



3) 제품화

가) 제품화

- 진단방법: Multiplex Conventional PCR(housekeeping gene 포함)
- 진단시료: 사과/배(4종 바이러스, 1종 바이로이드), 포도(3종 바이러스), 복숭아(1종 바이러스, 1종 바이로이드), 감귤(3종 바이러스)에서 추출한 total RNA



나) 진단키트 메뉴얼 및 홍보물 제작

○ 사과·배 바이러스/바이로이드 진단검사키트

**Product Information**  
Unit: 100 reactions

**Description**  
P-CHEK™ Virus/Diarrhoeal Virus Detection Kit (A & P)은 바이러스의 감염 여부를 검사 할 때 필요한 PCR 반응으로 이루어진 진단 키트입니다.  
국내 농가연구기관에서 국내 복숭아류 사과 및 배의 바이러스 및 바이로이드인 사과열매갈라짐바이러스(ACLSV), 사과열기그루줄바이러스(ASGV), 사과열매갈라짐바이로이드(ASPV), 사과열기그루줄바이로이드(ASGVd), 사과열기그루줄바이러스(ASGVd)를 검출합니다.  
본 키트는 배양액 4종, 배양액 2종을 검출하는 진단 키트입니다.  
본 키트는 nad가 housekeeping gene으로 사용됩니다.

구분	용량	수량
1. 2X RT-PCR Mix	500ul/tube	2
2. Oligo Mix	500ul/tube	1
3. Control DNA	100ul/tube	1

○ 포도 바이러스 진단검사키트

**Product Information**  
Unit: 100 reactions

**Description**  
P-CHEK™ Virus Detection Kit (Grape)은 바이러스의 감염 여부를 검사 할 때 필요한 PCR 반응으로 이루어진 진단 키트입니다.  
국내 농가연구기관에서 국내 복숭아류 포도류 중의 바이러스인 GLRav, GLRav1, GLRav2를 검출합니다.  
포도열매갈라짐바이러스 (GPMV)는 주로 열매로 감염되며 열매가 부패할 정도로 감염을 나타냅니다.  
포도열매갈라짐바이러스 1 (GLRav1)은 주로 열매로 감염되며 열매가 부패할 정도로 감염을 나타냅니다. GLRav2는 열매 감염을 나타내며 열매가 부패할 정도로 감염을 나타냅니다.  
본 키트는 바이러스 3종을 검출하는 진단 키트입니다.  
Grapevine leafroll associated virus 1 (GLRav1), Grapevine leafroll associated virus 2 (GLRav2), Grapevine leaf virus (GLV), 본 키트는 18s rRNA가 housekeeping gene으로 사용됩니다.

구분	용량	수량
1. 2X RT-PCR Mix	500ul/tube	2
2. Oligo Mix	500ul/tube	1
3. Control DNA	100ul/tube	1



# ○ 복숭아 바이러스/바이로이드 진단검사키트



**P-CHEK™**  
Virus Detection Kit (Mandarin)

**Product Information**  
Unit : 100 reactions

**Description**

- P-CHEK™ Virus Detection Kit (Mandarin)은 바이러스의 감염을 검출할 수 있는 PCR 반응으로 다음 진단을 하는 데 사용할 수 있습니다.
  - 국내 출자관리목업은 각종 바이러스 감염 검사 대상 바이러스는 4종입니다.
    - Citrus Greening Virus (CGV) (중추신경바이러스)
    - Citrus Mosaic Virus (CMV) (문물류자이토바이러스)
    - Citrus Tristeza Virus (CTV) (중추신경바이러스)
    - Citrus Veinching Virus (CVV) (문물류자이토바이러스)
  - 총 7종에 대해 검사 결과를 제공합니다.

**Component**

구분	용량	수량
1. RT-PCR Mix	50µl/tube	2
2. Oligo Mix	50µl/tube	1
3. Control DNA	10µl/tube	1

**Procedure**

1. 검사 시료
  - 과육과 잎, 과육에서 채취 가능합니다.
  - 다른 식물에서 표본을 채취할 때는 반드시 멸균을 실시합니다.
2. 바이러스 RNA 추출
  - RNA 추출 키트 제조사의 설명서를 참고하십시오.
  - RNeasy Plant mini Kit(Qiagen)을 권장합니다.
3. 순제 사멸
  - 고열처리 또는 PCR before Plant Filter Type을 사용하십시오.
  - 고열 처리는 생체에서 실시합니다.
  - 식재에서 Heating & Bleaching을 할 경우 시기에 맞춰서 실시할 수 있습니다.
4. 검사 전용액 제조

Component	Volume(µl)
RT-PCR Mix	10
Oligo mix	5
Template (RNA or DNA)	5
Total Volume	20

**Component**

구분	용량	수량
1. RT-PCR Mix	50µl/tube	2
2. Oligo Mix	50µl/tube	1
3. Control DNA	10µl/tube	1

**Procedure**

1. 검사 시료
  - 과육과 잎, 과육에서 채취 가능합니다.
  - 다른 식물에서 표본을 채취할 때는 반드시 멸균을 실시합니다.
2. 바이러스 RNA 추출
  - RNA 추출 키트 제조사의 설명서를 참고하십시오.
  - RNeasy Plant mini Kit(Qiagen)을 권장합니다.
3. 순제 사멸
  - 고열처리 또는 PCR before Plant Filter Type을 사용하십시오.
  - 고열 처리는 생체에서 실시합니다.
  - 식재에서 Heating & Bleaching을 할 경우 시기에 맞춰서 실시할 수 있습니다.
4. 검사 전용액 제조

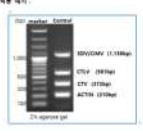
Component	Volume(µl)
RT-PCR Mix	10
Oligo mix	5
Template (RNA or DNA)	5
Total Volume	20

**RT-PCR 조건 설정**

- RT-PCR 시를 1시간 전에 미리 준비하십시오.

Step	온도	시간	Cycle
cDNA synthesis	50°C	30 min	1
Initial activation	95°C	15 min	1
Denaturation	95°C	30 sec	40
Annealing	50°C	1 min	
Extension	72°C	1 min	
Final Extension	72°C	5 min	1

**4. 결과 해석**



2% agarose gel

# ○ 감귤 바이러스 진단검사키트



**P-CHEK™**  
Virus Detection Kit (Peach)

**Product Information**  
Unit : 100 reactions

**Description**

- P-CHEK™ Virus Detection Kit (Peach)는 바이러스의 감염을 검출할 수 있는 PCR 반응으로 다음 진단을 하는 데 사용할 수 있습니다.
  - 국내 출자관리목업은 각종 바이러스 감염 검사 대상 바이러스는 2종에 대해 진단합니다.
    - Citrus Greening Virus (CGV) (중추신경바이러스)와 Citrus Veinching Virus (CVV) (문물류자이토바이러스)가 해당하여 감염을 일으키는 바이러스에 대해 진단, 예방, 고열처리 및 과육 사용 관련 진단을 제공합니다.
  - 총 7종에 대해 검사 결과를 제공합니다.
  - Apple stem cell associated virus (ASCaV)
  - Apple stem cell virus (ASCaV)

**Component**

구분	용량	수량
1. RT-PCR Mix	50µl/tube	2
2. Oligo Mix	50µl/tube	1
3. Control DNA	10µl/tube	1

**Procedure**

1. 검사 시료 및 1/2인치
  - 과육과 잎, 과육, 줄기에서 채취 가능합니다.
  - 다른 식물에서 표본을 채취할 때는 반드시 멸균을 실시합니다.
  - 바이러스의 경우 잎 끝부분을 1cm 이내에서 2cm 이내에서 Trisection을 사용하며, 이때 줄기, 줄기 끝 부분까지 RNeasy Plant mini Kit(Qiagen)에 적용합니다.
2. 바이러스 RNA 추출
  - RNA 추출 키트 제조사의 설명서를 참고하십시오.
  - RNeasy Plant mini Kit(Qiagen)을 권장합니다.
3. 순제 사멸
  - 고열처리 또는 PCR before Plant Filter Type을 사용하십시오.
  - 고열 처리는 생체에서 실시합니다.
  - 식재에서 Heating & Bleaching을 할 경우 시기에 맞춰서 실시할 수 있습니다.
4. 검사 전용액 제조

Component	Volume(µl)
RT-PCR Mix	10
Oligo mix	5
Template (RNA or DNA)	5
Total Volume	20

**Component**

구분	용량	수량
1. RT-PCR Mix	50µl/tube	2
2. Oligo Mix	50µl/tube	1
3. Control DNA	10µl/tube	1

**Procedure**

1. 검사 시료 및 1/2인치
  - 과육과 잎, 과육, 줄기에서 채취 가능합니다.
  - 다른 식물에서 표본을 채취할 때는 반드시 멸균을 실시합니다.
  - 바이러스의 경우 잎 끝부분을 1cm 이내에서 2cm 이내에서 Trisection을 사용하며, 이때 줄기, 줄기 끝 부분까지 RNeasy Plant mini Kit(Qiagen)에 적용합니다.
2. 바이러스 RNA 추출
  - RNA 추출 키트 제조사의 설명서를 참고하십시오.
  - RNeasy Plant mini Kit(Qiagen)을 권장합니다.
3. 순제 사멸
  - 고열처리 또는 PCR before Plant Filter Type을 사용하십시오.
  - 고열 처리는 생체에서 실시합니다.
  - 식재에서 Heating & Bleaching을 할 경우 시기에 맞춰서 실시할 수 있습니다.
4. 검사 전용액 제조

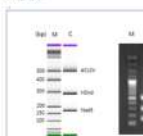
Component	Volume(µl)
RT-PCR Mix	10
Oligo mix	5
Template (RNA or DNA)	5
Total Volume	20

**RT-PCR 조건 설정**

- RT-PCR 시를 1시간 전에 미리 준비하십시오.


Step	온도	시간	Cycle
cDNA synthesis	50°C	30 min	1
Initial activation	95°C	15 min	1
Denaturation	95°C	30 sec	40
Annealing	50°C	1 min	
Extension	72°C	1 min	
Final Extension	72°C	5 min	1

**4. 결과 해석**




2% agarose gel

[브로슈 제작]



과수바이러스 진단키트  
**P-CHEK™**

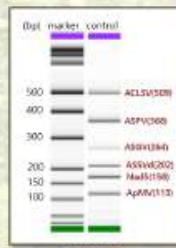


과수 주요 바이러스를 ONE STEP으로 진단합니다.

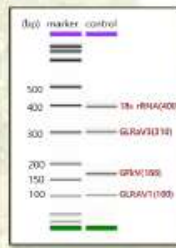
- ◆ **출자관리요강 과수 바이러스/바이로이드 검정법에 따른 RT-PCR 다중진단키트**
- ◆ 사과·배 : 고집병(ACLSV, ASPV, ASGV), 사과바이로이드병(ASSVd), 모자이크병(ApMV) 동시 진단
- ◆ 포도 : 잎말림바이러스병(GLRaV-1, GLRaV-3), 포도잎록바이러스만점병(GFkV) 동시 진단
- ◆ 복숭아 : 사과황화잎만점바이러스병(ACLSV), 호프스틴트바이로이드병(HsVd) 동시 진단
- ◆ 감귤 : 온주위축바이러스병(SDV), 감귤모자이크바이러스병(CIMV), 점록부이상바이러스(CTLV), 감귤갈색줄무늬바이러스(CTV) 동시 진단
- ◆ 검출민감도 :  $10^3 \sim 10^4$  copies

Cat. No.	제품명	진단 바이러스	해당 과수	가격
NBPA2001	P-CHEK™ Virus Detection Kit (A&P) 100test	ACLSV, ASPV, ASGV, ASSVd, ApMV	사과/배	385,000
NBPG2001	P-CHEK™ Virus Detection Kit (Grape) 100test	GLRaV-1, GLRaV-3, GFkV	포도	385,000
NBPP2001	P-CHEK™ Virus Detection Kit (Peach) 100test	ACLSV, HsVd	복숭아	385,000
NBPM2001	P-CHEK™ Virus Detection Kit (Mandarin) 100test	CTLV, CTV, SDV/CIMV	감귤	385,000

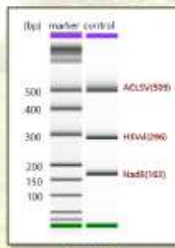
◆ 실험데이터 전기영동 결과



NBPA2001



NBPG2001



NBPP2001



NBPM2001

(주) 웨스바이오 TEL : 042-286-7478 FAX : 042-286-7479 E-mail : info@wesbio.co.kr

4) 상용화 및 판매실적

- 2019년 8.6백만원, 2020년 23백만원 매출
- 거래명세서 및 전자세금계산서 자료 첨부

■ 2019년 거래명세서 첨부

Page	1 / 1		<b>거래명세서</b> (공급받는자 보관용)		등록번호 129-86-29753 상호 (주)백스바이오			
발행일자	2019.09.03				주소	대전광역시 유성구 대전대 산학협력관312		
거래처명	대우과학				대표	서비스업 연구및개발업		
<b>합계금액 ₩ 1,485,000</b>			전화번호 042-286-7478		팩스 042-286-7479			
일련	품목코드	품명	단	수량	단	금액	비	
09.03	NBPA1B.02	PCNet™ Virus/Viral Detector WAA&T	100T	3	450,000	1,350,000	135,000	
<b>잔잔금 ₩</b>			<b>합</b>		1,350,000		135,000	
총합계 ₩		합계 ₩		합계 ₩		인수지	인	

결제계좌 : 656-910010-55704 (하나은행, 예금주:(주)백스바이오)

Page	1 / 1		<b>거래명세서</b> (공급받는자 보관용)		등록번호 129-86-29753 상호 (주)백스바이오			
발행일자	2019.03.07				주소	대전광역시 유성구 대전대 산학협력관312		
거래처명	주식회사 와이쿠브				대표	서비스업 연구및개발업		
<b>합계금액 ₩ 1,705,000</b>			전화번호 042-286-7478		팩스 042-286-7479			
일련	품목코드	품명	단	수량	단	금액	비	
03.07	NBPA1B.02	P-CHEK, virus/viral detection kit	100test	1	350,000	350,000	35,000	
03.07		RNA 6000 nano kit	kit	1	1,200,000	1,200,000	120,000	
<b>잔잔금 ₩</b>			<b>합</b>		1,550,000		155,000	
총합계 ₩		합계 ₩		합계 ₩		인수지	인	

결제계좌 : 656-910010-55704 (하나은행, 예금주:(주)백스바이오)

Page	1 / 1		<b>거래명세서</b> (공급받는자 보관용)	등록번호	129-86-29753				
발행일자	2019.08.26			회사명	[주]엑스바이오 				
거래처명	홍은씨어연스			주소	대전광역시 유성구 대전동 산학협력로312				
<b>합계금액 ₩ 495,000</b>				전화번호	042-286-7479	팩스	042-286-7479		
품명	품목코드	분	격	규격	수량	단가	금액	가액	세액
08.26	NBPA18.2			max/real detection kit(API)	100T	1	450,000	450,000	45,000
<b>전전금 ₩</b>				<b>합계</b>			<b>450,000</b>	<b>45,000</b>	
총합계 ₩		입금 ₩		출잔액 ₩		인수자		인	

www.EasyForm.co.kr

결제계좌 : 656-910010-55704 (하나은행, 예금주:(주)엑스바이오)

Page	1 / 1		<b>거래명세서</b> (공급받는자 보관용)	등록번호	129-86-29753				
발행일자	2019.01.15			회사명	[주]엑스바이오 				
거래처명	와이비랩			주소	대전광역시 유성구 대전동 산학협력로312				
<b>합계금액 ₩ 4,950,000</b>				전화번호	042-286-7479	팩스	042-286-7479		
품명	품목코드	분	격	규격	수량	단가	금액	가액	세액
01.15	NBPA18.02			PCR RT-PCR kit	100test	10	450,000	4,500,000	450,000
<b>전전금 ₩</b>				<b>합계</b>			<b>4,500,000</b>	<b>450,000</b>	
총합계 ₩		입금 ₩		출잔액 ₩		인수자		인	

www.EasyForm.co.kr

결제계좌 : 656-910010-55704 (하나은행, 예금주:(주)엑스바이오)

■ 2020년 세금계산서 첨부

전자세금계산서				승인번호		20200623-41000108-1rh80001				
공급자	등록번호	129-86-29753	중사업장번호		등록번호	547-45-00359	중사업장번호			
	상호(법인명)	(주)넥스바이오	성명	박양찬	상호(법인명)	BSC solution(비전씨솔루션)	성명	김민겸		
	사업장주소	대전중구 용운동 대전대 산학협력관312		사업장주소	경북 청도군 화양읍 순흥정길7-1					
	업태	서비스업	종목	연구및개발업	업태	도매 및 소매업	종목	의약품, 정밀 및 과학기기 도매업		
	이메일	nexbio@nexbio.co.kr		이메일	boysbe1119@naver.com					
작성일자	공급가액	세액	수령사유	비고						
2020-06-23	1,272,727	127,273	해당없음							
월	일	품목	규격	수량	단가	공급가액	세액	비고		
06	23	P-CHEK virus detection kit	100T	4	350,000	1,272,727	127,273			
합계금액						원금	수표	어음	의상미수금	이 금액을 (영구) 환
1,400,000										

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급 또는 전송 입력된 전자(세금)계산서입니다.  
 발급사실 확인은 상기 홈페이지의 "조회/발급" <전자세금계산서> 제3차 발급사실 조회 \*를 이용하시기 바랍니다.

