

3cm

11-1543
000-001
716-01

4cm

발간등록번호

11-1543000-001716-01

(건고덕31p)

5cm

식물 바이러스병 매개 가루이류 예찰진단 및 방제기술 개발 최종보고서

(0.1cm)

2017. 02. 08

0.15cm

(건고덕15p)

(별색바탕 : C50, M20, Y59, K0)

주관연구기관 / 경북대학교

협동연구기관 / 농촌진흥청

성균관대학교

충남농업기술원

경북농업기술원

(주)에코원 2cm

(건고덕 15.5p)

식물 바이러스병 매개 가루이류 예찰진단 및 방제 기술 개발

최종보고서

(건고덕 14p)

2017
(건고덕13p)

농림축산식품부

(건고덕 17p)

농생명산업기술개발사업 R&D Report

(건고덕 25p)

5cm

3

cm

(백색바탕)

농림축산식품부

(건고덕 20p)

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “식물 바이러스병 매개 가루이류 예찰진단 및 방제기술 개발”(개발기간 : 2011. 12. 26. ~ 2016. 12. 25.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 02. 08.

주관연구기관명 :	경북대학교	(대표자)	황의욱
협동연구기관명 :	농촌진흥청	(대표자)	정황근
	성균관대학교	(대표자)	유지범
	충남농업기술원	(대표자)	김영수
	경북농업기술원	(대표자)	박소득
참여기관명 :	(주) 에코윈	(대표자)	구경분

주관연구책임자 :	경북대학교	이경열
협동연구책임자 :	농촌진흥청	이관석
	농촌진흥청	최홍수
	농촌진흥청	이인용
	성균관대학교	이석찬
	충남농업기술원	김지광
	경북농업기술원	이중환
참여기관책임자 :	(주) 에코윈	구경분

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	311058-5	해당단계 연구기간	5년	단계구분	5/5
연구사업명	중사업명	농생명산업기술개발사업			
	세부사업명	-			
연구과제명	대과제명	-			
	세부과제명	식물 바이러스병 매개 가루이류 예찰진단 및 방제기술 개발			
연구책임자	이경열	해당단계 참여 연구원 수	총: 명 내부: 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 천원 민간: 천원 계: 천원
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 56명 내부: 34명 외부: 22명		총연구개발비
연구기관명 및 소속부서명	경북대학교 농업생명과학대학			참여기업명 (주) 에코원	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
요약 고위해성 바이러스인 토마토황화잎말림바이러스(TYLCV)의 방제를 위하여 매개충인 가루이류의 바이러스 매개기작, 유전적 변이, 지역별 약제저항성 검정, 중간기주인 잡초의 감염율, 국내 유입 신종 바이러스의 발생, 변이, 확산 등 조사했다. 또한, 정확한 진단을 위하여 LAMP, DNA 칩 등 첨단 진단법을 개발하고 바이러스의 변이 및 복합감염 패턴을 분석했다. 가루이를 방제하기 위하여 공생균 살충독소 분리, 유인살충식물의 추출물 분리, 녹색 LED 유인등, 님액제의 관주법 등 친환경 방제제를 개발했고 이를 이용하여 가루이류 매개 바이러스병의 종합적 방제기술 개발했다.				보고서 면수	

		코드번호	D-01
연구의 목적 및 내용	1. 가루이류의 바이러스 매개기작 구명 및 방제기술 개발 2. 가루이류의 유전적 변이 분석 및 지역별 약제저항성 검정 3. 가루이류 매개 바이러스의 유전적 변이 분석 및 DNA 칩 개발 4. 잡초기주의 바이러스병 확산 역학 조사 및 관리 기술 개발 5. 가루이류 매개 바이러스 정밀진단기술 개발 및 복합감염 분석 6. 가루이류 매개 바이러스 변이와 복합감염 현장 실증 연구 7. 바이러스 매개 가루이류의 환경친화적 방제제 개발 8. 가루이류 매개 바이러스병의 종합적 방제기술 개발		
연구개발성과	1. 가루이류의 바이러스 매개기작 구명 및 방제기술 개발 ○ 담배가루이의 바이러스 매개관련 생리적 작용기작 분석함 - TYLCV 매개시 발달 및 행동이 촉진되었지만 고온 및 살충제 등 환경요인에 대한 내성이 감소함 - 즉, 매개충의 바이러스 매개효율성이 증가하지만 매개충 자체의 환경 내성은 저하됨 ○ RNAi법(hsp70 dsRNA)을 이용한 바이러스 매개충 담배가루이의 살충기술 개발함 ○ 곤충병원성 선충의 공생균 독소의 가루이 살충율 검정 및 친환경적 살충제 개발함 - 공생균 <i>Photorhabdus temperata</i> 배양액에서 anthraquinone을 분리하여 살충활성 확인함 ○ 녹색 LED의 가루이 유인효과 분석 및 가루이 유인등 개발함 2. 가루이류의 유전적 변이 분석 및 지역별 약제저항성 검정 ○ 2008년 이후 국내의 담배가루이의 염기서열을 이용한 유전적 변이 및 계통분석함 - 국내 3계통(B, Q, JpL)의 지역적 분포를 확인하고 COI 및 내부공생균 염기서열 분석함 ○ 국내의 온실가루이의 유전적 변이 분석 및 진단 프라이머 개발함 ○ 국내 지역별 담배가루이의 살충제 저항성 검정함 3. 가루이류 매개 바이러스의 유전적 변이 분석 및 DNA 칩 개발 ○ 가루이류 매개 바이러스(TYLCV)의 국내 확산패턴 및 유전적 변이 분석함 ○ 가루이류 매개 신규 바이러스(7종)에 대한 발생 현황, 병징 및 확산패턴 분석 ○ 가루이류 매개 바이러스 진단용 DNA 칩 개발함 4. 잡초기주의 바이러스병 확산 역학 조사 및 관리 기술 개발 ○ 가루이류 및 TYLCV의 증식 잡초기주 구명함 - 작물 5종, 잡초 12종을 새로운 가루이 기주식물로 기재함 ○ 잡초기주-가루이류-매개 바이러스 상호작용 및 확산양상 구명함 ○ 가루이 및 매개 바이러스병의 방제를 위한 잡초기주 관리 매뉴얼 제작함 5. 가루이류 매개 바이러스 정밀진단기술 개발 및 복합감염 분석 ○ 가루이 매개 바이러스의 정밀진단기술 개발 - 식물바이러스 7종의 등온증폭반응(LAMP-PCR) 진단기술 개발함 - 국내 담배가루이 매개 바이러스(TYLCV, TbLCV, HYVV, HYVMB) 동시 진단 multiplex PCR 프라이머를 개발함 - TYLCV의 종자전염을 확인하는 진단기술을 개발함 ○ Geminivirus 바이러스 복합감염에 따른 감염성 분석 - 가루이 매개 바이러스 4종(TYLCV, TbLCV, HYVV, HYVMB)의 감염성클론을 이용하여 토마토, 고추, 파프리카 등 가지과 작물과 박과 작물에 대한 기주 범위 분석을 수행함 - 농가현장 시료로부터 토마토 외 작물로의 TYLCV 기주범위 확장을 확인함 ○ 국내 DNA-beta의 분포 양상 분석 및 병원성 기능 분석 - 국내 geminivirus DNA-beta 분포양상 분석 및 감염성 클론을 제작함 - DNA와 RNA virus 복합 감염에 의한 담배가루이 매개 바이러스의 변이 분석함 6. 가루이류 매개 바이러스 변이와 복합감염 현장 실증 연구 ○ TYLCV의 종자감염 확인 및 국내의 상업용 토마토 종자의 TYLCV 감염실태 조사함 ○ 토마토 재배현장 및 육묘장의 TYLCV발생 실태 조사함 (현장실증) ○ 박과류에 대한 가루이류 및 가루이류 매개 바이러스 병징 분석함 7. 바이러스 매개 가루이류의 환경친화적 방제제 개발 ○ 곤충병원성 선충의 공생균 배양액을 이용한 살충 물질의 대량생산 및 상품화 기술 개발함		

	<ul style="list-style-type: none"> ○ 천연물(야생담배 추출물)을 이용한 가루이류 살충활성이 높은 방제제 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 생물농약 1건, 천연물살충제 1건, 유인살충식물 1건 개발 8. 가루이류 매개 바이러스병의 종합적 방제기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> ○ 토마토 품종, 재배 작형별 가루이류 매개 바이러스의 피해분석 ○ 님액제의 관주처리에 대한 가루이 방제효과 분석 및 현장적용 실시함 ○ 시설재배지 토마토 가루이류 및 매개바이러스 종합적 방제기술개발 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 활용계획 <ul style="list-style-type: none"> ○ 매개충의 바이러스-매개작용에 대한 정보를 활용한 RNAi 기술을 현장에 적용할 수 있음 ○ 국내 가루이 및 가루이 매개 바이러스의 발생현황 자료를 병해충관리시스템에 적용 ○ 가루이 및 가루이매개 바이러스 정밀진단기술(LAMP-PCR, DNA 칩, 종 및 biotype-specific primers)의 산업화 및 현장적용 ○ 정밀진단기술을 활용한 신규 바이러스 및 변이주의 스크리닝을 통한 검역 및 재배현장 적용 ○ 친환경적 가루이 방제제(곤충병원성 선충의 공생균 배양액, 가루이 유인살충식물 및 추출액, 녹색 LED 유인등, 님액제의 관주처리법)의 산업화 및 현장적용 ○ [바이러스-매개충-식물(중간기주, 작물) COMPLEX]의 생태, 재배 및 관리체계의 종합적 이해를 통한 외래 병해충 확산방지 시스템의 현장적용 2. 기대효과 <ul style="list-style-type: none"> ○ 국내 매개충 및 바이러스의 진단, 상호작용 및 방제 기술의 전문화 및 국제경쟁력 강화함 ○ 매개충 및 바이러스의 현장관리체계의 확립 ○ 가루이 및 가루이매개 바이러스 정밀진단기술의 국제경쟁력 강화 ○ 가루이 계통 및 바이러스 변이주의 확보를 통한 글로벌 유전정보의 big data 구축 ○ 바이러스 및 매개충의 친환경적 방제기술 확보를 통한 국제 경쟁력 강화 ○ [바이러스-매개충-식물(중간기주, 작물) COMPLEX]의 현장적용을 통한 체계적 병해충 방제 				
중심어 (5개 이내)	가루이류	식물바이러스	RNAi	저항성	바코드칩

< SUMMARY >

	코드번호	D-02
Purpose& Contents	1. Identification of virus-transmission mechanism of whiteflies and development of whitefly control techniques 2. Analysis of genetic diversity and regional pesticide resistance of whiteflies 3. Analysis of genetic diversity of whitefly-transmissible virus and DNA chip development 4. Analysis of weed-mediated virus spread mechanism and development of management techniques 5. Development of acute diagnosis techniques of whitefly-transmissible virus and the analysis of multiple virus infection 6. Field monitoring of mutation and multiple infection of whitefly-transmissible virus 7. Development of environment-friendly pesticide for the whitefly control 8. Development of the integrated management system of whitefly-transmissible virus	
Results	1. Identification of virus-transmission mechanism of whiteflies and development of whitefly control techniques <ul style="list-style-type: none"> ○ Physiological and molecular mechanisms of virus-transmission mechanism of whiteflies were identified <ul style="list-style-type: none"> - When whiteflies acquired TYLCV, their development and behavior was increased but the susceptibility against the exposures of high temperature and pesticides was decreased in comparison to non-viruliferous (NV) whiteflies. Namely, whiteflies enhanced virus transmission rates by active behavior but suffered trade-off expenses at unsuitable environmental conditions. ○ Treatments of RNAi using dsRNA of heat shock protein 70 (hsp70) gene of <i>Bemisia tabaci</i> suppressed its mRNA level and knockdown whiteflies. This technique can be applicable into the whitefly control. ○ Lethal activity of symbiont culture media of entomopathogenic nematodes was determined into the feeding assay of whiteflies using the two-layered parafilm chamber. <ul style="list-style-type: none"> - The insecticidal compounds, two anthraquinones, were identified from the culture medium of the symbiont <i>Photorhabdus temperata</i>, and determined its toxicity against the <i>B. tabaci</i> adults. - Commercial product was developed using the enhancement of these compounds in the symbiont culture media. ○ Whitefly attraction rate was analyzed using various rates of wave length of LED bulbs. <ul style="list-style-type: none"> - Green LED light was most attractable for whiteflies and used to develop the LED light trap. 	
	2. Analysis of genetic diversity and regional pesticide resistance of whiteflies <ul style="list-style-type: none"> ○ Since 2008, the occurrence and genetic diversity of whiteflies has been conducted around the country as well as various countries including southeastern countries, including Bangladesh, Myanmar, Nepal. <ul style="list-style-type: none"> - There were three species (B, Q and JpL) in Korea by the analysis of nucleotide 	

	<p>sequences of CO, rDNA and endosymbionts</p> <ul style="list-style-type: none"> - B-biotype was only present in Goyang, the Q-biotype and JpL were spread around the country, but Q-biotype was habit in various crop plants but the JpL biotype was mostly present in honeysuckle <i>Lonicera japonica</i>. ○ The genetic diversity of the greenhouse whitefly, <i>Trialeurodes vaporariorum</i>, was determined and its species-specific primers were determined for the accurate diagnosis. ○ Pesticide resistance rates were investigated from the collected whiteflies around the country. <ul style="list-style-type: none"> - The rates were various and depend on the regions that have different application programs. <p>3. Analysis of genetic diversity of whitefly-transmissible virus and DNA chip development</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Analysis of outbreak, symptom and genetic diversity of 7 whitefly-transmissible virus including TYLCV ○ Development of DNA chip for the multiple virus diagnosis <p>4. Analysis of weed-mediated virus spread mechanism and development of management techniques</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Due to the wide range of host plants of <i>B. tabaci</i>, we investigated weed species that can be host of TYLCV. <ul style="list-style-type: none"> - 17 new host plants were identified including 5 crop species, 12 weed species. ○ The interactive mechanisms of TYLCV-whiteflies - weeds were determined in the field situation and identified that weeds are important as “the green bridge” of the transmission of TYLCV across the crop plants. This suggest the importance of the green bridge control as a part of integral to pest and disease management. ○ The weed management manual was developed for the control of TYLCV. <p>5. Development of acute diagnosis techniques of whitefly-transmissible virus and the analysis of multiple virus infection</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Development of the field-applicable diagnosis of begomovirus. <ul style="list-style-type: none"> - LAMP-PCR techniques were developed for the diagnosis of 7 species of begomovirus. - Multiplex PCR primers were developed for the diagnosis of TYLCV, TbLCV, HYVV, HYVMB. - TYLCV diagnosis technique was developed from tomato seeds. ○ Geminivirus multi-infection analysis <ul style="list-style-type: none"> - Infection clones were developed for the detection of 4 virus that transmitted by whiteflies. - The range of host plants for TYLCV were determined from the varieties of various plant species. ○ Analysis of the distribution and symptoms of DNA-beta in Korea <ul style="list-style-type: none"> - Distribution of geminivirus DNA-beta was determined in Korea and their infection clones were constructed. - Mutation rate of whitefly-transmitted virus was analysed from the multi-infection of DNA and RNA virus in tomatoes.
--	---

	<p>6. Field monitoring of mutation and multiple infection of whitefly-transmissible virus</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ The occurrence of TYLCV disease in the tomato fields and also other crop plants in the fields. ○ We firstly identified that TYLCV infects into various tomato seeds available in the public markets of Korea and other countries. ○ various new begomovirus were identified in the fields and those symptoms were described. <p>7. Development of environment-friendly pesticide for the whitefly control</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ The control efficacy of symbiont culture media of entomopathogenic nematode were determined and commercial products were developed. ○ The leaf extracts of wild tobacco, <i>Nocotiana benthamiana</i>, was used for the production of commercial products of whitefly control. <p>8. Development of integrated management of whitefly-transmissible virus</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ The integrated management manual of TYLCV and whiteflies was developed for the greenhouse application. ○ The whitefly control efficacy through the irrigation of the neem liquid formula was determined in the tomato greenhouse. 				
Expected Contribution	<p>1. Contribution</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Application of the information on the mechanism of vector and virus interaction for the virus and vector management ○ Field application of the data on the occurrence of virus and vector in the country ○ Industrialization and field application of advanced diagnosis techniques for the control of virus and vector in the field ○ Industrialization and field application of environment-friendly pesticides developed in the project ○ Field application of the pest and disease management system in regarding the complex of virus-vector and plant. <p>2. Expectation</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ The results of this project strengthen international competition in the field of virus-vector diagnosis, interaction and management ○ The results contribute the establishment of the virus-vector management system in the field. ○ The results of this project strengthen international competition in advanced diagnosis techniques of virus and vector. ○ The results can be used for the construction of global virus and vector genetic information system. ○ The results can be used for the improvement of pest and disease management in terms of the virus-vector-plant complex system. 				
Keywords	Whitefly	Plant virus	RNAi	Microsatellite	Barcode chip

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의개요	9
2. 국내외 기술개발 현황	10
3. 연구수행 내용 및 결과	11
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	310
5. 연구결과의 활용계획 등	311
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	312
7. 연구개발성과의 보안등급	313
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	313
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	313
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	313
11. 기타사항	314
12. 참고문헌	314

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

1-1. 연구개발 목적

- 가루이는 노린재목(Hemiptera)에 속하는 흡즙성 곤충으로서 전 세계적으로 1,450종이 보고되었는데 약 600여종 이상의 원예작물을 가해하는 주요 해충일 뿐만 아니라 100여종 이상의 식물바이러스(주로 Geminivirus) 매개충으로서 직간접적으로 큰 피해를 끼친다 (Devine et al., 1998). 특히, 최근에 전 세계적으로 심각한 피해를 나타내는 담배가루이 (*Bemisia tabaci*)는 "중복합형 (species-complex)"로 불리는데 이는 형태적으로 구분이 않되지만 생태적, 생리적, 유전적 특징이 서로 다른 biotype으로 나누어지며 현재 36 biotype이 알려져 있다. 이 중에서 지중해지역으로 중심으로 발생이 되었던 B-biotype이 1980년대에 전 세계적으로 확산이 되어 큰 피해를 끼쳤고 1990년대에는 지중해 서부지역(스페인)에서 기원한 Q-biotype이 다시 확산이 되어 심각한 피해를 끼치고 있다.. 특히, Q-biotype은 B-biotype과 달리 지난 10여년간 주로 사용한 살충제인 neonicotinoid 계통의 살충제에 강한 저항성이 나타내어서 방제에 어려움을 주고 있다. 이러한 현상은 살충제 남용뿐만 아니라 기후변화 및 국제간 물류의 교류확산과 같은 요인으로 인하여 새로운 biotype이 출현할 가능성이 증대되고 있다.
- Geminivirus는 DNA virus로서 주로 가루이에 의해서 매개가 되는데 특히 최근에 큰 피해를 끼친 토마토황화잎말림바이러스(TYLCV)는 담배가루이가 유일한 매개충이다 (Garnim et al., 2001). TYLCV병은 약 60여 년 전 이스라엘에서 처음으로 보고되었는데 지중해연안, 아프리카, 북중미등으로 확산되어 현재에는 세계적으로 퍼져있다(Choen et al., 1966; Czosnek, 1999; Abhary et al., 2007; Anfoka et al., 2009). 증상으로는 잎이 황화 및 잎말림 현상이 나타나고 심하면 고사하여 경제적 피해가 심한 국가관리대상 바이러스 질병인데 실제로 국내 토마토 농가의 TYLCV의 피해는 가루이에 의한 직접적인 것보다 훨씬 더 심각하게 나타났다(Taai et al., 2011a,b). 농업현장의 실질적인 작물보호에 있어서 담배가루이와 같은 매개충에 의한 바이러스 질병의 피해는 매개충과 바이러스의 발생, 유전, 및 확산과 같은 모든 측면에 있어서 서로 상호작용을 하기 때문에 효율적인 예찰, 진단 및 방제를 위하여 본 연구팀에서는 "가루이-제미니바이러스 COMPLEX" 개념으로 접근했다(Czosnek and Leterrot, 1997).
- 가루이에 의한 피해는 주로 온실가루이(*Trialeurodes vaporariorum*)에 의해서 나타났지만 미국의 경우 1986에 담배가루이 B-biotype이 처음으로 발생하여 온실가루이보다 더 큰 피해를 끼치면서 시설재배지의 주요 해충이 되었다. 그러나, 최근 Q-biotype이 중국 (1999), 일본 (2004), 미국 (2005)에서 처음으로 보고된 이후 B계통을 대체하여 주요 해충이 되었다.
- 담배가루이는 기주범위가 약 86과 700여종 이상의 식물에 피해를 주는 해충으로 원예작물과 채소류에 큰 피해를 주기 때문에 재배시설내 증식과 외부유입에 의한 차단이 매우 어려운 실정이다. 또한, 담배가루이는 성충과 유충이 잎의 뒷면에 위치하여 식물체를 구침으로 흡즙하여 잎이 위축되거나 심한 경우 낙엽이 되도록 하는 직접적인 피해뿐만이 아니라 바이러스병을 매개하고 대량발생시 배설물에 의한 그을림병을 유발하는 간접적인 피해도 유발한다.
- 국내에서 담배가루이는 1998년 충북 진천의 장미 시설재배지에서 B-biotype이 출현된 이후

2005년 Q-biotype이 마산 파프리카온실에서 최초 발견되어 전국적으로 확산되어 원예작물의 주요해충으로 피해를 나타내었다. 2008년 이후에는 TYLCV를 매개하여 매년 토마토 재배농가에 심각한 피해를 주고 있으며, TYLCV의 발병으로 인하여 3,000평의 유리온실의 폐농을 결정할 정도의 경제적 손실을 나타내었다. 이에 담배가루이는 새로운 계통이 발생하여 피해를 끼칠 우려가 매우 큰 해충으로서 지속적인 예찰을 통한 관리가 절실히 필요하다.

- 국내에서 담배가루이 전염 바이러스에 의한 토마토 생육 변화를 관찰한 결과, 완숙 토마토의 경우 생육이 성장점의 생육이 멈추고, 초기 감염시 수량감소 90% 이상, 방울토마토의 경우 병징 발현은 잘 되지 않으나 생육 30%이상 감소하였다. 국내 연간 토마토 재배면적은 6,144ha, 생산액은 6,642억 원으로 전국적으로 바이러스병이 퍼질 경우 1,800억원 이상의 피해를 초래할 것으로 보인다.

1-2. 연구개발의 필요성

- 기후변화와 농산물의 국제교역이 증가하면서 열대/아열대 지역에서 발생하는 바이러스 및 이를 보독한 매개충이 국내로 유입되어 이로 인한 국내 농작물의 피해가 증가하는 추세이다.
- 현재 국내에서 재배되는 가지과, 박과 등 주요 경제작물들의 종자는 대부분 수입에 의존하고 있고, 채종지가 대부분 아열대 국가들이기 때문에 신규 바이러스의 생물학적 유입경로가 되고 있으나 이에 대한 실태 파악이 체계적으로 되지 않고 있는 실정이다.
- 최근 국내에서 발생한 돌발 바이러스병은 기후변화와 더불어 매개충의 확산이 전국적으로 빠르게 진행되어 피해가 증폭되는 양상을 보였으며 그 위험수위가 점점 높아지고 있으므로 바이러스의 유입 및 확산에 대한 원인, 작용기작 및 현장의 발생 특성에 대한 연구가 필수적이다.

2. 국내외 기술개발 현황

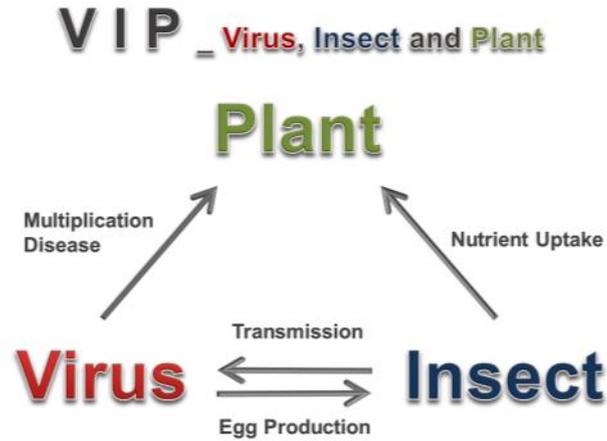
	코드번호	D-04
<ul style="list-style-type: none"> ○ 국외 연구동향 <ul style="list-style-type: none"> - 담배가루이와 제미니바이러스에 대한 연구는 전 세계적으로 활발하게 이루어지고 있으며 3년마다 열리는“국제담배가루이학회” 및 “국제제미니바이러스학회”를 통하여 학술교류를 한다. - 가루이와 바이러스 방제를 위하여 화학살충제, 천연물, 천적 및 경종적 방법 등 다양한 방법을 개발하고 있으며 최근 효과적으로 인증이 되고 있는 방법은 “종합적병해충관리(Integrated Pest and Disease Management)로서 선진 국가에서 시행이 되고 있다. - 국제적으로 저명한 이스라엘 그룹 (Dr. Murad Ghanim, The Hebrew University)과 중국 그룹 (Dr. Shu-Sheng Liu, Zhejiang University) 등과의 교류를 가졌다. ○ 국내 연구동향 <ul style="list-style-type: none"> - 국내에서 담배가루이 매개 바이러스인 Geminivirus에 대한 연구는 미비하였지만 2008년 TYLCV의 대발생 이후 본격적으로 연구가 진행되었다. 국내 담배가루이 매개 바이러스는 지금까지 토마토황화잎말림바이러스(TYLCV), 담배잎말림바이러스(TbLCV), 고 		

구마잎말림바이러스(SPLCV), 무늬인동식물바이러스(HYVV) 총 4종에 대하여 연구가 진행되었는데 본 연구팀에서는 이미 4종의 바이러스에 대한 분석을 완료하여 논문으로 발표하였다.

- 국내 담배가루이 방제를 위하여 다양한 외국의 사례와 같은 화학살충제를 판매하고 있고 천연물 등 친환경제제를 권고하고 있으나 현장에서 가루이 방제에 효과적으로 나타나지 않고 있는 실정이다.
- 새로운 종류의 바이러스와 변이 바이러스의 출현에 대한 정밀하고 신속한 바이러스 진단에 대한 정밀진단기술의 개발이 부족한 실정이다.
- 본 연구를 통하여 가루이의 진단 예찰 및 Geminivirus에 대한 국내 분포양상, 유전자 변이 분석 및 정밀진단기술 등과 같은 전문적인 분석기술과 전문 인력을 보유하고 가루이와 바이러스에 대한 진단예찰과 방제기술에 대한 연구를 체계적으로 추진했다.

3. 연구수행 내용 및 결과

	코드번호	D-05
<h4>3.1 연구개발 추진전략 및 방법, 연구개발 추진체계</h4> <p>○ 본 연구팀에서는 2008년 담배가루이 Q계통의 의하여 경남 통영지역의 토마토 시설재배지에서 처음으로 토마토황화잎말림병이 발생한 것을 계기로 긴급방제를 위한 특별연구팀으로 구성이 되었다. 본 연구팀의 구성은 담배가루이와 매개바이러스 방제를 위하여 Virus, Insect 및 Plant 전문가로 구성이 되었으며 본연구팀의 이름을 Virus, Insect 및 Plant의 initial을 이용하여 VIP로 명명하였다.</p> <p>○ 본 연구팀에서는 TYLCV 및 담배가루이 방제를 위하여 정확한 진단에 필요한 유전자 primer를 제작하고 현장에서 실용화했다. 또한, 담배가루이 방제를 위하여 살충제 등록 및 천연물을 이용한 환경친화적 방제에도 기여했다.</p> <p>○ 2008년 우리나라 남부지역에서 대발생한 TYLCV에 의한 바이러스 병의 경우 기주식물인 토마토와 바이러스, 매개충인 담배가루이 그리고 담배가루이에 공생하는 공생균의 상호작용에 의하여 발생한 것으로 곤충, 식물 그리고 바이러스와 세균의 상호작용을 입체적이며 상호보완적인 측면에서의 연구가 절실히 필요하다.</p>		



[VIP의 전공별연구팀의 상호관계 분석]

- 식물바이러스병 매개 가루이류 예찰진단 및 방제기술개발팀
: '바이러스 - 매개충 - 기주' 팀

(*Virus* 연구팀)

- 국내 분포 바이러스 수집 및 계통분석
- 간편하고 정확한 정밀진단기술 개발
- 지역 및 작물별 병원성 및 유전적 변이 분석
- 기주작물에서 바이러스의 발병 및 피해해석

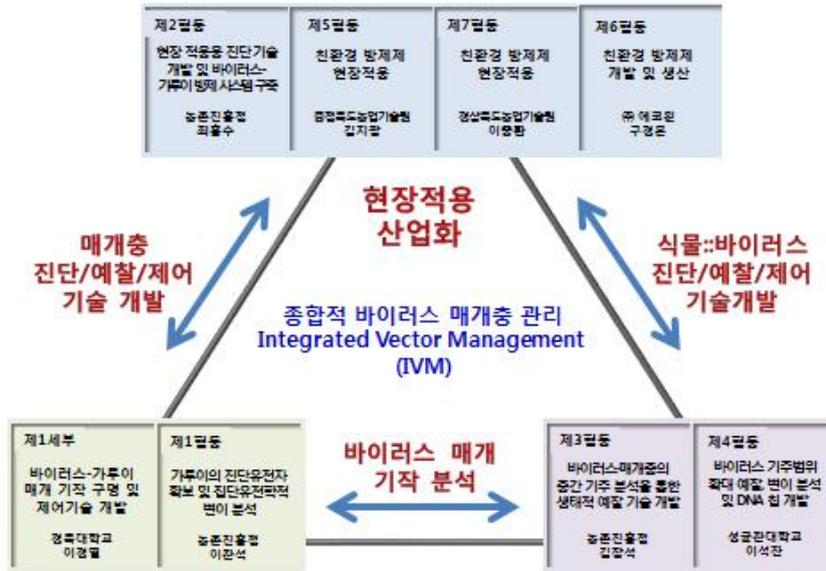
(*Insect* - 매개충 연구팀)

- 국내 분포 제미니바이러스 매개충의 계통분석
- 매개충의 계통별 국내 분포 및 정밀동정기술 개발
- 매개충의 월동생태(월동여부, 월동태 등) 구명
- 바이러스 보독 초기개체군의 조기방제기술 개발

(*Plant* - 중간기주 연구팀)

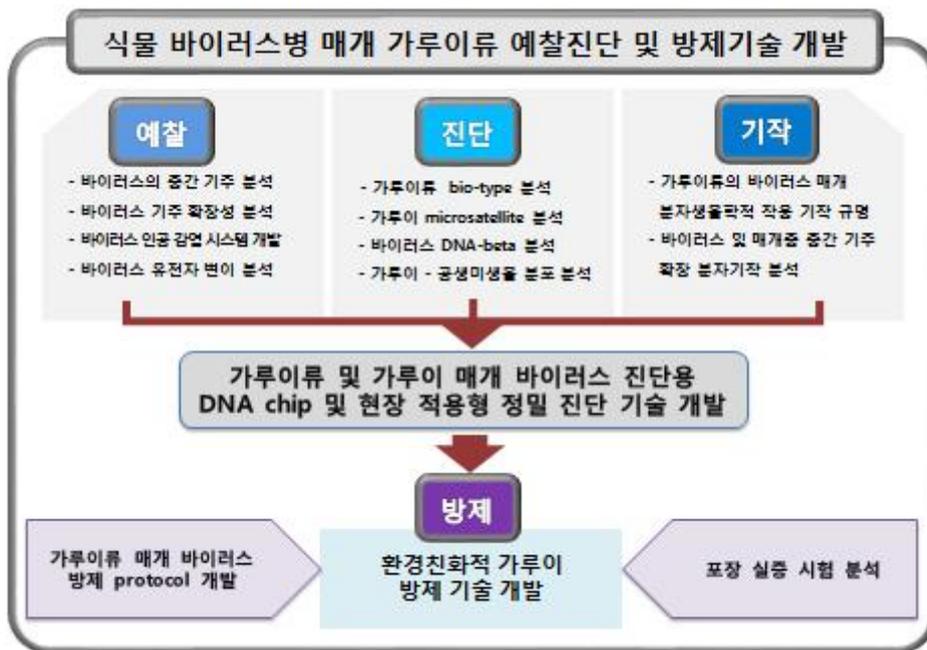
- 바이러스 보독기주, 매개충 증식기주 탐색
- 생활형별 보독기주의 계절적 변동모형 개발
- 작형별 중간기주의 병발생에 대한 영향 평가
- 보독기주, 증식기주의 효과적 관리기술 개발

- 본 과제는 국립농업과학원의 바이러스, 매개충, 중간기주 전문가와 2개 대학의 바이러스-매개충의 분자생물학 및 생식생리학 전문가, 농업기술원 2곳의 현장전문가, 산업체 1곳, 총 8개 팀이 상호 협력하여 연구팀을 구성했다.
- 본 연구팀은 다년간 담배가루이 매개 바이러스와 관련한 연구를 수행하였으며 담배가루이



이, Geminivirus 및 작물들을 대상으로 하는 다양한 분석기술과 정밀진단기술을 보유하고 있다.

- 또한, 1990년대 TYLCV의 피해가 많았던 미국의 체미니바이러스 전문가(Dr. Bisaro)와 TYLCV 전문가 (Dr. Polston) 그리고 바이러스 매개곤충의 전문가(Dr. Denlinger)의 자문을 통하여 연구 방향과 미국의 병발생 상황과 현재 국내의 병발생 상황을 비교하며 대책을 수립했다.



3.2. 연구내용

1장. 제1세부과제 (경북대학교)

1절. 진단

1. 가루이류의 주요 해충인 담배가루이와 온실가루이의 유전적 다양성 분석함
2. 가루이 내부공생균 5종에 대한 유전자 진단 및 국내 샘플의 공생균 분포 비교분석함
3. 동남아시아 등 국외 가루이 채집을 통한 유전적 다양성 및 유연관계 분석함
4. 온실가루이의 진단 프라이머 개발 및 현장적용함

1. 국내외 가루이의 biotype 및 내부공생균 염기서열을 이용한 유전적 다양성 분석

가. 개요

- (1) 담배가루이는 적어도 38개의 biotype으로 구성된 species complex로서 유전적 다양성이 아주 높기 때문에 가루이의 직접적 피해 및 바이러스 매개작용을 이해하기 위하여 국내에 분포하는 가루이의 정확한 진단 및 유전적 유연관계 연구가 필수적이다.
- (2) 최근 흡즙성 곤충의 세포내에 공생하는 다양한 내부공생균(endosymbiont)의 존재가 밝혀지면서 종내 유전적 다양성을 연구하는데 중요한 지표로 사용되고 있다. 본 연구에서는 이러한 공생균의 분포를 이용하여 유연관계를 비교 분석하였다.

나. 재료 및 방법

- (1) 연구기간(5년)동안 국내 전국 50여 지역의 토마토 등 다양한 시설재배지에서 담배가루이 및 온실가루이를 채집하였다.
- (2) 동남아시아의 다양한 국가(방글라데시, 필리핀, 미얀마, 네팔 등)에서 가루이를 채집하였다.
- (3) 가루이 한 개체당 DNA를 추출하여 COI 및 6종류의 내부공생균 rDNA 염기서열을 분석하였다.
- (4) 채집한 가루이의 유전정보 및 NCBI database 정보를 통합하여 가루이의 유연관계를 비교분석하였다.



담배가루이(*Bemisia tabaci*)와 온실가루이(*Trialeurodes vaporariorum*)

다. 결과

- 국내에 존재하는 담배가루이는 3-biotype(B, Q, JpL)이 존재했다. 가루이의 공생균 5종의 감염패턴을 조사해 본 결과 각 biotype 간에 서로 다르게 나타났음(표 1-2). JpL-biotype은 Arsenophonus, Cardinium, Wolbachia를 가졌으나, B-biotype은 Hemiltonella와 Rickettsia를 가졌고, Q1계통은 Cardinium과 Hemiltonella가 100% 존재했으며 Wolbachia 감염율은 다양하게 나타났으나 Arsenophonus와 Rickettsia는 발견되지 않았음
- 국내계통은 동남아시아지역 토착계통과 83-84% 유사했으며 공생균의 분포도 다름
- 온실가루이의 공생균 패턴을 조사해 본 결과 Arsenophonus, Cardinium을 가졌으나 Hemiltonella, Rickettsia, Wolbachia는 없었음(표 1-2).

표 1-1. 담배가루이의 biotype과 내부공생균의 프라이머 정보

Obs.	Primer Name	Primer	Primer Sequence (5' to 3')	Size (bp)	References	Anneal. Temp.
Whitefly	C1-J-2195	F	TTGATTTTTGGTCATCCAGAAGT	~860	Simon et al. 1994	52°C
	L2-N-3014	R	TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA			
Biotype	LR-J-12887	F	CCGGTTTGAACCTCAGATCATGT	~520	Simon et al. 1994	55°C
	LR-N-13398	R	CGCCTGTTAACAAAAACAT			
TYLCV	TYLCV-CP	F	TGGGGATTACAAAATGTTTCT	~1000	Shatters et al. 2009	50°C
	TYLCV-CP	R	CTGAACTTCGACAGCCCAT			
Univ.	Btab-Uni	F	GAGGCTGRAAAATTARAAGTATTTGG	~748	Shatters et al. 2009	64°C
		R	CTTAAATTTACTGCACITTCGCCAYATTAG			
B	BioB	F	CTAGGGTTTATTGTTTGGAGGTCATCATATATTC	~478	Shatters et al. 2009	64°C
		R	AATATCGACGAGGCATTCCCCCT			
Q	BioQ	F	CTTGGTAACTCTCTGTAGATGIGIGIT	~303	Shatters et al. 2009	64°C
		R	CCTTCCCGCAGAAGAAATTTTGTTTC			
NW	BioNW	F	TACTGTTGRAATAGATGTTGACACTCGGG	~405	Shatters et al. 2009	64°C
		R	GGAAAAAATGTCAGRTTACTCCWC AAAATATT			
<i>Arsenophonus</i> 23S rDNA		F	CGTTTGATGAATTCATAGTCAAAA	~600	Thao Bau- mann, 2004	60°C
		R	GGTCCTCCAGTTAGTGTACCCAAC			
<i>Cardinium</i> 16S rDNA		F	GCGGTGTA AAAATGAGCGTG	~400	Weeks et al., 2003	58°C
		R	ACCTMTTCTTAACTCAAGCC			
<i>Fritschea</i> 23S rDNA		F	GATGCCTTGGCATTGATAGGCGATGAAGGA	~600	Everett et al., 2005	60°C
		R	TGGTCTCATCATGCAAAAAGGCA			
<i>Hamiltonella</i> 16S rDNA		F	TGAGTAAAGTCTGGAATCTGG	~700	Zchori Brown, 2002	58°C
		R	AGTTCAAGACCGCAACCTC			
<i>Rickettsia</i> 16S rDNA		F	GCTCAGAACGAACGCTATC	~900	Gottlieb et al., 2006	60°C
		R	GAAGGAAAGCATCTCTGC			
<i>Wolbachia</i> 16S rDNA		F	CGGGGGAAAAATTTATTGCT	~650	Heddi et al, 1999	55°C
		R	AGCTGTAATACAGAAAAGTAAA			
Wolbachia	Wsp81f	F	TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC	~625	Zhou et al. 1998	52°C
	Wsp69r	R	AAAAATTAACGCTACTCCA			

표 1-2. 국내외 가루이의 유전형 및 내부공생균의 패턴 비교 분석 (A; *Arsenophonus*, C; *Cardinium*, H; *Hamiltonella*, R; *Rickettsia*, W; *Wolbachia*)

Biotype	Host Plants	Locations	TYLCV	Endosymbionts				
				A	C	H	R	W
JpL	honeysuckle	Various places, Korea	-	+	+	-	-	+
B	Cucumber	Goyang, Korea	-	-	-	+	+	-
Q1	Various	Various places, Korea	+/-	-	+	+	-	+/-
Q	Tomato	Qingdao, China	-	-	+	+	+	-
Q1	-	Spain	-	-	+	+	-	+/-
Q2	-	Israel	-	+	-	-	+	+
Q3	-	Burkina	-	+	-	-	-	-
Indigenous	Eggplant	Patuakhali, Bangladesh	-	+	+	-	-	+
Indigenous	Eggplant	Kurigram, Bangladesh	+	+	+	-	-	+
Indigenous	Eggplant	Kurigram, Bangladesh	-	+	+	-	-	+
Indigenous	Okra	Kurigram, Bangladesh	-	+	+	-	+	+
Indigenous	Eggplant	Kyuktan, Myanmar	+	+	+	+	-	+
Indigenous	Ridge gourd	Kyuktan, Myanmar	+	+	+	+	-	+
Indigenous	Ridge gourd	Magway, Myanmar	-	+	+	-	-	+
Indigenous	Eggplant	Yangon, Myanmar	-	+	+	-	+	+
Indigenous	Marigold	Kathmandu, Nepal	-	+	+	+	-	+
Indigenous	Chili(Pepper)	Kathmandu, Nepal	-	+	+	-	+	+
Indigenous	Cucumber	Kathmandu, Nepal	-	+	+	+	-	+
Indigenous	Brinjal	Kathmandu, Nepal	+	+	+	+	-	+
Indigenous	Tomato	Kathmandu, Nepal	+	+	+	+	-	+
<i>Trealeurodes vaporariorum</i>	Various	Various places, Korea	-	+	+	-	-	-

표 1-3. 담배가루이 유전형 간의 COI 염기서열의 유사성

<i>mt</i> COI Sequence of <i>B. tabaci</i> (A)	Length (bp)	<i>mt</i> COI Sequence of <i>B. tabaci</i> (B)	Length (bp)	Score of Similarity (%)
Q1-biotype, Korea	746	B-biotype, Korea	746	94.0
Q1-biotype, Korea	746	Indigenous, Myanmar	746	83.0
Q1-biotype, Korea	746	BW1, Bangladesh(South)	746	83.0
Q1-biotype, Korea	746	BW2, Bangladesh(North)	746	84.0
Q1-biotype, Korea	746	Indigenous, Nepal	746	84.0
B-biotype, Korea	746	Indigenous, Myanmar	746	84.0
B-biotype, Korea	746	BW1, Bangladesh(South)	746	84.0
B-biotype, Korea	746	BW2, Bangladesh(North)	746	84.0
B-biotype, Korea	746	Indigenous, Nepal	746	84.0
Indigenous, Myanmar	746	BW1, Bangladesh(South)	746	99.0
Indigenous, Myanmar	746	BW2, Bangladesh(North)	746	90.0
Indigenous, Myanmar	746	Indigenous, Nepal	746	99.0
BW1, Bangladesh(South)	746	BW2, Bangladesh(North)	746	90.0
BW1, Bangladesh(South)	746	Indigenous, Nepal	746	99.0
BW2, Bangladesh(North)	746	Indigenous, Nepal	746	90.0

표 1-4. 담배가루이 16S rRNA의 염기서열의 유사성 비교

16S rRNA Sequence of <i>B. tabaci</i> (A)	Length (bp)	16S rRNA Sequence of <i>B. tabaci</i> (B)	Length (bp)	Score of Similarity (%)
Q1-biotype, Korea	392	B-biotype, Korea	392	50.0
Q1-biotype, Korea	392	Indigenous, Myanmar	392	53.0
Q1-biotype, Korea	392	BW1, Bangladesh(South)	392	53.0
Q1-biotype, Korea	392	BW2, Bangladesh(North)	392	90.0
Q1-biotype, Korea	392	Indigenous, Nepal	392	53.0
B-biotype, Korea	392	Indigenous, Myanmar	392	91.0
B-biotype, Korea	392	BW1, Bangladesh(South)	392	90.0
B-biotype, Korea	392	BW2, Bangladesh(North)	392	55.0
B-biotype, Korea	392	Indigenous, Nepal	392	90.0
Indigenous, Myanmar	392	BW1, Bangladesh(South)	392	99.0
Indigenous, Myanmar	392	BW2, Bangladesh(North)	392	55.0
Indigenous, Myanmar	392	Indigenous, Nepal	392	99.0
BW1, Bangladesh(South)	392	BW2, Bangladesh(North)	392	56.0
BW1, Bangladesh(South)	392	Indigenous, Nepal	392	100.0
BW2, Bangladesh(North)	392	Indigenous, Nepal	392	56.0

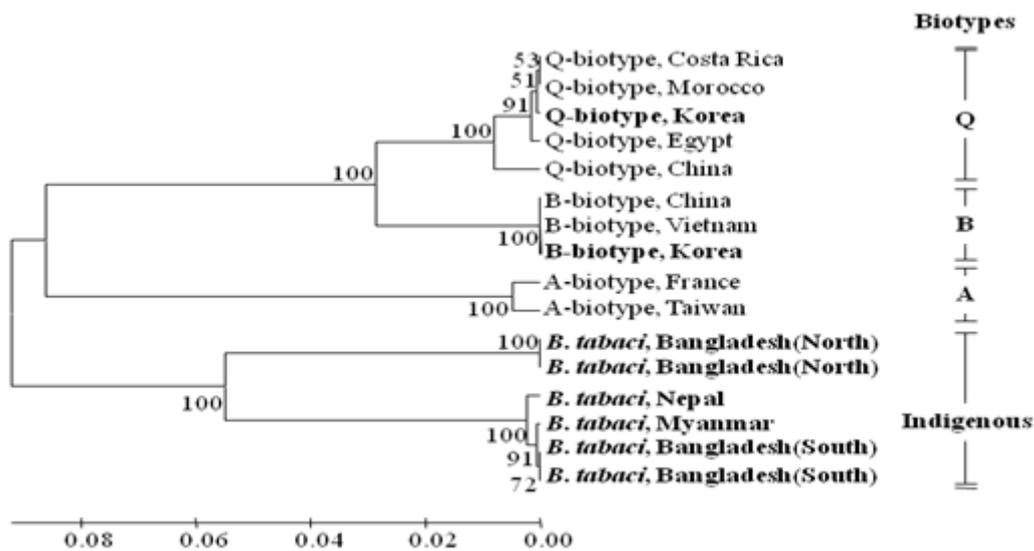


그림 1-1. Phylogenetic relationships of *B. tabaci* populations based on a fragment (~860 bp) of the mitochondrial COI sequences. The *mtCOI* sequences of *B. tabaci* were compared with other *B. tabaci* biotype sequences to generate the phylogenetic trees according to the Bayesian method. Scale bar indicates the horizontal distance of 0.00-0.08. Bold letters indicated the samples of the present study.

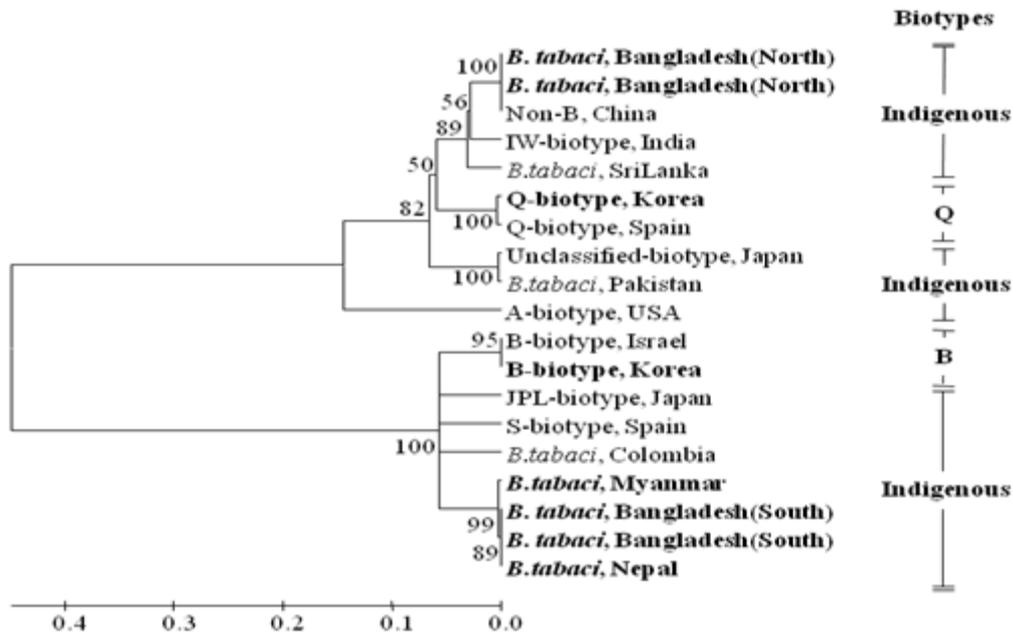


그림 1-2. Phylogenetic relationships of *B. tabaci* populations based on a fragment (~520 bp) of the 16S rRNA sequences. 16S rRNA sequences of *B. tabaci* were compared with other *B. tabaci* biotype sequences to generate the phylogenetic trees according to the Bayesian method. Scale bar indicates the horizontal distance of 0.0-0.4. Bold letters indicated the samples of the present study.

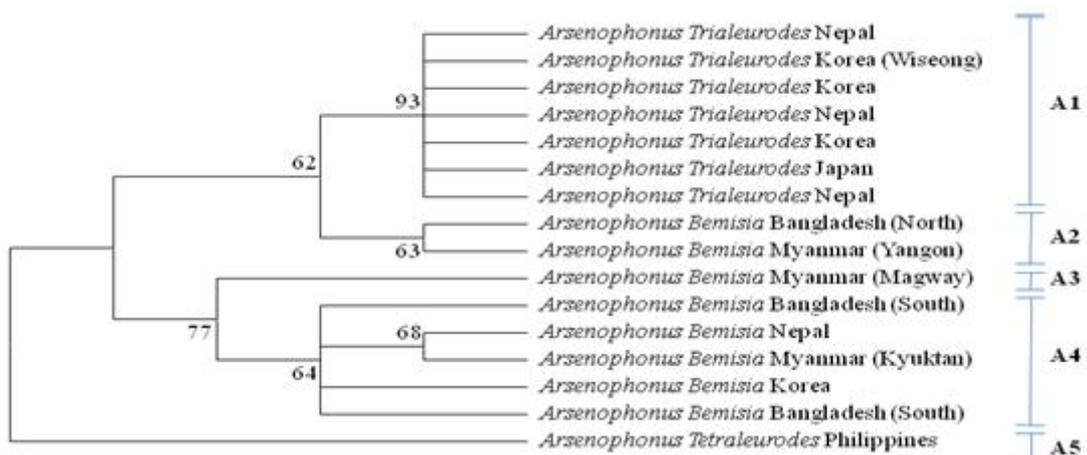


그림 1-3. According to the Bayesian method, the neighbor-joining (NJ) tree based on a fragment (~600 bp) using Kimura 2-parameter distances with complete deletion of gap/missing data, by partial 23S rDNA sequences. The number on each branch is the bootstrap support (1,000

replicates). Phylogenetic relationships 23S rDNA sequences of *Arsenophonus* in *B. tabaci* were compared with other *Arsenophonus* in different whiteflies sequences.

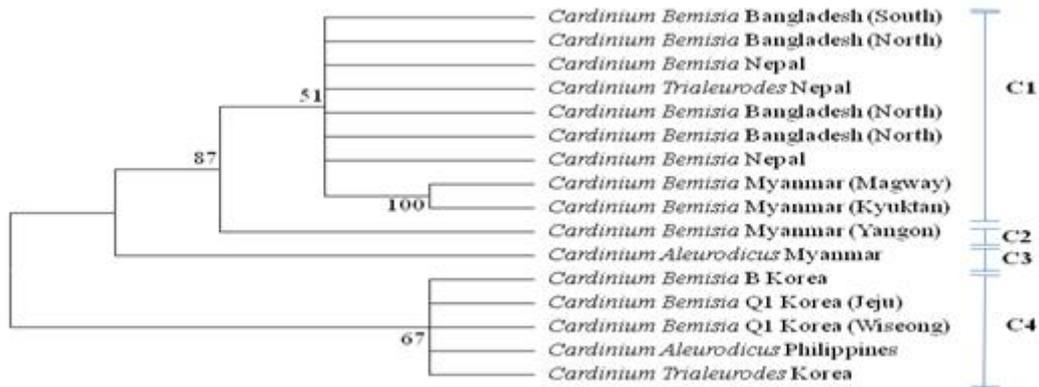


그림 1-4. According to the Bayesian method, the neighbor-joining (NJ) tree based on a fragment (~400 bp) using Kimura 2-parameter distances with complete deletion of gap/missing data, by partial 16S rDNA sequences. The number on each branch is the bootstrap support (1,000 replicates). Phylogenetic relationships 16S rDNA sequences of *Cardinium* in *B. tabaci* were compared with other *Cardinium* in different whitefly sequences.

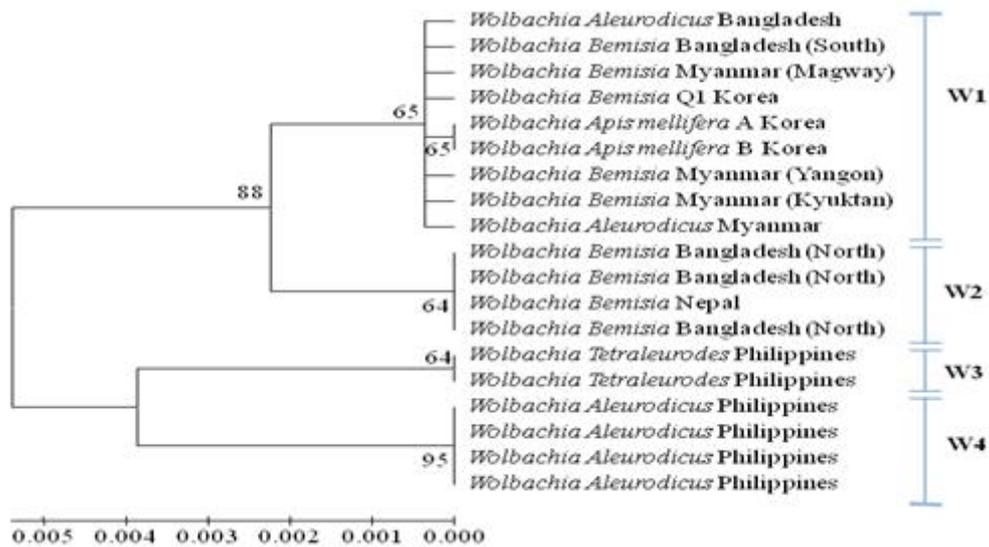


그림 1-5. According to the Bayesian method, the neighbor-joining (NJ) tree based on a fragment (~625 bp) using Kimura 2-parameter distances with complete deletion of gap/missing data, by partial 16S rDNA sequences. The number on each branch is the bootstrap support (1,000 replicates). Phylogenetic relationships 16S rDNA sequences of *Wolbachia* in *B. tabaci* were compared with other *Wolbachia* in different whiteflies sequences.

라. 요약

- (1) 국내에 존재하는 담배가루이는 3-biotype(B, Q, JpL)이 존재했다. 이 중에서 B-biotype은 경기도 고양 경북농업기술원내에 인공적 사육 개체군만 존재했고 Q-biotype이 전지역의 재배작물에 서식했다. 그러나, JpL-biotype은 야생의 인동덩굴에 서식했으며 토마토와 같은 작물에서는 채집되지 않았다. JpL-biotype은 한국과 일본에 서식하는 토착계통이지만 B는 1998년, Q는 2005년에 국내에 유입된 외래계통이다. 특히, 국내 Q-biotype은 3개 subgroup에서 Q1 subgroup에 속했으며 지중해 연안의 MED 계통(스페인)과 가장 유사했다. JpL-biotype에 관한 연구는 제3협동과제에서 중점적으로 연구했다(Jahan et al., 2012, 2014, 2015).
- (2) 가루이의 공생균 5종의 감염패턴을 조사해 본 결과 각 biotype 간에 서로 다르게 나타났다(표 1-2). JpL-biotype은 Arsenophonus, Cardinium, Wolbachia를 가졌으나, B-biotype은 Hemiltonella와 Rickettsia를 가졌고, Q1계통은 Cardinium과 Hemiltonella가 100%존재했으며 Wolbachia 감염율은 다양하게 나타났으나 Arsenophonus와 Rickettsia는 발견되지 않았다.
- (3) 국내계통은 동남아시아지역 토착계통과 83-84% 유사했으며 공생균의 분포도 다르게 나타났다(Jahan et al., 2015)
- (4) 온실가루이의 공생균 패턴을 조사해 본 결과 Arsenophonus, Cardinium을 가졌으나 Hemiltonella, Rickettsia, Wolbachia는 없었다(표 1-2).

2. 성주지역 담배가루이의 유전적 다양성 분석

가. 목적

- (1) 담배가루이 발생이 심각한 지역의 유전적 변이 및 다양성을 분석하기 위하여 경북 성주 참외재배지를 중심으로 조사하였다.
- (2) 담배가루이의 내부공생균(endosymbiont)의 종류를 비교분석하고 각 공생균의 염기서열을 토대로 지역 간 유연관계를 분석하였다.

나. 재료 및 방법

- (1) 성주 지역의 참외 및 토마토 시설재배지에서 19곳에서 담배가루이 및 온실가루이를 채집하였다.
- (2) 가루이의 biotype 및 그 내부공생균의 분포를 분석하였다.

다. 결과 및 고찰

- (1) 성주 지역의 시설재배지에서 채집된 담배가루이는 Q1-biotype이었고 공생균의 차이도 나타나지 않았다. 즉, Cardinium과 Hemiltonella가 100% 존재했고 Arsenophonus, Rickettsia, Wolbachia는 없었다.
- (2) 온실가루이는 Arsenophonus, Cardinium이 존재했다.
- (3) 즉, 매년 심각한 발생을 나타내지만 공생균의 분포는 변하지 않았다.

표 2-1. 성주지역 담배가루이 채집지 정보

번호	위치	작물	비고	주소
1	법정리	참외	참외농장 앞	경상북도 칠곡군 기산면 법정1길 14
2	유철리	호박	민남농장앞 근처 호박	경상북도 성주군 칠량면 유철리 326-3
3	유철리	참외/호박	민남농장앞 근처	경상북도 성주군 칠량면 유철리 326-3
4	안포리	참외/고구마	산림초등학교 앞	경상북도 성주군 칠량면 안포리 261-1
5	안포리	토마토 (바이러스 전염성 농작물 표본채 163)	김재동씨 하우스 (3000㎡)	경상북도 성주군 칠량면 안포리 270-3
6	상산리	참외	송발서 주변	성주군 성주읍 상산리 333-8
8	성주읍	참외 농장	성주읍교앞 근처	경상북도 성주군 성주읍 예산리 763-8
9	성주읍	참외	성주농원 단지 근처	경상북도 성주군 성주읍 예산리 1624-3
10	봉산리	참외	성주 봉산 2길 표지판	경상북도 성주군 성주읍 봉산리 645
11	봉산리	참외	주원로 396번지 옆 하우스	경상북도 성주군 봉진면 봉산리 747-13
12	봉곡리	참외	봉곡로중앙리 주변	경상북도 성주군 봉진면 봉곡리 447
13	봉곡리	참외	봉곡로가	경상북도 성주군 봉진면 봉곡리 869
14	수송리	참외	수송5길 앞	경상북도 성주군 봉진면 수송리 300
15	봉산리	참외	봉산교 지나서	경상북도 성주군 대가면 봉산리 538
16	홍성리	참외	수야네 토마토 교육농장	경상북도 성주군 대가면 홍성리 405
17	홍성리	토마토 (진원경 재배 TVLCV 검출 농장)	수야네 토마토 교육농장 (같이정 경주 진원경채소 하우스단지)	경상북도 성주군 대가면 홍성리 208
18	신동리	참외	주성농원앞	경상북도 성주군 산토면 신동리 350
19	홍암리	참외	홍암길동남권데이너 앞	경상북도 성주군 산토면 홍암리 819

표 2-2. 성주지역 담배가루이 biotype 및 내부공생균

Whitefly	Biotype	Endosymbiotic Bacteria				
		A	C	F	H	R
1(참외)	Q	-	+	-	+	-
2(호박)	Q	-	+	-	+	-
3(참외)	Q	-	+	-	+	-
4(참외)	Q	-	+	-	+	-
4(고구마)	Q	-	+	-	+	-
5(토마토)	Q	-	+	-	+	-
5(토마토)	온실가루이	+	+	-	-	-
6(참외)	Q	-	+	-	+	-
8(참외)	Q	-	+	-	+	-
9(참외)	Q	-	+	-	+	-
10(참외)	Q	-	+	-	+	-
11(참외)	Q	-	+	-	+	-
12(참외)	Q	-	+	-	+	-
13(참외)	Q	-	+	-	+	-
14(참외)	Q	-	+	-	+	-
15(참외)	Q	-	+	-	+	-
16(참외)	Q	-	+	-	+	-
17(토마토)	Q	-	+	-	+	-
18(참외)	Q	-	+	-	+	-
19(참외)	Q	-	+	-	+	-

3. 온실가루이의 종-특이적 프라이머 제작

가. 개요

- (1) 온실가루이(*Trialeurodes vaporariorum*)는 매미목, 가루이과의 곤충으로 다양한 원예작물에 피해를 주는 해충이다. 원산지는 북아메리카인데 1970년경에 아메리카, 유럽, 아프리카, 호주, 이란 등에 분포하였으나 1974년 일본 시설원에 재배지역에 출현하여 아시아에도 확산되기 시작하였다. 국내에는 1977년 수원지역 화훼재배지역에서 처음으로 발견되었으며 1983년에는 토마토 재배농가에서 발견되었고 그 이후로 점차 전국으로 확산되어 시설재배작물의 주요 해충이 되었다.
- (2) 온실가루이는 작물의 잎을 흡즙하여 식물의 생리적 장애를 일으켜 성장을 위축시키는 직접적인 피해를 뿐만 아니라 다량의 감로를 분비하여 그으름병을 유발하기도 한다. 또한, 온실가루이는 식물 바이러스의 주요 매개충으로서 식물바이러스병을 전파하여 심각한 피해를 끼치고 있는 실정이다. 최근 국내에서 발생한 tomato chlorosis virus (ToCV)는 단지 온실가루이에 의해서만 매개되는데 앞으로 온실가루이를 철저히 방제하지 않으면 농가에 큰 피해를 끼칠 것으로 판단된다.
- (3) 최근 온실가루이와 유사한 담배가루이가 유입되어 시설재배지에 확산되었는데 이 두 해충간에 정확한 종 진단에 오동정하는 경우가 빈번하다. 기본적인 형태적 동정 방법이 있지만 현장에서 종간의 차이가 뚜렷하지 않기 때문에 잘못 동정하는 경우가 빈번하다. 따라서 최근 발달한 분자생물학적 방법을 이용한 신속하고 정확한 종 동정 기술 개발이 절실히 요구되며, 외부 형태적으로 유사한 종 및 미성숙 발육태로 검출되는 표본들을 종 수준까지 구분하기 위한 종-특이적 진단법이 요구된다.
- (4) 이에, 온실가루이의 종-특이 프라이머를 제작하고 상기 프라이머를 이용하여 PCR 진단을 하는 경우, 온실가루이를 정확하게 진단할 수 있다.

나. 재료 및 방법

- (1) 온실가루이 및 담배가루이의 DNA 확보

온실가루이와 담배가루이 성충으로부터 DNA 샘플을 확보하였다.

- (2) 종-특이적 프라이머 제작

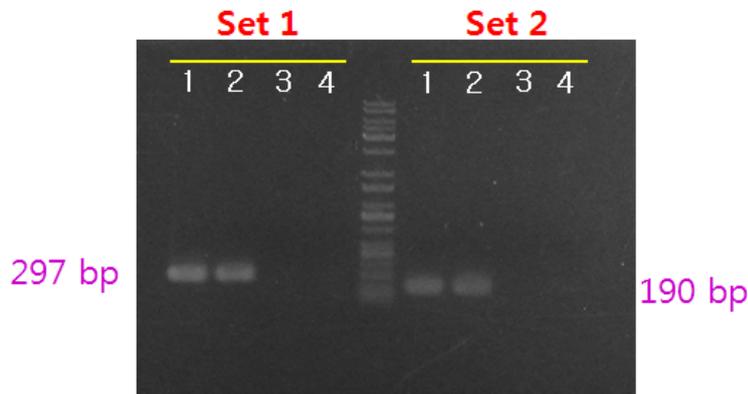
온실가루이 COI 염기서열 영역에 존재하는 종 특이적으로 나타나는 염기만을 발굴하여 종-특이적 프라이머를 제작하였다. COI 염기서열은 NCBI(National Center for Biological Information) database에서 발굴한 것과 채집한 가루이로부터 분리한 염기서열을 분석한 것을 이용하였으며, 활용한 염기서열은 온실가루이(*Trialeurodes vaporariorum*) 31개, *T. ricini* 5개, *T. lauri* 5개, *T. abutilonea* 1개, 담배가루이(*Bemisia tabaci*) 5개를 이용하였다. 총 47개의 염기서열을 비교하여 온실가루이에 특이적인 염기를 발굴하였으며 (표 2-1), 이 염기를 포함하는 영역을 선정하여 종-특이적 프라이머를 아래 표 1과 같이 제작하였다.

표 3-1. 온실가루이 종-특이적 프라이머 및 PCR 조건

No	종-특이적 프라이머	프라이머 Set	시퀀스(5'-3')	Size (bp)	Anneal temp (°C)/ Cycle
1	Tv-F1	F1R1	5'-GGATGTGGACTCGCGCTTA-3'	297	57/35
3	Tv-R1		5'-AACACAAGACCCCCTATAATAGCG-3'		
2	Tv-F2	F2R1	5'-TGTCATTTAATCCCCTTACTTCTTGG-3'	190	57/35
3	Tv-R1		5'-AACACAAGACCCCCTATAATAGCG-3'		

다. 결과

(1) 2세트의 프라이머를 이용하여 온실가루이와 담배가루이를 PCR 진단해 본 결과, 온실가루이만 특이적으로 표식되었다.



1, 2: *T. vaporariorum* 3, 4: *B. tabaci*

그림 3-1. 온실가루이 종-특이적 프라이머를 이용한 가루이 종 진단

2절. 예찰

1. TYLCV병 확산 원인으로서는 토마토 육묘장의 가루이 발생, TYLCV 감염여부 및 현장의 관리 실태 조사함
2. 담배가루이의 지역별 살충제 저항성을 조사함

1. 국내 토마토 육묘장의 TYLCV 및 가루이 발생 실태 조사

가. 개요

(1) 최근 토마토 TYLCV병이 수년내에 전국적으로 확산된 원인을 분석하는 가운데 육묘장의 바이러스 감염 가능성을 구명하고자 육묘장의 가루이 발생 및 육묘, 종자의 TYLCV 감염 여부를 진단하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 육묘장 육묘 및 종자 구입

(가) 경상지역 5개 육묘장으로부터 육묘 구입하였다.

(나) 육묘장 및 시중에 시판되고 있는 토마토 종자를 구입하였다.

육묘장 사용 품종 : 슈퍼도테랑 (=레전드썬머)

시중에 시판되는 품종: 서광토마토, 예광토마토

(2) 육묘의 TYLCV 감염 PCR 진단 및 염기서열 분석하였다.

(가) 육묘의 잎 또는 종자로부터 DNA를 추출한 뒤에 TYLCV-specific primer를 이용하여 TYLCV 감염 여부를 PCR 진단하였다.

(나) PCR product의 염기서열을 결정하고 유사성을 비교 분석하였다.

(3) 토마토 종자 재배시에 TYLCV 감염 여부 분석하였다.

(가) 육묘장에서 사용하는 종자를 구입하여 직접 파종을 한 뒤에 자란 어린 육묘의 잎으로부터 DNA를 추출하여 TYLCV 감염 여부를 진단하였다.

(4) TYLCV 피해 농가의 토마토 씨앗을 이용한 TYLCV 발병 여부 진단하였다.

(가) TYLCV 대량 발생 농가의 토마토 열매를 채집한 뒤에 씨앗을 채종하여 파종을 하고 자라난 육묘의 잎에서 추출한 DNA 샘플을 이용하여 TYLCV 감염 여부 진단했다.



그림 1-1. 토마토 육묘장 모습



그림 1-2. 구입한 육묘

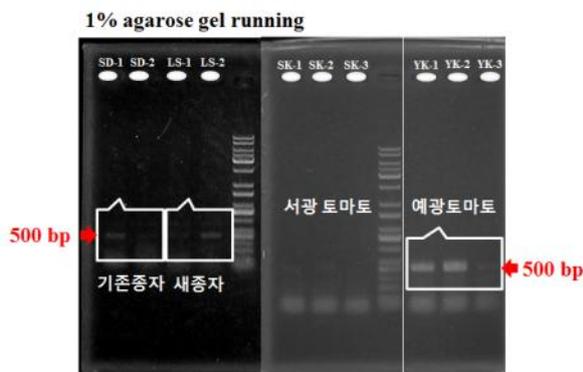


그림 1-3. 육묘의 TYLCV 감염 여부 진단



그림 1-4. 토마토 열매에서 채종한 종자를 파종방법

다. 결과

- (1) 육묘장에서 채집한 육묘에 TYLCV의 감염이 나타났으며 6개 육묘장에서 4곳의 육묘에서 감염 확인하였다.
- (2) 육묘의 TYLCV 염기서열 분석결과 국내에 보고된 TYLCV와 99-100% 유사하였다.
- (3) K 육묘장에서 사용한 종자의 TYLCV에 오염 또는 감염여부를 조사한 결과 종자에서 바이러스가 확인하였다.
- (4) TYLCV 대량 발생 농가(대구 화원)의 토마토에서 채종한 종자를 파종하여 생산된 육묘에도 TYLCV 감염된 것을 확인하였다.
- (5) 즉, 육묘장의 토마토 육묘는 TYLCV에 감염된 것이 많았으며 그 이유는 TYLCV에 감염된 종자를 사용했기 때문인 것으로 판단된다.
- (6) 시중에 판매되는 2개 품종의 토마토 종자의 TYLCV 감염여부를 진단해 본 결과 감염된 것도 있고 감염되지 않은 것도 나타났다(그림 1-3).
- (7) 또한 같은 품종의 종자라도 Lot number에 따라서 감염율이 다르게 나타났다.

표 1-1. 육묘장 및 종자의 TYLCV 감염 결과 요약

조사지역	상호명	조사일	육묘 품종	TYLCV Primer	TYLCV 감염여부	종자전염
	M 육묘장		큐피랑	TYLCV 1323/375	무	-
밀양	G 육묘장	2014.04.04	레전드번머	TYLCV F/R 500	유	500 bp
	A 육묘장		슈퍼도태랑	TYLCV F/R 500	유	500 bp
성주	K 육묘장	2014.04.29	슈퍼도태랑	TYLCV F/R 500	유	500 bp
	S 육묘장		레전드번머	TYLCV F/R 500	유	500 bp
함안	M 육묘장	2014.06.25	슈퍼도태랑	TYLCV F/R 500	무	-

3. 담배가루이에 대한 지역별 약제 저항성 모니터링

가. 개요

- (1) 국내 가루이 방제를 위하여 화학살충제의 과다사용이 빈번한 실정이다.
- (2) 특히, 국내에 분포하는 Q1-biotype은 살충제 저항성이 높아서 화학적 방제에 어려움이 있는 것으로 알려져 있다.
- (3) 본 연구에서는 지역별로 등록된 화학살충제의 저항성을 조사해서 살충제 선발에 필요한 정보를 제공하고자 한다.

나. 재료 및 방법

- (1) 저항성 모니터링을 위한 대상 해충은 담배가루이며 대상 살충제로서는 대상해충의 방제에 등록된 약제 중 많이 쓰이고 있으며, 상대적으로 새로이 개발된 약제로 앞으

로 계속 사용될 가능성이 높은 약제를 선정하였다.

- (2) 약제는 서로 다른 계통의 살충제로 그 중 하나씩 7가지의 약제를 선발하였다.
- (3) 군위에 위치한 토마토 친환경 농가에 서식하는 담배가루이를 약제 처리의 대조구로 정하고 결과를 비교 분석하였다.
- (4) 성충에 대한 살충제 경구독성 분석을 위하여 double-layered parafilm chamber를 이용. 시험 유리관의 이중 파라필름 사이에 살충제를 약제 희석 농도에 맞게 희석하여 약제를 담배가루이 성충에 섭식시키고, 24시간 후 사망률을 결정하였다.
- (5) 경구를 통한 성충의 살충 분석 뿐 아니라 직접적 살포 영향을 실내 실험으로 알아보기 위하여 건전한 잎을 약제에 담갔다가 말린 후 담배가루이에 섭식 시켰을 때의 살충률을 알아보았다.

표 3-1. 약제 저항성 모니터링에 사용된 농약

연번	상표명	계통	유효성분	작용기작
1	델리게이트	스피노신계	스피네토람	nAChRs 바인딩하여 신경이상흥분지속
2	베네비아	디아מיד계	시안트라닐리프롤	Ryanodine 수용체 조절제 (ion 채널 이상)
3	젠토킬	항생제	아바멕틴	GluCl(염소채널) 이상
4	지존	테트로닉에시드계	스피로메시펜	아세틸 CoA 저해, 산란억제
5	팡파레	IBR계(곤충행동제어)	피리플루퀴나존	섭식저해
6	팬텀	네오니코티노이드계	디노테퓨란	신경전달물질 수용체차단
7	코니도	클로로니코티닐계	이미다클로프리드	아세틸콜린 조절 수용체들 (nAChR)에 작용자(agonist)들로 작용

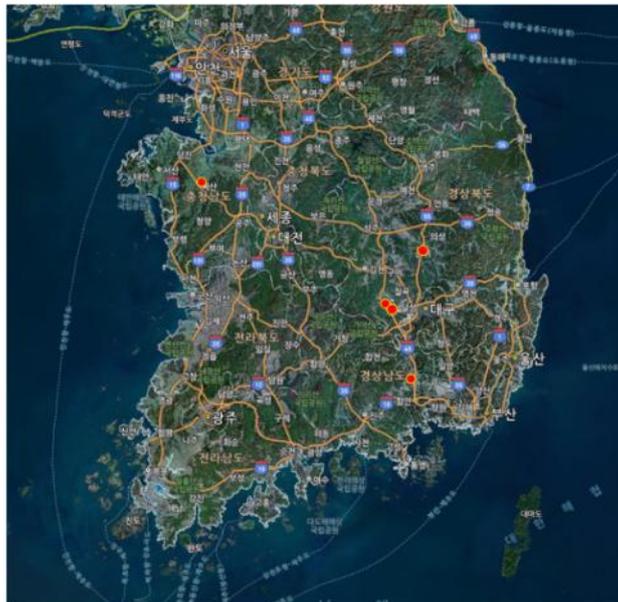


그림 3-1. 약제 저항성 시험에 사용된 담배가루이 채집 지역 분포

다. 결과 및 고찰

- (1) 담배가루이 약제에 대한 저항성은 지역마다 차이가 있었으며, 기존 지역에서 사용하는 살충제에 따라 차이가 있을 것으로 판단된다.
- (2) 경구독성을 통한 담배가루이 방제에 있어서 대조구인 친환경 농가는 무처리를 제외한 농약 처리구에서 모두 높은 살충력을 보였다.
- (3) 창녕 지역에서 채집한 담배가루이는 디노테퓨란 계통 약제에 대한 감수성이 가장 높았고, 스피로메시펜 계통 약제에 대한 저항성이 가장 높게 나타났으며 두 약제의 살충율 차이는 5배 정도로 큰 차이를 보였다.
- (4) 같은 성주지역이라도 농가별로 살충제 저항성이 다르게 나타났다. 즉, 스피로메시펜 계통 약제에 대한 저항성은 같았으나, 성주 대항리는 스피네토람 계통에 감수성을 성주 대항리는 아바멕틴 계통의 약제에 대한 감수성을 보였다.
- (5) 대부분의 조사지역에서 비교적 신규 약제인 델리게이트, 젠토킬, 베네비아에 대한 약제 감수성이 높은 것으로 보인다.
- (6) 스피로메시펜을 유효성분으로 하는 기존 약제의 저항성이 조사된 전 지역에서 공통으로 나타났으며 이것은 수년간 스피로메시펜 계통의 약제를 다량 사용함에 따라 약제 저항성의 영향인 것으로 판단된다.

표 3-2. 지역별 저항성, 감수성 약제 목록

		군위	예산	창녕	성주(대항)	성주(대흥)
감수성	1 순위	디노테퓨란	스피네토람	디노테퓨란	스피네토람	아바멕틴
	2 순위	코니도	젠토킬	젠토킬	젠토킬	델리게이트
저항성	1 순위	지존	지존	지존	지존	지존
	2 순위	광파레	광파레	광파레	광파레	베네비아

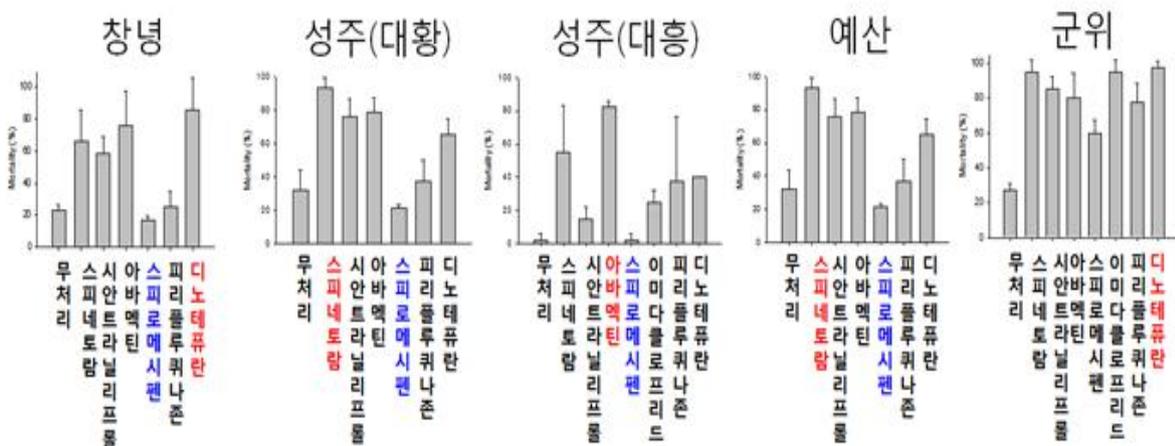


그림 3-2. Parafilm assay를 이용한 지역별 담배가루이 살충율 분석

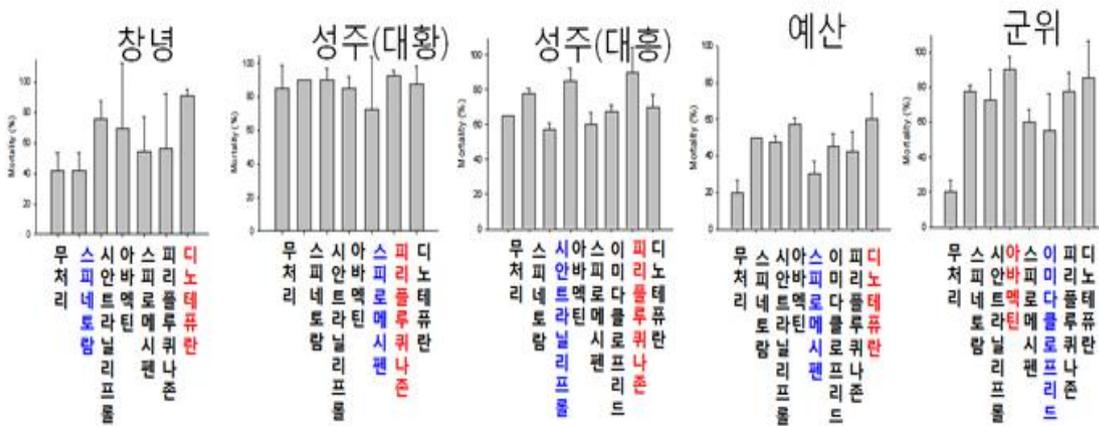


그림 3-3. Leaf Dipping assay를 이용한 지역별 담배가루이 살충율 분석

3절. 기작

1. 담배가루이의 TYLCV 보독에 대한 생리, 행동 및 유전자 발현의 변화를 분석함
2. TYLCV 보독이 되면 가루이의 발달, 생식 및 행동(특히 섭식행동)이 촉진됨
3. 그러나, 보독충은 고온 및 살충제 등 열악한 환경요인에 대한 감수성이 증가함
4. 즉, 담배가루이는 바이러스 매개활동이 촉진되지만 환경에 대한 내성은 감소함
5. 담배가루이의 TYLCV-보독에 따른 유전자 발현 pool의 차이 분석함
6. RNAi 기법으로 hsp70 dsRNA의 섭식을 유도하여 가루이 제어기술 개발함

1. TYLCV 보독에 대한 담배가루이의 발달을 및 생식을 비교 분석

가. 재료 및 방법

담배가루이 Q1-biotype의 성충(d0)을 채집하여 건전 및 TYLCV 감염 토마토에 27 일간 흡즙시키면서 산란율을 측정하였다. 또한, 담배가루이를 건전 및 TYLCV 감염 토마토에 지속적으로 키우면서 각 충태별 발달기간을 비교측정하였다(표 1-1). 이때에 온도조건을 22-24° C 와 28-30° C 의 조건에서 사육하면서 그 결과를 비교하였다(표 1-2, 1-3). 또한, 건전 및 TYLCV 감염 토마토에서 채집한 알 군집에서 자란 성충의 성비(sex ratio)를 비교하였다(표 1-4).

나. 결과 및 고찰

- (1) 담배가루이의 산란율은 보독충이 비보독충보다 낮게 나타났다(그림 1-3).
- (2) 담배가루이의 발달기간은 보독충이 짧았다. 또한 성충의 생존기간도 비보독충은 30.9일인데 비하여 보독충은 26.9일로서 4일정도 짧았다(표 1-4).
- (3) 이러한 현상은 사육온도조건이 28-30일때에도 유사한 패턴을 나타냈다(표 1-3).
- (4) 담배가루이의 성비(sex ratio)는 수컷의 비율이 약간 높았지만 보독충과 비보독충 간의 차이는 없었다(표 1-4)(Jahan et al., 2014).

(5) 알의 배 발달과정을 현미경으로 조사해 본 결과 보독충과 비보독충에서 산란된 알의 embryo 발달과정에는 큰 차이를 찾을 수 없었다(그림 1-3).

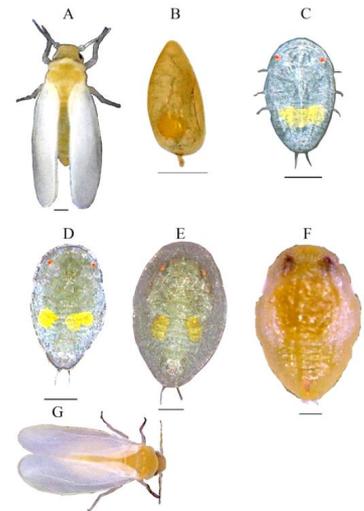


그림 1-1. Measurement of the different stages of *Bemisia tabaci*, A; adult female whitefly, B; matured egg, C; 1st instar (crawler), D; 2nd instar, E; 3rd instar, F; 4th instar (false pupa), G; eclosed day-0 adult whitefly. Here scale bars indicate 100 μm .

표 1-1. Measurement the different parts and whole body of whitefly and it's different stages in μm

Length (μm)	Egg	1 st instar	2 nd instar	3 rd instar	4 th instar	Adult female	Adult male	Stylet	Antenna
Mean	196.38	261.52	322.80	488.00	661.65	963.69	827.79	204.08	259.97
\pm SE	1.54	1.84	4.45	1.79	11.58	18.85	7.96	2.18	8.34

표 1-2. Comparison of developmental period of each stage between NV and V Q1 biotype of *B. tabaci* in 22-24 °C temperature

Whiteflies	Biotype	Eggs (days) M \pm SE	Instars of Nymph (days) M \pm SE				Total days M \pm SE	Longevity (d0-death) in days
			1 st	2 nd	3 rd	4 th (Pupae)		
Non-viruliferous	Q1	9.67 \pm 0.33a	5.67 \pm 0.33a	4.00 \pm 0.58a	4.67 \pm 0.33a	7.67 \pm 0.67a	31.67 \pm 0.88a	30.90 \pm 0.65a
Viruliferous	Q1	7.33 \pm 0.33b	3.33 \pm 0.33b	5.33 \pm 0.33a	4.67 \pm 0.33a	4.33 \pm 0.33b	25.00 \pm 0.58b	26.95 \pm 0.47b

표 1-3. Comparison of developmental period of each stage between NV and V Q1 biotype of *B. tabaci* in 28-30 °C temperature

Whiteflies	Biotype	Eggs (days) M \pm SE	Instars of Nymph (days) M \pm SE				Total days M \pm SE	Longevity (d0-death) in days
			1 st	2 nd	3 rd	4 th (Pupae)		
Non-viruliferous	Q1	4.67 \pm 0.33a	4.33 \pm 0.33a	2.67 \pm 0.33a	3.67 \pm 0.33a	6.50 \pm 0.65a	21.84 \pm 1.97a	18.50 \pm 1.04a
Viruliferous	Q1	4.33 \pm 0.33a	3.33 \pm 0.33a	2.67 \pm 0.33a	2.33 \pm 0.33b	4.75 \pm 0.48b	17.41 \pm 1.80b	15.25 \pm 0.48b

표 1-4. Sex ratio observed in *B. tabaci* that influenced by TYLCV

Observation	Total eggs	Number of eclosion		Female: Male
		Female	Male	
Non-viruliferous	300	135	165	1 : 1.22
Viruliferous	300	102	198	1 : 1.94

그림 1-2. Adult *Bemisia tabaci* with eggs and ventral view of female and male whiteflies

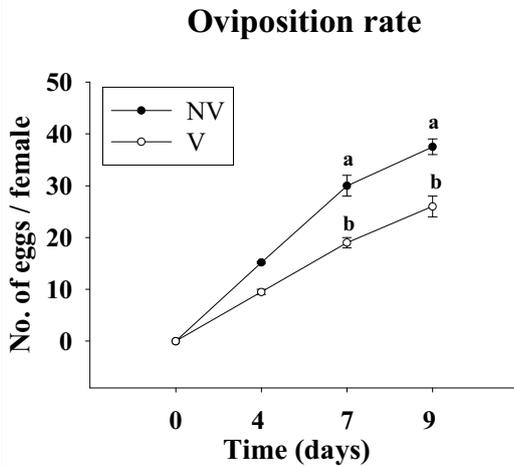


그림 1-3. Oviposition rates of whiteflies. A pair of 0-day-old adult whiteflies was collected from non-viruliferous (NV) and viruliferous (V) colonies and put in the clip cages. The oviposited egg numbers were counted for 9 days. Each bar represents mean (The bars in the same time set with different letters are significantly different at $p < 0.05$) \pm SE.

2. TYLCV 보독에 대한 담배가루이의 유전자 발현을 비교 분석

가. 개요

(1) 매개충의 바이러스 매개작용을 조절하는 인자를 발견하고 그 작용기작을 밝힌다.

나. 재료 및 방법

- (1) Realtime PCR 법으로 TYLCV 보독충과 비보독충간의 발현율을 비교 분석함
- (2) NCBI에 등록된 담배가루이의 발달, 면역, 근육, 신경계, 대사 및 생식에 관련된 주요유전자 26개의 염기서열을 활용하여 real-time PCR용 primer를 제작하였다(표 2-1). 담배가루이의 성충(d0)을 채집하여 건전 및 TYLCV 감염 토마토에 24시간 흡즙시킨 후 RNA를 추출하고 역전사법으로 합성한 RT product를 이용하여 PCR을 시행하였다. target 유전자의 발현량을 비교하기 위하여 대조구로서 actin gene을 이용함

다. 결과 및 고찰

- (1) 26개 유전자 발 12개 증가했고 10개 감소했으며 4개는 차이가 없었다(표 1-2).
- (2) 발현율이 증가한 유전자 중에서 근육관련 유전자(Myofilin, myosin H chain, Myosin L chain, Profilin)과 신경계 유전자(Acetylcholine esterase, Acetylcholine receptor, Sodium channel)들이 2-6배 높게 나타났다. 또한, 발달관련 유전자(Ecdysone receptor, Untraspiracle)과 면역관련 유전자(Knottin 1), 대사효소(carboxylesterase) 그리고 소화관 유전자 (Midgut gene, BtCG5885)도 높게 나타났다 (그림 2-1).
- (3) 발현율이 감소한 유전자들 중에서 근육관련 유전자(Troponin 1-a1, Tropomyosin, Paramyosin, Tubulin a-1 chain), 대사효소(Thioredoxin peroxidase 1, UDP-glucuronosyl transferase), 생식관련(vitellogenin) 및 면역관련(P8 protein)이 나타났다.
- (4) 또한, 발현율에 차이가 없는 유전자 중에서 근육관련(Myosin L alkali chain, Ferritin 2), 대사 및 면역관련(Cytochrome P450, Knottin 3), 침샘(Salivary gland gene BTGATAd)가 있었다.

- (5) 즉, 담배가루이는 TYLCV 보독함에 따라서 발현율이 다양하게 변화했으며 특정 유전자들의 발현율이 증가함으로서 바이러스 매개작용에 관여할 것으로 판단된다.
- (6) TYLCV 보독에 따라 발현율이 증가한 근육 및 신경계 관련 후보유전자를 대상으로 RNAi를 실시하여 바이러스 매개작용을 차단할 수 있을 것이라고 판단된다.

표 2-1. Nucleotide sequences of gene specific primers for quantitative real-time RT-PCR.

Type of protein	Target genes	Size (bp)	Primer Sequence (5'-3')	GenBank accession no.
Control	Bt-Actin gene	78	F-GACGGACAGGTCATCATAATCG R-CATACCCAAGAAGGATGGCTG	AF071908
	BtActin	231	F-TCA CCACCACAGCTGAGAGA R-CTCGTGGATACCGCAAGATT	
Immune	Knottin (Btk-1)	71	F-CATTCCAATCCCTCCGAAAA R-CGACCCTAGGCAAGTGTGAAC	DQ308606
	Knottin 1		F-TCCTGGACATTGCACAACCA R-TTTCGGAGGGATTGGAATGA	EE595695
	Knottin 3		F- CATGGTCGCTGTCAACGTCT R- TTGCAACTGGCACCTTTGG	EE597369
	P8 protein		F- CCACCAGACCGAAACCTGTT R- CGGTCAGGAGGCAGCTTATT	EE600305
	Ferritin 2		F- CTCCTCGAAGGCCAGACTA R- TGGACGAAATGAGATGAAGTCCT	EE603117
	Ultraspiracle	73	F-AAGCGGCAGATCGACAACCTT R-ACGGGTAACCTCGGTGAAATGA	EF174330
			F-TGTTTGCAACTAACCAGCCGTATA R-AGCAGATCCTCCACAGTATCACC	EF174329
Development	Ecdyson receptor	76		
	Vitellogenin	71	F-GACAAAATAGCAACGGCCAAAA R-GGCTGGTTGCATGAAGATTCT	EE597946
Muscular	Myosin H chain		F-ATTCCGCAAGGCACAACAAG R- AAGTCGGCTCGTTCTCAGC	EE599189
	Myosin L chain		TTCAGACGAGGATGTCGCA CGTCATAGATTTTCGAACGCG	EE597481
	Myosin L alkali chain		TGGCTGAATTCCAAGAAGCCT TGTGTACCTCGACTGTCGA	EE600954
	Paramyosin		F-GCAACCTGTCTTAATCCGC R-TGTTGGTGGTGACGAAGGTG	EE597453
	Myofilin		F- AGCAACCTCATCATCCGCAC R- CGCGTGATTTGATTGTCGAG	EE674613
	Profilin		F- ACGGGCTAAACTTGGCAAAG R- GCTTGGTGTGTTTTTCATGCAGT	EE597329
	Tropomyosin		F-GAACAGTTCATGCAAGTCTCCG R-GAGCGCCTTGTCCTTCTCT	EE601593
	UDP-glucuronosyl transferase		F- CTGCCGAGTATAGACGCGGT R- GGGCTTGAGAATCCGAAAA	EE595838
	Thioredoxin peroxidase 1		F- GCACGTGAATATGGCGTCCT R- TCCTCGGTAAGGGATTCCAGT	EE598240
	Troponin I-a1		F- AAAAGGCCGCCGAAGAATTA R- TTCAGCTGCTTTCCTTCTTGT	EE596386
Metabolic	Cytochrome P450	71	F-AACATTGGATCCCCTGTCAAAC R-TCTTGTGACGTACTTGCCGC	EU344879
	Carboxyl esterase (CoE1)	71	F-TGTTGAGGTGGGTGAAGAAAGA R-TTCGCCGAAAAGAGTGATGTT	EF675185
	Tubulin alpha-1 chain		F- ACTGGTGTCCCCTGGGTTT R- CGGTGGGTGGTTGGTAGTTG	EE598061
	BtCG5885 (midgut)	370	F-GCTTCGTAATCGGCAACTTC	

			R-CGAAAGACCAAGAAGAAGAGC	
	BtGATAd (salivary gland)	233	F-CAGGATTATCGTCCCCAGAA	
			R-CGATCGACCAAGTGGAGTTT	
	Sodium channel	71	F-TTCATTTTTGCTGTGATGGGAAT	DQ205204
			R-CCAGGAAAGCGATCAACATTGT	
Nervous system regulated	Acetylcholine esterase (AChE2)	82	F-TCGCTCAAGTCATGTCAGACAAC	AJ576072
			R-TCGCCCCACAAATTAGTGC	
	Nicotinic acetylcholine receptor(AChR α4)	71	F-TACTATCCTTGCTGCACTGAACCA	AJ880082
			R-AATAACGTTTTCGTCGCATC	

표 2-2. TYLCV 보독충과 비보독충간의 유전자 발현을 비교

Selected Genes	Regulation status	NV	V	V:NV
Myosin L chain	Up-regulated	1.7	4.1	2.4
Myosin H chain	Up-regulated	1.2	3.7	3.1
Profilin	Up-regulated	1.0	6.0	6.0
Myofilin	Up-regulated	1.4	3.8	2.7
Knottin1	Up-regulated	1.0	2.9	2.9
Ultraspiracle protein	Up-regulated	2.1	5.1	2.4
Ecdyson receptor	Up-regulated	2.0	4.5	2.3
Sodium channel	Up-regulated	1.1	3.9	3.5
Acetylcholinesterase	Up-regulated	1.1	5.5	5.0
Acetylcholine receptor	Up-regulated	1.9	3.8	2.0
CoE1	Up-regulated	4.4	5.8	1.3
BrCG5885 (Midgut)	Up-regulated	1.5	3.1	2.1
Thioredoxin peroxidase1	Down-regulated	3.5	1.7	0.5
P8 protein	Down-regulated	3.0	1.0	0.3
UDP-glucuronosyl transferase	Down-regulated	3.9	1.1	0.3
Ferritin 2	Down-regulated	2.9	2.1	0.7
Knottin 3	Down-regulated	3.0	1.9	0.6
Troponin I - α1	Down-regulated	3.4	0.5	0.1
Tubulin α-1 chain	Down-regulated	4.0	2.0	0.5
Paramyosin	Down-regulated	2.6	0.8	0.3
Tropomyosin	Down-regulated	3.6	2.0	0.6
Vitellogenin	Down-regulated	5.5	2.5	0.5
Actin	Unchanged	4.5	4.5	1.0
Cytochrome P450	Unchanged	3.1	3.5	1.1
BrGATAd (Salivary gland)	Unchanged	3.8	4.2	1.1
Myosin L alkali chain	Unchanged	2.3	2.7	1.2

3. TYLCV 보독에 대한 가루이의 섭식행동 및 섭식율 비교 분석

가. 재료 및 방법

담배가루이에 대한 RNAi법을 실시하는데 있어서 개체의 크기가 너무 작아서 injection 방법이 어려기 때문에 섭식을 통한 전달방법을 계획하였다. 가루이의 섭식 행동 및 섭식율을 조사하기 위하여 double-layer parafilm assay를 실시하고 섭식 행동을 비교하였다(그림 3-1).

나. 결과 및 고찰

- (1) Parafilm saay에서 24시간동안 섭식하게 한 뒤에 파라필름의 구멍의 수를 측정해 본 결과 비보독 개체는 총 728(수컷), 452(암컷)이고 TYLCV 보독충은 1619(수컷), 1080(암컷)으로 나타났다. 즉, 보독충이 비보독충보다 약 2.3배 더 probing을 한 것이다(표 3-2).
- (2) 파라필름에 나타난 구멍의 크기를 소형, 중형 대형으로 비교해 볼 때에 소형이 가장 많고 대형이 가장 적었다. 즉, 가루이가 먹이를 먹기 위하여 probing을 할 때에 직접 섭식을 하기 위한 대형 구멍보다 구기의 끝부분을 탐침하는 행동이 많았다는 것을 말한다. 이러한 현상을 비보독충과 보독충이 같은 패턴을 나타냈다.
- (3) 파라필름에 나타난 구멍의 크기는 7.5-26.7 μm 이며 구기의 가장 큰 부분은 27.08 μm 였다(표 3-1).
- (4) 담배가루이 성충을 5일동안 계속해서 섭식을 실시해 본 결과 구멍의 수는 큰 차이를 나타내지 않았지만 보독충의 경우 시간이 지날수록 대형 구멍의 수가 감소하였다(그림 3-3). 즉, 인공먹이를 이용한 섭식활동에서 활동력이 저하되었을 것으로 판단된다(Jahan et al., 2014a)
- (5) 바이러스 보독이 가루이의 소화작용에 끼치는 영향 중에서 소화효소의 활성화에 끼치는 영향을 분석하였다. 가루이 성충(d0)을 건전 및 TYLCV 감염 토마토 잎에서 24시간 동안 섭식을 하게 한 다음 가루이의 단백질을 추출하여 단백질 소화효소의 활성을 측정하였다. 5종류의 단백질 소화효소 (trypsin, chymotrypsin, alkaline phosphatase, aminopeptidase, esterase)의 활성을 측정해 본 결과 비보독충과 보독충의 활성을 큰 차이를 나타내지 않았다. 또한, 암수 간의 차이도 나타나지 않았다(그림 3-5).
- (6) 또한, 신경전달물질인 acetylcholine의 분해효소(AchE)의 활성을 비교해 본 결과 비보독충 및 보독충이 차이는 없었다. 또한, 암수간의 차이도 나타나지 않았다(그림 3-5).
- (7) 본 연구결과를 통하여 담배가루이는 TYLCV 바이러스에 보독이 되었을 때에 섭식 행동, 즉 probosis probing behavior이 2.3배 증가했으나 단백질분해효소 및 신경전달물질 분해효소의 활성화에는 차이가 없었다.