전자세금계산서				승인번호		20200528-41000108-1rh80002				
공급자	등록번호	129-86-29753	중사업장번호		등록번호	317-81-38738	중사업장번호			
	상호(법인명)	(주)넥스바이오	성명	박양찬	상호(법인명)	주식회사 씨이큐브	성명	박종민		
	사업장주소	대전중구 용운동 대전대 산학협력관312		사업장주소	충북 출원군 오창읍 광흥택지1길 17-16 101					
	업태	서비스업	종목	연구및개발업	업태	도소매	종목	연구용시약 및 기자재		
	이메일	nexbio@nexbio.co.kr		이메일	tax@scicube.co.kr					
작성일자	공급가액	세액	수령사유	비고						
2020-05-28	1,309,091	130,909	해당없음							
월	일	품목	규격	수량	단가	공급가액	세액	비고		
05	28	PCHEK A&P kit	100T/kit	5	289,000	1,309,091	130,909			
합계금액						원금	수표	어음	의상미수금	이 금액을 (영구) 환
1,440,000										

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급 또는 전송 입력된 전자(세금)계산서입니다.  
 발급사실 확인은 상기 홈페이지의 "조회/발급" <전자세금계산서> 제3차 발급사실 조회 \*를 이용하시기 바랍니다.

전자세금계산서				승인번호	20200806-10000000-85597208							
공급자	등록번호	129-86-29753		통신업종번호			등록번호	502-81-43334		통신업종번호		
	상호(법인명)	주식회사 넥스바이오 (NEX BIO)		성명	박양찬		상호(개인명)	(주)라이프사이언스		성명	이희환	
	사업장주소	대전광역시 동구 대학로 62, 312호(용운동, 대전대학교강업보육센터)		사업장주소	대구 동구 동촌로 72(갈사동, 3층)		사업장주소	대구 동구 동촌로 72(갈사동, 3층)		사업장주소		
	업태	서비스업	종목	연구및개발업	업태	도매	종목	연구용기자재시약	업태	도매	종목	연구용기자재시약
	이메일	nextbio@nextbio.co.kr		이메일	lfeec@daum.net		이메일			이메일		
작성일자	공급가액	세액		수령사유	비고							
2020-08-06	2,190,000	219,000		해당없음								
일	일	품목	규격	수량	단가	공급가액	세액	비고				
08	06	P-CHEK Virus Detection Kit	100T	6	331,818	1,669,091	166,909	NPBA2001				
08	06	NBE Buffer	500mL	4	132,727	530,909	53,091	NBF001				
합계금액		현금	수표	어음	외상미수금		이 금액을 (영수) 받					
2,409,000												

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급 또는 전송 입력된 전자(세금)계산서입니다.  
 발급사실 확인은 상기 홈페이지의 <조회/발급>전자세금계산서> 제3자 발급사실 조회 \*를 이용하시기 바랍니다.

전자세금계산서				승인번호	20200911-10000000-21795277							
공급자	등록번호	129-86-29753		통신업종번호			등록번호	654-06-00361		통신업종번호		
	상호(법인명)	주식회사 넥스바이오 (NEX BIO)		성명	박양찬		상호(개인명)	아이디사이언스		성명	백희경	
	사업장주소	대전광역시 동구 대학로 62, 312호(용운동, 대전대학교강업보육센터)		사업장주소	대구 북구 대명서길45-6 지하1층		사업장주소	대구 북구 대명서길45-6 지하1층		사업장주소		
	업태	서비스업	종목	연구및개발업	업태	도소매	종목	의약품	업태	도소매	종목	의약품
	이메일	nextbio@nextbio.co.kr		이메일	id-science@naver.com		이메일			이메일		
작성일자	공급가액	세액		수령사유	비고							
2020-09-11	3,181,820	318,180		해당없음								
일	일	품목	규격	수량	단가	공급가액	세액	비고				
09	10	P-CHEK Virus Detection Kit	100T	10	318,182	3,181,820	318,180					
합계금액		현금	수표	어음	외상미수금		이 금액을 (영수) 받					
3,500,000												

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급 또는 전송 입력된 전자(세금)계산서입니다.  
 발급사실 확인은 상기 홈페이지의 <조회/발급>전자세금계산서> 제3자 발급사실 조회 \*를 이용하시기 바랍니다.

전자세금계산서				승인번호	20200922-10000000-26351432			
공 급 자	등록번호	129-86-29753	통신업종 번호		등록번호	317-81-38738	통신업종 번호	
	상호 (법인명)	주식회사 넥스바이오 (NEX BIO)	성명	박정찬	상호 (법인명)	(주)사이큐브	성명	박정찬
	사업장 주소	대전광역시 동구 대학로 62, 312호(용운동, 대전대학교충 남보육센터)			사업장 주소	충북 청주시 오창읍 당청로1길 17-1		
	업태	서비스업	종목	연구및개발업	업태	도소매	종목	연구용시약
	이메일	nexbio@nexbio.co.kr			이메일	tas@scicube.co.kr		
작성일자	공급가액	세액	수정사유	비고				
2020-09-22	1,318,182	131,818	해당없음					
일	일	품목	규격	수량	단가	합계가액	세액	비고
09	22	P-CHEK Virus Detection kit	100T	6	263,637	1,318,182	131,818	
합계금액		환급	수표	어음	외상미수금	이 금액을 (환구) 함		
1,450,000								

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급 또는 전송 입력된 전자(세금)계산서입니다.  
 발급사실 확인은 상기 홈페이지의 <조회/발급>전자세금계산서> <제3자 발급사실 조회 >를 이용하시기 바랍니다.

전자세금계산서				승인번호	20200915-10000000-23117189			
공 급 자	등록번호	129-86-29753	통신업종 번호		등록번호	303-86-00387	통신업종 번호	
	상호 (법인명)	주식회사 넥스바이오 (NEX BIO)	성명	박정찬	상호 (법인명)	(주)옵티온	성명	김영광
	사업장 주소	대전광역시 동구 대학로 62, 312호(용운동, 대전대학교충 남보육센터)			사업장 주소	충주시 흥덕구 공단로134 세종테크노밸리B101호		
	업태	서비스업	종목	연구및개발업	업태	도소매	종목	유전자시약업
	이메일	nexbio@nexbio.co.kr			이메일	optigen77@gmail.com		
작성일자	공급가액	세액	수정사유	비고				
2020-09-15	636,364	63,636	해당없음					
일	일	품목	규격	수량	단가	합계가액	세액	비고
09	15	P-CHEK Virus Detection kit	100T	2	318,182	636,364	63,636	
합계금액		환급	수표	어음	외상미수금	이 금액을 (영수) 함		
700,000								

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급 또는 전송 입력된 전자(세금)계산서입니다.  
 발급사실 확인은 상기 홈페이지의 <조회/발급>전자세금계산서> <제3자 발급사실 조회 >를 이용하시기 바랍니다.

전자세금계산서				승인번호	20201008-10000000-39669139					
공급자	등록번호	129-86-29753		중사업장번호		등록번호	616-81-46270		중사업장번호	
	상호(법인명)	주식회사 넥스바이오 (NEX BIO)		성명	박영찬	상호(법인명)	(유)교성하이텍		성명	고성발
	사업장주소	대전광역시 중구 대학로 62, 312호(충유동, 대전대학교정림모작센터)				사업장주소	전주시 정실동1길 8-3			
	업태	서비스업	종목	연구및개발업		업태	도매	종목	과학기기	
	이메일	nexbio@nexbio.co.kr				이메일	61681462700@bestbill.co.kr			
작성일자	공급가액	세액		수령사유	비고					
2020-10-08	1,909,091	190,909		회당업종						
일	일	품목	금액	수량	단가	공급가액	세액	비고		
10	08	P-CHEK Virus Detection kit	100T	6	318,182	1,909,091	190,909			
합계금액		원금	수표	어음	외상대수금	이 금액을 (영수) 함				
2,100,000										

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급 또는 전송 입력된 전자(세금)계산서입니다.  
 발급사실 확인은 상기 홈페이지의 <조회/발급>전자세금계산서> 제3자 발급사실 조회 \*를 이용하시기 바랍니다.

전자세금계산서				승인번호	20201016-10000000-47109651					
공급자	등록번호	129-86-29753		중사업장번호		등록번호	547-45-00359		중사업장번호	
	상호(법인명)	주식회사 넥스바이오 (NEX BIO)		성명	박영찬	상호(법인명)	네엔씨솔루션		성명	권민경
	사업장주소	대전광역시 중구 대학로 62, 312호(충유동, 대전대학교정림모작센터)				사업장주소	경북 청도군 화양읍 은행동길7-1			
	업태	서비스업	종목	연구및개발업		업태	도소매	종목	과학기기외	
	이메일	nexbio@nexbio.co.kr				이메일	boysbell116@naver.com			
작성일자	공급가액	세액		수령사유	비고					
2020-10-16	3,625,454	362,546		회당업종						
일	일	품목	금액	수량	단가	공급가액	세액	비고		
10	16	P-CHEK Virus Detection Kit(A&P)	100T	7	318,182	2,227,272	222,728			
10	16	P-CHEK Virus Detection kit(Grape)	100T	4	318,182	1,272,728	127,272			
10	16	NBE Buffer	500ml	1	138,000	125,454	12,646			
합계금액		원금	수표	어음	외상대수금	이 금액을 (영수) 함				
3,986,000										

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급 또는 전송 입력된 전자(세금)계산서입니다.  
 발급사실 확인은 상기 홈페이지의 <조회/발급>전자세금계산서> 제3자 발급사실 조회 \*를 이용하시기 바랍니다.



전자세금계산서				승인번호	20201106-10000000-63328140					
공급자	등록번호	129-86-29753		통사업장번호	등록번호	144-81-36530		통사업장번호		
	상호(법인명)	주식회사 넥스바이오 (NEX BIO)		성명	(주)자무리서치		성명	송재동		
	사업장주소	대전광역시 유구 대학로 62, 312동(충민동, 대전대학교중입모욕센터)		사업장주소	경북 경산시 대학로290					
	업태	서비스업	종목	연구및개발업	업태	도매	종목	과학기자재		
	이메일	nexbio@nexbio.co.kr		이메일	tax@gpresearch.co.kr					
작성일자	공급가액	세액	수량	단가	공급가액	세액	비고			
2020-11-06	954,546	95,454	해당없음							
일	일	품목	규격	수량	단가	공급가액	세액	비고		
11	06	virus/viroid detection kit(A&P)	100T	3	318,182	954,546	95,454			
합계금액						합금	수량	단가	외상미수금	이 금액별 (종구) 합
1,050,000										

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급 또는 전송 입력된 전자(세금)계산서입니다.  
 발급사실 확인은 상기 홈페이지의 <조회/발급>전자세금계산서> 계3자 발급사실 조회 \*를 이용하시기 바랍니다.

전자세금계산서				승인번호	20201023-10000000-50852235					
공급자	등록번호	129-86-29753		통사업장번호	등록번호	654-06-00361		통사업장번호		
	상호(법인명)	주식회사 넥스바이오 (NEX BIO)		성명	아이디사이언스		성명	변인성		
	사업장주소	대전광역시 유구 대학로 62, 312동(충민동, 대전대학교중입모욕센터)		사업장주소	대구 북구 대보서길45-6 지하1층					
	업태	서비스업	종목	연구및개발업	업태	도소매	종목	의약품		
	이메일	nexbio@nexbio.co.kr		이메일	id-science@naver.com					
작성일자	공급가액	세액	수량	단가	공급가액	세액	비고			
2020-10-23	3,181,818	318,182	해당없음							
일	일	품목	규격	수량	단가	공급가액	세액	비고		
10	23	PO-HEK Virus detection kit	100T	10	318,181	3,181,818	318,182			
합계금액						합금	수량	단가	외상미수금	이 금액별 (종구) 합
3,500,000										

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급 또는 전송 입력된 전자(세금)계산서입니다.  
 발급사실 확인은 상기 홈페이지의 <조회/발급>전자세금계산서> 계3자 발급사실 조회 \*를 이용하시기 바랍니다.

전자세금계산서				승인번호	20201020-10000000-48569161			
공급자	등록번호	129-86-29753		중사업장번호	등록번호	135-83-01818		중사업장번호
	상호(법인명)	주식회사 넥스바이오 (NEX BIO)		성명	박양진	상호(법인명)	국립연세대학교학원	
	사업장주소	대전광역시 동구 대학로 62, 312동(용문동, 대전대학교중앙보육센터)		사업장주소	전북 완주군 이서면 농성로 100			
	업태	서비스업	종목	연구및개발업	업태	종목		
	이메일	nexbio@nexbio.co.kr		이메일	zmsst1212@korea.kr			
작성일자	공급가액	세액		수령사유	비고			
2020-10-20	2,065,000	206,500		해당없음				
월	일	품목	규격	수량	단가	공급가액	세액	비고
10	20	PCHEK Virus detection kit(A&P)	100T	5	350,000	1,750,000	175,000	
10	20	0.2ml PCR B-strip tube	bx	5	63,000	315,000	31,500	
합계금액		현금	수표	어음	외상미수금		이 금액을 (정구) 함	
2,271,500								

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 **발급 또는 전송** 입력된 전자(세금)계산서입니다.  
 발급사실 확인은 상기 홈페이지의 <조회/발급>전자세금계산서> **제3자 발급사실 조회** \*를 이용하시기 바랍니다.

전자세금계산서				승인번호	20201020-10000000-48394623			
공급자	등록번호	129-86-29753		중사업장번호	등록번호	356-88-00901		중사업장번호
	상호(법인명)	주식회사 넥스바이오 (NEX BIO)		성명	박양진	상호(법인명)	유한회사 영작한타크	
	사업장주소	대전광역시 동구 대학로 62, 312동(용문동, 대전대학교중앙보육센터)		사업장주소	전북 전주시 흥선구 문학대2길 31 101호			
	업태	서비스업	종목	연구및개발업	업태	도소매	종목	이동학기 시장
	이메일	nexbio@nexbio.co.kr		이메일	park6154@daum.net			
작성일자	공급가액	세액		수령사유	비고			
2020-10-20	1,590,909	159,091		해당없음				
월	일	품목	규격	수량	단가	공급가액	세액	비고
10	20	P-CHEK Virus Detection kit	100T	5	318,182	1,590,909	159,091	
합계금액		현금	수표	어음	외상미수금		이 금액을 (정구) 함	
1,750,000								

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 **발급 또는 전송** 입력된 전자(세금)계산서입니다.  
 발급사실 확인은 상기 홈페이지의 <조회/발급>전자세금계산서> **제3자 발급사실 조회** \*를 이용하시기 바랍니다.

**나. 과수 바이러스 현장진단키트 개발 및 시제품화**

1) 개발목적

- 과수 바이러스 현장 진단 LFA(lateral flow assay) 국산화 및 성능개선
- 7종 항원을 개발하고 그 중에서 4종 단클론 항체(ACLSV, ASGV, CTV, GLRaV-3)를 제작함.
- 개발한 단클론 항체는 골드-LFA와 산화철-LFA에 적용하여 현장진단민감도를 비교평가함.

2) 개발결과

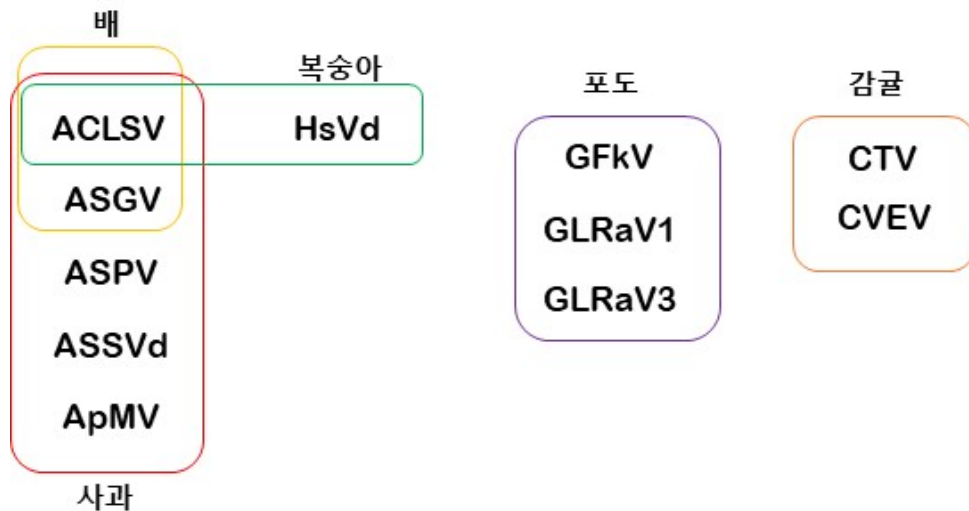
가) 과수바이러스 항원 및 항체 제작

(1) 과수 바이러스 CP(coat protein, capsid) 영역 항원 제작

㉔ 과수 바이러스 CP 영역 유전자 합성

- 다음과 같이 해당 과종에 대한 바이러스 CP 영역 유전자 정보 기반으로 유전자 합성
- 사과/배: ACLSV(KC404887.1), ASGV(MG682509.1)
- 복숭아: ACLSV(KC404887.1)
- 포도: GFkV(KX828706.1), GLRaV1(NC\_016509.1), GLRaV3(NC\_004667.1)
- 감귤: CTV(KC986380.1)

<국립종자원 요강에 제시한 5대 과수에 대한 바이러스 목록>



㉞ 단백질 발현 벡터 클로닝

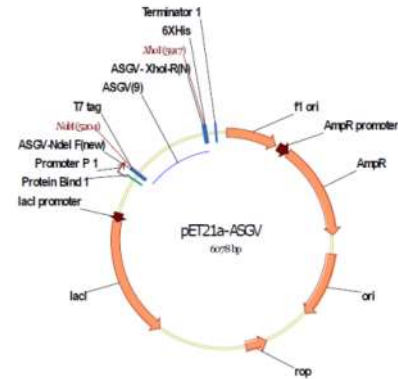
- 사과/배/복숭아 2종, 포도 3종, 감귤 2종 바이러스 CP 영역을 pET21a 벡터에 클로닝

○ ASGV

■ pET21a-ASGV map

■ 제한효소 처리후 insert 확인

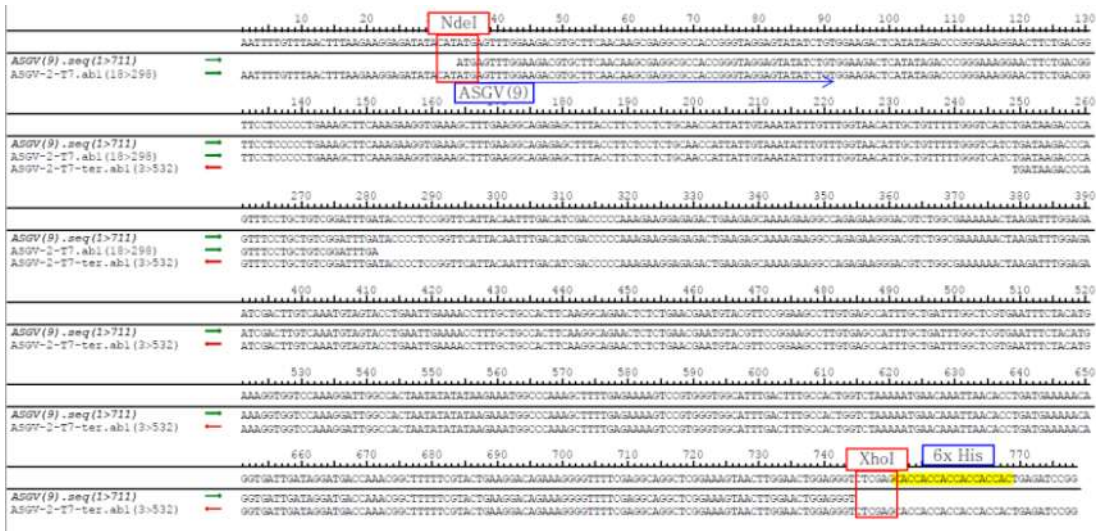
1. Plasmid map



2. Primer list

pET21a-ASGV	
Vector	
ASGV-NdeI F(new)	agagatatacatatg AGTTGGGAAGACGTGCT
ASGV-XhoI-R(N)	gattgtagactctgaa ACCCTCCAGITCCAAG
1st PCR	
Product size	bp
seq. primer	

■ Insert 염기서열 분석결과



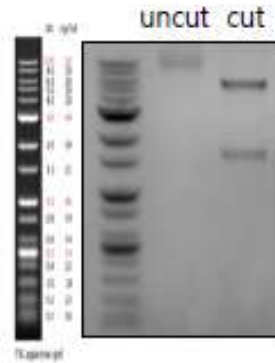
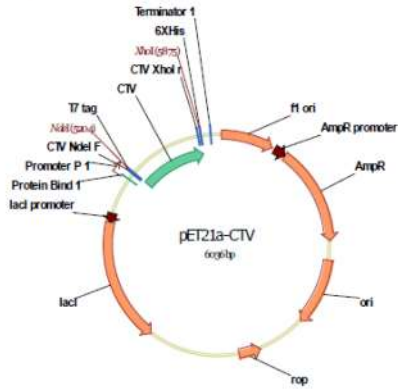
- ASGV의 CP 영역을 합성한 뒤에 pET21a vector에 cloning 함
- 제한효소(EcoRV, XhoI)를 처리하여 cloning 된 insert 크기를 검증함.
- T7 promoter primer를 이용하여 cloning 된 ASGV 염기서열을 검증함.

○ CTV

■ pET21a-CTV map

■ 제한효소 처리후 insert 확인

1. Plasmid map



2. Primer list

#3	pET21a-CTV	
Vector		
1st PCR	CTV NdeI F CTV XhoI r	aggagatatacatatg GACGACGAAACAAAGAAA ggtggtgctcctcag ACGTGTGTTAAATTCCTCAAG
	Product size	bp
seq. primer		

■ Insert 염기서열 분석결과



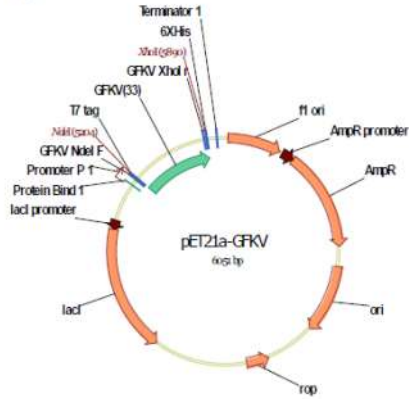
- CTV의 CP 영역을 합성한 뒤에 pET21a vector에 cloning 함
- 제한효소(HpaI, KpnI)를 처리하여 cloning 된 insert 크기를 검증함.
- T7 promoter primer를 이용하여 cloning 된 CTV 염기서열을 검증함.

○ GfKv

■ pET21a-GfKv map

■ 제한효소 처리후 insert 확인

1. Plasmid map



2. Primer list

#	Primer	Sequence	Product size (bp)
1	Vector		
1st PCR	GfKv NdeI F	aggagatatacatatg AGCCTCCCGGTGACCTC	bp
	GfKv XhoI r	qttqttggtactgaq AGGGAGTGGGGCGTTGA	
2nd PCR			

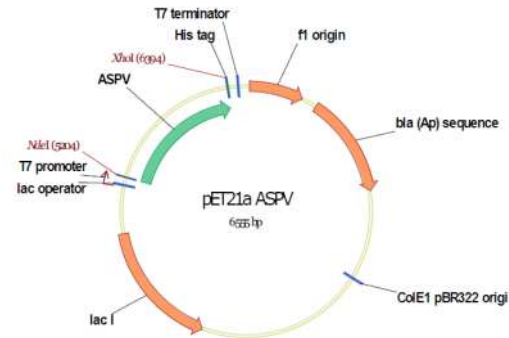
■ Insert 염기서열 분석결과



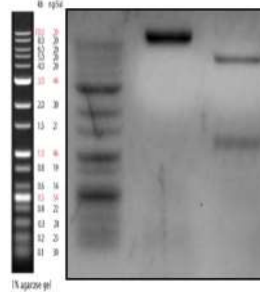
- GfKv의 CP 영역을 합성한 뒤에 pET21a vector에 cloning 함
- 제한효소(HpaI, SacI)를 처리하여 cloning 된 insert 크기를 검증함.
- T7 promoter primer를 이용하여 cloning 된 GfKv 염기서열을 검증함.

# OASPV

## ■ pET21a-ASPV map



## ■ 제한효소 처리후 insert 확인



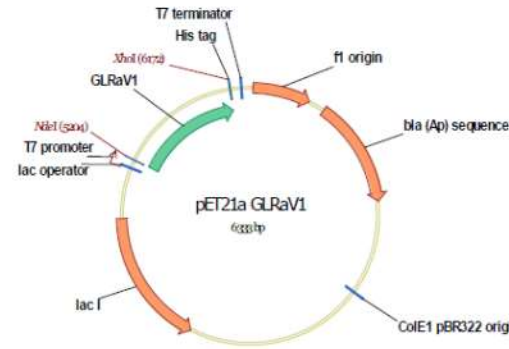
## ■ Insert 염기서열 분석결과



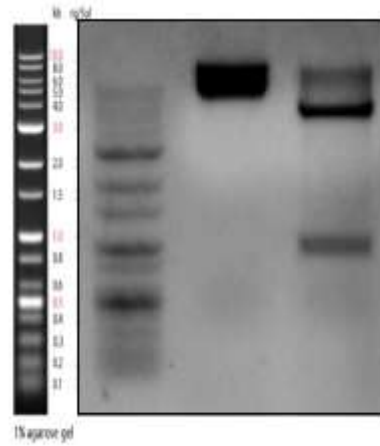
- ASPV의 CP 영역을 합성한 뒤에 pET21a vector에 cloning 함
- 제한효소(NdeI, XhoI)를 처리하여 cloning 된 insert 크기를 검증함.
- T7 promoter primer를 이용하여 cloning 된 ASPV 염기서열을 검증함.

○ GLRaV1

■ pET21a-GLRaV1 map



■ 제한효소 처리후 insert 확인



■ Insert 염기서열 분석결과

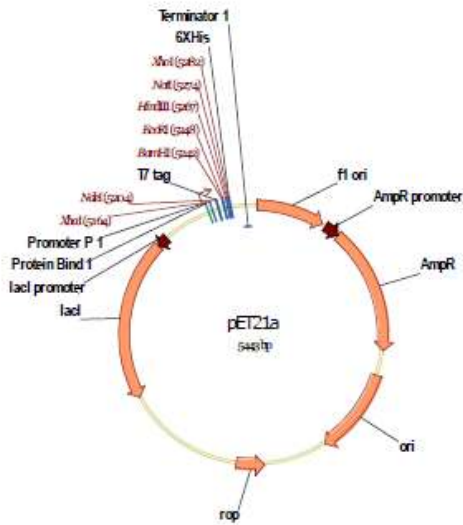


- GLRaV1의 CP 영역을 합성한 뒤에 pET21a vector에 cloning 함
- 제한효소(NdeI, XhoI)를 처리하여 cloning 된 insert 크기를 검증함.
- T7 promoter primer를 이용하여 cloning 된 GLRaV1 염기서열을 검증함.

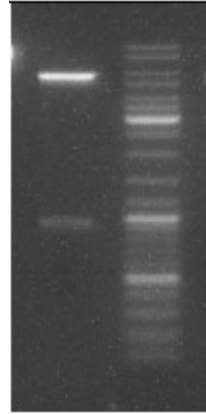


## ○ GLRaV3

### ■ pET21a-GLRaV3 map



### ■ 제한효소 처리후 insert 확인



### ■ Insert 염기서열 분석결과

Sequences producing significant alignments

Download Manage Columns Show 100

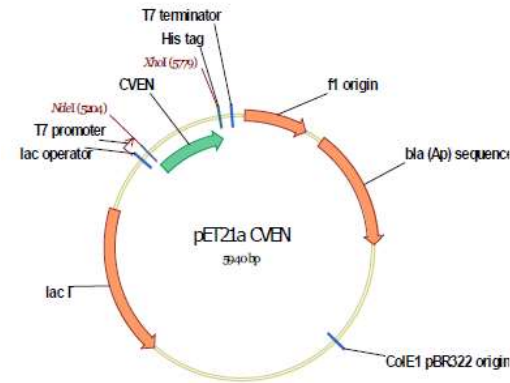
select all 100 sequences selected

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<a href="#">Grapevine leafroll-associated virus 3 complete genome</a>	1735	1735	99%	0.0	100.00%	<a href="#">AF037268.2</a>
<a href="#">Grapevine leafroll-associated virus 3 isolate 14G463 complete genome</a>	1707	1707	99%	0.0	99.47%	<a href="#">MH814490.1</a>
<a href="#">Grapevine leafroll-associated virus 3 isolate 12G402 complete genome</a>	1707	1707	99%	0.0	99.47%	<a href="#">MH814482.1</a>
<a href="#">Grapevine leafroll-associated virus 3 isolate Pin244 partial genome</a>	1707	1707	99%	0.0	99.47%	<a href="#">MH521116.2</a>
<a href="#">Grapevine leafroll-associated virus 3 isolate Kta255 partial genome</a>	1707	1707	99%	0.0	99.47%	<a href="#">MH521108.2</a>
<a href="#">Grapevine leafroll-associated virus 3 isolate Mal162 partial genome</a>	1707	1707	99%	0.0	99.47%	<a href="#">MH521113.1</a>
<a href="#">Grapevine leafroll-associated virus 3 isolate 8-6 coat protein divergent coat protein 21 kDa protein 19.6 kDa protein 19.7 kDa protein 4 kDa</a>	1707	1707	99%	0.0	99.47%	<a href="#">HQ130315.1</a>
<a href="#">Grapevine leafroll-associated virus 3 isolate WA-MR complete genome</a>	1707	1707	99%	0.0	99.47%	<a href="#">GU983863.1</a>
<a href="#">Grapevine leafroll-associated virus 3 isolate Pet-1 coat protein gene complete cds</a>	1707	1707	99%	0.0	99.47%	<a href="#">DQ680141.1</a>
<a href="#">Grapevine leafroll-associated virus 3 isolate 14G466 complete genome</a>	1701	1701	99%	0.0	99.36%	<a href="#">MH814491.1</a>
<a href="#">Grapevine leafroll-associated virus 3 isolate Tou260 partial genome</a>	1701	1701	99%	0.0	99.36%	<a href="#">MH521119.2</a>
<a href="#">Grapevine leafroll-associated virus 3 isolate LN3204 partial genome</a>	1701	1701	99%	0.0	99.36%	<a href="#">MH521112.2</a>
<a href="#">Grapevine leafroll-associated virus 3 isolate Kta252 partial genome</a>	1701	1701	99%	0.0	99.36%	<a href="#">MH521111.2</a>
<a href="#">Grapevine leafroll-associated virus 3 isolate Ita219 partial genome</a>	1701	1701	99%	0.0	99.36%	<a href="#">MH521107.2</a>
<a href="#">Grapevine leafroll-associated virus 3 isolate Ita218 partial genome</a>	1701	1701	99%	0.0	99.36%	<a href="#">MH521106.2</a>
<a href="#">Grapevine leafroll-associated virus 3 isolate Cha138b partial genome</a>	1701	1701	99%	0.0	99.36%	<a href="#">MH521096.2</a>
<a href="#">Grapevine leafroll-associated virus 3 isolate Cha106 partial genome</a>	1701	1701	99%	0.0	99.36%	<a href="#">MH521093.2</a>
<a href="#">Grapevine leafroll-associated virus 3 isolate Cha103 partial genome</a>	1701	1701	99%	0.0	99.36%	<a href="#">MH521092.2</a>
<a href="#">Grapevine leafroll-associated virus 3 isolate TRAJ-BR complete genome</a>	1701	1701	99%	0.0	99.36%	<a href="#">KX756669.1</a>
<a href="#">Grapevine leafroll-associated virus 3 isolate CS sequence variant 2 capsid protein (CP) gene complete cds</a>	1701	1701	99%	0.0	99.36%	<a href="#">KP401820.1</a>
<a href="#">Grapevine leafroll-associated virus 3 isolate GR3 sequence variant 2 capsid protein (CP) gene complete cds</a>	1701	1701	99%	0.0	99.36%	<a href="#">KP401809.1</a>

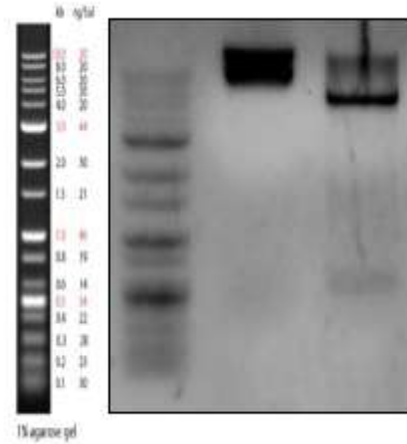
- GLRaV3의 CP 영역을 합성한 뒤에 pET21a vector에 cloning 함
- 제한효소(NdeI, XhoI)를 처리하여 cloning 된 insert 크기를 검증함.
- T7 promoter primer를 이용하여 cloning 된 GLRaV3 염기서열을 검증함.