그림 3-1. Materials are needed to conduct this probing experiment. A; falcon plastic tube in 1 cm of diameter, B; aeration tube making by 200 μ l yellow pipette tip, C; upper part of the tube covered by parafilm, D; after setting instruments all tubes put on the rack, E; sucrose 20% as artificial diet, F; making D-0 whiteflies on the tomato leaf with wet cotton on petridis, G; parafilm used as a sandwich with artificial diet and H; handmade aspirator for collecting single whitefly and release to plastic tube.

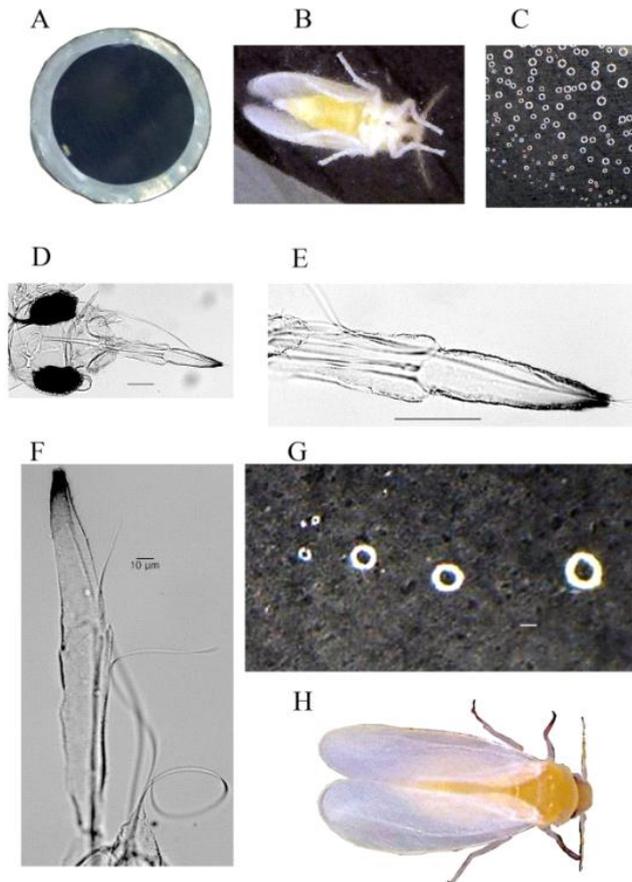
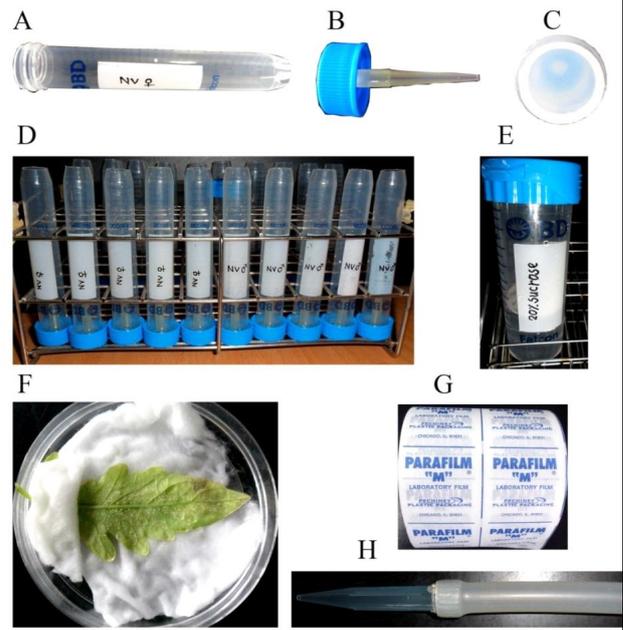


그림 3-2. The proboscis size of *Bemisia tabaci* and probe diameter on parafilm by the whitefly. A; a plastic falcon tube in 1 cm of diameter covered with double layered parafilm filled with 20% sucrose as artificial diet, B; male *Bemisia tabaci* sucked the artificial diet from parafilm, C; making hole on parafilm by whitefly (snaps are taking by Dimis 200x), D; Mouthparts with head of whitefly and bar indicates 50 μ m, E; proboscis of whitefly (dorsal view) scale bar indicate 50 μ m, F; lateral view of proboscis and scale bar indicates 10 μ m, G; different size of probe that making by the proboscis of whitefly and scale bar indicates 10 μ m, H; adult whitefly.

표 3-1. Measurement of the punctures (holes) on a parafilm and the proboscis diameter of the whitefly

Diameter of hole on the parafilm (μm)			Diameter of proboscis in different part (μm)		
Small hole	Medium hole	Large hole	Tip of proboscis	Behind of tip	Middle of proboscis
7.5	18.33	26.67	7.29	17.71	27.08

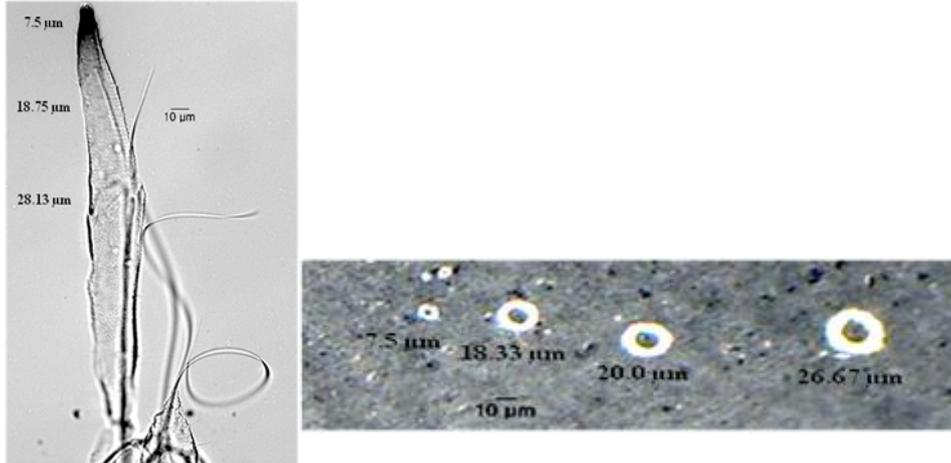


그림 3-3. A stylet of whiteflies with measurement of distinguished part and the measurement of punctures on parafilm by the stylet of *B. tabaci*

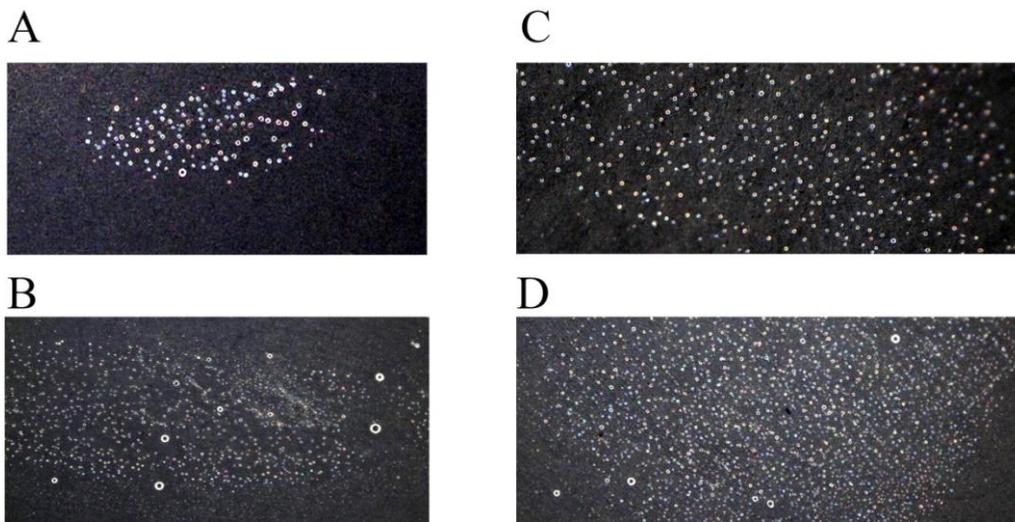


그림 3-4. Comparison of probing frequency between NV and V *Bemisia tabaci* on parafilm assay, A; probing by Non-viruliferous female (NV-F), B; probing by Non-viruliferous male (NV-M), C; probing by TYLCV-viruliferous female (V-F), D; probing by viruliferous male (V-M).

표 3-2. Comparison of different spot numbers between non-viruliferous (NV) and TYLCV-viruliferous (V) adult male and female whiteflies.

TYLCV acquisition	No. of whitefly (n)	Time of exposure (hours)	Area of a disk (cm) ²	Male			Female		
				Small spots* (n±SE)	Medium spots (n±SE)	Big spots (n±SE)	Small spots (n±SE)	Medium spots (n±SE)	Big spots (n±SE)
NV	1	24	0.79	609.32±47.80	91.64±13.16	28.96±2.79	382.72±24.96	49.04±4.63	21.72±0.91
V	1	24	0.79	1294.28±64.87	244.72±12.90	81.80±2.50	822.24±62.87	196±9.85	62.37±5.98

*Spot numbers were counted for 24 h that was generated by a single d0 adult whitefly.

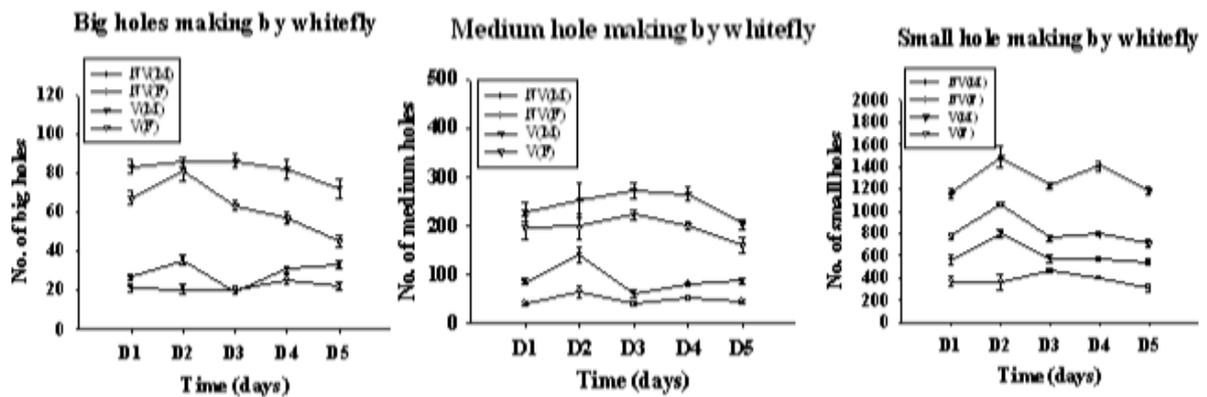


그림 3-5. Different size of probing making by NV and V male and female in time sequence from D1 to D5.

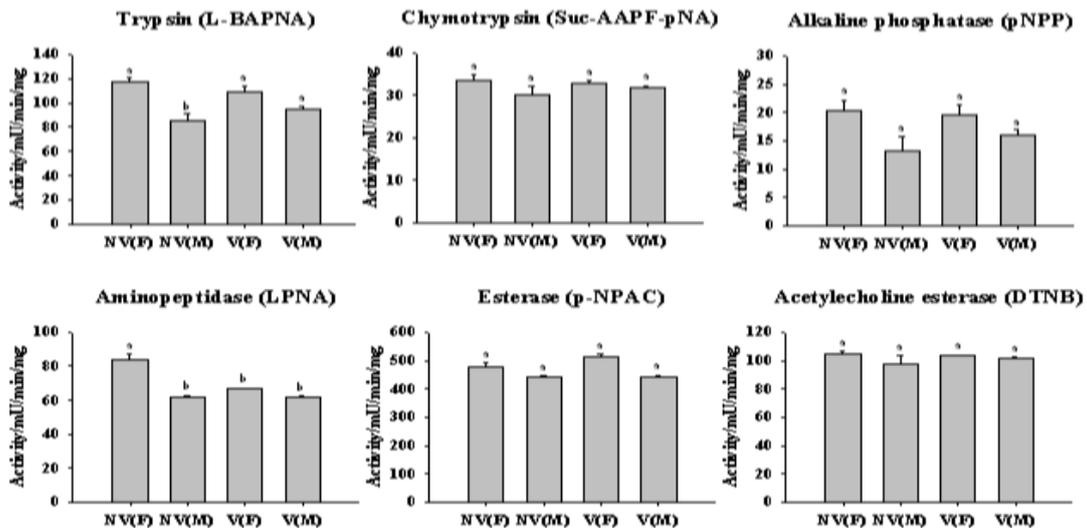


그림 3-6. The comparison of activity profiles of digestive enzymes in day 1 (D1) adult NV females (F) & males (M) and V females (F) & males (M) whiteflies. Each bar represents mean ± SE, (The bars in the same time set with different letters are significantly different and $p < 0.05$).

표 3-3. Measuring the body weight and amount of protein in *B. tabaci* per individual

Sample	No. (n)	Weight/ individual (μg)	Total vol. (μl)	Concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Total protein (μg)	Protein/ individual (μg)
NV-D1 (♀)	300	66.67	400	4.99	1996	6.65
NV-D1 (♂)	300	53.33	400	2.56	1024	3.41
V-D1 (♀)	300	60.00	400	3.77	1508	5.03
V-D1 (♂)	300	53.33	400	2.94	1176	3.92
NV-Rd (♀)	300	68.79	400	4.74	1896	6.32
NV-Rd (♂)	300	55.33	400	2.61	1044	3.48
V-Rd (♀)	300	62.39	400	4.78	1912	6.37
V-Rd (♂)	300	54.66	400	2.67	1068	3.56

4. TYLCV 보독에 대한 담배가루이의 살충제 감수성 비교 분석

가. 목적

- (1) TYLCV 보독에 대한 담배가루이의 생리적 변화 규명
- (2) TYLCV를 보독함으로서 매개충인 담배가루이의 다양한 생리적 변화가 유도되는 것을 1-2차년도에 밝힌 바가 있으며 금년도에는 바이러스를 보독함에 따라서 살충제에 대한 감수성이 어떻게 변하는지 그 영향을 조사함

나. 재료 및 방법

- (1) TYLCV보독 및 비보독충에 대하여 imidacloprid계 살충제인 코니도를 농도별로 섭식하게 하여 살충율을 비교분석함
- (2) 코니도를 농도별(1000배, 10,000배, 100,000배 희석)한 20% 설탕물을 함유한 parafilm feeding chamber를 이용하여 담배가루이(TYLCV-보독 및 비보독충)을 24시간동안 섭식하게 한 뒤에 살충율을 비교 분석함

표 7-1. Imidacloprid 희석 농도에 따른 담배가루이 살충율

처리 조건	살충률(%)	
	NV	V
대조군 (25 %설탕물)	1.67±0.6	1.67±0.6
1,000배 희석액	23.4±2.1	46.7±0.5
10,000배 희석액	15.0±2.6	43.4±1.5
100,000배 희석액	8.3±1.5	13.4±3.1

다. 결과 및 고찰

- (1) 담배가루이는 TYLCV에 보독이 됨에 따라서 코니도 섭식에 대한 살충율이 약 2배 증가하였음
- (2) 즉, 바이러스를 보독함에 따라서 살충제에 대한 저항성이 약해진 것으로 판단됨
- (3) 즉, 식물바이러스는 매개충의 생리적 변화를 초래하며 그 중에서 면역작용에 대한 기능이 감소됨으로서 매개충 자체에도 부정적으로 작용하는 면이 있다고 판단되며 이에 대한 분자수준의 작용기작을 이해할 필요가 있음

5. TYLCV 보독에 대한 담배가루이의 온도감수성 비교 분석

가. 목적

- (1) TYLCV 보독에 대한 담배가루이의 생리적 변화를 규명하였다.
- (2) 온도 변화에 따른 열충격유전자(hsp40, hsp70, hsp90)의 발현패턴 변화를 분석했다.
- (3) 담배가루이가 아열대성 해충이지만 본 연구과제의 2-3차 연구결과에 의하면 제주도 및 남해안지역에서 월동이 가능한 것으로 보고한 바 있다. 그러나 이러한 담배가루이가 바이러스를 보독한 경우에 월동개체군의 온도감수성에 어떤 영향을 끼치는지 알려진 바가 없다. 본 연구에서는 바이러스 보독여부에 대한 매개충의 온도감수성, 저온 및 고온에 대한 영향을 비교분석했다.

나. 재료 및 방법

- (1) 공시충: 경북대학교 사육실 누대 사육중인 담배가루이 이용하였다.
- (2) 토마토는 TYLCV 감염 기주와 비감염 기주로 나누어 재배하였다.
- (3) 담배가루이의 TYLCV의 보독과 비보독을 확인하기 위해 정기적으로 확인하였다.
- (4) 24시간 동안 3 시간 단위로 사충 수 관찰하였다.
- (5) 저온 4℃, 고온 40℃ 사육기를 이용했고 1h 와 3h 처리했다.
- (6) 무병주 목화 앞에서 산란후 48h이내의 알을 채취하여 온도처리했다.
- (7) 보독 및 비보독 개체들에 4, 25, 35℃에서 1h, 3h 처리 뒤에 실온에서 사육했다.
- (8) 가루이의 살충율과 hsp 발현패턴을 보독충과 비보독충간에 비교하였다.
- (9) Quantitative real-time RT-PCR법으로 발현 패턴을 분석하였다.

표 5-3. Primer sequences for the realtime PCR of *B. tabaci*.

Gene	Primer sequence (50-30)	References
hsp40	F-AGATGAGGCTCATGATGGTCAA	Mahadav et al. (2009)
	R-TGAGAAGCGCATTGCATTGT	
hsp70	F-ATTGAAAAGTCCACTGGTAAAGAA	Mahadav et al. (2009)
	R-GCTTGTACTTTTCAGCATCAGAC	
hsp90	F-TGGAAATCAACCCCTGACCACCCTG	Mahadav et al. (2009)
	R-TCACTGACTTGTCGTTCTTC	
Actin	F-TCTTCCAGCCATCCTTCTTG	Ghanim and Kontsedalov (2009)
	R-CGGTGATTTCTTCTGCATT	

다. 결과 및 고찰

- (1) 보독충의 살충율은 25°C에서 차이가 없었지만 4, 35°C처리에 대하여 비보독충보다 높게 나타났다(그림 5-1).
- (2) 보독충의 Hsp 유전자는 25에서 비보독충과 차이가 없었으나 저온 및 고온처리에 대하여 훨씬 더 높게 나타냈다(그림 5-2).
- (3) 즉, 보독충은 분자수준에서 열충격에 대한 스트레스에 훨씬 더 민감했으며 YLCV 매개작용에 있어서 중요한 역할을 할 것으로 판단된다(Pusag et al., 2012).

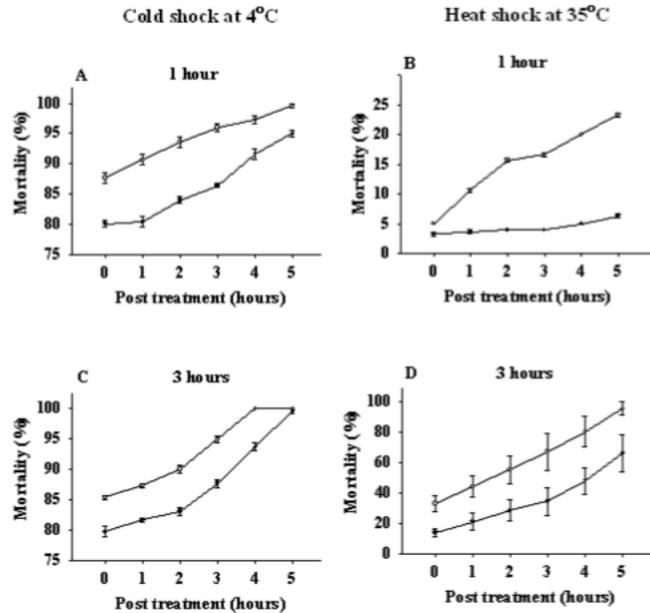


그림 5-1. 고온 및 저온처리에 대한 TYLCV 보독충 및 비보독충의 살충율 비교 분석

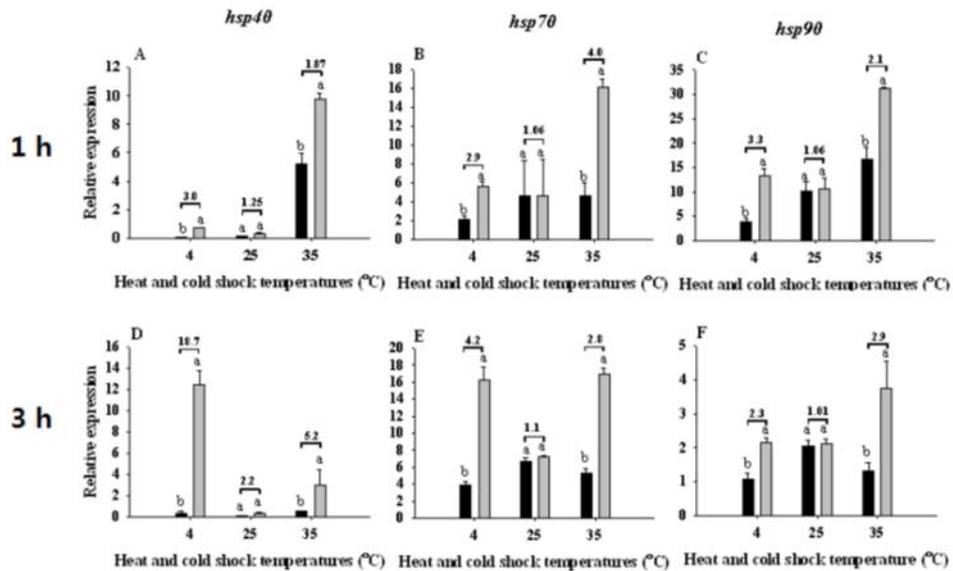


그림 5-2. 고온 및 저온처리에 대한 TYLCV 보독충 및 비보독충의 hsp 유전자 비교 분석

(4) TYLCV 바이러스를 보독된 담배가루이가 비보독 담배가루이보다 온도 처리에 대한 살충율이 높은 것으로 조사 되었으며, 보독된 담배가루이를 40℃에서 3시간 처리를 한 처리구에서 가장 높은 살충률 보였고, 저온처리보다 고온 처리 시 살충률이 더 높았다(표 5-3).

표 5-3. 온도처리에 따른 담배가루이 성충의 살충률

처리 조건	살충률(%)	
	NV	V
대조군 (25 °C)	7.73	3.33
4 °C, 1 h	8.75	12.5
4 °C, 3 h	5.53	8.33
40 °C, 1 h	18.73	20
40 °C, 3 h	25	54.17

(5) 4 °C에서 120시간 처리를 한 개체군이 가장 낮은 부화율을 보였고 4 °C에 24시간 처리를 한 개체군은 대조군과 거의 유사한 수치를 나타낸 것으로 보아 부화율을 낮추기 위해서는 일정 시간 이상의 저온이 연속되어야 할 것으로 판단됨

표 5-4. 담배가루이 알 저온처리 조건에 따른 부화율

처리 조건	부화율(%)
대조군 (25 °C)	85.71
4 °C, 24 h	83.33
4 °C, 72 h	66.66
4 °C, 120 h	17.65

6. 가루이류의 온도 감수성 유전자군 선발 및 발현 패턴 분석

- (1) 기후변화로 인해 생태계의 종 및 개체군 변동이 증가하고 있을 뿐만 아니라(Raymond, 1998) 고유종의 멸종, 외래종의 유입, 종간의 상호작용 등과 같은 생태계 요인의 변동이 심하게 나타났다. 또한, 국지적 기상이변으로 인하여 작물의 생육이 저해되면서 반대급부로 병해충의 발생이 증가하였다.
- (2) 기후변화에 따른 생물의 변화를 예측하고 적응양상을 분석하기 위해서는 적절한 지표종을 선택하는 것이 매우 중요하다. 지표종들의 선정은 기후 변화에 의한 영향에 민감하면서도 가능한 빠른 기간 내에 결과를 예측할 수 있는 것이 필요사항이다. 이러한 요인을 만족할 수 있는 주요 분류군 중 하나가 곤충이라 할 수 있다.
- (3) 침입해충의 월동 및 돌발해충화: 온실가루이(*Trialeurodes vaporariorum*)는 우리나라에서 1977년 수원에서 처음 발견되었는데 남미에서 도입된 스테비아묘와 함께 들어 온 것으로 추정되었으며 그 후 박멸되었다고 보고되었으나 1983년 10월 수원 토마토에서 재발견되었으며 담배가루이 (*Bemisia tabaci*)는 1998년 충북 진천의 장미농가에서 최초 발견되었으며 온실가루이와 마찬가지로 시설재배지 원예작물재배에 큰 피해를 끼쳤다.

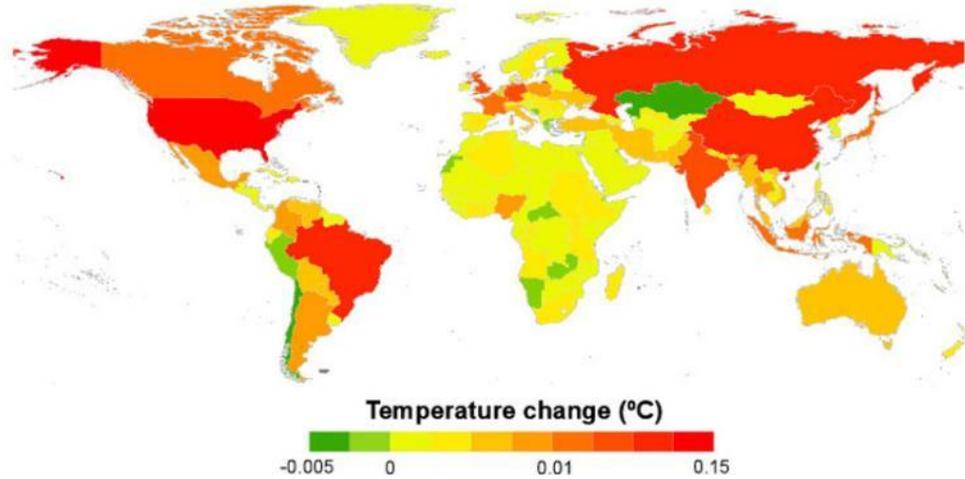


그림 6-1. 세계적인 온도 변화 (2014년 발표자료, Concordia University, Canada)

나. 재료 및 방법

(1) 스트레스 유전자 염기서열 및 발현 패턴 비교분석 하였다.

(가) EST database를 이용하여 온실가루이와 담배가루이의 3종류의 온도 감수성 유전자 [small heat shock protein (shsp), heat shock protein 70 (hsp70), heat shock protein 90 (hsp90)] 를 선발 및 염기 서열 분석

(나) 스트레스 유전자 cloning 및 염기서열 분석

(다) Real Time PCR법 활용을 위한 각 유전자 특이적 primer 제작함

표 6-1. Real time PCR 분석에 사용된 primer 정보

Gene	Species	Primer sequence (5' → 3')	Fragment length (bp)
<i>β-actin</i>	<i>B. tabaci</i>	GACGGACAGGTCATCATAATCG	78
		CATACCCAAGAAGGATGGCTG	
	<i>T. vaporariorum</i>	TGCCCGATGGACAAGTTATCA	62
		GAAGAGGGCTTCGGGACAAC	
<i>hsp23</i>	<i>B. tabaci</i>	GTTGAACTCACGTCCCCGTTA	57
		CCTGCAGCCAAGGGAAGA	
	<i>T. vaporariorum</i>	GTTGAACTCACGTCCCCGTTA	57
		CCTGCAGCCAAGGGAAGA	
<i>hsp70</i>	<i>B. tabaci</i>	TTCCCGAGTCGGACAAACAG	90
		CCTCCTGGAGCTTGTAAGTCGAA	
	<i>T. vaporariorum</i>	TCACAGACACTGAGCGGTTGA	60
		GTGGATTCA TGCGACTTGA	
<i>hsp90</i>	<i>B. tabaci</i>	CACTGGTGAAAGCAAAGATC	95
		CGATGGGTTTCGGTCATGTAGA	
	<i>T. vaporariorum</i>	ACATCACTGGTGAAAGCAAGGA	60
		TACGAACGCGCTCAACAAAG	

(2) 스트레스 유전자를 이용한 발달지표 온도 설정 및 비교분석

(가) 열충격 처리에 따른 사망율 측정

(나) 각 온도별 열충격 처리에 따른 3단계 온도감수성 지표 결정

① 스트레스유전자 발현유도온도(T_{on}) 결정

② 스트레스유전자 최대발현온도(T_{max}) 결정

③ 스트레스유전자 발현억제온도(T_{off}) 결정

(다) 온도감수성 스트레스 유전자를 이용하여 3단계 온도감수성 지표를 결정하고 그 database를 토대로 환경온도 설정에 대한 자료로 이용 가능함

다. 결과 및 고찰

(1) 고온에 대한 감응은 3가지 유전자 중 hsp70이 가장 빠른 것으로 나타남

(2) 스트레스유전자 발현유도온도(T_{on})는 hsp70의 경우 온실가루이가 담배가루이 보다 더 낮은 것으로 조사되었으며, 이것은 가루이류의 기본 생육 적온과 연관된 것으로 판단됨

(3) small heat shock protein의 경우 온실가루이에서는 42도 이상에서 발현양이 급증하는 패턴이며 담배가루이에서는 38도 이상의 고온부터 서서히 발현이 증가하는 것으로 조사됨

(4) hsp90 유전자의 경우 발현양만으로 분석했을 때 온도 조건에 큰 영향을 받지 않는 것으로 판단됨

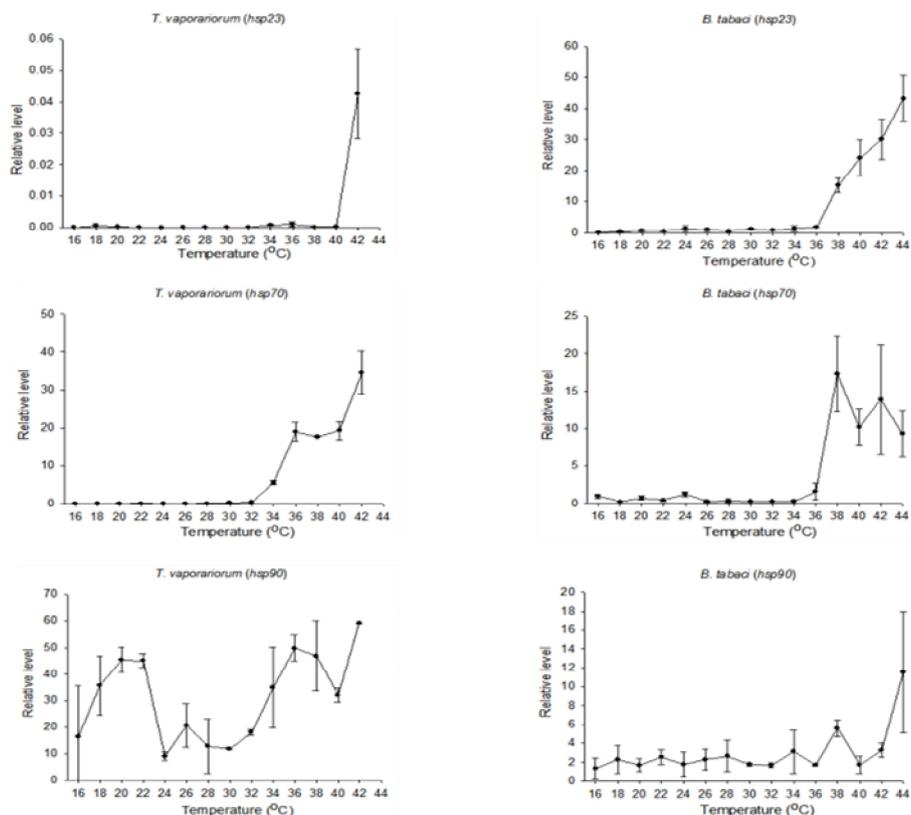


그림 6-2. 온도에 따른 온실가루이와 담배가루이의 온도감수성 유전자 발현 패턴

7. RNAi 기법을 이용한 담배가루이의 바이러스 매개기능 제어기술 개발

가. 개요

- (1) 매개충의 식물 바이러스 매개작용을 조절하는 인자를 발견하고 그 작용기작을 밝혔다.
- (2) RNAi 기법으로 열충격유전자 70(*hsp70*)의 발현을 억제시킴으로서 TYLCV 매개기능이 감소되는지 분석하였다.
- (3) RNAi 기법으로 스트레스 유전자 (*hsp70*)의 기능 knockdown을 시행하였다.
- (4) *hsp70* dsRNA 섭식 방법으로 RNAi 효능 시험을 하였다.
- (5) *hsp70* dsRNA 섭식에 의한 살충 및 온도감수성 분석하였다.
- (6) *hsp70* dsRNA 섭식에 의한 TYLCV 매개 효과 및 유연관계 분석하였다.

나. 재료 및 방법

- (1) 담배가루이 성충으로부터 total RNA를 추출하여 cDNA library를 합성하였다.
- (2) T7 promoter가 붙어있는 gene specific primer를 이용하여 고농도의 dsRNA를 합성하였다.
 - (3) 담배가루이 한 마리가 Two-layered membrane sandwich chamber를 이용하여 흡즙하는 양을 측정하였다.
 - (4) 담배가루이 성충에 대한 dsRNA 용액을 직접 흡즙하도록 하는 방법을 이용하였다.

즉, Two-layered membrane sandwich chamber를 이용하여 dsRNA를 함유한 20% 설탕물을 두 겹의 parafilm membrane 사이에 넣은 뒤에 tube 안에 건전 또는 TYLCV-보독 담배가루이 성충을 투입함으로써 가루이가 설탕물을 일정동안 섭식시켰다.
- (5) RNAi 처리 뒤에 가루이의 RNA를 추출한 뒤에 realtime PCR법으로 *hsp70*의 양적 변화를 비교분석하였다.



그림 4-1. Parafilm chamber를 이용한 담배가루이 인공먹이 섭식

표 7-1. 담배가루이 dsRNA 합성과 realtime PCR 분석에 사용된 프라이머

	Target gene	Primer	Sequence (5'→3')	Length (bases)	Product (bp)
RT-PCR	hsp70	forward	GATATGAAGCACTGGCCCTTC	21	1112
		reverse	AGATTGTTATCCTTCGTCATTGC	23	
RNAi	hsp70	forward	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACGCGC</u> CAAGATAGCTGCCA*		279
		reverse	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACTCTT</u> GCTCATGATGGGCGA*		
Realtime	hsp70	forward	CAATTCTTAGCGGCGACACCA	21	62
		reverse	AGGCGCCACGTCCAGGA	17	
Realtime	actin	forward	GACGGACAGGTCATCATAATCG	22	78
		reverse	CATACCCAAGAAGGATGGCTG	21	
Realtime	TYLCV	forward	GTCTACACGCTTACGCC	17	144
		reverse	GCAATCTTCGTCACCC	16	
Realtime	β-actin	forward	TCTTCCAGCCATCCTTCTTG	20	130
		reverse	CGGTGATTCCTTCTGCATT	20	

*T7 promoter seq underlined

표 7-2. Two-layered membrane sandwich chamber를 이용한 흡즙양 측정

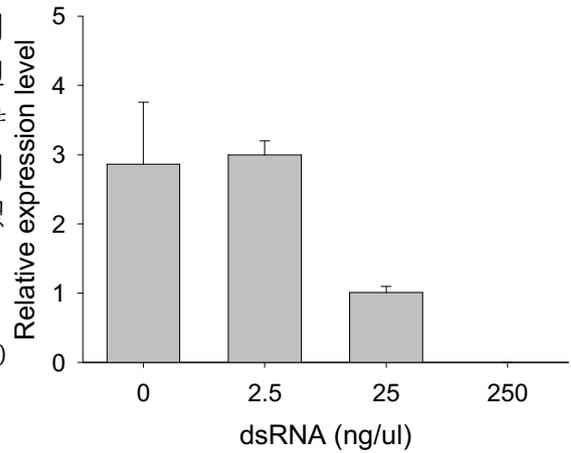
dsRNA (ng/μL)	Whitflies (n)	Total sugar solution (μL)	Ingested sugar solution (nL/day/individual)	Estimated amount of ingested dsRNAs (ng/day/individual)
250	20	10	67.6 ± 14.3	16.9 ± 3.6

다. 결과 및 고찰

- (1) RNA interference (RNAi, RNA 간섭)는 double-stranded RNA (dsRNA)에 의해 서열 특이적으로 mRNA가 분해되어, 그 결과 유전자 발현이 억제 (즉, gene silencing)되는 현상임. RNAi를 이용한 knock-down 법은 간편하면서 유전자 발현 억제에 큰 효과를 기대할 수 있어 최근 많이 요구 되고 있다.
- (2) 해충 제어를 위한 RNA 간섭 (RNAi)에 대한 연구가 최근에 많이 진행되고 있으며 곤충에서는 경구 전달 기술이 효율적인 방법 중 하나임. 본 실험에서도 Two-layered membrane sandwich chamber를 이용하여 담배가루이에 경구 섭식시켰고 특정 유전자의 발현 양이 농도와 시간에 유의하게 억제됨을 알 수 있었다.
- (3) Two-layered membrane sandwich chamber를 이용하여 담배가루이로 하여금 hsp70 gene의 RNAi 처리 시 섭식을 통해 유전자 발현이 완전히 억제되는 것을 관찰함. 즉, dsRNA의 농도가 높아짐에 따라 그 효과가 증가하였으며 250 ng/uL 농도에서 24시간 처리 하였을 때 hsp70 유전자의 발현율이 완전히 억제되었다.

(4) Parafilm feeding chamber를 이용한 담배가루이로 하여금 *hsp70* gene의 RNAi 처리시에 섭식하게 함으로서 유전자 발현이 완전히 억제되는 것을 관찰함. 즉, dsRNA의 량에 따라서 그 효과가 증가했으며 50ng의 dsRNA를 담은 설탕액을 3시간동안 섭식했을 때에 *hsp70* 발현율이 억제되었다.

그림 7-2. dsRNA의 농도에 따른 *hsp70* gene의 발현양 비교



(5) 담배가루이를 TYLCV 감염된 토마토를 섭식했을 시에 *hsp70*의 양이 증가했으나 RNAi처리를 한 담배가루이를 감염토마토에 다시 섭식했을 경우에는 *hsp70*의 양이 감소하는 패턴을 나타냄. 즉, TYLCV보독에 대하여 *hsp70* 유전자의 발현이 연관관계가 있다고 판단하여 보독 검사를 실시해보았으나 바이러스 보독양 감소에는 영향을 미치지 못했다.

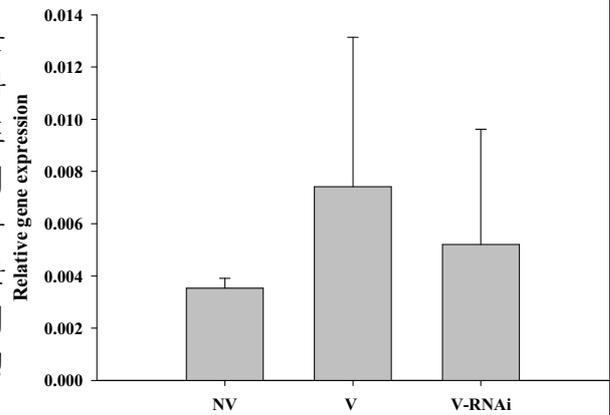


그림 7-3. RNAi 처리에 대한 TYLCV 보독 및 비보독층의 *hsp70* 양적 차이 비교

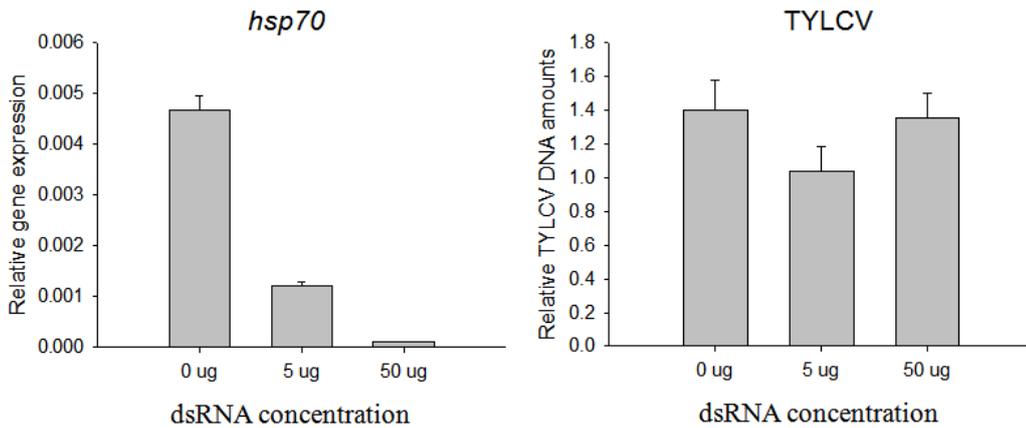


그림 7-4. dsRNA 섭식에 따른 *hsp70* 발현 및 TYLCV 보독양 변화

(6) 담배가루이 day-0 성충 선별 후 24시간 dsRNA 섭식 후 20% 설탕물로 옮긴 담배가루이와 지속적으로 섭식시킨 담배가루이 개체간의 사망률 비교했을 때 지속적으로 섭식시킨 처리구의 개체 사망률이 높았다.

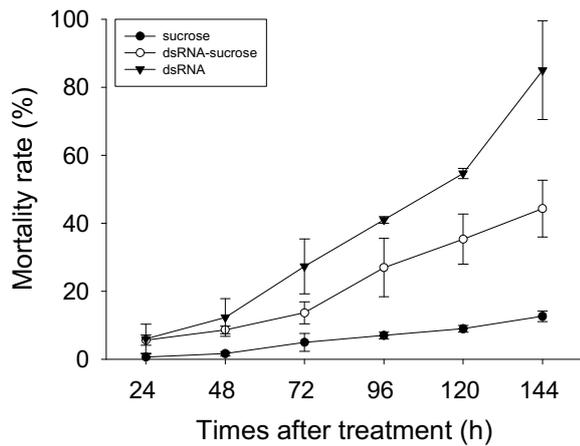


그림 7-5. *hsp70* 유전자 dsRNA 섭식에 따른 사망률

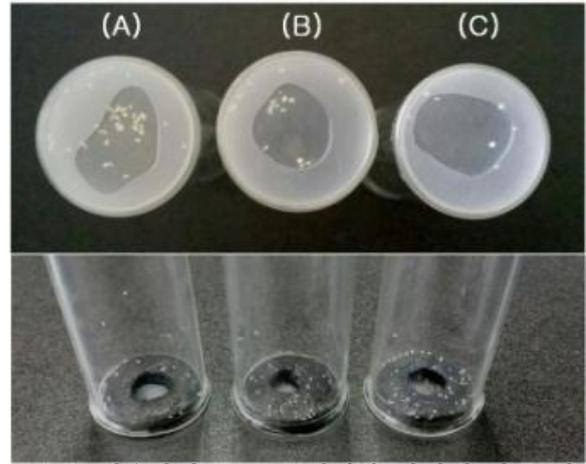


그림 7-6. Two-layered membrane sandwich chamber를 이용하여 dsRNA 섭식량 차이에 따른 사망률을 살펴보았다. 설탕물 20 % (A), dsRNA 24시간 섭식 후 설탕물로 교체 (B), 지속적으로 dsRNA 섭식 (C)하게 하였다.

(7) *hsp70* 유전자의 dsRNA 섭식 후 한 시간의 열충격으로 저온(4 °C)과 고온(40 °C) 처리를 하였다. 저온 처리와는 다르게 고온 처리 시 *hsp70* dsRNA를 섭식한 가루이에서 높은 사망률을 보였는데 이것은 *hsp70* 유전자 발현이 억제되면서 분자 샤페론으로 작용하며 세포의 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 하지 못하여 고온 충격 시 생리적 상태가 변함에 따라 높은 사망률로 이어진 것으로 판단된다(Shim et al., 2015)

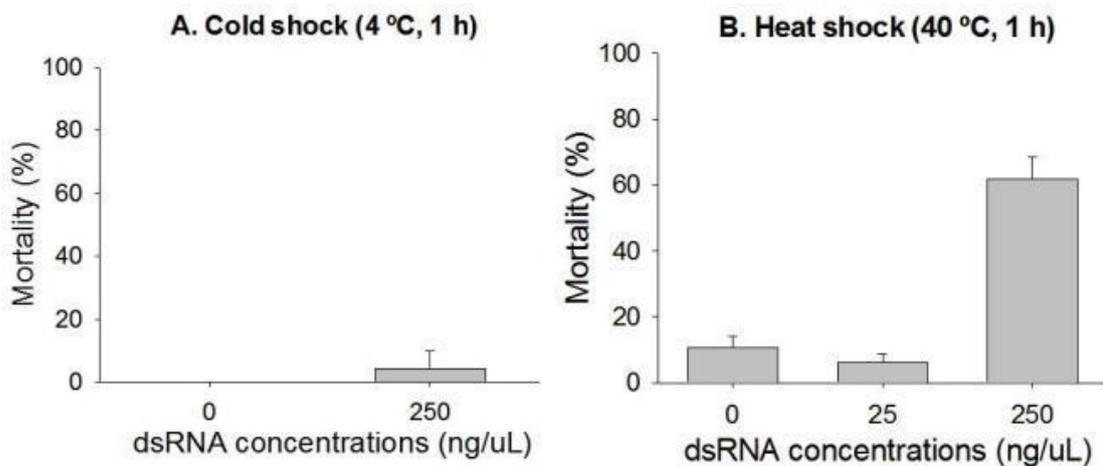


그림 7-7. dsRNA 섭식 후 온도 충격에 따른 사망률

4절. 방제

1. 곤충병원성 선충의 공생균 배양액으로부터 가루이 경구독성을 검정하고 이를 이용하여 가루이 방제용 살충제 개발함
2. 다양한 파장에 대한 가루이의 유인력을 측정하고 녹색LED 유인등을 개발함
3. 담배가루이의 유인살충식물인 야생담배를 발굴하고 이를 이용한 천연살충제를 개발함
4. Neem 액체에 대한 가루이 경구독성을 결정하고 토마토재배지의 관주처리를 통한 가루이 방제효과 현장검정함

1. 곤충병원성 선충의 공생균 배양액을 이용한 가루이 살충성 검정 및 살충독소 분석

가. 목적

- (1) 곤충병원성 선충의 공생균은 다양한 살충물질을 생산 분비하는 것으로 알려져 있으며 최근 이러한 공생균을 인공배양할 수 있기 때문에 이러한 공생균 배양액을 이용하여 가루이 방제에 적용하고자 함

나. 재료 및 방법

- Parafilm feeding chamber assay

Feeding chamber 제작: 플라스틱 튜브의 앞부분을 절단하여 윗면 직경 2.5cm, 아랫면 3cm, 높이 2cm의 원통을 만들고, Parafilm를 최대한 얇게 늘려 직경이 2.5cm인 면에 붙여 주었다. Parafilm이 붙어 있는 면이 아래쪽으로 하여, 직경 3cm, 높이 12cm 유리관 윗부분에 놓고 parafilm으로 연결부위를 고정하였다. 각 공생균 배양액을 원심분리한 상층액(공생균이 분비한 Toxin을 함유하고 있다) 15ml에 sucrose 15%, yeast extract 5%를 넣어서 인공먹이를 만들고, Control은 5YS medium 15ml에 sucrose 15%, yeast extract 5%를 넣었다. 유리관과 연결된 플라스틱 튜브에 3ml씩 넣고, 윗부분을 parafilm으로 덮어 이 물질이 들어가지 못하도록 하였고, 유리관 안에 담배가루이 성충을 넣고 아랫부분에는 땅으로 싸서 공기가 통할 수 있도록 하였다. 24시간 후 각 공생균 strain에서 살충율을 조사하였다.

- 곤충병원성 선충의 공생균 배양액 독소 분리 및 살충력 검정

- (1) 곤충병원성 선충 *Heterorhabditis* spp.에서 분리한 *P. temperata*를 대량 배양함
- (2) 배양액(9L)를 우선 ethyl acetate로 분리 한 뒤에 추가로 3단계에 걸쳐서 2개의 순수물질을 분리함
- (3) 분리한 물질의 화학구조는 핵자기공명법으로 분석함
- (4) Parafilm feeding chamber를 이용하여 순수분리한 물질의 살충 독성을 시험함

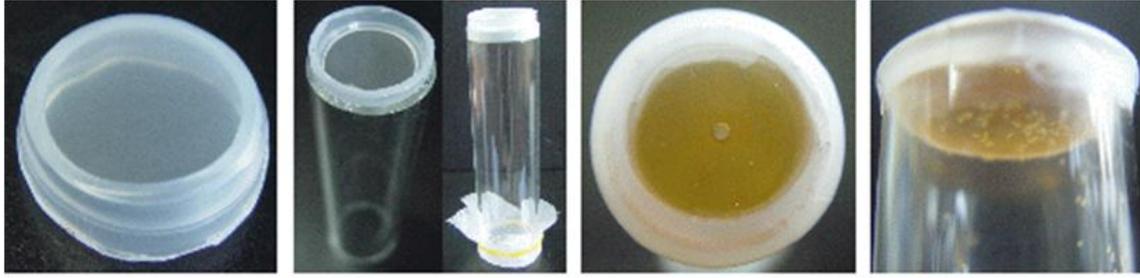


그림 1-1. 담배가루이 실험과정. 플라스틱에 parafilm를 씌운다(a). Parafilm을 씌운 플라스틱을 유리관 위에 놓고 parafilm으로 고정한 후 담배가루이 성충을 넣고, 아랫부분은 망으로 씌워 공기가 통하도록 하였다(b). 인공먹이와 공생균 배양액의 상층액만을 혼합하여 3ml씩 넣고 parafilm으로 덮어 이물질이 들어가지 않도록 하였다(c). 담배가루이 성충은 parafilm을 통해 흡즙한다(d).

나. 결과

(1) *Photorhabdus temperata*의 살충효과

% Pt	% Mortality (hours)						
	0	12	24	36	48	60	72
0%	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	1.67±1.67	1.67±1.67	6.67±3.33	6.67±3.33
1%	0.00±0.00	0.00±0.00	8.33±3.33	18.33±1.67	36.67±3.33	48.33±3.33	53.33±3.33
10%	0.00±0.00	0.00±0.00	23.33±1.67	48.33±1.67	88.33±1.67	93.33±1.67	100.0±0.00

(2) *Photorhabdus luminescens*의 살충효과

%Pl	% Mortality (hours)						
	0	12	24	36	48	60	72
0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	1.33±1.33	1.33±1.33	1.33±1.33
1	0.0±0.0	1.33±1.33	6.67±3.53	8.0±4.62	9.33±5.81	9.33±5.81	10.67±7.06
10	0.0±0.0	5.33±1.33	12.0±4.61	24.0±6.11	30.67±4.81	37.33±5.33	45.33±5.33

(3) *Xenorhabdus nematophilus*의 살충효과

%Xn	% Mortality (hours)							
	0	12	24	36	42	54	66	72
0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	1.67±1.67	4.0±2.31	5.33±3.53	8.0±4.0
1	0.0±0.0	1.33±1.33	1.33±1.33	2.67±1.33	9.33±2.67	18.67±2.67	25.33±2.67	29.33±2.67
10	0.0±0.0	2.67±2.67	9.33±7.42	28.0±6.92	49.33±2.67	53.52±5.14	57.38±4.51	63.12±7.16

(4) 살충독소 분리 및 살충효과

- *P. temperata* 공생균 배양액에서 2개의 물질을 순수분리했으며 그 구조는 anthraquinone 으로 밝혀짐
- 두 종류의 anthraquinone은 담배가루이 성충에 섭식독성을 나타냈으며 농도에 따라 증가함
- 이 물질들은 환경친화적 가루이 방제용으로 활용가능하다고 판단됨

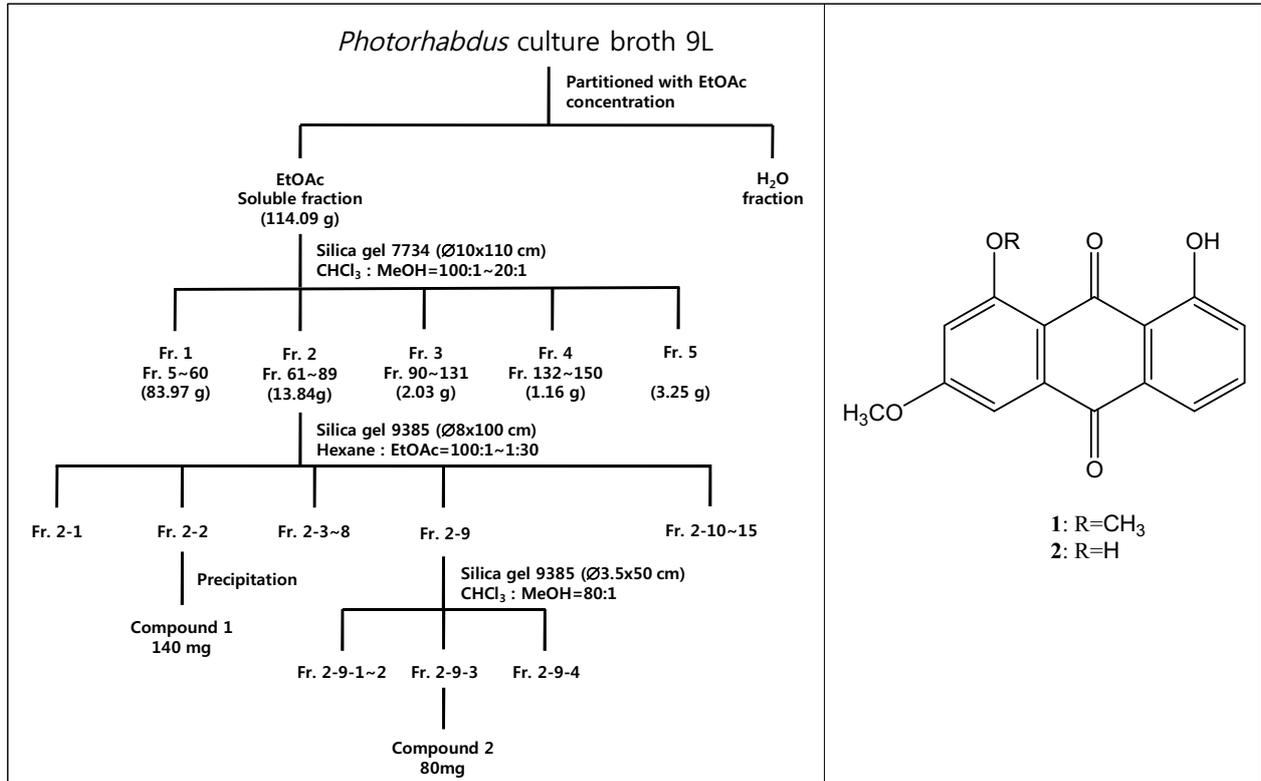


그림 1-2. 곤충병원성 선충의 공생균 배양액으로부터 살충성 물질의 분리 방법 및 순수분리된 compounds, 1 (1,3-dimethoxy-8-hydroxy-9,10-anthraquinone)과 2 (3-methoxychrysazine)

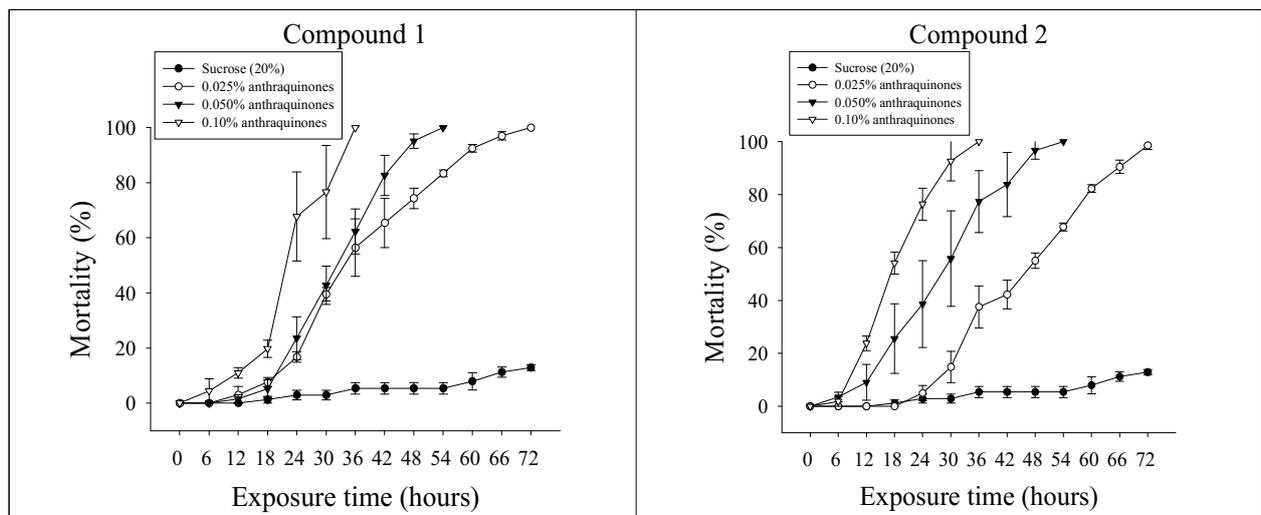


그림 1-3 담배가루이 성충에 대한 순수분리된 물질의 살충율 비교

다. 고찰

- 담배가루이 성충에 대한 *Photorhabdus* 2종과 *Xenorhabdus* 1종의 배양액을 이용하여 섭식독성을 조사해 본 결과 *P. temperata*가 *P. luminescens* 와 *X. nematophilus* 보다 효과적이었다.
- 살충율은 처리후 72시간까지 증가했으며 각 10% 공생균 배양액에서 *P. temperata*, *X. nematophilus*, *P. luminescens* 순서로 100%, 63.12%, 45.33%로 나타났다.
- *P. temperata*의 배양액에서 두 종류의 anthraquinone을 분리했으며 이 물질들이 가루이 성충에 대한 높은 경구독성을 나타냈다. 그래서, 이 물질의 대량생산에 관한 추후 연구가 필요하다고 판단한다.

2. 녹색 LED의 가루이 유인효과 분석 및 가루이 유인등 개발

가. 재료 및 방법

- (1) 시설원예작물 재배지의 주요 해충인 담배가루이 방제를 위하여 다양한 파장대의 LED 소자를 이용한 LED 유인등을 제작하고 담배가루이의 특정 광 유인율을 조사하였다(그림 IV-2-1). 또한, 최근 토마토 재배지에 큰 피해를 끼친 TYLCV의 보독 여부에 따른 담배가루이의 광유인성의 차이를 비교 분석하였다.
- (2) 3종류의 다른 파장을 가지는 LED등(녹색 526nm, 청색 455nm, 자외선 371nm)과 백열등(30W)의 총 4종류의 유인등을 이용하여 담배가루이의 광유인율을 측정하였다. 담배가루이가 서식하고 있는 토마토회분을 중앙에 설치하고 양 사방에 50cm 거리를 유지하며 각 유인등을 도 2와 같이 설치하였다. 각 유인등 아래에는 흰색 끈끈이판(10cm×10cm)을 설치하여 유인된 담배가루이가 부착되도록 했다. 설치 후 매시간 끈끈이트랩에 부착된 개체수를 12시간까지 측정하였다.

나. 결과 및 고찰

- (1) TYLCV 보독충과 비보독충 담배가루이를 대상으로 녹색광 LED등과 백열등에 관해서 12시간동안 시간대별로 광 유인력을 비교해 본 결과, TYLCV를 보독한 담배가루이가 훨씬 높은 광 유인율을 나타내었다(그림 2-2). 녹색 LED등의 광유인율은 B-biotype과 Q-biotype이 유사하게 나타났는데 보독충의 광유인율이 0.5-4시간 사이에 급격히 증가하여 그 이후에는 비보독충보다 3-4배 더 높게 나타났다. 백열등에 대한 광유인율도 보독충이 다소 높게 나타났지만 비보독충에 대한 비율은 2-4%의 차이를 나타냈다.
- (2) 녹색광 유인력은 보독충의 경우 1-3시간 사이에 급격하게 증가했다. 또한, 백열등 시험에서도 이 시간대에 광유인력이 증가했다. 그러나, 5시간 이후에는 광유인력의 증가율이 나타나지 않았다(그림 2-3).
- (3) 가시광선 파장대에서 비교실험을 해 본 결과 Q-biotype 비보독충의 경우 녹색파장에서 유인력이 가장 높았고(4.37%) 그 다음 오렌지 파장에서 15.0%가 유인이 되었다(표 D-3-1). 그러나, Q-biotype의 TYLCV 보독충은 녹색파장에서 78.3%, 오렌지 파장에서 15.3%로 나타났다. 즉, 보독충은 녹색파장에서 광 유인력이 증가했지만 오렌지파장에서는 증가하지 않았다. 이러한 현상은 B-biotype에서도 유사하게 나타났다. 그러나, 대조구로서 꽃노알총채벌레는 녹색파장에서 가장 많이 유인이 되었으나 그 량이 33.3%

이고 그 다음으로 오렌지 파장에서는 2.3%로서 담배가루이보다 훨씬 낮게 나타났다.

- (4) 광원으로부터 거리에 대한 녹색광 유인력을 측정해 본 결과 보독충이 비보독충에 비하여 0.5m에서 훨씬 더 높게 나타났지만 1m이상의 거리에서는 유인력도 낮아지고 보독충과 비보독충사이의 차이도 나타나지 않았다. 즉, 바이러스 보독충의 녹색광 유인력은 거리가 짧을수록 나타나는 현상으로 간주된다.
- (5) 즉, 광유인력은 TYLCV-보독충이 비보독충보다 약 3배 더 높았다. 특히 가장 선호하는 녹색파장에 대한 보독충의 유인율이 증가했으나 오렌지색 및 노란색 파장에서는 바이러스 보독에 대한 광 유인율의 차이는 없었다. 또한, 녹색광 유인율이 B-biotype에서 20% 증가했으나 Q-biotype에서는 약 30%가 증가했다. 즉, TYLCV를 보독한 담배가루이는 녹색광의 주광성이 더 증가하며 이러한 현상은 최근에 만연한 Q-biotype에서 더 높게 나타났다. 녹색광에 대한 주광성의 증가는 보독충이 녹색을 띄는 식물의 앞에 더 잘 유인이 되며 그 결과 보독충이 바이러스를 더 잘 전파할 수 있는 조건이 될 수 있다. 따라서 본 발명에 따른 녹색광 LED를 이용하여 TYLCV 보독 담배가루이 개체를 효과적으로 방제할 수 있다(Jahan et al., 2014b).

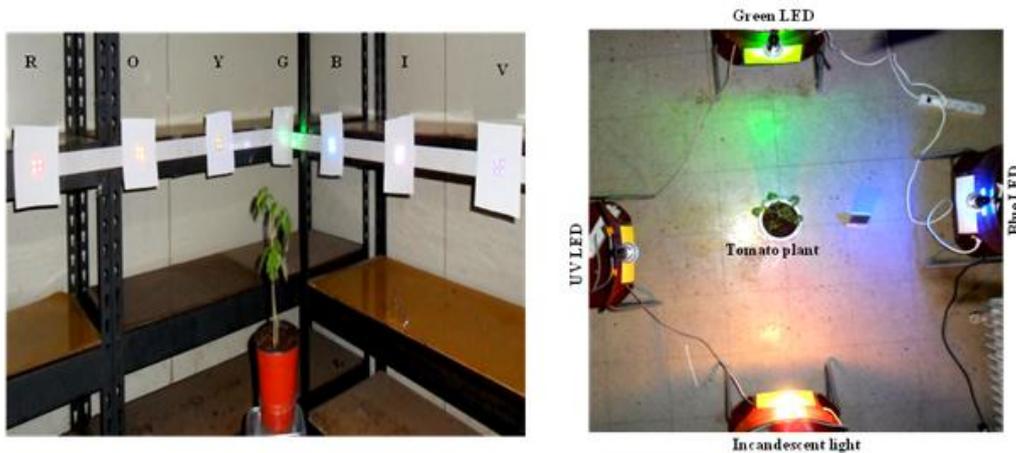


그림 2-1. Different light-emitting diodes (LEDs) attached with chair about 50 cm heights from the ground and maintain same distance of the plants with whiteflies and lights one to another.

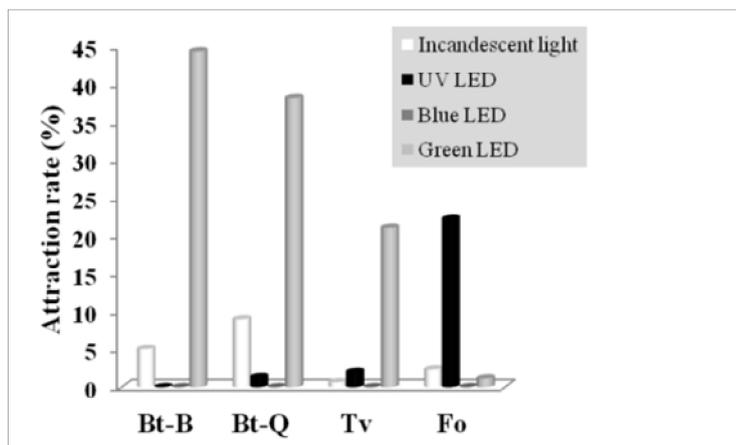


그림 2-2. Response of different insects towards different color of lights. Bt-B: *Bemisia tabaci*

B-biotype; Bt-Q: *Bemisia tabaci* Q-biotype; Tv: *Trialeurodes vaporariorum*, Fo: *Frankliniella occidentalis*.

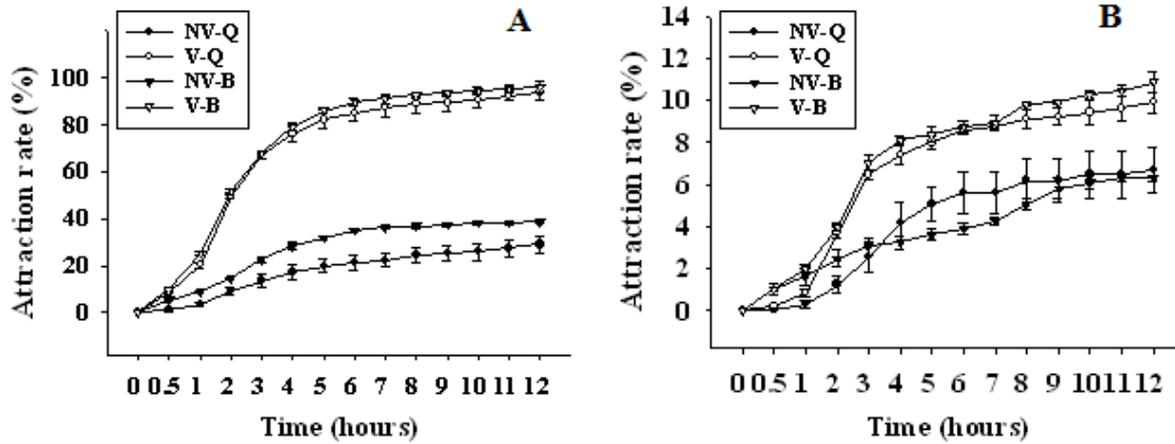


그림 2-3. Comparison of light attraction between non-viruliferous and viruliferous *B. tabaci* adults into either green LED or incandescent lights. (A) Green light attraction of *B. tabaci* B and Q biotype. (B) Incandescent light attraction of *B. tabaci* B and Q biotype. Error bar indicate statistically significant differences ($P < 0.05$).

표 2-1. Attraction frequency of whiteflies to the rainbow colors after 6 hours observation.

Obs.	Total no.	Attraction rate to different colors (mean \pm SE, %)						
		Violet	Indigo	Blue	Green	Yellow	Orange	Red
NV-Q	500	1.0 \pm 0.5f	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	47.3 \pm 2.9c	1.6 \pm 0.3f	15.0 \pm 3.0e	1.6 \pm 1.2f
V-Q	500	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.7f	78.3 \pm 2.9a	1.0 \pm 0.6f	15.3 \pm 1.5e	0.0 \pm 0.0
NV-B	500	0.3 \pm 0.3f	0.3 \pm 0.3f	0.0 \pm 0.0	62.0 \pm 2.0b	1.7 \pm 0.3f	17.0 \pm 2.6e	0.3 \pm 0.3f
V-B	500	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	82.3 \pm 1.8a	2.0 \pm 0.6f	13.3 \pm 1.9e	0.0 \pm 0.0
Tv	500	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	4.0 \pm 0.6f	33.3 \pm 2.6d	1.3 \pm 0.3f	2.3 \pm 0.3e	0.0 \pm 0.0

(Obs: Observation, NV-Q: Non-viruliferous *Bemisia tabaci* Q-biotype, V-Q: Viruliferous *Bemisia tabaci* Q-biotype, NV-B: Non-viruliferous *Bemisia tabaci* B-biotype, V-B: Viruliferous *Bemisia tabaci* B-biotype, Tv: *Trialeurodes vaporariorum*). Different letters indicate values are significantly different at $P = 0.05$ by duncan's multiple range test using the GLM procedure (SAS institute)

그림 2-4. Attraction frequency of whiteflies to the green LED on different distance after 6 hours observation using Sigma plot 8.0. Different letters indicate values are significantly different at P = 0.05 by duncan's multiple range test using the GLM procedure (SAS institute)

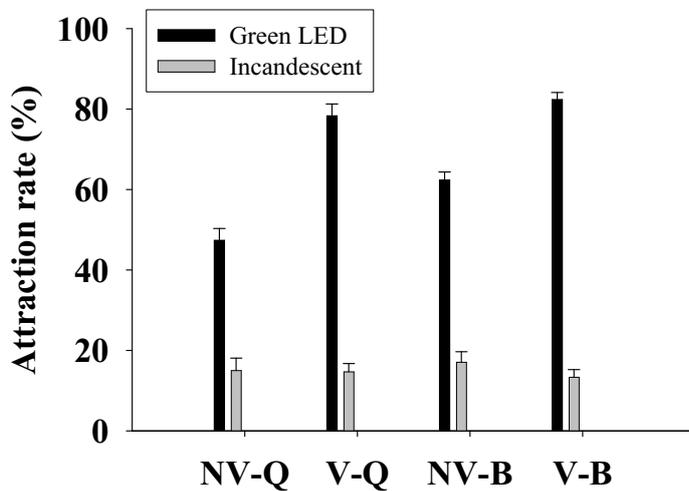
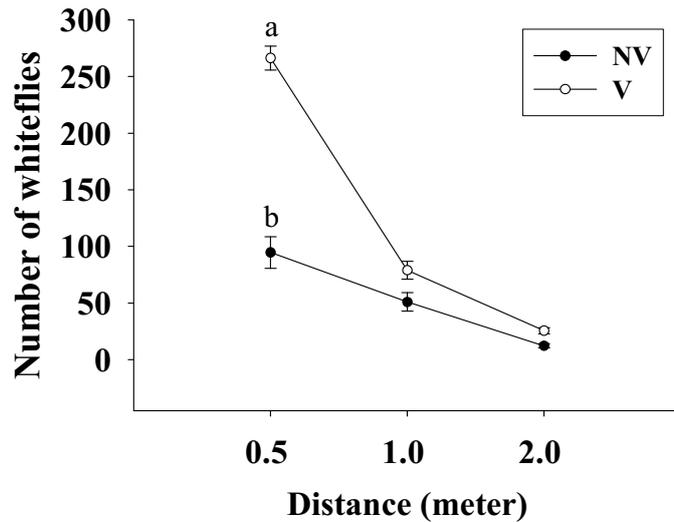


그림 2-5. Comparative attractions of whiteflies between Green LED and Incandescent. (NV-Q: Non-viruliferous *Bemisia tabaci* Q-biotype, V-Q: Viruliferous *Bemisia tabaci* Q-biotype, NV-B: Non-viruliferous *Bemisia tabaci* B-biotype, V-B: Viruliferous *Bemisia tabaci* B-biotype)

■ 제작

- 광파장 조합형 LED를 흰을 장착한 해충포획망과 함께 설치하여 빛에 유인된 해충을 팬으로 포충망에 흡입하여 포획

대상 해충	광파장 조합형 LED등
가루이류	녹색등(100%)

■ 사용법

- 방제대상 해충에 따라 다른 광파장 조합형 LED해충유인등 설치
- 야외 과원, 시설재배지 및 축산시설 내에 10m 간격으로 설치

그림 2-6. 타이머를 이용하여 야간에 ON/OFF 조절 가능



3. 담배가루이 유인식물 선발 및 야생담배에 대한 유인력 비교

가. 목적

- (1) 담배가루이의 유인살충 식물 발굴
- (2) 야생 담배 (*Nicotiana benthamiana*) 및 야생 토마토를 이용한 유인 및 살충력 분석
- (3) 주요 작물과 혼용재배에 대한 야생담배 및 야생토마토의 유인 및 살충력 비교 시험

나. 재료 및 방법

- (1) 공시충: 경북대학교 농장에서 사육중인 담배가루이 이용하였다.
- (2) 유인식물: 육묘장에서 토마토, 참외, 고추, 가지, 파프리카 육묘를 사용했다.
- (3) 야생담배 (*N. benthamiana*)와 참외 품종별 유인력 비교 실험: 경성 육묘장에서 3가지 품종(금싸라기, 부자, 해담은)의 참외를 구입하여 사용하였다.
- (4) 야생담배, 야생토마토: 경북대학교 농장 유리온실에서 재배하고 있는 식물 이용했다.
- (5) 유인식물을 사육케이지 망사 안에 넣고 담배가루이 방사 24시간 경과 후 유인율 조



담배가루이



야생담배



야생토마토



토마토



참외



고추



가지



파프리카

그림 3-1. 유인력 비교를 위해 사용된 식물체와 담배가루이

다. 결과 및 고찰

- (1) 작물별 기주 실험 결과 가지에서 담배가루이 유인력이 가장 높았다(그림 3-1).
- (2) 재배되는 작물에서의 유인력은 가지 > 참외 > 토마토 > 파프리카 순으로 나타났다.
- (3) 야생토마토, 야생담배 (*N. benthamiana*)는 유인력이 매우 낮게 나타났다.
- (4) TYLCV 비보독충과 보독충 사이의 유인 경향은 큰 차이를 보이지 않았다.

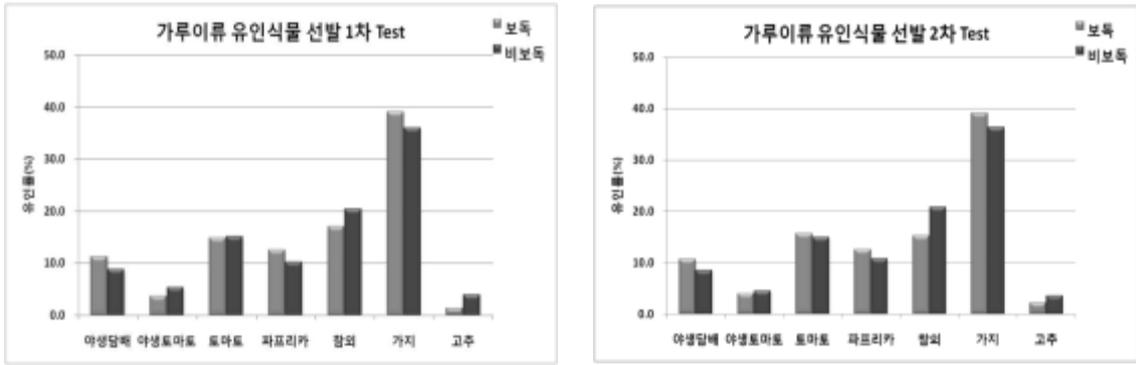


그림 3-2. 가루이류 유인식물선발 실험

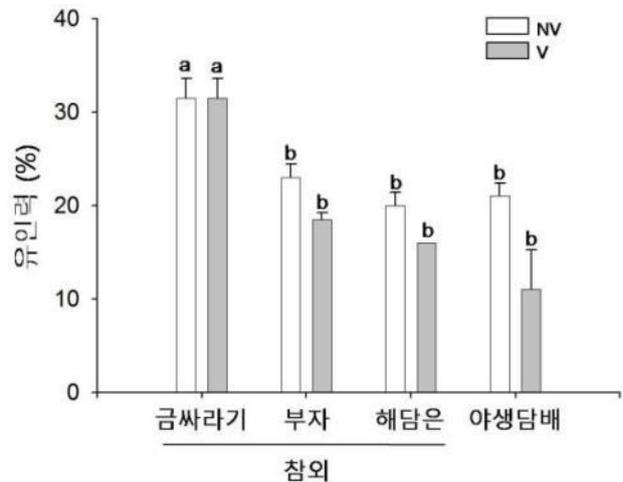
- (5) 참외 품종별로 야생담배와 비교했을 때 품종별로 유인력의 차이가 있었다.
- (6) TYLCV 비보독충과 보독충 사이의 유인 경향은 큰 차이가 없었다.



그림 3-3. 야생담배 (*N. benthamiana*)와 참외 품종별 유인력 비교 처리방법

그림 3-4. 야생담배와 참외 품종별 유인력 비교 결과

- (7) 토마토 식물과 야생담배 식물 간 유인력 비교에서 담배가루이는 토마토를 선호했으나 벤타미아나에 유인된 담배가루이는 60시간 내에 97%가 살충되었다.



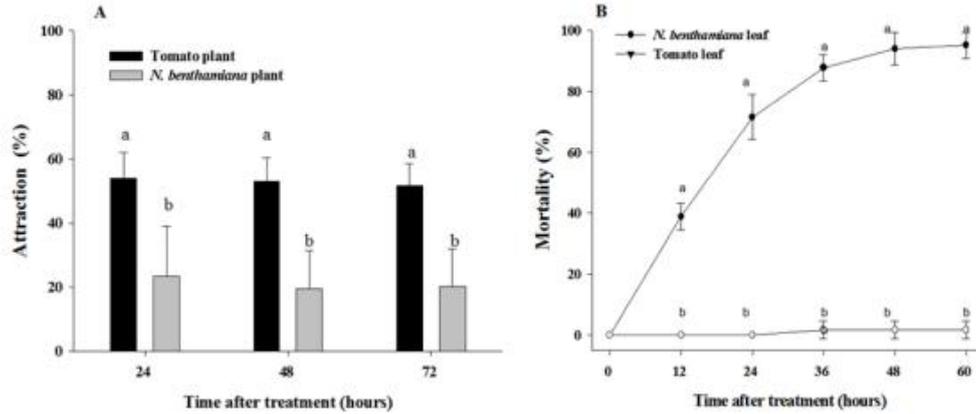


그림 3-5. 야생담배 (*N. benthamiana*)와 토마토에서의 담배가루이 유인력 비교 (A), 야생담배 (*N. benthamiana*)와 토마토에서의 담배가루이 살충력 비교 (B)

4. 니코티아나 벤타미아나를 이용한 가루이 방제용 천연살충물질 개발 및 효능 연구

가. 목적

- (1) 야생담배 (*Nicotiana benthamiana*)는 상업적으로 재배 및 판매되는 담배 (*Nicotiana tabacum*)의 근연종으로서 호주가 원산지이다. 최근 이 식물은 식물 분자생물학 연구 분야에서 모델 식물로 많이 사용되고 있다. 예를 들면, 에틸렌과 같은 호르몬 연구 및 다양한 종류의 식물 병원균을 쉽게 감염시킬 수가 있기 때문에 식물바이러스 연구에서 많이 사용되고 있다. 최근 유전자 재조합 단백질의 생산에도 이용되고 있다.
- (2) 벤타미아나는 잎 뒷면에 분비성 털 (glandular trichome)을 많이 가지고 있는데 이것은 잎의 상피세포가 돌출된 가지형태로 존재한다. 이 구조물은 진화과정에서 곤충으로부터 식물의 물리화학적 방어를 위하여 발달되었다. 이것은 다양한 화합물을 생산 분비하는데 그 중에서 비휘발성 대사물질인 아실 슈가 (acyl sugar)를 분비한다. 이 물질은 주로 가지과 (*Solanaceae*) 식물의 잎에서 생산 분비되는 점액성의 당지질 성분으로서 식물 표면 분비물 중에서 상당한 양을 차지하며 주로 야생 토마토 (*Solanum pennellii*)에서도 많이 생산된다 (잎 건조량의 약 20%). 또한 야생담배도 잎 건조량의 15%를 생산하고 벤타미아나에서도 생산된다. 이러한 아실 슈가는 주로 흡즙성 곤충에 독성을 나타내며 살충효과를 가지고 있다. 그래서 식물성 살충물질로 알려져 있지만 아실 슈가를 이용한 살충제의 개발에 대한 실용화한 예는 없다. 본 연구에서는 벤타미아나에서 살충성 아실 슈가 추출물을 간단하게 추출하는 방법의 개발 및 이 추출물의 처리에 대한 가루이의 다양한 생리적 방제 효능을 밝히고 궁극적으로 친환경적 가루이 방제제제를 개발하는데 목적이 있다.
- (3) 본 연구에서는 벤타미아나 식물을 대량으로 재배하여 잎과 줄기로부터 효율적으로 추출할 수 있는 방법을 개발하고 그 추출물을 이용하여 담배가루이의 기피, 발달 (탈피, 산란, 부화) 억제 및 살충효과를 조사하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 벤타미아나 대량 재배

(가) 5협동과제 시행기관인 충남 농업기술원에서 대량 재배하여 50 kg 확보함



그림 4-1. 벤타미아나 대량 재배

(나) 벤타미아나 유효 유인살충성분 추출

2가지 방법으로 2가지 용매를 사용하여 추출하였다. 첫째, 야생담배 잎과 줄기를 채취하여 건조시킨 뒤에 마쇄하여 분말을 만들었다. 그리고, 분말 1 kg에 물 또는 50% 에탄올 용액을 용매(1.5 L)로 하여 25℃에서 48시간 동안 침전시킨 뒤에 필터를 이용하여 추출하였다. 둘째, 담배 잎과 줄기를 채취(1 kg)하여 그대로 물 또는 50% 에탄올 용액 1.5 L에 30분 동안 침전시킨 뒤에 필터를 이용하여 추출하였다. 추출된 용액을 필터를 이용하여 분리한 뒤에 동결·건조하여 최종산물을 확보했다.

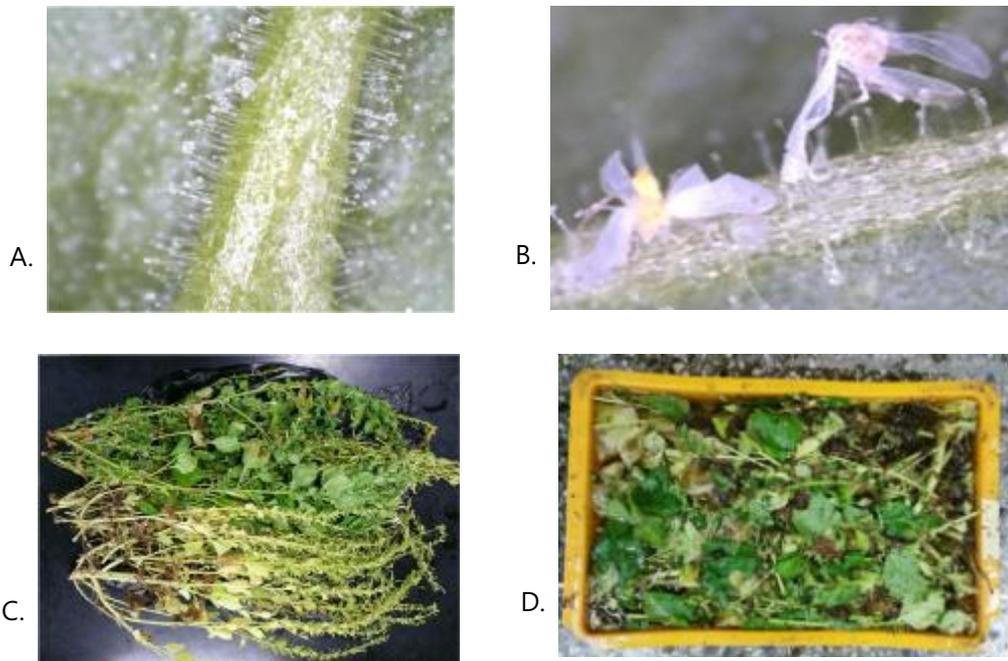


그림 4-2. 야생담배에서 발생하는 Acyl Sugar (A), Acyl Sugar에 의해 죽은 담배가루이(B), 야생담배 추출물 추출 과정(C), (D)

(다) 벤타미아나 추출물의 살충 및 생리적 장애 효능 분석

섭식살충효과 분석 : 담배가루이 인공먹이 사육통(Feeding chamber)을 제작하였다. 유리관(직경 3cm, 높이 12cm) 위쪽에 파라필름을 이용하여 2겹으로 봉했다. 아래쪽에는 플라스틱으로 봉한 뒤에 중앙에 플라스틱 튜브를 이용하여 구멍(직경 0.5cm, 높이 2cm)을 뚫었다. 담배가루이의 인공먹이는 sucrose 20%를 이용하였다. 니코티아나 벤타미아나 추출물을 설탕물과 혼합하여 0, 1, 10, 20%로 만든 다음에 유리관 위쪽의 2겹의 파라필름 사이에 약 200 μ l을 넣었다. 유리관 아래쪽의 플라스틱 튜브 구멍을 통하여 담배가루이 성충(50마리)을 투입한 뒤에 솜으로 구멍을 막았다. 유리관 사육통을 이용한 담배가루이 흡즙 실험을 관찰하였으며, 살아있는 담배가루이 성충은 위쪽의 파라필름 막에 붙어서 설탕물을 흡즙했으나 죽은 담배가루이는 아래쪽 바닥으로 떨어졌다. 처리 후 12시간 간격으로 담배가루이의 살충률을 조사하였다.



그림 4-3. 파라필름을 이용한 feeding chamber 및 20% 설탕물을 흡즙하는 담배가루이

(라) 우화율, 산란율, 부화율 및 기피율 분석 : 벤타미아나 추출물을 물과 0, 1, 10, 20%로 희석하여 만든 후 가루이 약충이 붙어 있는 토마토 잎에 엽면살포한 후에 시간 경과에 따른(24, 48, 72, 96, 120, 144, 168시간) 성충의 우화율, 성충의 산란율, 알의 부화율, 성충의 유인율 등을 측정하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) 유인 살충율 분석 : 24시간이 경과한 시점에 담배가루이는 토마토와 니코티아나 벤타미아나 식물에 각각 53.9%와 23.5% 유인되는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 비율은 96시간이 지난 뒤에도 유사하게 나타났다. 한편, 각 식물에 유인된 담배가루이의 살충율을 비교해 본 결과, 토마토에 있는 가루이 중에서 살충율은 60시간 이후에도 10% 이하였지만 벤타미아나 식물에 유인된 가루이는 79.8%가 살충된 것으로 나타났다. 또한, 벤타미아나 식물과 유사한 담배(*N. tabacum*) 식물을 비교 시험해 본 결과 살충율이 21.5%로 나타났다. 즉, 벤타미아나 식물에 유인된 담배가루이는 거의 대부분 죽은 것으로 나타났는데, 이러한 결과는 벤타미아나 식물이 토마토 및 담배와는 달리 가루이를 유인하여 살충특성을 나타냈다.

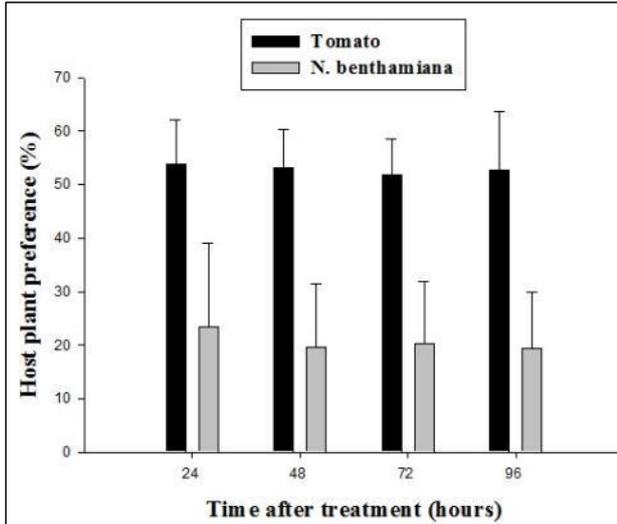


그림 4-4. 벤타미아나와 토마토 식물에 대한 유인율

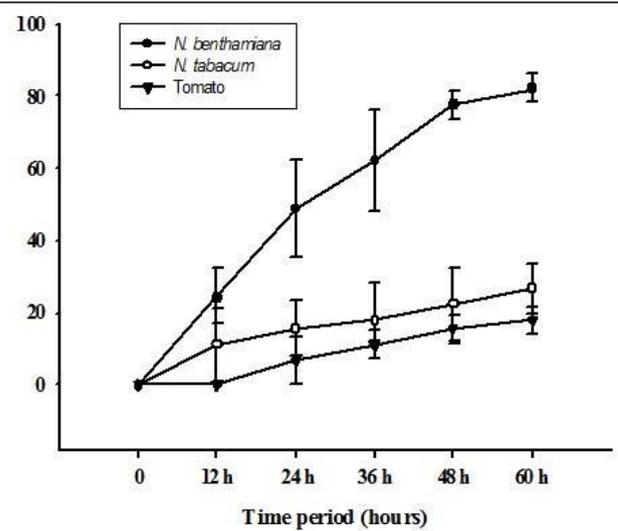


그림 4-5. 유인된 가루이의 살충율 비교

(2) 섭식 살충율 분석 : 설탕물(20%)만 사용한 무처리구에서는 84시간 이후의 살충율이 21%로 나타난 반면, 벤타미아나 추출물을 처리한 실험군에서는 용매의 종류(물 또는 에탄올)와는 상관없이 10%이상 농도에서 100%의 살충율을 나타냈으며, 0.5 및 1% 농도에서는 물과 에탄올 추출액이 58-62%로 나타났다.

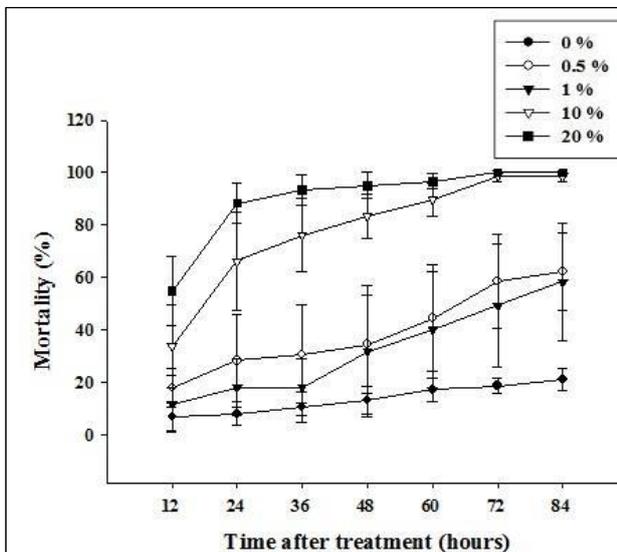


그림 4-6. 벤타미아나 에탄올 추출물에 대한 섭식 살충율

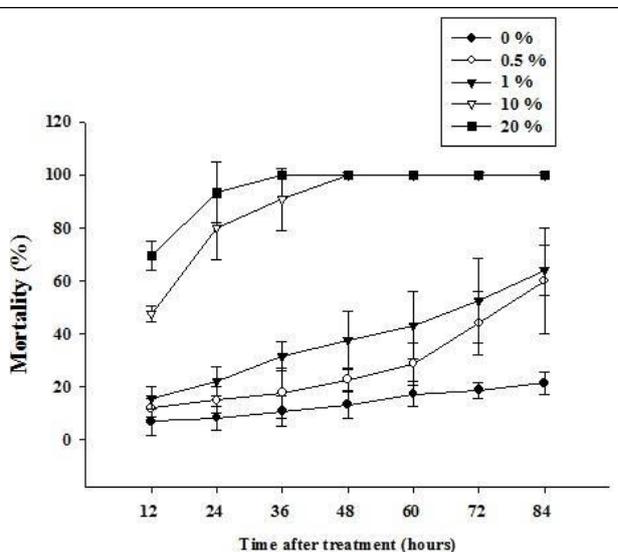
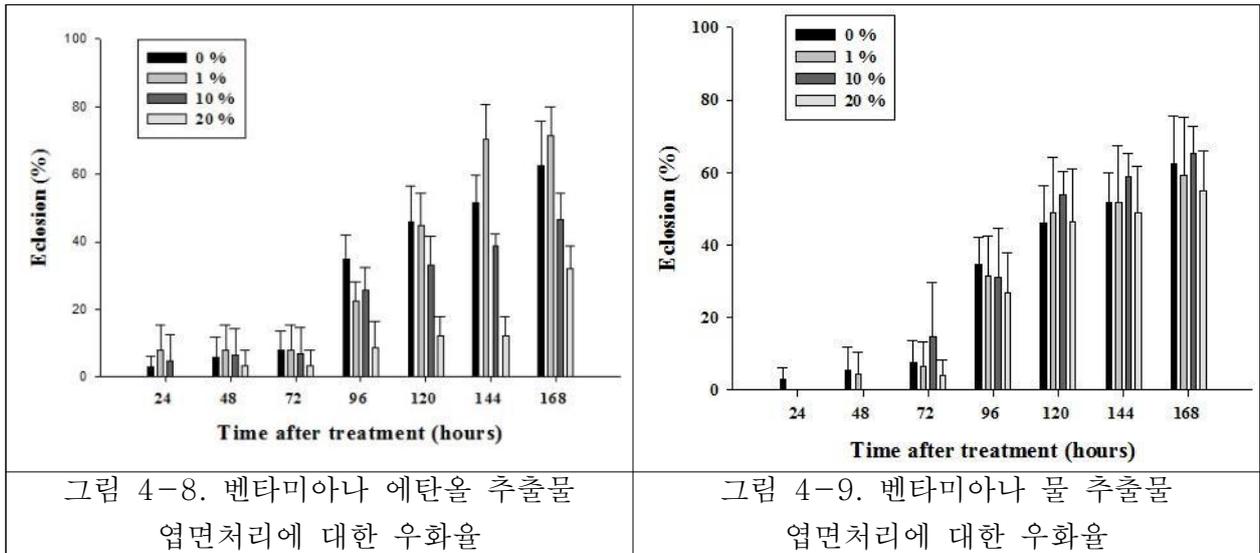


그림 4-7. 벤타미아나 물 추출물에 대한 섭식 살충율

(3) 우화율 분석 : 무처리구에서는 엽면살포한 후 7일이 경과한 시점에 총 62.5마리가 우화하였으며, 이에 비해 본 발명의 이코티아나 벤타미아나 에탄올 추출물(20% 농도) 처리구에서는 51.0%(31.9개)로 감소하였다. 그러나, 다른 농도에서는 대조구와 차이가 나타나지 않았다. 즉, 담배가루이 우화율은 벤타미아나 20% 에탄올 추출액에서는

효능이 있었으며 물 추출물 처리구에서는 효과가 없는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 두 종류의 다른 용매로 추출된 추출물의 경우, 가루이의 우화를 억제하는 성분의 차이가 있는 것으로 판단되었다.

- (4) 성충 유인율 분석 : 벤타미아나 추출물 처리 농도가 증가할수록 토마토에 대한 가루이의 유인율이 현저히 감소했다. 이러한 유인율은 처리후 12시간에 20% 농도에서 무처리구의 20% 수준이었으며 이러한 유인율 감소 비율은 84시간까지 측정해 본 결과 처음과 비슷한 수준으로 나타났다. 즉, 본 발명의 니코티아나 벤타미아나 추출물은 담배가루이 성충에 대하여 높은 기피율을 나타냈다.



- (5) 산란율 분석 : 무처리구에서 산란된 알의 수는 암컷당 약 72개인 반면, 벤타미아나 추출물에 침전한 잎에서는 산란수가 농도에 반비례하며 감소했다. 즉, 물과 에탄올 추출물의 20% 농도 처리구에서 산란수는 36.6개와 33.3개였으며 이는 대조구의 46.7%와 50.7% 수준으로 나타났다. 즉, 벤타미아나의 두 종류 추출물이 모두 가루이의 산란을 약 50% 수준으로 억제했다.

- (6) 부화율 분석 : 무처리구 샘플에서 알의 부화율은 92.1%인 반면에 벤타미아나 추출물을 처리한 경우에 그 처리 농도가 높을수록 부화율이 현저히 감소했다. 즉, 20% 농도의 벤타미아나 추출물을 처리한 경우에 알의 부화율은 물 추출액은 7.9%, 에탄올 추출액은 3.5%로 감소하였다. 이것은 무처리구의 9.1%와 3.6% 수준으로서 부화율이 현저히 억제되었다.

- (7) 야생담배 잎 추출액을 분말상태로 만들어 다음의 농도로 담배가루이에 섭식시켰을 때 기존에 시판되고 있는 약제 성분과 비교하였을 때와 비슷한 수준으로 높은 살충력을 보였다.

(8) 잎 추출물 분말제는 트리콤 추출액보다 담배가루이 살충력이 더 높았으며 10%의 분말액은 36시간 내에 100% 살충율을 나타내었다.

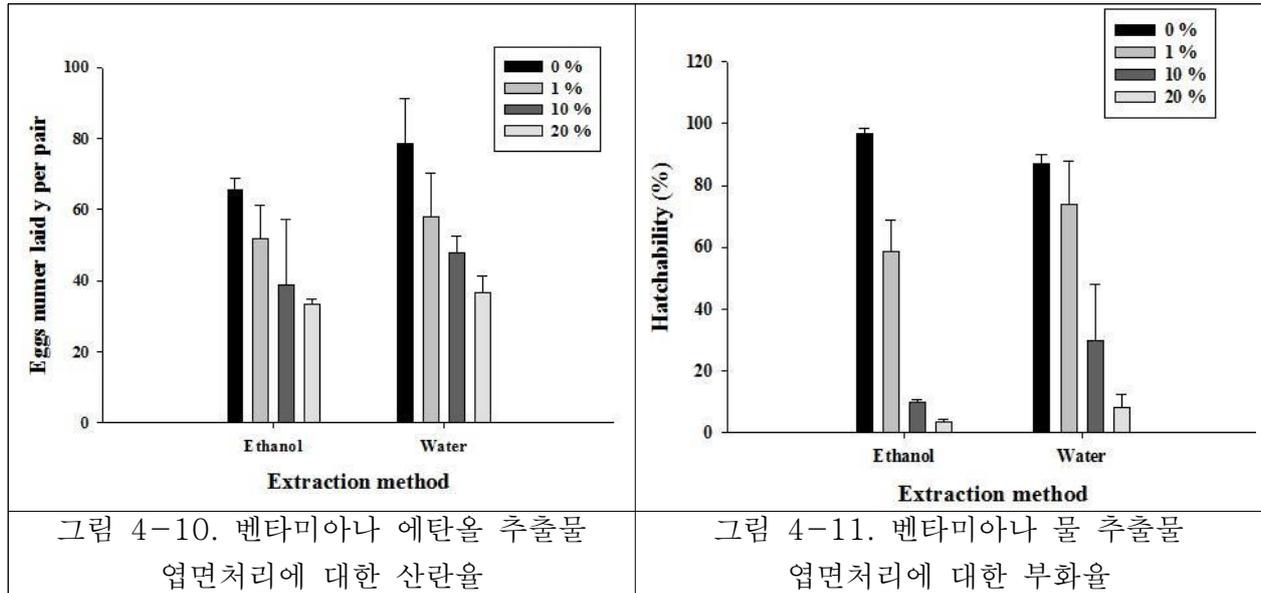


그림 4-10. 벤타미아나 에탄올 추출물 엽면처리에 대한 산란율

그림 4-11. 벤타미아나 물 추출물 엽면처리에 대한 부화율

표 4-1. *N. benthamiana* 추출 분말제를 이용한 섭식 독성 결과

Treated substance	Conc. (%)	Mortality (Mean±SE)				P	CL
		Time after treatment (h)*					
		12	24	36	48		
Control	0	3.3 ± 1.7a	8.3 ± 1.7d	13.3 ± 3.3e	18.3 ± 1.7e	<0.05	95
Water washed Trichome	0.10	8.0 ± 6.1a	32.0 ± 6.1c	46.7 ± 6.7d	46.7 ± 6.7d	<0.05	95
	1	12.0 ± 2.3a	56.0 ± 2.3b	61.3 ± 1.3c	64.0 ± 2.3c		
	10	10.7 ± 2.7a	60.0 ± 2.3b	73.3 ± 1.3b	81.3 ± 4.8b		
Ethanol washed Trichome	0.10	12.0 ± 4.6a	58.7 ± 4.8b	80.0 ± 2.3b	92.0 ± 2.3a	<0.05	95
	1	20.0 ± 2.9a	80.0 ± 2.9a	100.0 ± 0.0a	100.0 ± 0.0a		
	10	21.7 ± 3.3a	85.0 ± 2.9a	100.0 ± 0.0a	100.0 ± 0.0a		
Imidacloprid	0.10	13.3 ± 8.8a	63.3 ± 8.8b	100.0 ± 0.0a	100.0 ± 0.0a	<0.05	95
	1	20.0 ± 10a	83.3 ± 3.3a	100.0 ± 0.0a	100.0 ± 0.0a		
Acetamiprid+	0.10	6.7 ± 3.3a	40.0 ± 5.8c	80.0 ± 5.9b	93.3 ± 3.3a	<0.05	95
Etofenprox	1	13.3 ± 8.8a	86.7 ± 6.7a	100.0 ± 0.0a	100.0 ± 0.0a		

*Significant at $P < 0.05$. Means within same columns followed by the different uppercase letter are significantly different (SAS Institute, 2003) between different solvent used to extract trichome exudate and chemical pesticide.

라. 요약

- (1) 니코티아나 벤타미아나 추출물은 담배가루이 성충의 기피 효과; 담배가루이 성충의 산란 억제 효과; 담배가루이 알의 부화율 억제 효과; 및 담배가루이 성충의 살충효과가 우수했다(Assduzzaman et al., 2016).
- (2) 담배가루이와 같은 흡즙성 및 미소해충의 살충 또는 기피 용도로 유용하게 사용될 수 있다.
- (3) 식물체에서 추출한 물질이므로 친환경적으로 해충방제를 할 수 있는 장점이 있다.

5. Neem 제제를 활용한 담배가루이 방제 기술

가. 담배가루이 약충의 경구 독성

(1) 재료 및 방법

약충의 경구독성을 분석하기 위하여 single leaf method를 이용하였다. 가루이의 노숙 약충이 평균 200마리 이상 증식한 참외 잎을 골라 잎줄기에 솜을 뭉치고 은박지를 감싼 뒤에 님제제(azadirachtin 0, 5, 10, 50 ppm)를 처리하고 5일간 우화 개체 수를 조사하였다.



그림 5-1. Single leaf method를 이용한 약충의 경구독성 시험

(2) 결과 및 고찰

Single leaf method를 통하여 약충의 우화율을 비교분석해 본 결과 님제제의 농도가 증가함에 따라 우화율이 87.0, 16.6, 16.1, 6.6%로 감소하였다.

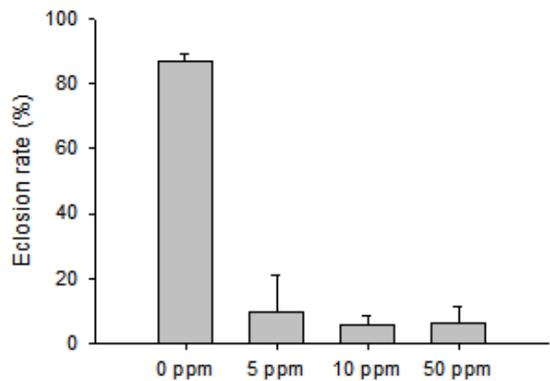


그림 5-2. Single leaf method를 이용한 약충 우화율

나. 담배가루이 성충의 경구 독성

(1) 재료 및 방법

성충에 대한 님액제의 경구독성 분석을 위하여 parafilm chamber를 이용하였다. 시험 유리관의 이중 파라필름 사이에 님제제(azadirachtin 0, 5, 10, 50 ppm)를 함유한 20%의 설탕물을 첨가하여 담배가루이에 섭식시키고, 시간대별(1, 2, 3일)로 사망률을 결정하였다.

그림 5-3. Parafilm chamber를 이용한 성충의 경구 독성 시험



(2) 결과 및 고찰

Azadirachtin의 농도에 따라서 살충율이 증가했으며 처리 후 72시간에 무처리구는 12.5%인 반면 5 ppm 이상의 농도에서는 77.5-100%의 살충율을 나타냈다.

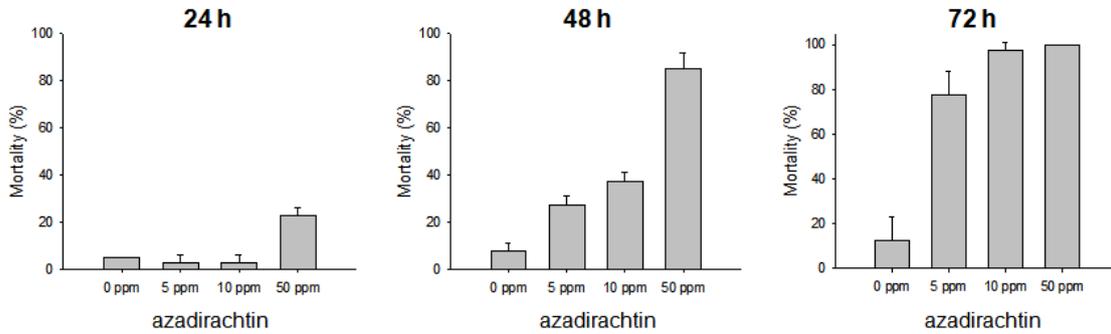


그림 5-4. Azadirachtin 농도 및 섭식 시간에 따른 담배가루이 성충의 경구독성

다. Neem처리에 따른 담배가루이 산란을 영향

(1) 재료 및 방법

담배가루이 산란에 대한 영향을 조사하기 위하여 토마토 pot에 다양한 농도 (azadirachtin 0, 10, 50 ppm)의 님 제제를 한 달 동안 4회 관주처리하고 난 뒤 토마토 가지를 뜯어서 15ml Falcon tube에 옮긴 것을 새로운 케이지에 두고 성충 암수 각 50마리를 풀어 2주간 사육한 뒤에 산란수를 현미경으로 조사하였다.

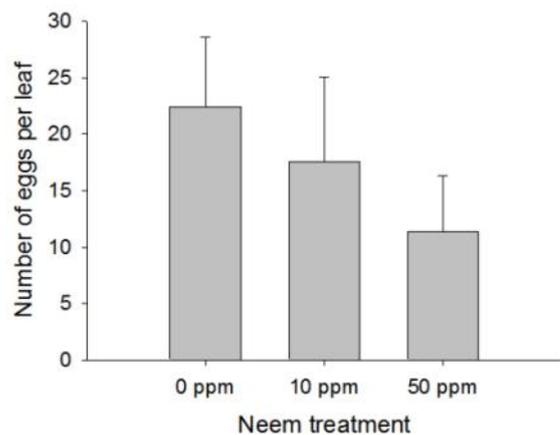


그림 5-5. 담배가루이 산란에 대한 님 제제 관주효과 시험

(2) 결과 및 고찰

님 제제를 관주 처리한 토마토 잎에 서식하는 성충은 잎에 존재하는 님 제제의 농도가 높을수록 산란율이 낮았다. 무처리구에 비해 10 ppm, 50 ppm 처리구에서는 각각 21.5%, 49.4%가 감소되었다.

그림 5-6. 님 관주 처리에 따른 담배가루이 산란 효과



라. 님 제제 관주 처리에 따른 담배가루이 약충 발생 조사

(1) 재료 및 방법

현장적용실험을 위하여 군위 부계면 친환경 토마토 농가에서 님제제(azadirachtin 10 ppm)를 7일 간격으로 3회 관주처리하고 잎 당 약충 수를 현미경을 통해 측정하였다. 또한 토마토의 약해를 육안으로 관찰했다.



그림 5-7. 친환경 토마토 농가에 현장적용 시험

(2) 결과 및 고찰

친환경 토마토 농가에 님 제제(azadirachtin 10 ppm)를 3회 관주처리한 결과 잎 당 약충 수가 무처리구에 비하여 평균 60.3% 감소하였다. 또한, 토마토의 성장을 육안 상 비교해 본 결과 무처리구와 차이가 없었다.

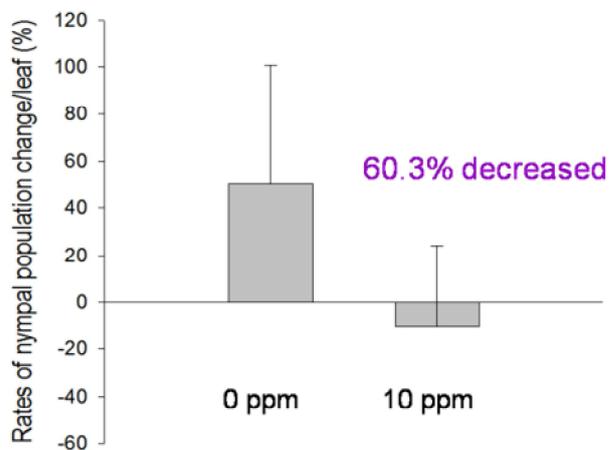


그림 5-8. 님 제제 관주 처리에 따른 잎 당 약

2장. 제1협동과제 (농촌진흥청)

1절. 가루이류의 유전적 변이 분석 및 지역별 약제저항성 검정

1. TbLCV 매개 가루이류 탐색 및 보독 바이러스 검정

가. 개요

- (1) 현재까지 국내에 알려진 *Begomovirus*속 식물바이러스는 총 4종으로서 TYLCV(*Tomato yellow leaf curl virus*, 2008), TbLCV(*Tobacco leaf curl virus*, 2008), SPLCV(*Sweet potato leaf curl virus*, 2006), HYVV(*Honeysuckle yellow vein virus*, 2006)이다.
- (2) 이 가운데 TbLCV는 국내에서 2011년 최초로 보고되었으며, 전북 익산, 김제, 순창, 그리고 제주에서 시설재배 토마토에 국부적으로 발생하였으나 이병주에서의 피해는 매우 심각하였다. 이 바이러스의 매개충은 아직까지 불분명하다.
- (3) 시설재배 토마토에서 발생하지만 매개충 및 매개충의 발생환경 등이 전혀 알려져 있지 않은 TbLCV에 중점을 두고 추진하였다.

나. 재료 및 방법

- (1) 야생식물에서 TbLCV의 발생과 이를 매개하는 가루이류를 알아보기 위하여 2009년에 시설재배 토마토에서 TbLCV의 발병이 확인된 전북 익산의 1개 지점(UpB)과 이곳으로부터 최소 2km에서 최대 10km 거리에 있는 6개 지점(UpA, UpC, ScA, ScB, ScC, Db)을 선정하였다(그림 1-1).
- (2) 조사대상 야생식물은 *Begomovirus*의 대표적인 야생기주의 하나로 알려진 인동덩굴(*Lonicera japonica*)이었다.
- (3) 조사기간은 월동 직후인 3월부터 월동직전인 10월까지였다. 잎이 붙어 있는 인동덩굴의 줄기를 전정가위를 사용하여 30-50cm 길이로 잘라 비닐봉지에 담아 수거하고 실험실에서 해부현미경으로 각각의 소엽에 서식하는 가루이류의 발생유무를 조사하는 한편, 식물체와 가루이류의 바이러스 감염여부를 각각 개체검정을 수행했다.
- (4) 가루이류의 종류와 유전적 변이를 알아보기 위하여 형태적 분석과 유전적 분석을 병행하였다. 형태적 분석은 알, 약충, 용각의 외부 형태적 특징을 관찰하였고, 유전적 분석은 mtDNA *COI* 유전자의 염기서열을 비교하였다.
- (5) 야생식물(인동덩굴) 및 서식충(가루이류)의 바이러스 감염을 알아보기 위하여 Genomic DNA는 추출하였고, 추출한 DNA로부터 TYLCV, TbLCV 및 HYVV를 진단할 수 있는 각각의 프라이머를 사용하여 standard PCR을 수행하였다.

다. 결과 및 고찰

- (1) 월동 직후인 3월 초순에 전년도 전개된 인동덩굴 잎에서 가루이류(약충)가 서식하고 있음을 확인하였다(표 1-1). 발생하는 가루이류는 형태적으로, 특히 노숙 약충대에서 서로 쉽게 구별되는 2종류였다(그림 1-2).

- (2) 이 가운데 한 종은 담배가루이(*Bemisia tabaci*)로 동정되었으나, 담배가루이의 어떤 유전적 그룹에 속하는지 형태적으로 알 수가 없었다. 또 다른 한 종류(unidentified whiteflies)는 *Bemisia afer*로 동정되었다(그림 1-2).
- (3) 가루이류 2종의 서식이 확인된 전년도(2011) 전개된 인동덩굴 잎의 일부에서 TbLCV가 검출되었다(표 1-2). TbLCV가 검출된 지점은 조사한 지점 2곳 모두였으며, 과거에 시설재배 토마토에서 TbLCV가 발견된 지점(UpB)과 이곳으로부터 2Km 떨어진 지점(UpA)이었다. TbLCV 검출율은 8.3-10.0%였다.
- (4) 2012년 새로 전개한 인동덩굴 잎에서 월동 직후 조사지점을 포함하여 5곳이 추가된 7개 지점에서 TbLCV가 검출되었다(표 1-3). TbLCV가 검출된 지점은 월동 직후 조사에서 TbLCV가 검출된 2곳(UpA, B)과 이곳과 가까운 추가 조사지점 1곳(UpC) 등 총 3곳이었으며, 나머지 4곳에서는 전혀 검출되지 않았다. TbLCV 검출율은 10.0-50%로서 월동 직후보다 약간 높은 경향이었다.
- (5) 2012년 새로 전개한 인동덩굴에서 서식하는 가루이류 종류와 발생밀도를 조사하고 TbLCV의 보독여부를 검정하였다(표 1-4, 1-5). 가루이류 종류는 월동 직후 조사와 동일하게 담배가루이와 미동정종 등 2종이었다. 담배가루이는 7개 지점 가운데 1곳(UpA)에서만 발생하였으며, 이 지점은 인동덩굴에서 TbLCV가 검출된 지점 중 하나였다. TbLCV가 검출된 가루이는 담배가루이였으며, 미동정종에서는 전혀 검출되지 않았다. 담배가루이 약충의 발생밀도는 15엽당 1.6마리였으며, TbLCV 검출율은 25.0%로 높은 편이었다.
- (5) 이와 같은 결과로부터 담배가루이와 TbLCV는 각각 노지조건인 야생식물인 인동덩굴을 중요한 월동 및 증식기주일 것으로 판단된다. 또한 TbLCV는 적어도 이듬해 인동덩굴에서 증식하는 담배가루이의 매개에 의해 자연순환 할 가능성이 높다고 판단된다.

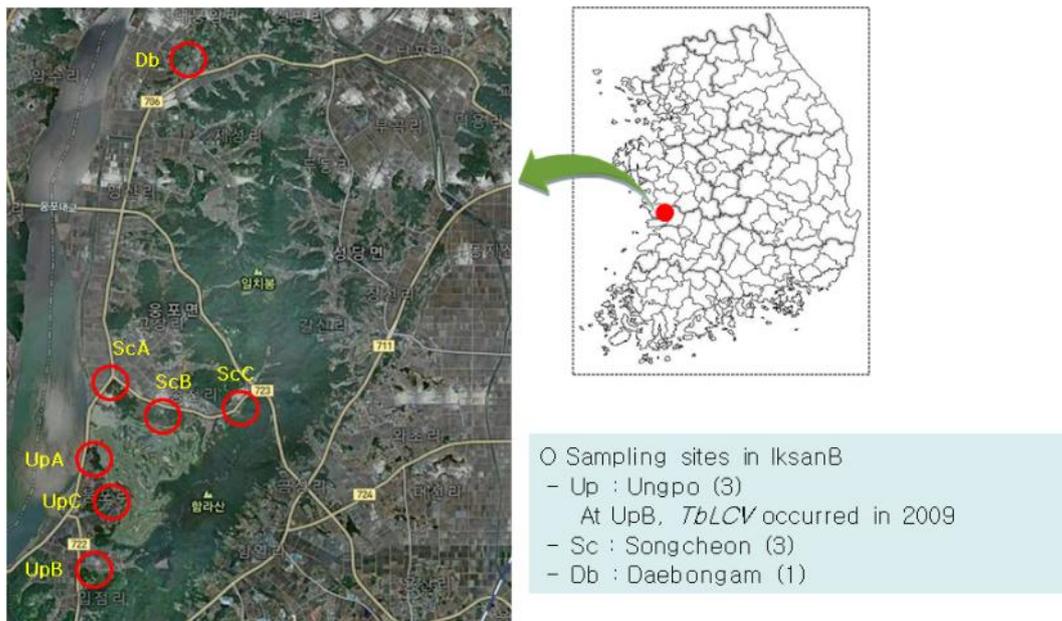


그림 1-1. 인동덩굴에 발생하는 가루이류 조사지점(전북 익산시 웅포면 소재)

표 1-1. 월동 직후 전년도 전개한 인동덩굴 앞에서 가루이류 발생 조사(2012)

Localities	Collection dates	Whiteflies	No. plants	Whiteflies	
				Developmental stages	No. Samples
Ungpo A	7 Mar. 2012	<i>B. tabaci</i>	7	nymph	17
Ungpo B	7 Mar. 2012	<i>B. tabaci</i>	2	nymph	4
	7 Mar. 2012	unidentified	1	nymph	1

표 1-2. 월동 직후 전년도 전개한 인동덩굴 앞에서 TbLCV 검정(2012)

Localities	Collection dates	Plants infected by TbLCV (PCR)		
		Tested	Infected	Infection (%)
Ungpo A	7 Mar. 2012	10	1	10.0
Ungpo B	7 Mar. 2012	12	1	8.3

표 1-3. 금년도 새로 전개한 인동덩굴 앞에서 TbLCV 검정(2012)

Localities	Collection dates	Plants infected by TbLCV (PCR)		
		Tested	Infected	Infection (%)
Ungpo A	4 Jun. 2012	5	2	40.0
Ungpo B	4 Jun. 2012	6	3	50.0
Ungpo C	4 Jun. 2012	4	4	100
Songcheon A	4 Jun. 2012	4	0	0.0
Songcheon B	4 Jun. 2012	5	0	0.0
Songcheon C	5 Jun. 2012	3	0	0.0
Daebongam	4 Jun. 2012	1	0	0.0

표 1-4. 금년도 새로 전개한 인동덩굴 앞에서 서식하는 가루이류의 TbLCV 보독 검정(2012)

Localities	Collection dates	Whiteflies	Developmental stages	Whiteflies		
				Tested	Infected	Infection (%)
Ungpo A	4 Jun. 2012	unidentified	egg	1	0	0.0
	4 Jun. 2012	<i>B. tabaci</i>	nymph	12	3	25.0
Ungpo B	4 Jun. 2012	unidentified	nymph	1	0	0.0
Songcheon A	4 Jun. 2012	unidentified	egg	1	0	0.0
	4 Jun. 2012	unidentified	nymph	4	0	0.0
Songcheon B	4 Jun. 2012	unidentified	egg	1	0	0.0

표 1-5. 금년도 새로 전개한 인동덩굴 앞에서 서식하는 가루이류의 발생밀도(2012)

Localities	Sampling dates	Whiteflies	No. plants	Whiteflies	
				Developmental stages*	Density (ind./15 leaves/plant)
Ungpo A	4 Jun. 2012	<i>B. tabaci</i>	5	nymph	1.6
Ungpo B	4 Jun. 2012	unidentified	6	nymph	0.8
Songcheon A	4 Jun. 2012	unidentified	4	nymph	1.3
Songcheon B	4 Jun. 2012	unidentified	5	nymph	1.6

* eggs excluded because of misidentification possibilities for each species.

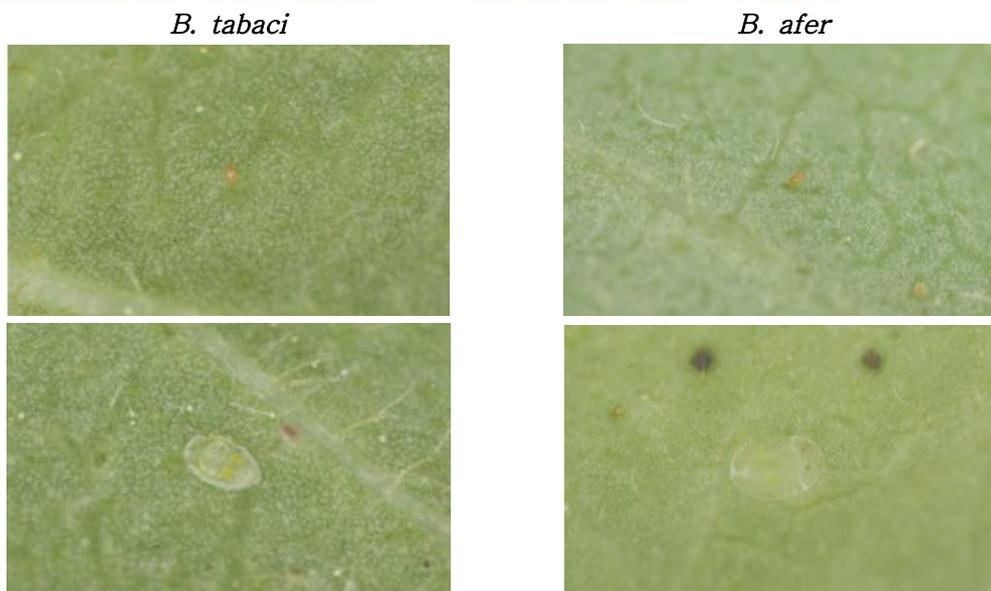


그림 1-2. 인동덩굴 앞에서 활동하는 가루이류 2종의 형태 비교(위, 알; 아래, 약충)

2. TbLCV 매개 가루이류의 전국적 분포 및 유전적 변이 분석

가. 개요

- (1) 현재까지 담배가루이 species complex에 속하는 종(species)들을 구별할 수 있는 외부형태형질이 없기 때문에 미토콘드리아 유전자 COI을 이용하여 종을 구분하고 있다.
- (2) 우리나라에서 최초로 야생기주인 인동덩굴에서 발견된 담배가루이(*JpL*)와 인동덩굴의 제미니바이러스(TbLCV, TYLCV, HYVV)의 보독여부를 알아보는 한편, 현재까지 확보된 *JpL* 담배가루이의 전국적 시료의 계통분석을 통해 국내 담배가루이류의 생물학적 실체를 밝히는 데 중점을 두고 추진하였다.

나. 재료 및 방법

- (1) 조사대상 야생식물은 *Begomovirus*의 대표적인 야생기주의 하나로 알려진 인동덩굴(*Lonicera japonica*)이었다.
- (2) 조사지역은 전국을 포괄하였으며, 경기, 강원, 충남북, 전남북, 경남북, 제주 등 9개도 24개 시군이였다(그림 2-1).
- (3) 농경지 주변에서 인동덩굴을 채취하고 실험실로 운반하여 잎 뒷면에 서식하는 담배가루이를 선별하였으며, 인동덩굴 자체와 담배가루이의 바이러스 감염여부에 대하여 각각 개체검정을 수행하였다. 야생식물(인동덩굴) 및 서식충(가루이류)의 바이러스 감염을 알아보기 위하여 Genomic DNA는 추출하였고, 추출한 DNA로부터 TYLCV, TbLCV 및 HYVV를 진단할 수 있는 각각의 프라이머를 사용하여 standard PCR을 수행하였다.
- (4) 가루이류의 유전적 분석은 개체별로 Genomic DNA는 추출하였고, mtDNA COI 유전자의 염기서열을 비교하였다. 담배가루이 시료는 2013년부터 2014년까지 강원, 경기, 충남북, 전남북, 경남북, 제주 등 전국적으로 채집한 시료(총 83샘플)를 이용하였다(표 2-1). *JpL* 담배가루이의 haplotyp은 ARLEQUIN version 3.5로 확인하였고, 염기서열 변이위치, haplotype 개수 및 다양성, nucleotide 다양성 및 차이 등 descriptive statistics는 DNASP version 5.0으로 계산하였다. 또한 *JpL* 담배가루이의 계통분석은 본 연구에서 얻어진 83개 COI sequences와 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)에 보고된 담배가루이 16개 COI sequences, 그리고 일본에서 보고된 7개의 COI sequences를 사용하여 Bayesian inference (BI) tree와 Neighbor-joining (NJ) tree를 분석하였다. nucleotide sequences의 alignments는 CLUSTALX를 이용하였다. Bayesian inference (BI) 분석은 MrBayes 3.1.2(Huelsenbeck & Ronquist, 2001)를, Neighbor-joining(NJ) 분석은 MEGA 5.0(Tamura et al. 2011)를 이용하였다.

다. 결과 및 고찰

- (1) 전국적으로 조사한 인동덩굴 앞에서 가루이류는 담배가루이 2종(*JpL Mediterranean* (=MED)), 가루이 1종(*Bemisia afer*) 등 총 3종이 확인되었다(표 2-2). 조사지역 6개시군 가운데 *JpL* 담배가루이는 5개시군(경기 남양주, 충북 괴산, 전북 익산, 제주 제주 및 서귀포)에서, MED 담배가루이는 제주 서귀포에서, *B. afer*는 2개시군(경기 남양주, 전

북 익산)에서 발생하였다. TYLCV의 매개충인 *MED* 담배가루이가 비록 1개체이지만 제미니바이러스의 야생기주인 인동덩굴에서 약충태로 발견된 것은 노지에서 TYLCV의 년중 순환과 관련 시사하는 바가 크다. 인동덩굴 이외의 노지작물(들깨, 토마토)과 왕고들빼기 등 야생 초본류 7종의 잎에서 발견된 가루이류는 *JpL* 담배가루이와 *MED* 담배가루이 등 2종이었다(표 2-3).

(3) TbLCV의 발생상황을 파악하기 위해 전국적인 범위에서 채집한 야생기주인 인동덩굴 197 샘플에서 제미니바이러스(TYLCV, TbLCV, HYVV)의 감염여부를 검정한 결과, TYLCV와 HYVV는 확인되지 않았고 TbLCV만이 검출되었다(표 2-4). TbLCV는 경기, 강원, 충남북, 경북, 전남북, 제주 등 대부분의 지역의 발생하였으며, 감염률은 9.1-80.0%였다.

(4) 제미니바이러스의 중요한 월동 및 증식기주인 노지 인동덩굴에서 채집한 *JpL* 담배가루이 가운데 일부는 우리나라 시설재배 토마토에서 간헐적으로 피해를 준 바 있는 TbLCV를 보독하였으며, 보독충율은 31.6~100%로 매우 높은 편이었다(표 2-5).

(5) 따라서 *JpL* 담배가루이와 TbLCV는 전국적으로 분포하고, 인동덩굴을 중요한 월동 및 증식기주로 하면서 년중 순환을 하는 것으로 생각된다. 토마토 등 시설재배 작물에 대한 감염경로는 [1) 인동덩굴에서 월동 → 2) 인동덩굴 등 기주식물에서 증식 → 3) 서식처로부터 주변으로 확산 → 4) 작물재배 시설로 유입, 감염 → 5) 토마토 등 작물에서 병증 발현, 피해 발생]일 것으로 추측된다.

(6) 노지 인동덩굴을 주요 기주식물로 하는 국내 분포 *JpL* 담배가루이는 경기, 강원, 충남북, 경북 등 중부지방과 전남, 경남, 제주 등 남부지방에 널리 분포함을 확인하였다(그림 B-2-2). 99개의 *COI* sequences의 염기서열을 분석을 통해 *JpL* 담배가루이는 총 8개의 haplotype으로 구성됨을 알 수 있었다(표 B-2-6). 이들 haplotype 가운데 hap-2가 압도적으로 우점한 반면, 나머지 7개의 haplotype은 충남, 전북, 제주의 1개의 샘플에서 확인되었다. MJ 네트워크를 통해 *JpL* 담배가루이는 두 개(한반도, 제주도)의 유전적 그룹으로 나누어짐을 알 수 있었다(그림 2-3). 특히 제주도의 경우 8개의 haplotype 가운데 5개(hap-1, 2, 6, 7, 8)을 포함하여 가장 높은 유전적 다양성을 나타냈다. 본 연구에서 확보된 99개의 염기서열과 일본에서 보고된 7개의 염기서열 등 총 106개의 *COI* sequences의 계통분석을 통해 우리나라와 일본에서만 보고된 *JpL* 담배가루이는 'Clade A'와 'Clade B'로 명확히 구분되었다(그림 2-4). 흥미로운 사실은 'Clade B'의 경우 제주도와 일본의 19개의 염기서열로 구성되었다. 일본과 한반도의 중간이라는 제주도의 지리적인 위치를 감안할 때, *JpL* 담배가루이는 생물지리학적으로 제주도와 깊게 연관되어 있음을 시사하였다.

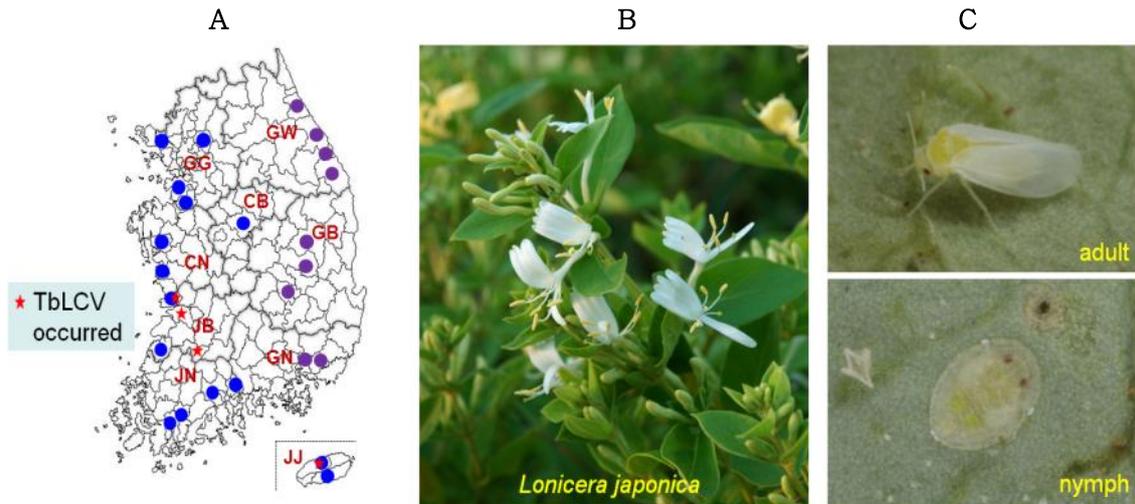


그림 2-1. 가루이류 및 제미니바이러스 조사. A. 조사지역; B, 인동덩굴; C. 담배가루이

표 2-1. *JpL* 담배가루이 유전분석 표본 (2013-2014)

	Region	Host	plant	Collection date	Status	Species
JJ	Seogwipo Cheonjidong	<i>Conyza</i>	<i>sumatrensis</i>	2014-02-05	3rd nymph	JpL
JJ	Seogwipo Cheonjidong	<i>Conyza</i>	<i>sumatrensis</i>	2014-02-05	3rd nymph	JpL
JJ	Seogwipo Cheonjidong	<i>Conyza</i>	<i>sumatrensis</i>	2014-02-05	3rd nymph	JpL
JJ	Seogwipo Cheonjidong	<i>Conyza</i>	<i>sumatrensis</i>	2014-02-05	Adult	JpL
JJ	Jeju Dodu	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-01-23	4th nymph	JpL
JN	Suncheon	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-03-13	Adult	JpL
JN	Suncheon	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-03-13	Adult	JpL
JJ	Jeju Joduri	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-02-25	3rd nymph	JpL
JN	Suncheon	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-03-13	4th nymph	JpL
JJ	Jeju Joduri	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-02-25	3rd nymph	JpL
JN	Suncheon	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-03-13	4th nymph	JpL
JJ	Jeju Joduri	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-02-25	3rd nymph	JpL
JN	Suncheon	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-03-13	4th nymph	JpL
JJ	Jeju Joduri	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-02-25	3rd nymph	JpL
GG	Pyeongtaek	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-04-04	2nd nymph	JpL
JJ	Jeju Dumori	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-02-25	3rd nymph	JpL
JJ	Jeju Dumori	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-02-25	3rd nymph	JpL
JJ	Jeju Josuri	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-02-25	4th nymph	JpL
JB	Iksan	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-04-04	3rd nymph	JpL
JJ	Jeju Napeup	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-02-25	3rd nymph	JpL

JJ	Jeju Napeup	<i>Lonicera japonica</i>	2013-02-25	3rd nymph	JpL
JB	Gochang	<i>Lonicera japonica</i>	2013-03-13	4th nymph	JpL
JJ	Seogwipo	<i>Conyza sumatrensis</i>	2013-02-25	Adult	JpL
JB	Iksan	<i>Lonicera japonica</i>	2013-04-04	3rd nymph	JpL
JJ	Seogwipo Seongmori	<i>Conyza sumatrensis</i>	2013-03-20	Adult	JpL
JJ	Seogwipo Seongmori	<i>Conyza sumatrensis</i>	2013-03-20	4th nymph	JpL
GN	Namhae	<i>Lonicera japonica</i>	2013-04-12	4th nymph	JpL
JB	Gochang	<i>Lonicera japonica</i>	2013-03-13	4th nymph	JpL
JN	Gwangyang	<i>Lonicera japonica</i>	2013-04-17	Adult	JpL
JN	Gangjin	<i>Lonicera japonica</i>	2013-04-17	4th nymph	JpL
JN	Gangjin	<i>Lonicera japonica</i>	2013-04-17	3rd nymph	JpL
JJ	Jeju Yeongpyeong	<i>Lonicera japonica</i>	2013-04-30	Adult	JpL
JJ	Seogwipo Namwon	<i>Lonicera japonica</i>	2013-04-30	Adult	JpL
JJ	Seogwipo Namwon	<i>Erigeron annuus</i>	2013-04-30	Adult	JpL
JB	Gochang	<i>Lonicera japonica</i>	2013-03-13	4th nymph	JpL
JB	Gochang	<i>Lonicera japonica</i>	2013-03-13	4th nymph	JpL
JJ	Seogwipo Seongmori	<i>Lonicera japonica</i>	2013-02-25	4th nymph	JpL
JN	Jangheung	<i>Lonicera japonica</i>	2013-03-13	Adult	JpL
GB	Chilgok	<i>Lonicera japonica</i>	2013-10-07	3rd nymph	JpL
GB	Chilgok	<i>Lonicera japonica</i>	2013-10-07	3rd nymph	JpL
GB	Chilgok	<i>Lonicera japonica</i>	2013-10-07	3rd nymph	JpL
GB	Uiseong	<i>Lonicera japonica</i>	2013-10-07	3rd nymph	JpL
GB	Andong	<i>Lonicera japonica</i>	2013-10-07	2nd nymph	JpL
GB	Andong	<i>Lonicera japonica</i>	2013-10-07	3rd nymph	JpL
GB	Andong	<i>Lonicera japonica</i>	2013-10-07	3rd nymph	JpL
GB	Andong	<i>Lonicera japonica</i>	2013-10-15	3rd nymph	JpL
GW	Donghae	<i>Lonicera japonica</i>	2013-10-15	Adult	JpL
GW	Donghae	<i>Lonicera japonica</i>	2013-10-15	3rd nymph	JpL
GW	Gangneung	<i>Lonicera japonica</i>	2013-10-15	3rd nymph	JpL
GW	Gangneung	<i>Lonicera japonica</i>	2013-10-15	2nd nymph	JpL
GW	Gangneung	<i>Lonicera japonica</i>	2013-10-15	2nd nymph	JpL
GW	Gangneung	<i>Lonicera japonica</i>	2013-10-15	2nd nymph	JpL
GW	Gangneung	<i>Lonicera japonica</i>	2013-10-15	2nd nymph	JpL
GW	Gangneung	<i>Lonicera japonica</i>	2013-10-15	4th nymph	JpL
GW	Gangneung	<i>Lonicera japonica</i>	2013-10-15	3rd nymph	JpL
GW	Gangneung	<i>Lonicera japonica</i>	2013-10-15	3rd nymph	JpL
GW	Gangneung	<i>Lonicera japonica</i>	2013-10-15	4th nymph	JpL
GW	Yangyang	<i>Lonicera japonica</i>	2013-10-15	3rd nymph	JpL

GW	Yangyang	<i>Lonicera japonica</i>		2013-10-15	3rd nymph	JpL
GW	Yangyang	<i>Lonicera japonica</i>		2013-10-15	3rd nymph	JpL
GW	Yangyang	<i>Lonicera japonica</i>		2013-10-15	3rd nymph	JpL
GW	Yangyang	<i>Lonicera japonica</i>		2013-10-15	3rd nymph	JpL
GN	Changwon	<i>Lonicera japonica</i>		2013-05-06	Adult	JpL
GN	Changwon	<i>Lonicera japonica</i>		2013-05-06	Adult	JpL
GN	Changwon	<i>Lonicera japonica</i>		2013-05-06	Adult	JpL
GN	Changwon	<i>Lonicera japonica</i>		2013-05-06	Adult	JpL
JN	Suncheon	<i>Lonicera japonica</i>		2013-07-22	Adult	JpL
JN	Suncheon	<i>Lonicera japonica</i>		2013-07-22	Adult	JpL
JN	Suncheon	<i>Lonicera japonica</i>		2013-07-22	4th nymph	JpL
JN	Suncheon	<i>Lonicera japonica</i>		2013-07-22	4th nymph	JpL
JN	Suncheon	<i>Lonicera japonica</i>		2013-07-22	4th nymph	JpL
JN	Suncheon	<i>Lonicera japonica</i>		2013-07-22	4th nymph	JpL
CN	Cheongyang	<i>Lactuca indica var.laciniata</i>		2013-07-11	4th nymph	JpL
CN	Seosan	<i>Lactuca indica var.laciniata</i>		2013-07-22	Adult	JpL
CN	Seosan	<i>Lactuca indica var.laciniata</i>		2013-07-22	4th nymph	JpL
CN	Seosan	<i>Lactuca indica var.laciniata</i>		2013-07-22	4th nymph	JpL
CN	Seosan	<i>Lactuca indica var.laciniata</i>		2013-07-22	4th nymph	JpL
CN	Hongseong	<i>Lactuca indica var.laciniata</i>		2013-07-22	Adult	JpL
JB	Imsil	<i>Lactuca indica var.laciniata</i>		2013-07-22	Adult	JpL
JB	Imsil	<i>Lactuca indica var.laciniata</i>		2013-07-22	4th nymph	JpL
JB	Namwon	<i>Lactuca indica var.laciniata</i>		2013-07-22	Adult	JpL
JB	Namwon	<i>Lactuca indica var.laciniata</i>		2013-07-22	Adult	JpL
JB	Namwon	<i>Lactuca indica var.laciniata</i>		2013-07-22	Adult	JpL

표 2-2. 인동덩굴 앞에서 발생하는 가루이류 종류(2012-2013)

	Region	Host	plant	Collection date	Status	Species
JJ	Seogwipo Cheonjidong	<i>Conyza</i>	<i>sumatrensis</i>	2014-02-05	3rd nymph	JpL
JJ	Seogwipo Cheonjidong	<i>Conyza</i>	<i>sumatrensis</i>	2014-02-05	3rd nymph	JpL
JJ	Seogwipo Cheonjidong	<i>Conyza</i>	<i>sumatrensis</i>	2014-02-05	3rd nymph	JpL
JJ	Seogwipo Cheonjidong	<i>Conyza</i>	<i>sumatrensis</i>	2014-02-05	Adult	JpL
JJ	Jeju Dodu	<i>Lonicera japonica</i>		2013-01-23	4th nymph	JpL
JN	Suncheon	<i>Lonicera japonica</i>		2013-03-13	Adult	JpL
JN	Suncheon	<i>Lonicera japonica</i>		2013-03-13	Adult	JpL
JJ	Jeju Joduri	<i>Lonicera japonica</i>		2013-02-25	3rd nymph	JpL
JN	Suncheon	<i>Lonicera japonica</i>		2013-03-13	4th nymph	JpL
JJ	Jeju Joduri	<i>Lonicera japonica</i>		2013-02-25	3rd nymph	JpL
JN	Suncheon	<i>Lonicera japonica</i>		2013-03-13	4th nymph	JpL
JJ	Jeju Joduri	<i>Lonicera japonica</i>		2013-02-25	3rd nymph	JpL
JN	Suncheon	<i>Lonicera japonica</i>		2013-03-13	4th nymph	JpL

JJ	Jeju Joduri	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-02-25	3rd nymph	JpL
GG	Pyeongtaek	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-04-04	2nd nymph	JpL
JJ	Jeju Dumori	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-02-25	3rd nymph	JpL
JJ	Jeju Dumori	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-02-25	3rd nymph	JpL
JJ	Jeju Josuri	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-02-25	4th nymph	JpL
JB	Iksan	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-04-04	3rd nymph	JpL
JJ	Jeju Napeup	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-02-25	3rd nymph	JpL
JJ	Jeju Napeup	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-02-25	3rd nymph	JpL
JB	Gochang	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-03-13	4th nymph	JpL
JJ	Seogwipo	<i>Conyza</i>	<i>sumatrensis</i>	2013-02-25	Adult	JpL
JB	Iksan	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-04-04	3rd nymph	JpL
JJ	Seogwipo Seongmori	<i>Conyza</i>	<i>sumatrensis</i>	2013-03-20	Adult	JpL
JJ	Seogwipo Seongmori	<i>Conyza</i>	<i>sumatrensis</i>	2013-03-20	4th nymph	JpL
GN	Namhae	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-04-12	4th nymph	JpL
JB	Gochang	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-03-13	4th nymph	JpL
JN	Gwangyang	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-04-17	Adult	JpL
JN	Gangjin	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-04-17	4th nymph	JpL
JN	Gangjin	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-04-17	3rd nymph	JpL
JJ	Jeju Yeongpyeong	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-04-30	Adult	JpL
JJ	Seogwipo Namwon	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-04-30	Adult	JpL
JJ	Seogwipo Namwon	<i>Erigeron</i>	<i>annuus</i>	2013-04-30	Adult	JpL
JB	Gochang	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-03-13	4th nymph	JpL
JB	Gochang	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-03-13	4th nymph	JpL
JJ	Seogwipo Seongmori	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-02-25	4th nymph	JpL
JN	Jangheung	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-03-13	Adult	JpL
GB	Chilgok	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-10-07	3rd nymph	JpL
GB	Chilgok	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-10-07	3rd nymph	JpL
GB	Chilgok	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-10-07	3rd nymph	JpL
GB	Uiseong	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-10-07	3rd nymph	JpL
GB	Andong	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-10-07	2nd nymph	JpL
GB	Andong	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-10-07	3rd nymph	JpL
GB	Andong	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-10-07	3rd nymph	JpL
GB	Andong	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-10-15	3rd nymph	JpL
GW	Donghae	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-10-15	Adult	JpL
GW	Donghae	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-10-15	3rd nymph	JpL
GW	Gangneung	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-10-15	3rd nymph	JpL
GW	Gangneung	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-10-15	2nd nymph	JpL
GW	Gangneung	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-10-15	2nd nymph	JpL
GW	Gangneung	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-10-15	2nd nymph	JpL
GW	Gangneung	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-10-15	2nd nymph	JpL
GW	Gangneung	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-10-15	4th nymph	JpL
GW	Gangneung	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-10-15	3rd nymph	JpL
GW	Gangneung	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-10-15	3rd nymph	JpL
GW	Gangneung	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-10-15	4th nymph	JpL
GW	Yangyang	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-10-15	3rd nymph	JpL
GW	Yangyang	<i>Lonicera</i>	<i>japonica</i>	2013-10-15	3rd nymph	JpL

GW	Yangyang	<i>Lonicera japonica</i>		2013-10-15	3rd nymph	JpL
GW	Yangyang	<i>Lonicera japonica</i>		2013-10-15	3rd nymph	JpL
GW	Yangyang	<i>Lonicera japonica</i>		2013-10-15	3rd nymph	JpL
GN	Changwon	<i>Lonicera japonica</i>		2013-05-06	Adult	JpL
GN	Changwon	<i>Lonicera japonica</i>		2013-05-06	Adult	JpL
GN	Changwon	<i>Lonicera japonica</i>		2013-05-06	Adult	JpL
GN	Changwon	<i>Lonicera japonica</i>		2013-05-06	Adult	JpL
JN	Suncheon	<i>Lonicera japonica</i>		2013-07-22	Adult	JpL
JN	Suncheon	<i>Lonicera japonica</i>		2013-07-22	Adult	JpL
JN	Suncheon	<i>Lonicera japonica</i>		2013-07-22	4th nymph	JpL
JN	Suncheon	<i>Lonicera japonica</i>		2013-07-22	4th nymph	JpL
JN	Suncheon	<i>Lonicera japonica</i>		2013-07-22	4th nymph	JpL
JN	Suncheon	<i>Lonicera japonica</i>		2013-07-22	4th nymph	JpL
CN	Cheongyang	<i>Lactuca indica var.laciniata</i>		2013-07-11	4th nymph	JpL
CN	Seosan	<i>Lactuca indica var.laciniata</i>		2013-07-22	Adult	JpL
CN	Seosan	<i>Lactuca indica var.laciniata</i>		2013-07-22	4th nymph	JpL
CN	Seosan	<i>Lactuca indica var.laciniata</i>		2013-07-22	4th nymph	JpL
CN	Seosan	<i>Lactuca indica var.laciniata</i>		2013-07-22	4th nymph	JpL
CN	Hongseong	<i>Lactuca indica var.laciniata</i>		2013-07-22	Adult	JpL
JB	Imsil	<i>Lactuca indica var.laciniata</i>		2013-07-22	Adult	JpL
JB	Imsil	<i>Lactuca indica var.laciniata</i>		2013-07-22	4th nymph	JpL
JB	Namwon	<i>Lactuca indica var.laciniata</i>		2013-07-22	Adult	JpL
JB	Namwon	<i>Lactuca indica var.laciniata</i>		2013-07-22	Adult	JpL
JB	Namwon	<i>Lactuca indica var.laciniata</i>		2013-07-22	Adult	JpL

표 2-3. 작물 및 야생식물 앞에서 발생하는 가루이류 종류(2012-2013)

Province	Locality	Sampling site	No. sampling plants	No. of whiteflies on <i>Lonicera japonica</i>						
				<i>JpL</i>		<i>Mediterranean</i>		<i>Bemisia afer</i>		
				Nymph	Adult	Nymph	Adult	Nymph	Adult	
GG	Paju	Geumchon	2	0	0	0	0	0	0	
		Namyangu	Jinjeob	2	0	0	0	0	1	0
			Hwado	2	10	0	0	0	3	0
CB	Goesan	Jangyeon	4	3	0	0	0	0	0	
JB	Iksan	Ungpo A	6	0	0	0	0	1	0	
		Ungpo B	4	0	0	0	0	0	0	
		Ungpo C	5	11	0	0	0	1	0	
		Songcheon A	5	0	0	0	0	3	2	
		Songcheon B	5	0	0	0	0	1	0	
		Songcheon C	3	0	0	0	0	0	0	
		Deabongam	1	0	0	0	0	0	0	
Jeju (N)	Jeju	Yeondong	4	17	3	0	0	0	0	
		Ara	5	0	0	0	0	0	0	
Jeju (S)	Seogwipo	Sinhyo	3	1	0	0	0	0	0	
		Beophwan	4	2	0	0	0	0	0	
		Gangjeong	1	0	0	1	0	0	0	
		Dosun	2	0	0	0	0	0	0	
		Wimi	4	8	0	0	0	0	0	
		Gamsan	2	1	1	0	0	0	0	

표 2-4. 인동덩굴 앞에서 Geminivirus 보독 검정

Province	Locality	Wild plants (Korean)	No. sampling plants	No. of whiteflies on host plants					
				<i>JpL</i>		<i>Mediterranean</i>		<i>B. afer</i>	
				Larva	adult	Larva	Adult	Larva	Adult
GG	Ansan	왕고들빼기	1	1	0	0	0	0	0
Jeju (N)	Jeju	들깨	3	1	2	0	1	0	0
		토마토	2	0	0	0	2	0	0
		개망초	2	1	0	1	0	0	0
		모시풀	3	0	0	0	0	0	0
Jeju (S)	Seogwipo	산딸기	3	0	0	0	0	0	0
		모시풀	2	0	0	0	0	0	0
		계요등	3	0	0	0	0	0	0
		망초	1	0	0	0	0	0	0
		왕고들빼기	3	0	0	3	0	0	0

표 2-5. 인동덩굴 앞에서 채집한 *JpL* 담배가루이의 Geminivirus 보독 검정

Province	City or county	Sampling date	No. samples	TbLCV		TYLCV		HYWV	
				Infected	Infection (%)	Infected	Infection (%)	Infected	Infection (%)
GG	Paju	2012-09-27	2	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	Namyangju		4	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	Hwaseong		3	1	33.3	0	0.0	0	0.0
GW	Pyeongtaek	2013-04-04	5	1	20.0	0	0.0	0	0.0
	Yangyang	2013-10-15	2	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	Gangneung	2013-10-15	4	2	50.0	0	0.0	0	0.0
	Samcheok	2013-10-15	3	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	Donghae	2013-10-15	3	0	0.0	0	0.0	0	0.0
CB	Goesan	2012-10-19	4	1	25.0	0	0.0	0	0.0
CN	Hongseong	2013-04-04	4	1	25.0	0	0.0	0	0.0
	Boryeong		3	1	33.3	0	0.0	0	0.0
GB	Andong	2013-10-07	2	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	Cheongsong	2013-10-07	4	2	50.0	0	0.0	0	0.0
	Uiseong	2013-10-07	2	1	50.0	0	0.0	0	0.0
	Chilgok	2013-10-07	5	4	80.0	0	0.0	0	0.0
GN	Changwon	2013-05-08	3	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	Gimhae	2013-05-09	4	0	0.0	0	0.0	0	0.0
JB	Iksan	2012-03-07	22	2	9.1	0	0.0	0	0.0
		2012-06-04	28	9	32.1	0	0.0	0	0.0
	Gochang	2013-03-13	7	1	14.3	0	0.0	0	0.0
JN	Jangheung	2013-03-13	5	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	Suncheon		3	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	Gwangyang		3	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	Gangjin	2013-04-17	4	1	25.0	0	0.0	0	0.0
JJ (N)	Jeju	2012-10-24	15	9	60.0	0	0.0	0	0.0
		2013-01-23	32	20	62.5	0	0.0	0	0.0
JJ (S)	Seogwipo	2012-10-25	16	8	50.0	0	0.0	0	0.0
		2013-01-22	5	0	0.0	0	0.0	0	0.0

Province	Region	Tested	TbLCV		TYLCV		HYW	
			Infected	Infection(%)	Infected	Infection(%)	Infected	Infection(%)
GG	Namyangju	10	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	Pyeongta ^다	3	2	66.7	0	0.0	0	0.0
GW	Gangneung	11	9	81.8	0	0.0	0	0.0
	Donghae	2	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	Yangyang	6	0	0.0	0	0.0	0	0.0
CB	Goesan	2	2	100.0	0	0.0	0	0.0
	Hongseong	1	1	100.0	0	0.0	0	0.0
JB	Iksan	19	6	31.6	0	0.0	0	0.0
	Gochang	4	0	0.0	0	0.0	0	0.0
JN	Jangheung	2	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	Suncheon	8	7	87.5	0	0.0	0	0.0
	Gwangyang	7	3	42.9	0	0.0	0	0.0
	Gangjin	3	3	100.0	0	0.0	0	0.0
GB	Andong	4	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	Chilgok	4	4	100.0	0	0.0	0	0.0
	Uiseong	1	1	100.0	0	0.0	0	0.0
GN	Namhae	4	4	100.0	0	0.0	0	0.0
JJ	Jeju	43	30	69.8	0	0.0	0	0.0
	Seogwipo	26	12	46.2	0	0.0	0	0.0

표 2-6. JpL 담배가루이 haplotypes의 생물지리학적 분포

Population name	Group	Number of samples per population	Haplotypes							Haplotype diversity	Nucleotide diversity	Average number of nucleotide differences	
			Hap-1	Hap-2	Hap-3	Hap-4	Hap-5	Hap-6	Hap-8				Hap-10
CN	Korea	6		5	1						0.333	0.00079	0.333
GG	Korea	7		7							0	0	0
GW	Korea	16		16							0	0	0
JN	Korea	15		15							0	0	0
JB	Korea	13		11		1	1				0.295	0.00073	0.308
JJ	Korea	29	1	15				4	1	8	0.658	0.00252	1.064
GN	Korea	5		5							0	0	0
GB	Korea	8		8							0	0	0
Frequency of distribution			0.010	0.828	0.010	0.010	0.010	0.040	0.010	0.081			
Average number of nucleotide differences										0.482			

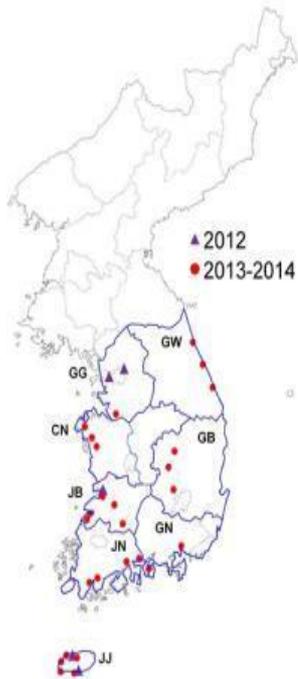


그림 2-2. 우리나라에서 *JpL* 담배가루이의 분포(2009-2014)

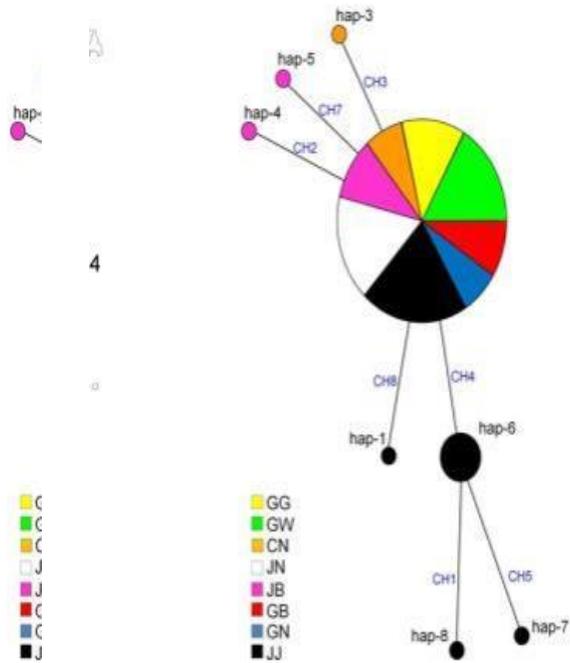


그림 2-3. 우리나라에서 *JpL* haplotypes의 MJ 네트워크

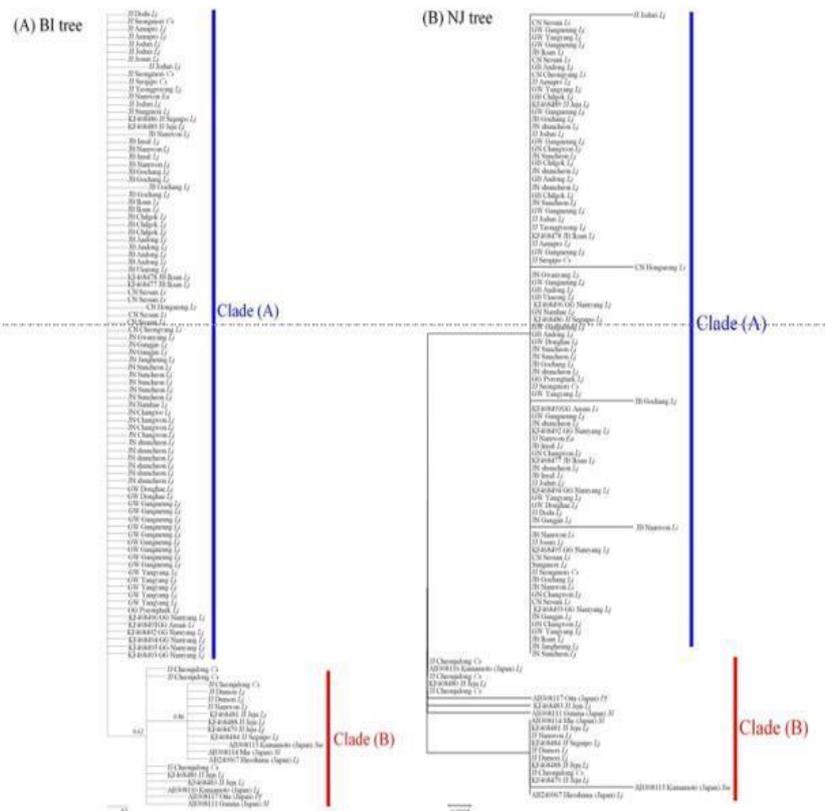


그림 2-4. 106개 *COI* 염기서열을 이용한 *JpL* 담배가루이의 유전적 계통도 (A, Bayesian 분석; B, Neighbor-joining 분석)

3. 국내 Geminivirus 매개 가루이류의 유전적 변이 분석

가. 개요

- (1) 현재까지 국내에는 담배가루이 2종(*Middle East-Asia Minor 1*(*B* biotype; *MEAM1*)과 *Mediterranean*(*Q* biotype; *MED*))이 보고되었다. *MEAM1*는 미토콘드리아 유전자 *large subunit ribosomal RNA(lrRNA)*와 *small subunit ribosomal RNA(srRNA)*를 근거로 2000년에 최초로 보고되었고, *MED*는 *lrRNA*를 근거로 2005년에 최초로 보고되었다.
- (2) 담배가루이 species complex에 속하는 종(species)들을 구별할 수 있는 외부형 태형질이 없기 때문에 미토콘드리아 유전자 *COI*을 이용하여 3.5%, 나아가 4.0%의 중간 유전적 경계(species genetic boundary)를 기준으로 종을 구분하고 있다.
- (3) 우리나라에서 최초로 야생기주인 인동덩굴에서 발견된 담배가루이(*JpL*)와 함께 *MED* 담배가루이 등 시설 및 노지에서 확보된 가루이류 시료의 계통분석을 통해 국내 담배가루이류의 생물학적 실체를 밝히는 데 중점을 두고 추진하였다.

나. 재료 및 방법

- (1) 담배가루이 시료는 2009년 12월부터 2013년 7월까지 경기, 강원, 충청남북, 전남북, 경남북, 제주에서 시설 및 노지 재배작물, 농경지 주변 야생식물 등에서 채집하였다(표 3-1). 총 276개의 담배가루이 성충, 약충, 알들을 채집하였고, 각 개체들은 99%의 에탄올에 보관하였다.
- (2) 가루이류의 유전적 분석은 개체별로 Genomic DNA는 추출하였고, mtDNA *COI* 유전자의 염기서열을 비교하였다. 담배가루이 샘플 중 동정을 위하여, 새롭게 분석된 47개 *COI* sequences와 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)에 보고된 담배가루이 212개 *COI* sequences, *B. atriplex*, *B. subdecipiens*, *B. afer*의 4개 *COI* sequences를 사용하여 Neighbor-joining(NJ) tree를 분석하였다. nucleotide sequences의 alignments는 CLUSTALX를 이용하였다. Neighbor-joining(NJ) 분석은 MEGA 5.0(Tamura et al. 2011)를 이용하였고, 종내 유전적 변이 계산은 MEGA 5.0의 K2P distance model을 사용하였다.

다. 결과 및 고찰

- (1) NJ tree에서 47개 *COI* sequences는 3종의 담배가루이, 즉 *MED*, *MEAM1*, *JpL*로 구분되었다(그림 3-1). 47개 *COI* sequences 가운데 29개 *COI* sequences는 *MED*이었고, 17개 *COI* sequences는 *JpL*로서 0.0%~0.2%의 종내 유전변이를 보였다. 나머지 1개 *COI* sequence는 *MEAM1*으로 확인되었다.
- (2) *MED*에 보고된 33개 haplotypes 중에 한국에서 채집된 29개 *COI* sequences는 크로아티아, 타이완, 중국(Dinsdale et al. 2010), 스페인, 미국(Shatters et al. 2009), 그리스(Tsagkarakou et al. 2007), 일본(Ueda 2006; Boykin et al. 2007), 우간다(Sseruwagi et al. 2005), 북아메리카(Mckenzie et al. 2012) 지역의 *COI* sequences와 일치하는 것으로 확인되었다. *JpL*에 보고된 5개 haplotypes 중에

17 *COI* sequences는 일본의 두 타입 (AB308114, AB308116) (Ueda *et al.* 2008)과 일치하였으며, *MEAM1*에 보고된 28 haplotypes 중에 한국의 *COI* sequence는 스페인, 호주, 중국, 콜롬비아, 도미니카공화국, 프랑스, 과테말라, 인도, 이탈리아, 사우디아라비아(Dinsdale *et al.* 2010), 이스라엘(Hsieh *et al.* 2006), 아르헨티나 (Viscarret *et al.* 2003)와 동일하였다.

(3) 담배가루이의 국내 분포상(그림 3-2A)은 *MED*는 경기(GG), 전남(JN), 충북(CB), 충남(CN), 경남(GN), 경북(GB), 제주(JJ) 지역에 고루 분포하고 있으며, *JpL*은 경기, 제주, 전남에 분포하였다. 반면, *MEAM1*는 경기도 지역에서만 채집되었다. 본 연구 결과를 기존의 담배가루이 연구 논문들(Lee *et al.* 2000; Lee *et al.* 2005; Park *et al.* 2010; Lee *et al.* 2012)과 비교하여 보면, *MEAM1*와 *MED*의 분포에 상당한 변화가 있었음을 확인할 수 있다(그림 3-2B와 그림 3-2C). 즉 후발 침입해충인 *MED*가 선발 침입해충인 *MEAM1*를 대체하여 우점해가는 것으로 나타났다. 선발 침입 담배가루이에 대하여 후발로 침입한 담배가루이 종의 우점 교체현상은 중국과 호주에서 이미 보고된 적이 있다.

(4) Lee *et al.* (2010)은 한국산 *MED*는 이란(AF247525)과 나이지리아(AF247526)와 같은 *IrRNA* sequence를 가지며, 한국산 *MED*는 아프리카에서 한국으로 유입하였다고 보고하였다. 하지만 이들 데이터들은 논문으로 출판된 데이터들이 아니기 때문에 이와 같은 결론은 타당성이 매우 떨어진다. 본 연구에서 한국산 *MED*의 29개 *COI* sequences는 여러 나라에서 보고된 *COI* sequences와 동일함을 확인하였고, 이는 한국산 *MED*의 원산지를 아직 속단할 수 없다는 것을 의미한다(Lee *et al.*, 2014, 2016).

표 3-1. Geminivirus 매개 담배가루이 유전분석 표본(2009-2013)

Region	Host plant	Collection date	Status	No. of collection	Species
JJ, Jeju-si	<i>Lamium amplexicaule</i>	2009-12-08	Adult	4	MEDa
JJ, Jeju-si	<i>Conyza sumatrensis</i>	2009-12-08	Adult	2	MED
JJ, Seogwipo-si	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2009-12-08	Adult	15	MED
JJ, Seogwipo-si	<i>Lamium amplexicaule</i>	2009-12-08	Adult	5	MED
JJ, Seogwipo-si	<i>Conyza sumatrensis</i>	2010-01-27	3rd nymph	17	MED
JJ, Seogwipo-si	<i>Malva pusilla</i>	2009-12-08	Adult	1	MED
JJ, Seogwipo-si	<i>Lamium amplexicaule</i>	2009-12-08	Adult	5	MED
JJ, Jeju-si	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2009-12-08	Adult	4	MED
JJ, Seogwipo-si	<i>Leonurus sibiricus</i>	2009-12-08	Adult	4	MED
JJ, Jeju-si	<i>Conyza sumatrensis</i>	2009-12-10	Adult	5	MED
JJ, Jeju-si	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2009-12-08	Adult	5	MED
JJ, Jeju-si	<i>Conyza sumatrensis</i>	2009-12-08	Adult	4	MED
JJ, Seogwipo-si	<i>Veronica persica</i>	2009-12-08	Adult	1	MED
JJ, Seogwipo-si	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2009-12-08	Adult	5	MED
JJ, Jeju-si	<i>Malva pusilla</i>	2009-12-08	Adult	1	MED
JJ, Jeju-si	<i>Lactuca indica var. laciniata</i>	2009-12-08	Adult	2	MED
GN, Hapcheon-gun	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2010-06-29	Adult	8	MED
GN, Uiryeong-gun	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2010-06-30	Adult	8	MED
GB, Gyeongju-si	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2010-07-01	Adult	8	MED

GB, Andong-si	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2010-07-02	Adult	12	MED
GN, Damyang-gun	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2010-10-01	Adult	12	MED
CB, Okcheon-gun	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2010-10-25	Adult	6	MED
JB, Iksan	<i>Lonicera japonica</i>	2012-06-04	4th nymph	1	JpL
JB, Iksan	<i>Lonicera japonica</i>	2012-06-04	nymph	11	JpL
JJ, Jeju-si	<i>Lonicera japonica</i>	2012-10-24	Adult	1	JpL
JJ, Jeju-si	<i>Lonicera japonica</i>	2012-10-24	Adult	1	JpL
JJ, Jeju-si	<i>Lonicera japonica</i>	2012-10-24	3rd nymph	4	JpL
JJ, Jeju-si	<i>Perilla frutescens var. japonica</i>	2012-10-24	Adult	2	MED
JJ, Jeju-si	<i>Lonicera japonica</i>	2012-10-25	3rd nymph	2	JpL
JJ, Jeju-si	<i>Lonicera japonica</i>	2012-10-25	3rd nymph	1	JpL
JJ, Seogwipo-si	<i>Lactuca indica var. laciniata</i>	2012-10-25	3rd nymph	1	MED
JJ, Seogwipo-si	<i>Lonicera japonica</i>	2012-10-25	4th nymph	1	JpL
JJ, Seogwipo-si	<i>Lonicera japonica</i>	2012-10-25	4th nymph	1	MED
JJ, Jeju-si	<i>Lonicera japonica</i>	2012-10-24	Egg	3	JpL
JJ, Jeju-si	<i>Lonicera japonica</i>	2012-10-24	Egg	3	JpL
CB, Goesan-gun	<i>Lonicera japonica</i>	2012-10-19	4th nymph	1	JpL
GG, Ansan-si	<i>Lactuca indica var. laciniata</i>	2012-09-26	4th nymph	2	JpL
GG, Namyangju-si	<i>Lonicera japonica</i>	2012-09-27	4th nymph	6	JpL
GG, Namyangju-si	<i>Lonicera japonica</i>	2012-09-27	3rd nymph	2	JpL
GG, Namyangju-si	<i>Lonicera japonica</i>	2012-09-27	1st nymph	2	JpL
GG, Namyangju-si	<i>Lonicera japonica</i>	2012-09-27	4th nymph	2	JpL
GG, Namyangju-si	<i>Lonicera japonica</i>	2012-09-27	2nd nymph	8	JpL
GG, Goyang-si,	<i>Euphorbia milii var. splendens</i>	2013-07-04	Adult	23	MEAM1b
CN, Buyeo-gun	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2013-07-11	Adult	15	MED
CN, Cheongyang-gun	<i>Duranta erecta</i>	2013-07-11	Adult	30	MED
GG, Yongin-si	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2013-07-18	Adult	12	MED
GG, Suwon-si	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2013-07-19	Adult	7	MED

* a, *Mediterranean* (Q biotype) ; b, *Middle East-Asia Minor I* (B biotype).

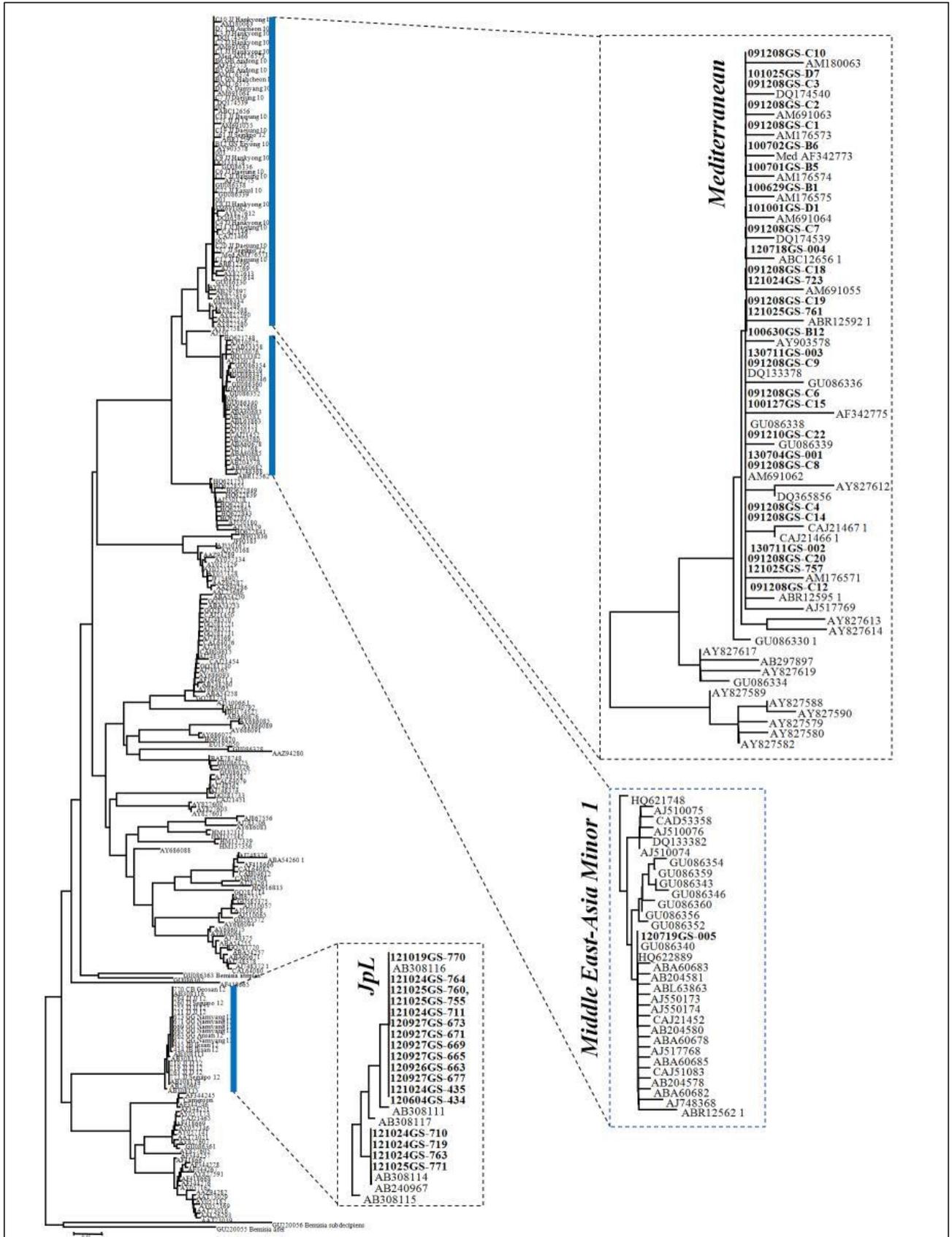


그림 3-1. 259개 COI 염기서열을 이용한 Geminivirus 매개 담배가루이의 유전적 계통도 (Neighbor-joining 분석)

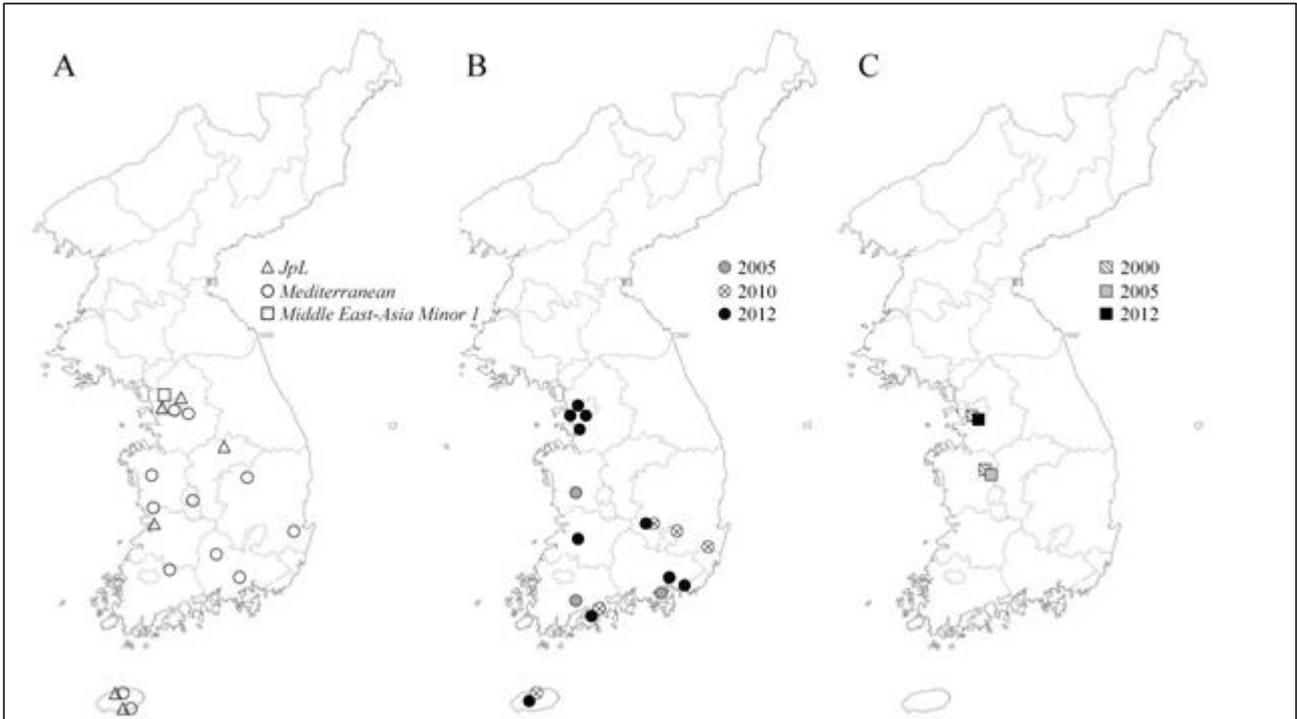


그림 3-2. Geminivirus 매개 담배가루이 국내 분포도(A, *Mediterranean*, *Middle East-Asia Minor 1*, and *JpL* in 2009-2013; B, *Mediterranean*; C, *Middle East-Asia Minor 1*)

4. 전세계 담배가루이 종복합군의 유전적 변이 분석

가. 개요

- (1) Dinsdale et al. (2010)은 *COI* 유전자의 유전적 변이 3.5%를 종경계 한계 (threshold of species boundary)로 설정하고 담배가루이를 24개 종들로 구성된 종복합군으로 정의하였다.
- (2) Lee et al. (2013)는 1,059개 *COI* 염기서열을 바탕으로 유전적 변이 4.0%를 새로운 종경계 한계로 제안하였으며, 담배가루이 종복합군이 31개의 종들로 구성되어 있음을 밝힌 바 있다.
- (3) 한국, 일본의 야생기주인 인동덩굴에서 발견된 담배가루이(*JpL*)와 함께 시설 및 노지에서 발견된 담배가루이류의 계통분석을 통해 국내 담배가루이류의 생물학적 실체를 밝히는 데 중점을 두고 추진하였다.

나. 재료 및 방법

- (1) 2016년 2월까지 GenBank에 보고된 담배가루이 550개 *COI* 염기서열과 2013년-2014년까지 국내에서 채집된 개체로부터 새롭게 분석된 83개 *COI* 염기서열을 통합하여 분석하였다. 독립된 유전적 계통 관계를 뚜렷이 보여주기 위하여 각 그룹 당 *COI* 염기서열을 10개 미만으로 제한하여 총 217개 염기서열을 선택하였다. 아웃 그룹으로 5개 그룹(*Bemisia atriplex*, *Bemisia subdecipiens*, *Bemisia afer*, *Aleurocanthus camelliae*, *Aleurodicus dispersus*)을 이용하였다.
- (2) Nucleotide 염기서열의 정리는 CLUSTALX를 이용하여 분석하였다(Thompson et al., 1997). 계통관계는 HKY85 model을 기반으로 한 maximum likelihood 방법

을 이용한 PhyML 3.0(Guindon et al., 2010)를 이용하여 분석하였다.

다. 결과 및 고찰

- (1) 담배가루이 217개 COI 염기서열과 가루이과 5종의 COI 염기서열(아웃 그룹)을 기반으로 분석된 계통수는 담배가루이가 43개 그룹으로 나뉘었다(그림 B-4-1).
- (2) 이 가운데 42종(*Africa*, *Asia I*, *Asia I-India*, *Asia II 1*, *Asia II 2*, *Asia II 3*, *Asia II 4*, *Asia II 5*, *Asia II 6*, *Asia II 7*, *Asia II 8*, *Asia II 9*, *Asia II 10*, *Asia II 11*, *Asia II 12*, *Asia III*, *Asia IV*, *Australia*, *Australia/Indonesia*, *China 1*, *China 2*, *China 3*, *China 4*, *East Africa 1*, *Indian Ocean*, *Italy*, *Italy-Ru*, *Japan 1*, *JpL*, *Mediterranean*, *Middle East Asia Minor 1*, *Middle East Asia Minor 2*, *Morocco*, *New world*, *New world 2*, *Pakistan*, *Sub Saharan Africa 1*, *Sub Saharan Africa 2*, *Sub Saharan Africa 3*, *Sub Saharan Africa 4*, *Sub Saharan Africa 5*, *Uganda*)은 이미 다른 연구에서 보고된 종이였으며, 또한 1종(*Java*)은 아직 보고된 적이 없는 잠재적인 신종이었다.
- (3) 담배가루이 종복합군의 종내 유전적 변이는 0.2%-3.9%의 범위를 보였다(그림 B-4-2). 33개 종들 중에서 *Sub Saharan Africa 5*는 가장 낮은 평균 종내 유전적 변이인 0.2%를 보인 반면, *Australia*는 가장 높은 평균 종내 유전적 변이인 3.10%를 보였다. 5종(*New world 2* (평균 2.2%), *Asia II 10* (평균 2.27%), *Asia II 6* (평균 2.38%), *New world* (평균 2.58%), *Australia* (평균 3.1%))을 제외한 대부분 종들은 2.0%보다 낮은 평균 종내 유전적 변이들을 보였다.

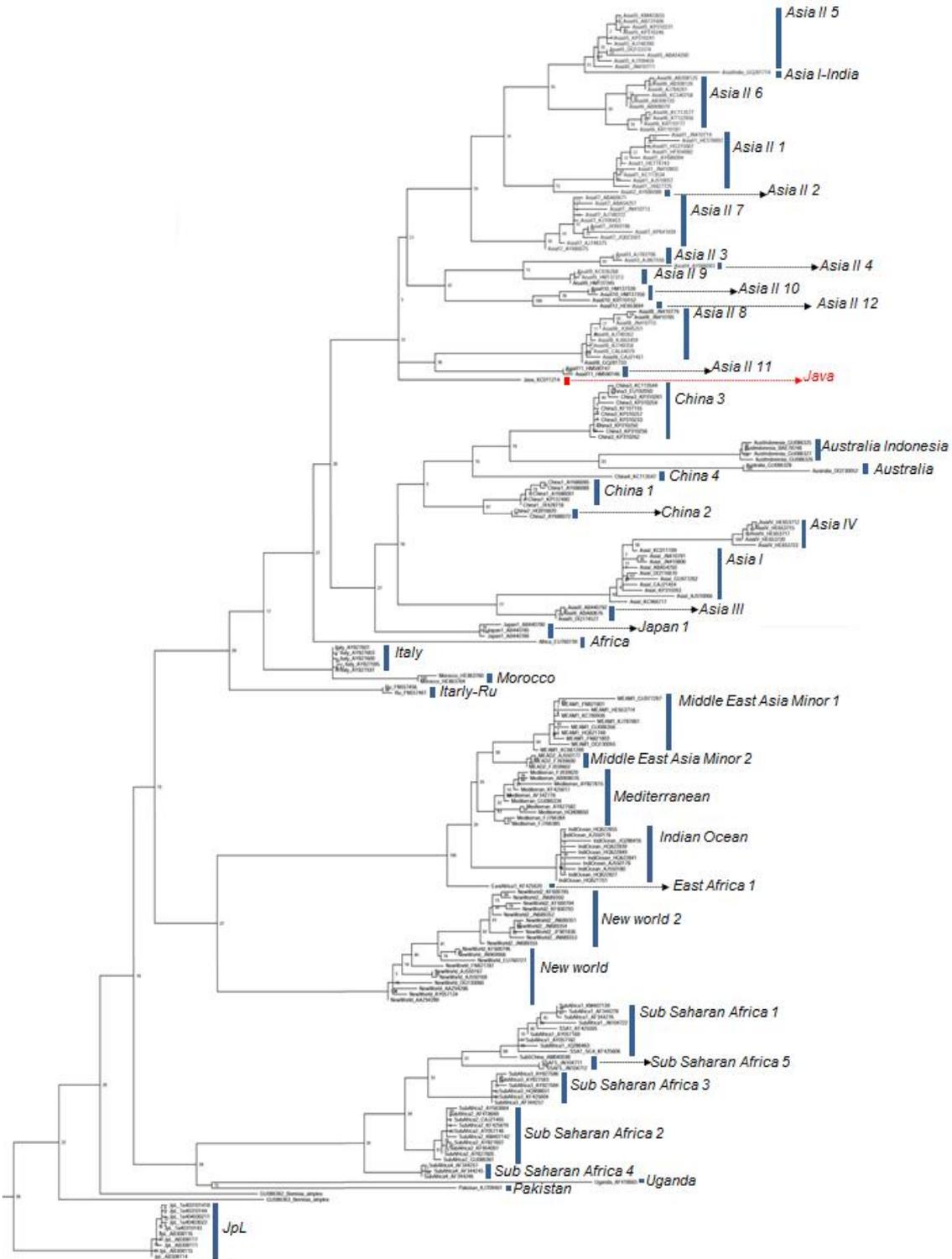


그림 4-1. 217개 COI 염기서열을 이용한 전세계 담배가루이의 유전적 계통도(Maximum likelihood 분석)

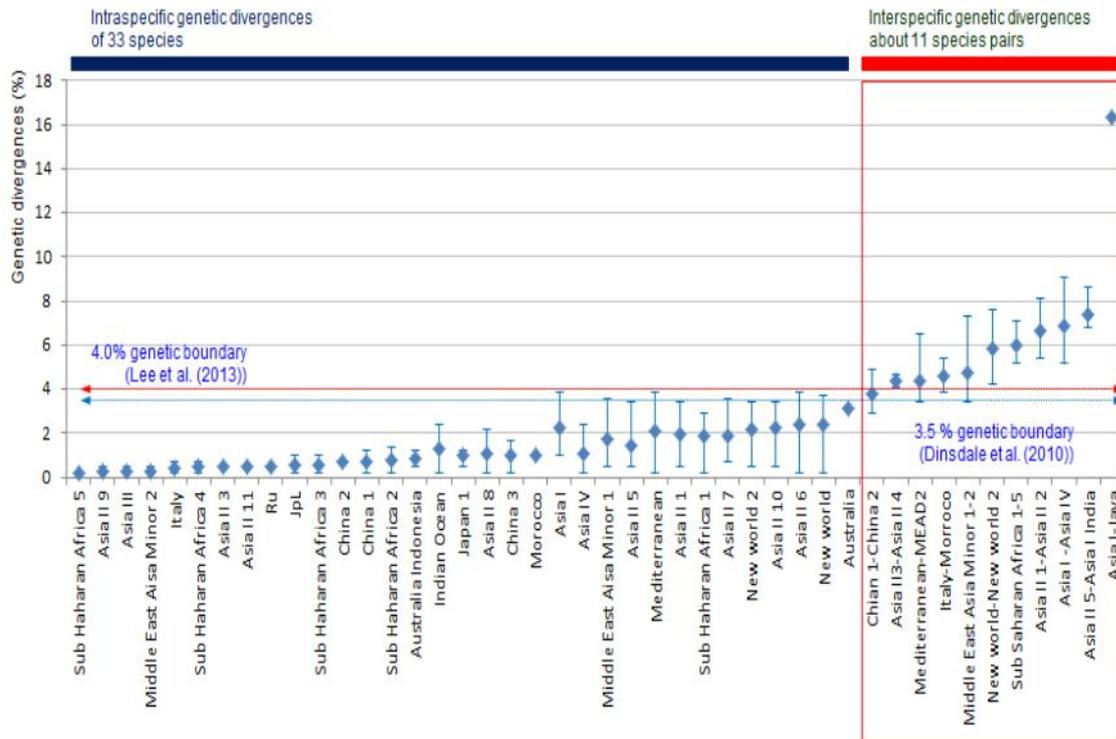


그림 4-2. 전세계 담배가루이의 종내 및 종간 유전변이

4. 시설에서 Geminivirus를 매개하는 담배가루이류의 약제저항성 검정

가. 개요

- (1) 현재까지 국내의 시설재배포장에서 Geminivirus를 매개하는 담배가루이는 2종, 즉 *Mediterranean*(Q biotype; *MED*)과 *Middle East-Asia Minor 1*(B biotype; *MEAMI*)이 보고되었다.
- (2) 식물바이러스 관련 가루이류의 약제저항성 검정검정을 위해 토마토, 참외, 파프리카, 꽃기린 등 4종의 시설재배 작물에 발생하는 담배가루이를 채집하고 실내에서 증식하여 시험에 이용하였다(표 5-1).

나. 재료 및 방법

- (1) 작물-담배가루이 조합은 토마토, 참외, 파프리카는 *MED* 담배가루이, 꽃기린은 *MEAMI* 담배가루이였다. 약제는 가루이류의 방제용 약제로서 유기인계, 네오니코티노이드계 등 계통별로 저항성 평가에 적합한 농약을 선정하였다(표 5-2).
- (2) 담배가루이 생물검정에는 엽침지법을 이용하였다. 39mm의 직경으로 자른 오이 잎을 각 약액에 40초간 침지한 후 1시간 동안 후드 안에서 건조시켰다. 페트리디쉬에(50 × 12mm)에 필터페이퍼 한 장을 깔고 건조시킨 오이 잎을 넣고, 20마리의 담배가루이 성충을 방사하고 24시간 후에 사충수를 조사하였다.

다. 결과 및 고찰

- (1) *MED* 담배가루이에 대해서 경북 성주, 전남 장흥, 제주지역 모두에서 합성피레스로이드계인 에토펜프록스만이 추천농도(RC, recommended concentration)에서 65-85%의 살충 활성을 보였고, 추천 2배 농도 이상에서는 100%의 살충 활성을 나

타내었다(표 5-3, 4, 5). 이미다클로프리드 등 4종의 다른 살충제는 추천 4배의 농도에서도 대부분 50% 미만의 낮은 살충 활성을 나타내었다. MEAMI 담배가루이도 MED와 비슷한 경향이었으며(표 5-6), 합성피레스로이드계인 에토펜프록스가 추천농도에서 100%의 살충 활성을 보였고, 디노테푸란, 이미다클로프리드, 티아메톡삼이 추천 4배 농도에서 50% 정도의 살충 활성을 보였다.

(2) 이상의 결과로부터 국내에 유입된 담배가루이는 두 종 모두 높은 약제저항성을 갖는 것으로 보이며, 차후 보다 많은 지역에 대한 저항성 검정을 통해 지역별 저항성 패턴을 추론하고 방제에 효과적인 약제 선택이 가능할 것으로 생각된다.

표 5-1. 약제저항성 검정을 위해 누대사육한 담배가루이 계통

담배가루이	채집 장소	작물	채집 날짜
MED (Mediterranean)	경북 성주군 성주읍	참외	2013-05-06
	전남 장흥군 관산읍	방울토마토	2013-04-17
	제주 제주시 애월읍	파프리카	2013-04-30
MEAMI (Middle East-Asia Minor I)	경기 고양 일산서구	꽃기린	2013-07-04

표 5-2. 담배가루이 약제저항성 검정 처리내역

	품목명	유효성분	계열	제제
1	디노테푸란	dinotefuran	멜라크니오이계	수화제
2	에토펜프록스	etofenprox 20%	합성피레스로이드계	유제
3	이미다클로프리드	imidacloprid 8%	클로로니코티닐계	액상수화제
4	티아메톡삼	thiamethoxam 10%	치아니코티닐계	입상수화제
5	플로니카미드	flonicamid 10%	니아신계	입상수화제

표 5-3. MED 담배가루이 성주계통의 살충제 감수성

	Insecticide	Mortality (%±SD)		
		RC	RCx2	RCx4
1	Dinotefuran	0	10.1±4.72	13.3±7.3
2	Etofenprox 20%	86.6±7.49	100	100
3	Imidacloprid 8%	0	0	13.9±5.33
4	Thiamethoxam 10%	0	6.3±6.69	49.9±2.78
5	Flonicamid 10%	0	14.3±7.92	46.1±9.10

표 5-4. MED 담배가루이 장흥계통의 살충제 감수성

	Insecticide	Mortality (%±SD)		
		RC	RCx2	RCx4
1	Dinotefuran	1.7±1.7	22.7±2.82	18.0±6.72
2	Etofenprox 20%	65.0±13.2	100	100
3	Imidacloprid 8%	0	7.5±2.18	21.9±6.59
4	Thiamethoxam 10%	0	5.5±3.2	8.8±3.10
5	Flonicamid 10%	1.7±1.7	0	7.7±6.72

표 5-5. MED 담배가루이 애월계통의 살충제 감수성

	Insecticide	Mortality (%±SD)		
		RC	RCx2	RCx4
1	Dinotefuran	0	32.2±2.55	69.6±4.35
2	Etofenprox 20%	70.0±5.00	100	100
3	Imidacloprid 8%	0	0	26.8±4.18
4	Thiamethoxam 10%	0	0	13.2±7.43
5	Flonicamid 10%	0	15.6±4.44	8.3±2.88

표 5-6. MEAM1 담배가루이 고양계통의 살충제 감수성

	Insecticide	Mortality (%±SD)		
		RC	RCx2	RCx4
1	Dinotefuran	31.7±2.88	41.7±2.88	67.6±4.67
2	Etofenprox 20%	100	100	100
3	Imidacloprid 8%	1.5±1.50	13.1±2.70	51.6±4.95
4	Thiamethoxam 10%	0	3.2±3.20	45.0±5.00
5	Flonicamid 10%	0	1.9±1.90	9.8±0.27

3장. 제2협동과제 (농촌진흥청)

1절. 가루이류 매개 바이러스의 발생현황

연구과제 수행기간 동안 발생이 확인된 국내 가루이류 매개 바이러스는 베고모바이러스 (Begomovirus) 속에 속하는 DNA 바이러스인 고구마잎말림바이러스(*Sweet potato leaf curl virus*, SPLCV), 담배잎말림바이러스 (*Tobacco leaf curl virus*, TbLCV), 인동 노란줄무늬바이러스 (*Honeysuckle yellow vein virus*, HYVV), 등대풀잎말림바이러스 (*Euphorbia leaf curl virus*, EuLCV)와 파파야잎말림바이러스 (*Papaya leaf curl virus*, PaLCuV) 및 크리니바이러스 (Crinivirus) 속에 속하는 RNA 바이러스인 토마토쇠록바이러스(*Tomato chlorosis virus*, ToCV) 등이 있으며 그 발생 지역 현황은 그림 1-1에 표기된 바와 같으며, 각 바이러스의 병징은 1-2에 정리한 바와 같다.

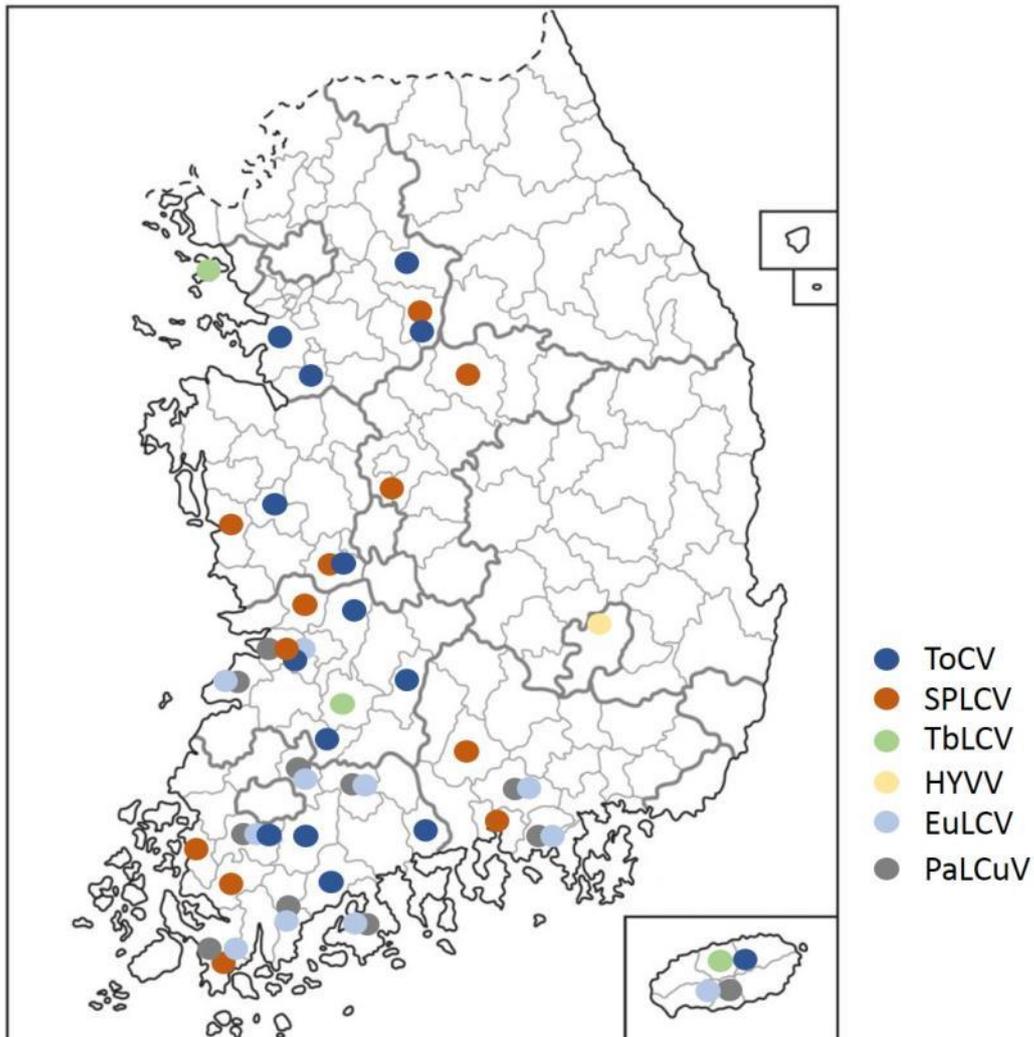


그림 1-1. 가루이류 매개 바이러스 발생 현황 (2011~2016)



<패션프루트 발생 EuLCV 병징>



<토마토 TbLCV 병징>



<고구마 발생 SPLCV 병징>



<토마토 ToCV 병징>



<파파야 발생 PaLCuV 병징>

그림 1-2. 가루이류 매개 바이러스 중별 기주별 병징

또한 토마토황화잎말림바이러스 (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV)는 2008년에 처음 발생이 보고된 후에 지속적인 확산을 거듭하였으며 계속되는 모니터링을 통해 추가로 확인된 발생 지역의 현황은 표1-1과 그림 1-3과 같다.