○ CVEN

■ pET21a-CVEN map



■ 제한효소 처리후 insert 확인



■ Insert 염기서열 분석결과



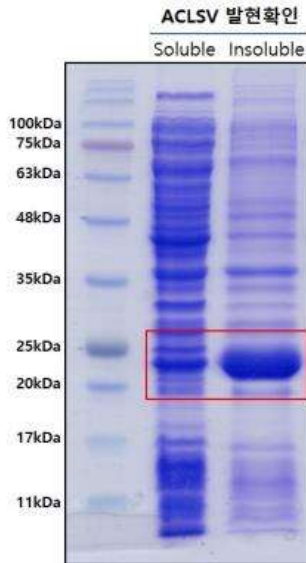
- CVEN의 CP 영역을 합성한 뒤에 pET21a vector에 cloning 함
- 제한효소(NdeI, XhoI)를 처리하여 cloning 된 insert 크기를 검증함.
- T7 promoter primer를 이용하여 cloning 된 CVEV 염기서열을 검증함.

㊤ 과수 바이러스 항원 단백질 생산

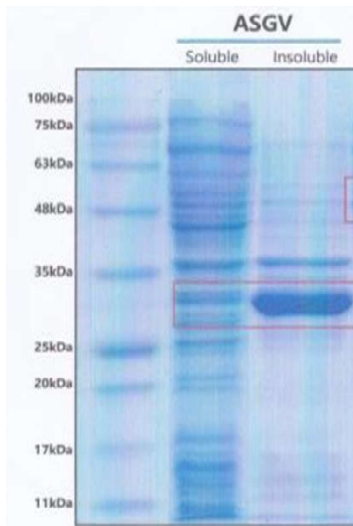
- 0.1 ~ 2uM IPTG를 처리하고 16도 24시간 이상 발현유도함. cell pellet를 회수하고 lysis buffer를 이용해서 cell pellet(insoluble)과 상등액(soluble)을 분리해서 단백질 전기영동으로 발현을 확인함.

- His-tagging을 이용하여 발현된 단백질을 분리정제하였음.

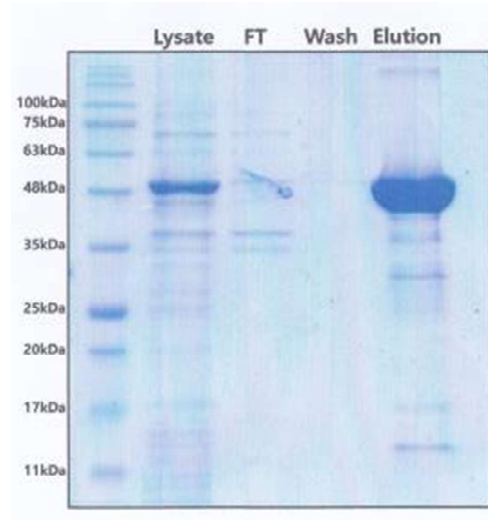
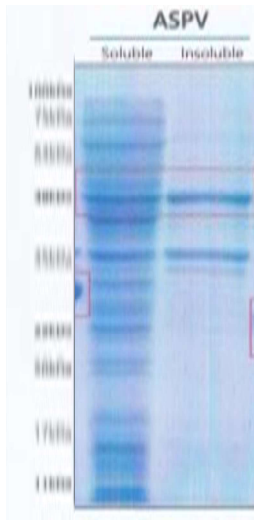
■ ACLSV(23.63 kDa)



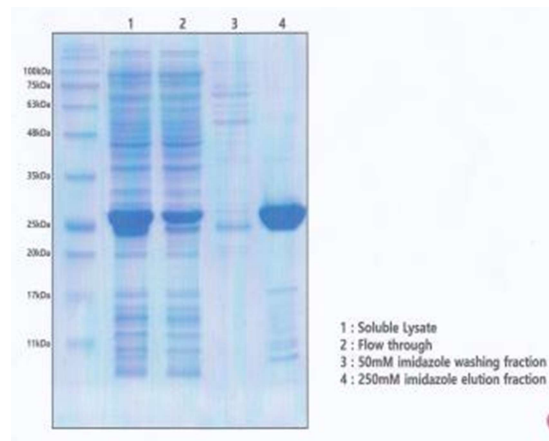
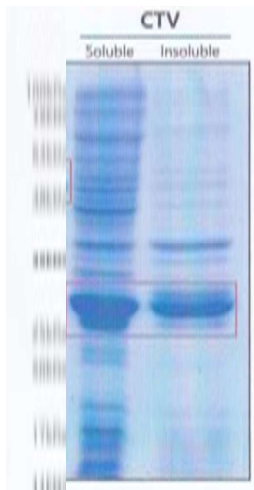
■ ASGV(27.16 kDa)



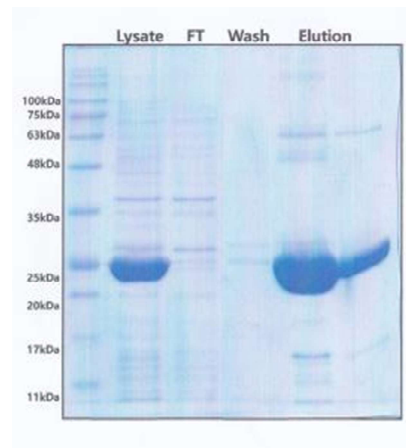
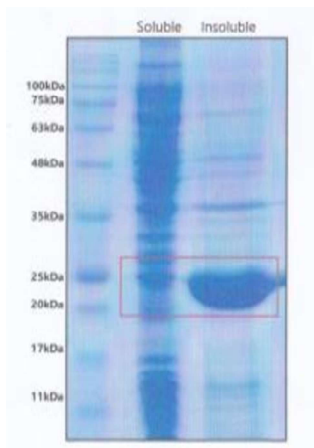
■ ASPV(42.16 kDa)



■ CTV(24.77 kDa)



■ GLRaV1(25 kDa)

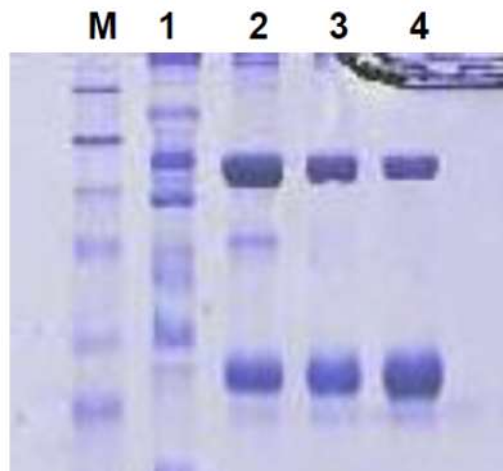


## (2) 과수 바이러스 항체 제작

### ㉠ 항체 정제

- 항원을 암컷 마우스에 면역시킨후 췌장세포를 채취함. primary cell culutre와 암 세포의 fusion을 통해서 항체 발현 세포를 선별함. 세포 배양액 상등액은 Immuno-affinity column chromatography을 이용하여 항체 정제

<Immuno-affinity column chromatography 이용하여 세포 배양액 상등액에서 항체 정제>



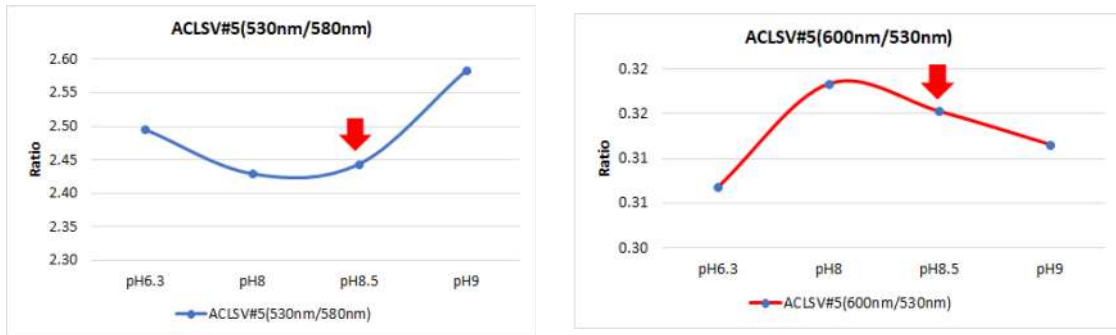
### ㉡ 항체 pH 및 농도 설정 최적화

- Çam 등(2016년) 발표논문에 근거에 따라서 LFA 적용 단클론 항체 pH 및 농도를 최적화하였음.

### ① ACLSV

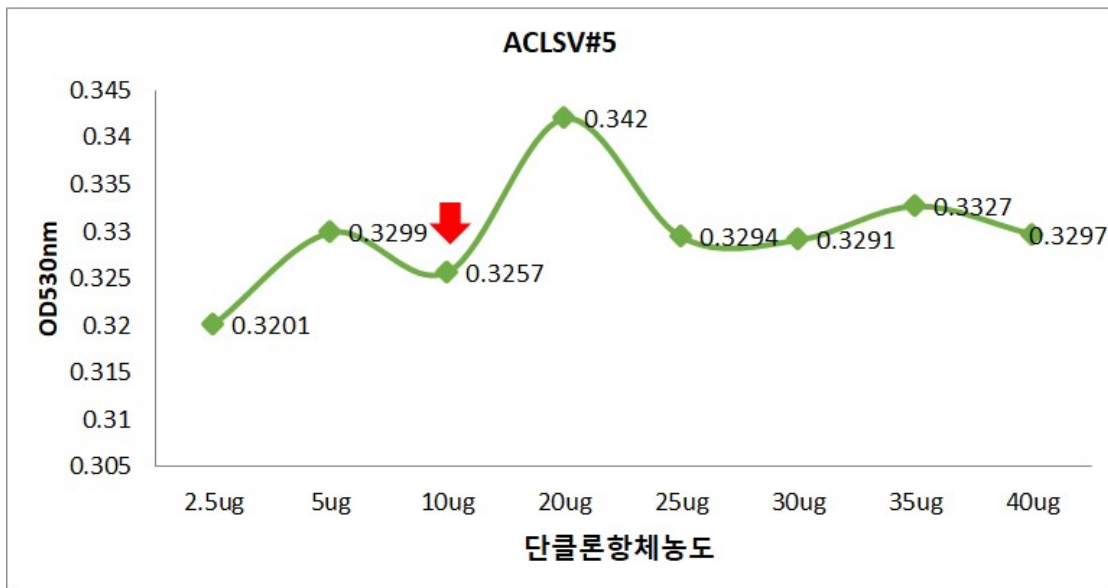
- 0.1ml AuNP에 0.2M  $K_2CO_3$ 를 첨가하여 pH를 6.3, 8.0, 8.5, 9.0으로 조정함. 8ug ACLSV#5를 첨가하고 상온에서 1시간 반응후에 ELISA reader를 이용해서 530nm, 580nm, 600nm 구간에서 흡광도를 측정함. OD530nm/OD580nm, OD600nm/OD530nm 비율로 계산하여 OD530nm/OD580nm은 감소하다가 증가하는 pH, OD600nm/OD530nm은 증가하다가 감소하는 pH가 일치하는 곳을 최적화된 pH로 설정함.
- OD530nm/OD580nm와 OD600nm/OD530nm가 일치하는 곳은 pH = 8.5 임.

○ACLSV 단클론 항체의 pH 선정



- 0.1ml AuNP을 pH8.5로 조정하고 ACLSV#5 항체를 2.5, 5, 10, 20, 25, 30, 35, 40ug 농도 범위에서 반응시키고 530nm 흡광도를 측정하였음. 참고문헌(Çam 등, 2016년) 근거에 따라서 항체처리농도가 증가하는 구간에서 흡광도가 감소하다가 증가하는 지점인 10ug이 적절한 항체 농도임을 확인함.

○ ACLSV 단클론 항체 농도에 대한 반응 곡선



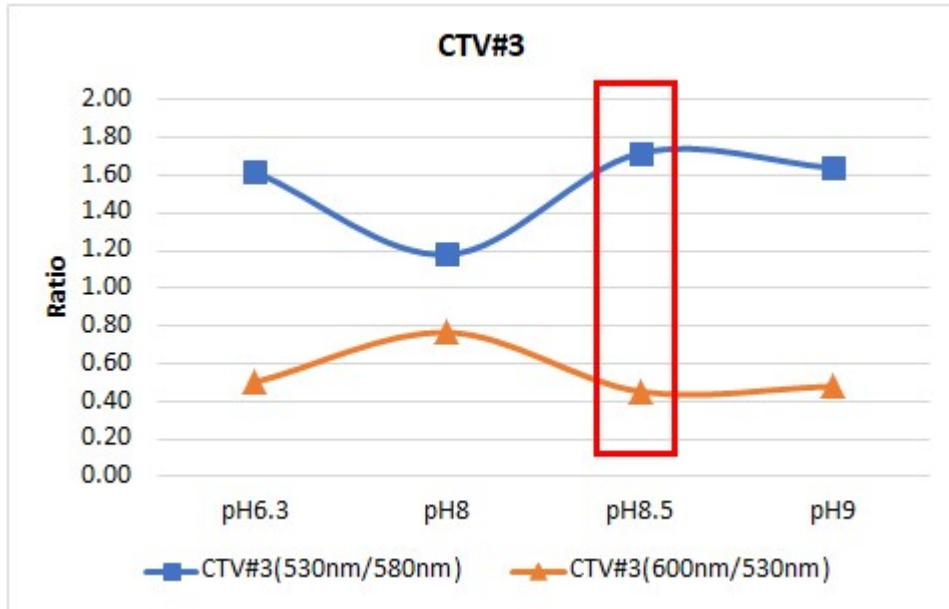
② CTV

- 0.1ml AuNP에 0.2M  $K_2CO_3$ 를 적용하여 pH를 6.3, 8.0, 8.5, 9.0으로 조정함. 8ug CTV#3를 첨가하고 상온에서 1시간 반응후에 ELISA reader를 이용해서 530nm, 580nm, 600nm 흡광도를 측정함. OD530nm/OD580nm, OD600nm/OD530nm 비율로 계산하여 OD530nm/OD580nm은 감소하다가 증가하는 pH, OD600nm/OD530nm은 증가하다가 감소하는 pH가 일치하는 곳을 최적화

된 pH로 설정함.

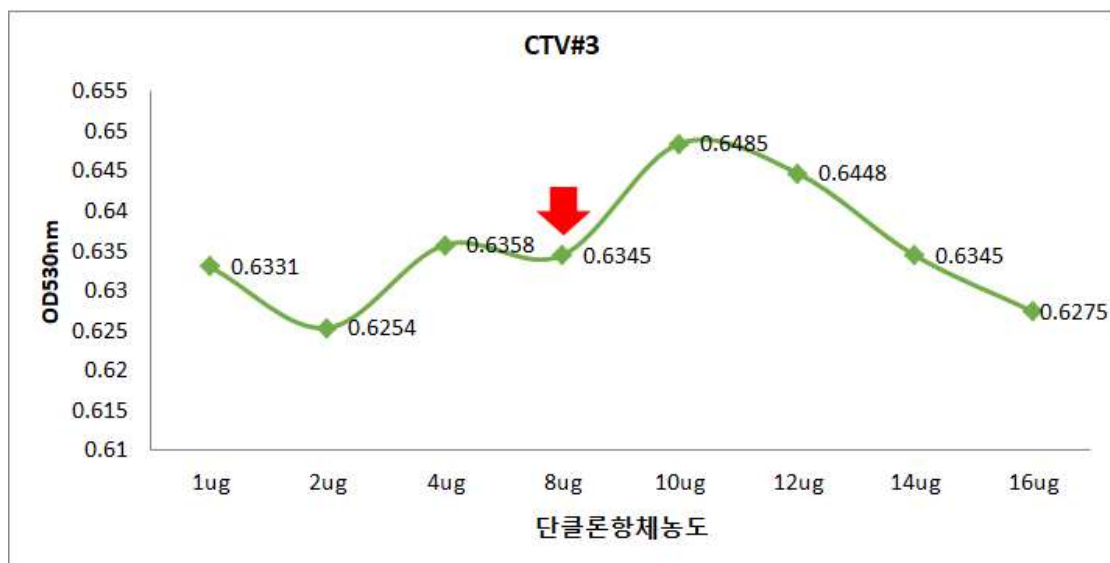
- OD530nm/OD580nm와 OD600nm/OD530nm가 일치하는 곳은 pH = 8.5 임.

■ CTV 단클론 항체의 pH 선정(OD530nm/OD580nm, OD600nm/OD530nm)



- 0.1ml AuNP을 pH8.5로 조정하고 CTV#3 항체를 1, 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16ug 농도 범위에서 반응시키고 530nm 흡광도를 측정하였음. 참고문헌(Çam 등, 2016년) 근거에 따라서 항체처리농도가 증가하는 구간에서 흡광도가 감소하다가 증가하는 지점인 8ug이 적절한 항체 농도임을 확인함.