표 1-1. 토마토황화잎말림바이러스 (TYLCV) 신규 발생연도 및 지역

Year	Province	Area occurred
2011 (9)	Gyeongsangbukdo(5)	Andong, Chilgog, Gimcheon, Pohang, Gumi
	Jeollanamdo(2)	Naju, Jangseong
	Jeollabukdo(1)	Namwon
	Ganwondo(1)	Chuncheon
2012 (5)	Jeollanamdo(1)	Hwasun
	Chungcheongbukdo(1)	Cheongwon(Oksan,Ochang)
	Gyeonggido(3)	Seongnam, Pyeongtaek, Ganghwa
2013 (3)	Jeollanamdo(1)	Hampyeong
	Chungcheongnamdo(1)	Boryeong
	Gyeonggido(1)	Yeoju
2014 (1)	Gyeongsangbukdo(1)	Yeongyang

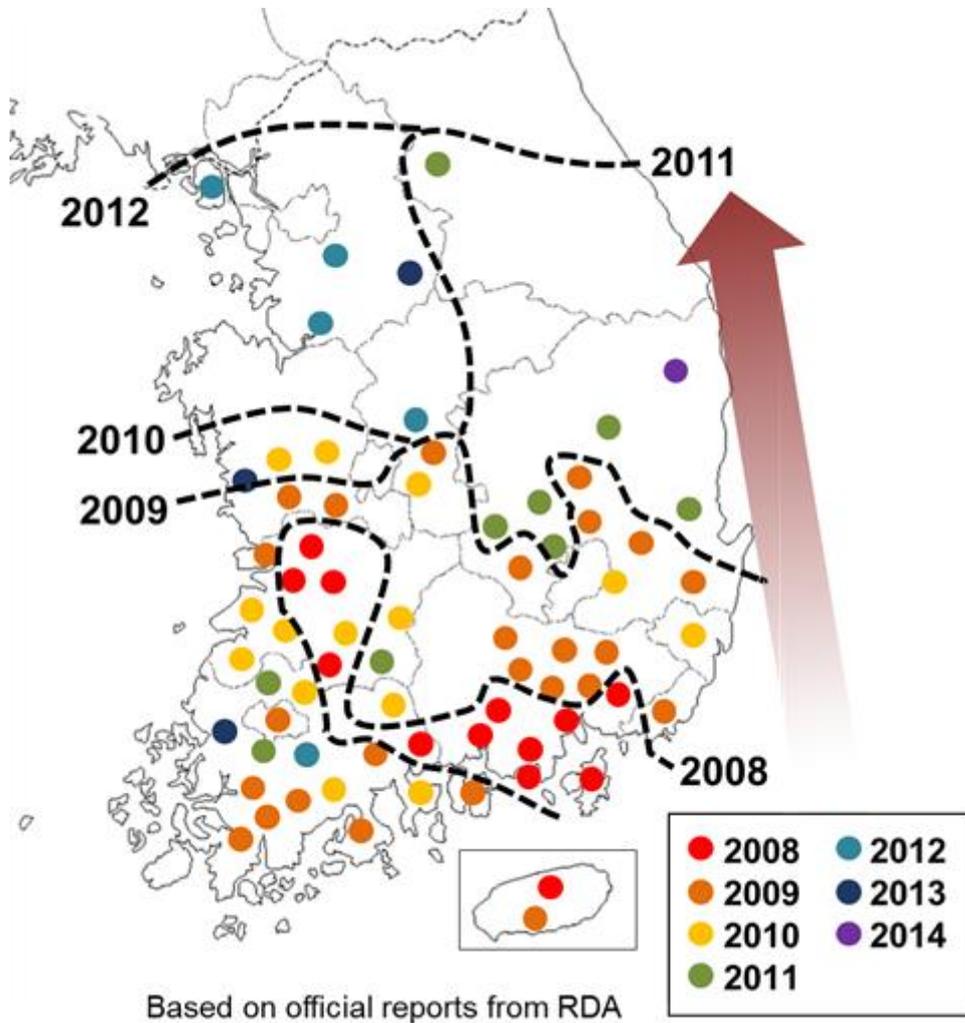


그림 1-3. 토마토황화잎말림바이러스 (TYLCV) 발생 및 확산 양상

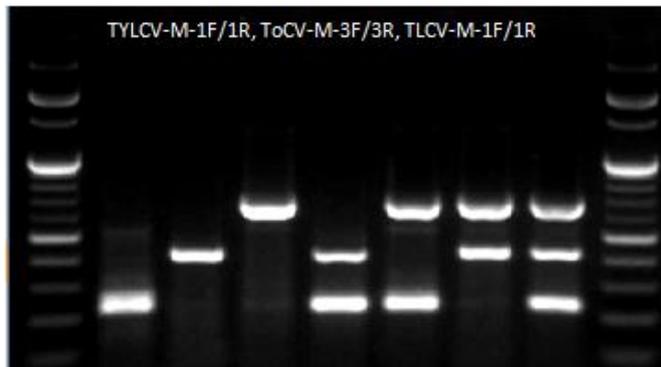
2절. 가루이 매개 바이러스 진단법 개발

1. Multiplex RT-PCR : TYLCV, ToCV, TbLCV

가. 일반적으로 토마토에 걸리는 바이러스병 중 가루이가 매개하는 토마토황화잎말림바이러스(*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV), 토마토평록바이러스(*Tomato chlorosis virus*, ToCV), 담배잎말림바이러스(*Tobacco leaf curl virus*, TbLCV)는 복합으로 감염되는 경우가 빈번하게 확인되고 있다.

나. 이 바이러스의 단독 및 복합 감염에 의하여 토마토의 수량 감소 및 상품의 질 저하 등의 피해가 크며, 저항성품종의 건전 종자나 종묘로 수시 갱신하지 않으면 바이러스병에 의해 수량이 감소하고 품질이 악화되는 등 농가의 경제적 피해를 입히게 된다. 따라서 빠른 시간에 바이러스병을 진단할 필요가 있으며, 가루이가 매개하는 토마토 감염 바이러스 3종을 한 번에 진단할 수 있는 RT-PCR 다중 진단 시스템을 구축하였다.

다. 토마토 시료는 병징이 있는 잎 및 열매를 액체질소로 마쇄한 뒤, 바이러스 게놈 추출 키트(Intron, Viral gene-spin kit)를 이용하여 전체 게놈을 추출하였다. 추출된 게놈을 주형으로 RT-PCR을 수행하였고, RT-PCR산물은 1.5% 아가로스겔, 100V 조건에서 1시간동안 전기영동을 하여 확인하였다(그림 2-1-1).



M. 100bp ladder

lane 1 > TYLCV

lane 2 > ToCV

lane 3 > TLCV

lane 4 > TYLCV+ToCV

lane 5 > TYLCV+TbLCV

lane 6 > ToCV+TbLCV

lane 7 > TYLCV+ToCV+TbLCV

그림 2-1-1. 가루이 매개 토마토 바이러스 3종 Multiplex RT-PCR 결과

2. 등온증폭법을 이용한 토마토평록바이러스 검출

가. 현장적용이 수월한 토마토평록바이러스 검정을 위해 등온증폭반응용 프라이머 및 이를 이용한 토마토평록바이러스를 검정법을 개발하였다.

나. 기존 PCR 방법은 변성, 접합, 및 신장의 세 단계를 반복적으로 수행하면서 유전자의 증폭을 시행하기 때문에 반응과정 중 지속적인 온도 변화가 필요하여 이 과정을 수행할 수 있는 고가의 전문기기가 필요로 한다.

다. 반면, 등온증폭법 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP)은 기존 PCR 방법에 사용되는 *Taq* DNA 중합효소(*Taq* DNA polymerase)를 사용하는 대신, 핵산말단가수분해(exonuclease) 기능을 갖고 있는 *Bst* DNA 중합효소(*Bst* DNA polymerase)를 사용함으로써 고온 조건에서 유도되는 DNA의 이중나선 구조 변성이 가능하기에 유전자를 증폭하는 동안 온도의 변화를 필요

로 하지 않아 전문장비 없이 손쉽게 고정된 온도에서 유전자 증폭이 가능하며, 고농도의 SYBR Green I을 이용하여 자연광 및 자외선 하에서 육안으로 신속하게 진단할 수 있다(그림 2-1-1).

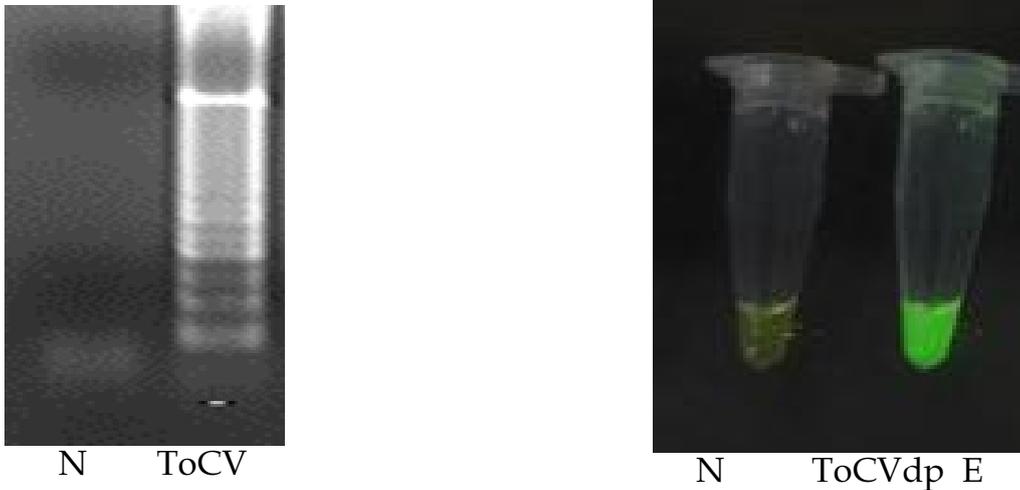


그림 2-1-1. 등온증폭법을 이용한 토마토포록바이러스 검출

3절. 국내 발생 가루이 매개 토마토포록바이러스의 특성 연구

1. 토마토포록바이러스병의 발생양상

가. 토마토의 황화, 잎말림 및 위축 증상 등을 보이는 토마토포록바이러스 (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV)에 의해 2008년 경남 통영지역에서 국내에 처음 보고한 이후로 2008년도에 13지역, 2009년 25지역, 2010년 15지역, 2011년 9지역, 그리고 2012년 5지역, 2013년 3지역, 2014년 1지역 등으로 확산되어 총 71개 지역에서 발생을 확인하였다(표 1-1, 그림 1-3).

나. TYLCV는 발생농가에서 확산에 비하여 피해정도는 현저하게 낮아지는 것을 확인할 수 있었는데, 이는 TYLCV 저항성 품종의 재배, 초기 감염주의 제거, 매개충인 담배가루이의 철저한 방제 등 농가 교육 및 홍보에 의한 효과로 해석되어 질 수 있을 것으로 사료된다.

2. 가루이류 매개 바이러스병에 대한 발생지역의 문제점

가. 감염 시기에 따른 토마토포록바이러스병 병징

(1) 토마토 재배 기간 중에 감염이 발생한 토마토포록바이러스병의 병징은 감염이 일어난 시기별로 차이가 있었으며 각각의 주요 병징은 그림 3-2-1에 정리하였다.



<정식기 감염 병징>



<적과 및 적엽기 감염 병징>

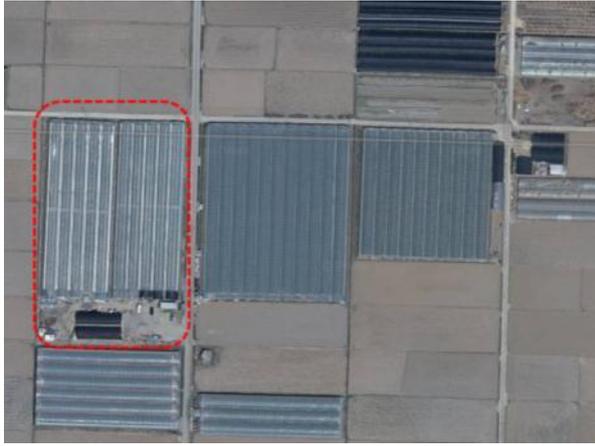


<수확기 감염 병징>

그림 3-2-1. 감염 시기에 따른 토마토황화잎말림병 병징

나. 토마토황화잎말림병 발생지에서 정식시기의 재감염 양식

- (1) 토마토황화잎말림병 발병주 사이에 재정식에 의한 재발생 양식을 조사하였다.
경남, 경북, 전북지역의 발생 농가에서 조사를 하였다.



<토마토황화잎말림병 발생지>



<포장 전경>



<토마토황화잎말림병 병징 및 그으름 증상>



<포장내 중간기주 식물 및 담배가루이>

그림 3-2-2. 토마토황화잎말림병 발생 농가 조사 결과

○ 재배양식

- 1차 재배('09. 07~' 10. 06) : 초기(1%내외), 후기(100%)
- 2차 재배('10. 02~' 10. 11) : 100% 발생

※ 1차 재배 수확기 중에 2차 재배(사이심기)를 하였음

○ 주변 여건

- 하우스 내외부에 담배가루이 및 중간기주 식물 대량 분포하고 있음.
- 하우스에 방충망 시설이 있으나, 방충망 간격이 너무 멀어 외부로부터 담배가루이 출입 용이
- 담배가루이 및 온실가루이 대량 증가로 인해 방제 포기
- 주변 중간기주 식물의 위험성에 대한 인식이 전혀 없음
- 주변에 토마토 재배 농가가 많이 있으나, 상호 협력이 되고 있지 않음

※ 담배가루이 및 중간기주 식물 등 전염원이 계속 증가

(2) 1차 발병지에서 연속재배에 의한 재발생 : 경북, 전남, 경북



<토마토황화잎말림병 발생지>



<①번 포장 전경>



<②번 포장 전경>



<③번 포장 전경>

그림 3-2-3. 토마토황화잎말림병 1차 발병지에서 연속재배에 의한 재발생 조사

- ①번 위치
 - 1차 재배 양식('09. 10~' 10. 05) : 5%이내 발생, 경남소재 육묘장 구입
 - 2차 재배 양식('09. 03~' 10. 07) : 100% 발생
- ② 및 ③번 위치('10. 06~' 10. 11) : 100% 발생

※ 1차 재배 중 2차 재배(사이심기)→자기 육묘(주변 하우스)→주변하우스 정식

- 주변여건
 - 하우스 내외부에 담배가루이 및 중간기주 식물 대량 분포하고 있음.
 - 하우스에 방충망 시설이 있으나, 방충망 간격이 너무 멀어 외부로부터 담배가루이 이입이 용이
 - 친환경 농가이기 때문에 살충제, 제초제 등 약제 살포할 수 없음

※ 담배가루이 및 중간기주 식물 등 전염원이 계속 증가

(3) 전작기 이병주의 삼수에 의한 발생 : 전남, 경남



<TYLCV 발생지>



<주변여건>

그림 3-2-4. 토마토황화잎말림병 발생농가의 전작기 이병주의 삼수에 의한 발생 조사

- 발생양상 : '09년(1%이내) → ' 10년(50%)
- 재배 작기 : '10. 05 ~' 10.08
- 육묘 : 전작기 토마토를 삼수하여 옆동 하우스에 육묘
- 주변여건
 - 하우스 내외부에 담배가루이 및 중간기주 식물 대량 분포하고 있음
 - 하우스에 방충망 시설이 없음.
 - 무농약 농가이기 때문에 살충제, 제초제 등 약제 살포할 수 없음
 - 전작기 땅에 떨어진 토마토로부터 종자가 발아하여 하우스주변에 산재하여 있음 → 토마토황화잎말림병 감염

다. 토마토황화잎말림병 발생 포장으로부터 주변농가 확산

(1) 1차 발병지에서 보독 담배가루이의 방제 소홀 : 경남 등 대부분 지역



<TYLCV 발생지>



<2차 발병지의 주요 병징>



1차 발병지



2차 발병지

그림 3-2-5. 토마토황화잎말림병 발병 양상

- 1차 발병지 재배 양식('09. 12~' 10. 07) : 50% 발생, 육묘장 구입
 - ※ 전작기 발생에 따른 포장에서의 재감염.
- 2차 발병지 재배 양식('10. 05~' 10. 11) : 50% 이상 발생
 - 발병 패턴 : 1차 발병지를 중심으로 1-2라인(95%), 6-7라인(30%), 10-11라인(50%), 15-16라인(20%)
- 주변여건
 - 하우스 내외부에 중간기주 식물 깨끗하게 정리하였음.
 - 하우스에 방충망 시설이 있으나 간격이 너무 큰 편임.
 - 살충제를 계속적으로 살포하였으나 담배가루이가 소량으로 유지됨.
 - 작년 이병주의 삽수/하우스 내부 중간기주

3. 토마토황화잎말림바이러스 발생 관련 육묘장 및 육묘장 주변의 문제점

가. 개별 육묘장 및 육묘장 주변의 문제점

- 지역 단위로 육묘를 공급 : 이력관리 가능
- 토마토황화잎말림병 및 담배가루이에 관한 정보 부족.
- 육묘 하우스 주변 재배환경 여건
 - 하우스 내외부에 중간기주 식물이 자라고 있음.
 - 하우스에 방충망 시설이 없으며, 하우스 내외부 담배가루이 발생
- 육묘장 주변에 토마토 재배 농가가 존재



<개별 육묘장의 환경 여건>



<개별 육묘장 TYLCV 감염 구입 육묘로 인한 발생>

그림 3-3-1. 토마토황화잎말림바이러스 발생 개별 육묘장 현황

나. 대형 육묘장 및 육묘장 주변의 문제점

- 전국 단위로 육묘를 공급 : 이력관리 가능
- 연속적인 육묘로 인하여 담배가루이 완전 방제는 거의 불가능한 실정
- 육묘 하우스 주변 재배환경 여건
 - 하우스 내외부에 중간기주 식물이 자라고 있음.
 - 하우스에 넓은 간격의 방충망 시설이 있으나, 외부로부터 담배가루이 이입이 용이
- 육묘장 주변에 대부분 토마토 재배 농가가 존재



<대형 육묘장 환경 여건>



<육묘장 주변에 TYLCV 발생>

그림 3-3-2. 토마토황화잎말림바이러스 발생 대형 육묘장 현황

4. TYLCV 계통 분석

- TYLCV 전체 염기서열을 분석하기 위하여, PCR 결과로 얻어진 산물을 QIAquick Gel Extraction kit(Qiagen)로 분리하여 pGEM-T vector (Promega)에 클로닝시켰다. Automated sequencer를 사용하여 sequencing하였으며, GenBank. BLAST program 등의 방법을 사용하여 염기서열 분석을 하였다.

가. 2012년도 유전적 변이 분석

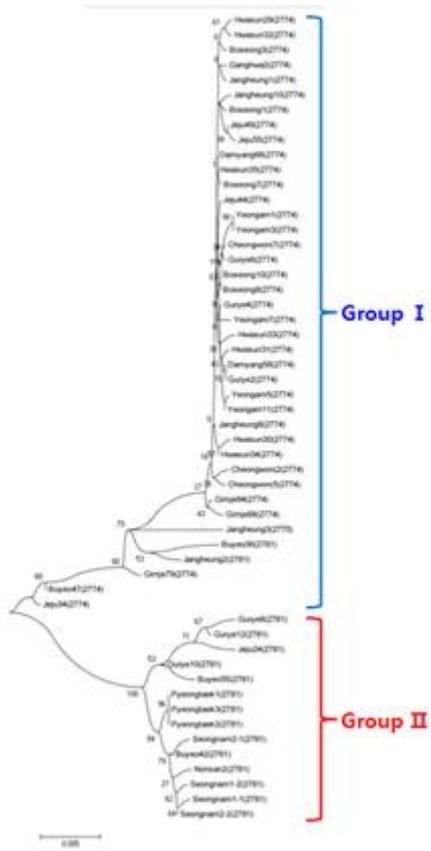
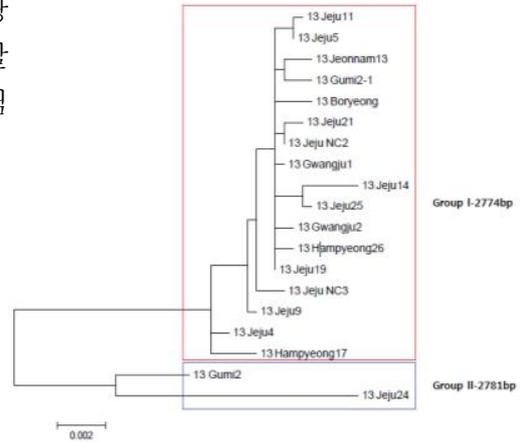
- (1) 2012년 주요 발생지역인 경기도 등 6도 14지역을 대상으로 토마토 시료를 채집하여, 시기별 및 지역별 총 171점의 시료를 PCR 검정한 결과 152점이 바이러스에 감염되었음을 확인하여 지역별로 선발한 분리주 56점에 대해서 전체 염기서열을 결정하였으며 염기서열 분석결과, 발생지역에 따라 크게 2그룹으로 나뉘어졌다 (그림 3-3-3).
- (2) 그룹 I의 경우 2774bp로, 강화, 청원, 김제, 담양, 영암, 보성 지역에서 나타났고, 그룹 II의 경우는 2781bp로, 성남, 평택, 논산 지역에서 나타났다. 또한, 이 전까지 구례지역에서만 두 그룹이 모두 검정된 반면 2012년에는 부여, 구례, 장흥, 화순, 제주 지역까지 확산되는 것을 확인할 수 있었다. 특이하게도, 화순지역에서는 그룹 I과 더불어 그룹 I+II의 복합감염을 확인할 수 있어서 이 지역은 토마토황화잎말림바이러스의 변이여부를 추적할 필요가 있을 것으로 사료된다(그림 3-12). 더불어 장흥지역에서는 2775bp의 변이 분리주가 계속적으로 발생되고 있음을 확인할 수 있었기 때문에, 화순지역과 더불어 장흥지역 역시 변이 여부를 지속적으로 분석하였다.

나. 2013년도 유전적 변이 분석

- (1) 2013년 지역별로 선발한 TYLCV 분리주 19점에 대해서 전체 염기서열을 분석한 결과, 2012년도와 마찬가지로 크게 2그룹으로 나뉘어졌다(그림 3-13). 그룹 I의 경우 2774bp로, 제주와 구미지역에서 나타났고, 그룹 II의 경우는 2781bp로, 제주, 광주, 함평, 구미, 보령지역에서 나타났다.
- (2) 2011년도 이전까지 구례지역에서만 두 그룹이 모두 검정된 반면 2012년에는 부여, 구례, 장흥, 화순, 제주 지역까지 확인할 수 있었다. 2013년도의 경우 제주와 구미지역에서 그룹 I+II의 복합감염을 확인할 수 있어서 2012년도의 장흥 화

순 지역과 더불어 이 지역들의 토마토황화잎말림바이러스의 변이여부를 추적할 필요가 있을 것으로 사료된다 (그림 3-3-3, 그림 3-3-4).

그림 3-3-4. 2013년도 TYLCV phylogenetic tree



Province	Area	Investigated date	No. of plants		Full genome sequence	Group
			investigated	detected		
경기	강화	2012.8	2	1	1	I
	성남	2012.6	8	8	4	II
	평택	2012.8	5	5	3	II
충남	논산	2012.8	2	2	1	II
	부여	2012.3	22	12	4	I, II
충북	청원 (옥산,오창)	2012.7	11	10	3	I
전북	김제	2012.3	12	11	4	I
전남	담양	2012.3	21	19	2	I
	영암	2012.5	11	11	5	I
	보성	2012.5	10	10	5	I
	구례	2012.3	12	11	6	I, II
	장흥	2012.5	10	10	5	I, II
	화순 (도곡)	2012.3	8	8	8	I, I+II
제주	제주	2012.2	37	34	5	I, II
2012년도 total			171	152	56	

그림 3-3-3. 2012년도 지역별 및 시기별 TYLCV 전체 계통 분석 및 계통 분포도

4절. 국내 신규발생 가루이 매개 토마토포록바이러스의 특성

1. 토마토포록바이러스 (ToCV) 발생 확인

가. 토마토포록바이러스 (ToCV)는 1990년대 후반 미국 플로리다주에서 처음 발견된 것을 시작으로 현재까지 유럽, 미국, 대만, 일본, 중국 등에서 보고되었다.

나. ToCV는 특히 거의 모든 가루이류(담배가루이, 온실가루이)에 의해 전염된다고 알려

- 져 있기 때문에 확산의 속도가 빠르고, 방제가 어려운 바이러스에 속한다.
- 다. ToCV의 자연기주로는 토마토, 고추, 파프리카, 감자 그리고 까마중 등이 있으며 현재 우리나라에서는 작물로는 토마토에서만 발견되고 있다.
- 라. ToCV는 감염된 토마토의 잎을 퇴색시키는 바이러스로써 하엽에서 나타나 점차적으로 상엽으로 병징이 따라올라 가는 경향을 보이며, 초기에 감염되면 위축 및 황화로 인하여 경제적으로 큰 손실을 입히는 바이러스로 알려져 있다. 이에 우리나라에서는 ToCV를 검역관리급 바이러스로 지정하고 있다.
- 마. 2013년도 익산에서 수집된 토마토 잎에서 불규칙적인 퇴색 모틀 및 엽맥간 황화 병징을 관찰할 수 있었다. 추가적으로 제주도와 전라도 등 6도 12지역을 대상으로 토마토 시료를 채집하여, 시기별 및 지역별 총 225점의 시료를 RT-PCR 검정한 결과 81점에서 토마토퇴록바이러스에 감염되었음을 확인하였다 (표 4-1-1).

표 4-1-1. 2013년도 지역별 토마토퇴록바이러스(ToCV) 검정 결과

year	place name	infected plant/examed plant	
2013	Jeju	Jeju	4/7
		Seoqwipo	18/105
	Jeollabukdo	Iksan	22/23
		Kimje	0/2
		Gunsan	0/4
		Naju	0/3
	Jeollanamdo	Hwasun	10/13
		Hampyeong	24/61
		Yeonchun	0/1
	Gyeonggido	Yeoju	1/2
	Chungcheongnamdo	Nonsan	2/3
	Gyeongsangnamdo	Jinju	0/1

- 바. 또한, ToCV의 발생시기를 조사하기 위하여 2013년도 이전에 TYLCV 발생확인을 위하여 전국적으로 채집된 시료를 대상으로 ToCV의 존재 확인하기 위해 검정한 결과, 2008년~2012년도 토마토에서 추출한 total RNA에서 ToCV가 전혀 검출되지 않았다. 이를 토대로 2013년에 ToCV가 최초발생된 것을 확인할 수 있었다.
- 사. 2014년에는 2013년에 발생한 지역을 포함하여 충청남도 부여지역까지 ToCV가 관찰됨을 확인할 수 있었다. 2015년도에는 경기도 화성, 충남 부여, 전북 장수, 익산, 김제, 정읍, 전남 화순, 영광, 광양 및 제주 지역에 발생하는 것을 발생을 확인해 보고되어 있다 (그림 4-1-1).

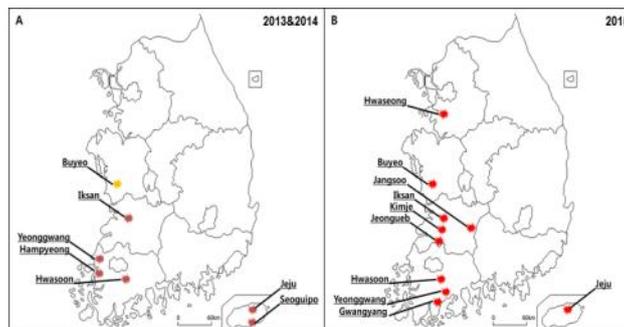


그림 4-1-1. 토마토퇴록바이러스(ToCV) 발생지역

2. 토마토퇴록바이러스병 (ToCV) 에 대한 시설재배지의 문제점

가. 토마토퇴록바이러스병 (ToCV) 발병주 사이에 재정식에 의한 재발생 : 제주도



<토마토퇴록바이러스병 발생 포장>



<토마토퇴록바이러스병 병징>



<토마토퇴록바이러스병 이병과실>



<포장내 중간기주 식물 및 담배가루이 발생>



그림 4-2-1. 토마토퇴록바이러스병 발병포장 현황

○ 재배양식

- 1차 재배('13. 04~06) :15~58%
- 2차 재배('13. 09~10) :16~77%

※ 1차 재배 수확기 중에 2차 재배(사이심기)를 하였음

○ 주변 여건

- 하우스 내외부에 담배가루이 및 중간기주 식물 대량 분포하고 있음.
 - 하우스에 방충망 시설이 있으나, 방충망 간격이 너무 멀어 외부로부터 담배가루이 이 출입 용이
 - 담배가루이 및 온실가루이 대량 증가로 인해 방제 포기
 - 주변 중간기주 식물의 위험성에 대한 인식이 전혀 없음
- ※ 담배가루이 및 중간기주 식물 등 전염원이 계속 증가**

3. TYLCV와 ToCV의 복합감염

가. TYLCV와 ToCV는 가루이가 매개한다는 공통점을 가지고 있기 때문인지 의뢰된 이병토마토의 경우 TYLCV와 ToCV가 복합감염이 되어 나타나는 경우를 많이 볼 수 있었다(그림 3-17).

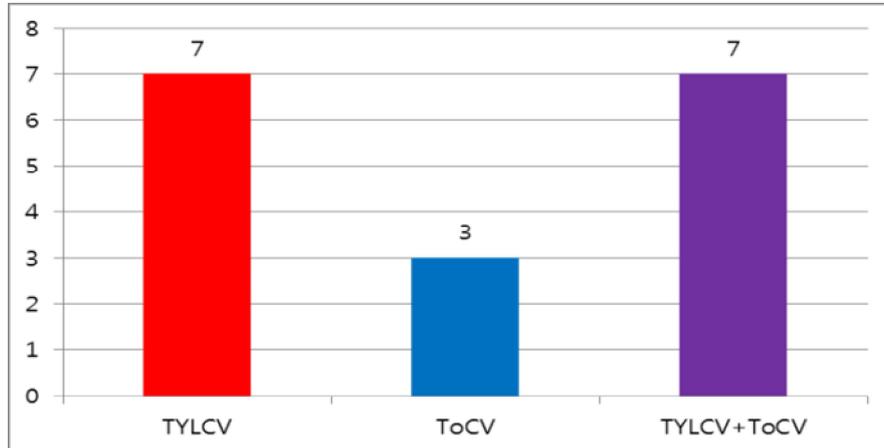


그림 4-3-1. TYLCV와 ToCV 단독 및 복합감염률

나. 2014년 이상증상을 보이는 토마토 시료의 바이러스 검정 결과, 총 17건 중 TYLCV 단독으로 걸린 경우는 7건, ToCV가 단독으로 걸린 경우는 3건, 그리고 복합으로 감염된 경우는 7건이었다. 이와 같이 복합으로 걸리는 빈도수가 많으며, 특히 익산과 제주도에서는 거의 100%에 가까운 복합감염률을 보인다.

4. 토마토티록바이러스(ToCV)의 유전자 분석

가. ToCV 전체 염기서열을 분석하기 위하여, RNA1와 RNA2를 각각 3개의 segment로 나눠 Long RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 얻어진 PCR 산물을 정제하여 sequencing하였으며, GenBank, BLAST program 등의 방법을 사용하여 염기서열 분석을 하였다.

나. 2013년도에 논산, 제주, 익산 등의 5지역에서 채집된 15분리주를 대상으로 전체 염기서열을 확정하고 계통 분석 결과, 지역에 따라 크게 2그룹으로 나뉘어졌다(그림 4-2-1). 그룹 I의 경우 제주 지역의 분리주가 대부분인 반면, 그룹 II는 익산에서 발견된 ToCV 분리주가 주를 이루었다. 그리고 그룹 I의 경우 중국과 미국의 계통과 상동성이 높으며 그룹 II는 그리스와 스페인등지에서 발견되는 계통과 흡사함을 알 수 있었다(그림 4-4-1).

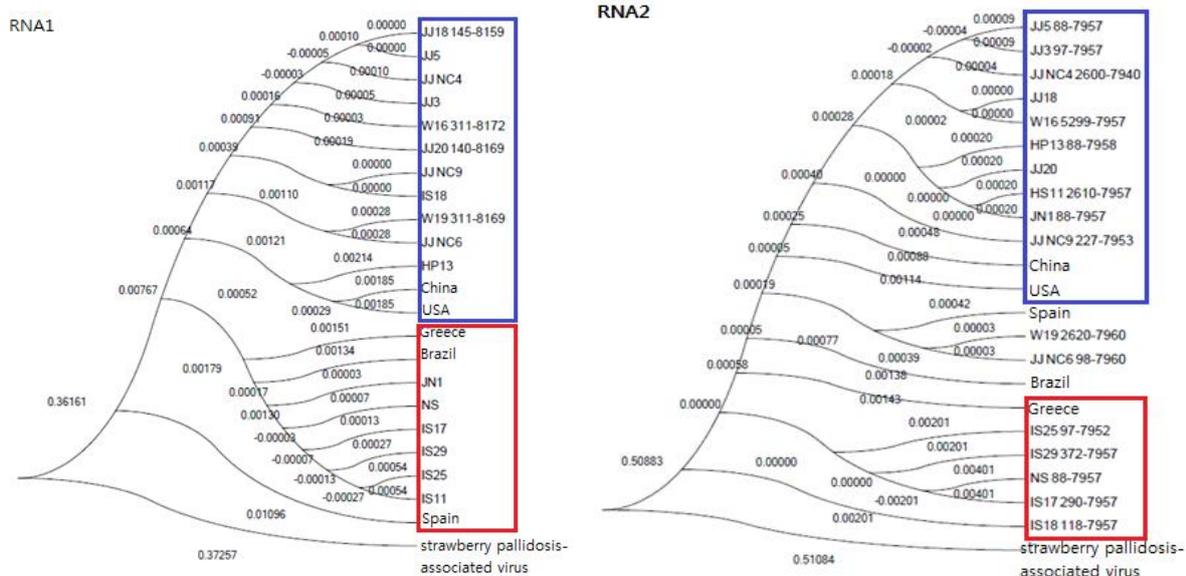
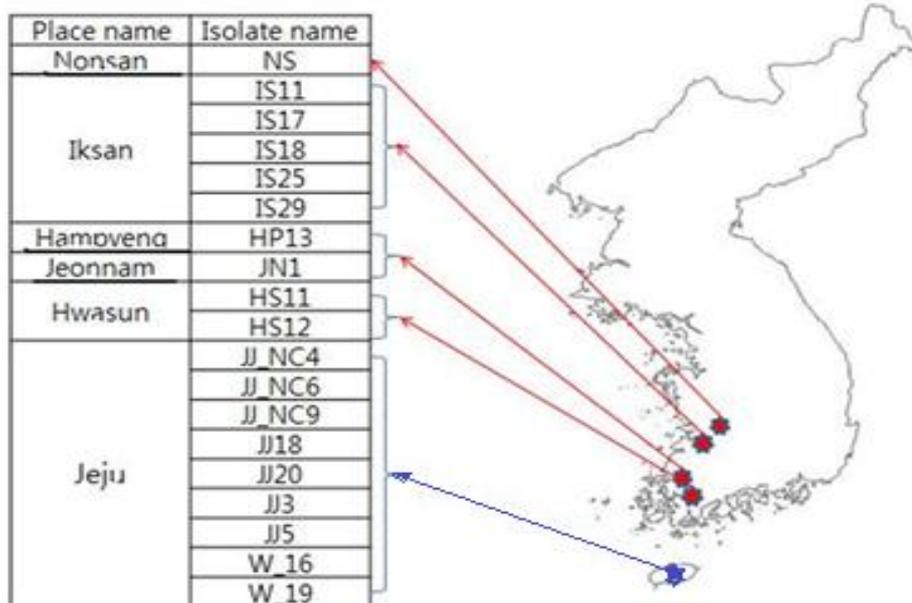


그림 4-4-1. 2013년도 토마토포록바이러스(ToCV)의 염기서열 계통분석

다. 2014년도에 국내에서 ToCV에 감염된 토마토에서 얻어진 분리주를 대상으로 RNA1과 RNA2의 전체 염기서열을 결정하였고 계통 분석을 수행한 결과 전북과 충남지역 그리고 전남과 제주도지역으로 나뉘어졌다. 그룹 I의 경우 제주도에서 detection된 isolate가 대부분이었고, 그룹 II는 익산에서 발견된 ToCV isolate를 이루었다. 그리고 그룹 I의 경우 중국과 미국의 strain과 homology가 높으며 그룹 II는 그리스와 스페인등지에서 발견되는 strain과 흡사함을 알 수 있었다(그림 4-4-2).

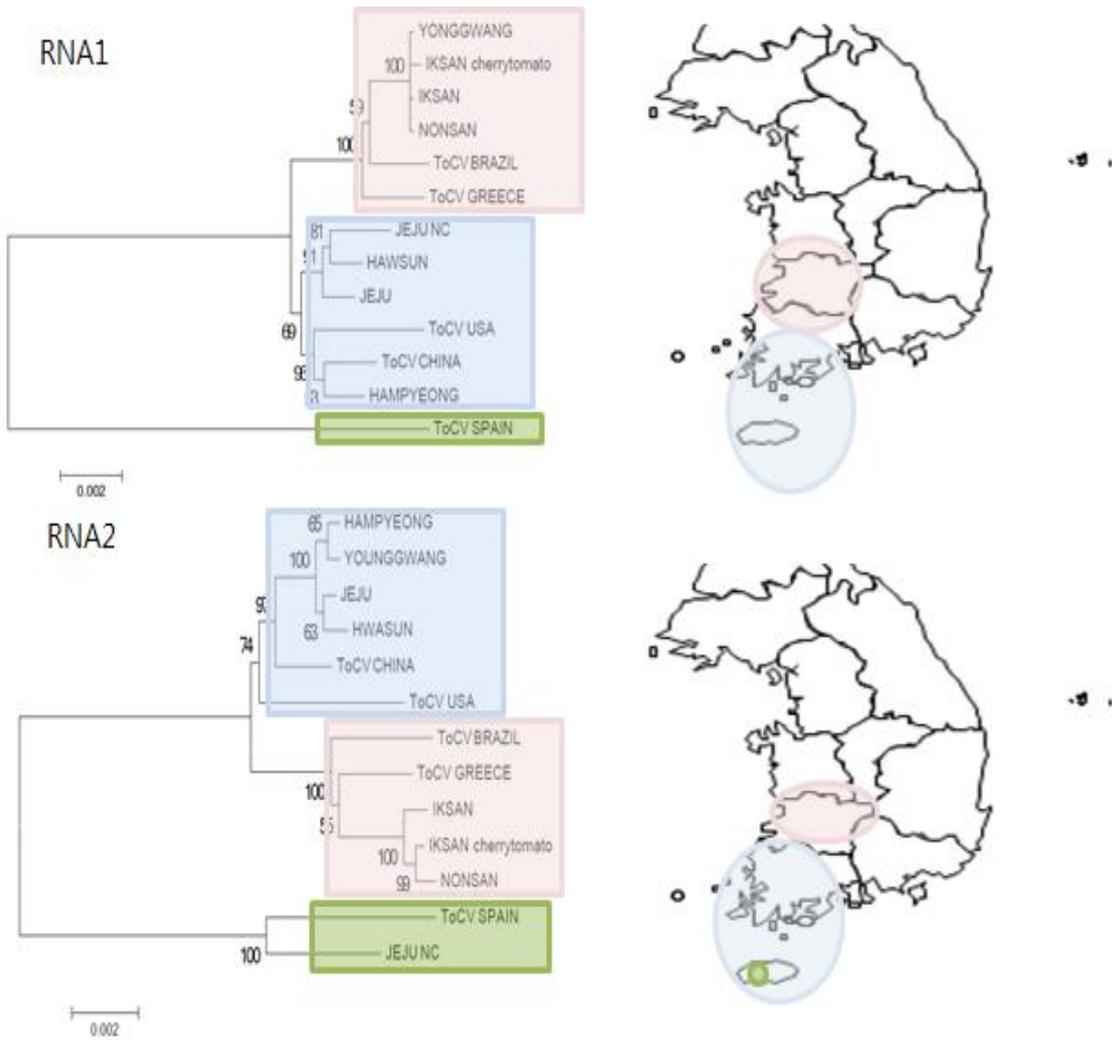


그림 4-4-2. 지역별 ToCV 전체 게놈 분석

라. ToCV RNA1과 RNA2 유전자 각각의 전체 염기서열 분석결과, 기존에 보고되어있는 분리주들과 각각 97~99%의 상동성을 보였다. 이중 RNA1에서는 ToCV-China, ToCV-USA, ToCV-Greece, ToCV-Brazil 계통과는 98.4~99.7%의 높은 상동성을 보인 반면, ToCV-Spain계통하고는 97.4~97.6%로 다소 낮은 상동성을 보였다. RNA2에서도 ToCV-China, ToCV-USA, ToCV-Greece, ToCV-Brazil 계통과는 높은 상동성을 보인 반면, ToCV-Spain계통하고는 다소 낮은 상동성을 보여 RNA1과 동일한 경향을 보였다 (표 4-4-1).

표 4-4-1. ToCV 국내분리주와 외국분리주간의 핵산 염기서열 상동성 분석

Virus isolate*	ToCV_NJ China	ToCV_SDSG China	ToCV_BJ China	ToCV_Florida1 USA	ToCV_Florida2 USA	ToCV_AT80/99 Spain	ToCV_AT80/99-IC Spain	ToCV_Gr-535 Greece	ToCV_ToC-Br2 Brazil
RNA1									
ToCV_JJ3_Korea	98.6	99.6	99.4	99.4	99.4	97.6	97.6	99.4	99.4
ToCV_JJ5_Korea	98.6	99.6	99.4	99.4	99.4	97.6	97.6	99.4	99.4
ToCV_JJ_NC_Korea	98.5	99.5	99.3	99.3	99.3	97.5	97.5	99.2	99.2
ToCV_IS17_Korea	98.4	99.4	99.2	99.1	99.1	97.4	97.4	99.6	99.7
ToCV_IS29_Korea	98.4	99.4	99.2	99.1	99.1	97.4	97.4	99.6	99.7
ToCV_HS_Korea	98.6	99.6	99.4	99.4	99.4	97.6	97.6	99.4	99.4
ToCV_HP_Korea	98.7	99.7	99.5	99.4	99.4	97.6	97.6	99.3	99.4
ToCV_YG_Korea	98.4	99.4	99.2	99.1	99.1	97.4	97.4	99.6	99.7
ToCV_JN1_Korea	98.4	99.4	99.2	99.1	99.1	97.4	97.4	99.6	99.7
ToCV_NS_Korea	98.4	99.4	99.2	99.1	99.1	97.4	97.4	99.6	99.7
RNA2									
ToCV_JJ3_Korea	99.4	99.6	-	99.3	99.3	97.8	97.8	99.3	99.2
ToCV_JJ5_Korea	99.4	99.7	-	99.3	99.3	97.8	97.9	99.3	99.2
ToCV_JJ_NC_Korea	97.8	98.0	-	97.8	97.7	99.1	99.2	97.8	97.7
ToCV_IS17_Korea	99.0	99.3	-	99.1	99.0	97.6	97.6	99.5	99.4
ToCV_IS29_Korea	99.0	99.3	-	99.1	99.0	97.6	97.6	99.5	99.4
ToCV_HS_Korea	99.3	99.6	-	99.3	99.2	97.8	97.8	99.2	99.2
ToCV_HP_Korea	99.4	99.6	-	99.3	99.2	97.8	97.8	99.3	99.3
ToCV_YG_Korea	99.4	99.6	-	99.3	99.2	97.8	97.9	99.3	99.3
ToCV_JN1_Korea	99.4	99.6	-	99.3	99.2	97.8	97.9	99.3	99.3
ToCV_NS_Korea	98.9	99.2	-	99.1	98.9	97.5	97.6	99.5	99.4

*See table 6 for isolates information and GenBank accession numbers.

마. ToCV RNA1 encoding proteins 영역에서 ToCV 국내분리주를 포함한 criniviruses 간에 아미노산의 상동성을 분석한 결과, ToCV-China, ToCV-USA, ToCV-Greece, ToCV-Brazil 및 ToCV-Spain 계통과 높은 상동성을 보이는 것을 확인할 수 있었다(표 4-4-2). 더불어, ToCV RNA2 encoding proteins 영역에서도 ToCV 국내분리주를 포함한 criniviruses 간에 아미노산의 상동성을 분석한 결과, RNA1와 거의 유사한 경향을 보이는 것을 확인할 수 있었다(표 4-4-2).

표 4-4-2. ToCV 국내분리주를 포함한 Crinivirus 간에 아미노산 서열 상동성 분석 (ToCV RNA1 encoding proteins)

Virus ^b	ORF1a		ORF1b/RdRp		ORF2/p22		ORF3/p6	
	ToCV_Korea_JJ	ToCV_Korea_IS	ToCV_Korea_JJ	ToCV_Korea_IS	ToCV_Korea_JJ	ToCV_Korea_IS	ToCV_Korea_JJ	ToCV_Korea_IS
ToCV_China	100	99	100	100	98	99	100	100
ToCV_USA	99	99	100	100	99	99	100	100
ToCV_Greece	99	99	100	100	98	98	100	100
ToCV_Brazil	99	100	100	100	98	100	100	100
ToCV_Spain	98	98	99	100	95	96	100	100
ToCV_Israel	NA	NA	NA	NA	NA	NA	100	100
ToCV_Japan	NA	NA	NA	NA	NA	NA	100	100
ToCV_France	NA	NA	NA	NA	NA	NA	100	100
AYV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	100	100
BnYDV	34	34	61	62	8	8.5	9	9
BPYV	35	35	63	63	NA	NA	13	13
BYVaV	37	37	63	63	NA	NA	NA	NA
CCYV	34	34	61	61	12	12.6	11	11
CYSDV	33	33	63	63	8	7.6	19	19
DVCV	34	34	59	59	NA	NA	NA	NA
LCV	34	34	60	60	20	19.8	7	7
LIYV	28	28	58	58	10	10.2	NA	NA
PYVV	33	33	61	61	NA	NA	9	9
SPaV	35	35	59	59	NA	NA	4	4
SPCSV	38	38	66	67	10	10.4	6	6
TICV	28	28	56	56	6	6.4	NA	NA

^aHomologies with less than 25% identity over the length of the protein are not considered related.

^bSee Table 2 and 6 for virus acronyms and GenBank accession numbers.

표 4-4-3. ToCV 국내분리주를 포함한 Crinivirus 바이러스 간의 아미노산 서열 상동성 분석 (ToCV RNA2 encoding proteins)

Virus ^a	ORF1p4		ORF2/HSF		ORF3/p8		ORF4/MP		ORF5/p9		ORF6/CP		ORF7/tcP		ORF8/p27		ORF9/p9	
	ToCV_Korea_JJ	ToCV_Korea_JS																
ToCV_China	97	94	99	99	99	99	100	99	99	99	99	99	99	99	100	98	100	
ToCV_USA	94	91	99	99	100	100	99	99	100	100	99	99	99	99	100	98	100	
ToCV_Greece	97	100	99	99	100	100	100	100	100	100	99	99	99	99	100	98	100	
ToCV_Brazil	97	100	99	99	97	97	100	99	100	100	98	98	99	99	100	98	100	
ToCV_Spain	94	91	99	99	99	99	98	98	100	100	96	96	97	97	97	98	97	
ToCV_Israel	NA	99	99	NA	NA	NA	NA	NA										
ToCV_Japan	NA	NA	99	99	NA	NA	NA	NA	NA	NA	99	99	NA	NA	NA	NA	NA	
ToCV_France	NA	NA	99	99	NA	NA	99	98	NA	NA	98	98	NA	NA	NA	NA	NA	
ATV	NA	30	30	NA	NA	NA	NA	NA										
BoYDV	0	0	61	61	24	24	42	42	29	29	30	30	20	20	23	23	NA	
BPYV	8	11	60	60	26	26	41	41	24	24	30	30	21	21	17	17	NA	
BYVaV	18	15	59	59	32	32	41	41	24	24	28	28	22	22	18	18	NA	
CCV	11	11	60	60	24	24	43	43	28	28	32	32	22	22	20	20	NA	
CYSOV	3	3	60	60	24	24	41	41	35	35	33	33	20	20	22	22	NA	
DVCV	3	3	60	60	31	31	40	40	27	27	26	26	21	21	22	22	NA	
LCV	11	11	60	60	24	24	44	44	28	28	31	31	21	21	23	23	10	
LITV	NA	NA	51	51	NA	NA	32	32	NA	NA	24	24	14	14	9	8	NA	
PIYV	NA	NA	58	58	15	15	36	37	19	19	31	31	20	20	NA	NA	NA	
SPaV	8	8	61	61	30	30	40	40	33	33	27	27	21	21	16	16	NA	
SPCSV	NA	NA	61	61	NA	NA	42	42	26	26	36	36	24	24	17	17	NA	
TICV	12	12	53	53	38	38	31	30	26	26	19	19	16	16	16	16	NA	

^aSequences with less than 25% identity over the length of the protein are not considered related.
^bSee Table 2 and 6 for virus acronyms and GenBank accession numbers.

5. 토마토퇴록바이러스 종자전염 진단법 구축

가. 2013년 ToCV 대발생된 제주도 토마토 농가의 재감염여부를 조사한 과정 중 이 병토마토 종자로부터 발아한 것으로 추정되는 토마토 유묘를 채집하여 검정해 본 결과, ToCV 감염을 확인할 수가 있어 ToCV 종자전염 가능성 여부를 추가적으로 수행하였다 (그림 4-5-1).



그림 4-5-1. 토마토퇴록바이러스(ToCV) 감염 주에서 채종한 종자로부터 발아한 유묘에서의 검정 결과

나. 프라이머 선발은 바이러스 농도별에 따른 민감도를 측정하기 위해 진행되었으며, 이 중 낮은 농도에서도 충분히 detection할 수 있는 프라이머를 선발하여 추후 실험을 진행하였다(그림 4-5-2).

다. ToCV가 감염된 토마토로부터 채종한 종자 및 과중한 유묘에서 RNA를 추출하여 검정한 결과 모두 ToCV가 검출되었고, 염기서열 분석을 통해 ToCV임을 확인할 ,

종자전염 확인수 있었다.

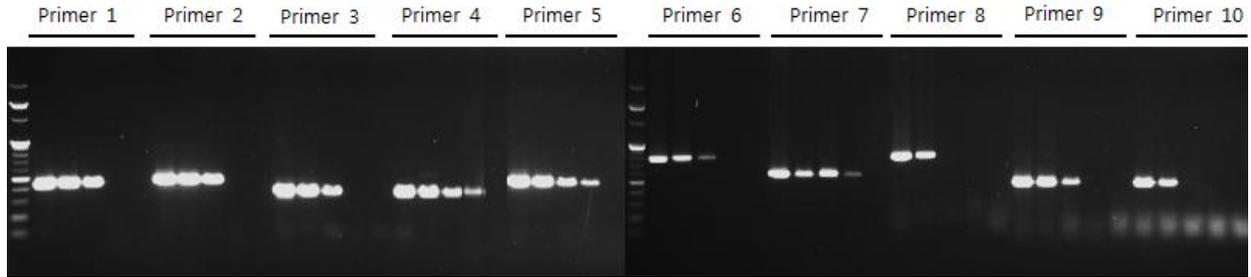


그림 4-5-2. 바이러스농도별 프라이머 민감도 테스트

라. 토마토 종자에서의 바이러스 검정은 종자 내의 바이러스 농도가 적어 일반 토마토 잎을 사용하여 검정할 때 보다 더 민감함 방법이 필요하기 때문에 기존 중합효소 연쇄 반응(PCR)과 다르게 Nested PCR을 진행하였다.

마. ToCV에 감염된 토마토 잎 조직부터 토마토 과실, 종자, 종자내부의 배아와 배유, 종자발아 후의 떡잎과 본엽까지 총 6 부분의 조직을 대상으로 ToCV 감염 여부를 검정하였다. 이때 종자와 종자내부의 배아와 배유는 10개 묶음을 하나의 시료로 사용하였으며, 핵산 추출은 인트론(주)의 Viral Gene-spin kit를 사용하여 진행하였다 (그림 4-5-3).



그림 4-5-3. 토마토 조직들에서의 ToCV 검정 결과

바. 더 나아가서, 종자전염과 전반율은 대량의 시료를 검정할 뿐만 아니라, 낮은 농도에서도 진단할 수 있는 검정법이 필요로 하며, 더불어 기존의 nested-PCR 방법보다 신속하고 간편한 검정법이 필요하였기 때문에 one-step RT-PCR 진단법으로 재구축을 하였다.

사. ToCV는 성숙한 토마토 잎보다 유묘 내의 바이러스 농도가 적어 성숙한 토마토 잎을 사용하여 검정할 때 보다 더 민감함 방법이 필요하기 때문에 기존 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 Biocube를 적용한 PCR을 진행하였다 (그림 4-5-4).

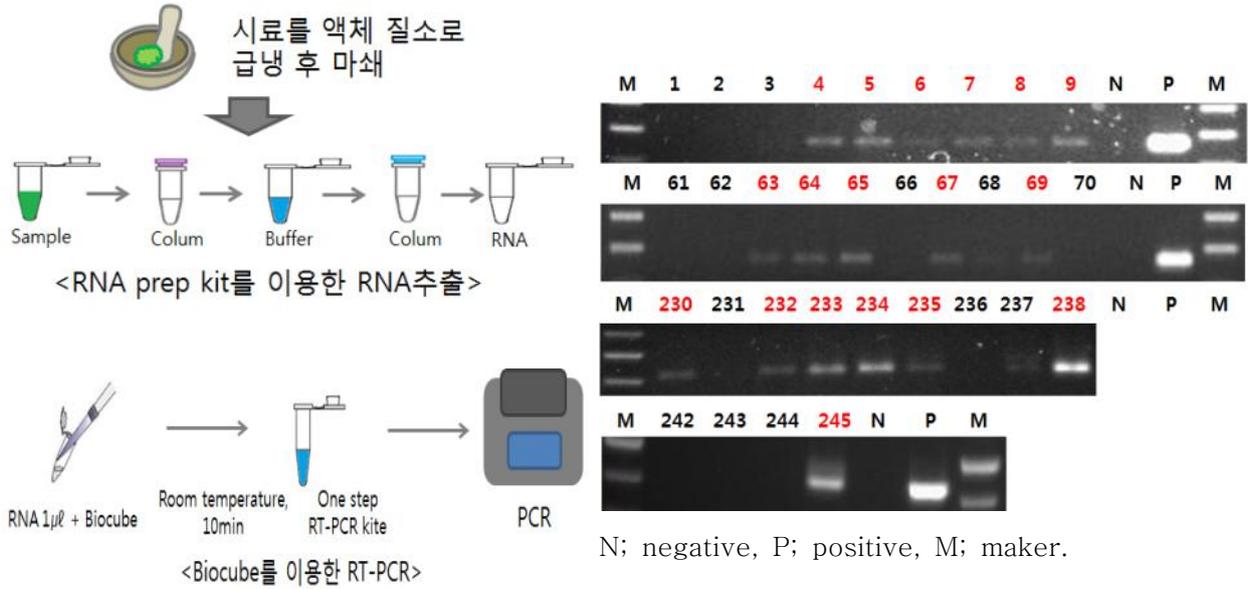


그림 4-5-4. Biocube를 이용한 ToCV 유묘검정

아. Biocube는 철, 알루미늄, 규소 등 여러 가지 금속 산화물을 재료로 하며, 재료를 단용 하거나 혼용하여 제작되었다. 높이와 폭이 0.5mm, 길이 0.5~3mm 정도의 육면체모양이며 크기 20nm~600nm 정도의 pore가 균일하게 분포한다. 액체질소로 급속냉동 시킨 후 마쇄한 시료를 Biocube사의 Plant RNA prep kit를 사용하여 RNA 추출을 한 후 추출된 RNA 1 μ l에 Biocube를 넣어 10분 이상 방치하였다 (그림 3-5-4).

자. Genetbio SuPrime one-step RT-PCR Premix PCR에 RNA를 넣는 대신 RNA가 흡수된 Biocube를 넣고 PCR을 하였다. ToCV가 감염된 토마토로부터 채종한 종자를 파종한 유묘에서 RNA를 추출하여 검정한 결과 모두 ToCV가 검출되었고, 염기서열 분석을 통해 ToCV임을 확인할 수 있었다 (그림 3-5-6).

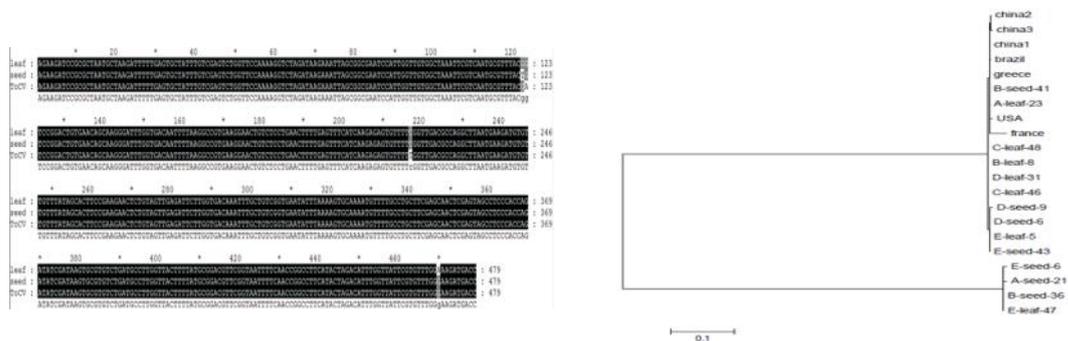


그림 4-5-6. 종자와 유묘에서 검출된 ToCV의 염기서열분석(A) phylogenetic tree (B)

6. 시판종자에서의 토마토티록바이러스 종자전염 여부 확인

가. ToCV에 감염된 토마토에서 채종한 종자에서 바이러스가 확인되었기 때문에 시판 종자에서의 종자전염 여부를 확인하는 실험을 진행하였다. 실험은 종자 10개 묶음을 하나의 시료로 사용하였고, 유묘 10개 묶음을 하나의 시료로 사용하여 ToCV 감염 여부를 조사하였다. 그 결과 12~44%의 종자 감염율을 확인할 수 있었다(표 3-6-1).

표 4-6-1. 시판종자에서의 ToCV 검정 결과

		A	B	C
종자오염	샘플 당 종자수	50 (10개 묶음)	50 (10개 묶음)	50 (10개 묶음)
	감염된 샘플수	37	15	1
	오염률(%)	74	30	2
종자전반	샘플당 유묘수	50 (10개 묶음)	50 (10개 묶음)	50 (10개 묶음)
	감염된 샘플수	17	6	22
	전반율(%)	34	12	44

나. 전기영동을 통해 확인된 ToCV의 밴드를 시퀀스분석을 하였으며 ToCV의 염기서열임을 확인하였고, phylogenetic tree를 통해서도 ToCV임을 확인할 수 있었다.

7. 토마토티록바이러스의 종자전염

가. 2015년 4월 가온이 되는 온실에서 ToCV 감염 토마토에서 채종한 종자를 파종하였다. 채종종자에서 발아한 유묘의 본엽 2~3엽기 때 본엽을 채취하여 검정하였다. 그 후 10~15일 간격으로 계속적으로 잎을 채취하여 검정하였다.

나. ToCV에 감염된 유묘기 때의 토마토는 병징이 보이지 않기 때문에 (그림 4-7-1) 전수를 10주씩 묶어서 검정 후 감염된 개체를 중점으로 개별 검정을 진행하였다.

다. 시간 변화에 따라 토마토 유묘에서 ToCV를 검정한 결과 초기에는 채종종자에서 6.2%, 사판종자에서 10.5%의 감염률을 보였으나 시일이 경과하면서 감염률은 점차 감소하여 파종 후 96일정도 경과했을 때는 감염률 0%를 보였다 (표 4-7-1).

라. 이러한 결과는 포장에서의 매개충인 가루이와의 연관성이 있을 것으로 생각되어 ToCV 감염 토마토 유묘와 가루이의 병징 발현의 연관성을 밝혀내는 추가 실험이 필요하다.

표 4-7-1. 시간변화에 따른 ToCV 감염 토마토 유묘에서의 ToCV 감염률

ToCV	검정	10주묶음	개별1차	개별2차	정식 후 1차	정식 후 2차	정식 후 3차	정식 후 4차
	시간(일)	27	33	48	63	74	83	96
채종종자	검정/전체	290/4,610	70/4,610	22/4,610	8/4,610	1/4,610	1/4,610	0/4,610
	감염률(%)	6.29	1.52	0.48	0.17	0.02	0.02	0
시판종자	검정/전체	110/1,040	28/1,040	8/1,040	0/1,040	1/1,040	0/1,040	0/1,040
	감염률(%)	10.58	2.69	0.77	0	0.10	0	0



그림 4-7-1. ToCV에 감염된 토마토 유묘

5절. 국내 발생 가루이 매개 담배잎말림바이러스의 특성 연구

1. 담배잎말림바이러스(TbLCV)의 유전자 분석

가. 담배잎말림바이러스는 열대, 아열대지역에 널리 분포하며 담배에는 권엽, 주름잎, 기형 등의 증상을 나타낸다. 인동덩굴에는 엽맥황화 등의 병징이 나타나며 담배가루이에 의해 영속전염되지만, 즙액접종은 할 수 없으며 주로 가지과 식물이 기주이나 소수의 국화과 식물, 인동덩굴이 주요기주이다.

나. 2007년 7월 제주도 시설하우스 토마토에서 처음 발견되었으며 감염된 식물은 잎의 가장자리가 황화되면서 위쪽 방향으로 잎말림 증상이 나타나고, 잎 두께가 두꺼워지며 더 심한 경우에는 줄기마디가 짧아지며 총생 및 왜화를 보인다.

다. 2007년 발견된 TbLCV는 부양친형인 일본계 *Honeysuckle yellow vein mosaic virus* 와 주 양친형인 일본계 TbLCV 사이에 재조합된 바이러스로 확인되었고, 최근 발생되지 않던 TbLCV가 2015년 9월 인천 강화군의 토마토에 감염이 된 것을 확인할 수 있었다. 강화지역의 TbLCV 유전자 염기서열 분석을 통하여 기존에 보고된 TbLCV 분리주와의 상관관계를 분석한 결과, 2015년 발생된 TbLCV는 2007년 국내 김제에서 발생한 TbLCV와 유사한 것으로 보였다 (그림 5-1-1).

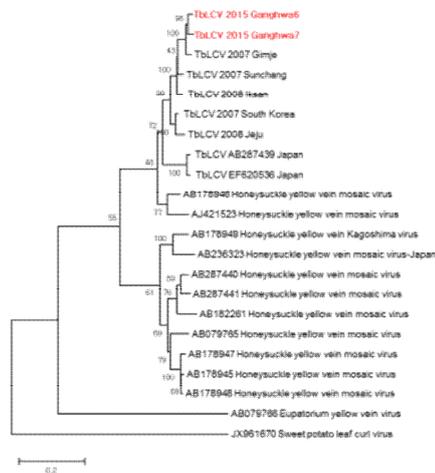


그림 5-1-1. 담배잎말림바이러스(TbLCV)의 유전자 계통 분석

6절. 가루이류 매개 바이러스의 진단용 DNA 칩 개발 및 제작

1. LSON chip을 이용한 식물바이러스의 진단

가. 가루이 매개 바이러스인 TYLCV, TbLCV, HYVV, ToCV, SPLCV 등을 포함한 1,100여종의 식물바이러스를 대상으로 식물바이러스 데이터베이스를 이용하여 특이 올리고머를 제작하였다. 44,000개의 올리고머 probe spots를 한 개의 칩에 4arrays로 제작하여 4종의 시료를 동시에 진단할 수 있는 새 버전의 칩을 개발하였다(그림 6-1-1). 이 칩의 프로브 중에는 가루이류 매개 바이러스는 49 종과 그 유사 바이러스 종을 진단할 수 있는 프로브가 포함되어 있으며 그 바이러스 종 목록은 표 6-1-1과 같다.

표 6-1-1. LSON chip에 포함된 가루이류 매개 바이러스 48종

No.	Virus genus	Virus name
1	Begomovirus	<i>Abutilon mosaic virus</i>
2		<i>Ageratum leaf curl virus</i>
3		<i>Ageratum yellow vein virus</i>
4		<i>Blainvillea yellow spot virus</i>
5		<i>Chilli leaf curl virus</i>
6		<i>Chino del tomate virus</i>
7		<i>Cleome leaf crumple virus</i>
8		<i>Clerodendron golden mosaic virus</i>
9		<i>Corchorus golden mosaic virus</i>
10		<i>Corchorus yellow vein mosaic virus</i>
11		<i>Cotton leaf curl virus</i>
12		<i>Crassocephalum yellow vein virus</i>
13		<i>Dalechampia chlorotic mosaic virus</i>
14		<i>Dicliptera yellow mottle virus</i>
15		<i>East African cassava mosaic virus</i>
16		<i>Euphorbia leaf curl virus</i>
17		<i>Hemidesmus yellow mosaic virus</i>
18		<i>Honeysuckle yellow vein virus</i>
19		<i>Jatropha mosaic virus</i>
20		<i>Macroptilium yellow mosaic virus</i>
21		<i>Malvastrum coromandelianum yellow vein virus</i>
22		<i>Malvastrum leaf curl virus</i>
23		<i>Malvastrum yellow mosaic virus</i>
24		<i>Malvastrum yellow vein virus</i>
25		<i>Okra mottle virus</i>
26		<i>Pepper leaf curl virus</i>
27		<i>Pepper yellow leaf curl virus</i>
28		<i>Pouzolzia golden mosaic virus</i>
29		<i>Rhynchosia golden mosaic virus</i>
30		<i>Rhynchosia yellow mosaic virus</i>
31		<i>Sida mosaic virus</i>
32		<i>Sida yellow blotch virus</i>
33		<i>Siegesbeckia yellow vein virus</i>
34		<i>Soybean chlorotic spot virus</i>
35		<i>Squash leaf curl virus</i>
36		<i>Squash mild leaf curl virus</i>
37		<i>Squash yellow mild mottle virus</i>

38		<i>Stachytarpheta leaf curl virus</i>
39		<i>Sweet potato leaf curl virus</i>
40		<i>Tobacco leaf curl virus</i>
41		<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i>
42		<i>Tomato leaf curl virus</i>
43		<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>
44		<i>Watermelon chlorotic stunt virus</i>
45		<i>West African Asystasia virus</i>
46		<i>Wissadula golden mosaic virus</i>
47	Crinivirus	<i>Sweet potato chlorotic stunt virus</i>
48		<i>Tomato chlorosis virus</i>
49		<i>Tomato infectious chlorosis virus</i>

나. 칩에 있는 probe의 발색여부와 probe정보를 분석하여 국내에서 미동정된 바이러스들을 보고할 수 있었다. 바이러스 10종이 감염된 있는 각각의 시료를 혼합하여 total RNA를 추출하여 1개의 칩으로 진단한 결과 10종에 대해 동시진단이 가능함을 확인하였다 (표 6-1-2, 그림 6-1-2).



그림 6-1-1. 2014년 LSON chip - Agilent사

표 6-1-2. 바이러스 10종에 대한 LSON chip결과

No.	Virus name	Probe	Detection	%	R=1000, G=800	
1	<i>Alfalfa mosaic virus</i>	231	168	72.73	169	73.16
2	<i>Broad bean wilt virus 2</i>	406	55	13.55	89	21.92
3	<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i>	258	194	75.19	194	75.19
4	<i>Cucumber mosaic virus</i>	1399	601	42.96	680	48.61
5	<i>Pepper mild mottle virus</i>	295	272	92.20	275	93.22
6	<i>Tomato spotted wilt virus</i>	1136	122	10.74	287	25.26
7	<i>Turnip mosaic virus</i>	345	302	87.54	308	89.28
9	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>	108	30	27.78	38	35.19
10	<i>Tobacco mosaic virus</i>	328	5	1.52	5	1.52

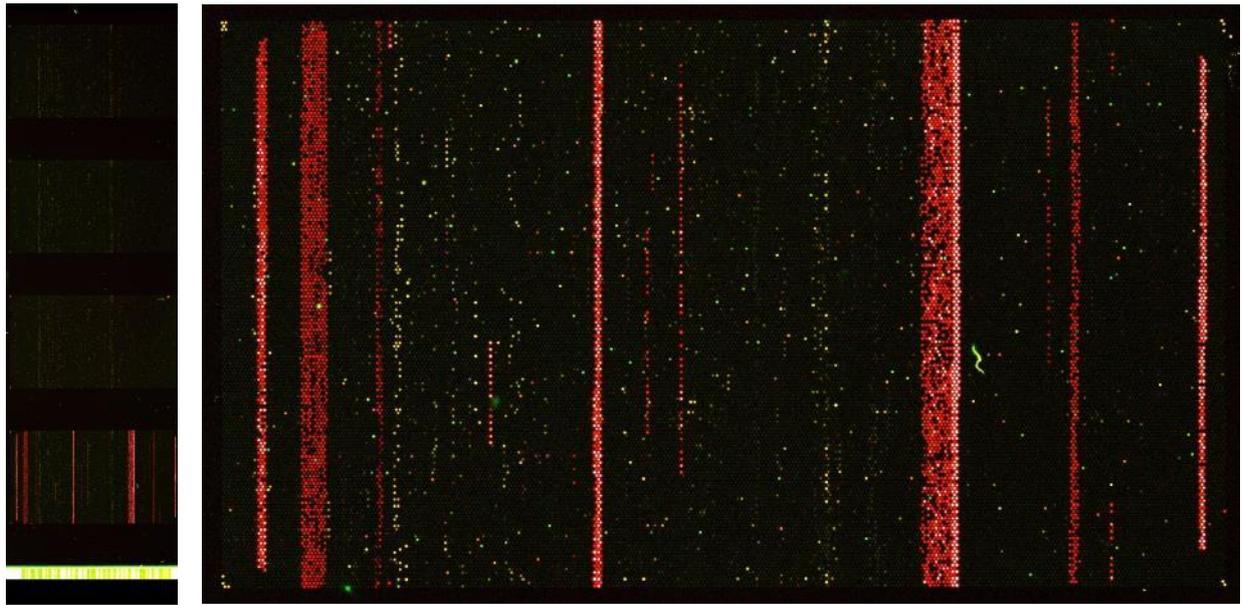


그림 6-1-2. LSON chip 이용한 바이러스 10종 진단 결과: 4개의 array로 나뉜 칩(좌). 바이러스 별 특이점이 발색된 probe(우)

4장. 제3협동과제 (농진청)

1절. 가루이 매개 바이러스의 기주 잡초 구명

1. 가루이류 및 가루이 매개 바이러스 기주식물 분석함
2. 토마토황화잎말림바이러스(TYLCV) 및 토마토퇴록바이러스(ToCV)감염 신규 기주잡초를 밝힘
3. 기주잡초의 제미니바이러스 종자전염 가능성 분석함
4. 벼과 잡초의 제미니바이러스 기주여부 구명함

1. 인위적 실험조건에서 담배가루이 및 바이러스 증식 기주잡초 탐색

가. 망실 하우스 내부 잡초군락 조성

(1) 잡초 채집 및 이식

잡초에서의 토마토황화잎말림바이러스 보독 담배가루이 증식 및 바이러스감염 여부를 확인하기 위해 6*7.2m(43.2㎡) 온실 내부에 2012. 4. 18~7. 6 까지 9회에 걸쳐 자연조건에서 생육중인 잡초를 채집하여 이식하였다. 이식 잡초 22과 59종에 대한 과별 현황은 국화과가 22종으로 가장 많았다. 생활형별로는 하계일년생이 35종으로 가장 많았으며 그 다음으로 다년생 18종 및 동계일년생 6종순이었다.(표 1-1)

표 1-1. 망실 하우스 내부 잡초 이식현황

과명	종수	개체수	과명	종수	개체수	과명	종수	개체수
국화과	22	61	명아주과	3	8	가지과	2	5
마디풀과	9	29	메꽃과	2	7	기타 15과	15	48
비름과	4	12	콩과	2	6	전체 22과	59종	176개체

(2) 잡초 배치 및 조사대상 종 선정

잡초의 토마토황화잎말림바이러스 보독 담배가루이 증식 및 바이러스 감염 여부를 확인하기 위해 망실 하우스 내부에 잡초를 식재한 배치도 및 조사 대상 종(번호로 표시, 1~60)은 그림 1과 같다. 잡초 이식 후 잡초 생육 기간이 경과하면서 일부 종 및 개체가 해충의 피해를 받거나 동계일년생의 경우 자연적인 요인에 의해 고사하였다. 조사 대상은 종당 1개체를 기준으로 하였으나 일부 종은 2개체씩 조사하여 주변 잡초가 담배가루이 증식에 영향을 미치는지 여부를 추정하는데 활용하였다.

표 1-2. 망실 하우스 내부 잡초 이식 세부현황

생활형	과	종	이식 개체수	생활형	과	종	이식 개체 수
다년생 (18)	괭이밥과	선괭이밥	10	하계 일년생	국화과	울산도깨비바늘	3
	국화과	똥딴지	2		국화과	한련초	6
	국화과	머위	4		꿀풀과	쥐개풀	2
	국화과	미국썩부쟁이	3		닭의장풀과	닭의장풀	4
	국화과	사대풀	3		대극과	깨풀	4
	국화과	서양민들레	3		마디풀과	개여뀌	4
	국화과	썩	3		마디풀과	고마리	3
	대극과	토끼풀	3		마디풀과	며느리배꼽	1
	마디풀과	돌소리쟁이	5		마디풀과	큰개여뀌	3
	마디풀과	소리쟁이	3		마디풀과	털여뀌	3
	마디풀과	좁소리쟁이	4		메꽃과	미국나팔꽃	3
	마디풀과	참소리쟁이	3		명아주과	좁명아주	3
	메꽃과	큰메꽃	4		명아주과	취명아주	2
	비름과	털쇠무릎	3		명아주과	흰명아주	3
	산형과	미나리	3		박주가리과	박주가리	2
	석주과	쇠별꽃	3		비름과	가는털비름	3
	자리공과	미국자리공	3		비름과	개비름	3
	질경이과	개질경이	2		비름과	청비름	3
하계 일년생 (35)	가지과	까마중	3	삼과	환삼덩굴	2	
	가지과	땅파리	2	쇠비름과	쇠비름	4	
	국화과	단풍잎돼지풀	2	아욱과	어저귀	2	
	국화과	돼지풀	3	콩과	돌콩	3	
	국화과	미국가막사리	3	현상과	미국외풀	2	
	국화과	붉은서나물	1	동계 일년생 (6)	국화과	가시상치	3
	국화과	왕고들빼기	3		국화과	개망초	4
	국화과	중대가리풀	1		국화과	망초	3
	국화과	큰도꼬마리	3		국화과	주걱개망초	1
	국화과	털별꽃아재비	3		바늘꽃과	달맞이꽃	3
국화과	털진득찰	1	양귀비과		애기똥풀	2	
국화과	도깨비바늘	3	계	22과 59종 176개체			

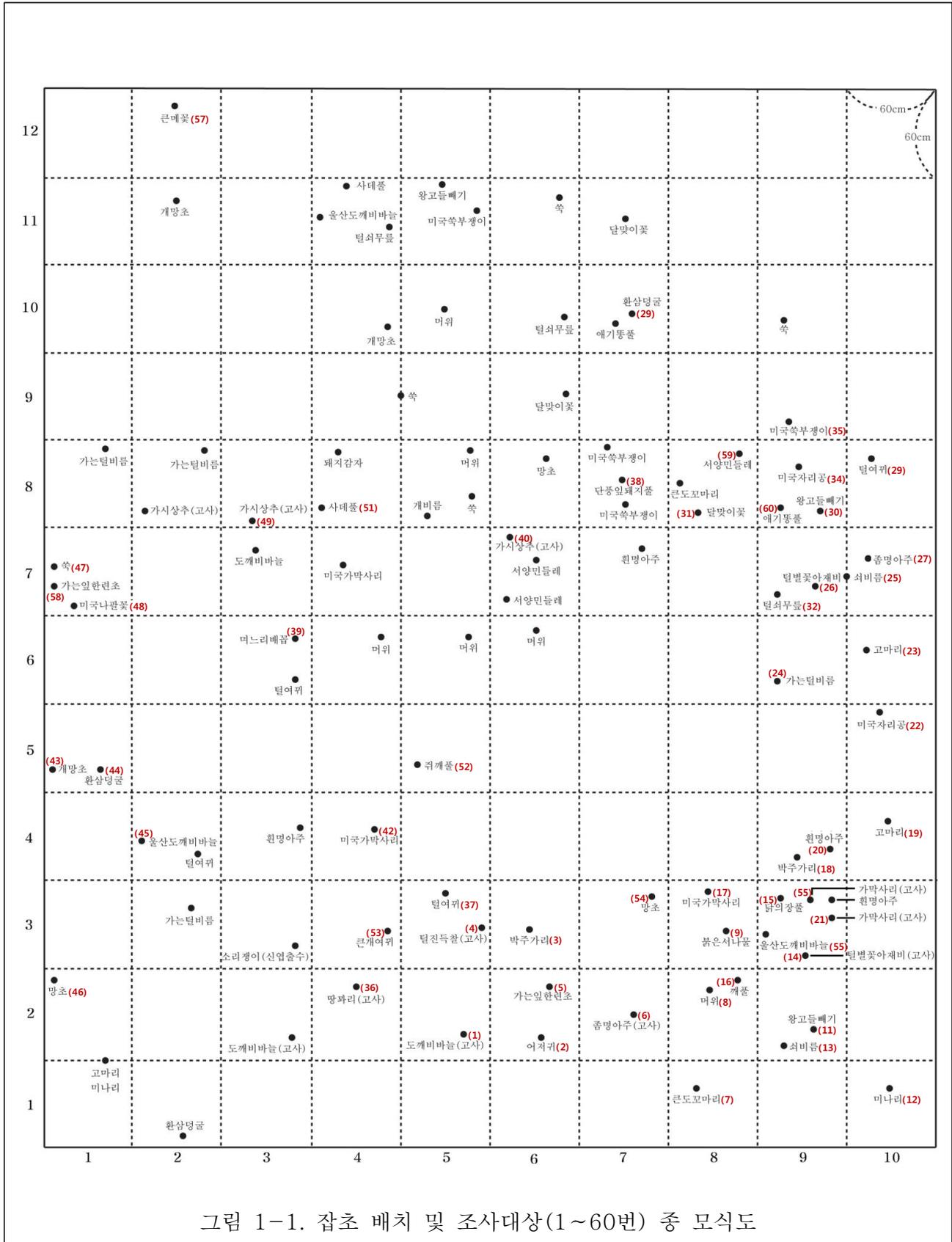


그림 1-1. 잡초 배치 및 조사대상(1~60번) 중 모식도



망실 하우스 내부 잡초 배치 전경



60*60cm 방형구 설치 전경

그림 1-2. 잡초 배치 및 방형구 설치 전경

(3) 토마토황화잎말림병(TYLCV) 보독 담배가루이 증식 및 방사

TYLCV 보독 담배가루이 증식을 위해, 2012년 5월 25일 성균관대학교에서 TYLCV 감염 토마토를 기주식물로 이용하여 증식 중이던 TYLCV 보독 담배가루이를 분양 받아 국립 농업과학원에서 토마토를 기주작물로 하여 2012년 5월 25일부터 7월 5일까지 42일간 증식시켰다. 방사 시 새로운 환경에 적응할 수 있도록 잡초를 이식한 망실 하우스에서 7일간 적응기간을 거친 후 방사하였다.(그림 1-3)



TYLCV감염 토마토에서 보독 담배가루이 증식 장면



보독 담배가루이 방사 전경-1



보독 담배가루이 방사 전경-2

그림 1-3. 망실하우스 내부 TYLCV 보독 담배가루이 증식 및 방사 전경

(4) 담배가루이 증식 및 TYLCV 감염 기주잡초 조사

담배가루이 증식 기주잡초 바이러스 감염기주 조사를 위하여 TYLCV 보독 담배가루이를 잡초 식재 망실하우스에 방사 한 후, 바이러스 감염기주 조사는 2012년 8월 13일부터 10월 17일 까지 3회(8월 13~28일, 9월 27일, 10월 17일) 실시하였다.

바이러스 조사용 잡초시료 채집은 신엽 위주로 하였으며 불가피하게 잎을 이용 할 수 없는 경우에는 줄기를 사용하였다. 또한 담배가루이 증식 기주 잡초는 2012년 8월 27일 1회 조사하였다. 조사방법은 잎 면적을 고려하여 잎 1매를 기준으로 하였으나 잎이 작을 경우 조사 시 오류를 줄일 목적으로 잎 개수를 탄력적으로 조정하였다. 잎 면적은 엽면적 측정기

(LI-3100 AREA METER)를 사용하였다. 약층 조사 시 채집한 잎 전체를 대상으로 1~3, 4령 및 용각을 구분하여 조사한 후 10cm²당 약층 수로 환산하였다. 담배가루이 증식 정도 및 바이러스 감염여부를 조사하기 위한 대상 잡초는 22과 46종 60개체이다(표 1-3).

표 1-3. 담배가루이 증식 정도 및 바이러스 감염여부

과	종	생활형	잡초 번호	조사엽 수	엽면적(cm ²)		전체 엽당 약충 수(마리)				10cm ² 당 약충 수	1 엽당 약충 수 (마리)	바이러스 감염여부
					전체	엽당 엽면적	1~3령	4령	용각	전체			
국화과	가는잎한련초	SA	5	1	33.7	33.7	2	15	133	150	44.5	4.5	
	가는잎한련초	SA	58	3	81.7	27.2	720	330	90	1,140	139.5	41.9	◎
	가막사리	SA	21	3	83.1	27.7	32	3	3	38	4.6	1.4	◎
	가막사리	SA	56	1	64.9	64.9	1,083	458		1,541	237.4	23.7	◎
	가시상추	WA	40	4	106.6	26.7	0	1	7	8	0.8	0.3	
	가시상추	WA	49	7	121.3	17.3	3	0	1	4	0.3	0.2	
	개망초	WA	43	14	164.6	11.8	0	0	30	30	1.8	2.6	◎
	단풍잎돼지풀	SA	38	3	659.8	219.9	572	94	106	772	11.7	3.5	
	도깨비바늘	SA	1	9	132.2	14.7	48	38	47	133	10.1	9.1	◎
	돼지감자	P	37	7	824	117.7	160	269	298	727	8.8	6.2	◎
	망초	WA	46	11	150.3	13.7	1	0	19	20	1.3	1.5	
	망초	WA	54	12	47.2	3.9	1	0	16	17	3.6	4.3	
	머위	P	8	2	840.2	420.1	7	0	8	15	0.2	0.0	
	미국가막사리	SA	17	4	234.9	58.7	745	100	144	989	42.1	16.8	
	미국가막사리	SA	42	1	69	69.0	454	721	166	1,341	194.3	19.4	
	미국쑥부쟁이	P	35	18	69.4	3.9	0	0	0	0	0.0	0.0	
	붉은서나물	SA	9	1	62.4	62.4	13	46	3	62	9.9	1.0	
	사대풀	P	51	5	319.1	63.8	2	0	13	15	0.5	0.2	
	서양민들레	P	59	7	356.4	50.9	0	0	4	4	0.1	0.1	
	쑥	P	47	10	86.8	8.7	21	0	6	27	3.1	3.1	
	왕고들빼기	SA	11	1	115.4	115.4	25	2	0	27	2.3	0.2	
	왕고들빼기	SA	30	3	108.1	36.0	4	0	0	4	0.4	0.1	
	울산도깨비바늘	SA	45	4	227.7	56.9	939	680	1091	2710	119.0	47.6	
	울산도깨비바늘	SA	55	4	231.1	57.8	584	343	523	1450	62.7	25.1	
	큰도꼬마리	SA	7	1	312.1	312.1	14	11	28	53	1.7	0.2	
	털별꽃야재비	SA	14	3	65.6	21.9	49	24	137	210	32.0	9.6	
털별꽃야재비	SA	26	5	51.9	10.4	36		8	44	8.5	4.2		
털진득찰	SA	4	1	151.4	151.4	153	34		187	12.4	1.2		
마디 풀과	고마리	SA	23	5	96.6	19.3	0	0	0	0	0.0	0.0	
	고마리	SA	19	6	74.4	12.4	0	0	0	0	0.0	0.0	
	머느리배꼽	SA	39	4	113.5	28.4	1	0	7	8	0.7	0.3	
	큰개여뀌**	SA	53	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	◎
	털여뀌	SA	28	5	422.6	84.5	9	1	10	20	0.5	0.2	

(계속)

과	종	생활형*	잡초 번호**	조사 업수	엽면적(㎢)		전체 엽당 약충 수(마리)				10㎢당 약충 수	1 엽당 약충 수 (마리)	바이러스 감염여부
					전체	잎당 엽면적	1~3령	4령	용각	전체			
비름과	가는털비름	SA	24	5	93.6	18.7	0	0	0	0	0.0	0.0	
	개비름	SA	10	3	34.1	11.4	1	1	1	3	0.9	0.3	
	청비름	SA	50	5	80.7	16.1	11	0	3	14	1.7	0.9	◎
	털쇠무릎	P	32	7	335.5	47.9	7		20	27	0.8	0.6	
메꽃과	미국나팔꽃	SA	48	3	157.1	52.4	776	154	13	943	60.0	18.0	
	큰메꽃	P	57	3	64.5	21.5	620	549	816	1,985	307.8	92.3	◎
명아주과	증명아주	SA	6	1	4	4.0	0	0	0	0	0.0	0.0	
	증명아주	SA	27	5	36.3	7.3	3	0	0	3	0.8	0.4	
	흰명아주	SA	20	5	100.2	20.0	0	0	0	0	0.0	0.0	◎
대극과	깨풀	SA	16	5	124.7	24.9	224	13	1	238	19.1	9.5	
	깨풀	SA	61	3	78.6	26.2	1,879	189	185	2,253	286.6	86.0	
삼과	환삼덩굴	SA	29	3	183.3	61.1	0	0	0	0	0.0	0.0	
	환삼덩굴	SA	44	1	90.4	90.4	1,219	352	324	1,895	209.6	21.0	
쇠비름과	쇠비름	SA	13	3	15.6	5.2	0	0	0	0	0.0	0.0	
	쇠비름	SA	25	10	21.6	2.2	0	0	0	0	0.0	0.0	
박주가리과	박주가리	SA	3	1	69.8	69.8	4	0	0	4	0.6	0.1	◎
	박주가리	SA	18	5	216.6	43.3	2	1	0	3	0.1	0.1	◎
자리공과	미국자리공	P	22	3	431.7	143.9	7	0	1	8	0.2	0.1	
	미국자리공	P	34	4	437.2	109.3	0	0	0	0	0.0	0.0	◎
석죽과	쇠별꽃	P	41	2	28.8	14.40	54	111	251	416	144.4	28.9	◎
콩과	돌콩	SA	33	26	791	30.42	15	7	10	32	0.4	1.1	◎
꿀풀과	쥐깨풀	SA	52	10	69.9	6.99	1	1	18	20	2.9	2.9	
닭의장풀과	닭의장풀	SA	15	5	99.3	19.86	24	1	0	25	2.5	1.3	
가지과	땅파리	SA	36	8	378.2	47.28	225	166	1,381	1,772	46.9	37.5	
아욱과	어저귀	SA	2	1	214.7	214.70	216	213	94	523	24.4	2.4	◎
양귀비과	애기뽕풀	P	60	5	136.8	27.36	0	0	0	0	0.0	0.0	
미나리과	미나리	P	12	5	47.8	9.56	3	0	2	5	1.0	0.5	
바늘꽃과	달맞이꽃	WA	31	8	261.5	32.69	52	6	123	181	6.9	5.5	

*: SA: 하계일년생, WA: 동계일년생, BI: 이년생, P: 다년생

** : 그림 1의 잡초 배치 및 조사대상(1~60번) 중 모식도 참조

*** : 살충제 처리가 불가능한 조건으로서 돼지풀잎벌레의 피해로 인해 바이러스 검정만 수행하였다.

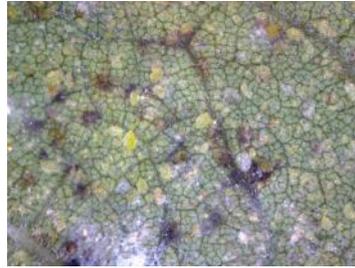
(가) 담배가루이 증식 기주잡초

조사대상 잡초 22과 46종 60개체 중 담배가루이가 증식한 것으로 밝혀진 잡초는 국화과 가는잎한련초 등 38종이었다. 이 중 약충 마릿수가 10㎢ 당 100개체 이상인 기주잡초는 국화과의 가는잎한련초, 가막사리, 미국가막사리, 울산도깨비바늘, 메꽃과의 큰메꽃, 대극과의 깨풀, 삼과의 환삼덩굴 및 석죽과의 쇠별꽃 8종이었다. 잎당 약충 수가 10마리 이상인 종은 12종이었으며, 이들 잡초 중 메꽃과의 큰메꽃이 잎 당 92.3마리로 가장 많은 약충이 발생하

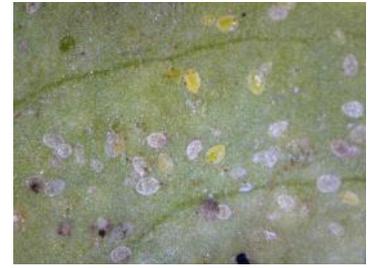
고 있었으며, 다음으로 대극과의 깨풀이 86마리였다. 실제로 큰메꽃의 경우 담배가루이 선호도가 매우 높아 그을음 현상으로 인해 식물체가 조기 고사하는 것을 관찰 할 수 있었다.



환삼덩굴(44)



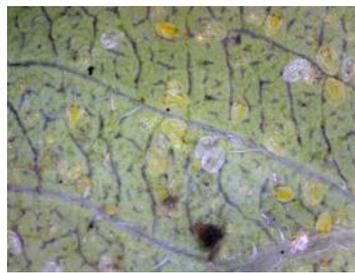
돼지감자(37)



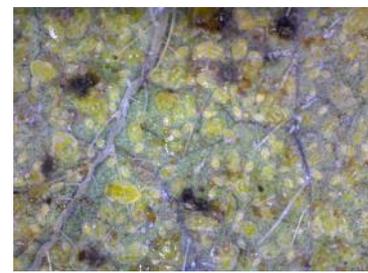
쇠별꽃(41)



미국가막사리(42)



울산도깨비바늘(45)



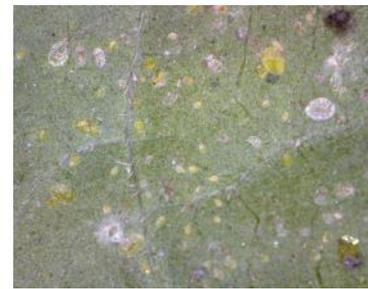
미국나팔꽃(48)



가막사리(56)



가는잎한련초(58)



깨풀(61)

그림 1-4. 담배가루이 증식에 중요한 주요 기주잡초

(나) 토마토황화잎말림바이러스(TYLCV) 감염 기주잡초

조사대상 잡초 22과 46종 60개체 중 TYLCV에 감염된 잡초 기주는 아욱과의 어저귀 등 13종이었다. 과별 감염 중 현황을 살펴보면 국화과는 가는잎한련초 등 5종, 비름과의 청비름, 메꽃과의 큰메꽃, 명아주과의 흰명아주, 박주가리과의 박주가리, 자리공과의 미국자리공, 석죽과의 쇠별꽃, 콩과의 돌콩 및 아욱과의 어저귀 등이었다. 담배가루이 증식 효율이 우수하면서 바이러스 감염이 확인 된 잡초기주는 국화과의 가는잎한련초와 가막사리, 메꽃과의 큰메꽃, 석죽과의 쇠별꽃 3종으로 조사되었다.

2. TYLCV 발생 토마토 재배농가에서 바이러스 및 가루이류 증식기주 잡초조사

TYLCV가 발생하고 있는 토마토 재배 농가에서 바이러스 및 가루이류 증식 기주 잡초 조사를 위해 2012년 3월 6일부터 8일까지 구례, 김제 및 담양의 3농가를 조사하였다.(표 2-1)

구례군 농가의 경우 2011년에 TYLCV가 최초 발생해서 피해를 입은 농가로서 2011년 9월 15일 재 정식하여 2012년 3월 20일에 작기를 마칠 예정으로서 조사 당시에는 작기를 마치기 직전이었다. 이 농가의 경우 2011년 최초 피해 후 저항성 방울 토마토를 정식한 경우이다. 하우스 내부의 가장자리에서 주홍서나물 등 3종의 잡초를 조사한 결과, 가루이류는 주로 담배가루이가 발생하고 있었으며 TYLCV는 망초에서 만 감염을 확인하였다.

김제시 김성희 농가(800평)의 경우 만경 소재 이레육묘장에서 대과종 토마토 묘를 구입하여 2011년 12월 1일~3일에 정식하였으며 2012년 5월 말 작기를 마무리하는 농가이다. 조사대상 잡초에는 담배가루이보다 온실가루이가 더 많이 증식하고 있었으며 큰망초와 뿌리뱅이에서 온실가루이의 증식이 많이 이루어지고 있음을 확인하였다. 이 농가의 경우 큰망초 등 5종의 잡초에서 가루이류 증식 및 바이러스 감염여부를 조사하였다. 그 결과 동계 일년생인 큰망초 5개체 중 2개체, 다년생 잡초인 참소리쟁이 1개체에서 TYLCV 감염을 확인하였다. 큰망초 1개체 및 뿌리뱅이 2개체에서는 약하게 감염되어 있음을 확인하였다. TYLCV 감염 잡초 중 조사 당시 담배가루이를 확인하지 못한 큰망초-4와 5번 및 참소리쟁이의 경우는 흡즙 후 담배가루이가 이동한 결과로 판단된다.

담양군 조사농가의 경우 2011년 10월 상순에 방울토마토(품종: 유니콘)를 정식하여 2012년 5월 20일에 작기를 마무리 할 계획으로 있어서 조사 당시 재배 베드에 잡초가 비교적 많이 발생하고 있었다. 이 농가의 경우 망초 등 4종의 잡초에서 TYLCV 감염을 확인하였으나 담배가루이는 발견하지 못했다.

표 2-1. TYLCV 발생 토마토 재배농가에서 바이러스 및 가루이류 증식 기주잡초 조사

조사지역 및 농가	과	생활형	종	온실가루이(마리/잎)**		담배가루이(마리/잎)		바이러스 감염여부*	
				약충	성충	약충	성충		
담양군 (정○○ 농가)	국화과	동계일년생	망초(3)	7	多	0	0	◎	
			망초(4)	0	5	0	0	※	
			망초(5)	0	0	0	0	-	
			방가지뚝	0	0	0	0	◎	
			큰방가지뚝	0	多	0	0	◎	
		하계일년생	가는잎한련초(잎-1)	14	多	0	0	-	
			가는잎한련초(잎-2)	11	多	0	0		
			가는잎한련초(잎-3)	4	多	0	0		
		꼭두서니과	동계일년생	갈퀴덩굴	0	2	0	0	◎

(계속)

조사지역 및 농가	과	생활형	종	온실가루이(마리/잎)**		담배가루이(마리/잎)		바이러스 감염여부*
				약충	성충	약충	성충	
김제시 (김○○ 농가)	국화과	동계일년생	큰망초-1(잎-1)	56	0	14	0	◎
			큰망초-1(잎-2)	32	0	0	0	
			큰망초-1(잎-3)	40	0	11	0	
			큰망초-2	14	0	0	0	
			큰망초-3	3	7	0	0	
			큰망초-4	12	多	0	0	
			큰망초-5	0	9	0	0	
			뿌리뱅이-1(잎-1)	103	15	3	0	
			뿌리뱅이-1(잎-2)	59	0	0	0	
			뿌리뱅이-1(잎-3)	27	0	0	0	
			뿌리뱅이(2)	0	3	4	多	
	하계일년생	가는잎한련초	2	0	0	0	-	
	비름과	하계일년생	개비름	3	0	0	0	-
마디풀과	다년생	참소리쟁이	0	0	0	0	◎	
구례군	국화과	동계일년생	주홍서나물	0	0	0	4	-
			뿌리뱅이	0	3	0	2	-
			망초-1	0	0	0	5	-
			망초-2	0	0	0	7	◎

*: ※ - 바이러스 검정 시 약한 밴드가 관찰됨.