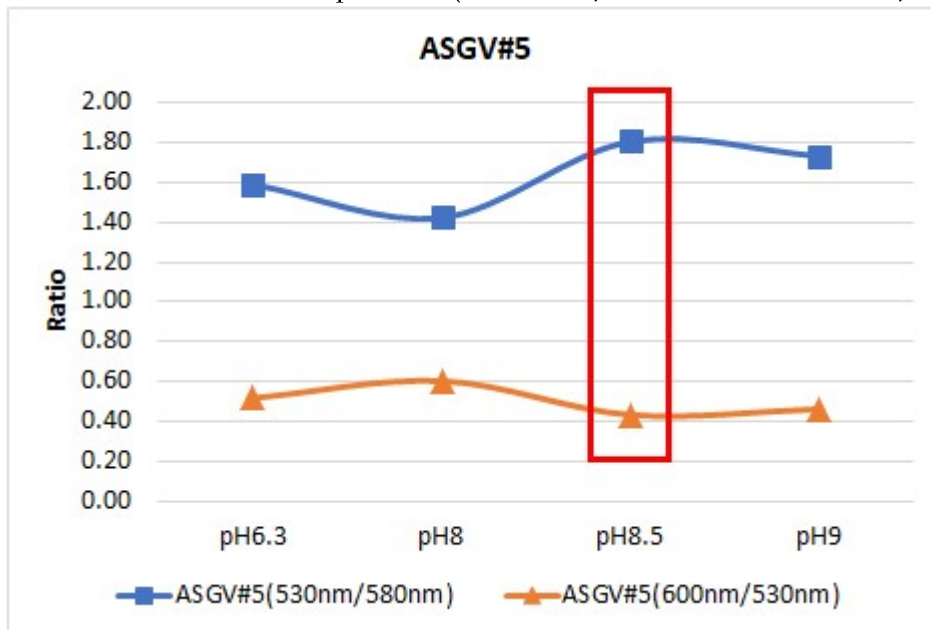
○ CTV 단클론 항체 농도에 대한 반응 곡선



③ ASGV

- 0.1ml AuNP에 0.2M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 적용하여 pH를 6.3, 8.0, 8.5, 9.0으로 조정함. 8ug ASGV#5를 첨가하고 상온에서 1시간 반응후에 ELISA reader를 이용해서 530nm, 580nm, 600nm 흡광도를 측정함. OD530nm/OD580nm, OD600nm/OD530nm 비율로 계산하여 OD530nm/OD580nm은 감소하다가 증가하는 pH, OD600nm/OD530nm은 증가하다가 감소하는 pH가 일치하는 곳을 최적화된 pH로 설정함.
- OD530nm/OD580nm와 OD600nm/OD530nm가 일치하는 곳은 pH = 8.5 임.

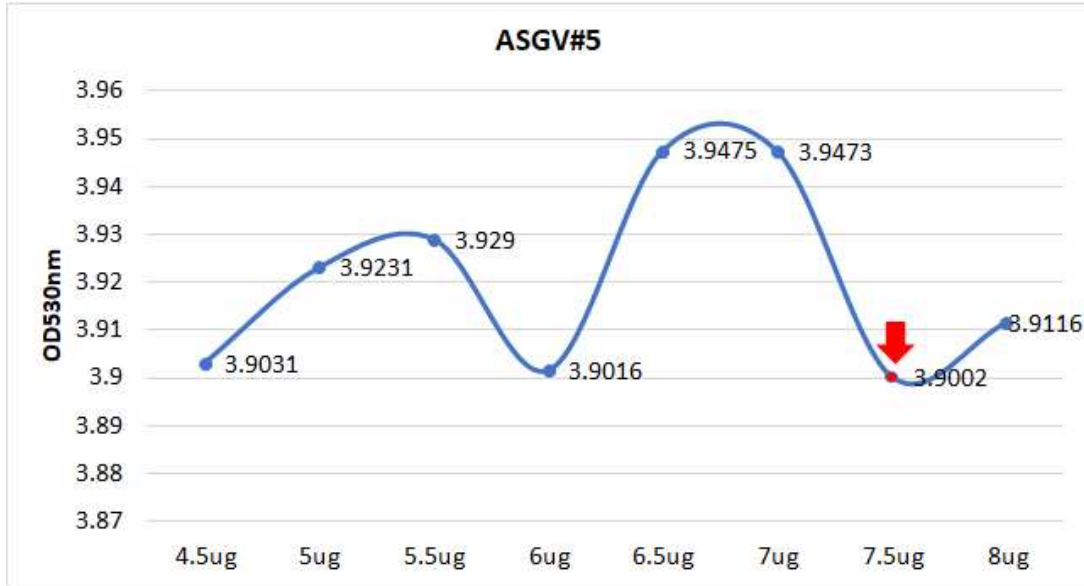
■ ASGV 단클론 항체의 pH 선정(OD530nm/OD580nm, OD600nm/OD530nm)



- 0.1ml AuNP을 pH8.5로 조정하고 ASGV#5 항체를 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8ug 농도 범위에서 반응시키고 OD530nm 측정하였음. 참고문헌(Çam 등, 2016년) 근거에 따라서 항체처리농도가 증가하는 구간에서 흡광도가 감소하다가 증가하는 지점인 7.5ug이 적절한 항체 농도임을 확인함.



○ASGV 단클론 항체 농도에 대한 반응 곡선

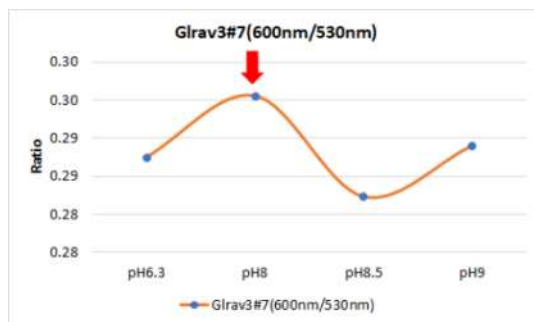
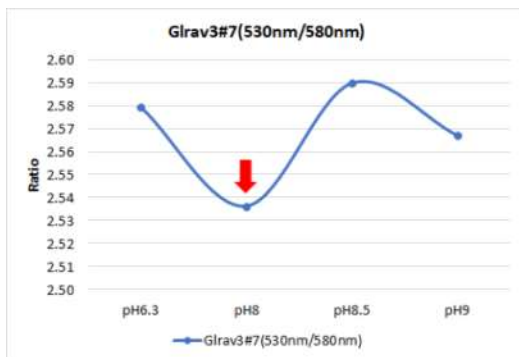


④ GLRaV3

0.1ml AuNP에 0.2M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 적용하여 pH를 6.3, 8.0, 8.5, 9.0으로 조정함. 8ug CTV#3를 첨부하고 상온에서 1시간 반응후에 ELISA reader를 이용해서 530nm, 580nm, 600nm 흡광도를 측정함. OD530nm/OD580nm, OD600nm/OD530nm 비율로 계산하여 OD530nm/OD580nm은 감소하다가 증가하는 pH, OD600nm/OD530nm은 증가하다가 감소하는 pH가 일치하는 곳을 최적화된 pH로 설정함.

- OD530nm/OD580nm와 OD600nm/OD530nm가 일치하는 곳은 pH = 8.0 임.

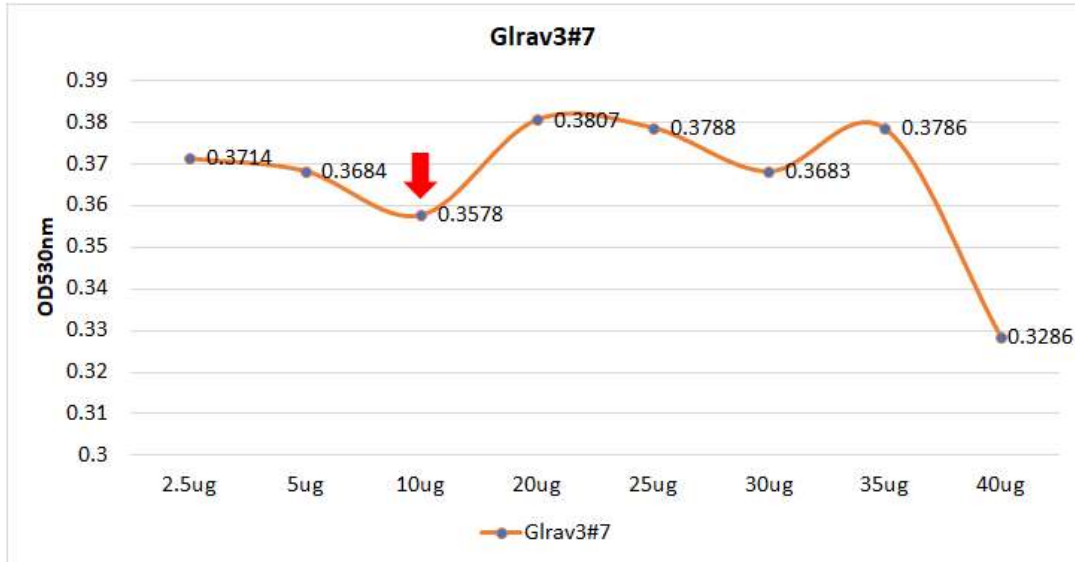
○GlraV3 단클론 항체의 pH 선정



- 0.1ml AuNP을 pH8.5로 조정하고 ASGV#5 항체를 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8ug 농도 범위에서 반응시키고 OD530nm 측정하였음. 참고문헌(Çam 등, 2016

년) 근거에 따라서 항체처리농도가 증가하는 구간에서 흡광도가 감소하다가 증가하는 지점인 7.5ug이 적절한 항체 농도임을 확인함.

○Glrav3 단클론 항체 농도에 대한 반응 곡선

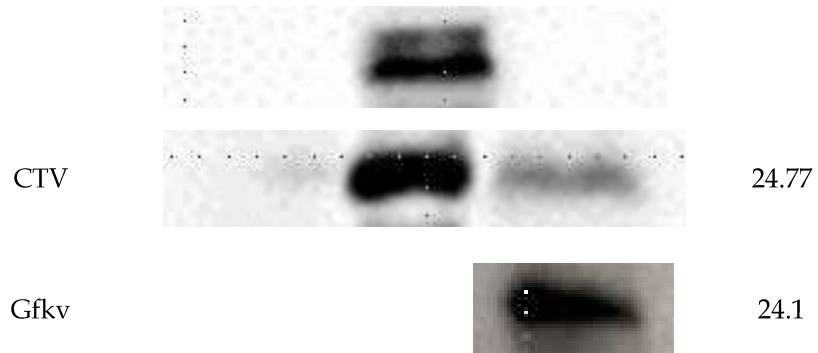


㉞ 현장시료에 대한 단클론항체 반응성 평가

- 과제를 통해 개발된 과수 바이러스·바이로이드 RT-PCR 진단키트를 이용해서 검증된 현장시료는 Plant lysis buffer[1M Tris-HCl(pH8.5), 50% glycerol, 0.25M EDTA, 10% SDS]를 이용하여 파쇄하여 확보한 상등액을 이용하여 western blot 수행함. 제작한 단클론 항체를 100 ~ 1000 배 희석하여 4도, 12시간 이상 반응함. HRP(horseradish peroxidase)가 tagging된 anti-mouse IgG 항체를 상온 1시간 반응하여 ECL(enhanced chemilluminescence) 반응을 통해서 제작한 단클론 반응성을 확인함.
- 현장시료는 ASPV를 제외한 ACLSV, ASGV, CTV, Gfkv에서는 예상위치에서 밴드가 관찰함.

[현장시료에 대한 단클론항체 western blot 결과]

단클론항체명	무감염	양성대조군	감염시료	크기(kDa)
ACLSV				21.5
ASGV				27.16
ASPV				42.16



나) AuNP 기반 스트립 개발 및 최적화

① ACLSV

- Coupling 항체는 8ug 사용하고 대조선 항체는 0.5ug anti-mouse IgG, 지시선 항체는 1ug ACLSV#5 사용함.
- 50mg 무감염시료 잎과 감염시료 잎은 1ml lysis buffer(10mM Tris-HCl, 1% Tween20, 0.1% PVP)를 넣고 5~10초 동안 호모게나져를 이용하여 분쇄함. 분쇄한 시료는 14,000x rpm, 5분동안 원심분리하여 0.1ml 상등액을 스트립에 적용
- 양성대조군은 미생물에서 발현시킨 항원단백질임.

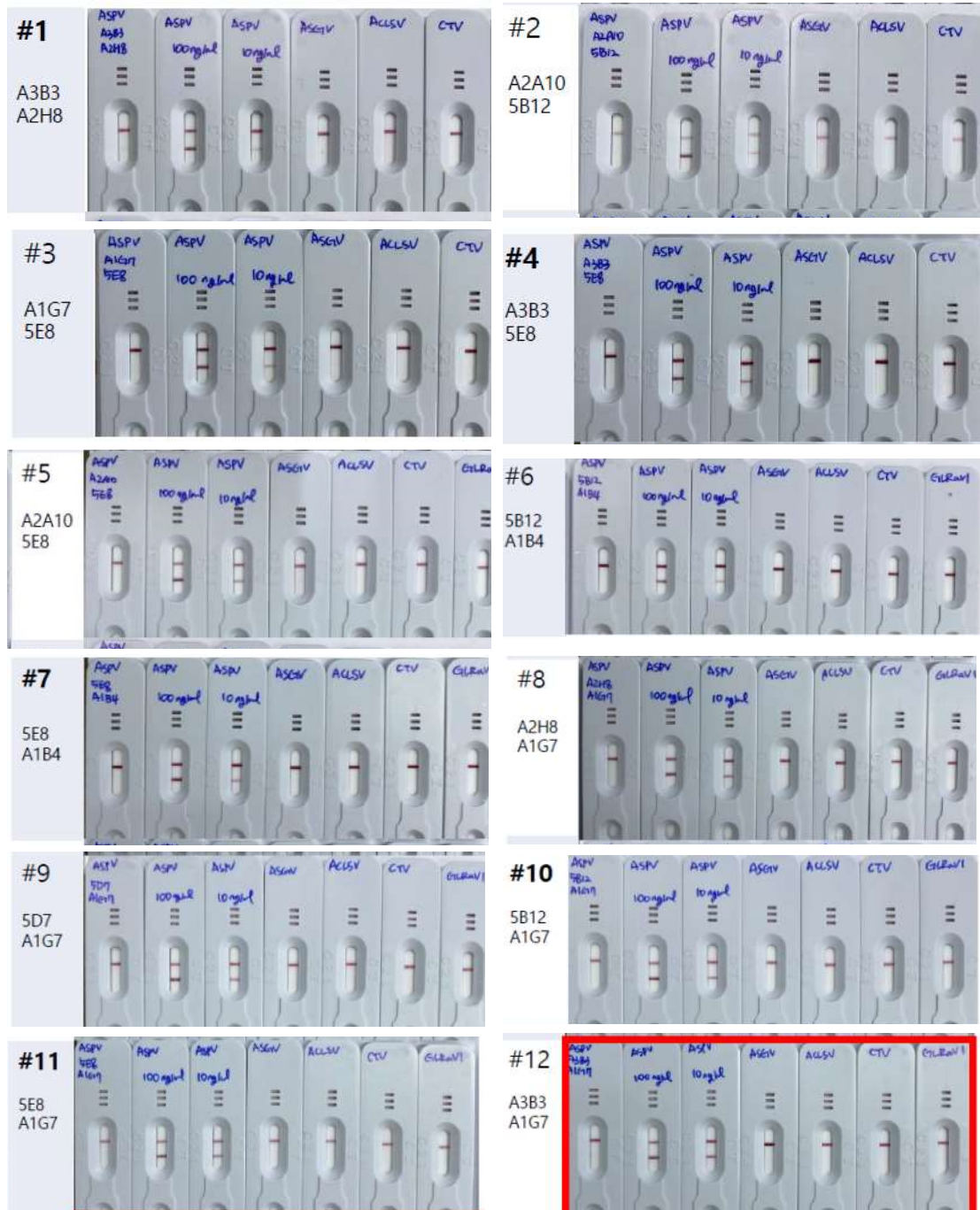


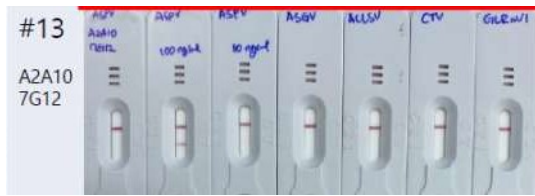
C: 대조선, T: 지시선

② ASPV

- ASPV 항체 pair test를 통해 13종 pair을 선정하여 ASPV 항원(재조합단백질)과의 교차반응성을 확인함. 그외 4종 재조합단백질 항원(ASGV, ACLSV, CTV, GLRaV1)과의 교차반응도 동시에 확인함.
- 13가지 pair 중에 A3B3(Test)과 A1G7(Coupling)을 선정함.

[ASPV 항체 선별]

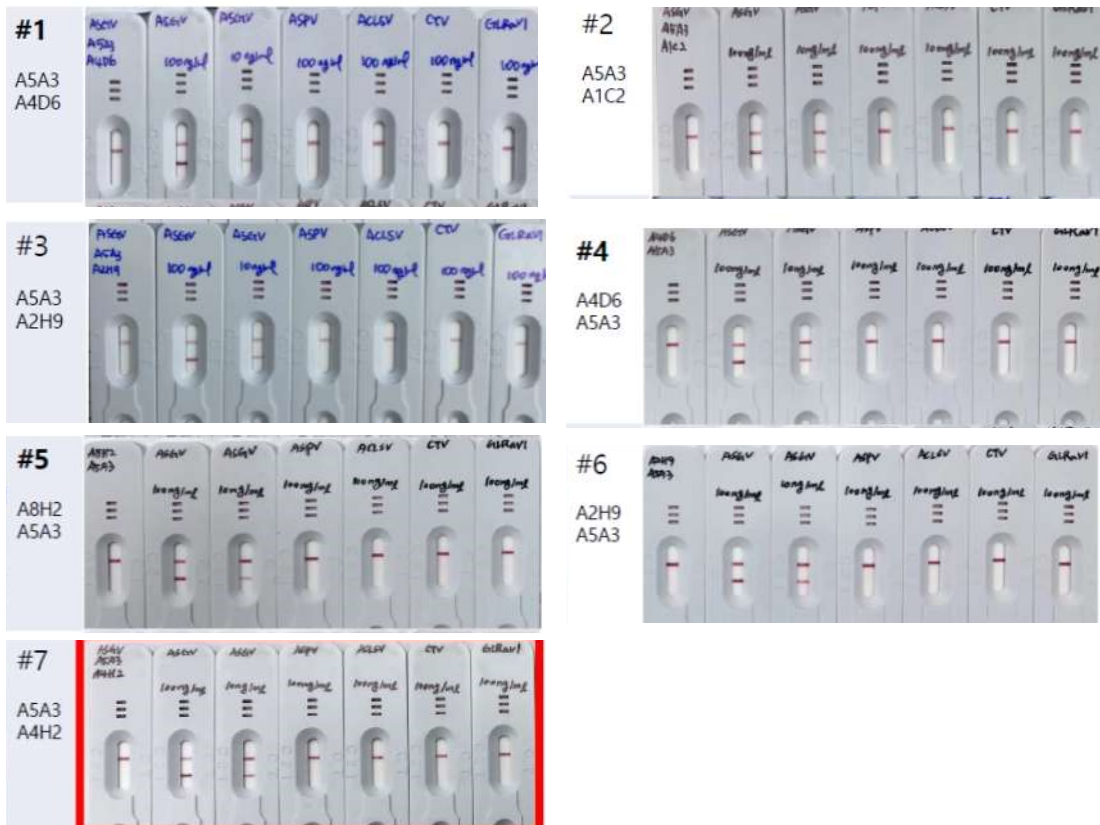




### ③ ASGV

- ASGV 항체 pair test를 통해 6종 pair을 선정하여 ASGV 항원(재조합단백질)과의 교차반응성을 확인함. 그외 4종 재조합단백질 항원(ASPV, ACLSV, CTV, GLRaV1)과의 교차반응도 동시에 확인함.
- 7가지 pair 중에 A5A3(Test)과 A4H2(Coupling)을 선정함.

[ASGV 항체 선별]

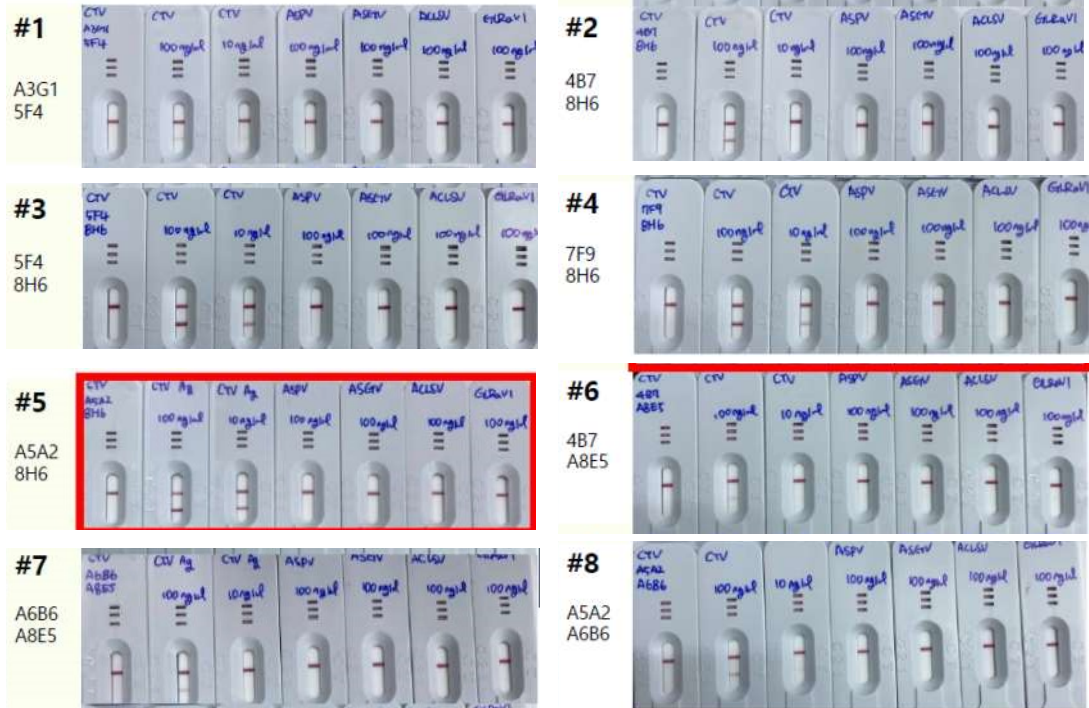


### ④ CTV

- CTV 항체 pair test를 통해 4종 pair을 선정하여 CTV 항원(재조합단백질)과의 교차반응성을 확인함. 그외 4종 재조합단백질 항원(ASPV, ASGV, ACLSV, GLRaV1)과의 교차반응도 동시에 확인함.

- 8가지 pair 중에 A5A2(Test)과 8H6(Coupling)을 선정함.

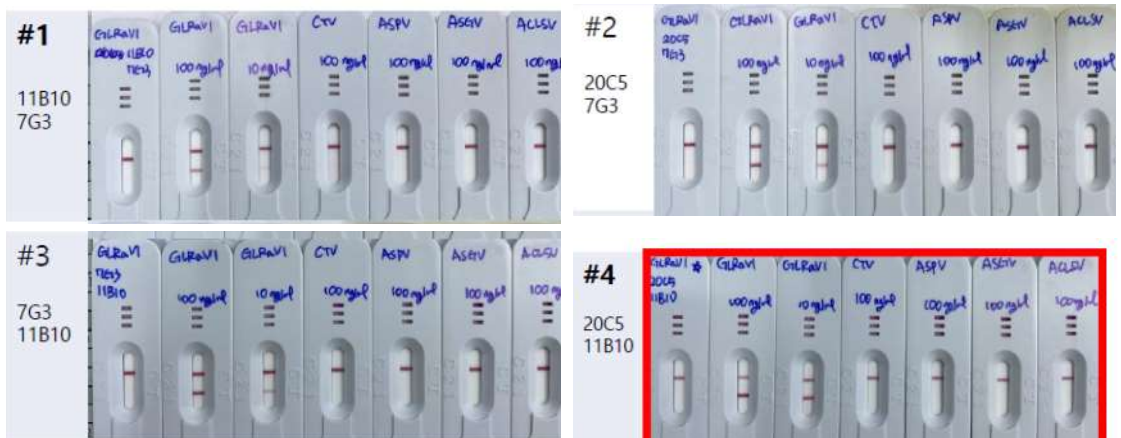
[CTV 항체 선별]

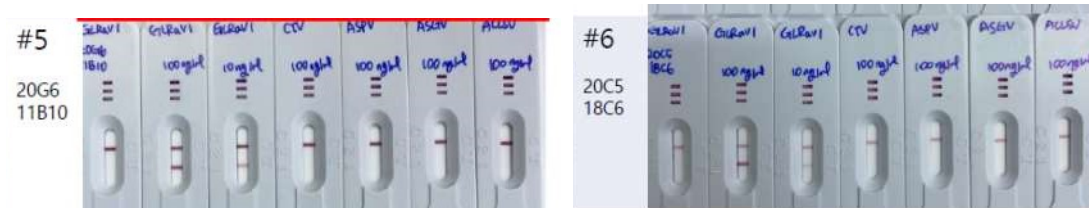


⑤ GLRaV1

- GLRaV1 항체 pair test를 통해 4종 pair을 선정하여 GLRaV1 항원(재조합단백질)과의 교차반응성을 확인함. 그외 4종 재조합단백질 항원(ASPV, ASGV, ACLSV, CTV)과의 교차반응도 동시에 확인함.
- 6가지 pair 중에 20C5(Test)과 7G3(Coupling)을 선정함.

[GLRaV1 항체 선별]





다) 산화철 기반 스트립 제조 및 평가

① 산화철 커플링 효율 측정

- 100ug CTV-3(10ug/ul)는 40nm AuNP, 350~400nm MNP(nanocs, 외산), 350~400nm MNP(AMO, 국산)에 각각 혼합하여 사용함.
- 커플링 1시간 수행, pellet 침전 후 상등액 OD 측정상등액을 제거하고 pellet은 10ul dilution buffer(10mM Tris-Cl, pH8.5/0.25% BSA)로 현탁함.
- 항체는 10mM Tris-Cl(pH8.5)로 희석함.
- AuNP, AMO 소재는 항체 커플링 이후 A280nm 값이 음의 값 또는 0.01 값을 나타내서 모든 항체가 소재에 결합되는 것을 확인하였지만 nanocs 소재는 커플링이 되지 않고 남아 있음을 확인함. 추가적으로 커플링 방법에 따른 차이를 보여주고 있음.
- 커플링항체를 패드에 적용할 경우 고유의 색깔을 띠고 있음.

■ 항체 커플링 이후 상등액 OD 측정

시료명	단백질 농도 (mg/ml)
AuNP와 CTV항체와 반응 상등액	0
Fe3O4(nanocs사)와 CTV항체와 반응 상등액	0.129
Fe3O4(AMO사)와 CTV항체와 반응 상등액	0.009

■ 커플링 항체 패드 적용



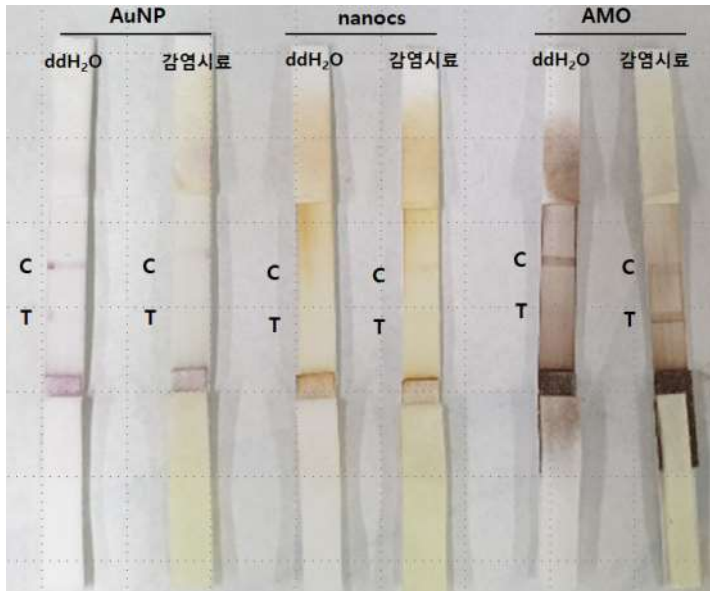
G: AuNP, N: Fe3O4(nanocs), A: Fe3O4(AMO)

② CTV 감염시료 적용후 진단소재 비교평가

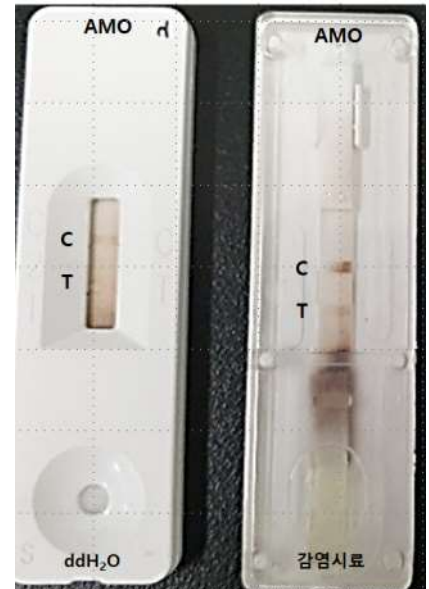
- CTV 감염시료를 이용하여 진단소재를 비교평가하였음.
- AuNP, nanocs(외산), AMO(국산) 진단소재를 이용하여 스트립과 카세트에 적용하였을때 민감도 비교평가하였음.

· AuNP 소재와 nanocs 소재를 적용할 경우 대조선과 지시선이 약하게 관찰되는 반면에 AMO 소재는 감염시료에서 대조선과 지시선이 구분되게 관찰됨.

■ 스트립에서 비교평가



■ 카세트에서 평가

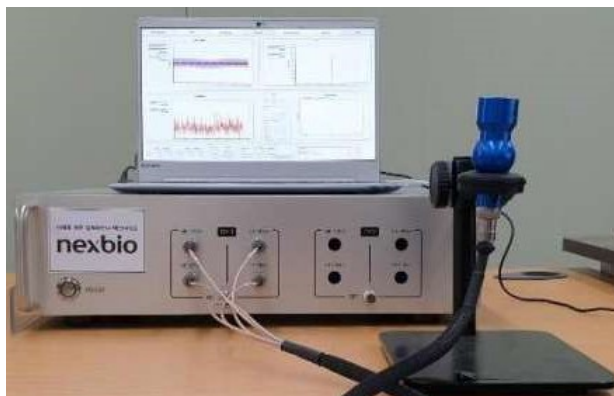


라) 휴대용 스트립진단기기 개발

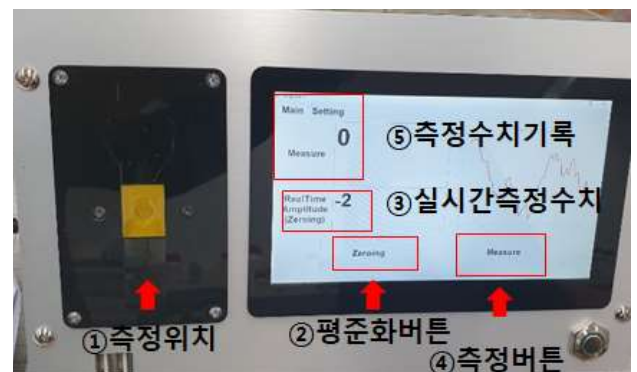
① 기기의 소형화

· 기존 장비는 휴대하기 힘들고 진단장치와 본체가 분리되어있으며 별도의 전원공급장치가 없음. 개선한 제품은 측정장치와 디스플레이의 일체형 장치이며 배터리 전원공급장치로 성능을 개선하였음.

기존



현재

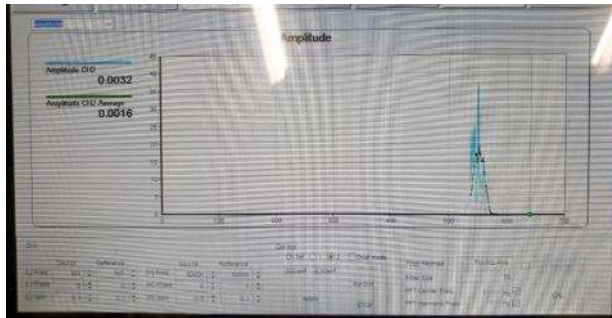




② 진단기기 화면 UI(User Interface) 변경

- 기존 진단기기 프로그램 화면은 매우 복잡하고 초보자들이 사용하기 어려웠음. 그래서 사용하기 편리함을 적용한 진단기기 화면으로 업그레이드함.

기존



현재

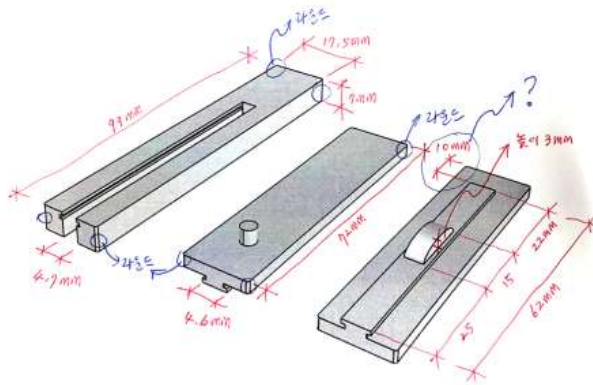


③ 스트립 슬라이딩 홀더 개발

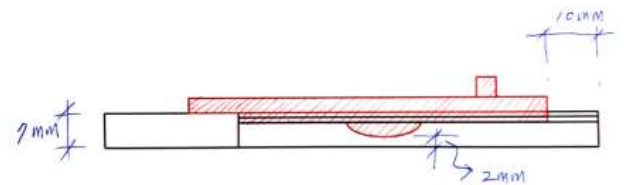
가) 기구설계

- 스트립홀더가 수평으로 슬라이딩하여 측정하도록 고안함.