** : 가루이류 성충을 농가현장에서 조사 시 개체수가 많은 경우 마릿수를 계수하지 못해 「多」로 표현하였다.

3. 자연조건(유리온실)에서 담배가루이 및 바이러스 증식 잡초기주 탐색

가. 조사 대상 토마토 재배농가 개요

잡초기주 조사 당시 농가에서는 토마토황화잎말림바이러스(TYLCV)에 저항성인 데프니스 품종을 재배중이어서 TYLCV감염 증상은 전무하였으나 토마토퇴록바이러스(ToCV)에는 100%감염된 상태였다. 조사 대상 농가는 2012년에 TYLCV에 감수성인 방울토마토를 재배하여 TYLCV에 의해 피해를 본 바 있었으며, 이때 낙과 된 방울토마토가 2013년에 자연 발아하여 증식하고 있었는데 이들 잡초화 된 방울토마토의 대부분 개체에서 TYLCV증상이 뚜렷하였다. 또한 조사 대상 농가는 토양 관비재배를 하는 과정에서 풋마름병 유사증상에 의해 피해를 보았으며, 피해 지점은 잡초 및 잡초화 된 방울토마토를 방치함으로써 자연조건에서 담배가루이 증식 및 TYLCV, ToCV 감염 잡초기주를 탐색하는데 매우 좋은 환경이었다.(그림 3-1, 3-2)



사진 3-1. 토마토 재배 하우스 내부(꽃마름병 발생지점에 방치된 잡초 및 토마토)



ToCV에 감염된 토마토(테프니스)



방치 토마토(테프니스)에서 ToCV 감염 증상



TYLCV에 감염된 잡초화된 방울토마토



TYLCV에 감염된 방울토마토와 잡초들

사진 3-2. 토마토 재배 하우스 내부의 여러 장면들

나. 하우스 내부에서 자연 발생하여 생육한 조사대상 잡초

잡초에서 토마토황화잎말림바이러스(TYLCV)와 토마토퇴록바이러스(ToCV) 감염 및 담배가루이 증식여부를 확인하기 위해, 이 두 종의 바이러스에 심하게 감염된 토마토 재배농가(전북 익산시 망성면 소재, 재배면적 5000평)의 유리 온실 내부에서 자연 발생하여 생육중인 잡초를 채집하여 조사하였다. 조사대상 잡초는 16과 37종 93개체였다. 과별 현황을 보면 국화과가 8종 23개체로 가장 많았으며, 화본과 6종, 마디풀과 석죽과 각 3종이었다.(표 3-1)

표 3-1. 토마토 재배 하우스 내부 자연발생 잡초 조사현황

과 명	종수	개체수	과 명	종수	개체수	과 명	종수	개체수
국화과	8	23	십자화과	2	6	새모래덩굴과	1	3
화본과	6	11	명아주과	2	5	지리공과	1	3
마디풀과	3	6	두과	2	4	지치과	1	2
석죽과	3	8	꼭두서니과	1	3	현삼과	1	3
가지과	2	7	대극과	1	3	전체 16과	37종	93개체
괭이밥과	2	5	사초과	1	1			

다. 담배가루이 증식 기주잡초

자연 발생하여 생육중인 잡초를 채집하여 종 당 표준이 되는 잎 1매를 대상으로 0.25cm²의 면적을 4회 조사하여 이들 약충 마릿수를 합해 1cm²로 계산하였다. 조사 시 알은 조사 대상에서 제외하였으며, 성충은 영기별로 고려하지 않고 통합하여 계수하였다.

자연조건에서 채집한 16과 37종 중 담배가루이가 증식하고 있는 잡초는 국화과의 가는잎한련초를 비롯한 21종이었다(표 3-2). 화본과 잡초 6종을 포함한 16종의 잡초는 담배가루이 증식기주가 아님을 확인하였다. 국화과 잡초 8종 중 떡썩을 제외한 7종에서 담배가루이가 증식함을 확인하였으며, 특히 망초, 개망초, 붉은서나물, 큰방가지뚱 및 가는잎한련초가 담배가루이 증식에 매우 효과적인 잡초임을 확인하였다. 가을강아지풀 등 화본과 잡초 6종은 담배가루이 약충이 발견되지 않아 증식기주로서 역할을 하지 못함을 확인하였다. 마디풀과 3종 중 개여뀌에서 담배가루이 약충을 확인하였다. 별꽃 등 석죽과 잡초 3종 중 별꽃과 쇠별꽃이 증식기주로 확인되었다. 특히 쇠별꽃은 별꽃에 비해 증식 정도가 우수하였음을 확인하였다. 가지과 잡초인 까마중과 미국까마중은 토마토와 같은 과 잡초로서 담배가루이 증식에 매우 중요한 역할을 하고 있음을 확인하였다. 특히 미국까마중은 까마중보다 월등히 우수한 증식기주임이 확인되었다. 십자화과, 두과, 사초과 및 새모래덩굴과 잡초는 증식기주로 부적합함을 확인하였다. 대극과의 깨풀은 망초와 더불어 매우 중요한 담배가루이 증식기주로 확인되었다. 결론적으로 담배가루이 증식 기주잡초로서 큰 역할을 하고 있는 잡초는 국화과의 망초 및 큰방가지뚱, 가지과의 미국까마중, 대극과의 깨풀 3종이었다.

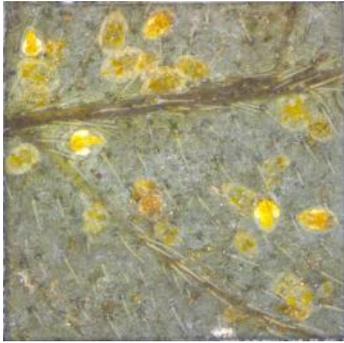
표 3-2. 토마토 하우스 내부에서 자연 발생한 잡초에서 종별 담배가루이 증식현황

과	종	생활형*	담배가루이 약충 수 (마리/1cm ²)
석죽과	별꽃	WA, SA	8
	쇠별꽃	P	28
	유럽점나도나물	WA	0
꼭두서니과	갈퀴덩굴	WA	5

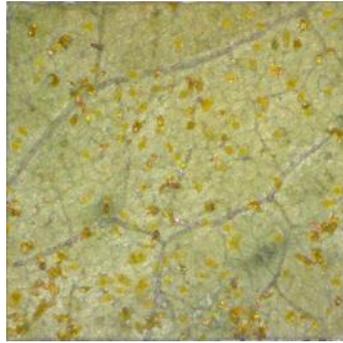
(계속)

과	종	생활형*	담배가루이 약충 수 (마리/1㎡)
국화과	가는잎한련초	SA	72
	망초	WA	220
	개망초	WA, BI, P	112
	떡쑥	WA	0
	붉은서나물	SA	237
	보리쟁이	WA	10
	큰방가지뚱	WA, SA	90
	큰빛자루국화	SA	25
화본과	가을강아지풀	SA	0
	개밀	P	0
	논피	SA	0
	돌피	SA	0
	미국개기장	SA	0
	바랭이	SA	0
마디풀과	개여뀌	SA	17
	며느리배꼽	SA	0
	참소리쟁이	P	0
가지과	까마중	SA	26
	미국까마중	SA	94
괭이밥과	괭이밥	P	7
	붉은괭이밥	P	3
십자화과	속속이풀	P	1
	황새냉이	WA	0
명아주과	좀명아주	SA	24
	흰명아주	SA	27
두과	살갈퀴	WA	0
	얼치기완두	WA	0
대극과	깨풀	SA	140
사초과	금방동사니	SA	0
새모래덩굴과	덩덩이덩굴	P	0
자리공과	미국자리공	P	37
지치과	꽃마리	WA	0
현삼과	주름잎	SA	20

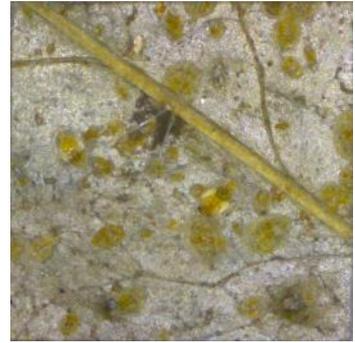
* SA: 하계일년생, WA: 동계일년생, BI: 이년생, P: 다년생



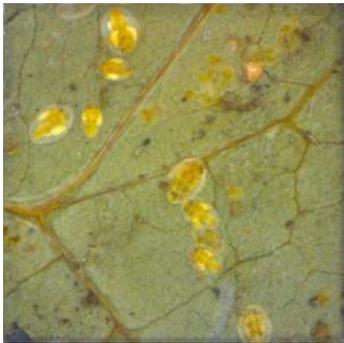
가는잎한련초



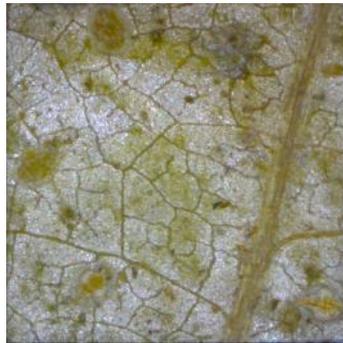
망초



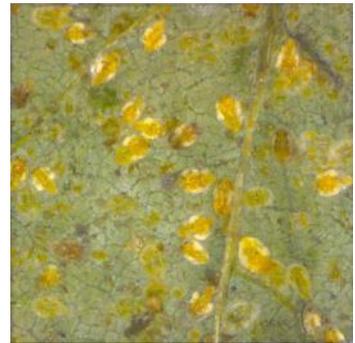
개망초



큰방가지똥



까마중



미국까마중



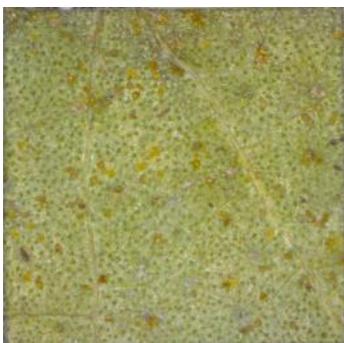
쇠별꽃



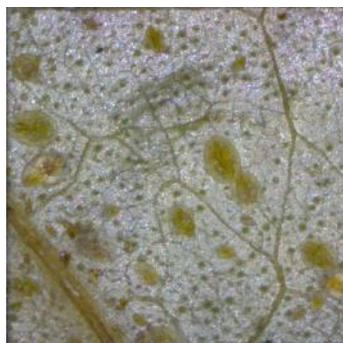
좀명아주



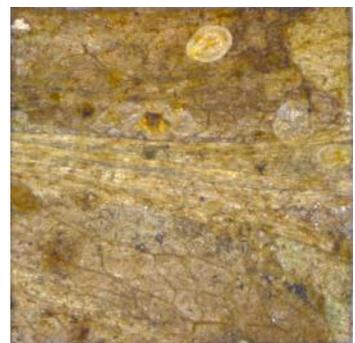
흰명아주



깨풀



미국자리공



주름잎

그림 3-3. 담배가루이 증식에 중요한 주요 기주잡초(1cm²)

라. 토마토황화잎말림바이러스(TYLCV) 및 토마토퇴록바이러스(ToCV) 감염

기주잡초

자연조건에서 채집한 16과 37종 93개체의 잡초에서 TYLCV와 ToCV 감염여부를 확인하기 위하여 뿌리를 액체질소로 마쇄한 뒤, 바이러스 게놈 추출 키트(Intron, Viral gene-spin kit)를 이용하여 전체 게놈을 추출하였고 추출된 게놈을 주형으로 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR산물은 1% 아가로스겔에 100V 조건에서 1시간 동안 전기영동을 하여 확인한 결과 기주잡초는 표 3-2와 같다.

조사대상 잡초 37종 중 토마토퇴록바이러스(ToCV)에 감염된 잡초는 국화과 망초 등 16종, 토마토황화잎말림바이러스(TYLCV)에 감염된 잡초는 개망초 등 24종이었다. ToCV와 TYLCV가 복합감염된 종은 망초 등 15종이었으며, TYLCV 단독감염된 종은 붉은서나물 등 9종이었다. ToCV와 TYLCV 복합감염 잡초 중 감염율이 매우 높은 종은 국화과의 보리쟁이 및 큰방가지뚱, 석죽과의 별꽃, 가지과의 까마중 및 미국까마중, 명아주과의 흰명아주 그리고 현삼과의 주름잎 등이었다. ToCV 기주잡초를 생활형별로 분석해 보면, 다년생은 쇠별꽃, 미국자리공 2종이었으며, 하계일년생은 바랭이, 까마중, 미국까마중, 흰명아주 및 주름잎 4종이었다. 동계일년생은 망초, 보리쟁이, 유럽점나도나물, 황새냉이, 얼치기완두 및 꽃마리 6종이었다. 하계 또는 동계일년생인 종은 큰방가지뚱 및 별꽃 2종이었다. 또한 영양생장 조건에 따라 동계일년생, 이년생 및 다년생의 다양한 생활형을 보인 종은 개망초 1종이었다. TYLCV 기주잡초를 생활형별로 분석해 보면, 다년생은 쇠별꽃, 속속이풀, 땡땡이덩굴 및 미국자리공 4종이었으며, 하계일년생은 붉은서나물, 큰빛자루국화, 가을강아지풀, 돌피, 미국개기장, 바랭이, 까마중, 미국까마중, 흰명아주 및 주름잎 10종이었다. 동계일년생은 망초, 보리쟁이, 유럽점나도나물, 황새냉이, 살갈퀴, 얼치기완두, 갈퀴덩굴 및 꽃마리 7종이었다.

ToCV와 마찬가지로 하계 또는 동계일년생인 종은 큰방가지뚱 및 별꽃 2종이었으며, 영양생장 조건에 따라 동계일년생, 이년생 및 다년생의 다양한 생활형을 보인 종은 개망초 1종이었다. 특히 금번 조사 연구를 통하여 세계에서 최초로 화본과 잡초인 가을강아지풀, 돌피, 미국개기장 및 바랭이 4종이 TYLCV 기주잡초로 확인되었다.

잡초의 바이러스별 감염현황 및 담배가루이 약충 증식여부를 종합적으로 분석해 보면 표 3-3과 같다. ToCV와 TYLCV 2종 바이러스 감염 및 담배가루이 약충 증식도 이루어지지 않은 종은 국화과의 떡쭈, 화본과의 개밀 및 논피 2종, 마디풀과의 며느리배꽃 및 참소리쟁이 2종 그리고 사초과의 금방동사니 1종 등 6종이었다. ToCV와 TYLCV 2종 바이러스 감염은 안 되나 담배가루이 증식기주로서 역할을 하는 종은 가는잎한련초, 개여뀌, 팽이밥, 붉은팽이밥 및 깨풀 5종이었다. 가장 중요한 잡초기주는 바이러스 감염 뿐 아니라 매개충 증식도 가능한 경우이다. 본 연구에서 ToCV와 TYLCV 2종 바이러스 감염 및 담배가루이 약충 증식까지도 가능한 잡초로 확인된 종은 국화과의 망초, 개망초, 보리쟁이, 큰방가지뚱 4종, 석죽과의 별꽃 및 쇠별꽃 2종, 가지과의 까마중 및 미국까마중 2종, 명아주과의 흰명아주, 자리공과의 미국자리공 그리고 현삼과의 주름잎 등 11종이었다.

표 3-3. 토마토 하우스 내부에서 자연 발생한 잡초에서 종별 바이러스 감염현황

과	종	생활형*	검정 개체수	바이러스별 감염 개체수	
				ToCV	TYLCV
국화과	가는잎한련초	SA	2	0	0
	망초	WA	3	2	1
	개망초	WA, BI, P	3	1	1
	떡썩	WA	3	0	0
	붉은서나물	SA	4	0	3
	보리병이	WA	3	3	2
	큰방가지뚝	WA,SA	2	2	2
	큰빛자루국화	SA	3	0	2
화본과	가을강아지풀	SA	2	0	2
	개밀	P	1	0	0
	논피	SA	1	0	0
	돌피	SA	3	0	2
	미국개기장	SA	1	0	1
	바랭이	SA	3	1	2
마디풀과	개여뀌	SA	3	0	0
	며느리배꼽	SA	1	0	0
	참소리쟁이	P	2	0	0
석죽과	별꽃	WA, SA	5	5	5
	쇠별꽃	P	2	1	2
	유럽점나도나물	WA	1	1	1
가지과	까마중	SA	3	3	3
	미국까마중	SA	4	4	3
괭이밥과	괭이밥	P	3	0	0
	붉은괭이밥	P	2	0	0
십지화과	속속이풀	P	3	0	2
	황새냉이	WA	3	2	1
명아주과	좀명아주	SA	1	0	0
	흰명아주	SA	4	4	3
두과	살갈퀴	WA	3	0	3
	얼치기완두	WA	1	1	1
꼭두서니과	갈퀴덩굴	WA	3	0	2
대극과	깨풀	SA	3	0	0
사초과	금방동사니	SA	1	0	0
새모래덩굴과	맹덩이덩굴	P	3	0	1
자리공과	미국자리공	P	3	1	2
지치과	꽃마리	WA	2	2	0
현상과	주름잎	SA	3	2	3

* SA: 하계일년생, WA: 동계일년생, BI: 이년생, P: 다년생

표 3-4. 잡초의 바이러스별 감염현황 및 담배가루이 약충 증식여부

과	종	생활형*	바이러스별 감염 여부		약충 증식 여부
			ToCV	TYLCV	
국화과	가는잎한련초	SA	x	x	○
	망초	WA	○	○	○
	개망초	WA,BI,P	○	○	○
	떡쑥	WA	x	x	x
	붉은서나물	SA	x	○	○
	보리쟁이	WA	○	○	○
	큰방가지뚥	WA,SA	○	○	○
	큰빛자루국화	SA	x	○	○
화본과	가을강아지풀	SA	x	○	x
	개밀	P	x	x	x
	논피	SA	x	x	x
	돌피	SA	x	○	x
	미국개기장	SA	x	○	x
	바랭이	SA	○	○	x
마디풀과	개여뀌	SA	x	x	○
	머느리배꼽	SA	x	x	x
	참소리쟁이	P	x	x	x
석죽과	별꽃	WA	○	○	○
	쇠별꽃	P	○	○	○
	유럽점나도나물	WA	○	○	x
가지과	까마중	SA	○	○	○
	미국까마중	SA	○	○	○
괭이밥과	괭이밥	P	x	x	○
	붉은괭이밥	P	x	x	○
십지화과	속속이풀	P	x	○	○
	황새냉이	WA	○	○	x
명아주과	좀명아주	SA	x	x	○
	흰명아주	SA	○	○	○
두과	살갈퀴	WA	x	○	x
	얼치기완두	WA	○	○	x
꼭두서니과	갈퀴덩굴	WA	x	○	○
대극과	깨풀	SA	x	x	○
사초과	금방동사니	SA	x	x	x
새모래덩굴과	댕댕이덩굴	P	x	○	x
자리공과	미국자리공	P	○	○	○
지치과	꽃마리	WA	○	x	x
현삼과	주름잎	SA	○	○	○

2절. 기주잡초 종자전염 및 벼과잡초 기주여부 구명

1. 땅파리에서의 토마토황화잎말림바이러스(TYLCV) 종자전염 가능성 확인

본 과제의 3차 년도 연구 결과를 통해 토마토에 감염된 TYLCV가 종자전염을 통해 다음 세대로 전해질 수 있음을 밝힌바 있다. 하지만 아직까지 잡초에서는 TYLCV 감염여부만을 확인하였을 뿐 TYLCV 기주 잡초에서의 종자전염 가능성을 조사한 바 없었다. 이를 확인해 보기 위해, TYLCV에 감염된 상태에서 과실을 맺은 땅파리를 이용해 TYLCV 종자전염 여부를 확인하는 실험을 진행하였다 (그림 4-2).

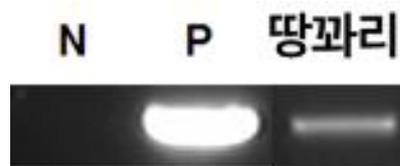


그림 2-1-1. 실험에 사용된 땅파리 열매와 PCR로 검정한 결과

PCR 분석 결과 땅파리 종자에서 TYLCV가 검출되었다. 이를 통해 TYLCV가 종자를 통해 다음 세대의 땅파리를 감염시킬 수 있는 가능성을 확인하였지만, 다음 세대에서의 전반여부를 확인하지는 못하였다. 추후 TYLCV가 검출된 다양한 잡초 종자로부터 발아시킨 2세대를 분석하는 실험을 진행하여, 잡초에서의 TYLCV 종자전염에 대한 연구를 추가적으로 수행할 예정이다.

2. 왕바랭이에 대한 토마토황화잎말림바이러스 감염 가능성 확인

현재까지 보고된 바에 따르면 TYLCV를 포함하는 베고모바이러스 속에 속한 바이러스들은 쌍자엽 식물만을 제한적으로 기주로 삼으며, 단자엽 식물에는 감염되지 않는 것으로 알려져 있다. 하지만, 국내에서 주로 발생하는 단자엽 잡초에 대해 인위적 접종과정을 통해 이를 증명한 보고는 없었다. 따라서 국내 토마토 농가 주변에서 흔히 볼 수 있는 단자엽 잡초 중 한해살이 풀인 왕바랭이에 대해 TYLCV 기주 여부를 알아보기 위해, 감염성 클론 접종 및 보독 담배가루이 방사를 통해 TYLCV 접종을 하였을 때 TYLCV 감염이 되는지 여부를 확인하였다. 외부에서의 바이러스 유입을 차단하기 위해 방충망이 설치된 하우스 내에 곤충 케이지를 3개 준비하고 한 케이지 내에는 TYLCV 감염성 클론으로 접종한 왕바랭이 6개체를 넣어두고, 또 다른 두 개의 케이지에는 왕바랭이 두 개체를 각각 넣어준 후 TYLCV 보독 가루이를 그 안에 방사하였다. 4주 후, 각 식물의 잎과 뿌리 조직을 채집하여 TYLCV에

대해 PCR로 검정하였다 (그림 4-1).

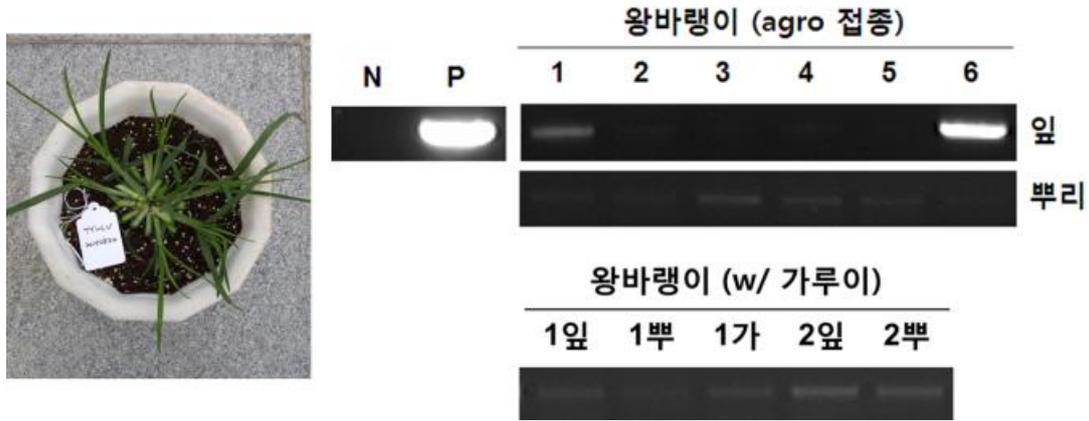


그림 2-2-1. 두 가지 접종법을 통해 TYLCV 감염시킨 왕바랭이와 PCR 검정 결과

왕바랭이는 감염성 클론을 통해 접종했을 때뿐만 아니라 TYLCV 보독 담배가루이를 방사한 조건에서도 TYLCV에 감염되었다는 것을 확인할 수 있었다. 이는 곧 실제 농가에서도 토마토 등의 작물과 왕바랭이를 담배가루이가 오가면서 TYLCV를 매개할 수 있다는 것을 의미한다. 왕바랭이는 번식력과 환경 적응력이 뛰어난 잡초 중 하나로 토마토 재배 농가 주변에서 흔히 발견되기 때문에, TYLCV 예방 및 방제 대책으로 왕바랭이 제거가 중요함을 보여준다. 또한 위 결과는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물도 TYLCV의 기주가 될 수 있음을 처음으로 확인한 것으로, 학술적으로도 큰 의미를 지닌다.

3. 왕바랭이에 대한 TYLCV 기주 여부 확인 실험

지난 4차년도 연구결과 단자엽 잡초인 왕바랭이가 TYLCV의 기주라는 사실을 확인한 바 있다. 이러한 결과를 재확인하기 위해 TYLCV 감염성 클론과 TYLCV 보독 담배가루이를 이용하여 왕바랭이에 TYLCV를 접종한 후 4주가 지난 식물의 잎과 뿌리를 샘플링하여 PCR을 통해 TYLCV 감염여부를 확인하였다. 그 결과, 감염성 클론과 담배가루이를 이용해 접종한 두 가지 경우 모두 잎과 뿌리 조직에서 TYLCV 감염이 확인되었다. 이를 통해 왕바랭이에 TYLCV가 감염될 수 있으며, 감염된 TYLCV가 그 안에서 복제 및 이동할 수 있다는 사실을 확인할 수 있었다(그림4-1).

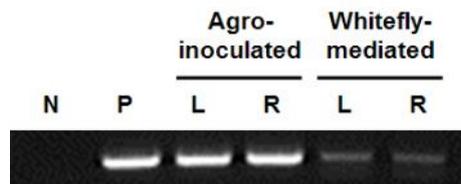


그림 2-3-1. 감염성 클론과 담배가루이를 이용해 TYLCV를 접종한 왕바랭이에서의 PCR 검정 결과 (N, negative control; P, positive control; L, leaf samples; R, root samples)

TYLCV에 감염된 왕바랭이가 비보독 담배가루이의 바이러스 감염원으로 작용할 수 있는지를 확인하기 위해, TYLCV에 감염된 왕바랭이를 비보독 담배가루이와 건전 토마토와 함께 곤충 사육용 케이지 내에 넣어주었다. 3주 후 왕바랭이와 토마토의 잎 조직을 샘플링하여 TYLCV 특이 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과, 비보독 담배가루이와 건전 토마토 모두 TYLCV 보독 및 감염이 된 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 담배가루이 매개 TYLCV전염에 있어서 왕바랭이가 TYLCV의 감염원으로 작용할 수 있다는 사실을 확인할 수 있었다.

이러한 결과들은 4차년도 결과들과 더불어 단자엽 잡초인 왕바랭이가 TYLCV의 기주이며, 담배가루이 매개 TYLCV 감염 및 확산 기작에서 중간기주로 역할 할 수 있다는 사실을 확인할 수 있었다. 이는 TYLCV의 방제에 있어서 왕바랭이의 제거의 중요성을 말해준다.

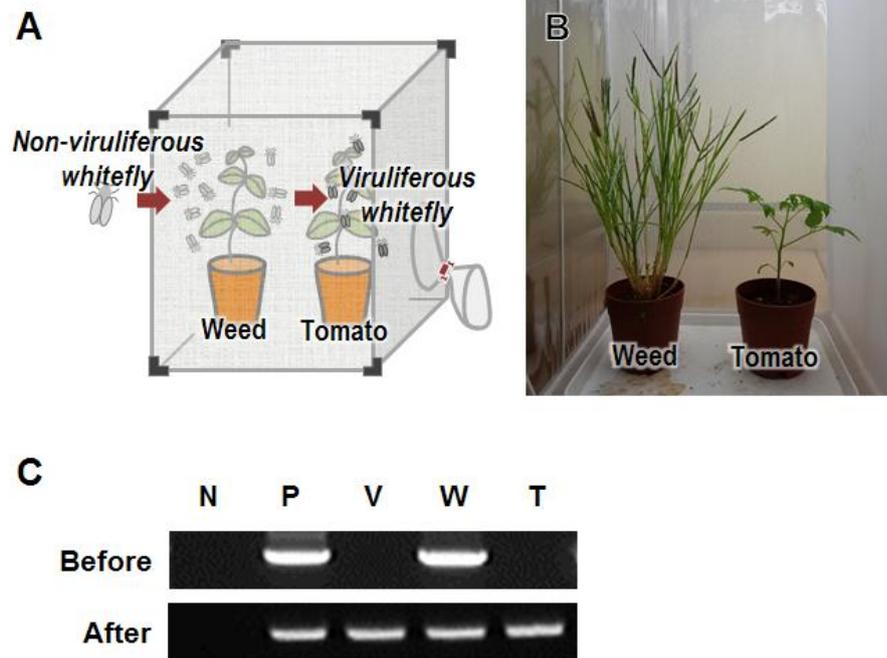


그림 2-3-2. 왕바랭이의 TYLCV 감염원으로서의 역할 확인 [N, negative control; P, positive control; V, vector(담배가루이); W, weed(왕바랭이); T, tomato(토마토)]

3절. 작물별 TYLCV 기주 여부 구명

1. 콩과 작물로의 토마토황화잎말림바이러스 기주 범위 확장

해외 보고들을 통해 TYLCV가 콩과 식물에 감염될 수 있다는 사실이 알려져 있었지만, 국내에서는 현재까지 자연적으로 TYLCV에 감염된 콩과 식물이 확인된 바 없었다. 여러 콩 재배 농가에서 원인을 알 수 없는 병징이 관찰되었고, 이에 대한 분석을 진행하는 과정에서 병징을 나타낸 콩들이 공통적으로 TYLCV에 감염되어 있음을 확인하였다. 이에 대한 추가 분석을 위해 춘천과 제천, 전주의 콩 재배 농가들에서 비슷한 병징을 나타낸 콩을 채집하여 PCR 분석을 진행하였다(그림 3-1-1).

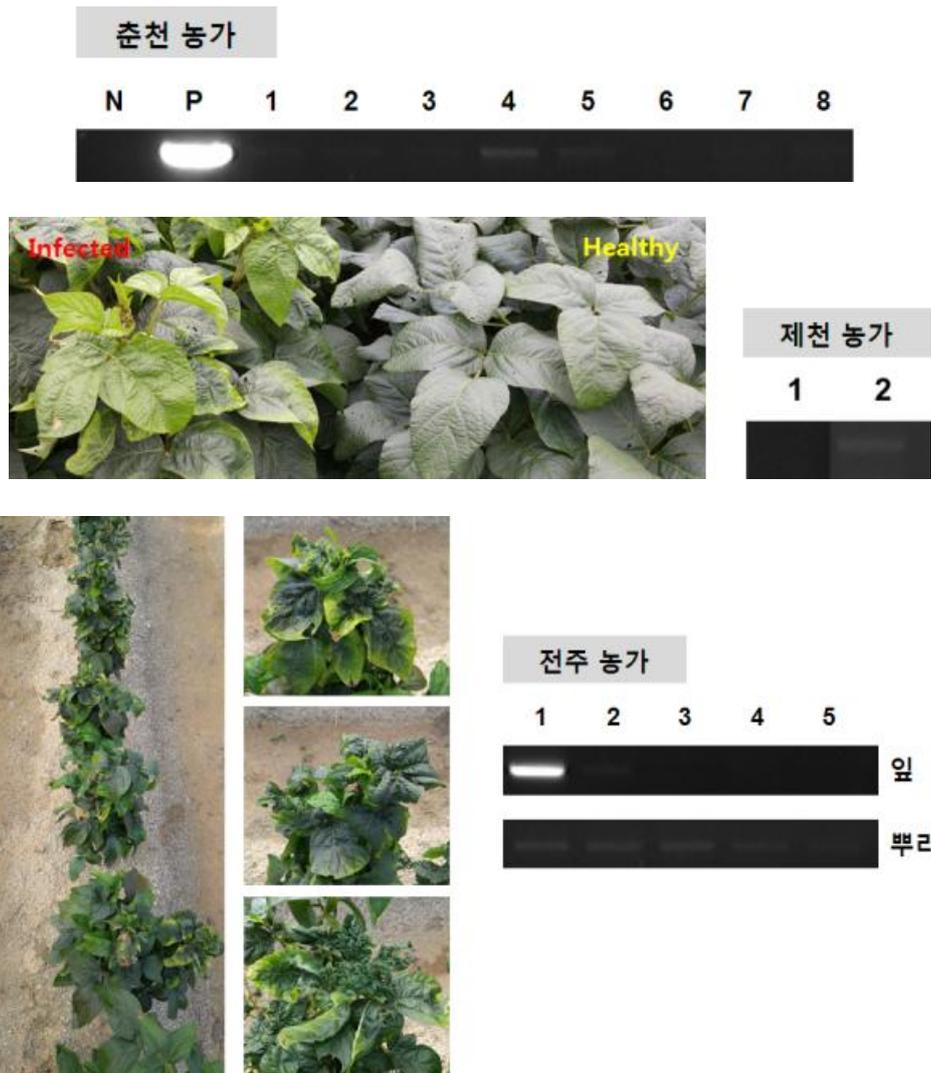


그림 3-1-1. 세 지역의 농가에서 관찰된 콩 병징 사진과 TYLCV에 대한 PCR 검정 결과

PCR 검정 결과 세 지역의 시료에서 모두 TYLCV가 검출되었다. 이는 국내에서 자연적으로 콩과 식물에 TYLCV가 감염된 첫 번째 사례로 TYLCV의 기주 범위 확장에 있어 중요한 근거 자료로 활용될 수 있을 것이다. 또한, 이들 농가 주변에서 담배가루이가 관찰되지 않았거나 소량의 가루이만이 관찰된 점을 통해, TYLCV가 종자를 통해 유입되었을 가능성이 높아 보이며 이에 대해선 추가적인 분석이 필요하다. 또한, 콩과 작물에서 관찰된 병징이 TYLCV 감염만으로 인해 나타난 것인지 확인해보기 위해, 제한된 환경 내에서 감염성 클론 및 보독 담배가루이를 통한 감염 실험도 추가적으로 진행되어야 할 것이다.

2. 파파야잎말림바이러스의 국내 최초 보고 및 염기 서열 분석

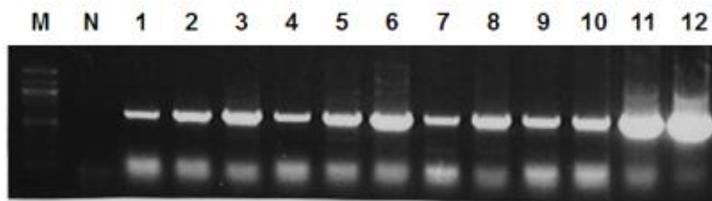
지구온난화에 의해 기온이 상승하면서 국내에도 다양한 열대작물들을 재배하는 농가가 증가하고 있다. 대표적으로 패션프루츠와 파파야의 경우, 주로 대만에서 판매되는 종자 및 유묘를 들여와 재배하는 농가들이 전라도 일대에 많이 분포하고 있다. 2014년 7월, 곡성의

한 파파야 농가에서 재배 중인 파파야에서 특이한 병징이 확인되었다. 파파야에 나타난 병징은 잎의 가장자리가 기형적인 형태가 되면서 노랗게 변하는 것으로 주로 어린잎에서 많이 관찰되었다 (그림 3-2-1). 이는 기존 해외 연구들에서 많이 보고된 전형적인 파파야잎말림바이러스 (Papaya leaf curl virus, PaLCuV)의 증상이었기 때문에 PaLCuV를 검출할 수 있는 프라이머 세트를 제작하여, 곡성의 파파야를 포함하여 비슷한 증상이 발견된 해남 농업기술원 내 과수연구소의 파파야와 담양의 패션프루츠 시료를 대상으로 PCR 검정을 진행하였다 (그림 3-2-2).



그림 3-2-1. 곡성 파파야 농가에서 관찰된 파파야 병증 사진

PCR using PaLCuV-specific primer set



M_ 100bp DNA marker, N_ no template control

Damyang	1	Passion fruit leaf #1
	2	Passion fruit leaf #2
	3	Passion fruit leaf #3
	4	Passion fruit leaf #4
Gokseong	5	Papaya leaf #1
	6	Papaya leaf #2
	7	Papaya leaf #3
	8	Papaya leaf #4
	9	Papaya leaf #5
	10	Papaya leaf #6
	11	Papaya root #1
	12	Papaya root #2
Haenam	13	Passion fruit leaf #1
	14	Passion fruit leaf #2
	15	Passion fruit leaf #3
	16	Papaya leaf #1
	17	Papaya leaf #2
	18	Papaya leaf #3
	19	Papaya root
20	Papaya stem	

그림 3-2-2. 세 지역에서 채집한 패션프루츠와 파파야 시료들로 PCR 검정 결과

PCR 검정 및 서열 분석 결과, 병징을 보인 모든 시료에서 PaLCuV 감염이 확인되었다. PaLCuV는 주로 인도와 대만에서 많이 보고되었는데 두 국가에서 보고된 PaLCuV의 염기 서열이 판이하게 다르기 때문에 국내에서 발견된 PaLCuV가 어느 쪽에 가까운지 알아보기 위하여 계통수 분석을 진행하였다 (그림 3-2-3).

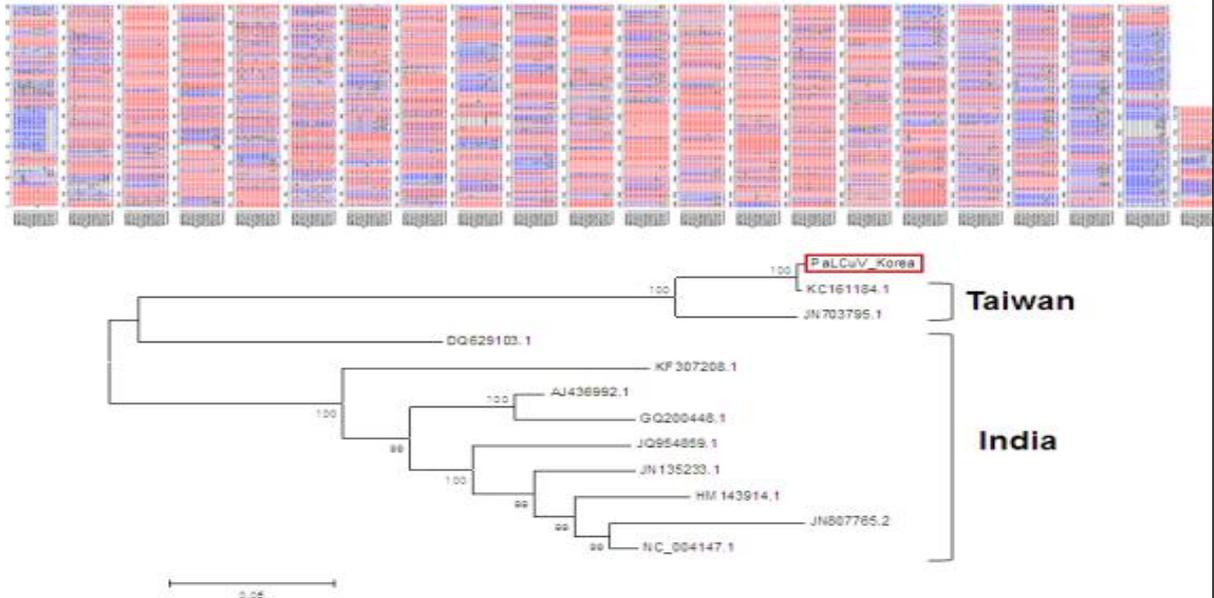


그림 3-2-3. 기보고된 PaLCuV 염기 서열을 이용한 계통수 분석 결과

계통수 분석 결과 국내에서 확인한 PaLCuV 서열은 대만에서 보고된 서열과 유사한 것으로 확인되었으며, 이는 PaLCuV가 파파야와 패션프루츠 종자 및 유묘를 대만에서 들여오는 과정에서 유입되었을 가능성이 높음을 보여준다. 추가적으로 국내 농가에서 재배중인 다양한 열대 작물에 대한 전반적인 바이러스 조사가 필요할 것으로 보인다.

5장. 제4협동과제 (성균관대)

1절. 진단

1. 토마토티록바이러스 등의 가루이 매개 바이러스 3종과 기타 식물바이러스 4종에 대하여 등온증폭반응(LAMP)를 통한 현장적용형 진단기술을 개발함
2. 내부공생균 분포를 이용한 가루이류 현장적용형 진단기술을 개발함
3. 국내에서 보고된 담배가루이 매개 바이러스들(TYLCV, TbLCV, HYVV, HYVMB)을 동시에 진단하는 multiplex PCR 프라이머를 개발함
4. 토마토헤황화잎말림바이러스의 종자전염을 확인하는 진단기술을 개발함

1. 식물 바이러스 4종에 대한 현장적용형 진단기술 개발

- 1차년도 과제 수행 당시 국내에는 아직까지 보고된 온실가루이 매개 바이러스가 없었으며, 추가적인 분석 결과 확인이 되지 않아 이에 대한 시료가 확보되지 못하였다.
- 대신 국내에서 문제가 되고 있는 식물바이러스들 중에서 *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV), *Broad bean wilt virus 2* (BBWV2), *Beet western yellow virus* (BWYV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Squash mosaic virus* (SqMV) 등에 대한 추가적인 등온증폭반응 (LAMP) 용 프라이머 세트를 제작하고, 이를 이용한 최적 반응 조건을 확립하는 과정을 진행하였다.
- 각각의 바이러스에 대한 등온증폭반응용 프라이머 세트들은 PrimerExplorer (primerexplorer.jp/e/) 프로그램을 통해서 2~5개의 후보 프라이머 세트를 작성하였으며, 실제 최적 반응 조건 확립에 사용된 프라이머 세트들은 표 5-1과 같다.
- 각각의 바이러스에 대한 등온증폭반응은 1 µl (5 U) *Bst* DNA 중합효소 (New England Biolabs), 2 µl 10× Thermoopol reaction buffer (New England Biolabs), 1.6 µl 10 mM dNTP mixture, 1 µl 40 mM MgSO₄, 각각 0.4 µl의 F3, B3 프라이머, 각각 1.6 µl의 FIP, BIP 프라이머, 9.4 µl 증류수를 포함하는 총 19 µl의 반응액에 각각 바이러스의 cDNA 1 µl을 넣고 반응을 진행하였다.
- 각각의 반응액은 60 ~ 65 °C의 온도에서 1시간 30분간 반응시킨 후 80 °C의 온도에서 5분간 불활성화 단계를 진행한 후 1 µl 1000X SYBR Green I을 넣고 가시광선과 UV 상에서 발색 여부를 확인함으로써 반응 여부를 확인하였으며, 추가적으로 각각의 결과물을 10 µl씩 1% 아가로스 겔에 전기영동하여 래더링(laddering)을 관찰함으로써 이를 재차 확인할 수 있었다. 이 때 해당 프라이머들이 바이러스 특이적으로 증폭을 할 수 있는지 여부를 확인하기 위해 다른 바이러스 cDNA을 넣는 반응액도 같은 조건에서 반응을 진행하였다.
- 그림 5-1에서 볼 수 있듯이, BBWV2와 BWYV는 60 °C의 온도에서 1시간 30분간 반응시켰을 때 해당 바이러스 특이적으로 증폭이 일어남을 발색과 래더링을 관찰함으로써 확인할 수 있었으며, TYMV와 CMV는 62 °C에서 최적의 결과를 볼 수 있었다.

표 5-1 4가지의 RNA 바이러스들에 대한 등온증폭반응 프라이머 서열

TYMV	
F3	GCCAACATCGACAGCGTT
B3	GYGGTGAGAGYGTGTTGATG
FIP	GGCTTGCAAGGTYGGATGGATY-CCACCCTYACCACCTTCT
BIP	RTYGGYGYTGCTGGGTACC-GAAGATCTGGCCYCCYTAGG
BBWV2	
F3	AARAGCACRCGTTTCYGTG
B3	AGACAAACGAGCTGCTAT
FIP	TGCCGAGTCCAAATCCCATC-TTTCCTAAAGAAGTCTTTGGAGTA
BIP	GAGGGGATGATGTCTCAGGTAAC-TCTGAATGTAAGCTCTCCTT
BWYV	
F3	TCTTCCCARAACTCCGGYTC
B3	CCHGCTATCGATGAAGAACC
FIP	CGGGCTTRGTGATCCCGAARTT-CTTACGAGCTGGACCCACA
BIP	GGAGGAGGRCGTTTACAGCG-TCCTGAATTGGTCCTRYGR
CMV	
F3	TGTGGGTGACRGTCCGTA
B3	GGCGTACTTTCMCATGTCYC
FIP	GGTCCGTCCGCYAACARAGC-AAGTTCTGCCTCCTCGG
BIP	AYGCTGCATCYGGMGTYCAAGC-WATATCAGCGCGCARCYC

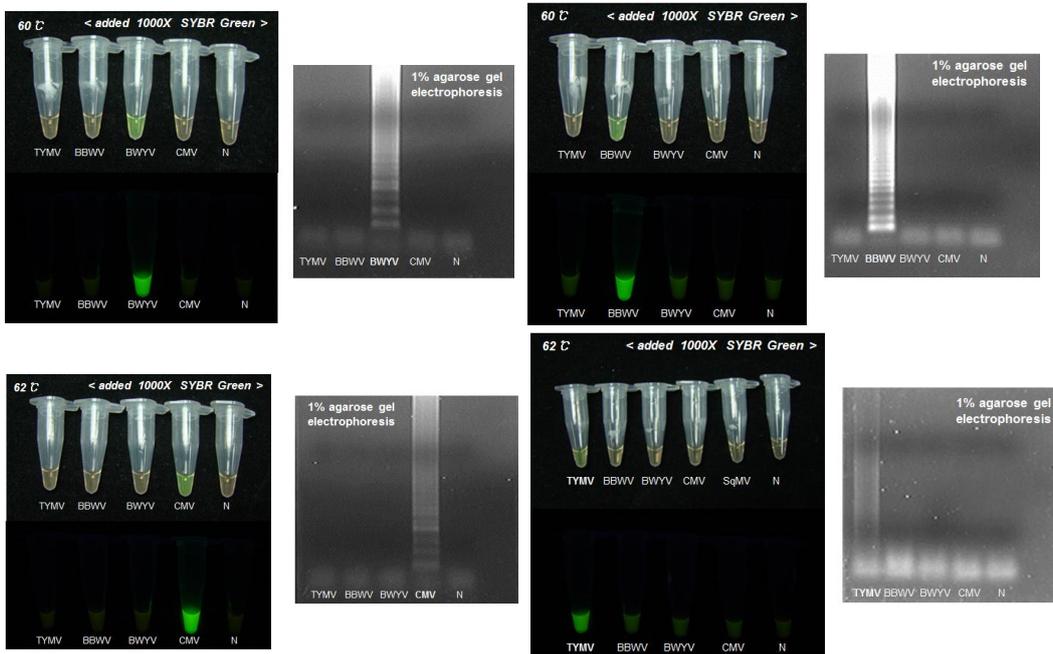


그림 5-1. 4가지의 RNA 바이러스들에 대한 등온증폭반응 결과 (각 바이러스에 대해 좌측 윗편 사진은 1000X SYBR Green I을 넣은 후 가시광선 상에서 본 것이며, 좌측 아랫편 사진은 UV 상에서 본 것이다. 우측 사진은 반응 후 결과물을 10 μ l씩 1% 아가로스 겔에 전기영동하여 laddering을 관찰한 것이다.)

2. 온실가루이 매개 식물 바이러스인 *Tomato chlorosis virus*에 대한 등온증폭반응법(LAMP) 진단 시스템 개발

- 2012년 이전에 국내에서 한 종의 온실가루이 매개 바이러스도 보고된 바 없었으나, 2013년 전북 익산 등 일부 지역에서 온실가루이 매개 바이러스 중 하나인 *Tomato chlorosis virus* (ToCV)가 최초로 보고되었다.
- 온실가루이 매개 식물바이러스의 일종인 ToCV에 대한 현장적용형 진단기술 개발을 위해 등온증폭반응 (LAMP) 용 프라이머 세트를 제작하고, 이를 이용한 최적 반응 조건을 확립하는 과정을 진행하였다.
- ToCV에 대한 등온증폭반응용 프라이머는 PrimerExplorer (primerexplorer.jp/e/) 프로그램을 통해서 총 5개의 후보 세트를 작성하였으며, 실제 최적 반응 조건 확립에 사용된 프라이머 세트들은 표 5-2와 같다.

표 5-2. ToCV에 대한 등온증폭반응용 프라이머 서열

F3	GACGAGGTGCAGAACTTG
B3	ATTCGAGTATCTTCTCGAACT
FIP	AAGCCCAACTGGAAGATCGA-GGAGGGACGATTCGACAT
BIP	ACGAGTTAAGGAAATTGAAGGTACA-CTCTTCCTGAGTCAAGGTGA

- 바이러스에 대한 등온증폭반응은 1 μ l (5 U) *Bst* DNA 중합효소 (New England Biolabs), 2 μ l 10 \times Thermopol reaction buffer (New England Biolabs), 1.6 μ l 10 mM dNTP mixture, 1 μ l 40 mM MgSO₄, 각각 0.4 μ l의 F3, B3 프라이머, 각각 1.6 μ l의 FIP, BIP 프라이머, 9.4 μ l 증류수를 포함하는 총 19 μ l의 반응액에 각각 바이러스의 cDNA 1 μ l을 넣고 반응을 진행하였다.
- 각각의 반응액은 60 ~ 65 ° C의 온도에서 1시간 반응시킨 후 80 ° C의 온도에서 5분간 불활성화 단계를 진행하였다. 반응이 끝난 후 1 μ l 1000X SYBR Green I을 넣고 가시광선 상에서 육안으로 발색 여부를 확인함으로써 반응 여부를 확인하였으며, 추가적으로 각각의 결과물을 10 μ l씩 1% 아가로즈 겔에 전기영동하여 래더링 (laddering)을 관찰함으로써 이를 재차 확인할 수 있었다. 이 때 해당 프라이머들이 바이러스 특이적으로 증폭을 할 수 있는지 여부를 확인하기 위해 다른 식물 바이러스 cDNA들도 같은 조건에서 반응을 진행하였다.
- 그림 5-2에서 볼 수 있듯이, ToCV 특이 프라이머를 이용한 등온증폭반응은 62°C 온도에서 1시간 반응시켰을 때 특이적으로 증폭이 일어남을 가시광선 상에서의 발색과 래더링으로 확인하였다.

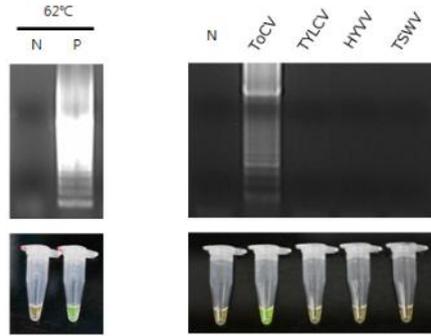


그림 5-2. 바이러스들에 대한 등온증폭반응 결과

- 토마토에서 병을 일으킬 수 있는 다른 바이러스들에 대해서는 발색과 래더링을 보이지 않았으며, 이를 통해 비특이적 반응이 일어나지 않음을 확인하였다 (그림 5-2).

3. LAMP를 이용한 담배가루이 매개 바이러스의 현장적용형 진단기술 실용화

- 담배가루이 매개 바이러스 중 국내에서 보고된 바 있는 *Tobacco leaf curl virus* (TbLCV)와 *Honeysuckle yellow vein virus* (HYVV)에 대한 등온증폭반응용 프라이머 세트를 제작하고, 이에 대한 최적 조건을 확립하는 실험을 수행하였다.
- 각각의 프라이머 작성을 위해 국내 및 일본에서 보고된 TbLCV strain들 (NCBI accession number : HM164547, HM164541, HM164545, HM164550, EF620536, NC_004641, NC_004654, AB287439, AB028604, AB055008, AB055009, AB079689)과 국내 및 일본, 뉴질랜드, 영국 등지에서 보고된 HYVV strain들 (GQ477135, AB236325, FJ817425, NC_005807, AJ543429) 서열정보를 분석하여 각각의 바이러스에 대해 상대적으로 잘 보존된 서열들을 사용하였다.
- TbLCV와 HYVV에 대한 등온증폭반응용 프라이머 세트들은 PrimerExplorer (primerexplorer.jp/e/) 프로그램을 통해서 각각 5개의 후보 세트를 작성하였으며, 실제 최적 반응 조건 확립에 사용된 프라이머 세트들은 각각 표 5-3, 표 5-4과 같다.

표 5-3. TbLCV에 대한 등온증폭반응용 프라이머 서열

F3	TCGAAGCGTCCAGCAGAT
B3	CCTTACACGGGCCTTCAC
FIP	GGCATACGGGCTGTCTGAAGT-GGGATTTTCACTCCCGTCTC
BIP	AGGAGATCATGGGCTCAAAGGC-ACCCCTTAGGCACATCAGG

표 5-4. HYVV에 대한 등온증폭반응용 프라이머 서열

F3	GAGGTCTGAAGAATCGTTGA
B3	TCACATACCCACAATGCT
FIP	CATCAAAATGGGAGCGGTCAT-TGCAGTTGTATTTCCCCTC
BIP	GCTCTCTGCAGATCCTTATGAATT-ATCGACAAAGGTGAAGCC

- 등온증폭반응은 2 μ l 10 \times *Bst* DNA 중합효소 반응버퍼 (20mM Tris-HCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 10mM KCl, 2mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100), 1.6 μ l 10mM dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP 각각 10mM씩 섞인 혼합물), 0.4 μ l의 10uM F3와 B3 프라이머(각각 서열번호 1, 2), 1.6 μ l 10uM FIP와 BIP 프라이머, 1 μ l 20 mM MgSO₄, 1 μ l(8 U) *Bst* DNA 중합효소, 주형 gDNA 1 μ l, 및 증류수 11.5 μ l를 반응튜브에 첨가한 후 혼합하여 수행했으며 65 $^{\circ}$ C에서 1시간 30분 동안 반응시켰다.
- 각각의 결과는 앞서 기술한 ToCV에 대한 등온증폭반응 결과물처럼 아가로즈 겔 전기영동 상의 래더링과 1 μ l 1000X SYBR Green I을 넣은 후의 발색여부를 통해 확인할 수 있었다 (그림 5-3).
- 이러한 등온증폭반응용 프라이머 세트 및 이를 이용한 반응 결과들을 통해 등온증폭 반응을 통한 가루이류 매개 바이러스 진단 기술에 대한 실용화 가능성을 확인하였다 (Kil et al., 2015).

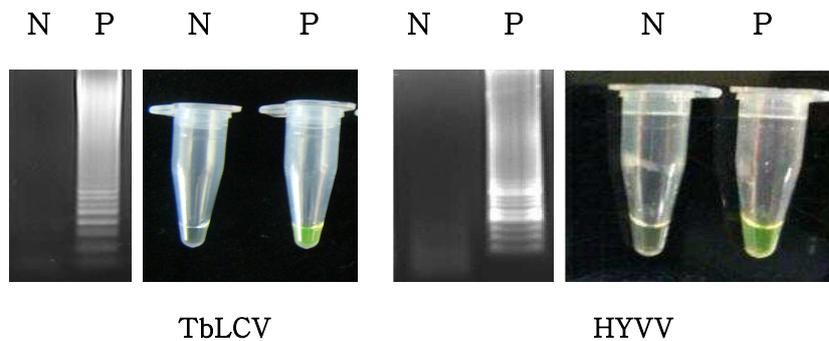
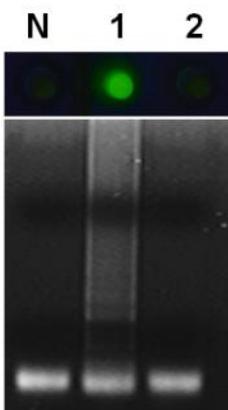


그림 5-3. TbLCV, HYVV에 대한 등온증폭반응 결과

4. 등온증폭반응법(LAMP)을 이용한 담배가루이 내생공생균 진단기술 개발

- 담배가루이와 온실가루이는 각각 다른 식물바이러스를 매개하는 것으로 알려져 있다. 예를 들어 TYLCV는 담배가루이에 의해 매개되지만 온실가루이에 의해서는 매개되지 않는다. 반면, 토마토퇴록바이러스 (ToCV)의 경우는 담배가루이와 온실가루이 둘 다에 의해서 매개될 수 있는 것으로 알려져 있다. 하지만, 가루이의 크기가 작기 때문에 집단 내에서 날개 등 형태학적인 차이만으로 두 종을 정확히 구별하는 것은 용이하지 않으며, 전문가가 아닌 사람들은 육안으로 구별하기가 어렵다. 또한, 두 종이 함께 존재하는 경우는 더욱 분리가 어렵다.
- 두 가루이의 경우, 공통적인 2차 공생균 패턴에서 차이를 보인다. 그 중 *Hamiltonella*는 국내에서 보고된 TYLCV를 매개하는 담배가루이에서 존재하지만, 온실가루이에서는 확인이 되지 않는 공생균 중 하나이다. 따라서, TYLCV를 매개하는 담배가루이와 온실가루이를 구분하기 위해 *Hamiltonella*를 진단할 수 있는 진단법 개발을 진행하였다.

- 담배가루이의 내생공생균 *Hamiltonella*을 진단하는 현장적용형 진단기술 개발을 위해 등온증폭반응 (LAMP) 용 프라이머 세트를 제작하고, 이를 이용한 최적 반응 조건을 확립하는 과정을 진행하였다.
- 담배가루이에 대한 등온증폭반응용 프라이머는 PrimerExplorer (primerexplorer.jp/e/) 프로그램을 통해서 총 5개의 후보 세트를 작성하였다. 그 중 하나를 선발하여 추가 실험을 진행하였다.
- 가루이에 대한 등온증폭반응은 1 μ l (5 U) *Bst* DNA 중합효소 (New England Biolabs), 2 μ l 10 \times Thermopol reaction buffer (New England Biolabs), 1.6 μ l 10 mM dNTP mixture, 1 μ l 40 mM MgSO₄, 각각 0.4 μ l의 F3, B3 프라이머, 각각 1.6 μ l의 FIP, BIP 프라이머, 9.4 μ l 증류수를 포함하는 총 19 μ l의 반응액에 각각 가루이의 DNA 1 μ l을 넣고 반응을 진행하였다.
- 각각의 반응액은 60 ~ 65 ° C의 온도에서 30분 ~ 1시간 반응시킨 후 80 ° C의 온도에서 5분간 불활성화 단계를 진행하였다. 반응이 끝난 후 1 μ l 1000X SYBR Green I을 넣고 가시광선 상에서 육안으로 발색 여부를 확인함으로써 반응 여부를 확인하였으며, 추가적으로 각각의 결과물을 10 μ l씩 1% 아가로스 겔에 전기영동하여 래더링 (laddering)을 관찰함으로써 이를 재차 확인할 수 있었다. 이 때 해당 프라이머들이 담배가루이 특이적으로 증폭을 할 수 있는지 여부를 확인하기 위해 온실가루이 DNA도 같은 조건에서 반응을 진행하였다.



60°C, 1시간
 N - no template control
 1 - 담배가루이 gDNA
 2 - 온실가루이 gDNA

그림 5-4. 가루이 DNA을 이용한 등온증폭반응 결과

- 그림 5-7에서 볼 수 있듯이, 담배가루이 특이 프라이머를 이용한 등온증폭반응은 60°C 온도에서 1시간 반응시켰을 때 특이적으로 증폭이 일어남을 형광과 래더링으로 확인하였다.

- 담배가루이가 아닌 온실가루이에 대해서는 형광과 래더링을 았보였으며, 이를 통해 비

특이적 반응이 없음을 확인했다 (그림 5-4).

5. TYLCV, TbLCV, HYVV, HYVMB를 동시에 진단하는 multiplex PCR primer 개발

- 국내에서 현재까지 보고된 베고모바이러스 3종 (TYLCV, TbLCV, HYVV) 및 베타 위성 DNA 1종 (HYVMB)을 동시에 진단할 수 있는 multiplex PCR용 프라이머를 작성하고, 이를 이용하여 PCR을 수행하였다. 이 때, TbLCV와 HYVV는 서열이 매우 유사하여 개별적으로 진단할 수 있는 프라이머를 각각 짜는 것이 용이하지 않아, 두 바이러스를 같이 진단하는 프라이머를 이용하여 진단한 후, HYVV만을 진단해낼 수 있

는 프라이머를 이용해 확인할 수 있도록 추가로 프라이머를 제작하였다.

- PCR 반응액 내에서 프라이머 농도는 TYLCV는 1 μ M, HYVV, TbLCV는 2 μ M, HYVMB는 0.5 μ M으로 서로 다르게 하였다. 그 결과, 그림 4-8에서 볼 수 있듯이 종류가 서로 다른 베고모바이러스 3종 (TYLCV, TbLCV, HYVV) 및 베타위성 DNA 1종 (HYVMB)을 동시에 진단할 수 있음을 확인할 수 있었다.

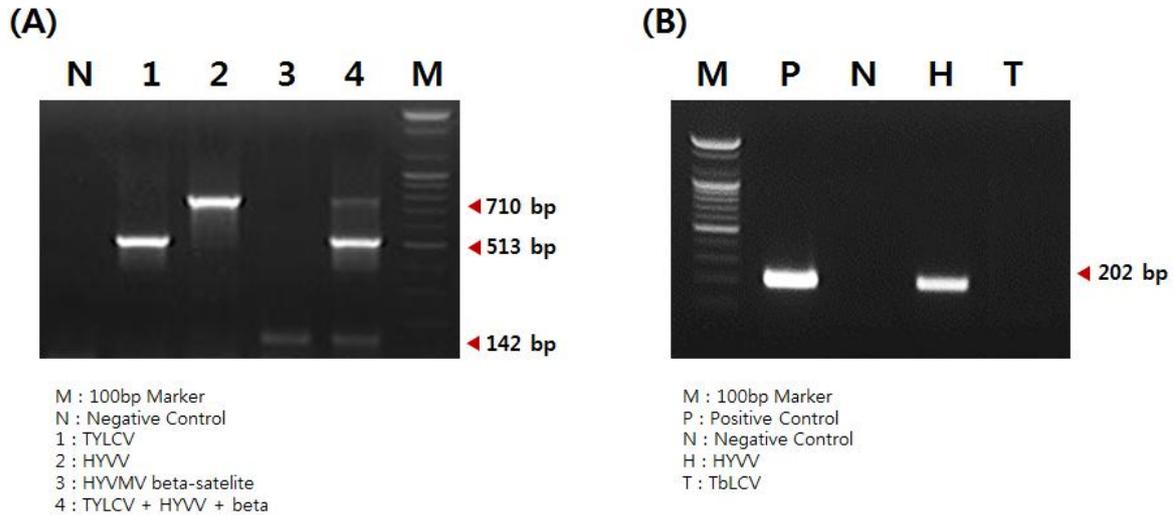
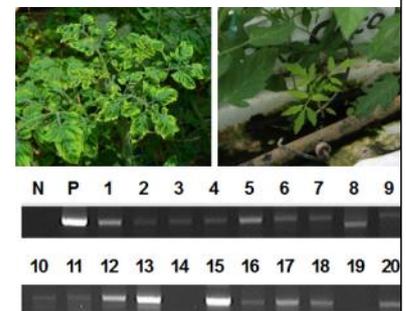


그림 5-5. 베고모바이러스 3종 및 베타위성 DNA 1종을 동시에 진단할 수 있는 multiplex PCR에 대한 반응 결과

6. 토마토황화잎말림바이러스 종자전염을 확인하기 위한 진단법 개발

- 현재까지의 보고에 따르면 토마토황화잎말림바이러스(TYLCV)는 담배가루이에 의한 감염을 제외한 다른 감염 경로는 없다고 알려져 있다. 하지만 제주도 토마토 농가에서 지난해 TYLCV에 감염된 토마토 종자로부터 발아한 유묘를 검정해 본 결과 TYLCV가 확인되어 종자전염의 가능성을 보고 진단법 개발을 진행하였다 (그림 5-6).

그림 5-6. 토마토황화잎말림바이러스(TYLCV) 감염주에서 채종한 종자로부터 발아한 유묘에서의 검정 결과



- 토마토 종자에서의 바이러스 검정은 종자 내의 바이러스 농도가 적어 일반 토마토 잎을 사용하여 검정할 때 보다 더 민감한 방법이 필요하기 때문에 여러 프라이머 세트를 이용하여 최적의 조건을 확립하였다. 실험은 총 8개의 프라이머 세트로 진행하였으며 각각의 프라이머 세트를 이용하여 각각 10^{-1} 부터 10^{-11} 까지 희석하여 민감도 검사를

진행하였다 (그림 5-7).

- 실험은 TYLCV에 감염된 토마토 잎 조직을 대상으로 각 프라이머 세트를 사용하여 진행하였다. 민감도 확인 결과 7번 프라이머 세트가 30 ng/μl 농도의 식물 DNA에서 10⁻⁶ 까지 검정하였다. 이 7번 프라이머 세트를 이용해 TYLCV 감염 종자 개수에 따른 검정 실험을 진행하였다 (그림 5-7).

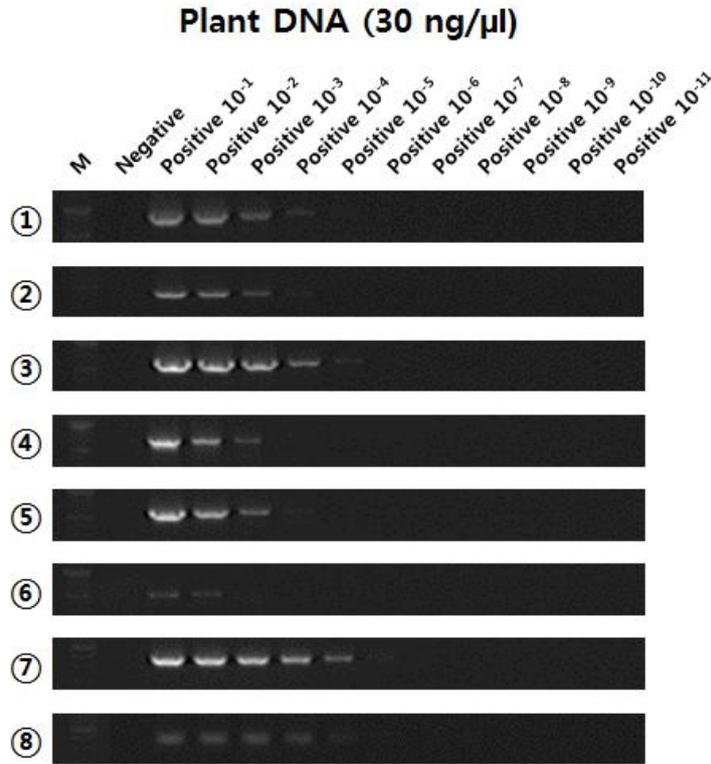


그림 5-7. 토마토황화잎말림바이러스(TYLCV) 검정 프라이머 세트별 PCR 결과

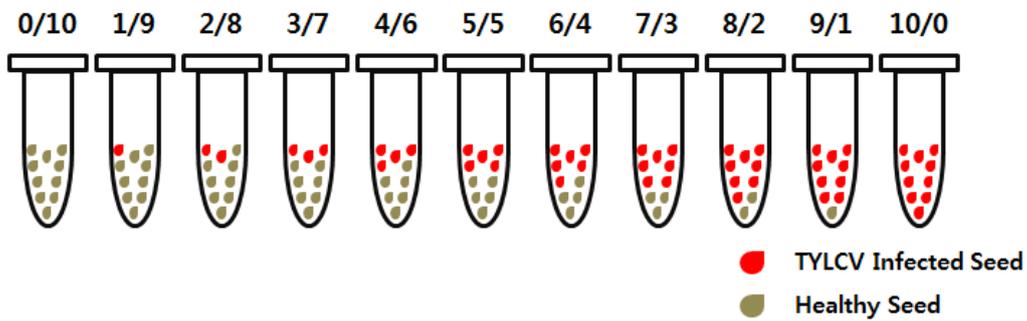


그림 5-8. 토마토황화잎말림바이러스(TYLCV) 감염 종자 개수에 따른 검정 실험 방법

- 종자는 총 10개를 한 묶음으로 실험하였고, TYLCV가 확인되지 않은 품종의 종자와 TYLCV에 감염된 토마토에서 채종한 종자를 조합하여 검정 방법을 확인하였다. 바이러스가 확인되지 않은 종자 10개 묶음부터 채종한 종자 10개 묶음까지 순차적으로 총 11개의 묶음으로 진행하였고, DNA 추출 방법은 Dellaporta 방법과 인트론社 제품인

Viral Gene-Spin kit를 각각 사용하여 비교 실험하였다 (그림 5-9).

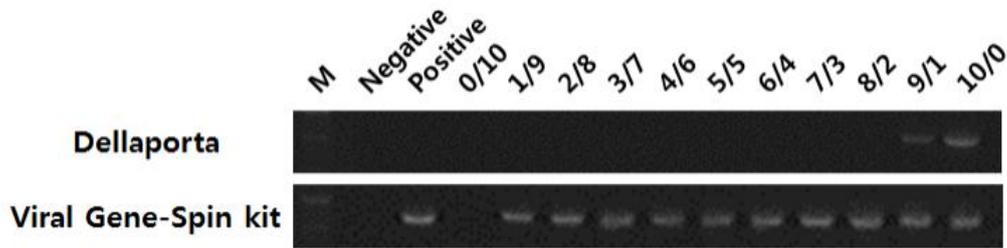


그림 5-9. 토마토황화잎말림바이러스(TYLCV) 감염 종자 개수에 따른 검정 실험 결과

- Dellaporta방법을 사용하여 실험을 진행한 결과 채종한 종자 9개를 넣은 묶음과 10개 넣은 묶음에서만 검정이 되는 반면, 인트론社의 Viral Gene-Spin kit를 사용하였을 때 채종한 종자 1개를 넣은 묶음에서부터 10개 넣은 묶음까지 모두 검정되었다.

2절. 예찰

1. 국내에서의 geminivirus DNA-beta 분포양상 분석을 수행함
2. 가루이 매개 바이러스 4종(TYLCV, TbLCV, HYVV, HYVMB)의 감염성클론을 이용하여 토마토, 고추, 파프리카 등 가지과 작물과 박과 작물에 대한 기주 범위 분석을 수행
3. 농가에서 TYLCV에 감염된 리시안셔스를 확인하고, 가루이 매개 실험을 수행함
4. 등대풀잎말림바이러스를 국내에서 최초로 보고하고 이에 대한 염기서열을 분석함
5. 농가현장 시료로부터 토마토 외 작물로의 TYLCV 기주범위 확장을 확인함
6. 베타위성DNA(HYVMB)와 이의 재조합 바이러스를 분석하고 감염성 클론을 제작함
7. TYLCV Korea group 2에 대한 감염성 클론을 제작함

1. 국내 Geminivirus DNA-beta 분리 및 분포양상 분석

- 2012년 전반기에 국내에서 Geminivirus DNA-A (TYLCV) 감염이 확인된 총 120개의 시료로부터 게노믹 DNA를 분리하여 DNA-beta 분석용 공용 프라이머 세트를 이용하여 PCR를 수행하여 확인하였으나 전혀 확인하지 못하였다.
- 본 연구팀에서 기존에 보고한 DNA-beta (HYVMV beta-satellite DNA (HYVMB))의 경우 경남 사천 (삼천포) 지역에서 확보한 시료로부터 분리가 되었으며, 이러한 정보를 바탕으로 경남 사천 일대 지역 (진주, 김해, 광양, 통영, 사천, 거제 등, 그림 B-1-1)에서 2007 ~ 2011년 사이에 Geminivirus DNA-A (TYLCV) 감염이 확인되었던 시료 일부 (100개)로부터 게노믹 DNA를 분리하여 DNA-beta 분석용 공용 프라이머 세트를 이용하여 PCR를 수행하여 1개의 DNA-beta (통영 지역 토마토 농가 시료)를 확인하였다. (그림 5-10).



그림 5-10. Geminivirus DNA-beta 분리를 위해 사용된 시료들의 지역 분포

- PCR을 통해 확보한 DNA-beta partial sequence (142 bp)에 대한 local alignment 분석 결과 확인된 DNA-beta 서열이 기존에 보고된 Honeysuckle yellow vein mosaic virus (HYVMV) beta-satellite DNA (HYVMB) 서열과 거의 일치함을 확인할 수 있었다 (그림 5-11). 이를 통해 확보한 1개의 DNA-beta가 HYVMV beta-satellite DNA임을 확인할 수 있었으며, 전체 DNA 서열 분석 및 이를 이용한 추가적인 실험을 수행하여 HYVMV beta-satellite DNA (HYVMB) 임을 확인하고 서열정보를 등록할 예정이다.
- 2012년에 확보한 시료로부터 Geminivirus DNA-beta 확인 및 분리가 되지 않았고, 이전 시기의 시료에서도 1건만 확인이 되어 분포양상 분석을 수행할 수 없었다. 추가적으로 2012년 하반기에 확보된 시료 일부와 이전 시기 (2007 ~ 2011년)의 시료로부터 확인되는 DNA-beta가 있을 경우 이에 대한 서열 분석 및 관련 실험을 진행할 예정이다.

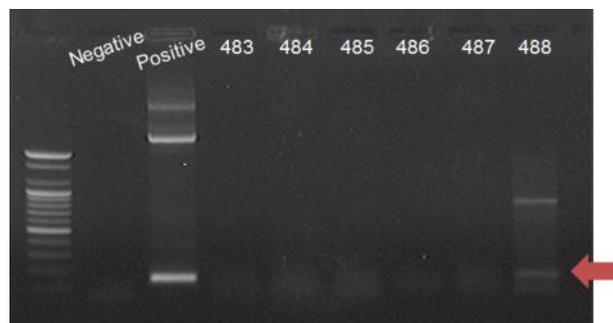


그림 5-11. DNA-beta 분석용 공용 프라이머를 이용한 PCR 수행 결과 (마커: 100bp DNA ladder (바이오니아), Negative: No template control, Positive : Positive control (HYVMB infectious clone), 483~488 : 샘플 번호, '488'이 확인이 된 통영 시료)

```

Query 1   ATCAAGTTCATCATAGACGTAAGGCTCCAACAGTTCATCAGAGTGCAAGTCCAGGTATAC 60
          |||
Sbjct 526 ATCAAGTTCATAATAGACGTAAGGCTCCAACAGTTCATCAGAGTGCAAGTCCAGGTATAC 467

Query 61   TCAACAAATCAACCAGTACTGACAGGTATCCGCTGCAACATACCATACACATACGTCCAA 120
          |||
Sbjct 466 TCAACAAATCAACCAGTACTGACAGGTATCCGCTGCAACATACCATACACATACGTCCAA 407

Query 121  ATGGTTCACCATTTCGACTTCA 142
          |||
Sbjct 406 ATGGTTCACCATTTCGACTTCA 385

```

그림 5-12. 확보된 partial sequence에 대한 local alignment 분석 결과

2. 가루이 매개 바이러스 4종에 대한 토마토 및 박과 작물에 대한 기주 범위 분석

- 국내에 보고된 가루이 매개 바이러스 4종에 대해 가지과, 박과의 총 4개 작물 7개 품종을 대상으로 감염실험을 수행하였다. (그림 5-13). 감염시킨 작물들은 경북 안동 소재 경상북도농업기술원 생물자원연구소의 온실에서 2달간 관찰하였으며 (그림 5-14), 감염시킨 후 2달이 되는 시점에 각각의 시료로부터 gDNA를 분리한 후 PCR과 서던 블롯 (Southern blot)을 통해 감염 여부를 확인하였다.

Tomato 1 (256 개체)	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
Tomato 2 (256 개체)	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
Tomato 3 (256 개체)	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
Tomato 4 (256 개체)	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
Cucumber (256 개체)	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
Oriental melon (256 개체)	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
Water melon (256 개체)	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
	Mock	TYLCV	HYW	TbLCV	beta	TYLCV +HYW	TYLCV +TbLCV	TbLCV +HYW	TYLCV +beta	TbLCV +beta	HYW +beta

그림 5-13. 기주 범위 분석 실험에 사용한 작물 품종들 및 바이러스들 (표 안의 숫자들은 접종한 식물의 수)



그림 5-14. 작물에 바이러스를 접종했던 과정과 감염시킨 식물체를 재배한 온실

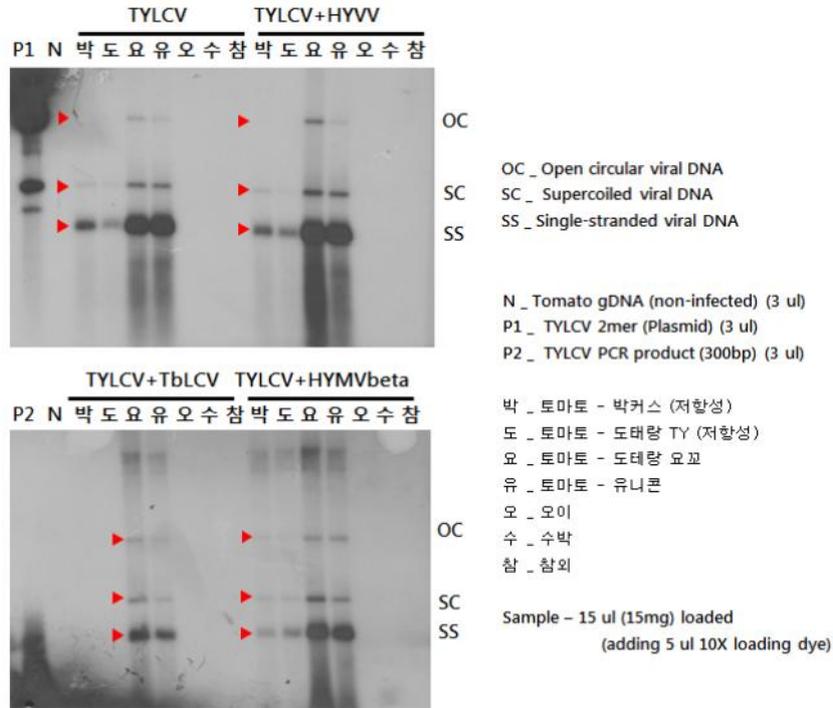


그림 5-15. TYLCV를 단독감염시킨 경우와 다른 가루이 매개 바이러스와 함께 복합감염시킨 개체들에 대한 서던 블롯 분석 결과

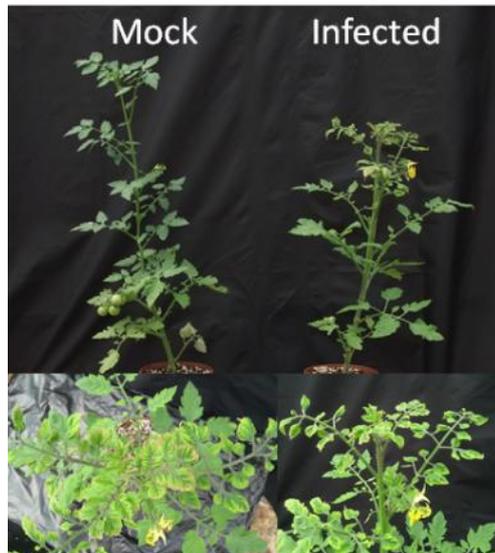


그림 5-16. TYLCV를 감염시킨 토마토 (유니콘)

- TYLCV를 단독감염시키거나 다른 가루이 매개 바이러스를 함께 감염시켰을 경우 토마토 4개 품종 모두에서 감염되었음을 확인할 수 있었으며, 박과 작물인 수박, 참외와 오이에는 감염되지 않음을 확인하였다. 또한 저항성 품종인 박커스와 도태랑 TY은 이 병성 품종 (도태랑 요꼬, 유니콘)에 비해 전반적인 바이러스양이 더 적음을 확인할 수 있었으며 (그림 5-15), 이병성 품종에서 잎의 말림 (curling), 황화(yellowing), 왜소증 (stunting) 등 전형적인 TYLCV 증상을 확인할 수 있었다 (그림 5-16).

- TbLCV의 경우 단독감염시켰을 때 토마토 1개 품종에서, TYLCV와 함께 감염시켰을 때 토마토 3개 품종에서 감염되었음을 확인할 수 있었다 (그림 5-17).

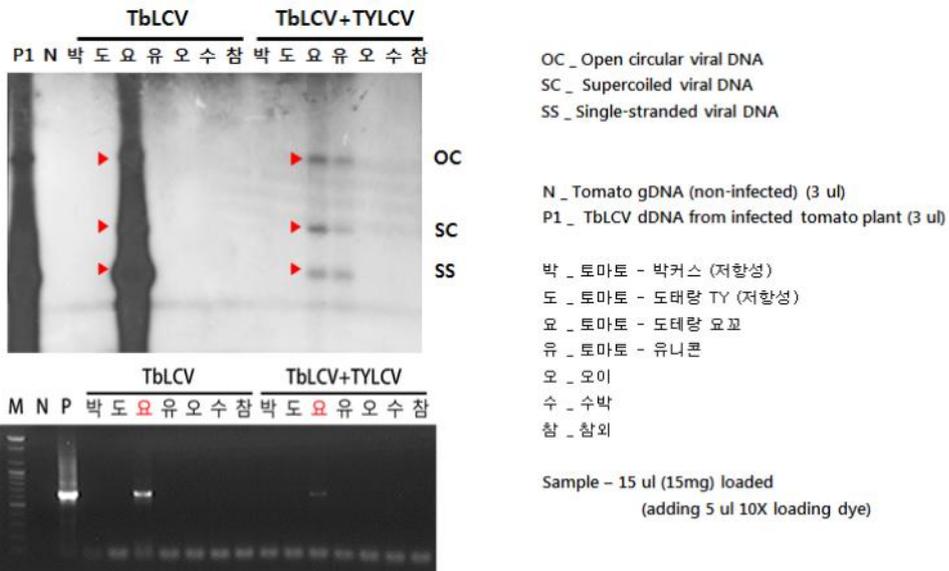


그림 5-17. TbLCV를 단독감염시킨 개체들과 TYLCV와 함께 복합감염시킨 개체들에 대한 서던 블롯 및 PCR 분석 결과

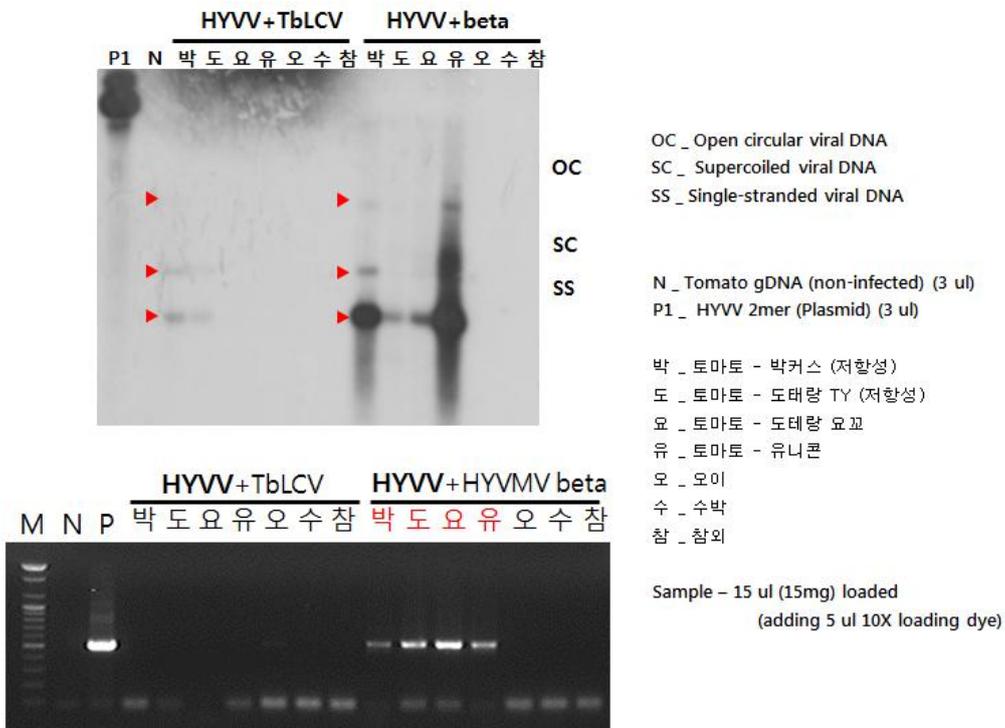


그림 5-18. HYVV를 TbLCV 혹은 HYVMV beta-satellite와 함께 복합감염시킨 개체들에 대한 서던 블롯 및 PCR 분석 결과

- 기존에 토마토에 감염되지 않는 것으로 알려져 있던 HYVV의 경우 토마토에 단독 감

염시켰을 때 감염 되지 않았음을 확인할 수 있었다. 하지만 HYVV를 TbLCV혹은 HYVMV beta-satellite DNA와 함께 감염시켰을 때 토마토에 감염된다는 사실을 확인할 수 있었으며 (그림 B-3-6), 이 경우 잎의 수가 급격히 적어지고, 잎의 말림, 황화 병증이 TYLCV를 감염시켰을 때보다 심하게 나타남을 확인할 수 있었다 (그림 5-19).



그림 5-19. HYVV와 HYVMV beta-satellite를 함께 감염시킨 토마토에서 나타나는 병증

- HYVMV beta-satellite DNA의 경우 접종 시 식물체 내에서 존재함을 PCR과 서던 블롯 상으로 확인할 수 없었으나, 그림 B-3-7 등의 현상에서 보듯 다른 가루이 매개 바이러스의 기주 확장 및 병증 심화에 큰 영향을 주는 것으로 확인할 수 있었다. HYVMV beta-satellite의 기주 내 감염 여부 및 복제 양상에 대한 분석은 추가적으로 이루어져야 할 것이다.
- 각각의 바이러스를 감염시킨 후 식물체에서 나타나는 병증을 0점에서 5점까지의 점수로 매겨서 비교하였을 때 표 B-3-1와 같은 결과를 얻을 수 있었다. 그림 B-3-1에서 보듯 TYLCV는 저항성 토마토 품종에도 감염이 되는 것으로 확인되었으나 실제적인 병증은 나타나지 않았으나 약간의 왜소증 (stunting) 및 과실 수확량에는 차이를 주는 것으로 확인되었다. 특히 TYLCV를 HYVV와 함께 감염시킨 경우와 HYVV를 HYVMV beta-satellite DNA와 함께 감염시킨 경우에 가장 심한 병증을 관찰할 수 있었다 (그림 5-20).

표 5-5. 가루이 매개 바이러스를 토마토 4개 품종에 감염시켰을 때 나타나는 병증의 심화도 비교

	병증 심화도			
	저항성		이병성	
	박카스	도태랑TY	도태랑요꼬	유니콘
Mock	-	-	-	-
TYLCV	-	-	+++	++
TbLCV	-	-	+++	-
HYVV	-	-	-	-
Beta	-	-	-	-
TYLCV +HYVV	-	-	++++	++++
TYLCV +TbLCV	-	-	++++	+++
TbLCV +HYVV	-	-	+++	-
TYLCV +HYVMV beta	-	-	+++	+++
TbLCV +HYVMV beta	-	-	-	-
HYVV +HYVMV beta	-	-	+++++	-

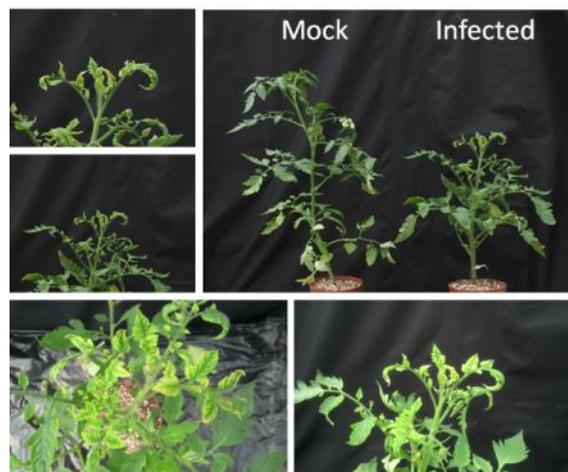


그림 5-21. 심한 병증을 보였던 TYLCV, HYVV 복합감염 토마토 (도태랑요꼬)

3. 가루이 매개 바이러스의 고추, 파프리카 등 가지과 작물에 대한 기주 확장 가능성 실험 수행 및 분석

- 국내에서 많이 재배되고 있는 가지과 작물들 중 해외에서 가루이 매개 제미니바이러스의 기주로 규명되었거나 그 가능성이 높은 작물 5가지의 10개 품종 (표 B-4-1)을 대상으로 4가지 바이러스 (TYLCV, TbLCV, HYVV, HYVMB)의 인위적 감염시스템을 이용한 기주 확장 가능성 예찰 실험을 수행하였다. (그림 5-22).

표 5-6. 기주 확장 가능성 예찰 실험에 사용한 작물 품종들

작물명	품종명
고추	한샘파리꽃고추, 배로따고추, 파워스피드고추, 청양고추, 터널용고추
파프리카	슈퍼레드파프리카, 슈퍼옐로우파프리카
피망	슈페리어피망
가지	흑장가지
토마토	큐티토마토

한샘파리꽃고추	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
배로따고추	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
파워스피드고추	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
터널용고추	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
청양고추	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
슈페리어 피망	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
슈퍼레드 파프리카	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
옐로우파프리카	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
흑장가지	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
토마토	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Mock	TYLCV	HYVV	TbLCV	beta	TYLCV	TYLCV	TbLCV	TYLCV	TbLCV	HYVV
						+HYVV	+TbLCV	+HYVV	+beta	+beta	+beta

그림 5-22. 기주 확장 가능성 예찰 실험에 사용한 작물 품종들 및 바이러스들 (표 안의 숫자들은 접종한 식물의 수)

- 감염시킨 작물들은 충남 예산 소재 충청남도농업기술원의 온실에서 2달간 관찰하였으며 (그림 5-23), 감염시킨 후 1달이 되는 시점에 각각의 시료로부터 gDNA를 분리한 후 1차 분석 (PCR과 서던 블롯 (Southern blot))을 수행하였으며, 그 후 2달이 되는 시점에 추가 분석을 수행하였다.



그림 5-23. 바이러스 접종 실험에 사용한 작물들을 재배했던 공간과
접종 후 재배했던 공간 (위) 및 바이러스 접종 실험 과정

- 국내에서 토마토에만 감염되는 것으로 알려진 TYLCV가 파프리카도 기주로 삼는다는 것을 1차 분석 결과 PCR과 서던 블롯을 통해 확인하였다 (그림 5-24, 그림 5-25). 이 경우 토마토와 달리 파프리카에 병증이 나타나지 않아 비감염주와 외관상 차이는 없지만, 가루이가 감염된 파프리카를 흡즙한 후 토마토와 같은 TYLCV 기주 작물에 바이러스를 매개할 가능성이 있다.

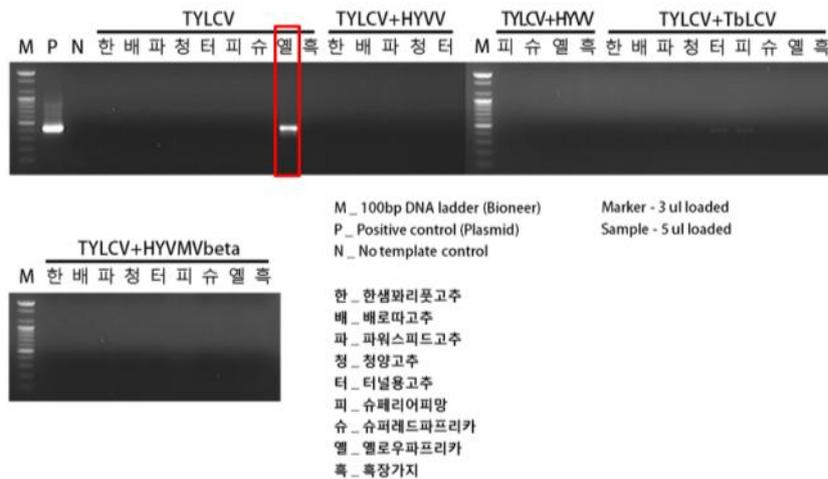


그림 5-24. TYLCV를 단독감염시킨 경우와 다른 가루이 매개 바이러스와
함께 복합감염시킨 개체들에 대한 PCR 분석 결과

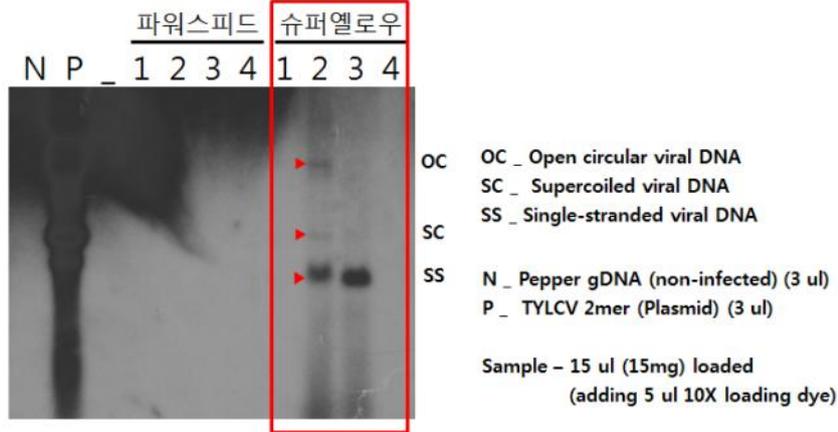


그림 5-25. TYLCV를 단독감염시킨 파워스피드고추와 슈퍼엘로우파프리카에 대한 서던 블롯 분석 결과

- TYLCV를 제외한 TbLCV, HYVV, HYVMV beta-satellite의 경우 토마토를 제외한 작물에 감염되지 않았음을 확인하였다. 각각 감염시킨 식물체에서 나타나는 병증을 0점에서 5점까지의 점수로 매겨서 비교하였을 때 앞선 실험을 통해 확인한 결과와 유사하였다 (그림 5-26).

한샘파리꽃고추	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
배로따고추	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
파워스피드고추	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
터널용고추	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
청양고추	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
슈페리어피망	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
슈퍼레드 파프리카	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
엘로우파프리카	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
흑장가지	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
토마토	-	+++	-	++	-	++	+++	+++	+++	++	+++
	Mock	TYLCV	HYVV	TbLCV	beta	TYLCV	TYLCV+HYVV	TbLCV+HYVV	TYLCV+beta	TbLCV+beta	HYVV+beta

그림 5-26. 가루이 매개 바이러스를 토마토 4개 품종에 감염시켰을 때 나타나는 병증의 심화도 비교 ('-'는 병증이 없음을 의미한다.)

- 감염 후 2달이 되는 시점에 TYLCV를 단독감염시킨 토마토와 슈퍼엘로우파프리카의 신초, 뿌리, 줄기, 아랫잎, 열매를 각각 수확하여 gDNA를 분리한 후 분석을 수행하였다. 슈퍼엘로우 파프리카의 경우에도 토마토에서처럼 식물 전체적으로 바이러스가 존재하며 복제가 진행되고 있음을 확인함으로써, 슈퍼엘로우파프리카가 TYLCV의 기주임을 확인할 수 있었다 (그림 5-27).

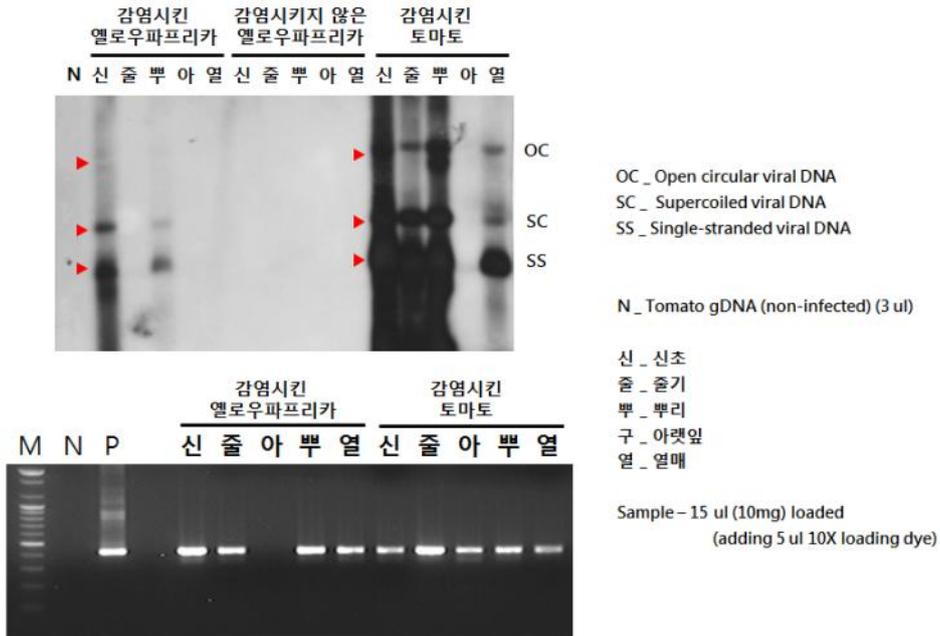


그림 5-27. TYLCV를 단독감염시킨 슈퍼옐로우 파프리카, 토마토와 비감염 슈퍼옐로우 파프리카의 기관별 서던 블롯 분석 결과

4. TYLCV 감염 리시안셔스의 확인

- 리시안셔스는 대표적인 화훼작물로서, 국내에서도 고부가 가치 창출을 위해 전북, 강원 등지에서 재배가 이루어지고 있다. 리시안셔스의 경우 이미 해외 연구를 통해 가루이 매개 바이러스의 일종인 TYLCV의 기주임이 밝혀진 바 있으나 국내에서는 아직까지 TYLCV에 감염된 리시안셔스가 발견된 사례가 없었다.
- 2013년 리시안셔스 재배 농가에서 비정상적인 생장을 보이는 리시안셔스가 확인되었으며 (그림 5-28), 이 식물 시료로부터 genomic DNA를 분리해 PCR과 Southern blot을 이용하여 바이러스 검정을 해본 결과 TYLCV에 감염되었음을 확인할 수 있었다. 또한 잎, 줄기, 뿌리, 꽃 모두에서 바이러스 감염 및 복제를 확인함으로써, TYLCV의 분명한 기주임을 확인할 수 있었다 (그림 5-29).