■ 전체 모형도



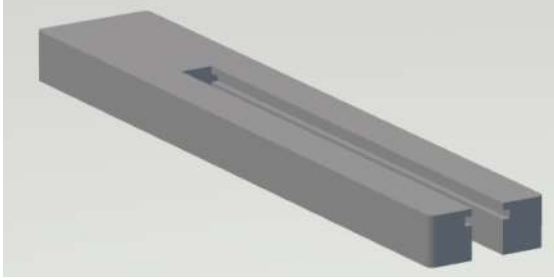
■ 스트립홀더



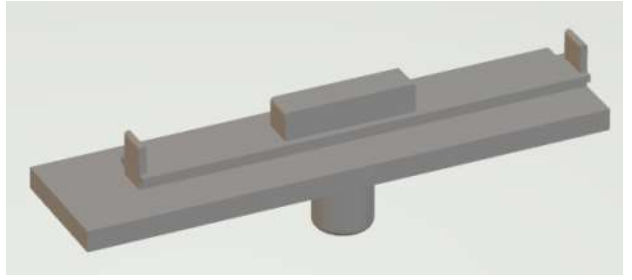
나) 3D 설계도면

- 진단기기 하부 고정판과 슬라이딩 스트립 홀더

■ 진단기기 하부 고정판



■ 슬라이딩 스트립 홀더



다) 목업

■ 휴대용진단기기와 스트립홀더



■ 스트립홀더를 휴대용진단기기에 결합 모습



④ 측정결과

· 측정부위를 손가락으로 누르지 않을 경우 또는 누를 경우 및 슬라이딩 스트립 홀더를 적용할 경우 별차이가 없었음.

○대조선 측정

■ 스트립을 누르지 않을경우



○지시선 측정



■ 스트립을 누를때



■ 슬라이딩 스트립 홀더 적용할 경우



## 2. 연구개발성과

### 2-1. 기술요약정보

	과수 바이러스/바이로이드 진단 RT-PCR 키트	과수바이러스 현장진단키트
가. 연도	· 2018년 ~ 2020년	· 2019년 ~ 2020년
나. 기술명	· VCheck Virus Detection kit(A&P, Grape, Mandarin, Peach)	· 과수바이러스 현장진단키트
다. 요약내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 3시간 이내 과수바이러스와 바이로이드 진단검사할 수 있는 RT-PCR 키트</li> <li>· 사과/배, 복숭아, 포도, 감귤 4종 키트로 개발함</li> <li>· 3 - 5종 바이러스/바이로이드를 동시진단가능</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 15분 이내 감염 여부를 현장에서 판단할수 있는 휴대용검사키트</li> <li>· 산화철 기반 스트립 1종</li> <li>· 휴대용 진단기기 1종</li> </ul>
라. 기술완성도	· 시장개척단계	· 기술개발완료

## 3. 연구결과

### 3-1. 기술적성과

- 과수 바이러스/바이로이드 진단 RT-PCR 키트는 기존 시판제품에 대비 돌연변이

진단능력을 개선하였으며 비특이적 반응성을 감소시켰음.

- 과수바이러스 현장진단키트는 기존 골드소재를 산화철소재로 개선하여서 가시적인 진단효과 및 휴대용기기로 민감하게 측정할 수 있도록 개선함.

### 3-22. 경제적성과

가. 개발기술과 제품개발을 통한 생산성 향상

- 과수바이러스 진단키트를 통해 과수질병의 선제적 차단방역 가능
- 과수 무병묘 선별 도구 활용을 통한 농가 생산성 증대

나. 시장점유율

- 국내시장 5% 점유(현재) → 10% 이상 목표(향후 3년이내)
- 해외시장 1% 점유(5년 이내)

다. 매출액증대

- 국내시장 0.3억원(현재) → 1.0억원(3년 이내)
- 해외시장 1.0억원(향후 5년이내)

마. 고용창출

- 석사급 연구인력 1명 채용(2020년)

바. 산업기여도

- 과수 바이러스 진단영역 개척
- 과수 바이러스 사전방역을 통한 농가수익증대
- 차세대염기서열분석 기반 과수바이러스 고해상정밀진단영역 개척

#### 4. 사업화성과 및 매출실적

##### - 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.3억원	
			향후 3년간 매출	1.0억원	
		관련제품	개발후 현재까지	억원	
			향후 3년간 매출	억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 5 % 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : 10 % 국외 : %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			5 위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			3 위

##### - 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세 부 항 목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	3년			
	소요예산(백만원)	100			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		0.3	1.0	4.0	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	5	10	20
		국외			5
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	- 열매채소, 과채류, 콩과종류, 엽채류, 근채류에 대한 바이러스 진 단 영역 개척			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)				
	수 출				

### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 3-1. 목표

##### 가. 최종목표

- 과수 바이러스의 감염 실태 조사에 근거한 신속 현장 진단 기술 개발

##### 나. 세부목표

- 사과, 배, 복숭아, 포도, 감귤에 발생하는 바이러스 발생 실태 규명
- 주요 과수 바이러스 신속 현장 진단 기술 개발
- 묘목 생산 및 공급체계 개선 정책 방안 마련
- 검사 대상 바이러스 종자관리 요강 현행화

##### 다. 1차년도

###### (1) 개발 목표

- 주관연구기관(한국생명공학연구원)
  - 바이러스 감염 의심 사과대목, 포도 시료의 수집 및 시료의 분석
- 1협동연구기관(경북대학교)
  - 사과 및 복숭아 바이러스 감염주 채집 및 주요 바이러스 감염 실태 조사
- 2협동연구기관(전남대학교)
  - 배 바이러스 피해 실태 조사 및 감염주 시료 분석
- 3협동연구기관(국립종자원)
  - 감귤 바이러스 의심 시료 수집 및 피해 조사
- 4협동연구기관(넥스바이오)
  - 국내 발생 과수 바이러스 서열 정보 분석

###### (2) 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관(한국생명공학연구원)
  - 주산지 2개소 이상 지역에서 시료 수집
  - Pre-sequence 정보 부재 바이러스 동정 기법 활용
- 1협동연구기관(경북대학교)
  - 사과 및 복숭아 전국 주산지 주요 바이러스 감염주 채집 사과 및 복숭아
  - 주요 바이러스 진단법 확보 및 감염실태 조사
- 2협동연구기관(전남대학교)
  - 배 주산지 2개소 이상에서 바이러스 의심 감염 시료 채취 피해조사 정도 분석
- 3협동연구기관(국립종자원)
  - 감귤 바이러스 감염 의심 시료 수집 및 실태 조사
- 4협동연구기관(넥스바이오)
  - 주관 및 3개 협동으로부터 분양 받은 정보를 활용 최적 에피토프 선정

## 라. 2차년도

### (1) 개발 목표

- 주관연구기관(한국생명공학연구원)
  - 바이러스 감염 의심 사과대목, 포도 시료의 수집 및 시료의 분석
- 1협동연구기관(경북대학교)
  - 사과 및 복숭아 전국 주산지 주요 바이러스 감염주 채집 및 감염실태 분석
- 2협동연구기관(전남대학교)
  - 배 바이러스 피해 실태 조사 및 감염주 시료 분석
- 3협동연구기관(국립종자원)
  - 과수 무병묘 이력추적시스템 구축
- 4협동연구기관(넥스바이오)
  - 국내 발생 과수 바이러스 서열 정보 분석

### (2) 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관(한국생명공학연구원)
  - 주산지 2개소 이상 지역에서 시료 수집
  - Pre-sequence 정보 부재 바이러스 동정 기법 활용
- 1협동연구기관(경북대학교)
  - 사과 및 복숭아 감염 바이러스 종류 조사
  - 사과 및 복숭아 지역 및 조직별 감염실태 분석
- 2협동연구기관(전남대학교)
  - 배 주산지 2개소 이상에서 바이러스 의심 감염 시료 채취 피해조사 정도 분석
  - 배 바이러스 유전자 정보 수집 및 분석
- 3협동연구기관(국립종자원)
  - 과수 모수 고유번호 부여를 통한 상위 단계 묘목의 바이러스 검정 이력 규정화
  - 감귤 바이러스 감염 의심 시료 수집 및 실태 조사
- 4협동연구기관(넥스바이오)
  - 주관 및 3개 협동으로부터 분양 받은 정보를 활용 최적 에피토프 선정

## 마. 3차년도

### (1) 개발 목표

- 주관연구기관(한국생명공학연구원)
  - 사과대목, 포도 바이러스 시료 수집 및 바이러스별 감염 현황 분석 및 동정된 바이러스 표준 진단법 확립
- 1협동연구기관(경북대학교)
  - 사과 및 복숭아 주요 바이러스 발생실태 및 피해 현황 분석

- 2협동연구기관(전남대학교)
  - 배 바이러스 감염 피해 분석 및 동정된 바이러스 신속진단법 확립
- 3협동연구기관(국립종자원)
  - 주산지별 주요 과수 바이러스의 발생 및 피해현황 DB 구축
- 4협동연구기관(넥스바이오)
  - 국내 발생 과수 바이러스 서열 정보 분석

## (2) 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관(한국생명공학연구원)
  - 아종 포함 100 종의 사과대목, 포도 바이러스 감염 현황 도출
  - 유전자 분석에 의한 30종 표준 진단법 확립
- 1협동연구기관(경북대학교)
  - 사과 및 복숭아 주요 바이러스 발생실태 및 피해 현황 분석
  - 사과 및 복숭아 무병묘 보증시 검사대상 바이러스의 선정
- 2협동연구기관(전남대학교)
  - 배 주요 바이러스 감염 피해 현황 분석
  - 주요 배 바이러스 유전자 분석을 통한 표준 진단법 확립
- 3협동연구기관(국립종자원)
  - 주관, 협동1, 2의 과종별 바이러스 감염 조사 결과를 바탕으로 국내 피해현황
  - DB 구축 과수 주요 바이러스별 검사 매뉴얼 구축(반응 조건 등)
- 4협동연구기관(넥스바이오)
  - 항체 생산 및 과수 바이러스 진단 막대 개발

## 바. 4차년도

### (1) 개발 목표

- 주관연구기관(한국생명공학연구원)
  - 사과대목, 포도 감염 바이러스 신속 현장 진단법 개발
- 1협동연구기관(경북대학교)
  - 사과 및 복숭아 주요 바이러스 피해현황 분석 및 현장 진단법 개발
- 2협동연구기관(전남대학교)
  - 배 바이러스 주요 바이러스 신속 현장 진단법 개발 및 매뉴얼 확립
- 3협동연구기관(국립종자원)
  - 과수 무병묘 생산을 위한 검사대상 바이러스 현행화
- 4협동연구기관(넥스바이오)
  - 국내 발생 과수 바이러스 서열 정보 분석

### (2) 개발 내용 및 범위



- 주관연구기관(한국생명공학연구원)
  - 사과대목 감염 주요 바이러스 2종 신속 현장 진단법 개발
  - 포도 감염 주요 바이러스 3종 신속 현장 진단법 개발
- 1협동연구기관(경북대학교)
  - 사과 및 복숭아 주요 바이러스 현장 진단용 키트 개발
  - 감염바이러스 종류별 피해해석
- 2협동연구기관(전남대학교)
  - 배 감염 바이러스 신속 현장 진단법 개발
  - 주요 감염 바이러스 종류별 피해 분석
- 3협동연구기관(국립종자원)
  - 과수류 주요 바이러스 피해해석을 통한 검사대상 현행화
  - 무병묘의 생산·공급 체계 개선 방안 마련
- 4협동연구기관(넥스바이오)
  - 항체 생산 및 과수 바이러스 진단 막대 개발

### 3-2. 목표 달성여부

#### 가. 연구개발 성과 및 달성도

구분	연도	연구개발 목표	가중치	평가의 착안점 및 기준	달성도 (%)
1차 년도	2017	○ 사과, 배, 복숭아, 포도, 감귤 주산지로부터 바이러스 시료의 수집	100%	- 재배 주산지 2개소 이상에서 확보된 바이러스 시료의 수	100
2차 년도	2018	○ 사과, 배, 복숭아, 포도, 감귤 주산지로부터 바이러스 시료의 수집	30%	- 재배 주산지 2개소 이상에서 확보된 바이러스 시료의 수	100
		○ 수집된 사과, 배, 복숭아, 포도, 감귤 시료의 분석에 의한 바이러스의 분포, 및 발생 현황 도출	50%	- Meta-transcriptome 분석 방법을 활용한 시료의 분석 결과 확보된 contig의 수	100
		○ 과수의 모수 고유 번호 부여를 통한 상위 단계 묘목의 바이러스 검정 이력 규정화	20%	- 고유 번호가 부여된 모수의 수	100
3차 년도	2019	○ 각 과종별(사과, 배, 복숭아, 포도, 감귤)바이러스의 표준 진단법 확립	40%	- Meta-transcriptome 분석 방법을 활용한 시료의 분석 결과를 바탕으로 각 과종별 표준 진단법이 확립된 바이러스의 수	100
		○ 각 과종별(사과, 배, 복숭아, 포도, 감귤)바이러스의 피해 현황 분석	30%	- 국내 과수 바이러스 분포 지도 작성 및 DB 구축 여부	100
		○ 각 과종별(사과, 배, 복숭아, 포도, 감귤)바이러스의 검사 매뉴얼 제작	30%	- 과수 감염 바이러스 검사 매뉴얼 작성이 적용된 바이러스의 수	100

4차 년도	2020	○ 각 과종별(사과, 배, 복숭아, 포도, 감귤)바이러스의 신속 현장 진단법 개발	40%	- 개발된 바이러스의 신속 현장 진단법의 수	100
		○ 무병묘의 생산 및 공급 체계 개선 방안 마련	30%	- 무병묘의 생산 및 공급 체계 개선 방안의 적정성	100
		○ 각 과종별(사과, 배, 복숭아, 포도, 감귤) 주요 바이러스의 검사 대상 현행화	30%	- 바이러스 발생 현황 분석에 기초한 종자 관리 요강의 업데이트 여부	100
최종평가		○ 국내 주요 과수 바이러스 발생 피해 조사	40%	- 국내 주요 과수 바이러스 피해 분석 여부	100
		○ 국내 주요 과수 바이러스 신속 현장 진단 기술 개발 및 현장 진단 매뉴얼 확립	30%	- 1-2시간 이내 80-90% 확인 가능한 신속 현장 진단 기술 개발 및 현장 진단 매뉴얼 대상 바이러스의 수	100
		○ 무병묘의 생산·공급 체계 개선 및 검사 대상 현행화	30%	- 제안된 정책 건의의 수	100

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

## 4. 연구결과의 활용 계획 등

### 가. 연구개발 결과의 활용방안 및 활용 분야

- 공공적인 측면에서 본다면, 본 과제를 통해 개발되는 칩은 필요로 하는 농진청 산하의 여러 연구기관, 종묘회사, 및 관련 산업계에 배포되어 실질적인 연구에 사용되어 지거나, 국가적인 survey project 등에 활용
- 개발된 과수 바이러스 신속 현장 진단 키트를 활용하여 과수 묘목 유통 체계 지원에 활용
- 신종 및 미기록 바이러스는 분리 증식하여 바이러스 유전자원으로 등록 기탁하며, 지속적인 바이러스 특성 구명으로 지적재산권 확보 자원으로 이용
- 신뢰성 있는 민원해결 및 대책수립 : 이상증상 원인규명 및 병역학 예측으로 적절한 대책 수립의 근거 확보
- 과수 우량 건전묘의 생산 및 공급 체계 개선에 활용
- 국내 발생 과수 바이러스 진단에 활용
- 국내 주요 과수 바이러스 모니터링 및 관리방안에 활용
- 과수 바이러스 진단기술의 스마트팜 산업 응용
- 바이러스, 바이로이드 및 세균 분포도와 농작물의 상관관계 분석을 통한 지역특화 작물 개발 및 육성
- 병해충에 강한 작물 개량 응용

### 나. 연구성과의 기대성과 및 파급효과

#### 1) 기술적 측면

- 우리나라 과수 바이러스의 발생 및 분포 조사 방법론 확립
- 주요 과수바이러스 신종, 미기록 과수 바이러스 탐색 및 이용
- 유용 바이러스 자원의 지적재산권 확보로 원천기술 자원의 선점
- 현장 진단키트 대중화를 통하여 무병묘 공급 기술의 확립과 농업의 생산성 향상에 기여

#### 2) 경제적·산업적 측면

- 지역별 과수별 문제 바이러스에 대한 맞춤형 대책 수립으로 병 피해 조기차단
- 국내 과수 바이러스 특이 진단 키트를 보급함으로써 정확한 진단 및 외화대체 효과
- 농산물 수출입관련 정책자료 활용
- 바이러스 관리체계의 세계적 선진화로 국가위상 제고
- 사과 무병 묘목 갱신에 의한 연간 928억원의 경제적 기대 효과 (11, 농림축산식품부)