그림 5-28. 감염 리시안셔스 및 새순의 잎말림 현상

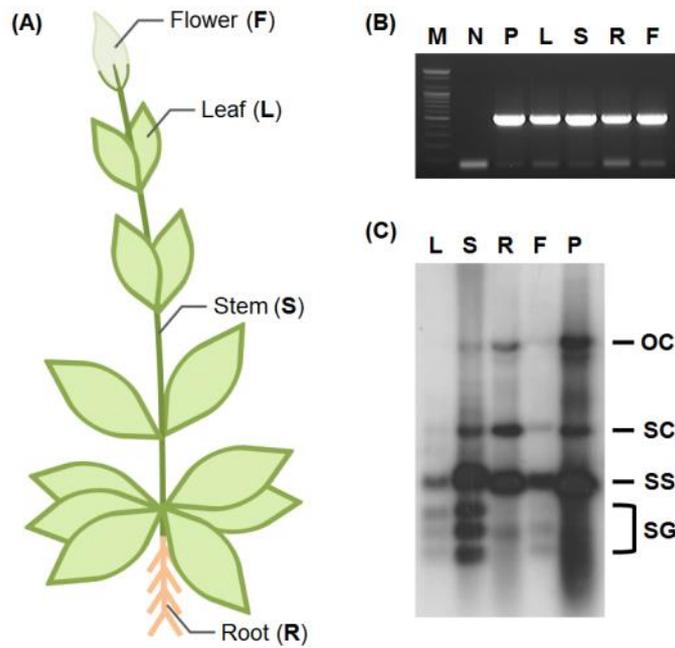


그림 5-29. (A) 리시안셔스 부위별 모식도 (F; 꽃, L; 잎, S; 줄기, R; 뿌리)
 (B) PCR 검정 결과 (C) Southern blotting 검정 결과 (N; 음성대조군, P; 양성 대조군)

5. TYLCV 보독충을 이용한 리시안셔스 기주 확인 실험

- TYLCV 보독충에 의하여 리시안셔스가 TYLCV에 감염될 수 있는지 여부를 확인하고, TYLCV가 감염된 리시안셔스를 흡즙한 비보독충이 TYLCV를 보독한 후 다른 리시안셔스를 감염시킬 수 있는지 확인하는 실험을 수행하였다 (그림 5-30). 이를 통해 리시안셔스 간의 담배가루이를 통한 TYLCV 전이 가능성 및 감염율을 확인하고자 하였다. 각각의 실험은 독립된 공간에서 수행되었으며, 각각의 실험은 3주간 진행되었다.
- PCR과 Southern blot을 통해 확인해본 결과, TYLCV 감염 TYLCV 보독충을 이용한 접종 실험의 경우 보독충과 함께 케이지에 넣어준 리시안셔스 5개 개체 모두에서 TYLCV 감염 및 복제를 확인할 수 있었다. 비보독충을 넣어 리시안셔스 간의 바이러스 전이 여부를 확인한 실험에서는 5개 개체 중 4개 개체에서 TYLCV 감염 및 복제를 확인할 수 있었다.
- 이러한 결과를 통해 리시안셔스가 TYLCV 보독충에 의해 감염이 될 수 있으며, 이렇게 감염된 TYLCV가 비보독충을 보독화시켜 또 다른 리시안셔스를 감염시킬 수 있음을 확인할 수 있었다. 이는 고가의 화훼작물인 리시안셔스 재배 시 하우스 내 담배가루이 예방 및 방제가 매우 중요함을 말해준다.

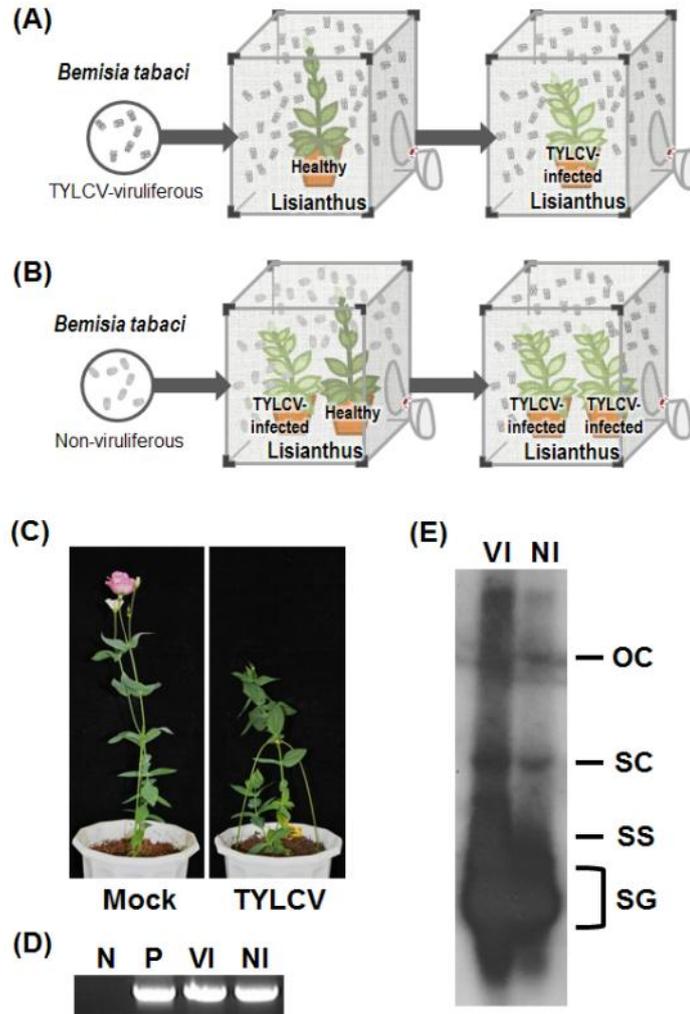


그림 5-30. (A) TYLCV 보독충을 이용한 리시안셔스 접종 실험 (B) TYLCV 비보독충을 이용한 리시안셔스 간 바이러스 전이 실험 (C) TYLCV 접종 리시안셔스에서의 병증 (우) (D) PCR 검증 결과 (E) Southern blot을 통한 TYLCV 복제 여부 확인 결과 (VI은 보독충을 통해 접종한 리시안셔스, NI은 비보독충을 통한 리시안셔스 간 TYLCV 전이를 통해 감염된 리시안셔스)

6. 등대풀잎말림바이러스의 국내 최초 보고 및 염기서열 분석

- 지구온난화에 따른 기온 상승으로 국내 농가들에서도 패션프루츠, 멜론, 파파야 등의 열대작물이 재배되고 있다. 열대작물을 들여오는 과정에서 다양한 식물 바이러스도 함께 들어올 수 있는데 본 연구에서는 그러한 방식으로 국내로 유입된 등대풀잎말림바이러스 (*Euphorbia leaf curl virus*, EuLCV)에 대한 보고와 염기 서열 분석을 진행하였다. 전라남도 담양과 고흥의 패션프루츠 농장과 해남의 전남도원 과수연구소에서 재배하는 패션프루츠에서 EuLCV에 의한 것으로 추정되는 잎말림과 퇴록 병징이 발견되

어 각각의 시료를 채집하였다 (그림 5-31).

- 담양에서 채집한 시료로부터 DNA를 추출한 뒤 rolling circle amplification을 수행하여 원형의 DNA만을 증폭하였다. 증폭된 DNA는 제한효소 *Bam*HI을 처리하고 pGEM-3zf(+) vector DNA에 삽입한 뒤 sequencing 분석을 의뢰하였다. 그 결과 병징을 보인 패션프루츠에 EuLCV가 감염된 것을 확인할 수 있었다 (그림 5-32). EuLCV는 국내에서 처음으로 보고되었으며 염기서열 분석 결과 대만에서 보고된 EuLCV와 99% 동일한 것으로 나타났다. 이는 국내의 패션프루츠 농가들이 패션프루츠 종자와 유묘를 대만으로부터 수입해 들어오는 것과 일치하는 결과이다.



그림 5-31. 담양 패션프루츠 농가에서 발견된 EuLCV 병징



대만 패션프루츠 에서 확인된 시퀀스와 99% 일치

그림 5-32. 국내 EuLCV와 대만에서 보고된 EuLCV 염기서열 비교

- 담양 외 지역의 패션프루츠와 다른 작물 시료를 검정하기 위해 EuLCV를 검출할 수 있는 프라이머를 제작하였다. 해남과 고흥에서 패션프루츠 근처에서 재배되던 토마토,

파파야와 패션프루츠 근처에서 자라고 있던 잡초 2종까지 함께 채집하여 PCR 검정을 진행한 결과 병징을 나타낸 패션프루츠 외에도 토마토와 파파야, 잡초인 둥근잎아욱에서 EuLCV가 검출되었다. 또한 일반적으로 패션프루츠는 접붙이기를 이용해 재배되기 때문에 접붙이기에 이용되는 대목도 함께 검정한 결과 마찬가지로 EuLCV가 검출되었다 (그림 5-33).

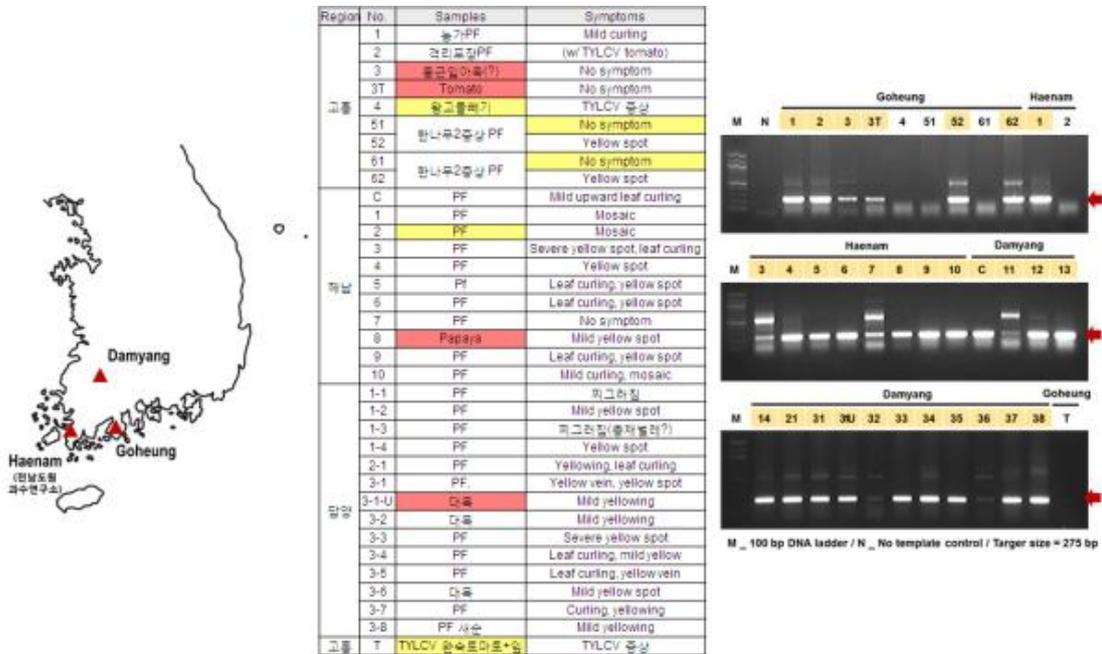


그림 5-33. 국내 EuLCV 발생 농가의 위치와 그 검정 결과

- 국외 보고에 따르면 EuLCV는 패션프루츠 같은 열대작물뿐만 아니라 토마토 등의 가지과 작물에도 감염된다고 하며 본 연구를 통해 국내에서도 그 사례가 관찰되었다. 따라서 국내에 EuLCV가 얼마나 확산되었는지 조사하고, 방제 방안을 빠르게 확립하는 것이 필요하다.

7. 현장에서의 토마토 외 작물로의 TYLCV 기주범위 확장 확인

- 기존 국외 연구 결과에 따르면 TYLCV는 토마토 외에도 고추를 비롯한 가지과 작물과 콩과, 박과 작물에도 감염될 수 있다고 알려졌다. 이전 연구에서 고추와 여러 박과 작물에 대해 감염성 클론으로 TYLCV를 접종한 결과가 있었지만 국내에서 자연적으로 담배가루이에 의해 TYLCV가 토마토 외의 작물로 전염됐다는 사례는 보고된 바 없었다. 본 연구에서는 이를 검증하기 위해 경상북도 진주의 고추 농가에서 시료를 채집하였다. 시료를 채집한 농가 주변에는 TYLCV가 발병한 토마토 농가가 위치하고 있으며 담배가루이 또한 널리 퍼져있었으므로 TYLCV의 자연적인 전염이 일어날 가능성이 높았다. 또한 경북대학교 소재의 농장에서는 고추에 바이러스에 의한 것으로 추정되는 병징과 함께 담배가루이가 발견되었으므로 함께 시료를 채집하였다. 채집된 시료들로부터 DNA를 추출하여 PCR로 검정한 결과 대부분의 시료에서 TYLCV가 검출

되었다 (그림 5-34). 이는 국내에서 최초로 보고되는 고추에서의 자연적인 TYLCV 전염이다.

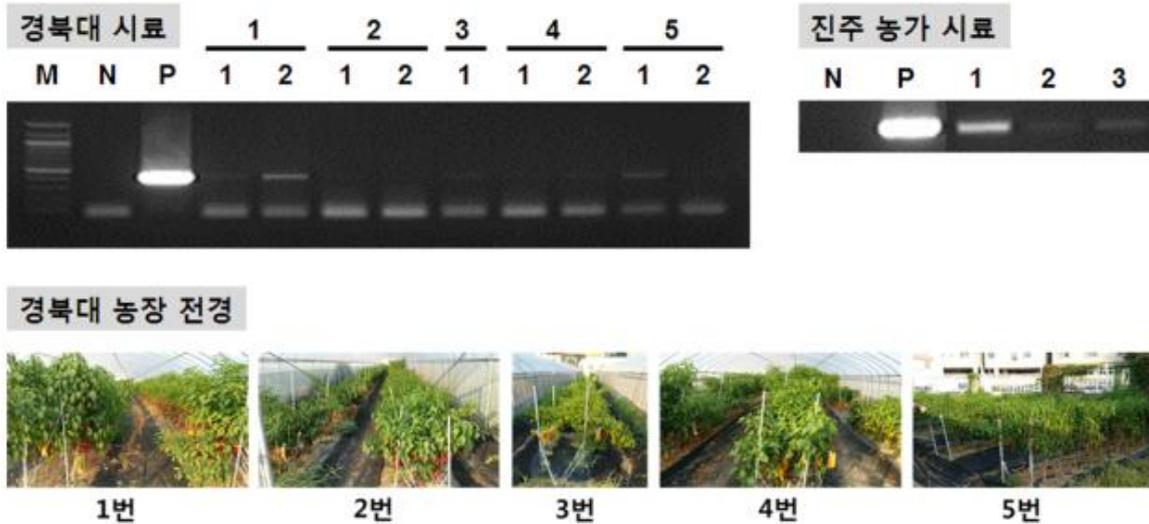


그림 5-34. 경북대 농장과 진주 농가 시료의 PCR 검정 결과

– 추가로 경상북도 성주군 일대의 참외 농가들에서 시료를 채집하여 PCR 검정을 진행하였다 (그림 5-35). 앞서 실험한 진주 고추 농가와 마찬가지로 인근에 TYLCV가 발병한 토마토 농가가 위치하고 있으며 담배가루이가 널리 퍼져 있기 때문에 자연 전염의 가능성이 의심되었다.



그림 5-35. 성주군 일대의 참외 농가 위치와 PCR 검정 결과

– 실험 결과 대부분의 참외 시료는 물론이거니와 농가 주변에서 자라고 있던 호박과

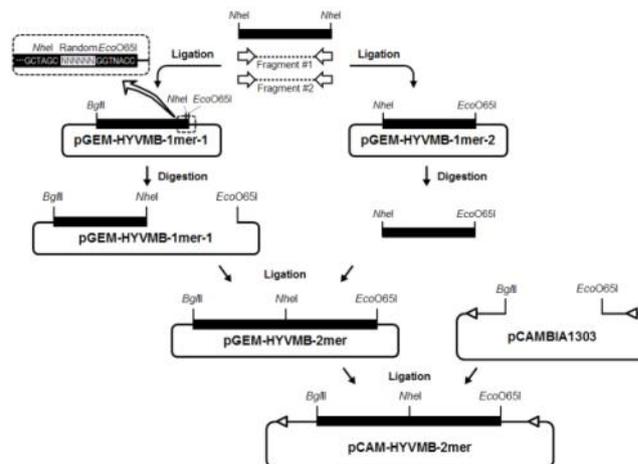
고구마의 잎에서도 TYLCV가 검출되었다 (그림 5-35). 본 결과 역시 고추와 마찬가지로 국내에서 처음으로 보고되는 박과 작물에서의 자연적인 TYLCV 감염이다.

- TYLCV가 속한 Geminivirus는 DNA 바이러스임에도 불구하고 복제 기작의 특이성 때문에 유전자 재조합이 쉽게 발생하며 이는 곧 바이러스 저항성 극복, 기주범위 확장, 병징의 변화 등을 초래한다. TYLCV와 같이 농작물에 심각한 피해를 유발할 수 있는 바이러스에 대해서는 사전에 기주범위를 더욱 자세하게 연구해 발생할 수 있는 피해를 최소화할 필요가 있다. 따라서 차후 연구에서는 더 다양한 농작물과 잡초를 대상으로 TYLCV의 기주범위 확장에 대해 연구할 예정이다.

8. Honeysuckle yellow vein mosaic virus DNA-beta (HYVMB) 감염성 클론 제작

- 가루이류 매개 바이러스 중 베고모바이러스는 하나 혹은 두 개의 게놈을 갖는다. 하나의 게놈(DNA-A)을 갖는 베고모바이러스의 경우 satellite DNA의 일종인 베타위성 DNA (beta-satellite DNA)를 갖기도 하며, 이러한 satellite DNA는 DNA-A를 도와 기주 내 병증 유도에 영향을 주는 것으로 보고된 바 있다. 하지만 이러한 satellite DNA도 DNA-A와 마찬가지로 가루이에 의해서만 매개가 되므로, 인위적 감염을 위해서는 감염성 클론을 제작하여 이를 아그로박테리움에 형질전환시킨 다음 재조합 아그로박테리움 배양액을 식물체에 접종시키는 방법을 이용해야 한다. 따라서 DNA-A와 satellite DNA가 복합되었을 시의 양상을 관찰하고 분석하기 위해선 satellite DNA에 대한 감염성 클론을 제작하는 것이 중요하다.
- 국내에서 2009년 삼천포에서 *Honeysuckle yellow vein mosaic virus* DNA-beta (HYVMB)가 확인되었던 토마토 시료로부터 rolling circle amplification (RCA)법을 통해 바이러스 DNA를 증폭하였으며, 이를 DNA-beta 시퀀스 특이적인 제한효소인 *NheI*으로 처리한 후 얻은 1.3 kb 길이의 DNA 절편을 확보하였다. 확보한 DNA절편은 클로닝벡터의 일종인 pGEM-3Zf에 삽입시킨 후 시퀀싱 과정을 통해 정확히 DNA-beta의 전체 DNA 시퀀스를 포함하는지를 확인하였다.

그림 5-36.
Honeysuckle yellow vein mosaic virus
DNA-beta
감염성 클론
제작



- HYVMB의 감염성 클론을 제작하기 위하여, 상기 과정을 통해 pGEM-3Zf 내에 삽입한 HYVMB의 전체 DNA를 주형으로 하여, 하나의 1 mer 말단 부위에는 제한효소 *EcoO65I* 및 *NheI* 인식부위, 다른 1 mer에는 제한효소 *BgIII*, *NheI* 및 *EcoO65I* 인식부위가 포함되어 있는 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하여 각각의 1 mer에 제한효소 인식부위가 추가된 DNA를 습득하고, 얻은 DNA들을 pGEM-T easy vector에 삽입하였다. 그 중에서 제한효소 *BgIII*, *NheI* 및 *EcoO65I* 인식부위를 갖는 1 mer를 *NheI*, *EcoO65I* 제한효소를 처리하여 잘라낸 후에, 이 DNA를 다시 *NheI*, *EcoO65I* 제한효소가 처리된 *BgIII*, *NheI* 및 *EcoO65I* 인식부위가 포함된 1mer를 갖는 pGEM-T easy vector에 삽입하여 2 mer의 HYVMB 유전자를 갖는 재조합 플라스미드를 제조하였다 (그림 5-36).
- 획득한 2 mer의 베타위성 DNA를 식물 발현 벡터인 pCAMBIA1303에 클로닝하기 위하여, pCAMBIA1303 및 2 mer의 DNA를 제한효소 *EcoO65I* 및 *BgIII*를 이용하여 각각 자른 후, 아가로스겔 전기영동을 수행하고 겔로부터 잘려진 벡터를 습득하였다. 그리고 잘려진 pCAMBIA1303 및 2 mer의 베타위성 DNA를 혼합하고 T4 DNA 연결효소를 이용하여 결합시켜 2 mer의 HYVMB의 감염성 클론을 제작하였다 (그림 5-36).
- 2mer의 HYVMB 유전자가 제대로 삽입되어 있는지 확인된 플라스미드를 동결-해동 형질전환법(freezing and thawing transformation)을 이용하여 아그로박테리움 내로 형질전환하였다. 그리고 형질전환된 아그로박테리움으로부터 플라스미드를 분리하여 HYVMB 유전자가 제대로 삽입되어 있는지 확인하였다. 형질전환된 아그로박테리움은 국립농업과학원 농업유전자원센터에 기탁하였다 (수탁번호 KACC95114P).
- 상기 과정을 통해 제조된 HYVMB 감염성 클론의 감염성을 확인하기 위하여, HYVMB 감염성 클론을 포함하는 아그로박테리움 배양액을 정단부에 핀을 이용해 찔러준 후 식물체 내로 주입시키는 방법으로 담배(*Nicotiana benthamiana*)에 감염시켰다. 이때 DNA-beta는 DNA-A와 상호작용하여 복제가 되는 것으로 알려져 있기 때문에, TYLCV DNA-A의 감염성 클론도 함께 감염시킨 후, 감염된 식물들을 배양하여 식물에서의 감염성 여부를 확인하였다. 3주 배양 후에는 식물의 게놈 DNA를 추출하여 HYVMB 특이적 primer set을 이용한 PCR을 수행하여 HYVMB가 식물 체내에 제대로 감염되었는지 확인하였다.
- 그림 5-4에 나타난 바와 같이, TYLCV DNA-A만을 접종시킨 담배에서보다 HYVMB 및 TYLCV DNA-A를 함께 감염시킨 담배에서 더 심한 병증을 확인함으로써 바이러스의 복제가 일어나 효과적으로 질병을 유발시킬 수 있다는 것을 확인하였다. 또한 그림 5-37에서 볼 수 있듯이 HYVMB의 감염 여부를 PCR을 통해 확인할 수 있었다. 상기 결과를 통하여, HYVMB 감염성 클론을 이용하면 다양한 식물체에서 효과적으로 감염증을 유발시킬 수 있다는 것을 확인하였다.

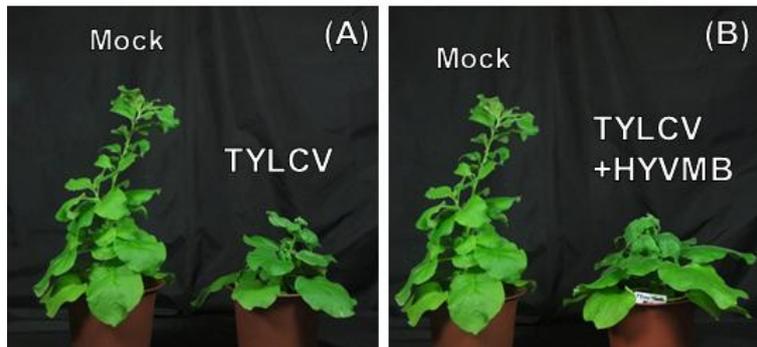


그림 5-37. (A) TYLCV만을 접종한 식물 (우)에서의 병증, (B) TYLCV 및 HYVMB를 접종한 식물(우)에서 나타난 병증 (각 그림에서의 좌측은 비감염주)

N P 접종

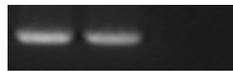


그림 5-38. HYVMB 특이 primer set을 이용한 PCR 결과

9. 재조합 DNA-beta에 대한 분석 및 감염성 클론 제작

- 2009년 샘플링한 시료 중 토마토 샘플에서 DNA-beta를 탐색하는 과정에서 기존의 HYVMB과 다른 형태의 시퀀스 구성을 갖는 satellite DNA를 확인하였다. 이는 기존에 보고된 HYVMB와 같은 시퀀스의 beta C1을 코딩하고 있고 이를 포함하는 절반 정도의 시퀀스는 기존 한국에서 보고된 HYVMB와 거의 동일한 시퀀스를 갖고 있었으나, non coding region이 기존에 보고된 HYVV 및 TbLCJV의 intergenic region과 유사한 것을 확인할 수 있었다 (그림 5-6). 시퀀스 분석 결과 이러한 새로운 satellite DNA는 두 번의 재조합과정을 통해 만들어졌을 가능성이 높아 보인다 (그림 5-39).

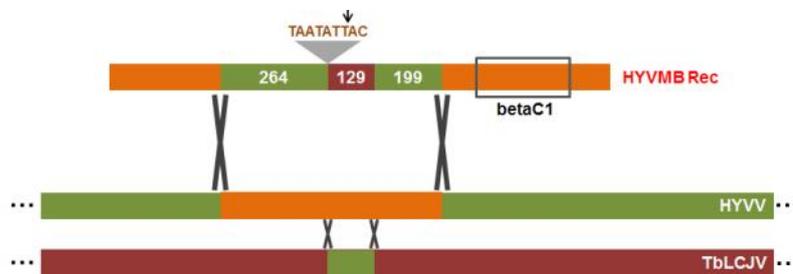


그림 5-39. 국내 토마토 시료에서 확인된 satellite DNA와 추정되는 재조합 과정

- 이러한 재조합 satellite DNA에 대한 감염성을 확인하고, 다른 바이러스와의 상관 관계 분석을 진행하기 위해 상기 HYVMB 감염성 클론을 제작한 과정과 동일한 과정을

통해 감염성 클론 제작을 진행하였다.

- HYVMB 감염성 클론 제작과정과 동일하게 시료로부터 RCA법을 통해 바이러스 유전자를 증폭시킨 후 제한효소 *NheI*로 처리하여 얻은 DNA절편을 pGEM-3Zf 내에 삽입하여 시퀀싱을 수행하였다. 시퀀스가 확인된 재조합 HYVMB의 전체 DNA를 주형으로 하여, 각각 말단부위에 제한효소 *BglII* 및 *NheI* 인식부위, *NheI* 및 *EcoO65I* 인식부위가 포함되어 있는 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하여 각각의 1 mer에 제한효소 인식부위가 추가된 DNA를 얻고, 이 DNA들을 pGEM-T easy vector에 삽입하였다. 각각을 해당하는 제한효소로 처리한 후 *BglII* 및 *EcoO65I*로 처리한 pCAMBIA1303를 함께 T4 DNA 연결효소를 이용하여 결합시켜 2 mer의 재조합 HYVMB의 감염성 클론을 제작하였다 (그림 5-40).
- 2mer의 재조합 HYVMB 유전자가 제대로 삽입되어 있는지 확인된 플라스미드를 동결-해동 형질전환법(freezing and thawing transformation)을 이용하여 아그로박테리움 내로 형질전환한 후 이를 확인하였다. 이렇게 준비된 재조합 HYVMB 감염성 클론 및 이를 포함하는 아그로박테리움은 차후 분석 실험에 활용될 수 있을 것이다.

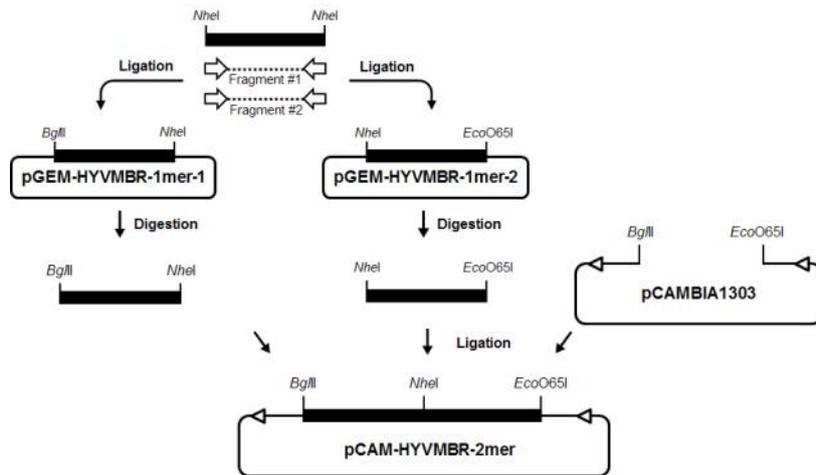


그림 5-40. 재조합 HYVMB (HYVMBR) 감염성 클론 제작

10. TYLCV Korea Group 2에 대한 재조합 감염성 클론 제작

- 국내에서 보고된 TYLCV 서열들을 분석하면, 크게 두 개의 서브그룹으로 구성되어 있음을 알 수 있다 (Korea group 1과 Korea group). 이들을 이스라엘계열 TYLCV 분리주들과 함께 계통 분석을 진행해 본 결과 두 개의 서브그룹이 서로 다른 분리주들과 유사성을 보임을 확인할 수 있었다 (그림 5-12). 하지만 현재까지 이들이 실제로 어떠한 영향을 미치는지에 대해선 확인되지 않았다. 따라서, 이러한 두 가지 TYLCV 그룹간의 특징을 비교하기 위해서는 두 가지 그룹 모두에 대한 재조합 감염성 클론을 제작하여 토마토 등 식물에 용이하게 감염시킬 수 있는 시스템을 구축하여야만 한다.

- 두 그룹의 TYLCV 중 KG1에 속하는 고성 isolate를 이용한 TYLCV 감염성 재조합 클론의 제작은 이미 1차년도에 진행한 바 있으며, 이를 이용하여 다양한 감염 실험을 수행한 바 있다. 당시 사용한 방법과 동일한 방법을 이용하여서 TYLCV KG2에 속하는 평택 isolate에 대한 감염성 재조합 클론을 제작하였다 (그림 5-41).

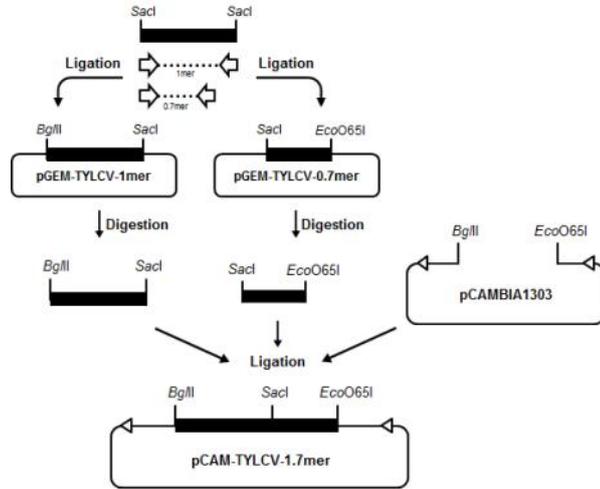


그림 5-41. TYLCV에 대한 재조합 감염성 클론 제작 과정

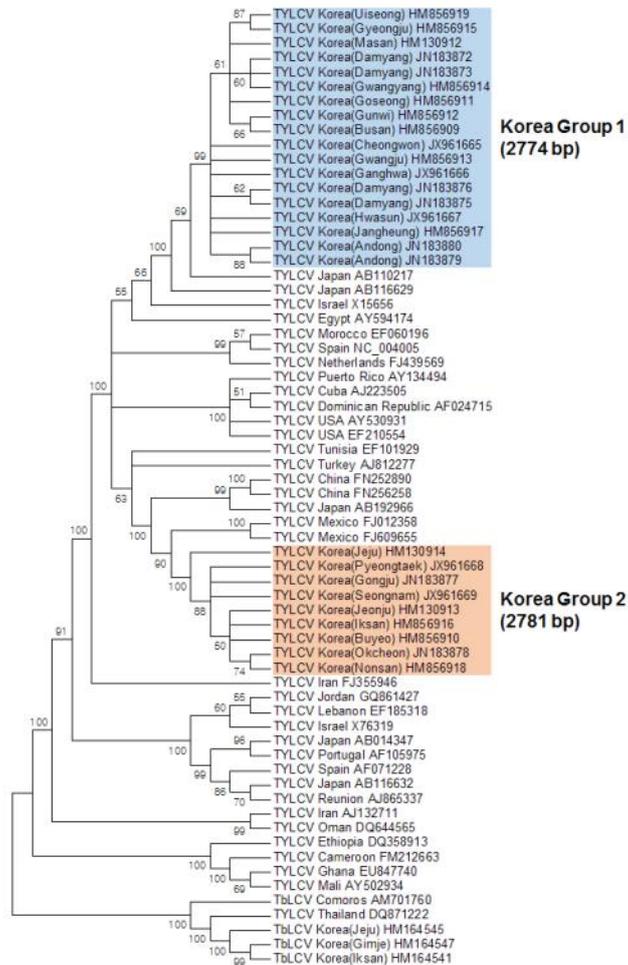


그림 5-42. 한국에서 보고된 TYLCV에 대한 계통 분석

3절. 기작

1. TbLCV 감염 인동에서 replication intermediate에 대한 분석하고, DNA A와 DNA-beta satellite 간의 유전자 재조합 분석함
2. 토마토에서 토마토황화잎말림바이러스의 종자 전염을 확인하고, 강원도와 제주도 농가의 시료에서 TYLCV 종자전염을 확인함
3. 국내외 시장에서 판매중인 토마토 종자를 대상으로 TYLCV 종자전염 가능성 확인함
4. TYLCV를 감염시킨 파프리카에서 채종한 종자를 이용하여 TYLCV 종자전염 가능성을 확인함
5. DNA와 RNA virus 복합 감염에 의한 담배가루이 매개 바이러스의 변이 분석을 수행함

1. 바이러스 감염 인동에서의 replication intermediate에 대한 분석

- 전북 익산시 인근의 토마토 농가에서는 *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV)와 함께 *Tobacco leaf curl virus* (TbLCV)가 많이 발견되었다. TbLCV의 유전자 서열이 *Honeysuckle yellow vein virus* (HYVV)의 유전자 서열과 상당 부분 유사하여 비슷한 기주 범위를 가지기 때문에 2012년 6월과 2013년 6월에 익산시 옹포면 주변의 길가와 야산에서 바이러스에 감염된 것으로 의심되는 인동을 찾아 위치와 번호를 기록하고 잎과 줄기를 채집하였다. 채집된 인동 시료들은 총 14개였으며 이 중 8개의 시료에 TbLCV가 감염된 것을 PCR을 이용하여 확인하였다.

표 5-7. PCR로 TbLCV를 확인하기 위한 프라이머 세트

	Sequence	Tm 값
Forward primer	5' - TGCAGTGATGGTGACCCCTGTGCGT - 3'	70.7
Reverse primer	5' - TGCCAACGACGCATACGCCGAGGCAAT - 3'	72.8

- 그 후 rolling circle amplification (RCA) 반응으로 TbLCV가 감염된 시료들의 DNA로부터 원형 DNA만을 증폭하고, TbLCV 유전자에서 절단 위치가 한 곳만 존재하는 제한효소(*SacI*)를 처리하여 선형의 전체 유전자를 확보하였다. 그런데 전기영동으로 확인하는 과정 중에 TbLCV의 전체 유전자 크기(2.8kb) 외에 1.3~1.4kb 정도의 작은 DNA가 존재하는 것을 알게 되었고 전체 유전자와 함께 이것들을 클로닝하여 염기서열 분석을 의뢰한 결과 TbLCV의 DNA-A 유전자가 재조합된 형태의 유전자임을 알 수 있었다.

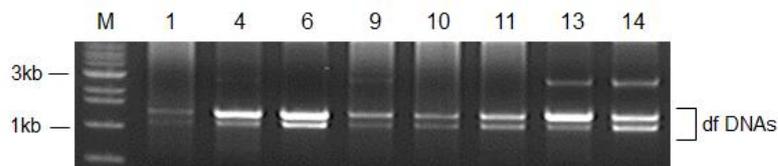


그림 5-43. RCA 후 제한효소(*SacI*)를 처리하고 전기영동으로 확인

- 이러한 형태의 유전자는 replication intermediates, defective DNA, subgenomic DNA 등의 이름으로 불리며 몇몇 제미니바이러스가 복제하는 과정에서 알 수 없는 이유로 인해 하나 이상의 DNA-A로부터 재조합(recombination), 결손(deletion), 반복(repetition), 역전(inversion), 첨가(addition) 등의 과정을 통해 생성된다고 알려져 있다. 이전까지 TbLCV의 replication intermediates에 관한 보고는 없었으며 전체 제미니바이러스를 통틀어도 적은 수의 논문들만이 이에 대해 생성되는 이유와 기능을 명백히 알 수 없다는 식으로 보고하고 있다.

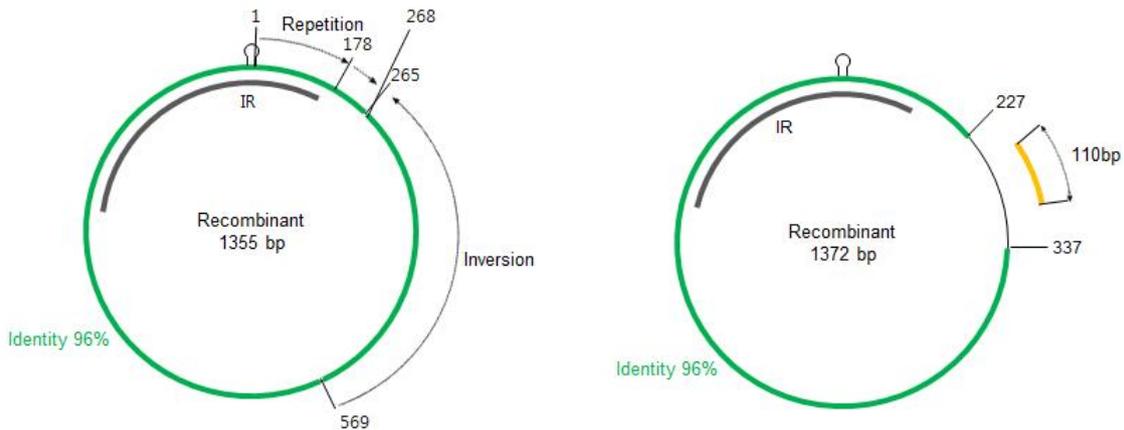


그림 5-44. 익산시 응포면에서 채집된 인동 샘플에서 발견된 두 종류의 recombinant replication intermediate

- 인동은 겨울을 날 수 있는 여러해살이 식물이기 때문에 TbLCV에 감염된 인동은 익산시 인근 지역에 지속적으로 발생하는 TbLCV의 원인이 될 수 있다. 2012년 시료와 2013년 시료 모두에서 replication intermediates가 발견된 것으로 미루어 보아 두 가지 가설을 세울 수 있었다. 첫 번째는 TbLCV가 인동에서 지속적으로 유지되면서 복제하는 과정에서 replication intermediates를 생성한다는 것이고 두 번째는 전 해에 생성된 replication intermediates가 겨울을 지나는 과정에도 복제하며 계속 유지된다는 것이다. 혹은 이 두 가지 모두를 합친 가설도 가능할 수 있다.

2. DNA A와 DNA-beta satellite 간의 유전자 재조합 분석

- 인동 덩굴은 겨울을 날 수 있는 여러해살이 식물이기 때문에 바이러스에 감염된 채로 긴 시간동안 유지된다. 이 때문에 안에서는 감염된 바이러스가 복제 과정에서 많은 변이를 일으키게 되는데 만약 둘 이상의 바이러스가 한 개체에 동시에 감염되어 있는 경우 둘 사이의 유전자 재조합이 발생한다. 우리나라의 인동 덩굴에서는 Tobacco leaf curl virus (TbLCV)가 흔히 발견되는데 작년에는 TbLCV만이 단독으로 감염된 인동 덩굴 개체에서 DNA A만이 재조합된 작은 DNA들을 분리할 수 있었다. 이번에는 추가로 익산시 인근의 야산에서 인동 덩굴들을 채집하여 바이러스를 확인한 결과 우리나라

라에서 보고된 TbLCV isolate 2종 (Genbank Accession No. HM164541, HM164547)과 이전에 보고된 적이 없는 일본 유래의 *Honeysuckle yellow vein* beta-satellite (HYVB) 1종 (AB236326)이 확인되었다. 재조합 DNA가 복제하기 위해서는 DNA A의 도움을 받아야만 하기 때문에 복제에 필수적인 바이러스 단백질인 replication-associated protein이 결합하는 intergenic region (IR)이 존재할 것이라는 것에 착안하여 IR에서 양 방향으로 증폭시키는 inverse PCR 프라이머를 고안하였다.

- 복합 감염이 확인된 5개의 인동 덩굴 개체의 DNA로 inverse PCR을 진행한 결과 아래와 같이 DNA A에 해당하는 크기와 재조합 DNA로 추정되는 크기의 밴드들을 얻을 수 있었다.

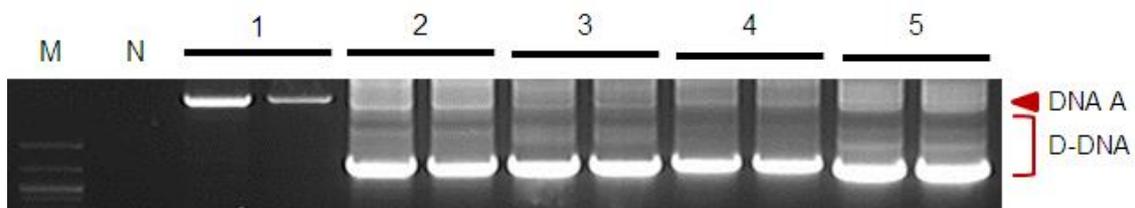


그림 5-45. Inverse PCR로 바이러스 DNA를 증폭한 뒤 전기영동으로 확인한 사진

- D-DNA에 해당하는 밴드들을 클로닝하여 염기서열 분석을 진행한 결과 다양한 D-DNA들을 얻을 수 있었는데 작년과 달리 2개 이상의 바이러스가 섞인 형태의 재조합 D-DNA들이 확인되었다. 앞서 발견했던 2가지의 TbLCV isolate가 섞인 형태뿐만 아니라 HYVB까지 섞인 형태도 있었는데 특이하게도 작년의 재조합 DNA와 결손 (deletion), 반복 (repetition), 역전 (inversion), 첨가 (addition) 등의 유전자 재조합이 일어난 부분이 비슷했다.

Tobacco leaf curl virus isolate KJ (HM164547)
 Tobacco leaf curl virus isolate IS4 (HM164541)
 Honeysuckle yellow vein beta-satellite isolate [Japan:Masuda:2003] (AB236326)

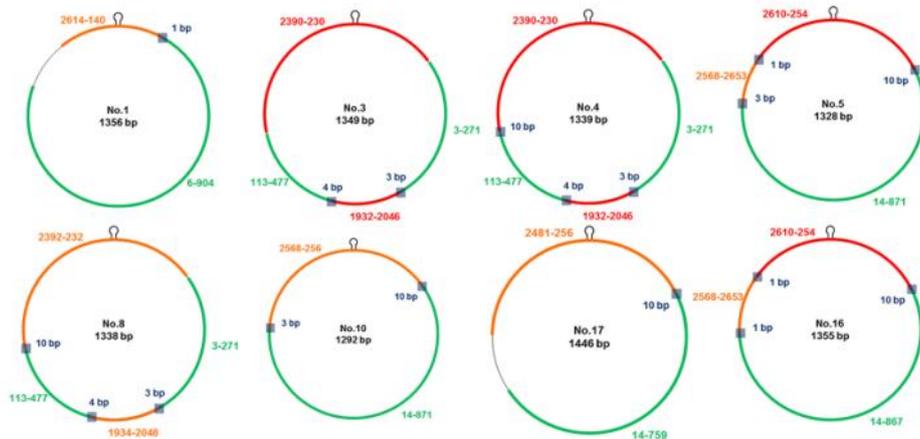


그림 5-46. D-DNA의 염기서열 분석 결과를 간략하게 나타낸 모식도

- 인동 덩굴이 여러해살이 식물이기 때문에 바이러스가 한 개체 내에서 지속되면서 복합 감염을 통해 다른 바이러스와 만나고, 그로 인해 서로 다른 바이러스간의 유전자 재조합이 쉽게 일어날 수 있다. 우리는 이번 실험을 통해 3가지 다른 바이러스가 서로 재조합을 통해 또 다른 DNA를 만드는 것을 확인하였으며 서로 다른 인동 개체에서 매우 유사한 형태의 재조합 DNA가 만들어지는 것으로부터 재조합 DNA 생성 기작을 규명할 수 있는 단서를 얻을 수 있었다.

3. 토마토황화잎말림바이러스 진단법을 이용한 종자 전염 확인

- 새롭게 확립한 TYLCV 진단 방법을 이용하여 바이러스에 감염된 토마토의 조직을 대상으로 1세대 식물에서 바이러스가 어느 부위까지 존재하는지 확인하였다 (그림 5-47).

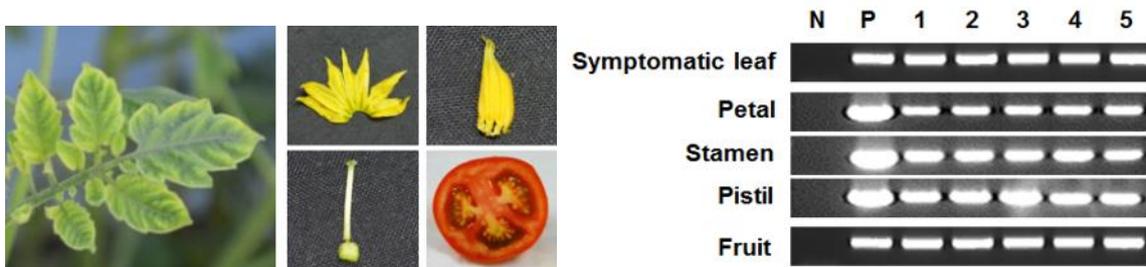


그림 5-47. 토마토황화잎말림바이러스(TYLCV)에 감염된 식물 조직에 따른 검정 실험 결과

- 1세대 식물 검정 결과 1세대 식물에서 종자발달에 이르는 과정까지 바이러스가 모두 존재한다는 것을 확인하였다. 그 후 종자로부터 발아하여 2세대 식물이 되는 과정까지도 바이러스가 존재하는지 알아보기 위한 실험을 진행하였다. 종자감염이 아닌 종자전염을 확인하기 위해 1% 락스(NaClO)로 소독한 종자부터 종자 내부의 배아와 배유, 종자발아 후 떡잎과 본엽에서 바이러스 검정을 실행하였다 (그림 5-48).



그림 5-48. 토마토황화잎말림바이러스(TYLCV)에 감염된 종자 조직과 발아 후 식물에서의 검정 결과

4. 강원도와 제주도 농가의 시료에서 TYLCV 종자전염 가능성 확인

- 기존 문헌에 따르면 TYLCV는 담배가루이에 의해서만 전염이 된다고 알려져 있었지만 지난해 제주도 농가의 시료 검정 결과로부터 종자전염에 의한 전염 가능성을 발견하고 추가 실험을 진행한 결과 TYLCV의 종자전염이 확인되었다. 이를 뒷받침하기 위해 담배가루이가 없음에도 불구하고 TYLCV가 발병한 강원도의 여러 토마토 농가들로부터 토마토 잎과 과실을 수집하였다 (그림 5-49).



그림 5-49. 강원도의 여러 농가에서 발견된 TYLCV 병징 사진

- 수집한 시료 36개에 대해 각각의 DNA를 추출하여 지난해 개발한 TYLCV 종자전염 진단 프라이머를 이용해 PCR 검정을 진행하였다 (그림 5-50). 36개의 시료 중 20개의 시료에서 TYLCV가 검출되었으며 전기영동 상에서 밴드가 진하게 나타난 5개의 샘플로 DNA sequencing을 수행하여 검증하였다. 그 결과 모든 시료가 국내에서 보고된 TYLCV와 동일한 sequence를 갖는 것으로 나타났다 (그림 5-50).

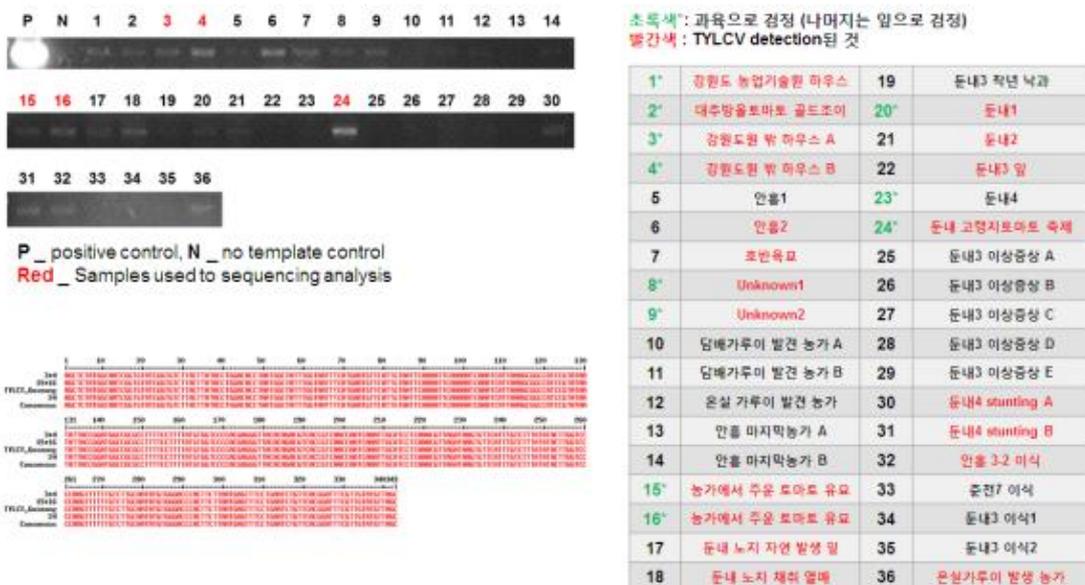


그림 5-50. 강원도 농가의 시료를 정리한 표와 PCR 및 sequencing 결과

- 국내에서 TYLCV가 전국적으로 창궐했음에도 불구하고 강원도 지역은 낮은 기온 탓에 담배가루이가 잘 번식하지 못해 그동안 TYLCV 청정 지역으로 알려졌다. 하지만 위 실험 결과에서 담배가루이가 없음에도 불구하고 TYLCV가 발병한 것이 확인되었으며 이는 종자전염에 의한 TYLCV의 추가 확산이 가능함을 의미한다.
- 지난해 제주도의 여러 농가로부터 토마토 과육 및 종자를 채집, TYLCV를 검출하였다. TYLCV에 오염된 종자로부터 다음 세대로 TYLCV가 전염되는지 알아보기 위해 해당 종자들을 발아시켜 얻은 유묘를 PCR로 검정하였다 (그림 5-51). 담배가루이가 없는 환경에서 재배한 유묘에서 TYLCV가 모두 검출되었으므로 이는 TYLCV 종자전염을 설명하는 데 있어 중요한 근거로 활용될 것이다.

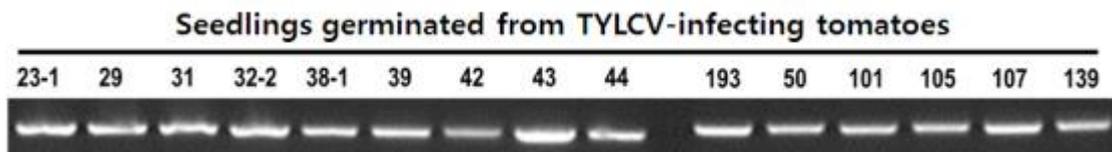


그림 5-51. 제주도 농가 유묘 시료의 PCR 검정 결과

5. 국내외 시장의 토마토 시료에서 TYLCV 종자전염 가능성 확인

- 지금까지의 종자전염 실험에 사용된 종자들은 모두 담배가루이가 없음에도 TYLCV가 발생한 농가에서 채집되었다. 그 원인을 파악하고자 시중에 유통되고 있는 종자들을 대상으로 TYLCV 감염 여부를 조사하였다. 실험에는 현재 시판중인 42종의 제품들이 사용되었으며 각각 10립씩 무작위로 선별한 뒤 DNA를 추출하여 PCR 검정을 진행하였다 (그림 5-52).

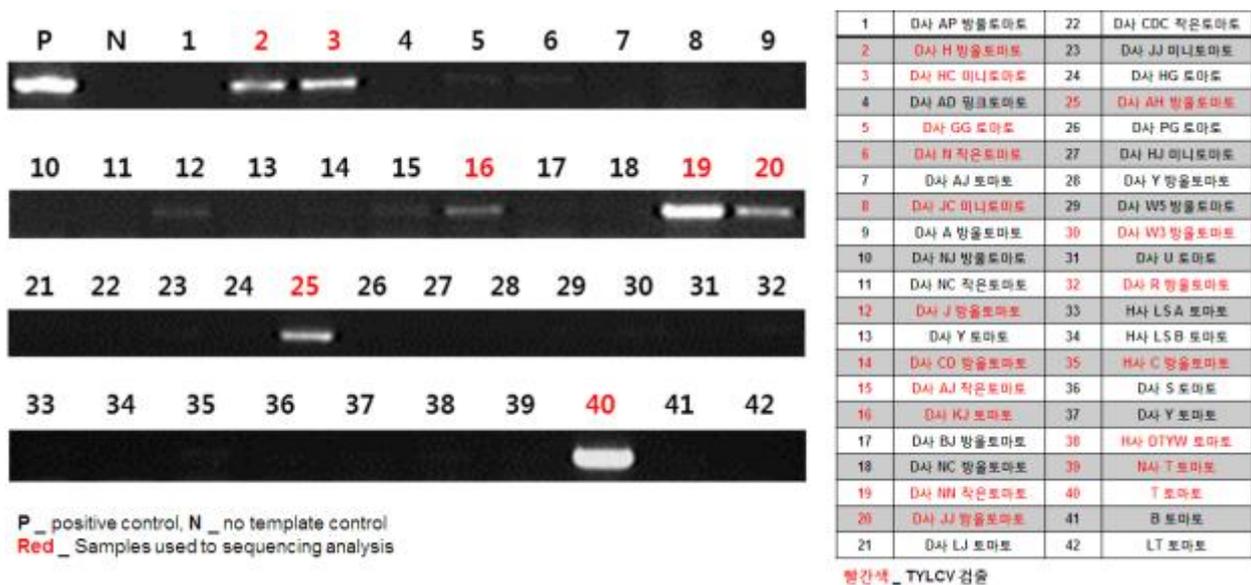


그림 5-52. 국내에 시판되는 42종의 토마토 종자와 그 PCR 검정을 진행한 결과

- 검정 결과 42개의 품종 중 18개의 품종에서 TYLCV가 검출되었으며 그 중 전기영동 상에서 밴드가 진하게 나타난 7개의 시료에 대해서는 DNA sequencing을 진행하였다 (그림 5-52). DNA 상태가 좋지 않아 분석에서 누락된 2개의 시료를 제외한 5개의 시료에서 기존에 국내에서 보고된 TYLCV와 동일한 염기 서열을 갖는 것을 확인했다.

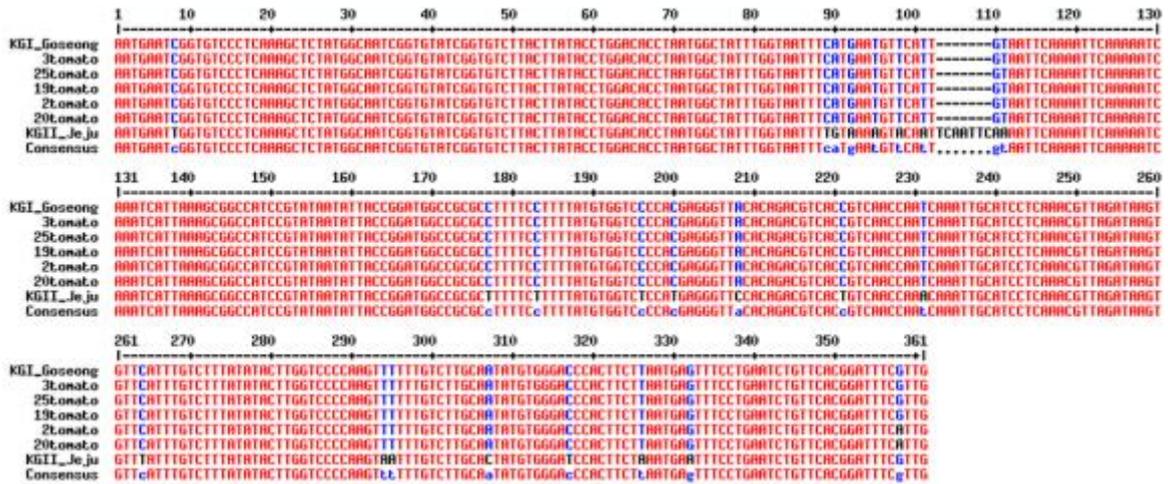


그림 5-53. 국내 시판 종자에서 검출된 TYLCV sequencing 분석 결과

- 다음으로 감염된 종자를 이용해 재배된 토마토의 과실에서 동일한 종자전염이 관찰되는지 조사하고자 시중에 유통되는 14종의 토마토와 그로부터 분리한 종자에 대해 TYLCV 검정을 진행하였다 (그림 5-54).

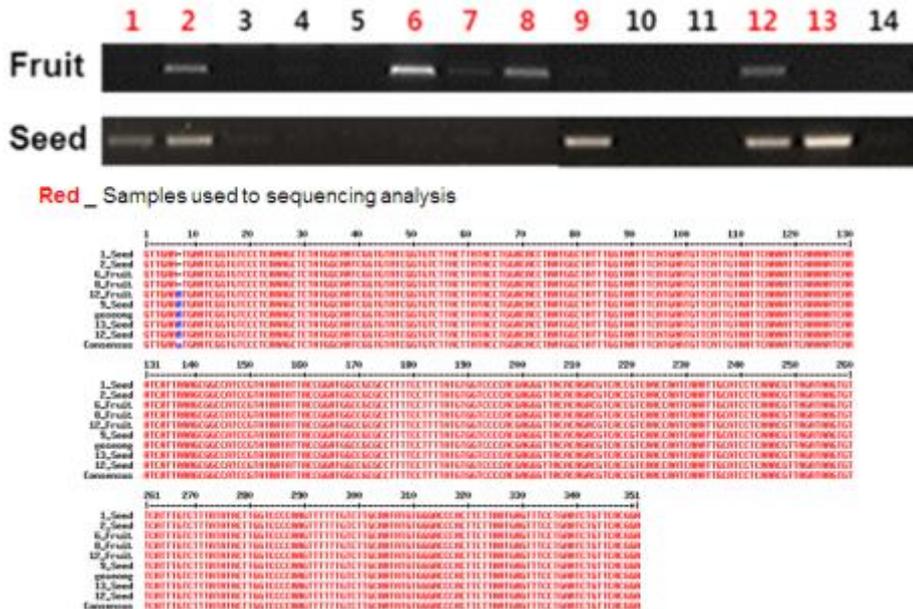


그림 5-54. 국내에서 시판되는 14종의 토마토와 그 종자로 PCR 검정 및 sequencing 분석을 진행한 결과

- 검정 결과 11종의 토마토에서 채취한 종자에서 TYLCV가 검출되었으며 그 중 8개의 시료에 대해 DNA sequencing 분석까지 진행하여 국내에서 보고된 TYLCV의 염기서열과 일치하는 것을 확인하였다 (그림 5-54).
- 위 실험들로 국내에서 시판되는 종자 상품과 토마토 과실 안의 종자까지 TYLCV 종자전염 가능성을 가진다는 것을 확인하였다. 이는 TYLCV 종자전염을 뒷받침하는 중요한 근거가 되는 동시에 현재 국내 농가들이 TYLCV 종자전염에 의한 피해를 입을 수 있다는 문제점을 나타낸다.
- 다음으로 국외 시판 종자들에서도 동일한 TYLCV 종자전염 가능성이 관찰되는지 조사하고자 14개국에서 시판되고 있는 87종의 종자를 수집하였다 (그림 5-55). 수집한 종자들은 앞선 국내 종자 실험과 마찬가지로 각 품종별로 10립씩을 무작위로 선별하여 DNA를 추출한 뒤 PCR 검정을 수행하였다 (그림 5-56). 검정 결과 87종의 시료 중 31종에서 TYLCV가 검출되었다.

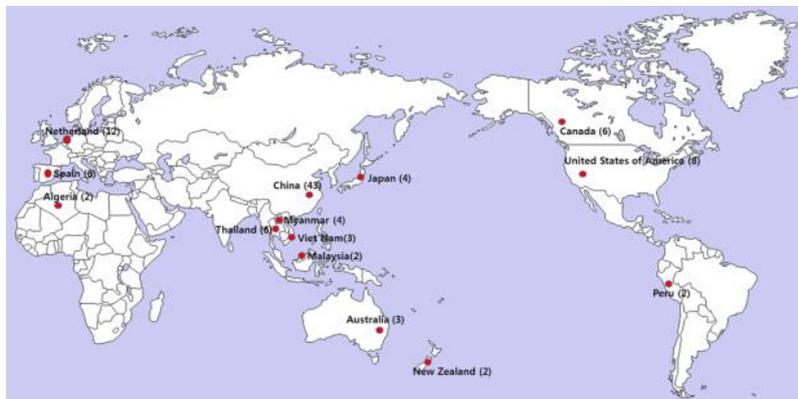


그림 5-55. 수집된 국가별 시판 종자 시료를 나타낸 지도

		* : detection		** : detection+Sequencing	
1	Algeria 1	33	China 23	63	USA 1
2	Algeria 2	37*	China 26	64*	USA 2
3	New Zealand 1	38*	China 27	65**	USA 3
4	New Zealand 2	35	China 28	66*	USA 4
5	Myanmar 1	36*	China 29	67	USA 5
6	Myanmar 2	37*	China 30	68	USA 6
7	Myanmar 3	38	China 31	69	USA 7
8	Myanmar 4	39	China 32	70	USA 8
9**	Peru 1	40**	China 33	71	Canada 1
10	Peru 2	41*	China 34	72	Canada 2
11	Australia 1	42	China 35	73**	Canada 3
12	Australia 2	43**	China 36	74	Canada 4
13*	Australia 3	44	China 37	75	Canada 5
14	Japan 1	45	China 38	76	Canada 6
15	Japan 2	46	China 39	77	Malaysia 1
16	Japan 3	47	China 40	78	Malaysia 2
17	Japan 4	48	China 41	79*	Vietnam 1
18	Thailand 1	49*	China 42	80*	Vietnam 2
19	Thailand 2	50	China 43	81*	Vietnam 3
20	Thailand 3	51	Netherlands 1	82*	Spain 1
21	Thailand 4	52*	Netherlands 2	83*	Spain 2
22	Thailand 5	53	Netherlands 3	84	Spain 3
23**	Thailand 6	54*	Netherlands 4	85**	Spain 4
24**	China 17	55**	Netherlands 5	86**	Spain 5
25	China 18	56	Netherlands 6	87	Spain 6
26	China 19	57	Netherlands 7	88	
27**	China 21	58*	Netherlands 8	89	
28*	China 22	59*	Netherlands 9	90	
29*	China 24	60	Netherlands 10	91	
30	China 25	61	Netherlands 11	92	
31	China 24	62	Netherlands 12	93	

그림 5-56. 국가별 종자 상품을 정리한 표와 PCR 검정 결과

- 본 연구에서는 기존 문헌에 알려진 바와 달리 TYLCV가 종자전염을 통해 다음 세대로 전이될 수 있으며 그로 인해 이미 시판되고 있는 종자들 중 상당수가 오염되었다.

6. 파프리카에서 TYLCV 종자전염 가능성 확인

- 토마토에서 확인된 TYLCV 종자전염이 같은 가지과에 속하는 작물에도 일어날 수 있는지 알아보려고 TYLCV의 또 다른 기주로 알려져 있는 파프리카에 대해서도 종자전염 확인 실험을 진행하였다. 국내에서 많이 재배되는 5가지 파프리카 품종에 감염성 클론을 이용해 TYLCV를 접종한 뒤 진주 소재의 경상남도 농업기술원의 도움을 받아 8주간 양액 재배하였다. 각 품종별로 10주씩 재배하였으며 개체별로 잎, 꽃, 종자를 채집하여 DNA를 추출, PCR 검정을 진행하였다 (그림 5-57).

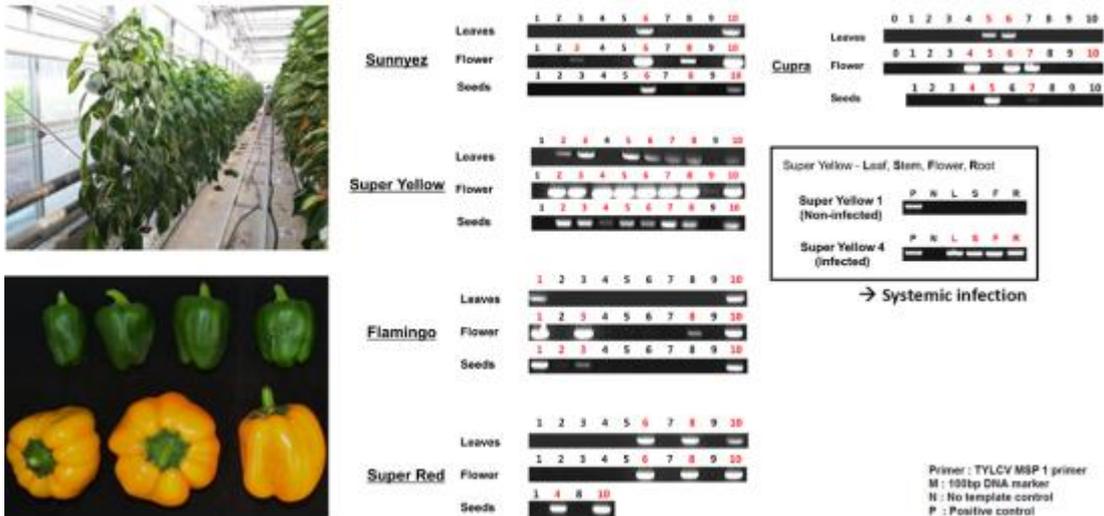


그림 5-57. 경상남도 농업기술원 온실 전경과 파프리카 사진 및 PCR 검정 결과

- 파프리카는 TYLCV에게 있어 토마토만큼의 좋은 기주가 아니기 때문에 감염률이 높지 않게 나타났지만 감염된 파프리카에서는 대부분 잎과 꽃은 물론 종자까지 TYLCV가 검출되었다. 이는 앞선 토마토 실험과 마찬가지로 TYLCV가 파프리카에서도 종자전염 가능성을 보여주는 결과로 이후 감염된 종자를 발아시켜 검정하는 등의 추가 실험을 통해 파프리카에서 다음 세대로 TYLCV가 전이되는지 알아볼 예정이다.

7. DNA와 RNA 바이러스 복합 감염에 의한 담배가루이 매개 바이러스 변이 분석

- 실제 농업 현장에서는 다양한 종류의 바이러스가 복합감염이 된 경우가 종종 발견이 된다. 이 경우, 바이러스간의 상호작용으로 인해 단일 바이러스 감염 시와는 다른 양상을 보여주기도 한다. 이번 년도에는 넓은 기주 범위를 갖는 오이모자이크바이러스 (*Cucumber mosaic virus*, CMV)와 TYLCV를 두 가지 품종의 토마토 (TYLCV 이병성 및 저항성 토마토)에 복합감염 시 병리학적 특성을 분석했다 (표 5-8).
- 접종 실험 시 CMV는 CMV가 감염된 패션후르트 잎의 즙액을 이용하여 접종하였으며, TYLCV는 기존에 제작한 재조합 감염성 클론이 형질전환된 아그로박테리아를 이용해 접종하였다 (표 5-8).

표 5-8. 바이러스 복합 감염 실험군에 대한 설명 (각각의 숫자는 접종한 식물 주수)

서광 (TYLCV 이병성)		박커스 (TYLCV 내병성)	
CMV only	10	CMV only	10
TYLCV only	10	TYLCV only	10
CMV + TYLCV *	15	CMV + TYLCV *	15
CMV → TYLCV **	15	CMV → TYLCV **	15
TYLCV → CMV **	15	TYLCV → CMV **	15

* 같은 시기에 접종을 수행

** 첫번째 바이러스를 감염시킨 후 일주일 후에 두번째 바이러스를 접종

- 서광 토마토에서는 CMV, TYLCV 단독 감염에서는 전형적인 각각의 병징이 잘 발현되었으며, 복합 감염 시에는 동시에 감염시킨 경우엔 두개 바이러스 병징 특징이 모두 나타났지만, 시간차를 두고 접종한 경우엔 먼저 감염시킨 바이러스에 대한 병징이 우세하게 나타났다. 특히 TYLCV를 먼저 감염시키고 CMV를 감염시킨 경우는 TYLCV를 단독 감염시켰을 때보다 더 강한 병징이 나타났다. (그림 5-58)



그림 5-58 바이러스를 접종한 서광 토마토 (2차 접종 후 3주차, 그룹별 사진에서 왼편 식물은 접종하지 않은 식물)

- 박커스 토마토 (TYLCV 내병성)에서는 CMV 단독 감염시에는 TYLCV 내병성과 무관하게 병징이 잘 나타났으며, TYLCV는 *Ty-1* 등 TYLCV 내병성과 관련된 유전자의 영향을 받아서 병징이 전혀 나타나지 않았다 (그림 5-59).

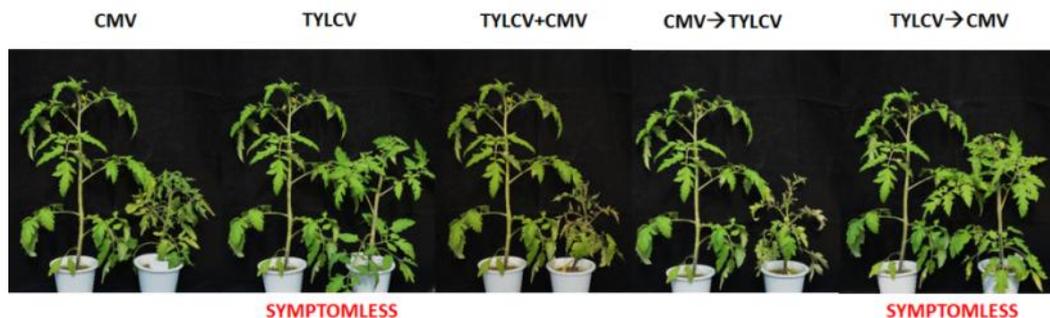


그림 5-59. 바이러스를 접종한 박커스 토마토 (2차 접종 후 3주차, 그룹별 사진에서 왼편 식물은 접종하지 않은 식물)

- TYLCV와 CMV를 동시에 감염시킨 조합들에 대해서 DNA를 추출한 후, TYLCV 서열상에 변이가 발생했는지 관찰하였지만, 확인이 되지 않았다.

4절. 방제

1. *Nicotiana benthamiana*의 담배가루이 유인 및 방제 식물 활용 가능성을 확인하였다.

1. *Nicotiana benthamiana*의 담배가루이 유인 및 방제 식물 활용 가능성 확인

- 담배가루이가 왕성하게 번식하고 있는 토마토와 고추, 가지 등의 가지과 작물이 심어져 있는 온실 내에 *N. benthamiana*를 두었을 때 초반에 많은 수의 담배가루이가 *N. benthamiana*로 몰리지만, 일정시간이 지난 후 관찰하였을 때 급속도로 담배가루이의 개체수가 줄어드는 현상을 발견할 수 있었다. 다른 비슷한 환경의 온실 내에서 반복적으로 같은 실험을 수행하였을 때 같은 현상이 반복됨을 확인할 수 있었다.
- 이를 구체적으로 확인하기 위해 토마토, *N. benthamiana*, *N. tabacum* 이 세 가지 식물을 넣은 케이지에 담배가루이를 각각 25개체씩 넣어주고 일주일 후 살아있는 담배가루이의 개체수를 관찰하여 보았다. 그 결과 토마토와 *N. tabacum*에서는 20개체와 근접한 개체수가 확인이 되었지만, *N. benthamiana*가 있는 케이지에 넣어준 담배가루이들은 모두 잎 표면이나 바닥에 죽어있는 것을 발견할 수 있었다 (표 5-9)

표 5-9. 토마토, *N. benthamiana*, *N. tabacum*를 넣은 케이지에서의 담배가루이 개체수 변화

	넣어준 담배가루이 개체수	일주일 후의 담배가루이 개체수
토마토 (서광)	25	19
<i>N. benthamiana</i>	25	0
<i>N. tabacum</i>	25	22

- 담배가루이들은 주로 잎의 뒷면에 붙어서 존재하며 흡즙을 하는 것을 관찰할 수 있었지만, 죽어있는 담배가루이들은 주로 담배 잎 윗면과 바닥에 죽어있는 것을 확인할 수 있었다 (그림 5-60). 이는 흡즙과정에서 바로 담배가루이가 죽는 것이 아니라 그 이후에 죽었을 가능성이 높다고 할 수 있다.

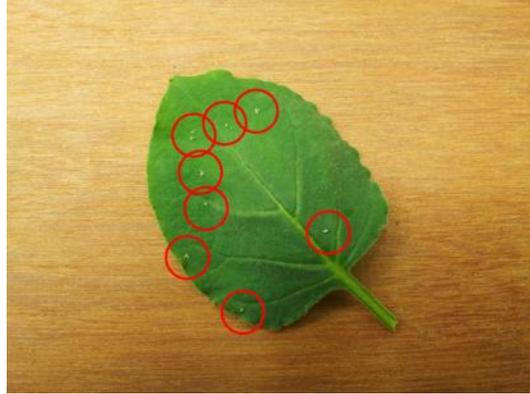


그림 5-60. *N. benthamiana*를 넣어준 케이스 내에서 잎 윗면에 사체로 발견된 담배가루이 (적색 원으로 표시한 부분이 담배가루이)

- 이러한 결과를 통해 *N. benthamiana*가 담배가루이를 유도하고 죽이는 살충력을 갖고 있다고 말할 수 있으며, 이를 체계적으로 분석하고 가루이 방제에 활용하기 위해 추가 실험을 진행할 예정이다.
- 추가실험을 통해 가루이 유도 및 살충력에 영향을 주는 물질을 *N. benthamiana*로부터 추출하여 이를 살충제로 개발할 수도 있을 것이며, 이는 가루이 매개 바이러스의 방제에 활용될 수 있을 것이다.

6장. 제5협동과제 (충남농업기술원)

1절. 가루이류 매개 바이러스 변이와 복합감염 현장실증 연구

1. 서언

토마토는 가지과에 속하며 보통토마토(*Lycopersicon esculantum* Mill.)와 방울토마토(*Lycopersicon esculantum* var. *ceradiforme* Alef.)로 나누어지고 온대지역에서는 1년생 초본이나 열대지역에서는 단명의 다년생 식물이다.

원산지는 남아메리카의 서부 고원지대인 안데스산맥으로 알려져 있으며 페루, 에콰도르, 볼리비아 지방에서는 많은 야생종이 발견되고 있다(Yamaguchi, 1993).

토마토의 이동경로는 16세기 초에 이탈리아에 전파되었고 17세기에 영국에 들어와 관상용으로 재배되었고 18세기에 이탈리아에서 식용으로 이용되었다. 우리나라에 들어온 것은 확실히 알 수는 없으나 지봉유설에 그 이름이 ‘남만시’로 기술된 것으로 보아, 그 책의 저작연대인 1614년 보다는 앞선 것으로 보이며, 중국에 도입된 시기가 17세기 초이므로 중국에서 우리나라 사신이 도입한 것으로 보인다(表 등, 1982).

우리나라에서 토마토가 본격적으로 재배되기 시작된 것은 6. 25전쟁 후 미군들이 들어오면서부터였다. 1990년대부터 노지재배 면적은 점차 줄어들고 시설하우스 면적은 급격히 증가하기 시작하였다. 현재 토마토의 재배면적은 7,070ha이고 생산량은 약 500천톤에 달하며 시설재배가 주로 이루어지고 있다(농림부, 2015)

담배가루이(*Bemisia tabaci* (Gennadius))는 노린재목 가루이과(Aleyrodidae)의 해충으로 열대 및 아열대 지방에서 약 600 여 종의 기주에 발생하는 주요 흡즙성 해충이다(Perring 등, 1993). 또한, 담배가루이는 시설재배지의 농작물에 피해를 심각하게 주는 해충으로 알려져 있다. 담배가루이의 기주범위는 매우 광범위하며(Greathead, 1986), 기주에 따른 형태적 변이가 심해 24종의 다른 이름으로 불리기도 하였다(Mound와 Halsey, 1978). 또한 이 해충은 작물을 흡즙하여 가해할 때 바이러스를 매개하며 이차적인 피해를 주는데, 약 100종 이상의 바이러스를 매개한다(Jones, 2003). 또한 간접적인 피해인 감로에 의한 그을음병도 작물에 피해를 끼친다(Byrne, 1999). 담배가루이는 TYLCV를 매개하는 유일한 매개충이다(Ghanim 등, 1998). 김과 김(2014)은 담배가루이는 기주작물과 농약 감수성 정도에 따라 다양한 생태형으로 분류되고 있다. 안동 참외밭 11곳에서 Q 생태형 담배가루이를 진단 하였고, 이 가운데 4곳의 채집장소에서 B 생태형도 검출되었다. 경북지역 참외재배지에서 담배가루이가 발생한다는 최초의 보고이며, 특히 두 생태형이 동일한 재배지에서 혼재한다는 것을 나타낸다.

매개충인 담배가루이의 성충과 약충이 체내 순환식 영속전염을 하나, 산란과정에서 차세대로의 전염은 되지 않는다(Cohen과 Nitzany, 1966). 일본의 경우 1966년에 큐슈지역에서 처음 발생한 이후 2004년도 서남부 일대에 대발생하여 큰 피해를 일으킨 사례가 있고(Shigenori 등, 2009), 우리나라에는 1998년 처음 발생한 이래, 최근들어 급격히 확산되고 있다.

담배가루이는 생물적 특성을 달리하는 개체군 분화가 이루어져 있기 때문에 기주 선호성 및 매개하는 바이러스의 종류 등 담배가루이의 특성에 따라 여러 생태형(biotype)이 존재하

며(Brown 등, 1995), 전 세계적으로 최대 24개의 생태형으로 구분되었다(Perring 등, 2001). 그러나 De Barro 등(2011)은 이들 생태형들을 한 종으로 보지 않고, 형태적으로 구분이 어려운 서로 다른 24종으로 간주하기도 하였다.

이들 가운데 전 세계적으로 가장 심각한 피해를 주는 것은 B 생태형으로 이들은 생식력이 강하고 작물에 여러 종류의 geminivirus를 매개한다. 또한 다른 생태형보다 넓은 기주범위, 높은 번식률, 카바메이트계 및 유기인계 농약에 대한 저항성을 가지며, 박과류 작물에 특유의 은빛 잎 증상을 일으키는 점이 특징이다(Costa 등, 1993; Brown 등, 1995). Q 생태형은 B 생태형보다 사망률이 높고 번식률은 낮지만(Nombela 등, 2001), 네오니코티노사이드계 살충제와 일부 곤충 성장조절제에 대한 높은 저항성을 보인다(Xanen 등, 2002). 담배가루이 biotype B는 감염된 식물에 8시간 노출 후 TYLCV를 감염 시킬 수 있다(Garnim 등, 2001). 연 등(2011)은 참외에서 담배가루이 유인효과는 진노랑 트랩과 UV 390nm에서 황색 트랩보다 158% 향상 되었다.

토마토에서 유래한 TYLCV 관련하여 전파된 작물은 콩(Navas-Castillo 등, 1999), 오이, 호박, 멜론, 수박, 흰독말풀(Anfoka 등, 2009), 가지, 목화(Garnim 등, 1998) 등이다.

토마토황화잎말림바이러스(Tomato Yellow Leaf Curl Virus, TYLCV)는 Geminiviridae과 Begomovirus 속이며 세계적으로 토마토 재배지에서 가장 파괴적인 바이러스 병의 하나이다(Czosnek와 Laterrot, 1997, Moriones와 Navas-Castillo, 2000, Kil 등, 2014). 국내에서는 경남 통영의 시설재배 토마토에서 처음 발생 되었다(지 등, 2008 ; 광 등, 2008). 이후 2010년 경남, 경북, 충남, 충북, 전남, 전북, 제주도 등 전국적으로 확산되었다(김 등, 2011). TYLCV는 1960년대 중동에서 처음 발견되었으며 현재, 유럽, 아시아, 아프리카, 중앙아메리카, 호주 등 전 대륙에 확산되어 심각한 피해를 일으키고 있다(Aidawati 등., 2002; Duffy and Holmes, 2007; Maruthi et al., 2005; Tsai et al., 2011a, 2011b).

TYLCV는 single-stranded DNA로 구성된 바이러스로, 1964년 이스라엘에서 처음 분리되었으며(Cohen and Harpaz, 1964), 분리지역, 병증차이 등에 따라 10여종의 계통이 보고되어 있다(Abhary 등, 2007; Fauquet 등, 2003). TYLCV에 의해 감염된 토마토는 황화, 잎말림 및 위축 등의 증상으로 토마토에 치명적인 병으로 100%의 손실률이 보고되기도 하였다(Moriones, 2000). TYLCV의 전염양식은 담배가루이가 직접 매개하며, 즙액, 종자 및 접촉 전염은 하지 않는다(Czosnek, 1999; Die ner와 Raymer, 1971).

Czosnek과 Laterrot(1997)는 토마토 제미니바이러스는 1) 지중해/중동/아프리카지역, 2) 인도, 극동과 오스트레일리아지역, 3) 아메리카로 나뉘어지며, 1그룹은 서부 지중해와 중동/카리브해 지역으로 나뉘어진다고 하였다.

계통발생학적 분석은 한국에서 발생된 TYLCV는 2그룹으로 나뉘어지며, Korea group 1(마산)은 일본(미야자키)에서 기원했고, Korea group 2(제주/전주)는 일본(토사/하루노)에 기원한다고 했다(Lee 등, 2010).

TYLCV를 방제하는 방법은 그 동안 주로 살충제와 물리적 방제를 통한 매개충을 방제하는데 초점이 맞추어 왔다. 그러나 지속적인 살충제 사용으로 인해 담배가루이가 살충제 저항성을 나타내는 문제점 외에도 친환경재배의 중요성이 부각됨에 따라 살충제를 사용한 방제에는 한계가 있다. 방충망을 이용한 물리적 방제 방법 또한 통풍이 불량해 토마토 생육에 지장

을 주는 문제점이 있다. 따라서 TYLCV 피해를 줄이는 가장 효과적인 방법은 토마토 저항성 품종을 재배하는 것이다(Cohen and Antignus, 1994; Lapidot and Friedmann, 2002).

토마토 재배 작형별 바이러스 발병포장율은 반촉성재배는 23%, 억제재배는 59.4% 이었으며, 저항성 품종의 발병율은 매우 낮았다(고 등, 2014). 또한 토마토에서 감수성 품종은 바이러스 접종 30일 후에 상업에 황화, 위축증상을 나타내었고, Ty-1, Ty-3 유전자를 저항성 계통은 병증 발현이 없었다(최 등, 2013). 식물 바이러스의 매개충-전염을 조절하는 기작은 3가지 관점 즉, 바이러스-매개충의 상호작용, 식물-매개충의 상호작용, 바이러스-식물의 상호작용에서 이해해야 한다(Blanc 등, 2011).

본 연구에서는 담배가루이 발생시기와 TYLCV 발생양상을 구명하기 위하여 충남지역의 토마토 주산지역의 바이러스 발병현황 등을 조사하였고, 가지과 작물과 박과 작물의 TYLCV 발현증상 및 종자전염을 확인하기 위하여 아그로박테리움법으로 접종한 후 DNA를 추출하여 종자감염 여부를 조사하였다. 또한, 담배가루이 방제를 위하여 화학약제의 효율적인 처리방법과 액실 슈가 및 님제를 활용한 종합방제방법을 확립 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 토마토의 TYLCV 발생조사

2012년부터 2014년까지 3년 동안 충남지역 토마토 주산지인 부여, 논산, 예산, 청양을 중심으로 TYLCV 발생 현황을 조사하였다. 조사방법은 포장당 임의로 3지점을 선정하여 각 지점당 100주 이상씩 3반복으로 이병주를 조사하여 발병율을 산출 하였다. 포장당 10샘플을 채취하여 RT-PCR로 다시한번 바이러스 감염여부를 확인하였다.

나. TYLCV 접종에 의한 병증 발현

(1) 바이러스 종류별 병증 발현

시판되고 있는 토마토 품종 중에서 TYLCV 저항성 품종인 ‘박커스’와 ‘도태랑TY’, 감수성 품종인 ‘도태랑 요크’와 ‘유니콘’을 이용하였다. 바이러스의 접종은 TYLCV, TbLCV, HYVV, Beta 등 4개의 단독 바이러스 접종과 TYLCV+HYVV, TYLCV+TbLCV, TbLCV+HYVV, TYLCV+HYVMV beta, TbLCV+HYVMV beta, HYVV+HYVMV beta 등 6종의 복합 접종을 실시하였다. 식물에 대한 토마토황화잎말림바이러스 접종은 기존 연구에서 제작한 감염성 클론을 이용하여 수행하였다(Kil et al, 2014). 식물 발현용 벡터인 pCAMBIA 1303에 토마토황화잎말림바이러스 유전자가 1.7 mer 형태로 삽입이 된 플라스미드를 아그로박테리움 GV3101 분리주에 형질전환한 후, 이를 항생제 (50 µg/mL 카나마이신, 50 µg/mL 리팜피신, 10 µg/mL 젠타마이신)가 첨가된 LB 배지에 접종하여 28°C, 250 rpm으로 설정된 진탕 배양기 내에서 24시간 배양하였다. 접종을 할 3주령 식물 줄기의 정단부를 곤충핀을 이용하여 10회 가량 반복하여 찢어준 후, 배양한 아그로박테리움 배양액 500 µL를 찢어준 부위에 일회용 스포이드를 이용하여 조심스럽게 떨어트리면서 20~30회 가량 추가로 반복해 찢어주어서 흡수가 잘 되도록 하였다.

(2) 작물별 바이러스 병증 발현

작물별 바이러스 병증을 확인하고자 고추에서 ‘한샘파리꽃고추’, ‘배로따고추’, ‘터널용고

추’, ‘청양고추’ 등 4품종과 피망에서 ‘슈페리어’ 1종, 파프리카에서 ‘슈퍼레드’와 ‘엘로우파프리카’ 등 2종, 가지에서 ‘흑장가지’ 1종, 토마토에서 ‘큐티’ 1종에 TYLCV를 접종하였다. 접종방법은 식물 발현용 벡터인 pCAMBIA 1303에 토마토황화잎말림바이러스 유전자가 1.7 mer 형태로 삽입이 된 플라스미드를 아그로박테리움 GV3101 분리주에 형질전환한 후, 이를 항생제 (50 µg/mL 카나마이신, 50 µg/mL 리팜피신, 10 µg/mL 젠타마이신)가 첨가된 LB 배지에 접종하여 28°C, 250 rpm으로 설정된 진탕배양기 내에서 24시간 배양하였다. 접종은 3주령 식물 줄기의 정단부를 곤충핀을 이용하여 10회 가량 반복하여 찢러준 후, 배양한 아그로박테리움 배양액 500 µL를 찢러준 부위에 일회용 스포이드를 이용하여 조심스럽게 떨어트리면서 20~30회 가량 추가로 반복해 찢러주어서 흡수가 잘 되도록 하였다.

(3) TYLCV를 접종한 고추의 병증 발현

고추에서 품종별 TYLCV 병증검정을 위하여 ‘K스타’, ‘스마트’, ‘대들보’, ‘빅스타’, ‘대권선언’, ‘당첨’, ‘NW비가림’, ‘베로파’, ‘홍강’, ‘신통방통’ 등 10 품종을 공시하여 Agrobacterium법으로 바이러스를 접종한 후, 품종별 바이러스의 발병증상을 2달간 확인하였다.

(4) TYLCV를 접종한 박과류의 병증 발현

박과류에서의 바이러스 병증을 확인하기 위하여 수박에서 ‘대상’, ‘삼복꿀’, ‘달고나’ 등 3 품종, 오이에서 ‘백봉’, ‘조은’, ‘장백’ 등 3품종, 멜론에서 ‘설향’, ‘얼스발렌타인’, ‘얼스탈렌트’ 등 3품종, 참외에서 ‘금싸라기’, ‘금노다지’, ‘황태자’ 등 3품종에 대하여 TYLCV를 공시하여 Agrobacterium법으로 바이러스를 접종한 후, 작물별 품종별 바이러스의 발병증상을 2달간 확인하였다.

(5) 생장조절제 처리에 의한 TYLCV 병증 발현

토마토 ‘서광’ 품종에 육묘장에서 억제제로 사용하고 있는 빈나리액제를 1000배액으로 처리한 후, 4월 20일에 Agrobacterium법으로 바이러스를 접종 하였으며, 바이러스 조사는 2달 후인 6월 17일에 실시하였다.

다. TYLCV 전이

(1) TYLCV의 접종시기에 따른 고추와 토마토의 생육

바이러스 감염 시기에 따른 방울토마토의 수량성을 확인하기 위하여 ‘큐티’ 품종에 TYLCV를 무처리, 30일, 60일, 90일에 접종을 하였다. 과실특성과 품질조사는 2013년 6월 10일 ~ 8월 6일 실시하였으며, 재배관리는 농촌진흥청 표준재배법에 준하여 실시하였다.

식물에 대한 토마토황화잎말림바이러스 접종은 기존 연구에서 제작한 감염성 클론을 이용하여 수행하였다 (Kil et al, 2014). 식물 발현용 벡터인 pCAMBIA 1303에 토마토황화잎말림 바이러스 유전자가 1.7 mer 형태로 삽입이 된 플라스미드를 아그로박테리움 GV3101 분리주에 형질전환한 후, 이를 항생제 (50 µg/mL 카나마이신, 50 µg/mL 리팜피신, 10 µg/mL 젠타마이신)가 첨가된 LB 배지에 접종하여 28°C, 250 rpm으로 설정된 진탕배양기 내에서 24시간 배양하였다. 접종을 할 3주령 식물 줄기의 정단부를 곤충핀을 이용하여 10회 가량

반복하여 찢어준 후, 배양한 아그로박테리움 배양액 500 μ L를 찢어준 부위에 일회용 스포이드를 이용하여 조심스럽게 떨어트리면서 20~30회 가량 추가로 반복해 찢어주어서 흡수가 되도록 하였다.

(2) 토마토 착과 시기에 따른 TYLCV 종자 전염

바이러스가 종자가 생성되는 단계 중 특정 단계에만 전염되는지, 아니면 시기에 상관없이 종자까지 전염되는지를 알아보기 위하여 토마토 품종 중에서 이병성인 ‘서광’과 저항성인 ‘박커스’를 이용하여 2화방까지는 정상적으로 생육 착과시켰고, 3화방 개화기에 TYLCV를 Agrobacterium법으로 접종한 후 접종 전 과실과 접종 후인 3화방 이상의 종자를 채취하였으며 바이러스 전염여부를 확인하기 위하여 종자로부터 DNA를 추출하여 PCR을 통해 TYLCV 검정을 실시 하였다.

라. TYLCV 종자전염

(1) 이병주에서 건전주로 담배가루이를 통한 TYLCV 감염

토마토 품종 중에서 ‘서광’ 품종과 ‘박커스’ 품종에 TYLCV를 Agrobacterium법으로 접종 하였으며, 감염을 확인한 후 이들 품종의 종자를 채취한 후 다음해에 육묘하여 망실 내에 정식 하였다. 망실 내에는 감염된 토마토식물과 건전 토마토 식물을 교호로 배치한 후, 망실 내에 비보독 담배가루이를 방사하였으며 2달 후에 바이러스의 발병을 확인 하였고, 이들 각 개체의 잎과 담배가루이로부터 DNA를 추출하여 PCR을 통해 TYLCV 검정을 실시하였다.

(2) 오이고추에서 TYLCV 종자전염 분석

오이고추의 TYLCV 종자전염을 확인하기 위하여 ‘길상’, ‘롱그린’, ‘한입’, ‘트렌드’, ‘떡고또떡고’, ‘싱그린’ 등 6 품종을 공시하였다. 바이러스 접종방법은 식물 발현용 벡터인 pCAMBIA 1303에 토마토황화잎말림바이러스 유전자가 1.7 mer 형태로 삽입이 된 플라스미드를 아그로박테리움 GV3101 분리주에 형질전환한 후, 이를 항생제 (50 μ g/mL 카나마이신, 50 μ g/mL 리팜피신, 10 μ g/mL 젠타마이신)가 첨가된 LB 배지에 접종하여 28°C, 250 rpm으로 설정된 진탕배양기 내에서 24시간 배양하였다. 접종을 할 3주령 식물 줄기의 정단부를 곤충핀을 이용하여 10회 가량 반복하여 찢어준 후, 배양한 아그로박테리움 배양액 500 μ L를 찢어준 부위에 일회용 스포이드를 이용하여 조심스럽게 떨어트리면서 20~30회 가량 추가로 반복해 찢어주어서 흡수가 되도록 하였다. 바이러스 접종 후 식물을 정상적으로 생육시킨 후 종자를 채종하였으며 이들 종자에 대하여 PCR을 통하여 종자전염을 확인 하였다.

마. 담배가루이 방제

(1) 담배가루이 화학약제 방제

본 연구는 충청남도농업기술원 단동 비닐하우스(165m²)에서 실시하였다. 시험품종은 ‘큐티’를 이용하였고 2014년 2월 20일에 파종하여 4월 25일에 충청남도농업기술원 비닐하우스에 150 × 30cm 간격으로 정식 하였다. 시험구배치는 난괴법 3반복으로 하였으며 시비는 퇴비 3,000kg/10a, N:P:K = 20.4-10.3-12.2kg/10a로 처리하였다. 생육조사는 8월 7일에 실

시하였고, 수량조사는 7월 10일부터 8월 6일까지 실시하였다.

담배가루이 방제를 위한 약제는 무처리, 이미다클로프리드, 디노테퓨란, 디노테퓨란+ 스피네토람 혼용의 4처리를 하였고, 처리시기는 담배가루이를 방충망이 처리된 터널재배시설에 방사한 후 충분한 밀도로 증식된 후인 7월 3일에 약제를 처리 한 후 7일 간격으로 7월 10일, 7월 17일 등 3회에 걸쳐 약제 방제를 실시하였다. 담배가루이에 대한 밀도조사는 7월 16일, 24일, 31일 등 3회에 걸쳐 조사하였다. 담배가루이의 밀도조사는 식물체의 상위엽 중 밀도가 가장 높은 한 개의 전개엽에 붙어있는 담배가루이 개체수를 조사하였다.

(2) 야생토마토, 님제 및 화학약제를 활용한 담배가루이 종합방제

본 연구는 충청남도농업기술원 단동 비닐하우스(165m²)에서 실시하였다. 시험에는 ‘미니찰’ 품종을 이용하였고 2016년 6월 23일에 파종하여 7월 14일 12 × 11cm 포트에 정식하였고, 10% 님 입제는 포트당 0g, 10g, 20g, 30g 등 4처리를 완전임의배치 3반복으로 7월 26일 처리하였다. 담배가루이 조사는 8월 1일부터 8월 12일까지 3일 간격으로 실시하였다.

시험에는 ‘미니찰’ 품종을 이용하였고 2016년 6월 23일에 파종하여 7월 14일 12 × 11cm 포트에 정식하였고, 50% 님 액상제재를 포트당 0ml, 2ml, 4ml, 8ml 등 4처리를 완전 임의배치 3반복으로 8월 1일 처리 하였다. 담배가루이 조사는 8월 6일부터 8월 12일까지 3일 간격으로 실시하였다.

시험에는 ‘미니찰’ 품종을 이용하였고 2016년 2월 24일에 파종하여 4월 18일에 충청남도농업기술원 비닐하우스에 150 × 30cm 간격으로 정식하였다 . 시험구배치는 난괴법 3반복으로 하였으며 시비는 퇴비 3,000kg/10a, N : P : K = 20.4-10.3-12.2kg/10a로 처리하였다. 생육조사는 6월 24일에 실시하였고, 수량조사는 6월 24일부터 8월 18일까지 실시하였다. 담배가루이 발생조사는 6월 8일부터 8월 3일까지 7일 간격으로 하였으며, 담배가루이 유충수는 7월 26일부터 8월 16일까지 실시하였다. 담배가루이의 밀도조사는 식물체의 상위엽 중 밀도가 가장 높은 한 개의 전개엽에 붙어있는 담배가루이 개체수 및 유충수를 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 토마토의 TYLCV 발생조사

토마토에서 TYLCV는 다른 바이러스에 비하여 생장이 정지되는 등 수확에 치명적인 손실을 가져오는 바이러스로 농가에서의 재배상의 문제점과 대처방안을 찾아보고자 현장조사를 실시하게 되었다(표 1). 2012년에는 정식시기가 10월 상순으로 8월말에서 9월초에 육묘를 하고 있어 가루이가 만연한 시기가 되었고, 재배품종도 TYLCV 저항성이 없는 ‘큐티’, ‘미니찰’ 등이 심겨져 TYLCV가 발생된 것으로 판단되었다. 그러나 2013년 이후부터는 농가에서 정식시기를 9월 정식에서 11월 정식으로 늦추어 육묘기가 담배가루이 발생 시기를 회피하는 방법으로 육묘하고 있으며 재배기간도 가루이가 만연하기 이전인 5월 하순경에 재배를 끝내고 있으며 저항성 품종인 ‘티티찰’, ‘올레티와이’, ‘미라클’ 등의 품종을 선택하여 재배시에 나타나는 TYLCV 피해를 예방하고 있었다. 고 등(2014)은 토마토 재배작형별 바이러스발병포장율이 반축성재배는 23% 억제재배는 59.4%였으며, 이병주율은 반축

성재배가 0.4%, 억제재배가 13.1%였다 하였는데, 본 조사에서도 이병성 품종의 경우 1.1%가 발생되어 유사한 결과를 얻었다고 생각된다. 이러한 방법은 담배가루이가 없는 환경조건에서 재배가 가능하므로 앞으로도 작형 및 저항성품종을 선택하여 재배한다면 농가의 부담이 줄어들 것으로 판단되었다.

Table 1. Survey result of TYLCV occurrence in Chungcheongnam-do area.

Survey date	Farmhouse No.	Planting Time	TYLCV occurrence rate (%)	Cultivars
May 24, 2012	10	after early-Oct.	1.1	Cuty, Minichal etc
May 2, 2013	10	after mid-Nov.	0.0	Olle TY, Cheondo Miracle etc.
April 26, 2014	10	after mid-Nov.	0.0	Titichal, Olle TY etc

나. TYLCV 접종에 의한 병증 발현

(1) 바이러스 종류별 병증 발현

시판되고 있는 토마토 품종 중에서 TYLCV에 저항성인 ‘박커스’ 품종과 ‘도태량TY’ 품종과 저항성이 없는 ‘도태량 요크’ 품종과 ‘유니콘’ 품종을 이용하여 TYLCV 등 4개 바이러스 단독 접종과 TYLCV+HYVV 등 6종의 복합접종을 실시한 결과, TYLCV에 저항성인 박커스 품종과 도태량TY 품종에서는 모든 바이러스에서 병증이 나타나지 않았고, 이병성인 도태량요크 품종에서는 단독감염의 경우TYLCV, TbLCV의 병증이 나타났고, 복합감염의 경우는 TYLCV+HYVV, TYLCV+TbLCV, TbLCV+HYVV, TYLCV+HYVMV beta, HYVV+HYVMV beta에서 병증이 나타났으며 유니콘 품종의 경우는 단독접종에서는 TYLCV에서, 복합접종의 경우는 TYLCV+HYVV, TYLCV+TbLCV, TYLCV+HYVMV beta에서 병증을 보였다(표 2). 이상의 결과로 볼 때 저항성 품종의 경우는 병증이 나타나지 않았고 착과도 정상적으로 되어 재배 상에 문제를 나타내지 않는 것을 볼 수 있었다. 그러나 이병성 품종의 경우에는 바이러스 단독감염시에도 병증이 심하게 나타났고, 복합감염의 경우에는 병증이 더 심하게 나타나는 것을 볼 수 있었으며 TYLCV가 복합감염된 경우에는 더 심하게 증상이 나타나는 것을 볼 수 있었다.

그림 1은 이병성인 ‘도태량 요크’ 품종에 TYLCV+HYVV를 복합감염 시킨 후 나타난 병증으로 정상개체의 생육은 정상적으로 자라면서 초세가 유지되는 것을 볼 수 있으나, 감염된 식물체의 경우에는 성장점은 잎이 작고 세엽화 되면서 황색으로 변하며 생장이 정지되는 것을 볼 수 있다. 최 등(2013)은 감수성 품종은 접종 30일 후에 상업에 황화, 위축증상을 나타내었고, TY-1, Ty-3 유전자를 포함하고 있는 저항성 계통들은 TYLCV병증발현이 없었다고 하였는데 본 실험에서도 같은 결과를 얻을 수 있었다. 이 등(2012)은 시판 품종 중에서 TYLCV 저항성을 가진 품종들은 병징이 나타나지 않는다고 하였는데 본 실험에서도 같은 경향을 보였다.

Table 2. Comparison of nature of disease appears when inoculated with TYLCV in tomato.

Virus type	Deepening degree in nature of disease			
	Resistance		Sensibility	
	Bacchus	Dotaerang TY	Dotaerang York	Unicon
Mock	-	-	-	-
TYLCV	-	-	+++	++
TbLCV	-	-	+++	-
HYVV	-	-	-	-
Beta	-	-	-	-
TYLCV+HYVV	-	-	++++	++++
TYLCV+TbLCV	-	-	++++	+++
TbLCV+HYVV	-	-	+++	-
TYLCV+HYVMV beta	-	-	+++	+++
TbLCV+HYVMV beta	-	-	-	-
HYVV+HYVMV beta	-	-	+++++	-

※ Degree of disease occurrence : + : weak, +++ : middle, +++++ : severe.

(2) 작물별 바이러스 병증 발현

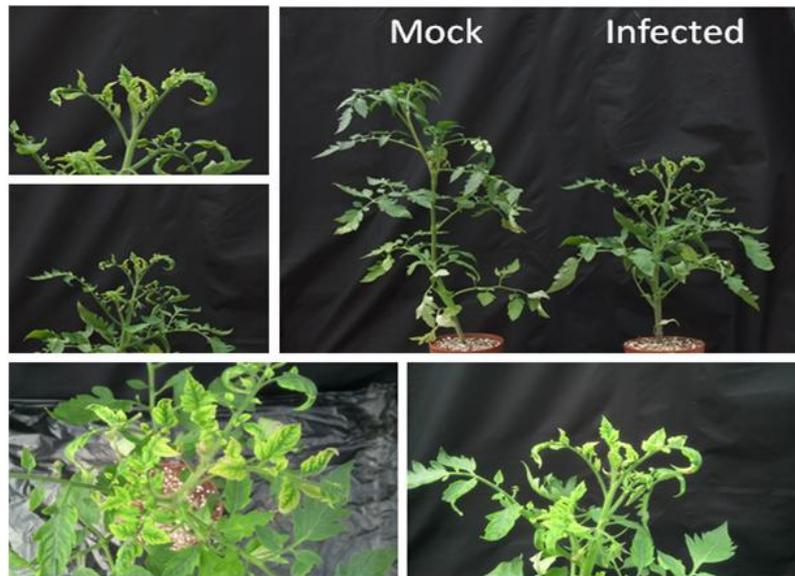


Fig. 1. Nature of disease of complex-infection of TYLCV+HYVV in Tomato

그림 3은 고추 5품종, 피망 1품종, 파프리카 2품종, 가지 1품종, 토마토 1품종에 TYLCV 등 단독 접종 4종 및 TYLCV+HYVV 등 6종을 접종한 후 PCR을 통하여 분석을 실시한 결과, 옐로우 파프리카 품종에서 TYLCV를 보독한 것을 확인하였다. 이러한 결과는 TYLCV에 감염된 담배가루이가 파프리카를 흡즙한 후 토마토와 같은 기주식물에 바이러스를 매개할 수 있다는 가능성을 보여준다. Anfoka 등(2009)은 요르단의 토마토에서 TYLCV 분리 계통에 접종된 오이, 호박, 멜론, 수박들은 병징을 보이지 않았지만, DNA를 추출하여 PCR

을 한 결과 가자 위쪽의 잎에서 바이러스가 발견되었다고 하였는데 본 실험에서도 병증은 보이지 않았지만 파프리카에서 TYLCV가 발견되어 같은 경향을 나타내었다.

한샘파리꽃고추	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
배로따고추	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
파워스피드고추	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
터널용고추	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
청양고추	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
슈페리어피망	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
슈퍼레드파프리카	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
옐로우파프리카	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
흑장가지	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
토마토	-	+++	-	++	-	++	+++	+++	+++	++	+++
	Mock	TYLCV	HYW	TbLCV	beta	TYLCV	TYLCV	TbLCV	TYLCV	TbLCV	HYW
						+HYW	+TbLCV	+HYW	+beta	+beta	+beta

Fig. 2. Expression patterns of nature of disease of virus by crops ('-' : no nature of disease)

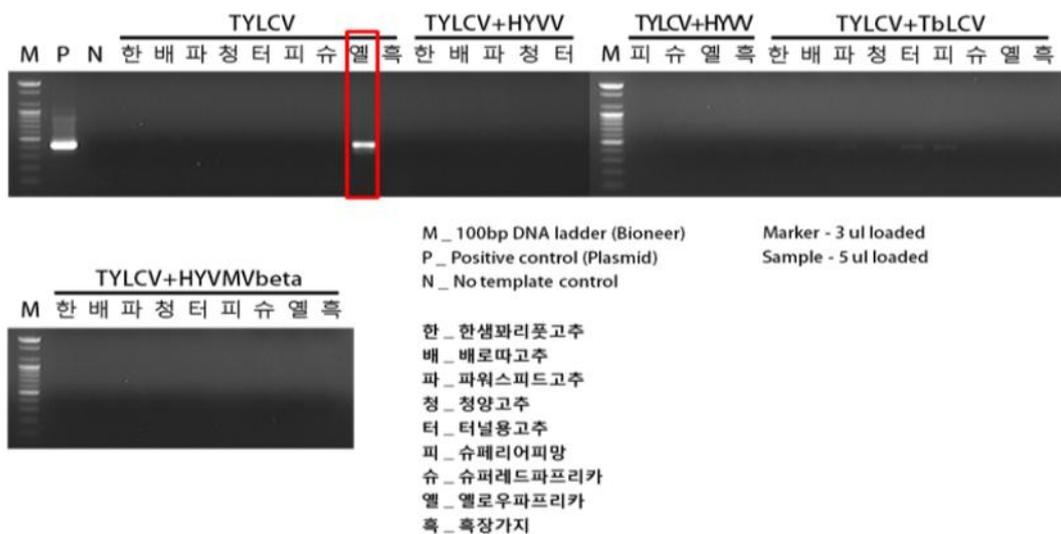


Fig. 3. PCR analysis results after virus inoculation

(2) TYLCV를 접종한 고추의 병증 발현

시판되고 있는 고추 10 품종을 공시하여 TYLCV를 접종한 후 바이러스의 병증을 관찰한 결과, 표 3에 나타난 것처럼 10 품종 모두 병증 발현이 나타나지 않아, 고추의 경우에는 TYLCV가 작물재배에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단되었다.

그러나 고추 10 품종의 잎을 채취하여 PCR 분석을 한 결과, ‘당침’ 품종과 ‘K스타’ 품종에서 TYLCV 복제가 관찰되었다. 이러한 결과는 파프리카와 마찬가지로 고추에서도

TYLCV에 감염된 담배가루이가 고추를 흡즙한 후 토마토와 같은 기주식물에 바이러스를 매개할 수 있다는 가능성을 보여준다.

Table 3. Growth characteristics of red pepper inoculated with TYLCV

Cultivars	Inoculation virus					
	Mock		TG1		TG2	
	Inoculation number	Symptom expression number	Inoculation number	Symptom expression number	Inoculation number	Symptom expression number
K Star	5	0	10	0	10	0
Smart	5	0	10	0	10	0
Daedeulbo	5	0	10	0	10	0
Big star	5	0	10	0	10	0
Daegweonseoneon	5	0	10	0	10	0
Dangcheom	5	0	10	0	10	0
NW bigarim	5	0	10	0	10	0
Baerodda	5	0	10	0	10	0
Honggang	5	0	10	0	10	0
Sintongbangtong	5	0	10	0	10	0

* Inoculation date : April 4, 2014., Survey date : June 5, 2014.

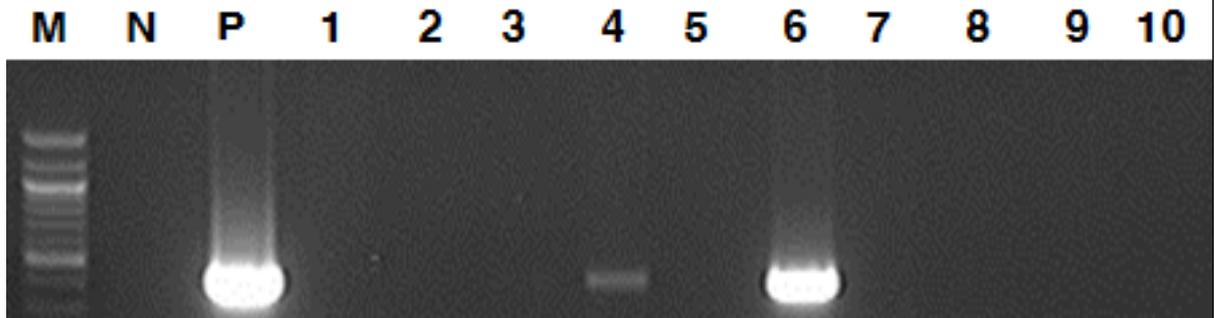


Fig. 4. Virus replication of pepper leaves.

* 1. Daedeulbo, 2. Daegweonseoneon, 3. Baerodda, 4. Dangcheom, 5. Honggang, 6. K Star, 7. Sintongbangtong, 8. Smart, 9. NW bigarim, 10. Big star.

(3) TYLCV를 접종한 박과류의 병증 발현

TYLCV의 주요 기주 작물은 토마토를 비롯한 가지과 작물들로 알려져 있다. 국외 연구결과에 따르면 박과 작물들도 TYLCV의 기주가 될 수 있음이 보고된 바 있지만, 현재까지 국내에서는 박과 작물에 대한 TYLCV 기주 범위 확인 연구는 진행되지 않았다. 시판되고 있는 박과류 수박, 오이, 멜론, 참외 등 4작목을 3품종씩 공시하여 TYLCV를 접종한 후 바이러스의 병증을 관찰한 결과, 표 4에 나타난 것처럼 수박 3품종, 오이 3품종, 멜론 3품종, 참외 3품종 모두에서 바이러스 병증이 나타나지 않아 박과류 재배에는 문제가 없는 것으로 나타났

으나, 그림 5에 나타난 것처럼 잎과 뿌리의 DNA를 추출하여 PCR을 실시한 결과, 잎과 뿌리 모두에서 TYLCV의 복제가 확인 되었고 잎보다는 뿌리 쪽에서 확실한 밴드를 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 볼 때 파프리카, 고추와 마찬가지로 박과류의 모든 작물에서도 TYLCV에 감염된 담배가루이가 박과작물을 흡즙한 후 토마토와 같은 기주식물에 바이러스를 매개할 수 있다는 가능성을 보여준다. Simmons 등(2011)은 페포호박의 ZYMV가 병증은 없지만 PCR을 통해서 1.6%의 종자전염을 관찰 했는데 본 실험에서도 같은 결과를 얻었다.

Table 4. Occurrence status for each of 3 cultivars of Cucurbitaceae four crops

Kind	Cultivars	TYLCV			
		Mock		TG1	
Watermelon	Daesang	10	0	10	0
	Sambogggul	10	0	10	0
	Dalgona	10	0	10	0
Cucumber	Baegbong	10	0	10	0
	Joeun	10	0	10	0
	Jangbaeg	10	0	10	0
Melon	Seolhyang	10	0	10	0
	Earls ballantine	10	0	10	0
	Earls talent	10	0	10	0
Oriental melon	Geumssaragi	10	0	10	0
	Geumnodaji	10	0	10	0
	Hwangtaeja	10	0	10	0

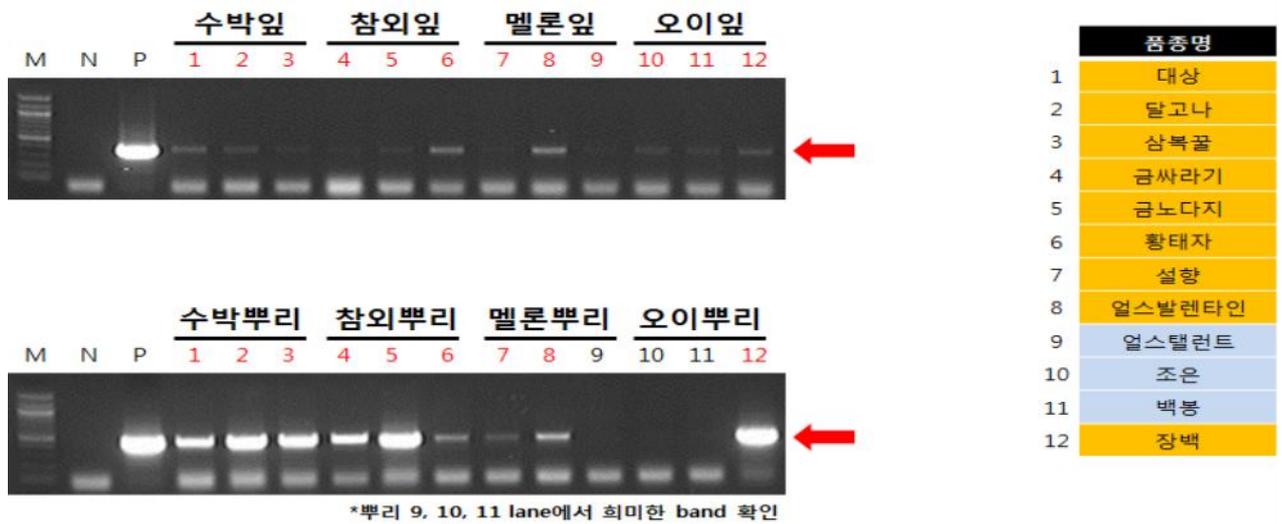


Fig. 5. Virus test of Cucurbitaceae inoculated with TYLCV

(5) 생장조절제 처리에 의한 TYLCV 발현

일반 육묘장에서 사용하고 있는 생장억제제인 빈나리액제를 이용하여 생육을 억제할 경우 바이러스의 발병에도 영향을 줄 수 있다는 판단에 따라 생장조절제를 처리하였다. TYLCV를 접종한 후 발병증상을 확인한 결과 생장조절제를 처리한 경우나 처리하지 않은 경우 모두에서 바이러스의 병증이 확인 되었다. 그러나 초장의 경우에는 차이가 있어서 생장조절제

처리시 111cm로 무처리의 149cm보다 무려 38cm나 차이가 나 생육이 억제됨을 알 수 있었다(표 5). 그러나 생장억제제가 바이러스의 발생이나 감염에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 그림 6은 TYLCV를 접종 하였을 때 나타나는 토마토의 병징을 나타내고 있으며 생육초기에 바이러스가 발생되면 생장점의 고사로 나타나 수확이 중지되었다.

Table 5. TYLCV morbidity rate by treatment with growth regulator in tomato ‘Seogwang’

Treatment		Plant height (cm)	Planting Plant No.	Contraction Plant no.	Morbidity (%)
Growth regulator	TYLCV inoculation	96	10	10	100
	Control	122	10	0	0
	Contraction F ₂	115	20	1	5
	Mean	111	-	-	-
Control	TYLCV inoculation	120	10	10	100
	Control	169	5	0	0
	Contraction F ₂	158	20	0	0
	Mean	149	-	-	-

※ Virus inoculation : April 20, Virus survey : June 17.



Fig. 6. TYLCV contraction of tomato

다. TYLCV 전이

(1) TYLCV 접종시기에 따른 고추과 토마토의 생육

TYLCV를 접종할 경우 고추의 생육에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 본 실험을 실시한 결과, 표 6에 나타난 것처럼 생육특성에서 초장은 무처리 227.3cm에 비하여 30일, 60일, 90일 처리에서도 처리간에 유의차가 나타나지 않았고, 측지수에서도 무처리 79.9개에 비하여 30일, 60일 처리에서는 더 많은 측지수를 나타내었고, 90일에서도 비슷한 결과를 보여 주었으며, 절간장에서도 무처리 21.4cm에 비하여 기타 처리에서 도 처리간에 유의차를 보이지 않았다. 경경에 있어서는 무처리 15.5cm에 비하여 바이러스 접종처리에서 유의차는 없었으나 더 큰 경향을 보였고, 엽장은 처리간에 유의차를 보이지 않았으며, 엽폭도 처리간에 유의차를 나타내지 않았다.

Table 6. Growth characteristics of red pepper inoculated with TYLCV

Inocuration time	Plant height (cm)	Collateral No. (each)	Internode length (cm)	Stem diameter (mm)	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)
Control	227.3a ^z	79.9a	21.4a	15.5a	20.7a	7.3a
30 days after sowing	225.3a	84.2a	22.7a	17.6a	20.8a	7.2a
60 days after sowing	234.0a	86.5a	21.2a	16.5a	20.6a	7.3a
90 days after sowing	226.9a	78.1a	24.3a	15.9a	20.0a	6.8a

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test at P = 0.05.

Survey date : Oct. 10, 2013.

표 7에 나타난 것처럼 TYLCV를 접종한 고추의 과실특성에서 과장은 무처리 12.4cm에 비하여 처리간에 유의차가 나타나지 않았고 과경은 무처리 17.4mm에 비하여 처리간에 유의차를 나타내지 않았으며, 1과중에서도 무처리 10.4g에 비하여 처리간에 유의차를 나타내지 않았다. 수량도 무처리 642.6kg/10a에 비하여 다른 처리와 처리간에 유의차가 없어 고추에서는 바이러스에 대한 병징과 피해를 확인할 수 없었다.

Table 7. Fruit characteristics of red pepper inoculated with TYLCV

Inocuration time	Fruit length (cm)	Fruit diameter (mm)	1 Fruit weight (g/FW.)	Yield (kg/10a)	Yield index
Control	12.4a ^z	17.4a	10.4a	642.6a	100
30 days after sowing	12.0a	17.6a	10.3a	631.1a	98
60 days after sowing	11.3a	17.3a	10.6a	657.9a	102
90 days after sowing	12.0a	17.1a	9.7a	634.6a	99

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test at P = 0.05.

Survey date : July 10, 2013 ~ Oct. 1, 2013.

TYLCV를 접종한 고추의 품질특성(표 8)에서 L값은 무처리 50.28에 비하여 30일, 60일, 90일 접종에서도 처리간에 차이를 보이지 않았고, a값과 b값도 처리간에 유의차를 보이지 않았으며 매운맛을 나타내는 캡사이시노이드의 경우도 무처리 11.1mg%에 비하여 바이러스 접종구에서 약간 높은 경향을 보였으나, 처리간에 유의차는 보이지 않았다. 이상의 결과로 볼 때 고추에서 TYLCV가 감염되어도 품질에는 차이가 없는 것으로 판단된다.

Table 8. Quality characteristics of red pepper inoculated with TYLCV

Inocuration time	Chromaticity			Capsaicinoid content (mg%)
	L	a	b	
Control	50.28a ^z	22.11a	20.43a	11.1a
30 days after sowing	48.93a	21.28a	18.43a	17.7a
60 days after sowing	50.04a	21.24a	19.10a	12.0a
90 days after sowing	49.77a	22.04a	20.16a	15.4a

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test at P = 0.05.

Survey date : July 10, 2013 ~ Oct. 1, 2013.

TYLCV를 접종한 고추의 생육은 정상적이었고, 수량도 처리간에 차이가 나타나지 않았지만, TYLCV를 30일, 60일, 90일에 접종한 고추에서는 그림 7에서 보여주는 것처럼 바이러스의 복제가 나타난 것을 볼 수가 있다.

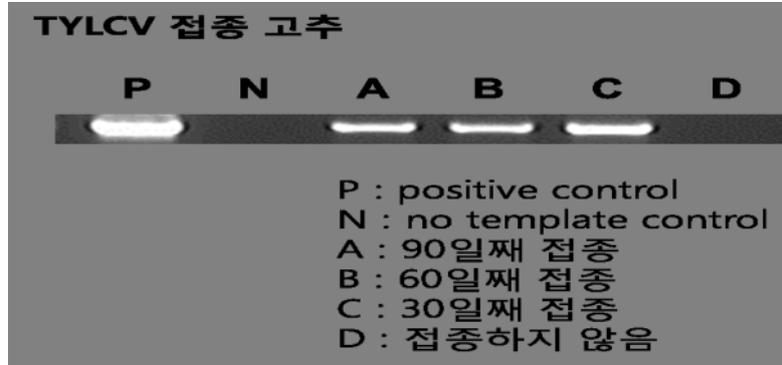


Fig. 7. Virus replication of red pepper inoculated with TYLCV

TYLCV를 접종할 경우 토마토의 생육에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 본 실험을 실시한 결과, 표 9에 나타난 것처럼 생육특성에서 초장은 무처리 223.4cm에 비하여 30일에 143.8cm, 60일에 158.7cm, 90일에 166.6cm 등 바이러스 접종이 빠를수록 초장이 작아지는 것을 확인할 수 있고 화방수에 있어서도 무처리 20.1개에 비하여 바이러스 처리구에서는 12.8~14.4개로 적어지는 것을 볼 수 있으며 처리간에도 유의차가 나타난 것을 확인할 수 있었다.

Table 9. Growth characteristics of tomato inoculated with TYLCV

Inocuration time	Plant height (cm)	Stem diameter (mm)	Internode length (cm)	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Flower clus (No.)
Control	223.4a ^z	11.7ab	35.1a	30.3a	19.1ab	20.1a
30 days after sowng	143.8b	11.5ab	25.0bc	18.7b	13.6b	12.8b
60 days after sowng	158.7ab	10.4b	24.1c	23.4ab	13.7b	14.4b
90 days after sowng	166.6ab	14.6a	29.5b	28.3a	20.8a	14.3b

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test at P = 0.05.

Survey date : Augst 7, 2013.

표 10은 TYLCV를 접종한 토마토의 과실특성에서 1과중은 무처리 9.8 g에 비하여 30일, 60일, 90일 바이러스 접종구에서 10.5~11.5g으로 약간 컸으나 처리간에 유의차는 보이지 않았고, 당도에 있어서도 처리간에 유의차가 없었고, 수량에서는 무처리 2,889 kg/10 a으로 30일 TYLCV 접종 1,437 kg/10 a에 비하여 유의차 있게 차이가 났으며 TYLCV 접종이 빠를수록 수량이 감소하는 경향을 보였다. 라이코펜과 베타카로틴의 경우는 바이러스 접종과 상관관계가 나타나지 않았다. 이상의 결과를 볼 때 농가에서 바이러스가 조기에 발생된다면 수량이 50% 이하로 줄어드는 등 바이러스의 조기 방제가 필요하였다.

그림 8은 30일 접종구에서 가장 생육이 저조하였고 60일 접종구는 다소 생육이 부진한 상

태로 나타났다. 무처리와 90일 처리구에서 거의 생육의 차이를 볼 수가 없었다.

그림 9는 방울토마토 종자 파종 30일, 60일, 90일 뒤의 PCR 결과 무처리에서는 바이러스가 발견되지 않았고 바이러스 접종구에서는 모두 TYLCV가 검출되었다.

Table 10. Fruit characteristics and quality of tomato inoculated with TYLCV

Inocuration time	1 Fruit weight (g/FW.)	Sugar content (°Brix)	Yield (kg/10a)	Lycopene (µg/g)	Betacaroten (µg/g)
Control	9.8a ^z	10.6a	2,889a	657.2b	66.8a
30 days after sowing	10.5a	9.6a	1,437b	748.6a	74.2a
60 days after sowing	10.5a	10.4a	1,460b	638.4b	76.3a
90 days after sowing	11.5a	10.0a	2,441ab	765.2a	70.5a

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test at P = 0.05.

Yield survey date : June 10, 2013 ~ Aug. 6, 2013.

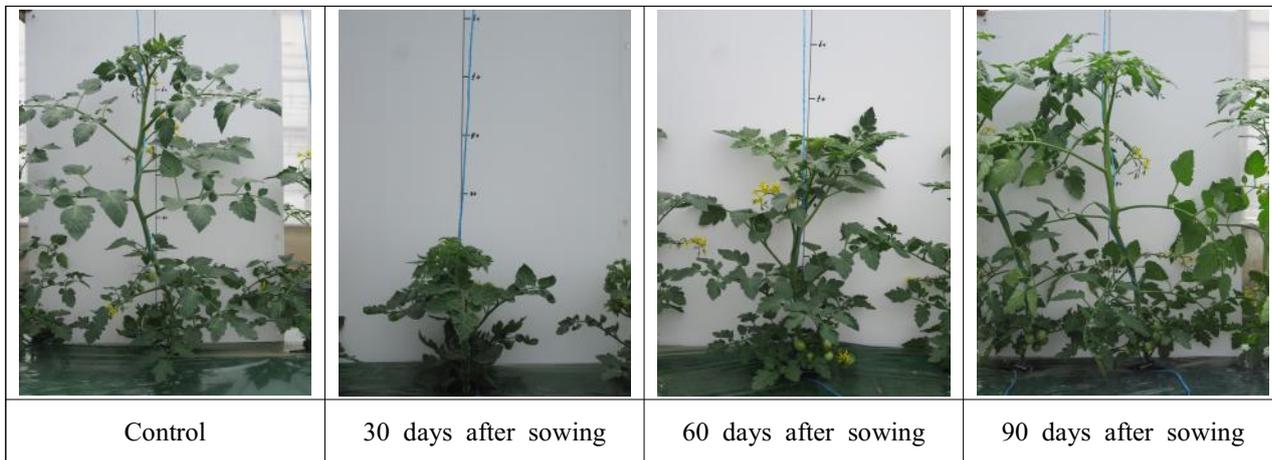


Fig. 8. The growth of tomato 'Cuty' inoculated with TYLCV (120 days after sowing)

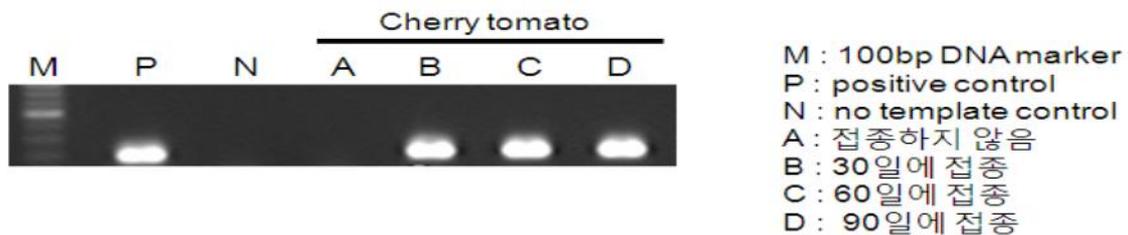


Fig. 9. PCR results after TYLCV inoculation in cherry tomato

(2) 토마토 착과 시기에 따른 TYLCV 종자전염율 조사

TYLCV가 토마토에서 종자전염이 된다는 것은 알게 되었지만 바이러스가 종자가 생성되는 단계 중 특정 단계에만 전염되는지, 시기에 상관없이 종자까지 전염되는지 조사한 연구는 현재까지 없었다. 본 연구에서는 TYLCV가 종자까지 들어가는 기작을 알아보기 위해 착과

시기를 기준으로 하는 종자전염 실험을 계획하였다. 이병성 품종인 서광과 저항성 품종인 박커스를 3개월간 재배하여 토마토 과실이 어느 정도 맺히면 TYLCV를 접종하였다. 그 후 접종 전부터 맺혀 있던 토마토와 접종 후에 착과된 토마토를 구분하여 채취한 뒤 그 안의 종자를 PCR로 검정하였다(그림 10).

검정 결과 모든 시료에서 TYLCV가 검출되었으며 양적인 차이 역시 크지 않았다. 이 결과로 미루어 보았을 때 당초 예상과는 달리 TYLCV의 감염 시기가 착과 전인지 후인지는 TYLCV 종자전염에 영향을 주지 않는 것으로 생각되었다.

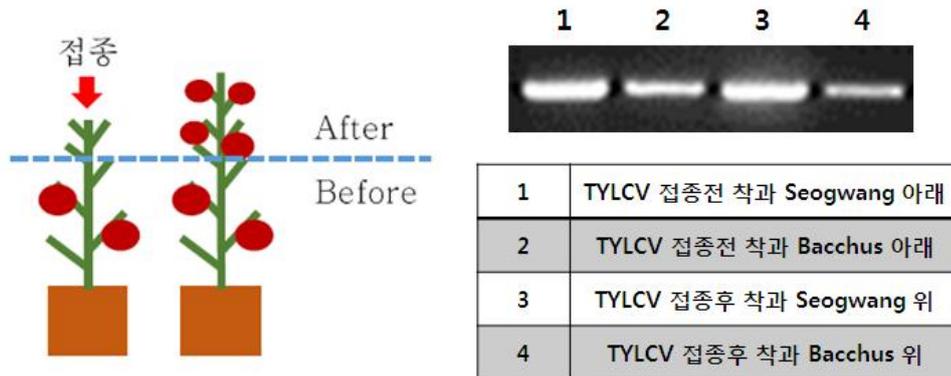


Fig. 10. Seed borne and PCR test results by TYLCV inoculation in tomato 'Seogwang'

라. 종자전염

(1) 이병주에서 건전주로 담배가루이를 통한 TYLCV 감염

종자전염을 통해 다음 세대 토마토로 전이된 TYLCV가 담배가루이에 의해 건전주 토마토로 전염될 수 있는지 조사하여, TYLCV의 종자전염에 의한 피해 가능성을 제시하고자 한다. 실험을 위해 지난해 TYLCV 접종한 토마토에서 채종한 종자를 심어 키운 토마토 4주와 동일 품종의 건전 종자를 심어 키운 토마토 3주를 각각 교차하여 곤충 케이지 안에 넣고 이 안에 비보독 담배가루이를 함께 넣어주었다 (그림 11).

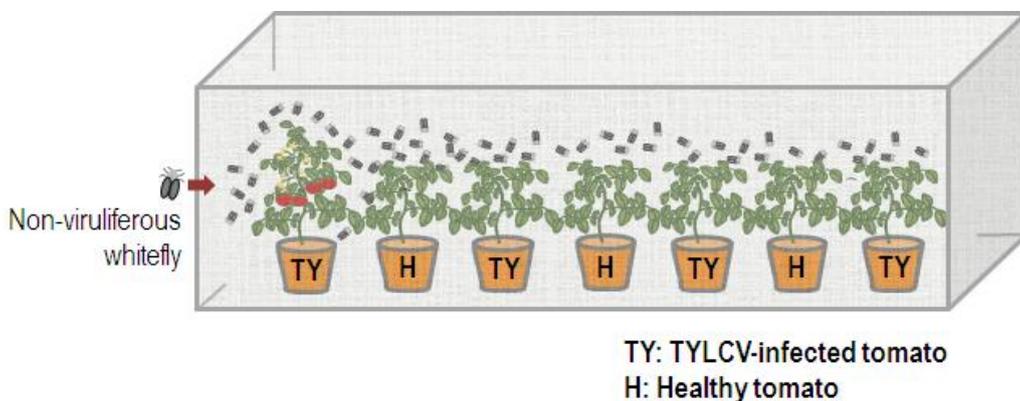


Fig. 11. Whiteflies infection experiment model map of TYLCV seed borne second generation plant

8주 후, 각 개체의 잎과 담배가루이로부터 DNA를 추출하여 PCR을 통해 TYLCV 검정을 진행하였다 (그림 12). 그 결과 2세대 종자전염 토마토 중 한 개체를 제외한 모든 개체와 담배가루이에서 TYLCV가 검출되었다. 이를 통해 종자전염을 통해 다음 세대로 전이된 TYLCV가 담배가루이에 의해 건전주 식물로 전이될 수 있다는 것을 확인하였다. Murad 등(2001)은 담배가루이(biotype B)는 감염된 식물에 8시간 노출 후 TYLCV를 감염 시킨다고 하였는데 실제로 본 실험에서도 담배가루이에 의한 종자전염을 확인할 수 있었으며, 농가에서 일부 토마토가 종자전염을 통해 감염되었을 경우, 담배가루이로 인해 동일 하우스 내에 있는 다들 건전 토마토들까지 감염시킬 수 있을 것으로 생각되었다. 또한 Maria 등(2007)은 토마토에서 PeoMV의 종자전염율이 1.84%인데 3시간 동안 10% trisodium phosphate에 종자를 침적하여 퇴치 하였다고 하였는데 토마토종자의 TYLCV도 종자 소독에 대한 연구가 필요하다고 생각되었다. 또한 Johansen 등(2011)은 일반적인 종자전염 바이러스와 영구보존을 위한 종자전염 바이러스를 구별해야 하며 종자전염의 경우 바이러스 종류와 기주 조합이 영구 보존에 결정적인 역할을 한다고 보고 했다. 앞으로 바이러스 유전자들이 각각 다른 유전자와 마찬가지로 기주와 함께 상호작용하는지에 초점이 맞추어져야 할 것으로 생각된다.

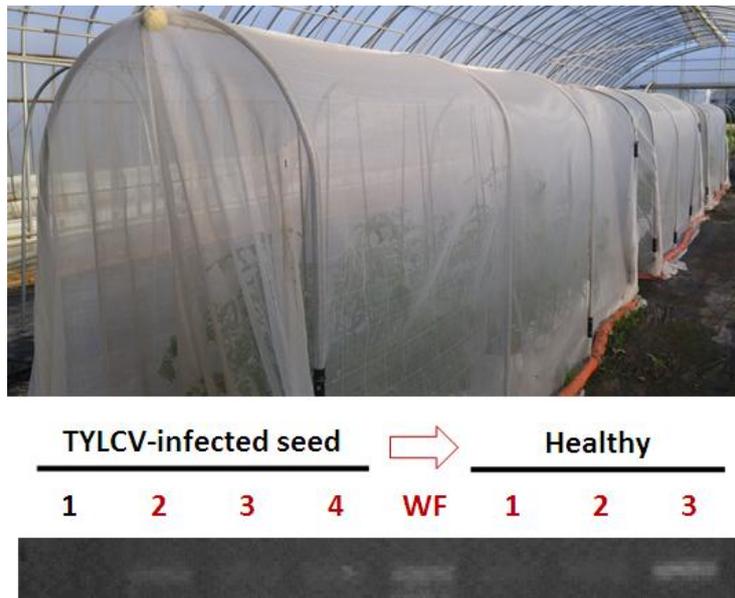


Fig. 12. The experimental whiteflies cage and PCR test results

(2) 오이고추에서 TYLCV 종자전염

고추 및 파프리카에서의 TYLCV 종자전염의 경우, 각각 TYLCV 접종한 식물에서 채종한 종자를 분석해 보았을 때 품종에 따른 차이가 있었지만 파프리카에서는 종자에서 TYLCV가 검출된 반면, 고추에서는 어떠한 품종도 확인이 되지 않았다. 따라서 고추와 파프리카간의 유전적 유사성에도 불구하고 이런 차이가 나타나는 이유를 알아보고, 이를 종자전염 연구에 활용하기 위해 고추와 파프리카의 교배종인 오이고추에서의 TYLCV 접종 및 종자 감염 확인을 수행하였다. 국내에서 판매중인 오이고추 6개 품종과 1개 품종의 고추에 감염성 클론을 이용하여 TYLCV를 접종한 뒤 재배하였다. 그 후 각 품종별로 종자를 채취하여 TYLCV에 대한

검정을 수행하였다 (그림 13). PCR 결과 7개 품종 중 3가지 품종의 오이고추에서 종자 오염이 확인되었다. 또한 전기영동 결과에 따르면 비교대상으로 실험에 포함시킨 대들보 품종에서도 TYLCV 특이적 밴드를 확인할 수 있었다. 이는 기존 연구 결과인 고추는 종자 오염이 되지 않는다는 것과 상반되는 결과로 기존 실험에 더불어 더 많은 품종의 고추를 대상으로 한 종자전염 확인 실험이 수행되어야 할 것으로 보인다.

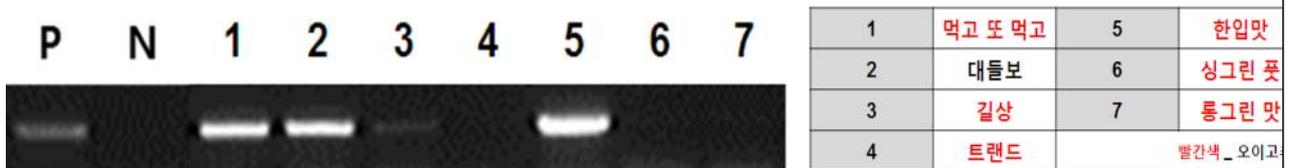


Fig. 13. PCR test results of 6 cultivars of cucumber pepper and 1 cultivar of red pepper seeds inoculated with TYLCV.

마. 담배가루이 방제 방법

(1) 담배가루이 화학약제 방제

토마토 시설재배에서 담배가루이는 TYLCV를 매개하는 해충으로 바이러스 확산에 큰 영향을 미치고 있으며 담배가루이 차체의 밀도가 늘어나면 그 자체만으로도 분비물이 확산되어 토마토의 품질을 떨어뜨리고 있다. 이 실험에서는 주로 봄 여름재배에서 담배가루이가 확산되어 피해를 주므로 침투이행성 약제인 디노테푸란 입상수용제와 속효성 살충제인 스피네토람 수화제를 혼용처리하여 그 결과를 확인하고자 본 실험을 실시하게 되었다. 효과적인 방제를 위해서는 표 11에 나타났듯이 디노테푸란+스피네토람을 담배가루이 발생시부터 7일간격으로 2가지 혼합 약제를 2회 살포할 경우 단용을 사용할 때보다 1회 약제 살포가 줄어들고 조기 방제가 가능하였다. 또한 이미다클로프리드는 방제효과가 전혀 나타나지 않아 담배가루이 약제로 적합하지 않았다. 그림 14는 담배가루이의 발생 시기를 파악하기 위한 것으로 약제처리에 따른 담배가루이의 발생 정도를 파악해 볼 수 있는데 약제에 따라 방제가 차이가 나는 것을 알 수 있었다. 이상의 결과로 볼 때 약제처리 시기나 방제약제 선택이 담배가루이 방제에 영향을 미치는 것으로 나타나 효과적인 방제를 위해서는 주기적인 방제 약제에 대한 스크린을 해야 할 것으로 판단되었다.

Table 11. Control value of whiteflies by using chemical treatment.

Chemical name	Live insect rate (%)			Control value
	I	II	III	
Dinotefuran + Spinetoram	2.0	2.0	0.2	90.9c ^z
Dinotefuran	17.0	20.6	19.9	71.7b
Imidacloprid	100.0	100.0	100.0	0.0a
Control	86.8	93.0	97.4	-

^aMean separation within columns by Duncan' s multiple range test at P = 0.05.

CV = 5.23%.

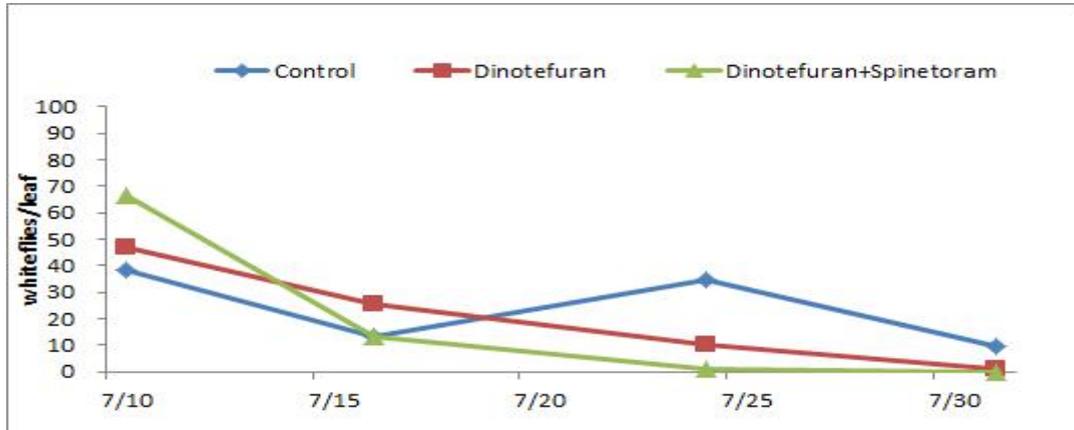


Fig. 14. Whiteflies density after chemical treatment for whiteflies control

그림 15에서 보는 바와 같이 무처리에 비해 혼용처리구에서 잎 단면에 가루이가 보이지 않았으며 디노테퓨란 처리도 담배가루이의 발생이 보이지 않았으나, 이미다클로프리드 처리의 경우 무처리와 같이 담배가루이가 그대로 생존해 있었다.

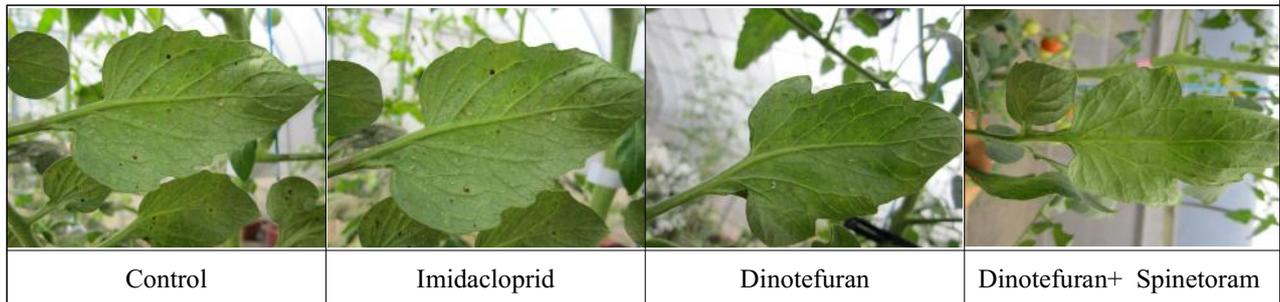


Fig. 15. Density of Whiteflies after 4 weeks of chemical treatment

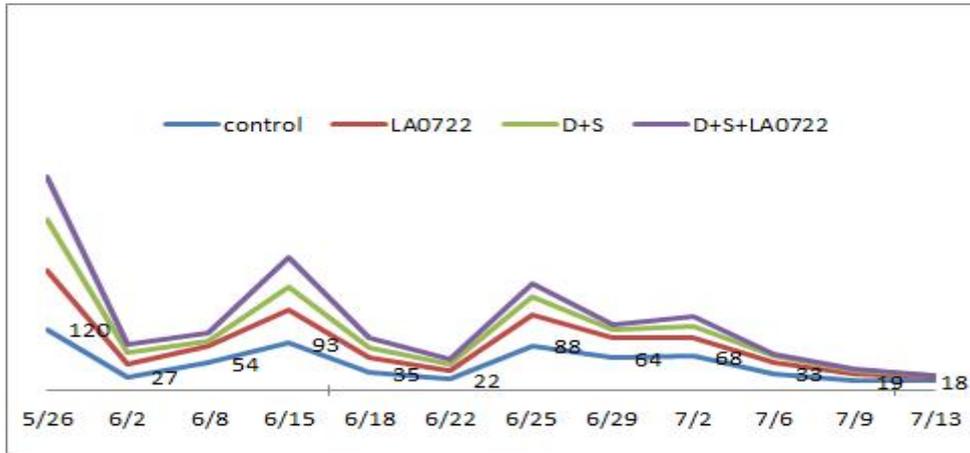
(2) 야생토마토, 님제 및 화학약제를 활용한 담배가루이 종합방제
 야생토마토 중에서 LA 0722(*L. pennellii*)는 잎과 줄기에 살충성분을 가지고 있어 가루이들이 잎과 줄기에 닿으면 독소가 나와 죽게 된다. 이러한 특성을 이용하여 토마토 재배포장의 식물체 사이에 10주 간격으로 1주씩 LA 0722를 정식한 후 살충효과를 살펴보고(그림 16) 밀도가 늘어나면 약제를 방제하였다.

Fig. 16. Insect screening installation and killing whiteflies in wild tomato

야생토마토(LA 722)는 무처리에 비하여 담배가루이 밀도를 줄일 수 있었으며 담배가루이 밀도가 현저히 증가한 일정 시기에 화학약제를 살포하면 담배가루이 방제가 가능하였다(그림 17). 야생토마토를 활용한 담배가루이 방제시험은 야생토마토 밀도를 어느 정도로 해야 할지와 야생토마토에 함유된 살충성분을 추출하여 직접 살포하는 방법 등이 추가로 연구되



어야 할 것으로 판단된다.



※ LA0722 : *Lycopersicon pennelli*, D(*Nicotiana benthamiana*) + S(Spinetoram)

Fig. 17. Whiteflies density change by various treatment

그림 18은 님 입상제제를 토마토 식물체 주변의 토양에 식물체당 10g~30g씩 처리한 후의 담배가루이가 발생하는 것을 그래프로 나타낸 것이다. 무처리의 경우 담배가루이가 꾸준히 증가하는 것을 볼 수 있으나, 님제를 처리한 경우에는 꾸준히 감소하는 것을 볼 수 있으며 주당 님제 처리량이 많을수록 담배가루이 수는 감소하는 것을 확인 할 수 있다. 이상의 결과로 볼 때 님 입제가 약해만 발생하지 않는다면 주당 30g 정도를 정식시기에 처리한다면 담배가루이의 방제에 효과적일 것으로 생각되며, 육묘시에도 처리농도를 낮춰 처리해 준다면 담배가루이에 의한 TYLCV 발생도 낮춰 줄 것으로 생각된다.

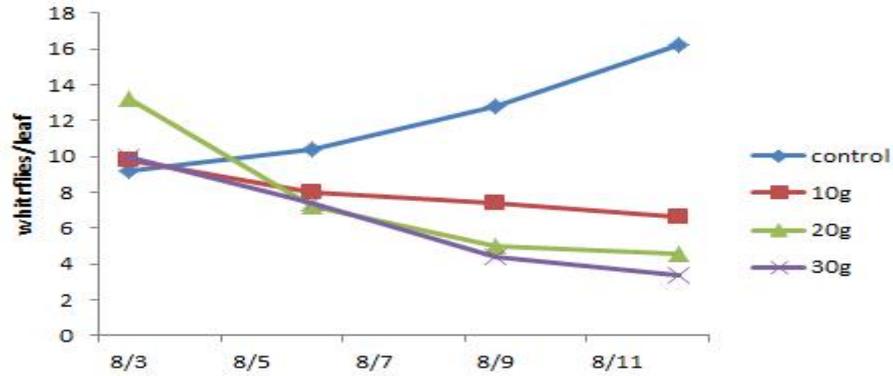


Fig. 18. Effect of Neem-based fomulation in the treatment

그림 19는 님 액제를 토마토 식물체 주변의 토양에 식물체당 2ml ~ 8ml씩 처리한 후의 담배가루이가 발생하는 것을 그래프로 나타낸 것이다. 무처리의 경우는 시간이 경과 할수록 담배가루이의 수가 꾸준히 증가하는 것을 볼 수 있으나, 님 액제를 처리한 경우에는 담배가루이의 수가 줄어드는 것을 알 수가 있으며 주당 8ml를 처리 했을 경우 가장 높은 방제가가 나타난 것을 볼 수 있다, 그러나 님 액제는 Ohn 등(2010)에 의하면 지속시간이 24시간으로 짧아 지속적인 효과를 기대할 수는 없고 담배가루이가 만연되었을 경우에 사용하면 효과를 볼 수 있다고 생각된다.

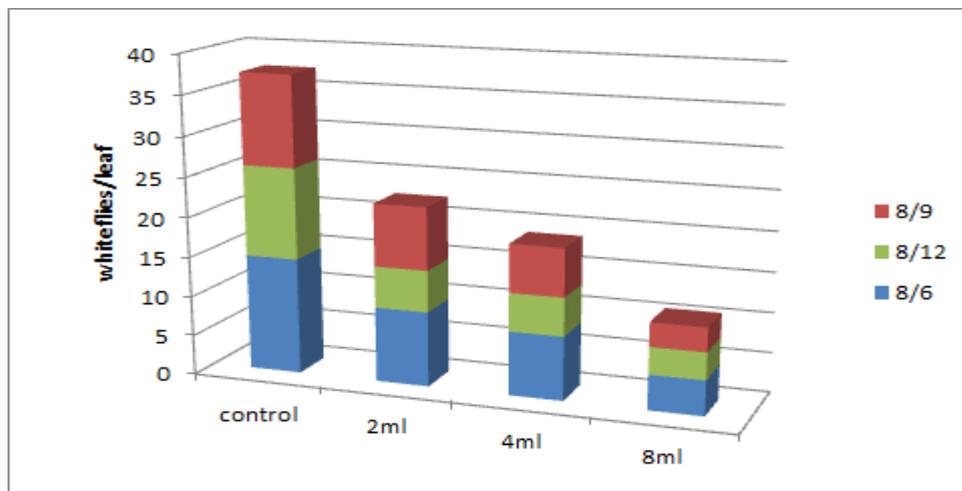


Fig. 19. Effect of liquid treatment using Neem-based fomulation

표 12는 담배가루이를 방제하기 위하여 실시한 토마토의 재배에 관한 생육을 나타낸 것이다. 생육특성에서 초장은 무처리 173.6cm에 비하여 다른 처리구에서도 차이가 없는 것을 볼 수 있으며 엽장은 무처리 38.8cm에 비하여 다른 처리구도 같은 경향을 나타내었고, 엽폭에 있어서도 무처리 28.8cm에 비하여 기타 처리구도 같은 경향으로 유의차를 보이지 않았다. 절간장에 있어서도 무처리 18.4cm에 비하여 다른 처리구에서도 같은 경향을 나타내었으며 경경은 무처리 11.0mm에 비하여 기타 다른 처리구에서도 비슷한 경향으로 유의차를 나타내지 않았다. 따라서 토마토재배에 있어서 님 펠릿, 야생토마토, 화학약제가 토마토의 생육에

는 지장이 없는 것으로 생각되었다.

Table 12. Growth characteristics by the integrated control of whiteflies in tomato.

Treatment	Plant height (cm)	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Internode length (cm)	Stem diameter (mm)
Control	173.6a ^z	38.7a	28.8a	18.4a	11.0a
Neem pellet	174.2a	38.1a	28.7a	18.1a	10.9a
Wild tomato (LA0722)	174.3a	38.7a	28.8a	18.1a	11.1a
Chemical control (Phantom)	174.2a	38.4a	28.6a	18.1a	11.1a
Neem pellet+Wild tomato	174.3a	38.2a	28.8a	18.1a	11.1a
Neem pellet+Chemical control	174.4a	38.3a	28.6a	18.2a	11.2a
Neem pellet+Wild tomato+ Chemical control	173.4a	38.3a	28.6a	18.2a	11.1a

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test at P = 0.05.

^aCV=17.07%, * First chemical treatment : July 14.

표 13은 담배가루이를 방제하기 위하여 실시한 토마토의 재배에 관한 과실특성을 나타낸 것이다. 과장에 있어서는 무처리 39.2mm에 비하여 다른 처리구에서도 비슷한 경향을 나타내었고 과경에 있어서는 무처리 27.5mm에 비하여 다른 처리구에서도 같은 경향을 보였고 과중에서는 무처리 19.1g에 비하여 님펠렛+야생토마토+화학방제 처리구에서 22.2g으로 가장 컸다. 수량에 있어서는 무처리 5,191kg/10a에 비하여 님펠렛+야생토마토+화학방제 처리구에서 5,530kg/10a으로 가장 많았으나 처리간에 유의차는 나타나지 않았다.

Table 13. Fruit characteristics and Yield by the integrated control of whiteflies in tomato

Treatment	Fruit length (mm)	Fruit diameter (mm)	Fruit weight (g)	Yield (kg/10a)
Control	39.2a ^z	27.5a	19.1b	5,191a
Neem pellet	37.6a	27.4a	18.7b	5,322a
Wild tomato (LA0722)	38.7a	27.7a	19.1b	5,374a
Chemical control (Phantom)	39.1a	27.2a	19.8b	5,409a
Neem pellet+Wild tomato	36.9a	27.5a	18.3b	5,436a
Neem pellet+Chemical control	36.7a	27.4a	18.4b	5,359a
Neem pellet+Wild tomato+ Chemical control	38.7a	28.6a	22.2a	5,530a

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test at P = 0.05

표 14는 토마토 시설재배시 담배가루이의 종합적인 방제를 위하여 님제, 야생토마토(LA0722, *Lycopersicon pennelli*), 화학방제(디노테푸란+스피네토람) 등을 활용하여 종합적인 방제방

법을 찾고자 실시 하였다. 처리별 담배가루이의 변화를 보면 무처리의 경우 발생 밀도가 꾸준히 증가하는 것을 볼 수 있으나 야생토마토와 님제의 경우는 현상 수준을 꾸준히 유지하면서 발생밀도가 더 이상 증가하지 않는 것을 볼 수 있으며 화학방제와 님제+화학방제, 님제+야생토마토+화학방제 처리구는 담배가루이 밀도가 꾸준히 감소하는 것을 볼 수가 있었다. 김 등(2015)은 담배가루이 발생시기인 봄 여름에 토마토를 재배할 경우 침투이행성인 디노테푸란과 속효성 약제인 스피네토람을 혼용하여 발생시기부터 7일간격으로 2회 처리시 90.0%의 방제가를 얻었다고 하였는데 본 실험에서는 님제+야생토마토+화학방제 처리구가 99.2%의 방제가를 나타내어 담배가루이 밀도를 낮추는데 효과적이라는 결론을 얻었다.

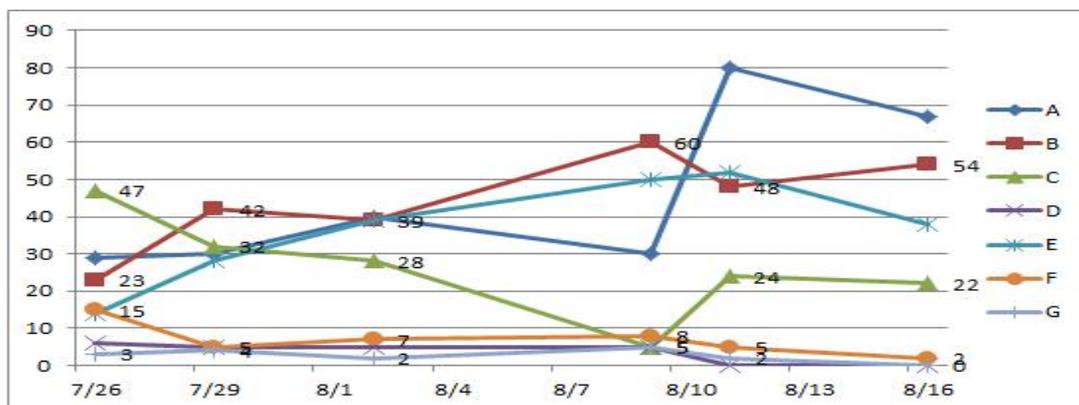
Table 14. Control value of whiteflies by the integrated control

Treatment	Density before chemical treatment (마리/leaf)	Occurrence and degree of damage				Control value (%)
		I	II	III	Mean ^a	
Control	37	50	45	37	44.0a ^z	
Neem pellet	44	20	18	16	18.0b	59.1
Wild tomato (LA0722)	30	22	27	28	25.7b	41.7
Chemical control (Phantom)	27	7	5	2	4.7c	89.4
Neem pellet+Wild tomato	37	15	17	19	17.0b	61.4
Neem pellet+Chemical control	24	1	3	1	2.0c	95.5
Neem pellet+Wild tomato+ Chemical control	29	1	0	0	0.3c	99.2

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test at P = 0.05.

^aCV---17.07%

그림 20은 토마토 시설재배시 담배가루이의 종합적인 방제를 위하여 님제, 야생토마토 (LA0722, *Lycopersicon pennelli*), 화학방제(디노테푸란+스피네토람) 등을 활용하여 종합적인 방제방법을 찾고자 실시 하였다. 무처리의 유충수를 보면 유충수의 꾸준한 증가를 보이는 반면, 화학방제와 님제+화학방제, 님제+야생토마토+화학방제 처리구는 유충수가 꾸준히 감소하는 것을 볼 수가 있다.



A : control, B : neem, C : wild tomato, D : chemical control, E : neem+wild toamto

F : neem+chemical control, G : neem+wild tomato+chemical control

Fig. 20. Number of whiteflies larva in the integrated control

4. 종합 결론

- 가. TYLCV를 예방하기 위해서는 담배가루이가 만연한 시기를 회피하여 육묘하여 정식하고 저항성품종을 선택하여 재배하는 것이 효과적이다.
- 나. TYLCV를 접종한 토마토의 과실특성에서 당도는 처리간 유의차가 없었으나, 수량에서는 조기에 발생될 경우 수량이 50% 이하로 줄어드는 경향을 보여 가루이의 조기 방제가 필요하였다. 따라서 매개충인 담배가루이의 조기방제가 토마토 생육 및 수량에 큰 영향을 미치는 것으로 확인되었다.
- 다. TYLCV를 접종 하였을 때 고추, 가지, 파프리카, 오이, 참외, 멜론, 수박에서는 병증을 나타내지 않았고 토마토 이병성 품종에서만 병증이 나타났으나, DNA를 추출하여 PCR한 경우에는 모든 작물에서 TYLCV가 검출 되었다.
- 라. TYLCV를 접종 하였을 때 고추에서는 병증이 나타나지 않고 정상적인 재배가 이루어졌으나, 토마토에서는 접종 후 1달이 경과하면 생육이 정지 되는 것을 확인할 수 있었고, DNA를 추출하여 PCR을 하였을 때 TYLCV가 모두 검출 되었다.
- 마. 종자전염 토마토 F₂ 개체와 담배가루이에서 TYLCV가 검출되었다. 이를 통해 종자전염을 통해 다음 세대로 전이된 TYLCV가 담배가루이에 의해 건전주 식물로 전이될 수 있다는 것을 확인하였다.
- 바. 화학약제처리에 의한 방제시험에서 이미다클로프로이드는 7월 10일 부터 1일 간격으로 3회 처리해도 방제효과가 없었으나, 디노테퓨란 단용처리는 2회 처리시 71.7%의 방제가를 나타내었으며, 디노테퓨란과 스피네토람의 혼용 2회 처리에서는 90.9%의 높은 방제가를 나타내었다.
- 사. 담배가루이 수의 변화를 보면 무처리의 경우 발생 밀도가 꾸준히 증가하는 것을 볼 수 있으나 야생토마토와 님제의 경우는 현상 수준을 꾸준히 유지하면서 발생밀도가 더 이상 증가하지 않는 것을 볼 수 있으며 화학방제와 님제+화학방제, 님제+야생토마토+화학방제 처리구는 담배가루이 밀도가 꾸준히 감소하는 것을 볼 수가 있었다.

7장. 제6협동과제 ((주)에코원)

1절. 곤충병원성 선충의 공생세균 이용

1. 곤충병원성 선충으로부터 공생세균의 분리동정 및 선발

가. 재료 및 방법

(1) 곤충병원성선충 *Heterorhabditis* spp. 분리

국내 간동, 울진, 소천, 함양 등지에서 채집된 토양시료 100g을 80×100 mm (지름×높이)의 반투명 플라스틱 통에 넣고 증류수를 분무하여 잘 섞은 다음 표면을 평탄하게 만들었다. 그리고 토양 표면은 가장자리에 여백이 없도록 크기가 맞는 여과지를 1장 덮어서 치사 곤충을 수집할 때 비 병원성선충의 오염을 방지했다. 멸균 증류수를 보충하여 여과지가 충분히 젖은 다음 꿀벌부채명나방 유충을 10 마리씩, 25±1℃에서 24 시간 간격으로 치사한 개체를 조사했다. 치사한 개체 중 갈색을 띠는 개체들은 페트리디쉬로 옮기고 위와 동일한 온도 조건에서 2-3 일간 유충의 체내에서 증식시킨 후 white trap(Woodring and Kaya, 1988)을 이용하여 선충을 분리했다. 분리된 선충은 분자생물학적인 방법을 통하여 *Heterorhabditis* spp. *megidis*로 동정되었다

(2) *Heterorhabditis* spp.으로부터 곤충병원세균 분리

0.5% 차아염소산나트륨 용액에 10분간 침전시켜 표면 살균된 선충을 3 회 멸균수를 이용하여 세척한 후 YS (토양침출한천배지에 yeast extract 1 g을 첨가) 배지가 첨가된 1.5 ml의 튜브에 담아 vortex (KMC-1300, Vision scientific, Bucheon, Korea)하여 선충 조직을 파괴시켰다. 그리고 28℃ 교반배양기에서 48 시간 배양한 후 배양액을 macConkey agar (BD, NJ, USA) 와 NBTA 배지에 평판도말하여 콜로니를 분리하였다. 두 번째로 각 선충을 꿀벌부채명나방 유충에 접종하여 사멸시킨 후 95% ethanol을 이용하여 표면살균한 후 3~4 회 멸균수를 이용하여 세척한 후 유충의 혈림프를 헤밀턴주사기(Hamilton Company, NV, USA)를 이용하여 추출하고, macConkey agar와 NBTA에 plate out 하여 콜로니를 분리하였다. 꿀벌부채명나방 유충의 혈림프를 NBTA배지 상에 100 µl 떨어트린 다음 선충을 그 위에 100 µl/units 떨어뜨려 28℃에서 48 시간 배양한 후 곤충병원세균의 단일콜로니를 분리하였다.

나. 결과

(1) 곤충병원성세균 분리 동정

분리된 단일 콜로니의 형태적 특징은 분류학적 특징을 중심으로 분석되었다. 이러한 특징들 중에서 특히 형광과 기주특성은 이균주가 *Photorhabdus* 속에 속한다는 것을 나타내고 있다.

곤충병원성 선충 공생균은 간상의 모양을 보이며 편모를 지녔다, 형태학적 특성은 광학현미경을 통해 관찰하였고, 생화학적 특성은 아래와 같은 방법으로 조사하였다, TSA 사면배지에서 28℃로 24시간 배양한후 3% KOH용액을 이용하여 그람염색반응을 식별하였다. 산소요

구성은 브롬티몰블루와 글루코스가 함유된 배지에서 세균을 접종한 후 액체 파라핀을 덮어 30℃에서 2일간 배양한 후 발색을 확인하였다, 이돌생성은 세균을 1% 트립톤 액체배지에 접종한 후 27℃에서 2일간 배양한 후 코백스시약을 10방울 떨어뜨려 변화를 관찰하였다, 분리균주의 생리 및 생화학적 반응결과는 표 1-1 과 같다.

표 1-1. 포토랍두스 템프라타 균의 생리형태적 특징

Characters	Photorhabdus	분리균주
Host	Heterorhabditis sp.	<i>Heterorhabditis sp.</i>
Gram staining	- ¹⁾	- ¹⁾
Oxygen requirements	Facultatively anaerobic	Facultatively anaerobic
Indol production	d ¹⁾	+ ¹⁾
shape	rod	rod
Cell length	40.0-10.0	4.5-9.2 μ m
Cell width	0.8-0.2	0.82-1.28 μ m
Filagella type	Peritrichous	Peritrichous
Morility	Sinusodal Motility	Sinusodal Motility
Bioluminescence	+ ¹⁾	+ ¹⁾

2. 공생세균의 최적배양조건 확립

가. 재료 및 방법

(1) 곤충병원선충으로부터 분리된 곤충병원세균 선발

곤충병원선충에서 분리된 곤충병원세균인 간동(GD), 울진(UJ), 소천(SC) 그리고 함양(HY)의 병원력 검정을 위해, 꿀벌부채명나방 4령 유충을 10 마리씩 3 반복으로 해밀턴주사기를 이용하여 각각의 곤충병원세균을 10⁵씩 혈강주사 하였다. 주사 후 3 시간마다 치사율을 확인하였다. 또한 각각의 곤충병원세균을 NBTA배지에서 48 시간 증식된 곤충병원세균을 100 ml의 Tryptic soy broth (TSB, BD) 액체배지에서 28℃, 200 rpm의 조건의 교반배양기에서 3 일간 배양한 후 100 μ l를 NBTA 평판배지에 도말하여 생균수를 측정하였다.

(2) 배지 종류별 곤충병원세균의 증식 비교

TSB, YM, LB, 5% YS (0.5% NaCl, 0.05% K₂HPO₄, 0.05% NH₄H₂PO₄, 0.02% MgSO₄·7H₂O, 5% yeast extract/100 ml), ECOWIN-1 배지(전지분유 1 g, NaCl 0.5 g, 난황분 0.25 g, KP 0.25 g, 이스트 0.05 g, 콜레스테롤 0.005 g, 레시틴 0.05 g/증류주 100 ml)를 121℃에서 15 분간 고압멸균 하였다. TSB 배지에서 *Photorhabdus* spp. GD 균주를 10 μ l 접종한 후 28℃, 200 rpm에서 3 일간 배양한 후 100 μ l를 NBTA 평판배지에 도말하여 생균수를 측정하였다.

(3) 곤충병원세균 배양에 적합한 ECOWIN-1 배지로의 개선

Photorhabdus spp. GD의 증식에 기존에 사용되어 오던 ECOWIN-1 배지가 부적합 하여 곤충병원세균의 배양에 적합하게 개선하려 하였다. 함유량이 많은 기름성분의 함유량에 따른 세균의 증식을 확인하기 위해 0, 5, 10, 25 그리고 50 g/L의 농도로 첨가하여 GD 균주를 접종하여 배양하였다. 또한 미량원소인 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 의 영향을 알아보기 위하여 0.5, 1, 2, 3 그리고 5 g/L의 농도로 배지를 조제하여 GD 균주를 접종후 배양하였다. K_2HPO_4 또한 위의 미량원소와 동일한 방법으로 실험하였다. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 는 0.1, 0.2, 0.5, 1 그리고 2 g/L의 농도로 배지를 조제하여 위와 같은 방법으로 실험하였으며, NaCl은 1, 5, 10, 20 그리고 30 g/L의 농도로 배지를 조제하여 위와 같은방법으로 실험하였다.

(4) GD 균주 증식에 따른 탄소원 및 질소원의 영향 분석

Photorhabdus spp. GD의 증식에 탄소원의 영향을 알아보기 위하여 ECOWIN-1 배지 100 ml을 넣고 탄소원인 glucose, fructose, sorbitol, lactose, sucrose 그리고 maltose를 각각 1%씩 첨가하였다. 또한 질소원인 Yeast extract를 1 L당 1, 3, 5, 10 그리고 50 g 비율로 첨가하였다. *Photorhabdus* spp. GD 단일 콜로니를 10 μl 접종한 후 28°C, 200 rpm의 조건에서 3 일간 배양한 후 100 μl 를 NBTA 평판배지에 도말하여 생균수를 측정하였다.

(5) GD 균주 배양시 환경적인 영향 분석

발효조(7 L Jar fermenter, CNS, Seongnam, Korea)에 ECOWIN-1을 3 L 채운 후 121°C 15 분간 고압멸균 후 28°C로 냉각시킨 후 GD 배양액을 0.5% 접종하였다. 최적 온도조건을 확립하기 위하여 초기 배양조건은 200 rpm, 0.5 vvm, pH 7로 일정하게 하고 배양온도를 18, 22, 25, 28 그리고 31°C로 달리하였다. 그리고 rpm 조건을 확립하기 위하여 초기 배양조건은 0.5 vvm, pH 7, 배양온도를 28°C로 일정하게 하고 rpm을 50, 100, 200, 300 그리고 500으로 달리하였다. 그리고 pH 조건을 확립하기 위하여 초기 배양조건은 0.5 vvm, 200 rpm, 배양온도를 28°C로 일정하게 하고 pH를 5, 6, 7, 8 그리고 9로 달리하였다. 산소 공급량(에어레이션)을 확립하기 위하여 초기 배양 조건은 200 rpm, pH 7, 배양온도를 28°C로 일정하게 하고 산소 공급량을 0, 0.1, 0.2, 0.5 그리고 1.0 vvm으로 달리하였다. 각각의 처리구는 48 시간동안 배양한 후 100 μl 를 NBTA 평판배지에 도말하여 생균수를 측정하였다.

나. 결과

(1) 곤충병원선충으로부터 분리된 곤충병원세균의 선발

곤충병원선충인 *Heterorhabditis* spp.로부터 분리된 곤충병원선충인 *Photorhabdus* ssp. 간동(GD), 울진(UJ), 소천(SC) 그리고 함양(HY)의 꿀벌부채명나방 4령 유충에 혈강주사를 이용한 병원력을 검정하였다(그림 7-2-1). 혈강주사 6 시간 이후부터 살충률을 나타내었으며, 혈강주사 12 시간 이후에는 GD 균주가 100%의 살충률을 나타내었고, UJ 균주와 HY균

주는 약 83%의 살충률을 나타내었고, SC 균주는 75%의 살충률을 나타내었다. 또한 각각의 균주를 TSB 배지를 이용하여 3 일간 배양하였으며, 증식된 균주를 확인하였다(그림 7-2-1A). 그 결과 GD 균주가 10.2×10^8 cfu/ml, HY 균주가 8.5×10^8 cfu/ml, UJ 균주가 7.2×10^8 cfu/ml 그리고 SC 균주가 5.3×10^8 cfu/ml 순으로 증식률이 높게 나타난 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 꿀벌부채명나방에 대해 병원력이 높게 나타났었으며, TSB 배지에서 증식률이 높은 GD 균주를 선발하여 앞으로의 연구에 이용하게 되었다.

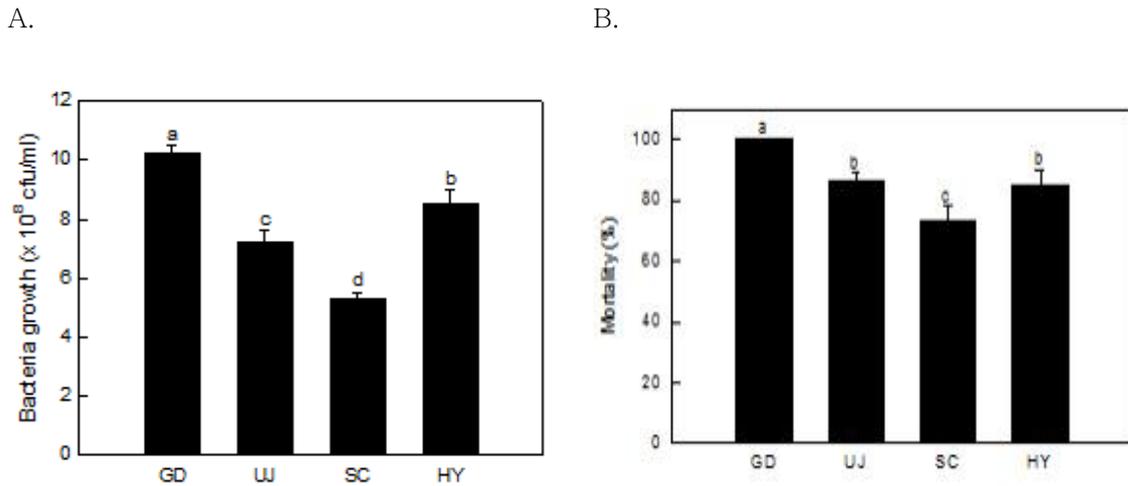
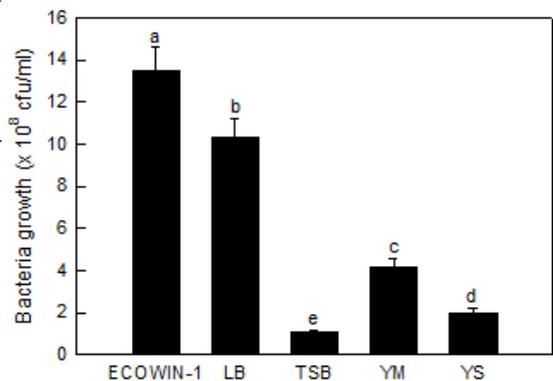


그림 2-1. 곤충병원선충으로부터 곤충병원세균을 선발하였다. (A) 곤충병원세균 GD, UJ, SC 그리고 HY는 꿀벌부채명나방 4 령충에 대해 3 반복으로 진행되었으며, 10^7 의 세균을 접종하였다. (B) 각각의 균주를 TSB 배지에 배양하였으며, NBTA 평판배지를 이용하여 개수 하였다.

(2) 배지 종류별 곤충병원세균의 증식 비교

TSB, YM, LB, 5% YS 그리고 ECOWIN-1 배지에 대한 *Photorhabdus* ssp. GD 균주의 증식률을 확인하였다(그림 7-2-2). ECOWIN-1 배지에서 13.5×10^8 cfu/ml, LB 배지에서 10.3×10^8 cfu/ml, YM 배지에서 4.2×10^8 cfu/ml, YS 배지에서 2.0×10^8 cfu/ml 그리고 TSB 배지에서 1.1×10^8 cfu/ml 순으로 GD 균주의 증식률이 나타났었다.

그림 2-2. ECOWIN-1과 일반 실험용 배지를 이용하여 GD 균주의 증식률을 비교하였다. 각각의 100 ml의 액체배지에 100 μ l를 접종한 후 3 일간 배양 하였으며, NBTA 평판배지를 이용하여 개수 하였다.



(3) 곤충병원세균 배양에 적합한 ECOWIN-1 배지로의 개선

기존에 사용되던 ECOWIN-1 배지는 곤충병원선충의 배양에 최적화되어 사용된 배지였다. 그리하여 곤충병원세균의 배양의 목적에 맞게 개선하였다. 우선 배지내 함유량이 많은 식용유를 농도를 달리하여 처리하였다(그림 2-3A). 그 결과 식용유의 함유량이 0 g/L에서부터 50 g/L까지 증가함에 따라 곤충병원세균의 증식이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 미량원소인 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 를 농도를 달리하며 처리하였다(그림 2-3B). 그 결과 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 의 농도가 0.5 g/L에서 5 g/L까지 증가함에 따라 곤충병원세균의 증식이 큰 차이 없이 증식되는 것을 알 수 있었다. 또한 다른 미량원소인 K_2HPO_4 를 농도별로 처리하였다(그림 2-3C). 그 결과 K_2HPO_4 의 농도가 0.5 g/L에서 5 g/L까지 증가함에 따라 곤충병원세균의 증식이 큰 차이 없이 증식되는 것을 알 수 있었다. 미량원소인 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 또한 농도별로 처리하였다(그림 2-3D) 그 결과 0.1 g/L에서 2 g/L까지 양을 달리하여 증식하여 보았으나 큰 차이가 나타나지 않는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 NaCl을 농도를 달리하여 처리하여 보았다(그림 2-3E). 그 결과 1 g/L에서 30 g/L까지 농도를 달리하여 실험해 보았으며, 30 g/L 이상 첨가될 경우 곤충병원세균의 증식이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들은 미량원소의 경우 곤충병원세균의 증식에 큰 영향을 미치지 않았으며, 식용유는 오히려 곤충병원세균의 증식에 악영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 또한 NaCl의 경우도 1 g/L가 적정 수준임을 알 수 있었다.

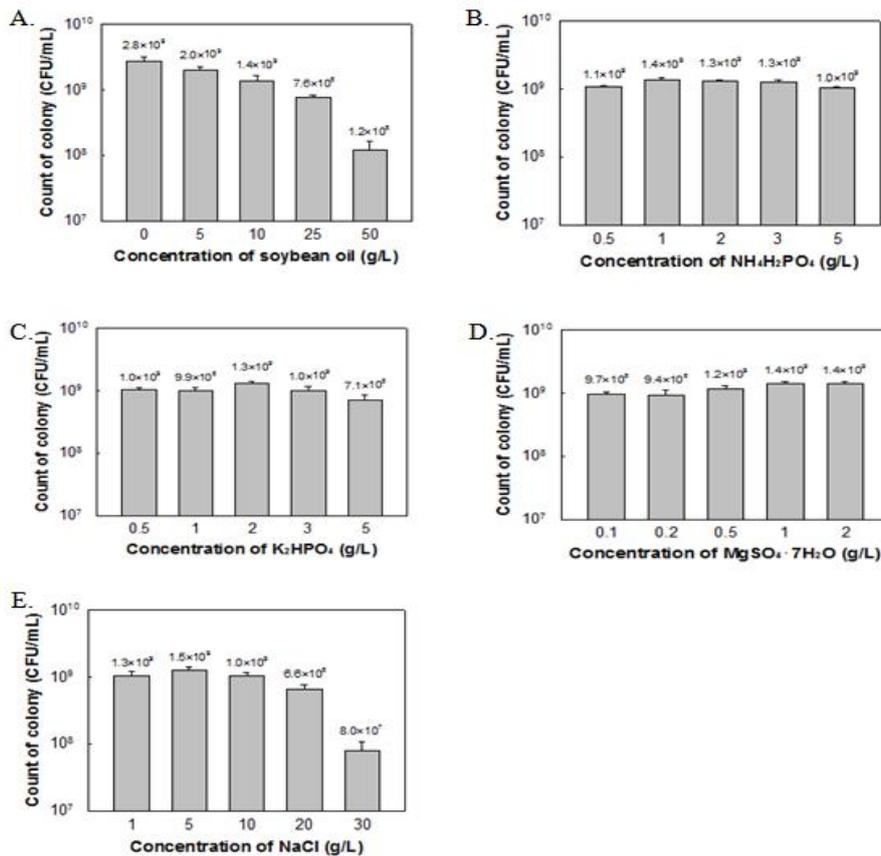


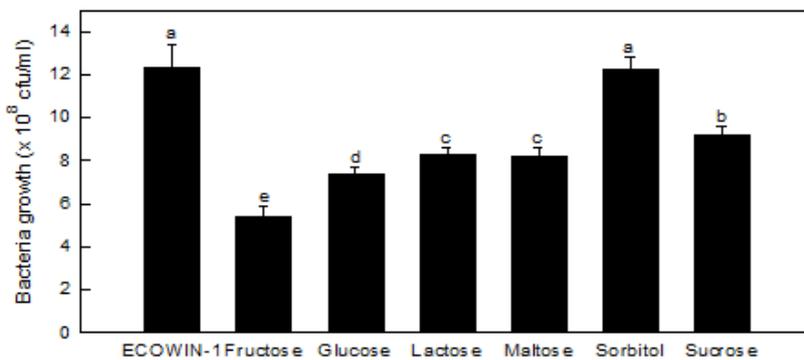
그림 2-3 기존의 ECOWIN-1 배지의 문제점을 보완 및 개선하기 위해 배지의 주성분 및 미량원소들을 개선하였다. (A) 곤충병원선충배지의 주 성분이었던 식용유를 첨가함에 따라 증식이 억제되었다. (B), (C), (D) 미량원소인 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 는 곤충병원세균 배양

에 중요한 비중을 차지하지 않는다. (E) NaCl의 경우 1 g/L가 세균배양에 적당한 양인 것으로 밝혀졌다.

(4) GD 균주 증식을 위한 ECOWIN-1 배지의 개선

ECOWIN-1 배지에서 곤충병원세균의인 *Photobacterium* spp. GD의 증식률이 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었으며, 이 배지에 탄소원을 추가하여 GD의 증식률을 높이기 위해 glucose, fructose, sorbitol, lactose, sucrose 그리고 maltose를 각각 1%씩 첨가하였다(그림 7-2-4A). 그 결과 ECOWIN-1 배지에서 12.3×10^8 cfu/ml 그리고 ECOWIN-1 배지에 solbitol을 첨가한 배지가 10.2×10^8 cfu/ml로 통계적으로 유사한 수준으로 나타내었으며, 그 외의 탄소원을 추가한 처리구에서는 증식률이 현저하게 낮게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 또한 질소원인 Yeast extract를 ECOWIN-1 배지 1 L당 1, 3, 5, 10 그리고 50 g 비율로 첨가하였다(그림 7-2-4B). 그 결과 Yeast extract를 3 g을 첨가하면, 13.2×10^8 cfu/ml로, ECOWIN-1 배지의 12.2×10^8 cfu/ml보다 증식률이 높게 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

A.



B.

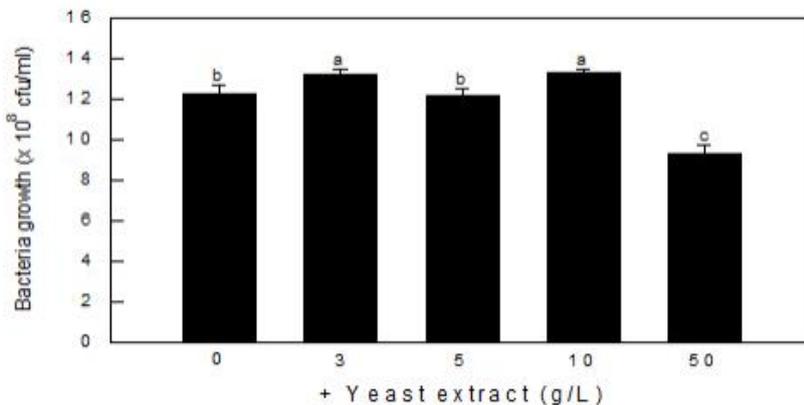


그림 2-4. GD 균주의 증식에 적합한 배지인 ECOWIN-1을 개량하기 위한 연구를 진행하였다. (A) ECOWIN-1 배지에 탄소원을 첨가하여 GD 균주의 증식률 상승을 위한 실험을 진행하였다. 100 ml의 ECOWIN-1 배지에 100 μ l의 GD 균주를 접종한 후 각각의 탄소원을 넣고 3일간 배양 후 NBTA 평판 배지를 이용하여 개수 하였다. (B) ECOWIN-1 배지에 질소원을 첨가하여 GD 균주의 증식률 상승을 위한 실험을 진행 하였다. 100 ml의 ECOWIN-1 배지에 100 μ l의 GD 균주를 접종한 후 각각의 질소원을 넣고 위와 같은 방법으로 개수했다.

(5) 7L 자퍼멘트에서의 최적화 공정을 위한 환경적인 영향 분석

ECOWIN-1 배지를 개선하였으며, 배양시 발효조의 대표적인 환경조건의 온도 조건, 교반 조건, pH 조건 그리고 산소공급 등의 조건을 알맞게 설정하였다. 우선 발효조의 온도 조건 18~31℃ 까지 달리하여 확인하였다(그림 7-2-5A). 그 결과 28℃에서 34.6×10^8 cfu/ml의 증식률을 나타내었으며, 31℃와 25℃ 이하의 온도에서는 22.7×10^8 cfu/ml 이하의 낮은 증식률을 확인할 수 있었다. 그리고 rpm 조건을 확인하기 위해 50~500 rpm으로 달리하여 확인하였다(그림 7-2-5B). 그 결과 200 rpm에서 34.3×10^8 cfu/ml의 높은 증식률을 나타내었으며, 300 rpm 이상의 조건에서는 26.5×10^8 cfu/ml 이하의 낮은 증식률을 보였고, 100 rpm 이하의 조건에서는 15.2×10^8 cfu/ml의 낮은 증식률을 나타내었다. 그리고 pH 조건을 확인하기 위해 pH 5, 6, 7, 8 그리고 9로 조건을 달리하여 확인하였다(그림 2-5C).

그림 2-5. GD 균주 배양시 환경적인 요인을 확인 하였다. (A) 배양 시 온도 조건을 확인하였다. ECOWIN-1 배지에 100 µl의 GD 균주를 접종한 후 온도를 달리하여 3일간 배양 후 NBTa 평판배지를 이용하여 개수 하였다. (B) ECOWIN-1 배지에 100 µl의 GD 균주를 접종한 후 교반속도를 달리하여 3일간 배양하였다. 배양 후 위와 같은 방법으로 개수 하였다. (C) ECOWIN-1 배지에 100 µl의 GD 균주를 접종한 후 pH를 달리하여 3일간 배양하였다. 배양 후 위와 같은 방법으로 개수 하였다. (D) ECOWIN-1 배지에 100 µl의 GD 균주를 접종한 후 산소 공급량을 달리하여 3일간 배양하였다. 배양 후 위와 같은 방법으로 개수 하였다. 그 결과 pH 7에서 47.3×10^8 cfu/ml의 높은 증식률을 나타내었고, pH 6 이하의 조건에서는 20.7×10^8 cfu/ml의 낮은 증식률을 나타내었고, pH 8 이상의 조건에서는 43.6×10^8 cfu/ml의 낮은 증식률을 보였다. 그리고 산소 공급량을 확인하기 위해 산소 공급량을 0, 0.1, 0.2, 0.5 그리고 1.0 vvm으로 달리하였다(그림 7-2-5C). 그 결과 0.5vvm에서는 48.2×10^8 cfu/ml의 높은 증식률을 나타내었고, 31 vvm 에서는 27.1×10^8 cfu/ml의 낮은 증식률을 나타내었고, 25 vvm 이하의 조건에서는 24.5×10^8 cfu/ml의 낮은 증식률을 나타내었다.

2절. 친환경 가루이 방제제 개발

1. 식물추출물을 이용한 친환경 가루이 방제제 개발

1-1. 고삼추출물을 이용한 친환경 가루이 방제제 개발

가. 실험방법

본 시험은 경북 안동시 남선면 이천 1리, 경북 김천시 감천면 포리, 경남 진주시 초전동 비닐하우스 포장에서 각각 3지역의 포장에서 작물을 달리하여 시험을 진행하였다. 안동시는 가시오이종으로 삼척오이품종에 시험, 김천시는 참외 오복품종에 시험하였으며, 경남진주시에는 완숙토마토 슈터도테랑 품종에 시험하였다. 약제살포는 최초살포일 이후 5일 간격으로 2회 살포 3일후 방제효과를 확인하였다. 총 약제살포는 2회 가루이 생충수

조사는 3회 실시하였다. 모든 포장에서 약제살포는 동일한 조건으로 시험하였다. 살포약제의 농도는 500배, 250배의 농도로 살포하였고, 대조약제는 디노테퓨란 수화제인 팬텀으로 2,000배 살포하였다. 약제 살포시간은 17시경에 살포하였다.

처리구 면적은 가로 1.5m, 세로 3m로 4.5m² 하나의 처리구로 구획을 정하여 임의배치법 3반복으로 시험하였다. 가루이 밀도조사는 구획당 10옆을 조사하여 각엽당 가루이 밀도를 조사하여 방제가를 확인하였다. 그리고 무처리에 대한 보정살충율로 환산했다.

나. 결과 및 고찰

고삼추출물을 이용한 가루이 방제제가 가루이 개체수에 미치는 영향을 알아보기 위해 시험을 수행한 결과 다음과 같다. 오이포장인 안동시에서의 시험결과는 살충효과가 무처리대비 67%였고, 배양처리구에서는 78%로 약 10%정도는 높았다(표 1-1-1).

표 1-1-1. 오이에 발생한 가루이에 대한 고삼추출물 살충효과 조사

처리구	희석배수	처리전 밀도수	살충율(%)			
			1반복	2반복	3반복	평균
고삼추출물	500배	31.03±3.00	63.62±14.68	65.08±14.12	71.38±15.01	66.69±14.61
	250배	32.33±1.07	79.26±8.77	78.76±9.59	75.04±12.08	77.68±10.15
대조구	2000배	32.83±3.84	92.98±5.71	94.15±4.99	93.47±7.26	93.53±5.99
무처리	-	37.60±3.89	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

참외포장인 김천시는 무처리 대비 66%의 살충율을 보였고, 배양처리구도 오이와 유사한 10%내외의 살충율 증가를 보였다(표 1-1-2).

표 1-1-2. 참외에 발생한 가루이에 대한 고삼추출물 살충효과 조사

처리구	희석배수	처리전 밀도수 (마리/엽)	Mortality(%)			
			1반복	2반복	3반복	평균
고삼추출물	500배	23.17±0.21	65.71±7.83	66.31±6.63	66.39±11.97	66.13±8.81
	250배	21.73±1.40	71.76±4.69	78.95±6.40	74.79±8.11	75.17±6.40
대조구	2000배	22.37±1.01	91.1±4.57	86.75±7.815	90.16±3.34	89.34±5.24
무처리	-	21.77±0.15	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00

토마토 진주시는 무처리대비 77% 살충율을 보였고, 농약은 무처리 대비 95%의 살충율을 보였다(표 1-1-3).

표 1-1-3. 토마토에 발생한 가루이에 대한 고삼추출물 살충효과 조사

처리구	희석 배수	처리전 밀도수 (마리/엽)	Mortality(%)			
			1반복	2반복	3반복	평균
고삼	500배	50.6±2.12	75.4±2.66	76.85±4.28	78.96±3.84	77.07±3.59
추출물	250배	51.83±1.08	85.03±1.32	84.66±3.35	83.53±3.36	84.4±2.68
대조구	2000배	53.1±0.50	95.74±2.25	95.56±2.89	93.94±2.60	95.08±2.58
무처리	-	52.57±0.78	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00

작물별 살충율을 보면 오이와 참외는 유사한 살충율을 보이고 토마토는 약 10% 높은 살충력을 보였다. 이는 작물에 대한 살충효과의 특이정보다는 토마토에서 처리전 밀도가 높아 살충효과가 높게 나온 것이라 사료된다. 그리고 가루이는 약제살포시에 날아서 약제비살포 지역으로 이동하는 특성을 보였다.

본 시험결과 60~70% 내외의 살충율을 확인할 수 있어 농약대비 다소 낮은 효과를 보였으나 친환경자재로 사용함에는 무리가 없을 것으로 보이며 농약과 교차 살포 또는 가루이 발생밀도가 낮을 경우 고삼추출물을 살포하고 고밀도의 경우 농약으로 살포하는 시스템적으로 농약살포량을 줄일 수 있는 방법을 제시할 수도 있을 것으로 판단되며 차후에 시험을 진행하여 살포기준을 마련할 수 있도록 하겠다.

1-2. 식물추출물을 이용한 친환경 가루이 방제제 개발

가. 실험방법

(1) 가루이 분양

경북 안동에 위치한 생물이용연구소에서 분양을 받아 살충시험에 이용하여 사용하였다.

(2) 식물추출물과 식물성오일의 살충력 검정

온실가루이 성충에 대한 살충 활성을 알기 위해 식물추출물 6종과 식물성 오일 7종을 이용하였다. 먼저 뚜껑에 공기가 통할 수 있는 페트리디쉬(직경: 10Cm, 높이: 4Cm)에 물을 축인 스펀지를 깔고, 식물추출물 6종을 물에 희석하여 강낭콩 잎을 30초 동안 침지하여 식물추출물이 강낭콩 잎에 충분히 흡수되도록 한 다음, 30분 이상 충분히 음건하여 처리 액이 마르도록 하였다. 온실가루이 성충이 많이 있는 케이지에 처리한 페트리디쉬의 뚜껑을 넣어서 담배가루이 성충을 페트리디쉬당 100마리씩 들어가게 하여 가루이 성충이 식물추출물이 묻은 강낭콩을 먹도록 하였다. 처리 후 24시간 간격으로 3일간 담배가루이 성충의 사망률을 조사하였다. 사육실의 온도는 22±4℃ 였고, 습도는 40~60%, 1000배액으로 하였다.

나. 결과

6종의 식물추출물의 온실가루이에 대한 살충 활성을 검정한 결과를 표 1-2-1에 나타내었다.

표 7-3-4.을 보면 고삼추출물이 91.67%로 온실가루이에 대하여 가장 높은 살충력을 나타내었고, 식물혼합추출물(멸구슬나무, 회양나무, 양명아주)이 85.67%로 두 번째로 높은 살충력을 나타내었다.

그러므로, 고삼추출물과 식물혼합추출물을 1차 선발하였으나 고삼추출물의 경우 농약성분 검출로 인하여 유기농업자재로 사용이 불가능 하여 다음실험 단계에서 제외시키고, 식물혼합추출물 1종을 선발하여 다음 단계를 진행 하였다.

표 1-2-1. 식물추출물의 온실가루이에 대한 살충 활성

구분	살충수/100마리			평균(%)
	1반복	2반복	3반복	
데리스추출물	73	76	72	73.67
고삼추출물	87	93	95	91.67
담배추출물	80	73	77	76.67
넝추출물	65	63	59	62.33
베라트린	34	33	36	34.33
식물혼합추출물 ¹⁾	84	87	86	85.67
공생균 배양액	48	50	42	46.67
무처리	0	0	0	-

1) 식물혼합추출물 = 멸구슬나무+회양나무+양명아주 추출물

2. 식물정유를 이용한 친환경 가루이 방제제 개발

7-4-1. 식물정유를 이용한 친환경 가루이 방제제 개발 1

가. 실험방법

(1) 가루이 분양

경북 안동에 위치한 생물이용연구소에서 분양을 받아 살충시험에 이용하여 사용하였다.