3) 최종보고서 지적 사항에 대한 수정·보완

○ 사과 무병묘목 갱신에 의한 연간 928억원의 경제적 기대효과가 있다고 하였는데 이에 대한 근거 제시 필요

- 종자관리요강에서 국가관리 바이러스로 지정된 바이러스·바이로이드가 제거된 유묘를 공급할 경우 최소 30%의 증산이 가능할 것으로 추정. 연간 사과 생산액은 2019년 기준 한국농촌연구원 농업관측본부의 통계에 의하면 1.24조원. 30%의 증산이 이루어지면 3,700억. 2025년까지 25% 수준으로 보증묘 공급이 가능할 것으로 추정. 3,700억의 25%는 약 930억

○ 개발된 진단키트의 활용으로 사과대목 외의 5대 과수에 대한 경제적 기대효과를 얻을 수 있는 데이터 제시가 필요하다고 봄

- 종자관리요강에 등재된 5대 과종의 감염 과수 바이러스를 검출할 수 있는 진단키트의 활용에 의한 실증적인 경제적 기대 효과에 대한 데이터는 보증묘의 공급이 완료되고 다년간 생산성을 비교하여야 도출 가능함

○ 개발된 진단키트의 활용으로 사과대목 외의 5대 과수에 대한 경제적 기대효과를 얻을 수 있는 데이터 제시가 필요하다고 봄

- 본 과제의 목표는 과수에 발생하는 바이러스·바이로이드의 발생 현황 조사 및 이들 병원균의 진단법 개발에 있음. 병원균 감염의 수준 대비 발생 가능한 경제적인 효과는 피해 해석의 연구 분야로 본 과제의 연구 결과를 바탕으로 중장기 후속 연구로 추진되어야 소득 증감의 정량적 데이터를 제시할 수 있음.
- 현재 국립원예특작과학원 및 국립종자원이 협력하여 제한적이거나 각각의 사과 바이러스 감염에 따라 나타나는 피해 수준을 측정하는 피해 해석 연구가 국내에서는 최초로 진행되고 있음

○ 이 연구결과가 사업화가 될 수 있는 모델을 정확히 제시하였으면 함. 예를 들어 묘목이 농가까지 가기 전에 무병묘 검사를 할 수 있는 시스템을 구축하여 이를 활성화 할 수 있는 제안적 모델은 있어야 될 것으로 판단함

- 본 과제의 연구 성과물인 바이러스 진단 키트는 과수 묘목의 보증을 위하여 판매되고 사업화가 진행 중에 있음. 그러나 보증묘 인증을 위한 바이러스·바이로이드 검사는 검사 인증기관 지정이 이루어지지 않아서 국립종자원 및 농진청 산하 실용화재단에서만 검사가 수행되고 있음. 따라서 농림부에서 과수 묘목의 보증을 위한 유묘 검사를 수행할 수 있는 인증기관 지정을 추진할 의사가 없어서 추가적인 시장 확대 및 사업화 모델을 제시하기 어려움

## 붙임. 참고문헌

- Toru Iwanami (2010) Properties and Control of Satsuma Dwarf Virus. JARQ, 44(1), 1-6
- Jeremy R. Tompson, Indranil Dasgupta, Marc Fuchs, Toru Iwanami, Alexander V. Karasev, Karel Petrzik, Helene Sanfaçon, Ioannis Tzanetakis, Rene van der Vlugt, Thierry Wetzler, Nobuyuki Yoshikawa and ICTV Report Consortium. (2017) Journal of General Virology, 98:529 - 531.
- LI Ping, LI Min, ZHANG Song, WANG Jun, YANG Fang-yun, CAO Meng-ji1, LI Zhong-an. (2018) Complete genome sequences of four isolates of Citrus leaf blotch virus from citrus in China. Journal of Integrative Agriculture, 17(3): 712 - 715.
- Emilyn E. Matsumura, Helvécio D. Coletta Filho, Shahideh Nourin, Bryce W. Falk, Luca Nerva, Tiago S. Oliveira, Silvia O. Dorta and Marcos A. Machado. (2017) Viruses, 9, 92.
- Subhas Hajeri, Chandrika Ramadugu, Manjunath Keremane, Georgios Vidalakis and Richard Lee. (2010) Nucleotide sequence and genome organization of Dweet mottle virus and its relationship to members of the family *Betaflexiviridae*. (2010) Arch Virol, 155:1523-1527.
- Chung-Youl Park, Hyun-Geun Min, Jonghee Oh, Bong-Sub Kim, Seungmo Lim, Youngnam Yoon and Su-Heon Lee. (2017) First Complete Genome Sequence of Barley Virus G Identified from Proso Millet (*Panicum miliaceum*) in South Korea. Genome Announcements, Volume 5 Issue 29 e00523-17.
- Satyanarayana Tatineni, Mohammad R. Afunian, Mark E. Hilf, Siddarame Gowda, William O. Dawson, and Stephen M. Garnse. (2009) Molecular Characterization of Citrus tatter leaf virus Historically Associated with Meyer Lemon Trees: Complete Genome Sequence and Development of Biologically Active In Vitro Transcripts. PHYTOPATHOLOGY, Vol. 99. No. 4, pp. 423-431.
- L. Krizbai, E. Kriston, J. Kreuze and G. Melika. Identification of Nectarine stem pitting-associated virus infecting Prunus persica in Hungary. (2017) New Disease Reports (2017) 35, 18.
- D. E. V. Villamor, T. A. Mekuria, S. S. Pillai, and K. C. Eastwell. (2016) High-Throughput Sequencing Identifies Novel Viruses in Nectarine: Insights to the Etiology of Stem-Pitting Disease. Virology, Vol. 106, No. 5.
- Takao Ito, Hiroyuki Ieki and Katsumi Ozaki. (2002) Simultaneous detection of six citrus viroids and *Apple stem grooving virus* from citrus plants by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction. Journal of Virological Methods 106, 235-239
- Javier Villacreses, Marcelo Rojas-Herrera, Carolina Sánchez, Nicole Hewstone,

Soledad F. Undurraga, Juan F. Alzate, Patricio Manque, Vinicius Maracaja-Coutinho and Victor Polanco. (2015) Deep Sequencing Reveals the Complete Genome and Evidence for Transcriptional Activity of the First Virus-Like Sequences Identified in *Aristotelia chilensis* (Maqui Berry), *Viruses*, 7, 1685-1699.

- Lester Hernández-Rodríguez, Juana María Pérez-Castro, Gabriel García-García, Pedro Luis Ramos-González, Victoria Zamora-Rodríguez, Xenia Ferriol-Marchena, Inés Peña-Bárzaga and Lochy Batista-Le Riverend. (2016) *Citrus leaf blotch virus* in Cuba: first report and partial molecular characterization. *Trop. plant pathol.* 41:147 - 154.
- Çam D, Öktem HA. Optimizations needed for lateral flow assay for rapid detection of pathogenic *E. coli*. *Turk J Biol.* 2017 Dec 18;41(6):954-968. doi: 10.3906/biy-1705-50. PMID: 30814860; PMCID: PMC6353270.

## <별첨작성 양식>

[별첨 1]

### 연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 사과 및 포도의 주요 바이러스 발생실태 분석 및 신속 현장진단 기술개발				
	(영문) Development of fast on-site detecton methods and anlysis of the actual condition of virus infection in apple and grapevine				
주관연구기관	한국생명공학연구원		주 관 연 구	(소속) 한국생명공학연구원	
참 여 기 업	(주)넥스바이오		책 임 자	(성명) 문제선	
총연구개발비 (1,466,700 천원)	계	1,466,700,000	총 연구 기간	2017. 4. 21~2020.12. 31( 3년 9월)	
	정부출연 연구개발비	1,100,000,000	총 참 연 구 원 수	총 인원	43명
	기업부담금	366,700		내부인원	37명
	연구기관부담금	0		외부인원	6명
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 사과, 배, 복숭아, 포도, 감귤에 발생하는 바이러스 발생 실태 규명</li> <li>- 주요 과수 바이러스 신속 현장 진단 기술 개발</li> <li>- 묘목 생산 및 공급체계 개선 정책 방안 마련</li> <li>- 검사 대상 바이러스 종자관리 요강 현행화</li> </ul> <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 과수 5대 과종의 바이러스 발생 조사를 통하여 다수의 신종 및 미보고종 발생 확인</li> <li>- 신종 및 미보고종 포함 국·내외 최초로 사과대목 바이러스 발생 보고</li> <li>- 국내 발생 바이러스 조사 내용을 반영하여 종자요강 개정을 위한 정책 제안</li> <li>- 과수 바이러스 진단 기술의 지재권 확보 및 기술 이전</li> <li>- 과수 바이러스 진단 키트의 제품화 및 매출</li> <li>- 과수 묘목 유통 합리화를 위한 바이러스종자요강 현행화</li> </ul> <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 기술이전 1건, 기술실시 7건, 제품화 4건</li> <li>- 과수 무병묘 생산 유통의 현대화에 활용</li> <li>- 새로운 과수 바이러스 동정으로 신규 진단법 개발에 활용</li> <li>- 과수 바이러스의 복합 유전체 분석 기술의 개발로 농임업 분야 지원에 활용</li> <li>- 신종 또는 미기록 바이러스 효율적인 탐색 효과</li> <li>- 농산물 수출입 관련 정책 지원 효과</li> </ul>					

[별첨 2]

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

		과제번호	317006-4		
사업구분	농식품기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	농생명산업기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	사과 및 포도의 주요 바이러스 발생실태 분석 및 신속 현장진단 기술개발			과제유형	(기초,응용,개발)
연구기관	한국생명공학연구원			연구책임자	문 제 선
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2017.4.21.~2017.12.31	200,000	66,700	266,700
	2차연도	2018.1.1.~2018.12.31	300,000	100,000	400,000
	3차연도	2019.1.1.~2019.12.31	300,000	100,000	400,000
	4차연도	2020.1.1.~2020.12.31	300,000	100,000	400,000
	계		1,100,000	366,700	1,466,700
참여기업	(주)넥스바이오				
상대국			상대국연구기관		

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

### 2. 평가일 :

### 3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
한국생명공학연구원	책임연구원	문 제 선

### 4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

<b>확약</b>	
-----------	---



## I. 연구개발실적

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

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (우수)

- 계획 대비 정량·정성 목표 달성을 하였음
- 과수 묘목 검정 사업을 지원하고 종자요강을 개정하기 위한 과학전 근거 마련
- 다수의 신·변종 및 미보고 바이러스·바이로이드의 국내 분포 규명

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (우수)

- 국가 관리 바이러스·바이로이드의 개정으로 농림부 정책 지원
- 과수 묘목 유통 선진화로 농업 생산성 증대
- 키트 개발로 과수 바이러스·바이로이드의 새로운 진단 시장 형성

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (우수)

- 새롭게 확인된 바이러스·바이로이드의 유전체 정보로 신규 진단 키트 개발에 활용
- 생산자 표시, 병원균 감염 기재 등으로 과수 묘목의 선진적인 유통에 활용

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (우수)

- 5개 참여 기관 및 연구책임자 모두 성실하게 연구 과제를 수행하였음

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

■ 등급 : (우수)

- 특허 4건
- 기술실시 7건
- 제품화 4건 등 우수한 연구 개발 성과를 달성하였음

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
사과, 배, 복숭아, 포도, 감귤에 발생하는 바이러스 발생 실태 규명	40	100	과수 5대 과종에서 발생하는 바이러스 및 바이로이드 발생 조사로 다수의 신종, 미보고 종 확인, 우점 바이러스 확인으로 종자 요강 개정 제안
주요 과수 바이러스 신속 현장 진단 기술 개발	40	100	과수 바이러스 진단 및 검출 기술 개발, 특허출원 및 등록, 및 기술이전을 통한 진단 키트의 제품화 및 판매로 상업화 완료
묘목 생산 및 공급체계 개선 정책 방안 마련	10	100	유통되는 과수 묘목의 생산자 표시 및 바이러스 검정 결과를 체계적으로 관리하는 시스템 구축으로 과수 유통 질서 확립
검사 대상 바이러스 종자관리 요강 현행화	10	100	과수별 바이러스 및 바이로이드 발생 빈도, 신·변종 바이러스 발생 규명으로 현행 종자요강의 개정을 위한 정책제안 및 건의
합계	100	400	계획된 연구 목표 대비 실제 연구 목표가 잘 달성되었음

## III. 종합의견

### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 과수 묘목 보증 제도를 정착시키고 원활한 시행을 위하여 농림부 원예 경영과 및 국립종자원의 제안에 의하여 시작된 과제로써 정책의 지원을 위하여 요구되는 모든 연구 결과를 도출한 것으로 사료됨
- 아프리카 돼지 열병, 과수 화상병, 및 COVID-19 등에 의한 대면 포장 조사에 큰 애로사항이 있었으나 5개 참여 연구 기관의 성실한 연구를 기반으로 大過없이 과제를 종료할 수 있었음

### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 일반적인 연구 과제의 경우 정량·정성적인 목표 달성에 대한 지표를 평가하는 것이 바람직하지만 본 과제의 경우 과수 묘목 유통 질서 확립이라는 정책을 지원하기 위하여 농림부 및 종자원의 요구에 따라 제시된 연구에 중점을 두었음. 따라서 이에 대한 연구 과제의 속성에 대한 고려가 평가에 반영되는 것이 바람직 할 것으로 사료됨

### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 연구 결과 사과, 사과대목, 복숭아, 포도, 및 감귤에서 새로운 바이러스 및 바이로이드 다수가 국내에 분포하는 것으로 확인되었음
- 이들 신규 발생 바이러스 및 바이로이드에 대한 국내 발생의 범위 및 수준, 정밀 진단법 및 신속 현장 진단 기술개발이 필요함
- 발생 현황 조사 및 진단법 개발을 통하여 필요시 국가 관리 바이러스 목록을 위한 종자 요강 개선과 과수 묘목 바이러스 검정에 적용되어야함

#### IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

##### 1. 연구책임자의 의견

해당사항 없음

##### 2. 연구기관 자체의 검토결과

해당사항 없음

[별첨 3]

## 연구성과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야		
연구과제명	사과, 복숭아, 감귤, 배, 포도의 유묘 바이러스 진단 기술 개발			
주관연구기관	한국생명공학연구원		주관연구책임자	문 제 선
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	1,100,000,000	366,700,000	0	1,466,700,000
연구개발기간	2017. 4. 21 ~2020. 12. 31			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input checked="" type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타(                      ) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:                      )			

### 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 사과, 배, 복숭아, 포도, 감귤에 발생하는 바이러스 발생 실태 규명	기보고된 병원균 가운데 우점종 확인 및 보고되지 않은 많은 수의 바이러스·바이러스의 국내 분포 규명
② 주요 과수 바이러스 신속 현장 진단 기술 개발	우점 바이러스를 대상으로 현장 진단 기술 개발
③ 묘목 생산 및 공급체계 개선 정책 방안 마련	감염 병원균, 생산자 표시가 된 이력 추적 관리
④ 검사 대상 바이러스 종자관리 요강 현행화	사과, 복숭아, 포도 감염 병원균에 대한 정책 제안

\* 결과에 대한 의견 첨부 가능

### 3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문		논 문 평 균 IF	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SC I	비 SC I							
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	5	5		5		60							5		5	15				
최종목표	4	3		2		2					3	2	1.5	5		5	3			
연구기간내 달성실적	5	4		7	19.1	4	86.0		1		4	2	1.3	32		5	4	2		
달성율(%)	125	133		350		200					133	100		100		100	133			

### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	목본류 감염 바이러스 검출 기술
②	다년생 목본류 바이러스 복합 감염 확인 기술
③	신속 현장 진단을 위한 바이러스 검출 기술
④	과수 묘목 바이러스 검정 기술
⑤	과수 묘목 유통 관리 기술

### 5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)					
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복	외국기술 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술						V	V	V		V	
②의 기술		V									
③의 기술						V	V	V			
④의 기술						V				V	
⑤의 기술						V				V	

\* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	사업화 및 과수 유통 선진화에 기여
②의 기술	기술이전 및 과수 감염 바이러스 국내 분포 정보 제공
③의 기술	기술이전 및 과수 생산성 향상
④의 기술	바이러스 프리 과수 묘목 검정 정책 지원
⑤의 기술	과수 묘목 유통 개선 및 농민의 소득 증대

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용 홍보		기타 (타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치	5	5		5		60								5		5	15		
최종목표	4	3		2		2					3	2	1.5	5		5	3		
연구기간내 달성실적	4	3		7	19.1		86		1		4	2	1.3	32		5	4	2	
연구종료 후 성과창출 계획		1					100												

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 <sup>1)</sup>	Direct LAMP법에 의한 과수 바이러스 및 바이로이드 신속 현장 진단		
이전형태	<input checked="" type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	0 천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간	0.5~1.0년	실용화예상시기 <sup>3)</sup>	2022년
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>	국립종자원과 협의하여 우선순위에 의한 대상 바이러스 선정		

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



주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.