(2) 식물성오일의 살충력 검정

Feeding chamber 제작: 100ml플라스틱 통을 이용하여 윗부분을 Parafilm를 최대한 얇게 늘려 직경이 3.5cm인 면에 붙여 주었다. Parafilm이 붙어 있는 면이 아래쪽으로 하

여, 직경 4cm, 높이 8cm 플라스틱 bottle을 이용하였다. 각 처리구는 식물정유 7종 (식물정유 20%+유화제 10%+물70%-설탕물15%) 100ml을 제조하였고, 대조구는 유화제 10%(PLE-Polyoxyethylene Laurylether)+물90%(설탕15%)로 제조하였고, 무처리는 설탕(sucrose 15%)를 넣어서 인공먹이를 만들었다. 각각제조된 제제를 0.5ml 씩 넣고 이물질이 들어가지 않도록 Parafilm으로 덮었다. 담배가루이는 Parafilm을 통해 흡즙한다. 24시간, 48시간, 72시간후 각 처리구별 가루이 살충율을 조사하였다. 약제처리 희석배수는 2,000배와 4,000배로 각각 시험하였다.

식물정유는 마늘유(Galic oil), 장뇌유(Camphor oil), 크로버유(Clove oil), 시트로넬라(Citronella oil)을 각각 사용하였다.



그림 2-1-1. 가루이 pot 시험 적용 통 사진

나. 결과 및 고찰

식물정유를 이용한 가루이 방제제가 가루이 개체수에 미치는 영향을 알아보기 위해 시험을 수행한 결과 다음과 같다. (표 2-1-1, 그림 2-1-2) 실험결과 마늘유가 24시간 후 2,000배와 4,000배 모두 처리구에 각각 70%, 42% 살충율을 보였고, 48시간 후 100%의 살충율을 보였다. 장뇌유 및 클로버 오일도 2,000배에서 48시간 후 100%의 살충율을 보여 높은 효과를 보임을 확인할 수 있었다.

식물정유오일도 20%만 사용하여 진행한 것에 비해 좋은 효과를 보였고 추후 포장시험 및 현장 적용시험을 통하여 친환경제제의 개발의 가능성을 확인할 것이다.

표 2-1-1. 가루이에 대한 식물정유의 살충효과

구분	희석배수	살충율(%)		
		24hr	48hr	72hr
마늘유	2,000배	70.32±8.47	100.00 ±0.00	100.00 ±0.00
	4,000배	42.37±2.80	100.00 ±0.00	100.00 ±0.00
장뇌유	2,000배	43.33±1.94	100.00 ±0.00	100.00 ±0.00

	4,000배	33.50±5.46	86.31 ±14.32	100.00 ±0.00
클로버유	2,000배	25.56±4.93	100.00 ±0.00	100.00 ±0.00
	4,000배	38.57±2.47	97.30 ±17.54	97.30 ±17.54
시트로넬라유	2,000배	28.11±2.91	51.68 ±7.96	64.35 ±6.37
	4,000배	16.19±4.88	38.27 ±6.55	63.51 ±1.72
PLE	2,000배	12.91±1.63	26.35 ±9.53	34.13 ±1.37
	4,000배	7.38±0.86	11.98 ±3.20	19.76 ±5.36
무처리	2,000배	0.00±0.00	0.00 ±0.00	2.22 ±3.85

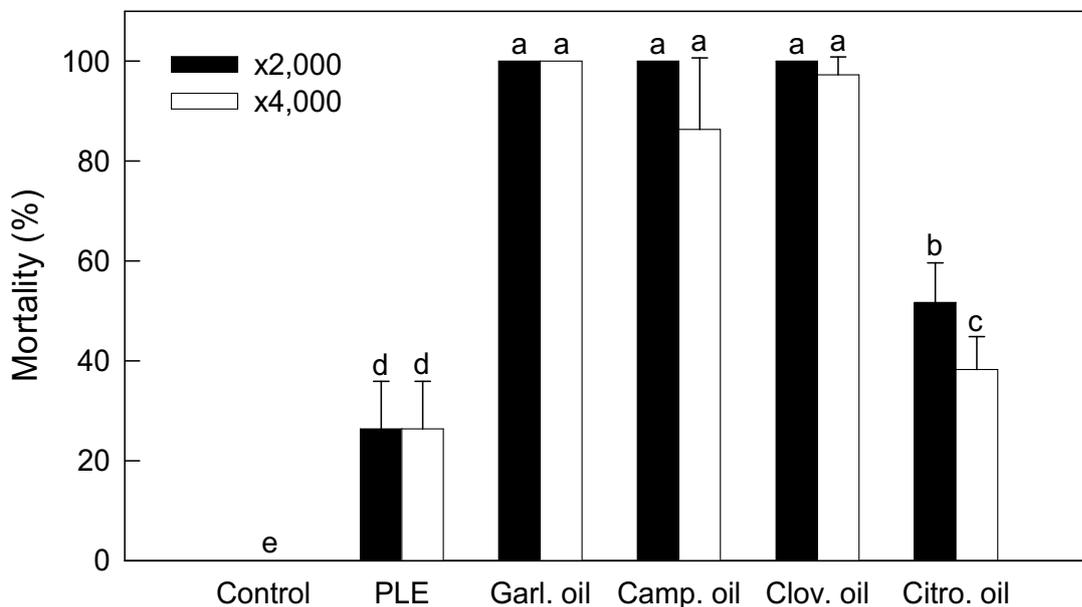


그림 2-1-2. 식물정유에 종류별 2,000배, 4,000배에 대한 48시간 후의 가루이에 대한 살충율조사 결과

2-2. 식물정유를 이용한 친환경 가루이 방제제 개발 2

가. 실험방법

(1) 가루이 분양

경북 안동에 위치한 생물이용연구소에서 분양을 받아 살충시험에 이용하여 사용하였다.

(2) 식물추출물과 식물성오일의 살충력 검정

온실 가루이 성충에 대한 살충 활성을 알기 위해 식물성 오일 7종을 이용하였다. 먼저 뚜껑에 공기가 통할 수 있는 페트리디쉬(직경: 10Cm, 높이: 4Cm)에 물을 축인 스펀지를 깔

고, 식물성 오일 7종을 물에 희석하여 강낭콩 잎을 30초 동안 침지하여 식물성 오일이 강낭콩 잎에 충분히 흡수되도록 한 다음, 30분 이상 충분히 음건하여 처리 액이 마르도록 하였다. 온실가루이 성충이 많이 있는 케이지에 처리한 페트리디쉬의 뚜껑을 넣어서 담배가루이 성충을 페트리디쉬당 100마리씩 들어가게 하여 가루이 성충이 식물추출물이 묻은 강낭콩을 먹도록 하였다. 처리 후 24시간 간격으로 3일간 담배가루이 성충의 사망율을 조사하였다. 사육실의 온도는 $22\pm 4^{\circ}\text{C}$ 였고, 습도는 40~60%였다. 처리는 1000배액으로 하였다. 단 식물성오일에는 유화제를 각각 10% 혼합하여 주었다.

나. 결과

7종의 식물성오일의 온실가루이에 대한 살충 활성을 검정한 결과를 표 2-2-1에 나타내었다.

표 7-4-4.을 보면 마늘유 92.33% 가장 우수한 살충율을 나타내었고, 팔마로사유 85.33%, 오레가노유 84.00%의 의 순으로 나타났다.

본 실험에서 이용된 식물성오일 7종 중 온실가루이에 대한 살충력이 우수한 마늘유, 팔마로사유, 오레가노유 3종을 선발하였다.

구분	살충수/100마리			평균(%)
	1반복	2반복	3반복	
마늘유	92	94	91	92.33
장뇌유	73	82	85	80.00
클로버유	63	75	76	71.33
시트로넬라유	23	35	27	28.33
고추씨유	75	77	77	76.33
오레가노유	83	87	82	84.00
팔마로사유	85	89	82	85.33
유화제	23	21	15	19.67
무처리	0	0	0	-

1) 식물혼합추출물 = 밀구슬나무+회양나무+양명아주 추출물

3. 식물정유를 이용한 연무제(향) 친환경 가루이 방제제 개발

가. 실험방법

향 제작 : 시험에 사용된 연막제의 주원료는 향나무 가루이며 이외에 백단+목분이 함유되었고 조립제로 전분을 사용하여 제조하였다. 본 향 제작과정에서 식물정유 2%를 각각 넣어서 향을 제작하였다. 사용된 정유는 마늘유(Galic oil), 고추유(Capsaicin oil), 팔각유(Camphor oil)를 각각 사용하였다. 대조구는 백단+목단+목분+전분으로 만들고 식물정유를 첨가하지 않은 향, 처리구는 대조구에 마늘유(Galic oil), 고추유(Capsaicin oil), 팔각유(Camphor oil)를 각각 2%의 정유를 넣은 향을 제작하여 사용하였다.

실험에 사용된 페트리디쉬는 윗부분은 망으로 덮여있어 향을 피워 연기가 외부로 외부로 유출이 될 수 있도록 하였다. 높이는 4.2cm× 직경은 10cm 인 페트리 디쉬를 사용하였고 총부피는 외부부피는 329.7cm³이고 내부부피는 251.2cm³이었다. 사용된 향의 길이는 3.0cm 크기로 동일하게 잘라서 사용하였다. 가루이 생충수는 처리전, 처리후 1시간, 3시간, 5시간후의 각각 조사하여 살충율을 확인하였다.

포장실험은 안동식물자원연구소에 마련된 소규모하우스 포장에서 시험을 진행하였다. 작물은 토마토를 식재하였고, 담배가루이는 기존에 방사하여 사육되어지고 있는 가루이에 적용하였다. 하우스는 가로 3m × 세로 4m × 높이 2m 로 만들어진 소규모 하우스에 가루이가 이동할 수 없는 망을 씌워 향을 피워 가루이 밀도를 조사하여 살충율을 확인하였다, 사용된 향의 개수는 하우스 1동당 5개 10개, 15개, 무처리구를 두었다.



그림 3-1. 가루이 향시험 pot 시험 사진

나. 결과 및 고찰

(1) 실내 페트리 디쉬 시험

식물정유를 이용한 연막제(향)이 가루이 개체수에 미치는 영향을 알아보기 위해 시험을 수행한 결과 다음과 같다. (표 3-1, 그림 3-1) 실험결과 마늘유가 24시간 후 2,000배와 4,000배 모두 처리구에 각각 70%, 42% 살충율을 보였고, 48시간 후 100%의 살충율을 보였다. 장뇌유 및 클로버 오일도 2,000배에서 48시간 후 100%의 살충율을 보여 높은 효과를 보임을 확인할 수 있었다.

식물정유오일도 20%만 사용하여 제제화한 것이 좋은 효과를 보였다.

표 3-1. 가루이에 대한 식물정유의 살충효과

구분	살충율(%)					
	1hr		3hr		5hr	
마늘유	85.67	±4.25	100.00	±0.00	100.00	±0.00
고추유	51.25	±1.89	65.42	±1.89	61.67	±2.36
팔각유	64.76	±0.89	74.27	±0.89	68.05	±1.45
대조구	11.03	±0.24	21.18	±0.24	11.47	±2.54
무처리	0.00	±0.00	0.00	±0.00	0.00	±0.00

(2) 연막제(향) 현장적용시험

식물정유를 이용한 연막제(향)가 가루이 개체수에 미치는 영향을 알아보기 시험을 수행한 결과 다음과 같다.(그림 3-2) 시험에 사용된 향은 페트리 디쉬 시험에서 가장 좋은 효과를 보인 마늘(Galic oil)이 함유된 향을 사용하였다. 실험결과 5개, 10개, 15개를 각각 넣은 곳에서 시간이 경과할수록 가루이 밀도가 감소하여 살충력이 증가하는 경향을 확인할 수 있었다. 그러나 5마리 처리구에서 다소 높은 결과를 보였다. 5개 처리구를 제외한 10개, 15개 처리구는 유사한 경향을 보여 포장 면적에 따른 연막제(향)을 적용시험을 편차를 줄이기 위한 많은 반복시험이 시행되어 저야 할 것으로 사료된다. 본 현장적용 시험에서는 연막제인 향을 이용하여 가루이를 방제하는 것에 충분히 현장적용이 가능함을 확인하였다. 추후 반복시험 및 다양한 시험 적용을 통한 확대시험이 필요함을 확인하였다. 시험에 사용된 면적당 향의 개수는 1동당 10개를 기준으로 0.83개/1m²개로 833개/10a(300평=1000m²)개로 현장적용에도 경제적으로도 별다른 무리가 없었다.

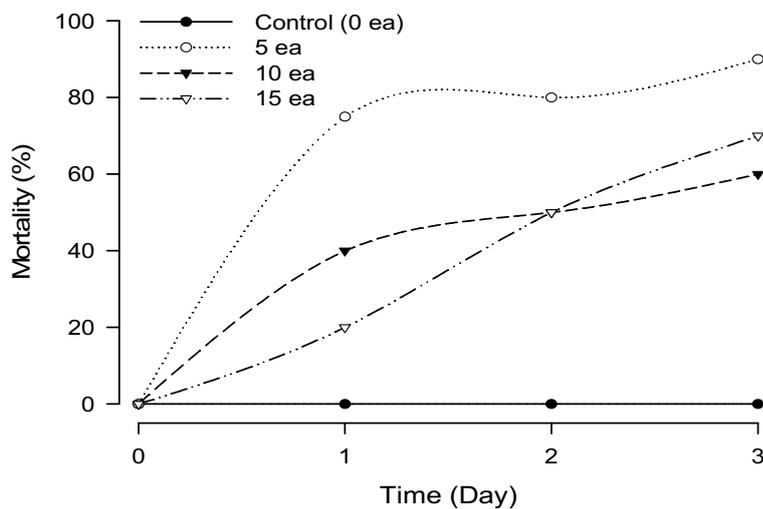


그림 3-2. 마늘유(Galic oil)가 첨가된 향을 이용한 가루이 적용시험

면적 : 3m(가로) × 4m(세로) × 2m(높이)
향적용갯수 : 5개/동(12m²), 10개/동(12m²), 20개/동(12m²)

3절. 가루이류에 대한 살충력 검정

1. 식물추출물과 식물성 오일의 혼합제형의 살충력 검정

가. 실험방법

(1) 식물추출물과 식물성 오일의 혼합제형의 살충력 검정

앞서 식물추출물과 식물성오일의 온실가루이 살충력 검정결과 식물추출물 6종 중 효과가 우수한 식물 혼합추출물 1종과 식물성 오일 7종 중 효과가 우수한 마늘유, 오레가노유, 팔마로사유 등 3종을 선발하였고, 선발된 4종을 이용하여 각각 2종씩 혼합하여 혼합 제형을 만들었고, 이를 이용하여 온실가루이에 대한 살충력을 검정 하였다. 먼저 뚜껑에 공기가 통할 수 있는 페트리디쉬(직경: 10Cm, 높이: 4Cm)에 물을 축인 스펀지를 깔고, 식물추출물 6종과 식물성 오일 7종을 물에 희석하여 강낭콩 잎을 30초 동안 침지하여 식물추출물이 강낭콩 잎에 충분히 흡수되도록 한 다음, 30분 이상 충분히 음건하여 처리 액이 마르도록 하였다. 온실가루이 성충이 많이 있는 케이지에 처리한 페트리디쉬의 뚜껑을 넣어서 담배가루이 성충을 페트리디쉬당 100마리씩 들어가게 하여 가루이 성충이 식물추출물이 묻은 강낭콩을 먹도록 하였다. 처리 후 24시간 간격으로 3일간 담배가루이 성충의 사망율을 조사하였다. 사육실의 온도는 $22\pm 4^{\circ}\text{C}$ 였고, 습도는 40~60%였다. 처리는 1000배액으로 하였다.

(2) 식물추출물별 부자재 혼용 물리성 확인

식물추출물 및 식물성 오일류의 혼합제형 중 효과가 우수한 식물추출물+마늘유, 오레가노유+팔마로사유 조합 2종을 선별하여 최적 유화제를 선발 하였다. 첨가된 유화제는 시중에 흔히 사용되고 있는 유화제로 PLE(이룸컴앤틱, 대한민국), EC 1451(이룸컴앤틱, 대한민국)을 이용하였 혼합하고, 수화성, 현수성, 표면장력 등을 육안으로 확인하였다.

나. 결과

식물추출물과 식물성오일을 이용한 온실가루이 살충 test에서 선발된 식물혼합추출물과 식물성오일인 마늘유, 오레가노유, 팔마로사유에 대한 혼합제형 살충력 검정결과 표 1-1.에 나타내었다.

표1-1. 식물추출물과 식물성오일의 혼합제형의 온실가루이에 대한 살충 활성

구분	살충수/100마리			평균(%)
	1반복	2반복	3반복	
식물추출물+마늘유	100	100	100	100.00
식물추출물+오레가노유	82	82	85	83.00
식물추출물+팔마로사유	86	83	82	83.67
마늘유+오레가노유	53	52	48	51.00
마늘유+팔마로사유	63	61	60	61.33
오레가노유+팔마로사유	95	97	97	96.33
무처리	0	0	0	-

표 1-1. 을 보면 식물추출물과 마늘유 혼합제형이 온실가루이에 대한 살충율이 100% 가장 우수하였으며, 오레가노유+팔마로사유 혼합제형이 96.33%로 두 번째로 높은 살충율을 나타내었다.

식물추출물과 식물성오일 혼합제제의 유화제별 혼용하여 유화력을 test한 결과 표 7-6-2. 에 나타내었다. 본 실험에 이용된 유화제인 PLE와 EC1451의 수화성 및 현수성 모두 우수한 것으로 나타났다.

표 1-2. 유화제에 따른 유화력 test

구분		수화성	현수성
식물추출물+마늘유	PLE	++++	++++
	EC1451	++++	++++
오레가노유+팔마로사유	PLE	++++	++++
	EC1451	++++	++++

파라필름에 물, PLE, EC1451이 첨가된 제제를 각각 1mL씩 떨군 후 증상을 육안으로 관찰한 결과를 그림 1-1에 나타내었다. 그림1-1.을 보면 물과 PLE처리구는 물방울이 그대로 맺혀 있는 것을 확인 할 수 있었지만 EC1451의 경우 표면장력의 경계를 없애 주어 떨구는 즉시 사방으로 퍼져 나가는 것을 확인 할 수 있었다.

		물	PLE	EC1451
파라필름	100배			
	1000배			

그림 1-1. 유화제별 표면장력 확인

2. 곤충병원성 선충의 공생균 8종에 대한 온실가루이 살충력 조사

가. 실험방법

(1) 가루이 분양

경북 안동에 위치한 생물이용연구소에서 분양을 받아 살충시험에 사용하였다.

(2) 8종 공생균에 대한 온실가루이 살충력 조사

온실가루이 성충에 대한 살충 활성을 알기 위해 (주)에코윈 기업부설연구소 내 보유 중인 공생균 8종을 실험에 사용하였다. 먼저 뚜껑에 공기가 통할 수 있는 페트리디쉬(직경: 10 cm, 높이: 4 cm)에 물을 축인 스펀지를 깔고, 공생균 배양액 8종을 각각 멸균수에 250배로 희석하여 강낭콩 잎을 30초 동안 침지하였다. 희석액이 강낭콩 잎에 충분히 흡수되도록 한 다음, 30분 이상 충분히 음건하여 마르도록 하였다. 온실가루이 성충이 많이 있는 케이지에 처리한 페트리디쉬의 뚜껑을 넣어서 온실가루이 성충을 페트리디쉬 당 100마리씩 들어가게 하여 가루이 성충이 공생균 배양액이 묻은 강낭콩을 먹도록 하였다. 처리 후 24시간 간격으로 2일간 온실가루이 성충의 사망률을 조사하였다. 사육실의 온도는 $22 \pm 4^\circ\text{C}$ 였고, 습도는 40~60%였다.

(3) 선발된 공생균 3종의 형태별 가루이 살충력 비교 검정

앞서 8종 공생균 배양액을 대상으로 온실가루이에 대한 살충력을 검정한 결과 살충 효과가 우수한 SMK, HGD, HBG 3종을 선발하였고, 선발된 3종을 이용하여 공생균을 배양액 자체와 원심 분리하여 만들어진 상등액, 펠렛 3가지의 형태별로 나누어 온실가루이에 대한 각각의 살충력을 비교 검정 하였다. 먼저 뚜껑에 공기가 통할 수 있는 페트리디쉬(직경: 10 cm, 높이: 4 cm)에 물을 축인 스펀지를 깔고, SMK, HGD, HBG 3종의 배양액, 상등액, 펠렛을 각각 멸균수에 250배로 희석하여 강낭콩 잎을 30초 동안 침지하여 처리액이 강낭콩 잎에 충분히 흡수되도록 한 다음, 30분 이상 충분히 음건하여 처리액이 마르도록 하였다. 온실가루이 성충이 많이 있는 케이지에 처리한 페트리디쉬의 뚜껑을 넣어서 온실가루이 성충을 페트리디쉬 당 100마리씩 들어가게 하여 가루이 성충이 처리액이 묻은 강낭콩을 먹도록 하였다. 처리 후 24시간 간격으로 2일간 온실가루이 성충의 사망율을 조사하였다. 사육실의 온도는 $22 \pm 4^\circ\text{C}$ 였고, 습도는 40~60%였다.

나. 결과

(1) 8종 공생균에 대한 온실가루이 살충력 조사

8종 공생균 배양액의 온실가루이에 대한 살충 활성을 검정한 결과를 표 7-7-1에 나타내었다. 표 2-1을 보면 SMK가 78.68%로 온실가루이에 대하여 가장 높은 살충력을 나타내었고, 그 다음은 HGD가 73.34%, HBG가 71.62%의 순서로 살충력을 나타내었다.

그러므로, 본 실험에서 SMK, HGD, HBG 3종의 공생균 배양액을 선발하여 다음 단계를 진행하였다.

표 2-1. 8종 공생균의 온실가루이에 대한 살충 활성

구 분	살충률(%)			평균 살충률(%)
	1반복	2반복	3반복	
HBG	70.56	68.22	76.08	71.62
SPC	60.54	63.10	63.89	62.51
SCG	71.85	68.62	70.28	70.25
SMK	75.98	80.2	79.86	78.68
SMO	65.14	60.82	64.45	63.47
SFF	41.14	38.52	45.35	41.67
HGD	72.51	74.23	73.28	73.34
48	55.5	60.21	53.4	56.37
무처리	10.2	18.94	19.13	16.09

(2) 선발된 공생균 3종의 형태별 가루이 살충력 비교 검정

온실가루이에 대하여 선발된 3종의 공생균을 배양액과 상등액, 펠릿으로 나누어 살충 활성을 검정하였고 그 결과를 표 2-2에 나타내었다.

표 2-2를 보면 선발된 HGD, SMK, HBG 3종 모두 상등액과 펠릿으로 분리하기 전 단계인 배양액에서의 온실가루이에 대한 살충 활성이 가장 높게 나타났으며, 그 중에서도 HGD 배양액이 100%의 활성을 나타내었다.

공생균은 HGD 배양액으로 선발하여 천연물과 혼합 단계를 진행하였다.

표 2-2. 식물성오일의 온실가루이에 대한 살충 활성

구분		살충률(%)			평균 살충률(%)
		1반복	2반복	3반복	
HGD	배양액	100	100	100	100
	상등액	14.25	13.85	12.82	13.64
	pellet	71.52	76.84	76.64	75
SMK	배양액	67.23	69.97	67.37	68.19

	상등액	28.46	30.2	21.35	26.67
	pellet	38.98	41.2	42.55	40.91
HBG	배양액	70.56	74.11	72.02	72.23
	상등액	28.54	25.31	27.99	27.28
	pellet	65.4	68.27	66.34	66.67
무처리		3.67	14.76	8.87	9.10

3. 곤충병원성 선충의 공생균과 천연물 혼합제형의 온실가루이에 대한 살충력 조사

가. 실험방법

(1) 가루이 분양

경북 안동에 위치한 생물이용연구소에서 분양을 받아 살충시험에 사용하였다.

(2) 선발된 공생균과 천연물 혼합제형 살충력 비교 검정

3종의 공생균 형태별 살충력 비교 검정에서 온실가루이에 대한 살충 활성이 가장 좋은 HGD 배양액을 선발하여 가루이류에 살충 효과를 가지는 5종의 천연물과 각각 혼합하여 살충력을 비교 검정하였다. 혼합 과정에서 첨가된 유화제는 시중에 흔히 사용되고 있는 유화제로 PLE(이룸컴앤틱, 대한민국)을 이용하였고, 수화성, 현수성, 표면장력 등을 육안으로 확인하였다. 먼저 뚜껑에 공기가 통할 수 있는 페트리디쉬(직경: 10Cm, 높이: 4Cm)에 물을 축인 스펀지를 깔고, HGD 배양액과 6종의 천연물, 유화제를 혼합한 약제를 각각 멸균수에 250배로 희석하여 강낭콩 잎을 30초 동안 침지하였다. 처리액이 강낭콩 잎에 충분히 흡수되도록 한 다음, 30분 이상 충분히 음건하여 처리액이 마르도록 하였다. 온실가루이 성충이 많이 있는 케이지에 처리한 페트리디쉬의 뚜껑을 넣어서 온실가루이 성충을 페트리디쉬 당 100마리씩 들어가게 하여 가루이 성충이 처리액이 묻은 강낭콩을 먹도록 하였다. 처리 후 24시간 간격으로 2일간 온실가루이 성충의 사망률을 조사하였다. 사육실의 온도는 $22 \pm 4^\circ\text{C}$ 였고, 습도는 40~60%였다.

(3) HGD 배양액과 천연물 혼합제형 최적비율 탐색

앞서 HGD 배양액과 혼합하여 온실가루이에 대한 살충력을 검정한 천연물 중 살충 활성이 가장 좋은 마늘유와 식물추출물 혼합 처리구를 선발하여 두 가지 혼합제형의 최적 비율을 탐색하였다. 유화제는 시중에 흔히 사용되고 있는 유화제로 PLE(이룸컴앤틱, 대한민국)을 이용하였고, 수화성, 현수성, 표면장력 등을 육안으로 확인하였다. 뚜껑에 공기가 통할 수 있는 페트리디쉬(직경: 10Cm, 높이: 4Cm)에 물을 축인 스펀지를 깔고, HGD 배양액과 마늘유, 식물추출물 2종을 비율별로 혼합하여 각각의 혼합액을 멸균수에 250배로 희석하여 강낭콩 잎을 30초 동안 침지하였다. 처리액이 강낭콩 잎에 충분히 흡수되도록 한 다음, 30분 이

상 충분히 음건하여 처리액이 마르도록 하였다. 온실가루이 성충이 많이 있는 케이지에 처리한 페트리디쉬의 뚜껑을 넣어서 온실가루이 성충을 페트리디쉬 당 100마리씩 들어가게 하여 가루이 성충이 처리액이 묻은 강낭콩을 먹도록 하였다. 처리 후 24시간 간격으로 2일간 온실가루이 성충의 사망률을 조사하였다. 사육실의 온도는 $22\pm 4^{\circ}\text{C}$, 습도 40~60%였다.

(4) HGD 배양액과 천연물 혼합제형 최적 희석배수 탐색

HGD 배양액과 혼합하여 온실가루이에 대한 살충력을 검정한 천연물 혼합비율 중 살충 활성이 가장 좋은 마늘유 10%, 식물추출물 30% 혼합 처리구를 선발하여 두 가지 혼합제형의 최적 희석배수를 탐색하였다. 유화제는 시중에 흔히 사용되고 있는 유화제로 PLE(이룸컴엔텍, 대한민국)을 이용하였고, 수화성, 현수성, 표면장력 등을 육안으로 확인하였다. 뚜껑에 공기가 통할 수 있는 페트리디쉬(직경: 10Cm, 높이: 4Cm)에 물을 축인 스펀지를 깔고, HGD 배양액과 마늘유, 식물추출물 2종을 각각 10%, 30%를 혼합하여 각각의 혼합액을 멸균수에 250배, 500배, 1000배로 각각 희석하여 강낭콩 잎을 30초 동안 침지하였다. 처리액이 강낭콩 잎에 충분히 흡수되도록 한 다음, 30분 이상 충분히 음건하여 처리액이 마르도록 하였다. 온실가루이 성충이 많이 있는 케이지에 처리한 페트리디쉬의 뚜껑을 넣어서 온실가루이 성충을 페트리디쉬 당 100마리씩 들어가게 하여 가루이 성충이 처리액이 묻은 강낭콩을 먹도록 하였다. 처리 후 24시간 간격으로 2일간 온실가루이 성충의 사망률을 조사하였다. 사육실의 온도는 $22\pm 4^{\circ}\text{C}$ 였고, 습도는 40~60%였다.

나. 결과

(1) 선발된 공생균과 천연물 혼합제형 살충력 비교 검정

구분	살충률(%)			평균 살충률(%)
	1반복	2반복	3반복	
HGD 배양액	40.75	44.04	49.76	44.85
HGD 배양액+마늘유	100	100	100	100
HGD 배양액+팔마로사	74.56	76.85	65.25	72.22
HGD 배양액+장뇌유	68.73	72.54	68.73	70
HGD 배양액+데리스추출물	65.44	62.10	78.02	68.52
HGD 배양액+오레가노	86.23	88.23	83.12	85.86
HGD 배양액+식물추출물	100	100	100	100
무처리	3.53	5.23	2.34	3.70

선발된 HGD 공생균 배양액과 온실가루이에 살충효과를 나타내는 천연물 5종을 각각 혼합한 제형의 살충 활성을 검정하였고, 그 결과를 표 3-1에 나타내었다.

표 7-8-1을 보면 HGD 배양액과 마늘유 혼합제형에서 100%, 식물추출물 과의 혼합제형

에서 100%를 나타내어 배양액 단독 처리 시 나타내는 살충 활성 44.85%보다 월등히 높은 효과를 나타낸다.

HGD 배양액과 마늘유 혼합제형, HGD 배양액과 식물혼합추출물 혼합제형 2종을 선발하여 다음 단계를 진행하였다.

(2) HGD 배양액과 천연물 혼합제형 최적비율 탐색

선발된 마늘유와 식물혼합추출물을 HGD 배양액과 혼합함에 있어서 온실가루이에 대한 살충 활성의 최적 비율을 탐색하였고, 그 결과는 표 3-2에 나타내었다.

표 7-8-2를 보면, 온실가루이에 대하여 살충 활성이 HGD 배양액과 마늘유 10% 이상, 식물혼합추출물 30%이상 혼합 시 100%의 살충 활성을 나타낸다. 마늘유 10%, 식물혼합추출물 30% 혼합 처리를 선발하여 다음단계를 진행하였다.

표 3-2. HGD배양액과 천연물 혼합제형 최적비 탐색

구분	살충률(%)			평균 살충률(%)
	1반복	2반복	3반복	
HGD 배양액 100%	30.52	32.28	31.04	31.40
HGD 배양액 85%+ 마늘유 5%	71.16	70.84	74.93	72.31
HGD 배양액 80%+ 마늘유 10%	100	100	100	100
HGD 배양액 75%+ 마늘유 15%	100	100	100	100
HGD 배양액 70%+ 마늘유 20%	100	100	100	100
HGD 배양액 80%+ 식물추출물 10%	72.57	71.55	73.23	72.45
HGD 배양액 70%+ 식물추출물 20%	88.73	90.88	92.10	90.57
HGD 배양액 60%+ 식물추출물 30%	100	100	100	100
HGD 배양액 50%+ 식물추출물 40%	100	100	100	100
무처리	10.24	9.87	13.28	11.13

(3) HGD 배양액과 천연물 혼합제형 최적 희석배수 탐색

선발된 HGD 배양액과 마늘유 10%, 식물추출물 30%의 두 혼합 처리구의 온실가루이에 대한 살충 활성 최적 희석배수를 탐색하였고, 그 결과는 표 3-3에 나타내었다.

표 3-3을 보면, 온실가루이에 대한 살충 활성이 HGD 배양액과 마늘유 10% 혼합액과 HGD 배양액과 식물혼합추출물 30% 혼합액 250배 희석 처리구에서 100%로 나타난다.

표 3-3. HGD배양액과 천연물 혼합제형 최적 희석배수 탐색

구분	살충률(%)			평균 살충률(%)
	1반복	2반복	3반복	
HGD 배양액 80%+ 마늘유 10% 250배	100	100	100	100
HGD 배양액 80%+ 마늘유 10% 500배	72.13	68.54	69.33	70
HGD 배양액 80%+ 마늘유 10% 1000배	36.71	29.87	45.92	37.5
HGD 배양액 60%+ 식물추출물 30% 250배	100	100	100	100

HGD 배양액 60%+ 식물추출물 30% 500배	88.84	86.79	86.87	87.5
HGD 배양액 60%+ 식물추출물 30% 1000배	71.13	69.84	84.03	75
무처리	11.97	16.73	14.17	14.29

4절. 제제의 제품화 및 안정성 확인 검사

1. 식물추출물과 식물성오일을 이용한 가루이 방제제의 제품화 및 안전성 확인

가. 실험방법

(1) 약해test

개발제제(식물추출물+마늘유혼합제형)에 대한 약해 test는 고추(청진), 배추(아시아봄), 상추(적치마), 토마토(예광), 벼(동안벼)에 대하여 실시하였다. 와그너포트(1/5000a) 당 1주를 정식한 후 처리 방법은 개발제제의 정량 1000배, 배량 500배로 하여 처리하였으며, 시험구 배지는 완전임의 배치법으로 3Pot를 1반복으로 하여 3반복 수행하였다. 약해 조사 방법은 약제 처리 3, 5, 7일 후 외관상 나타나는 약해유무를 약해정도에 따라 0~5로 하여 달관조사하였다.

달관조사 기준(무처리와 기준량 및 배량 비교 시)

- 0 : 육안으로 약해가 인정되지 않음
- 1 : 아주 가벼운 약해로서 작은 약반이 약간 인정됨.
- 2 : 처리된 잎의 소부분에서 약해가 인정됨
- 3 : 처리된 잎의 50퍼센터 정도 약해가 인정 됨
- 4 : 상당한 피해를 받고 있으나 아직 건전한 부분이 남아 있음
- 5 : 거의 심한 피해를 받고 고사된 상태임

(2) 담수어류(잉어, *Cyprinus carpio*)에 대한 급성독성

본 시험에 사용된 어종은 잉어로 수생 생태계의 유해성평가에 널리 사용되고 있고, 본 계통에 관한 비교할 수 있는 충분한 시험 기초자료가 축적되어 있으며, 농촌진흥청 및 OECD 가이드라인에서 추천된 종이다. 잉어는 20~24℃, 조명 16시간, 암 8시간, 제일사료(주)의 채색 관상어 사료를 이용하여 사육하였다. 사용수조는 시험어류의 단위체중 1g당 시험용수의 양이 1g/L가 넘도록 80L(30*60*45 cm)용량의 직육면체 수조를 사용하였다. 시험물질은 0.125g을 칭량하여 10L의 시험용수에 직접 처리한 후 충분히 교반하여 10.0mg/L의 시험용액을 제조하였다. 기초시험 결과 기초시험농도인 10.0mg/L에서 치사체가 관찰되지 않아 10.0mg/L 단일농도로 실험을 하였으며, 잉어 10마리를 노출시켰다. 대조군은 무처리한 시험용수를 음성대조군으로 하여 시험군과 동일하게 10마리를 노출시켰다. 시험생물 투입 후

3시간 및 6시간 그리고 24시간 간격으로 96시간까지 관찰을 실시하였다. 관찰 시 형태이상, 유영이상, 출혈 등의 중독증상과 치사 개체수를 관찰하였고, 치사어의 판정은 시험생물을 유리막대로 건드렸을 때 움직임이 없거나 아가미 호흡이 중단된 경우 치사로 판정하였다.

(3) 랫드에 대한 개발제제의 급성경구 독성

본 시험동물인 Rat는 (주)대한바이오링크에서 구입하여 사용하였다. 사육환경은 온도 23±2℃, 상대습도 50±10%, 환기시설, 조명시간 12시간 및 조도 200~300Lux의 실험실조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다. 시험용액은 1단계 시험약제 조제시 용매는 증류수를 사용하였으며, 시험물질 2.0g을 정확히 평량하여 5 mL의 volumetric flask에 넣고 2차 증류수를 가하여 표선까지 정용한 후 vortex로 충분히 현탁하여 시험용액으로 사용하였다. 2, 3단계 시험약제조제시 용매는 증류수를 사용하였으며, 시험물질 0.3g을 정확히 평량하여 5 mL의 volumetric flask에 넣고 2차 증류수를 가하여 표선까지 정용한 후 vortex로 충분히 현탁하여 시험용액으로 사용하였다.

투여량은 투여약량수준별 공히 5.0mL/kg bw으로 설정하였다. 시험물질 투여개시 하룻밤 전부터, 시험물질 투여 후 3시간 동안은 먹이를 주지 않았고, 랫드 경구 투여용 존데(Sonde)를 이용하여 투여 전 체중 측정치를 기준으로 소정의 시험물질 투여약량을 산출한 후, 경구투여 경로로 위내에 1회에 한하여 강제 투여하였다. 처리 당일은 처리 후 30분, 1시간에서 4시간까지 매 시간마다 일반 중독증상 및 치사수를 관찰하였으며, 익일부터는 매일 1회씩, 투여 개시 후 14일 까지 관찰 및 조사하였다.

급성경구독성시험(급성독성등급법)에 의해 시험을 실시하여 GHS(Globally Harmonized Classification System) 분류기준에 의거 LD50 기준치(mg/kg bw)로 반수치사약량을 산출하였다.

Classification criteria						
Class ^{a)}	LD ₅₀ (mg/kg bw)				GHS ^{b)}	LD ₅₀ (mg/kg bw) Acute Oral
	Acute Oral		Acute Dermal			
	Solids	Liquids	Solids	Liquids		
I (Extremely)	< 5	< 20	< 10	<40	I	≤ 5
II (Highly)	≥5, <50	≥20, <200	≥10, <100	≥40, <400	II	≤ 50
III (Moderately)	≥50, <500	≥200, <2,000	≥100, <1,000	≥400, <4,000	III IV	≤ 300 ≤2,000
IV (Slightly)	≥500	≥2,000	≥1,000	≥4,000	V	≤5,000

a) Classification systems of Acute toxicity for pesticides in Korea
b) Globally Harmonized Classification System

(4) 랫드에 대한 개발제제의 급성경피 독성

본 시험동물인 Rat는 (주)대한바이오링크에서 구입하여 사용하였다. 사육환경은 온도 23±

2℃, 상대습도 50±10%, 환기시설, 조명시간 12시간 및 조도 200~300Lux의 실험실조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다. 시험농도는 기초 및 예비시험 결과 반수치사농도(LD50)값이 300~4000 mg/kg bw 범위 내에 있을 것으로 추정되어 시험 약량 수준을 300, 573, 1095, 2093, 4000mg/kg bw(공비 1.91)로 설정하여 시험을 실시하였다. 시험 동물 수는 암수 각각 5마리씩 10마리를 1군으로 하였으며, 개체식별은 피크린산 용액을 이용하여 피모색소 표시를 하고, 사육상자는 군 식별정보를 부착하여 식별하였다. 시험약제 조제 시 용매는 증류수를 사용하였으며, 시험물질 1.20, 2.29, 4.38, 8.37, 16.00 g을 정확히 평량하여 20mL의 volumetric flask에 넣고 2차 증류수를 가하여 20mL의 표시선까지 용한 후 vortex로 충분히 현탁하여 시험 용액으로 사용하였다. 투여액량은 투여약량수준별 공히 5 mL/kg bw로 설정하였다. 시험동물은 시험물질처리 하루 전에 흉복배부에 제모기를 이용하여 5×6 cm 이상 크기 넓이로 제모하고, 4×5 cm 크기 면적의 거즈에 조제된 시험용액을 체중 측정치를 기준으로 소정 액량을 산출한 후 균일하게 묻힌 다음 제모된 부위에 Coban(self-adherentwrap, 3m 사)으로 고정/유지시켰다. 처리 당일은 처리 후 30분, 1시간에서 4시간까지 매시간 일반중독증상 및 치사수를 관찰하였으며, 익일부터는 매일 1회씩, 투여 개시 후 14일까지 관찰 및 조사하였다. 시험된 모든 동물에 대하여 시험 물질 투여 직전에 체중을 측정하였고, 생존한 동물에 한하여 투여 후 3일, 7일 관찰종료일인 14일 째 개체별 체중을 측정하였다.

(5) 토끼(New Zealand White계)에 대한 개발제제의 피부자극성시험

본 실험동물인 토끼는 (주)대한바이오링크에서 구매하여 사용하였다. 동물을 구입한 후 8일 동안 동물실험실의 환경 하에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰하여 건강한 개체만을 시험에 이용하였다. 군분리시 제모를 실시하여 피부에 이상이 없는 동물만 선택을 하였다.

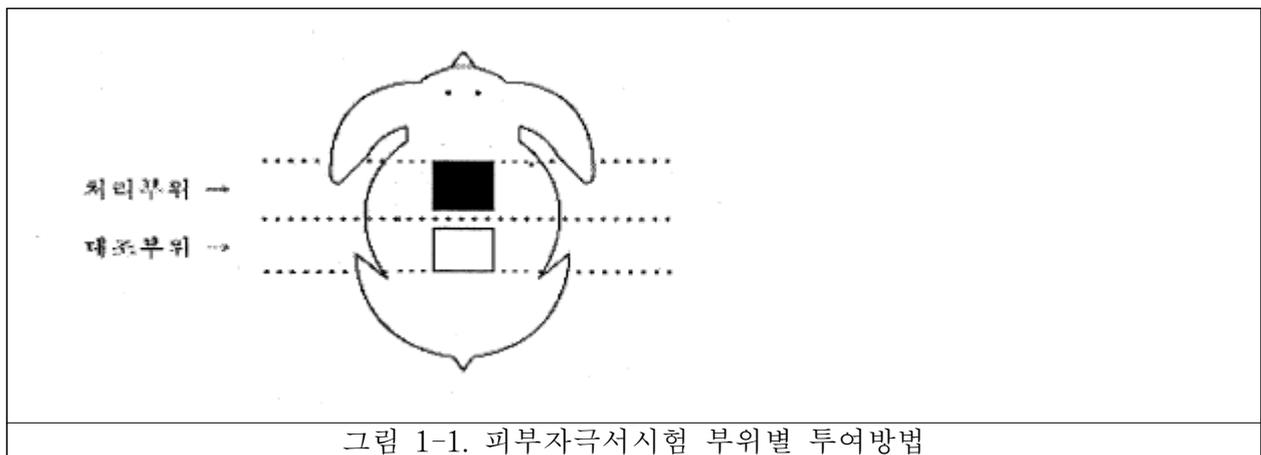


그림 1-1. 피부자극성시험 부위별 투여방법

사육환경은 온도 23±2℃, 상대습도 50 ± 10%, 환기시설 조명시간 12시간 및 조도 200~300 Lux의 실험실조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다. 실험동물은 건강하고 성숙한 동물 3마리를 사용하여 1군으로 구성하였고, 시험 물질이 액상이라 조제하지 않고 제품 자체를 직접 처리하였다. 투여량은 투여 군별 공히 0.5mL로 설정하였다. 투여방법은 실험동물은 시험물질 투여 24시간 전에 전기면도기를 이용하여 경배부(등부위)의 털을 15×15 cm 넓이로 제모한 다음 건강하고 깨끗한 피부를 가진 동물만을 사용하였다. 2×3 cm로 절개한 거즈를 이용하여 0.5 mL의 시험물질을 처리부

위에 도포한 후 시험물질의 유실 및 방출을 방지하기 위해 비자극성테이프와 Coban으로 고정 유지시켜 시험물질이 경구 및 안점막 등 타 경로로 유입되지 않게 처리하였다. 대조부위는 증류수로 처리하여 처리부위와 증상관찰 비교 용도로 활용하였다.

시험물질 처리 4기간 후 패치를 제거하고 피부에 묻은 잔여물질은 증류수로 세척하여 모두 제거 한 후 의료용 탈지면으로 물기를 흡수시킨 다음 케이스에 넣어 두었다. 시험물질 적용 후 72시간까지 일반증상의 변화, 중독증상 및 치사동물의 유, 무를 관찰하였고, 시험물질 적용직전과 적용 후 48, 72시간에 개체별 체중을 측정하였다. 시험물질 도포 종류 후 1, 24, 48 및 72시간에 홍반, 부종 및 가피형성 유, 무를 관찰하였다. 피부반응의 평가는 [피부반응 평가표]에 준하여 실시하였고, 결과에 대한 자극성의 정도 판정은 [피부 1차 자극표]를 적용하였다.

(6) 토끼(New Zealand White계)에 대한 개발제제의 안점막자극성시험

본 실험동물인 토끼는 (주)대한바이오링크에서 구매하여 사용하였다. 동물을 구입한 후 8일 동안 동물실험실의 환경하에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰하여 건강한 개체만을 시험에 이용하였다. 시험동물은 시험물질 투여 24시간 전에 양쪽 눈을 검사하여 눈에 이상이 없는 동물을 사용하였다. 사육환경은 온도 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기시설 조명시간 12시간 및 조도 200~300 Lux의 실험실조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다. 시험물질이 액상이라 조제하지 않고 제품 자체를 직접 처리하였다. 투여량은 투여 군별 공히 0.1mL로 설정하였다. 투여방법은 시험동물 시험개시 전 24시간 이내에 양쪽 눈을 검사하여 눈에 이상이 없는 동물을 사용하였다. 약제처리는 좌안의 하안점을 가볍게 잡아당겨 결막낭 내에 액상인 시험물질 0.1mL를 한 번에 넣어 처리하고 시험물질의 손실을 막기 위해 양안점을 느슨하게 맞춰 잡고 약 1초간 유지하였다. 무처리한 우안은 대조부위로 하여 처리부위와 증상관찰 비교 용도로 활용하였다. 비세척군은 시험물질 처리 후 세척을 실시하지 않았고, 세척군은 시험물질 처리 후 2분 뒤 물로 세척하였다. 비세척군은 시험물질 적용 후 7일까지 일반증상의 변화, 중독증상 및 치사동물의 유, 무를 관찰하였고, 세척군은 시험물질 적용 후 72시간 까지 관찰하였다. 시험물질 적용직전과 적용 후 48, 72시간에 개체별 체중을 측정하였다. 안 반응의 평가는 “안반응 평가표”에 따라 실시하였다. 시험물질 처리 후 1, 24, 48시간 및 72시간에 각막혼탁, 홍채이상, 결막발적, 부종, 배출물 등 평점을 기록하였다. 비세척군에서는 72시간 후에도 안점막 자극이 지속되어 자극의 가역성 또는 비가역성을 판별하기 위하여 7일까지 관찰하였다. 안반응 평가표에 의해 개체별 안자극 지수(I.O.I., Individual ocular irritation) 및 평균 안자극 지수 (M.O.I., mean ocular irritation)를 산출하여 평균안자극 지수 중 최고치를 급성안자극 지수 (A.O.I., acute ocular irritation)로 하였다. 이 결과로 안점막자극표를 이용하여 자극성의 정도를 평가하였다.

(7) 꿀벌 (Apis mellifera)에 대한 개발제제의 급성접촉독성

본 시험에 사용된 Apis mellifera는 생태환경독성 시험생물로 널리 사용되고 있고, 본 계통에 관한 비교할 수 있는 충분한 시험기초자료가 축적되어 있으며, OECD 가이드라인에서 추천된 종이기 때문에 선정을 하였다. 2012년 08월 02일에 분양한 꿀벌을 동년 시험에 사용

한 이후 (주) 한국생물안전성연구소의 별도로 설치된 꿀벌 야외사육소에서 시험 전까지 월동 및 사연사육하였다. 한 벌통에서 생산된 건강하고 활동성이 좋은 일벌 중 어린 개체를 제외한 후 한 케이지 당 10마리씩 벌을 넣어 25℃ 이상의 암조건에서 회복시킨 다음 시험에 사용하였다. 스테인리스 철망을 이용하여 길이 15 cm, 직경 5 cm 크기의 원통형으로 만들어진 시험용케이지에 입구를 유리급식관(직경 1cm, 길이 5 cm정도)을 끼울 수 있도록 구멍을 뚫은 스펀지 마개로 막았다. 야외사육벌통에서 채집한 꿀벌을 환기구멍에 있는 밀폐통에 넣어 Co₂ gas를 이용하여 마취하였다. 시험약량은 예비시험을 바탕으로 선정하였다. 본 시험 약량은 공비 1.97로 하여 주원료 투입비율 기준 1.000, 1.968, 7.622 및 15.000 ug/bee의 5단계로 설정하였으며, 각 약량수준 당 10마리씩 3반복으로 수행하였다. 시험물질 1.25g을 10 mL volumetric flask에 넣고 methanol을 표선까지 채운 후 vortex mixer를 이용하여 충분히 용해시켜 주원료 투입비율 기준 100.0ug/uL의 농축시험용액을 조제하였다. 이와 같이 조제한 농축시험용액을 10 mL volumetric flask에 각각 0.100, 0.197, 0.387, 0.762, 및 1.500 mL씩 처리하고, methanol을 가하여 10 mL 표선까지 정용한 후 충분히 용해시켜 1.000, 1.968, 3.873, 7.622 및 15.000 ug/uL의 시험용액을 조제하였다. 케이지 안에 10마리씩 수용된 꿀벌들을 비이커에 넣고 Co₂ gas로 마취시킨 후 여과지 위에 올려놓고, micro applicator를 사용하여 조제된 시험용액을 마취된 꿀벌의 흉부에 각 1uL 씩 처리하여 노출하였다. 모든 케이지에 대하여 처리 후 4시간, 24시간 및 48시간째에 관찰하였다. 꿀벌의 중독증상관찰은 일반중독증상, 특이증상 및 치사개체를 관찰하였다. 치사개체의 판정은 육안으로 관찰하여 움직임이 없고 주사침을 이용하여 건드렸을 때 더듬이, 다리, 몸통의 움직임이 중단된 경우 치사로 판정하였다. 시험물질 및 양성대조군시험물질(Dimethoate 99.6% tech.)처리 후 24시간 및 48시간일 때의 LD50 값 및 95% 신뢰한계는 Probit method(Minitab ver14, USA) 통계프로그램을 사용하여 계산하였다.

나. 결과

(1) 약해 test

약해 조사 결과는 표 1-1와 그림 1-2에 나타내었다. 본 결과를 보면, 개발제제는 고추, 배추, 상추, 토마토, 벼 등의 작물에 대한 약해는 전혀 없는 것으로 나타났다.

표 1-1. 개발제제의 약해 조사 결과

시험약제	시험작물	약해정도(0~5)		약해증상
		기준량	배량	
개발제제	고추	0	0	없음
	배추	0	0	없음
	상추	0	0	없음
	토마토	0	0	없음
	벼	0	0	없음

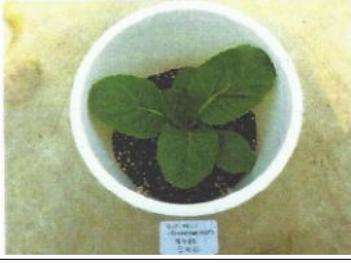
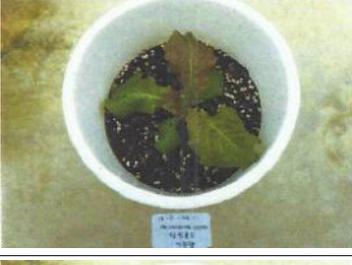
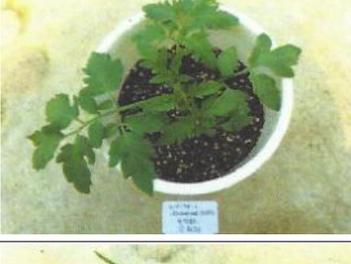
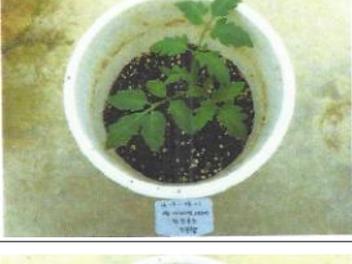
작물명	무처리	기준량	배량
고추			
배추			
상추			
토마토			
벼			

그림 1-2. 개발제제의 작물별 약해 test

(2) 담수어류(잉어, *Cyprinus carpio*)에 대한 급성독성

개발제제의 담수어류에 대한 급성적 영향을 평가하고, 반수치사농도(LC50)를 산출하기 위해 잉어를 이용하여 급성독성시험을 96시간 동안 지수식으로 실시하였다.

시험용액 중 시험물의 농도는 주원료 투입비율을 기준으로 10.0mg/L 및 음성대조군으로 구분하였으며, 결과는 표 1-2에 나타내었다.

표 1-2. 개발제제의 담수어류 독성

Time	LC50(mg/L) ^{a)}	95% confidence limits	NOEC(mg/L) ^{b)}
48 hr	>10.0	-	10.0
96 hr	>10.0	-	10.0

a) Based on nominal concentration of main ingredient ratio
 b) No observed effect concentration

해당 시험 조건하에서, 개발제제의 잉어에 대한 48시간 및 96시간 반수치사농도는 주원료 투입비율 기준 모두 10.0mg/L 이상으로 나타났다.

(3) 랫드에 대한 개발제제의 급성경구 독성

개발제제를 경구투여한 결과 1단계 시험 투여약량 2000 mg/kg bw에서 투여 직후 강한 호흡곤란을 일으키다 2마리의 개체가 24시간 이내 치사되었고, 1마리의 개체는 2일째 관찰 시 치사하였다. 2단계 및 3단계 투여약량 300 mg/kg bw에서는 시험 종료 시까지 일반 증독증상을 보이거나 치사한 개체가 관찰되지 않았다. 2단계 및 3단계 시험군의 모든 시험동물은 시험 종료 시 까지 체중이 증가하였다.

표 1-3. Mortality and clinical signs

Group	Dose(mg/kg bw)	Sex	Number of animals	Clinical signs	Mortality (dead/total)	LD50
1	2000	Female	3	dyspnea	3/3	>300~≤2000 mg/kg bw
2	300	Female	3	No abnormality detected	0/3	
3	300	Female	3	No abnormality detected	0/3	

표 1-4. Mean body weights

Group	Dose(mg/kg bw)	Sex	Number of animals	Days after administration (g)		
				0	7	14
1	2000	Female	3	178.8±6.3	NA	NA
2	300	Female	3	188.3±10.0	201.9±7.8	212.8±8.9
3	300	Female	3	181.8±10.0	197.5±3.8	210.3±3.0

(4) 랫드에 대한 개발제제의 급성경피 독성

개발제제를 본시험 투여약량 300, 573, 1095, 4000mg/kg bw으로 경피 노출한 결과, 중

독증상은 1095, 2093, 4000mg/kg bw에서 시험물질 처리 직후암수 모두에서 운동실조 증상을 보였다. 치사개체는 시험물질 처리 24시간 뒤 1095mg/kg bw에서는 암수 각각 4마리씩 치사되었으며, 2093 mg/kg bw에서는 수컷이 4마리가 치사하였고, 7일째 관찰시 암컷에서 1마리의 치사개체가 확인되었다. 4000mg/kg bw에서는 시험물질 처리 24시간 뒤, 암수 모두 치사 되었다. 생존한 시험동물 모두의 체중은 약제투여 후 경과일에 따라 증가추세를 보였다. 물리적 상태가 액체인 개발제제의 SD 랫드에 대한 경피 투여한 결과, 수컷과 암컷 모두에 대한 LD 50값은 1583.4mg/kg bw으로 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 III급(보통독성)에 해당되었다.

- 급성독성정도에 따른 농약 등의 구분

구 분	시험동물의 반수를 죽일 수 있는 양 (mg/kg 체중)	
	급성경피	
	고 체	액 체
I 급 (맹독성)	10 미만	40 미만
II 급 (고독성)	10 이상 100 미만	40 이상 400 미만
III 급 (보통독성)	100 이상 1000 미만	400 이상 4000 미만
IV 급 (저독성)	1000 이상	4000 이상

※ 고체 및 액체의 분류는 농약 등의 물리적 상태에 의함.

Group	Dose(mg/kg bw)	Sex	Number of animals	Clinical signs	Mortality (dead/total)		LD50
1	300	Male	5	No abnormality detected	0/5	0	1583.35 mg/kg bw
2	300	Female	5	No abnormality detected	0/5		
3	573	Male	5	No abnormality detected	0/5	0	
4	573	Female	5	No abnormality detected	0/5		
5	1095	Male	5	Ataxia	4/5	80	
6	1095	Female	5	Ataxia	4/5		
7	2093	Male	5	Ataxia	4/5	50	
8	2093	Female	5	Ataxia	1/5		
9	4000	Male	5	Ataxia	5/5	100	
10	4000	Female	5	Ataxia	5/5		

표 1-6. Mean body weights

Group	Dose(mg/kg bw)	Sex	Number of animals	Clinical signs	Days after administration (g)		
					0	7	14
1	300	Male	5	No abnormality detected	233.2±9.0	249.5±12.3	285.5±10.0
2	300	Female	5	No abnormality detected	177.4±10.6	198.6±10.3	222.9±10.1
3	573	Male	5	No abnormality detected	231.7±9.0	242.0±13.2	278.8±12.9
4	573	Female	5	No abnormality detected	180.6±7.6	209.4±10.3	234.1±18.3
5	1095	Male	5	Ataxia	227.7±8.5	252.5	293.5
6	1095	Female	5	Ataxia	180.3±3.9	198.5	219.5
7	2093	Male	5	Ataxia	228.1±8.4	260.0	310.5
8	2093	Female	5	Ataxia	185.8±4.5	213.1±5.4	228.4±11.5
9	4000	Male	5	Ataxia	227.1±7.3	NA	NA
10	4000	Female	5	Ataxia	176.9±5.4	NA	NA

(5) 토끼 (New Zealand White계)에 대한 개발제제의 피부자극성시험

모든 시험동물에 있어서 어떠한 일반증상도 관찰되지 않았으며, 치사개체도 발견되지 않았다. 시험물질 적용직전, 적용 후 48시간과 72시간에 개체별 체중을 측정된 결과, 시험경과 일수에 따라 증가하였으며 시험물질로 기인한 특이한 체중변화는 없었다. 시험물질 노출 종료 후 1, 24, 48 및 72 시간에 피부반응평가표를 기준으로 피부반응을 관찰한 결과, 시험물질 적용 1시간째 관찰시 부종의 피부반응이 관찰되었다. 72시간째 관찰시 모든 반응이 소실되어 정상으로 회복되었다.

피부반응평가표에 의해 평가된 피부자극정도를 적용하여 1차 피부자극지수를 산출한 결과, P,I,I는 “0.5” 이었고, 피부 1차 자극자료에 의해 자극성을 구분하면 “없음” 으로 나타났다.

- 피부반응 평가표

(1) 홍반과 가피형성	
홍반이 전혀 없음	0
아주 가벼운 홍반 (육안으로 겨우 식별할 정도)	1
분명한 홍반	2
약간 심한 홍반	3
심한 홍반 (홍당무 색의 발적)과 가벼운 정도의 가피형성	4
총 가능한 홍반 점수	4
(2) 부종형성	
부종이 전혀 없음	0
아주 가벼운 부종 (육안으로 겨우 식별할 정도)	1
가벼운 부종 (뚜렷하게 부어 올라서 변연부가 분명히 구별될 경우)	2
보통의 부종 (약 1 mm 정도 부어 올랐을 경우)	3
심한 부종 (1 mm 이상 부어오르고 노출부위 밖에까지 확장된 상태)	4
총 가능한 부종 점수	4

- 피부 1차 자극표

자극성 구분	기 준
없 음	1차 피부자극지수 (P.I.I)가 1.0 이하
경 도	1차 피부자극지수 (P.I.I)가 1.1 ~ 2.0
중 도	1차 피부자극지수 (P.I.I)가 2.1 ~ 5.0
강 도	1차 피부자극지수 (P.I.I)가 5.1 이상

☒ 1-7. Evaluation of skin irritation(1/2)

Phases ^{a)}	Animal No.	Sites	Days after application			
			0	1	2	3
Erythema & Eschar	1	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0
	2	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0
	3	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0
Edema	1	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	1	1	1	0
	2	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	1	1	1	0
	3	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	1	1	1	0

a) Time after topical application

☒ 1-8. Evaluation of skin irritation(2/2)

Sites	Control sites				Test sites			
Change	Erythema & Eschar		Edema		Erythema & Eschar		Edema	
Phases	24 hrs	72 hrs	24 hrs	72 hrs	24 hrs	72 hrs	24 hrs	72 hrs
1	0	0	0	0	0	0	1	0
2	0	0	0	0	0	0	1	0
3	0	0	0	0	0	0	1	0
Total	0	0	0	0	0	0	3	0
Mean	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0
Sum ^{a)}	0.0				1.0			
P.I.I. ^{b)}	0.0				0.5			

(6) 토끼 (New Zealand White계)에 대한 개발제제의 안점막자극성시험

모든 시험동물에 있어서 어떠한 일반증상도 관찰되지 않았으며, 치사동물 또한 발견되지 않았다. 체중측정 결과 모든 동물에서 정상적인 체중증가가 관찰되었다.

안반응평가

[비세척군]

비세척군-1

- 1 시간째부터 96시간째까지, 결막의 발적 및 부종에 대한 자극성과 배출물증상이 관찰되었다.
- 7일째, 결막의 발적 및 부종에 대한 자극 및 배출물 증상이 회복되었다.

비세척군-2

- 1시간째부터 24시간째까지, 결막의 발적 및 부종에 대한 자극증상과 배출물이 관찰되었다.
- 48시간째, 결막의 부종에 대한 자극증상과 배출물이 관찰되었고, 결막의 발적 자극은 회복되었다.
- 72시간째, 결막의 부종에 대한 자극증상이 관찰되었고, 배출의 증상은 회복되었다.
- 96시간째, 결막의 부종에 대한 자극증상이 관찰되었다.
- 7일째, 결막의 부종에 대한 자극이 회복되었다.

비세척군-3

- 1시간째, 결막의 발적 및 부종에 대한 자극증상이 관찰되었다.
- 24시간째, 결막의 발적 및 부종에 대한 자극증상이 회복되었다.

[세척군]

세척군-1

- 1시간째, 결막의 발적 및 부종에 대한 자극증상이 관찰되었다.
- 24시간째, 결막의 발적 및 부종에 대한 자극증상이 회복되었다.

세척군-2

- 1시간째, 결막의 발적 및 부종에 대한 자극증상과 배출물 증상이 관찰되었다.
- 24시간째, 결막의 발적 및 부종에 대한 자극증상과 배출물 증상이 회복되었다.

세척군-3

- 1시간째, 결막의 발적 및 부종에 대한 자극증상과 배출물이 관찰되었다.
- 24시간째, 결막의 발적 및 부종에 대한 자극증상과 배출물 증상이 회복되었다.

위 결과를 바탕으로 안반응 평가표에 의해 평가된 안점막자극정도를 적용하여 급성안자극 지수(A.O.I)를 산출한 결과, 비세척군의 A.O.I는 “8.0”, 세척군의 A.O.I는 “5.3” 이었다. 이상의 시험결과 비세척군과 세척군의 자극성은 안점막자극표에 의해 없음으로 평가 되었다.

- 안반응 평가표

1) 각막	
(A) 혼탁 : 안구의 농후한 정도(가장 농후한 지점을 관찰함)	평점
◦화농이나 혼탁이 없음	0
◦혼탁이 분산 혹은 밀집되어 있으나(정상적인 투명성이 약간 둔화 된 것과는 다름)홍채의 말단이 명확히 관찰됨	1
◦반투명한 부분이 쉽게 관찰됨, 홍채의 말단이 약간 불명확함	2
◦진주색깔을 나타냄, 홍채의 말단이 관찰안됨, 동공의 크기가 가까스로 관측됨	3
◦각막이 불투명, 혼탁 때문에 홍채가 관찰안됨	4
 (B) 혼탁된 각막의 범위	
◦1/4이하(그러나 0은 아니다)	1
◦1/4이상 1/2미만	2
◦1/2이상 3/4미만	3
◦3/4이상 1까지	4
A×B×5	최대치 = 80
 2) 홍채	
(C) 반응치	
◦정상.....	0
◦현저한 주름의 형성, 충혈, 종창, 각막주위에 중등도의 충혈, 이상과 같은 단독 혹은 혼합, 홍채는 빛에 대해 반응함(둔한 반응은 양성).....	1
◦빛에 대해 반응 없음, 충혈, 대부분 파괴(이상과 같은 증상의 일부 혹은 전부).....	2
C×5	최대치 = 10
 3) 결막	
(D) 발적(안검결막, 안구결막에 한함, 홍채 제외)	
◦혈관은 정상.....	0
◦일부 혈관 충혈.....	1
◦얇은 선홍색을 띄거나 각각의 혈관이 쉽게 관찰 안됨.....	2
◦질은 선홍색.....	3
 (E) 결막부종	
◦부풀지 않음.....	0
◦정상보다 약간 종창(순막 포함).....	1
◦안검의 부분적 외전을 동반한 현저한 종창.....	2
◦눈이 반쯤 잠길 정도의 안검의 종창.....	3
◦눈이 반 이상 잠길 정도의 안검의 종창.....	4
 (F) 배출물	
◦배출물 없음.....	0
◦약간의 배출물(정상동물의 내부 눈꼬리에서 관찰되는 작은양 제외).....	1
◦속눈썹과 눈꺼풀을 적실 정도의 배출물.....	2
◦눈주위의 상당한 부위와 속눈썹 및 눈꺼풀을 적실 정도의 배출물.....	3
점수(D+E+F) × 2	최대치 = 20

- 안점막자극표

자극성 구분	기 준
없 음	급성안자극지수 (A.O.I.)가 10.0 이하
경 도	급성안자극지수 (A.O.I.)가 10.1 ~ 30.0
중 도	급성안자극지수 (A.O.I.)가 30.1 ~ 60.0
강 도	급성안자극지수 (A.O.I.)가 60.1 이상

표 1-9. Mortality and clinical signs

Group	Animal No	Days after application				Mortality (%)
		0	1	2	3	
No eye washed	1	NOR ^{a)}	NOR	NOR	NOR	0
	2	NOR	NOR	NOR	NOR	
	3	NOR	NOR	NOR	NOR	
Eye washed	1	NOR	NOR	NOR	NOR	0
	2	NOR	NOR	NOR	NOR	
	3	NOR	NOR	NOR	NOR	

a) Normal

표 1-10. Body weight changes

Group	Animal No	Days after application (g)			
		0	2	3	Gain
No eye washed	1	2083.5	2147.0	2236.0	152.5
	2	2068.5	2097.0	2134.0	65.5
	3	1845.0	1913.0	1974.5	129.5
	Mean	1999.0	2052.3	2114.8	115.8
	S.D	133.6	123.2	131.8	-
Eye washed	1	1882.0	1908.5	1913.5	31.5
	2	2196.0	2199.0	2218.0	22.0
	3	2104.0	2118.0	2173.0	69.0
	Mean	2060.7	2075.2	2101.5	40.8
	S.D	161.4	149.9	164.4	-

☒ 1-11. No eye washed evaluation of eye irritation

Time	Animal No	Cornea		Iris (C)	Conjunctive			I.O.I ^{a)}	M.O.I ^{b)}
		Degree of opacity (A)	Diffuse areas of opacity (B)		Redness (D)	Edema (E)	Lacrima (F)		
1 hr	1	0	0	0	2	1	1	8	8.0
	2	0	0	0	2	2	1	10	
	3	0	0	0	1	1	1	6	
24 hr	1	0	0	0	1	1	1	6	8.0
	2	0	0	0	1	2	1	8	
	3	0	0	0	1	2	2	10	
48 hr	1	0	0	0	1	1	1	6	3.3
	2	0	0	0	0	1	1	4	
	3	0	0	0	0	0	0	0	
72 hr	1	0	0	0	1	1	1	6	2.7
	2	0	0	0	0	1	0	2	
	3	0	0	0	0	0	0	0	
96 hr	1	0	0	0	1	1	1	6	2.7
	2	0	0	0	0	1	0	2	
	3	0	0	0	0	0	0	0	
7 day	1	0	0	0	0	0	0	0	0.0
	2	0	0	0	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	0	0	0	

a) I.O.I = (Individual Ocular Irritation) = (A×B×5)+(C×5)+(D+E+F)×2

b) M.O.I = (Mean Ocular Irritation)

☒ 1-12. Eye washed evaluation of eye irritation

Time	Animal No	Cornea		Iris (C)	Conjunctive			I.O.I ^{a)}	M.O.I ^{b)}
		Degree of opacity (A)	Diffuse areas of opacity (B)		Redness (D)	Edema (E)	Lacrima (F)		
1 hr	1	0	0	0	1	1	0	4	5.3
	2	0	0	0	1	1	1	6	
	3	0	0	0	1	1	1	6	
24 hr	1	0	0	0	0	0	0	0	0.0
	2	0	0	0	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	0	0	0	
48 hr	1	0	0	0	0	0	0	0	0.0
	2	0	0	0	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	0	0	0	
72 hr	1	0	0	0	0	0	0	0	0.0
	2	0	0	0	0	0	0	0	

	3	0	0	0	0	0	0	0	
--	---	---	---	---	---	---	---	---	--

(7) 꿀벌 (*Apis mellifera*)에 대한 개발제제의 급성접촉독성

(가) 누적치사 수 및 중독증상(표 1-13, 1-14)

시험물질 노출 후 48시간동안, 음성대조군과 용매대조군에서 치사 및 어떠한 중독증상도 관찰되지 않았다. 시험물질 처리군에서는 시험물질 노출 후 4시간 관찰시, 1.968 ug/bee 이상의 처리군에서 각각 1, 1, 13, 17마리의 치사개체가 발견되었다. 24시간 관찰시, 3.873, 7.622 및 15.000ug/bee의 처리군에서 각각 1, 1, 3마리의 치사개체가 추가로 발견되어 각각 시험량의 누적치사 수는 0, 1, 2, 14, 20마리 이었다. 48시간 관찰시 3.873 ug/bee의 처리군에서 1마리의 치사개체가 추가로 발견되어 관찰 종료 시의 누적치사 수는 0, 1, 3, 14, 20마리이었다. 이상 증상으로는 시험물질 노출 후 4시간 관찰 시에 1.968 ug/bee의 처리군에서 보행장애 증상을 보인 개체 1마리, 7.622 및 15.000 ug/bee의 처리군에서 무기력한 증상을 보인 개체가 각각 1, 3마리씩 관찰되었으며, 이후 관찰 시 생존개체에서 이상 증상을 보인 개체는 발견되지 않았다.

(나)LD50의 산출(표 1-15)

개발제제의 꿀벌에 대한 24시간 LD50 값은 주원료 투입비율을 기준으로 11.160 ug/bee이었고, 48시간 LD 50값은 11.062 ug/bee이었다.

Dosage (ug/bee)	Number of honeybee	Cumulative mortality			Mortality(%)	
		4 hr	24 hr	48 hr	24 hr	48 hr
Negative control	10	0	0	0	0	0
	10	0	0	0		
	10	0	0	0		
Solvent control	10	0	0	0	0	0
	10	0	0	0		
	10	0	0	0		
1.000	10	0	0	0	0	0
	10	0	0	0		
	10	0	0	0		
1.968	10	0	0	0	3.3	3.3
	10	1	1	1		
	10	0	0	0		
3.873	10	1	1	1	6.7	10.0
	10	0	1	2		
	10	0	0	0		
7.622	10	5	5	5	46.7	46.7
	10	4	4	4		
	10	4	5	5		
15.000	10	5	7	7	66.7	66.7
	10	5	6	6		
	10	7	7	7		

㉞ 1-14. Behavioural abnormalities of honeybees				
Dosage (ug/bee)	Number of honeybee	Cumulative mortality		
		4 hr	24 hr	48 hr
Negative control	10	N	N	N
	10	N	N	N
	10	N	N	N
Solvent control	10	N	N	N
	10	N	N	N
	10	N	N	N
1.000	10	N	N	N
	10	N	N	N
	10	N	N	N
1.968	10	N	N	N
	10	N	N	N
	10	B(1)	N	N
3.873	10	N	N	N
	10	N	N	N
	10	N	N	N
7.622	10	N	N	N
	10	N	N	N
	10	C(1)	N	N
15.000	10	C(2)	N	N
	10	C(1)	N	N
	10	N	N	N

N : Normal, A : Hyperactivity, B : Mobile but not working or flying normally
C : Alive but unable to walk or fly

㉞ 1-15. LD 50 of test substance and dimethoate 99.6% tech		
Test substance	24 hrs LD 50 (95% Confidence limits)	48 hrs LD 50 (95% Confidence limits)
Dimethoate 99.6% tech	0.146 ug a.i./bee (0.129~0.168 ug a.i./bee)	0.138 ug a.i./bee (121~0.158 ug a.i./bee)
개발제제	11.160 ug a.i./bee (9.660~13.193 ug a.i./bee)	11.062 ug a.i./bee (9.545~13.131 ug a.i./bee)

2. 가루이 방제를 위해 제품화된 식물성오일 혼합제제(참가루)의 안전성 확인

가. 실험방법

(1) 약해test

개발제제(식물성 오일 혼합제제, 참가루)에 대한 약해 test는 고추(청진), 토마토(러브리 256), 벼(동안벼), 오이(네박자), 딸기(설향)에 대하여 실시하였다. 와그너포트(1/5000a) 당 1주를 정식한 후 처리 방법은 개발제제의 정량, 배량으로 하여 처리하였으며, 시험구 배지는 완전임의 배치법으로 3Pot를 1반복으로 하여 3반복 수행하였다. 약해 조사 방법은 약제 처리 3, 5, 7일 후 외관상 나타나는 약해유무를 약해정도에 따라 0~5로 하여 달관조사 하였다.

달관조사 기준(무처리와 기준량 및 배량 비교 시)

- 0 : 육안으로 약해가 인정되지 않음
- 1 : 아주 가벼운 약해로서 작은 약반이 약간 인정됨.
- 2 : 처리된 잎의 소부분에서 약해가 인정됨
- 3 : 처리된 잎의 50퍼센터 정도 약해가 인정 됨
- 4 : 상당한 피해를 받고 있으나 아직 건전한 부분이 남아 있음
- 5 : 거의 심한 피해를 받고 고사된 상태임

(2) 담수어류(잉어, *Cyprinus carpio*)에 대한 급성독성

본 시험에 사용된 어종은 잉어로 수생 생태계의 유해성평가에 널리 사용되고 있고, 본 계통에 관한 비교할 수 있는 충분한 시험 기초자료가 축적되어 있으며, 농촌진흥청 및 OECD 가이드라인에서 추천된 종이다. 잉어는 20~24℃, 조명 16시간, 암 8시간, 제일사료(주)의 채색 관상어 사료를 이용하여 사육하였다. 사용수조는 시험어류의 단위체중 1g당 시험용수의 양이 1g/L가 넘도록 80L(30*60*45 cm)용량의 직육면체 수조를 사용하였다. 기초시험 결과 48시간 반수치사농도(LC50) 값이 2.000~10.000mg/L 범위 내에 있을 것으로 추정되어 2.000, 2.991, 4.472, 6.687, 10.000mg/L로 시험농도를 설정하였으며.각 농도수준 당 잉어 10마리를 노출시켰다. 대조군은 무처리한 시험 용수를 음성대조군으로 하여 시험군과 동일하게 10마리를 노출시켰다. 시험물질은 0.167, 0.249, 0.37g, 0.557, 0.833g을 정확하게 평량하여 20L의 시험용수에 직접 처리한 후 충분히 교반하여 2.000, 2.991, 4.472, 6.687, 10.000mg/L의 시험 용액을 제조하였다. 시험생물 투입 후 3시간 및 6시간 그리고 24시간 간격으로 96시간까지 관찰을 실시하였다. 관찰 시 형태이상, 유영이상, 출혈 등의 중독증상과 치사 개체수를 관찰하였고, 치사어의 판정은 시험생물을 유리막대로 건드렸을 때 움직임이 없거나 아가미 호흡이 중단된 경우 치사로 판정하였다.

(3) 랫드에 대한 개발제제의 급성경구 독성

본 시험동물인 Rat는 한림실험동물연구소에서 구입하여 사용하였다. 사육환경은 온도 23±2℃, 상대습도 50±10%, 환기시설, 조명시간 12시간 및 조도 200~300Lux의 실험실

조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다. 시험용액은 1 단계 시험약제 조제 시 용매는 증류수를 사용하였으며, 시험물질 2.0g을 정확히 평량하여 5 mL의 volumetric flask에 넣고 2차 증류수를 가하여 표선까지 정용한 후 vortex로 충분히 현탁하여 시험용액으로 사용하였다. 2, 3단계 시험약제조제시 용매는 증류수를 사용하였으며, 시험물질 0.3g을 정확히 평량하여 5 mL의 volumetric flask에 넣고 2차 증류수를 가하여 표선까지 정용한 후 vortex로 충분히 현탁하여 시험용액으로 사용하였다.

투여량은 투여약량수준별 공히 5.0mL/kg bw으로 설정하였다. 시험물질 투여개시 하룻밤 전부터, 시험물질 투여 후 3시간 동안은 먹이를 주지 않았고, 랫드 경구 투여용 존데 (Sonde)를 이용하여 투여 전 체중 측정치를 기준으로 소정의 시험물질 투여약량을 산출한 후, 경구투여 경로로 위내에 1회에 한하여 강제 투여하였다. 처리 당일은 처리 후 30분, 1 시간에서 4시간까지 매 시간마다 일반 중독증상 및 치사수를 관찰하였으며, 익일부터는 매일 1회씩, 투여 개시 후 14일 까지 관찰 및 조사하였다.

급성경구독성시험(급성독성등급법)에 의해 시험을 실시하여 GHS(Globaally Harmonized Classification System) 분류기준에 의거 LD50 기준치(mg/kg bw)로 반수치사약량을 산출하였다.

Classification criteria						
Class ^{a)}	LD ₅₀ (mg/kg bw)				GHS ^{b)}	LD ₅₀ (mg/kg bw) Acute Oral
	Acute Oral		Acute Dermal			
	Solids	Liquids	Solids	Liquids		
I (Extremely)	< 5	< 20	< 10	<40	I	≤ 5
II (Highly)	≥5, <50	≥20, <200	≥10, <100	≥40, <400	II	≤ 50
III (Moderately)	≥50, <500	≥200, <2,000	≥100, <1,000	≥400, <4,000	III	≤ 300
IV (Slightly)	≥500	≥2,000	≥1,000	≥4,000	IV	≤2,000
					V	≤5,000

a) Classification systems of Acute toxicity for pesticides in Korea

b) Globally Harmonized Classification System

(4) 랫드에 대한 개발제제의 급성경피 독성

본 시험동물인 Rat는 ㈜코아텍에서 구입하여 사용하였다. 사육환경은 온도 23±2℃, 상대 습도 50±10%, 환기시설, 조명시간 12시간 및 조도 200~300Lux의 실험실조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다. 시험농도는 기초 및 예비시험 결과 반수치사농도(LD50)값이 300~4000 mg/kg bw 범위 내에 있을 것으로 추정되어 시험 약량 수준을 300, 573, 1095, 2093, 4000mg/kg bw(공비 1.91)로 설정하여 시험을 실시하였다. 시험 동물 수는 암수 각각 5마리씩 10마리를 1군으로 하였으며, 개체식별은 피크린산 용액을 이용하여 피모색소 표시를 하고, 사육상자는 군 식별정보를 부착하여 식별하

였다. 시험약제 조제 시 용매는 증류수를 사용하였으며, 시험물질 1.20, 2.29, 4.38, 8.37, 16.00 g을 정확히 평량하여 20mL의 volumetric flask에 넣고 2차 증류수를 가하여 20mL의 표시선까지 용한 후 vortex로 충분히 현탁하여 시험 용액으로 사용하였다. 투여액량은 투여약량수준별 공히 5 mL/kg bw로 설정하였다. 시험동물은 시험물질처리 하루 전에 흉복 배부에 제모기를 이용하여 5×6 cm 이상 크기 넓이로 제모하고, 4×5 cm 크기 면적의 거즈에 조제된 시험용액을 체중 측정치를 기준으로 소정 액량을 산출한 후 균일하게 묻힌다음 제모된 부위에 Coban(self-adherentwrap, 3m 사)으로 고정/유지시켰다. 처리 당일은 처리 후 30분, 1시간에서 4시간까지 매시간 일반중독증상 및 치사수를 관찰하였으며, 익일부터는 매일 1회씩, 투여 개시 후 14일까지 관찰 및 조사하였다. 시험된 모든 동물에 대하여 시험물질 투여 직전에 체중을 측정하였고, 생존한 동물에 한하여 투여 후 3일, 7일 관찰종료일인 14일 째 개체별 체중을 측정하였다.

(5) 토끼(New Zealand White계)에 대한 개발제제의 피부자극성시험

본 실험동물인 토끼는 (주)코아텍에서 구매하여 사용하였다. 동물을 구입한 후 8일 동안 동물실험실의 환경 하에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰하여 건강한 개체만을 시험에 이용하였다. 군 분리 시 제모를 실시하여 피부에 이상이 없는 동물만 선택을 하였다. 사육환경은 온도 23±2℃, 상대습도 50 ± 10%, 환기시설 조명시간 12시간 및 조도 200~300 Lux의 실험실조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다. 실험동물은 건강하고 성숙한 동물 3마리를 사용하여 1군으로 구성하였고, 시험물질이 액상이라 조제하지 않고 제품 자체를 직접 처리하였다. 투여량은 투여 군별 공히 0.5mL로 설정하였다. 투여방법은 실험동물은 시험물질 투여 24시간 전에 전기 면도기를 이용하여 경배부(등부위)의 털을 15×15 cm 넓이로 제모한 다음 건강하고 깨끗한 피부를 가진 동물만을 사용하였다. 2×3 cm로 절개한 거즈를 이용하여 0.5 mL의 시험물질을 처리부위에 도포한 후 시험물질의 유실 및 방출을 방지하기위해 비자극성테이프와 Coban으로 고정 유지시켜 시험물질이 경구 및 안점막 등 타 경로로 유입되지 않게 처리하였다. 대조부위는 증류수로 처리하여 처리부위와 증상관찰 비교 용도로 활용하였다.

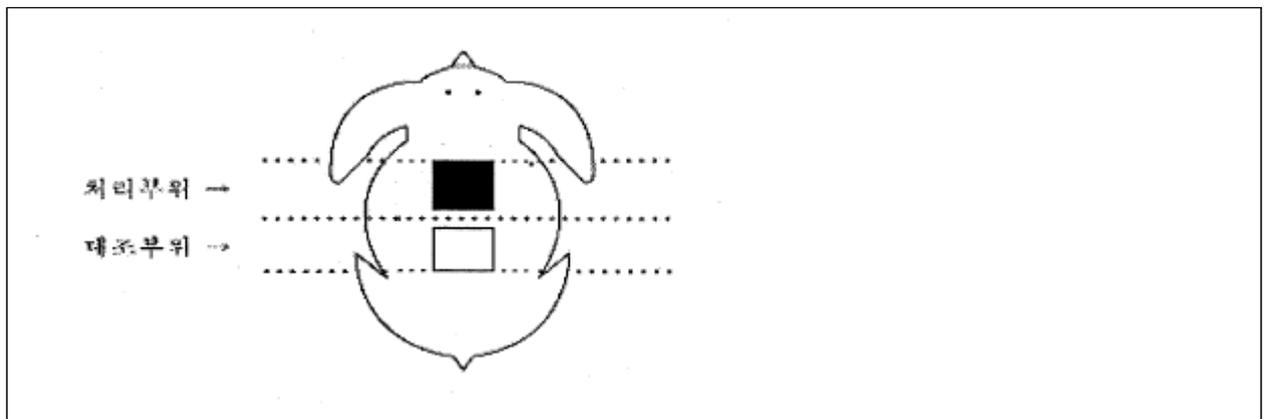


그림 2-1. 피부자극성시험 부위별 투여방법

시험물질 처리 4기간 후 패치를 제거하고 피부에 묻은 잔여물질은 증류수로 세척하여 모두 제거 한 후 의료용 탈지면으로 물기를 흡수시킨 다음 케이지에 넣어 두었다. 시험물질 적용

후 72시간까지 일반증상의 변화, 중독증상 및 치사동물의 유, 무를 관찰하였고, 시험물질 적용직전과 적용 후 48, 72시간에 개체별 체중을 측정하였다. 시험물질 도포 종류 후 1, 24, 48 및 72시간에 홍반, 부종 및 가피형성 유, 무를 관찰하였다. 피부반응의 평가는 [피부반응 평가표]에 준하여 실시하였고, 결과에 대한 자극성의 정도 판정은 [피부 1차 자극표]를 적용하였다.

(6) 토끼(New Zealand White계)에 대한 개발제제의 안점막자극성시험

본 실험동물인 토끼는 (주)코아텍에서 구매하여 사용하였다. 동물을 구입한 후 8일 동안 동물실험실의 환경하에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰하여 건강한 개체만을 시험에 이용하였다. 시험동물은 시험물질 투여 24시간 전에 양쪽 눈을 검사하여 눈에 이상이 없는 동물을 사용하였다. 사육환경은 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기시설 조명시간 12시간 및 조도 200~300 Lux의 실험실조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다. 시험물질이 액상이라 조제하지 않고 제품 자체를 직접 처리하였다. 투여량은 투여 군별 공히 0.1mL로 설정하였다. 투여방법은 시험동물 시험개시 전 24시간 이내에 양쪽 눈을 검사하여 눈에 이상이 없는 동물을 사용하였다. 약제처리는 좌안의 하안검을 가볍게 잡아당겨 결막낭 내에 액상인 시험물질 0.1mL를 한 번에 넣어 처리하고 시험물질의 손실을 막기 위해 양안검을 느슨하게 맞춰 잡고 약 1초간 유지하였다. 무처리한 우안은 대조부위로 하여 처리부위와 증상관찰 비교 용도로 활용하였다. 비세척군은 시험물질 처리 후 세척을 실시하지 않았고, 세척군은 시험물질 처리 후 2분 뒤 물로 세척하였다. 비세척군은 시험물질 적용 후 7일까지 일반증상의 변화, 중독증상 및 치사동물의 유, 무를 관찰하였고, 세척군은 시험물질 적용 후 72시간 까지 관찰하였다. 시험물질 적용직전과 적용 후 48, 72시간에 개체별 체중을 측정하였다. 안 반응의 평가는 “안반응 평가표”에 따라 실시하였다. 시험물질 처리 후 1, 24, 48시간 및 72시간에 각막혼탁, 홍채이상, 결막발적, 부종, 배출물 등 평점을 기록하였다. 비세척군에서는 72시간 후에도 안점막 자극이 지속되어 자극의 가역성 또는 비가역성을 판별하기 위하여 7일까지 관찰하였다. 안반응 평가표에 의해 개체별 안자극 지수(I.O.I., Individual ocular irritation) 및 평균 안자극 지수(M.O.I., mean ocular irritation)를 산출하여 평균안자극 지수 중 최고치를 급성안자극 지수(A.O.I., acute ocular irritation)로 하였다. 이 결과로 안점막자극표를 이용하여 자극성의 정도를 평가하였다.

(7) 꿀벌 (Apis mellifera)에 대한 개발제제의 급성접촉독성

본 시험에 사용된 Apis mellifera는 생태환경독성 시험생물로 널리 사용되고 있고, 본 계통에 관한 비교할 수 있는 충분한 시험기초자료가 축적되어 있으며, OECD 가이드라인에서 추천된 종이기 때문에 선정을 하였다. 당 연구소의 기존 생물군으로부터 자연 분봉된 꿀벌 세력을 2014년 7월 28일 입수하여 꿀벌 야외 사육소에서 시험 전까지 순화 및 자연 사육하였다. 한 벌통에서 생산된 건강하고 활동성이 좋은 일벌 중 어린 개체를 제외한 후 한 케이지 당 10마리씩 벌을 넣어 25°C 이상의 암조건에서 회복시킨 다음 시험에 사용하였다. 스테인리스 철망을 이용하여 길이 15 cm, 직경 5 cm 크기의 원통형으로 만들어진 시험용 케이지에 입구를 유리급식관(직경 1cm, 길이 5 cm정도)을 끼울 수 있도록 구멍을 뚫은 스펀

지 마개로 막았다. 야외사육벌통에서 채집한 꿀벌을 환기구멍에 있는 밀폐통에 넣어 CO₂ gas를 이용하여 마취하였다. 시험약량은 예비시험을 바탕으로 선정하였다. 본 시험 약량은 공비 1.97로 하여 주원료 투입비율 기준 1.000, 1.968, 7.622 및 15.000 ug/bee의 5단계로 설정하였으며, 각 약량수준 당 10마리씩 3반복으로 수행하였다. 시험물질 1.25g을 10 mL volumetric flask에 넣고 methanol을 표선까지 채운 후 vortex mixer를 이용하여 충분히 용해시켜 주원료 투입비율 기준 100.0ug/uL의 농축시험용액을 조제하였다. 이와 같이 조제한 농축시험용액을 10 mL volumetric flask에 각각 0.100, 0.197, 0.387, 0.762, 및 1.500 mL씩 처리하고, methanol을 가하여 10 mL 표선까지 정용한 후 충분히 용해시켜 1.000, 1.968, 3.873, 7.622 및 15.000 ug/uL의 시험용액을 조제하였다. 케이지 안에 10 마리씩 수용된 꿀벌들을 비이커에 넣고 Co₂ gas로 마취시킨 후 여과지 위에 올려놓고, micro applicator를 사용하여 조제된 시험용액을 마취된 꿀벌의 흉부에 각 1uL 씩 처리하여 노출하였다. 모든 케이지에 대하여 처리 후 4시간, 24시간 및 48시간째에 관찰하였다. 꿀벌의 중독증상관찰은 일반중독증상, 특이증상 및 치사개체를 관찰하였다. 치사개체의 판정은 육안으로 관찰하여 움직임이 없고 주사침을 이용하여 건드렸을 때 더듬이, 다리, 몸통의 움직임이 중단된 경우 치사로 판정하였다. 시험물질 및 양성대조군시험물질(Dimethoate 99.6% tech.)처리 후 24시간 및 48시간일 때의 LD50 값 및 95% 신뢰한계는 Probit method(Minitab ver14, USA)통계프로그램을 사용하여 계산하였다.

나. 결과

(1) 약해 test

약해 조사 결과는 표 2-1와 그림 2-2에 나타내었다. 본 결과를 보면, 개발제제는 고추, 토마토, 벼, 딸기, 오이 등의 작물에 대한 약해는 전혀 없는 것으로 나타났다.

표 2-1. 개발제제의 약해 조사 결과

시험약제	시험작물	약해정도(0~5)		약해증상
		기준량	배량	
개발제제	고추	0	0	없음
	토마토	0	0	없음
	벼	0	0	없음
	딸기	0	0	없음
	오이	0	0	없음

작물명	무처리	기준량	배량
고추			
토마토			
벼			
딸기			
오이			

그림 2-2. 개발제제의 작물별 약해 test

(2) 담수어류(잉어, *Cyprinus carpio*)에 대한 급성독성

개발제제의 담수어류에 대한 급성적 영향을 평가하고, 반수치사농도(LC₅₀)를 산출하기 위해 잉어를 이용하여 급성독성시험을 96시간 동안 지수식으로 실시하였다.

시험용액 중 시험물의 농도는 주원료 투입비율을 기준으로 10.0mg/L 및 음성대조군으로 구분하였으며, 결과는 표 2-2에 나타내었다.

표 2-2. 개발제제의 담수어류에 대한 급성독성		
Test substance	LC ₅₀ (mg/L)	
	48 hr	96 hr
Control	NA ^b	NA
PCP-Na salt ^a (14-KET-PC004)	0.104 ^c	0.104
개발제제	2.865 ^d	2.865

a: Duration of reference substance test : 2014.06.14. - 2014.06.20
 b: Not applicable
 c: Active ingredient
 d: Main base material input ratio

해당 시험 조건하에서, 개발제제의 잉어에 대한 48시간 및 96시간 반수치사농도(LC₅₀)는 모두 2.865mg/L로 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 III급으로 분류되었다.

(3) 랫드에 대한 개발제제의 급성경구 독성

개발제제를 경구 투여한 결과, 1단계 및 2단계 시험 투여약량 2000 mg/kg bw에서 일반 중독증상을 보이거나 치사한 개체가 관찰되지 않았다. 1단계 및 2단계 시험군의 모든 시험 동물은 시험 종료 시 까지 시간이 경과함에 따라 체중이 증가하였다.

표 2-3. Mortality and clinical signs						
Group	Dose(mg/kg bw)	Sex	Number of animals	Clinical signs	Mortality (dead/total)	LD ₅₀
1	2000	Female	3	No abnormality detected	0/3 ^a	> 2000~≥5000 mg/kg bw
2	2000	Female	3	No abnormality detected	0/3	

a: Number of dead animals / Number of animals

표 2-4. Mean body weights

Group	Dose(mg/kg bw)	Sex	Number of animals	Days after administration (g)		
				0	7	14
1	2000	Female	3	169.0±4.9 ^a	214.0±8.2	236.7±24.0
2	2000	Female	3	186.2±8.3	216.5±6.5	237.7±8.8

a: Mean ± standard deviation

(4) 랫드에 대한 개발제제의 급성경피 독성

개발제제를 본시험 투여약량 4000 mg/kg bw로 경피 노출한 결과, 모든 시험동물에게서 특이한 일반중독 증상은 관찰되지 않았으며, 치사개체도 관찰되지 않았다. 모든 시험동물의 체중은 약제투여 후 경과 일에 따라 증가추세를 보였다. 랫드에 대한 개발제제의 급성경피독성시험 결과, LD₅₀ 값은 4000 mg/kg bw 이상으로서 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 IV급(저독성)에 해당되었다.

- 급성독성정도에 따른 농약 등의 구분

구 분	시험동물의 반수를 죽일 수 있는 양 (mg/kg 체중)	
	급성경피	
	고 체	액 체
I 급 (맹독성)	10 미만	40 미만
II 급 (고독성)	10 이상 100 미만	40 이상 400 미만
III 급 (보통독성)	100 이상 1000 미만	400 이상 4000 미만
IV 급 (저독성)	1000 이상	4000 이상

※ 고체 및 액체의 분류는 농약 등의 물리적 상태에 의함.

표 2-5. Mortality and clinical signs

Group	Dose(mg/kg bw)	Sex	Number of animals	Clinical signs	Mortality (dead/total)	LD ₅₀
1	4000	Male	5	No abnormality detected	0% (0/5 ^a)	> 4000 mg/kg bw
2	4000	Female	5	No abnormality detected	0% (0/5)	

a: Number of dead animals / Number of animals

표 2-6. Mean body weights

Group	Dose(mg/kg bw)	Sex	Number of animals	Clinical signs	Days after administration (g)		
					0	7	14
1	4000	Male	5	No abnormality detected	292.9±5.7a	326.0±3.8	374.6±8.6
2	4000	Female	5	No abnormality detected	196.1±12.3	219.3±5.9	245.1±7.1

a: Mean ± standard deviation

(5) 토끼(New Zealand White계)에 대한 개발제제의 피부자극성시험

모든 시험동물에 있어서 어떠한 일반증상도 관찰되지 않았으며, 치사 동물 또한 발견되지 않았다. 시험물질 적용직전, 적용 후 48시간과 72시간에 개체별 체중을 측정 한 결과, 시험경과 일수에 따라 증가하였으며 시험물질로 기인한 특이한 체중변화는 없었다. 시험물질 노출 종료 후 1, 24, 48 및 72 시간에 피부반응평가표를 기준으로 피부반응을 관찰한 결과, 시험물질 처리 후 홍반 및 부종 등의 어떠한 피부반응도 관찰되지 않았다.

피부반응평가표에 의해 평가된 피부자극정도를 적용하여 1차 피부자극지수를 산출한 결과, P,I,I는 “0.0” 이었고, 피부 1차 자극자료에 의해 자극성을 구분하면 “없음” 으로 나타났다.

이상의 결과로부터 개발제제는 New Zealand White계 토끼의 피부에 처리 시 자극성이 없는 물질로 구분되었다.

- 피부 1차 자극표

자극성 구분	기 준
없 음	1차 피부자극지수 (P.II)가 1.0 이하
경 도	1차 피부자극지수 (P.II)가 1.1 ~ 2.0
중 도	1차 피부자극지수 (P.II)가 2.1 ~ 5.0
강 도	1차 피부자극지수 (P.II)가 5.1 이상

- 피부반응 평가표

(1) 홍반과 가피형성	
홍반이 전혀 없음	0
아주 가벼운 홍반 (육안으로 겨우 식별할 정도)	1
분명한 홍반	2
약간 심한 홍반	3
심한 홍반 (홍당무 색의 발적)과 가벼운 정도의 가피형성	4
총 가능한 홍반 점수	4
(2) 부종형성	
부종이 전혀 없음	0
아주 가벼운 부종 (육안으로 겨우 식별할 정도)	1
가벼운 부종 (뚜렷하게 부어 올라서 변연부가 분명히 구별될 경우)	2
보통의 부종 (약 1 mm 정도 부어 올랐을 경우)	3
심한 부종 (1 mm 이상 부어오르고 노출부위 밖까지 확장된 상태)	4
총 가능한 부종 점수	4

표 2-7. Evaluation of skin irritation(1/2)

Phases ^a	Animal No.	Sites	Days after application			
			0	1	2	3
Erythema & Eschar	1	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0
	2	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0
	3	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0
Edema	1	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0
	2	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0
	3	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0

a) Time after topical application

표 2-8. Evaluation of skin irritation(2/2)

Sites	Control sites				Test sites			
Change	Erythema & Eschar		Edema		Erythema & Eschar		Edema	
Phases	24 hrs	72 hrs	24 hrs	72 hrs	24 hrs	72 hrs	24 hrs	72 hrs
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Sum ^{a)}	0.0				0.0			
P.I.I. ^{b)}	0.0				0.0			
a: Time after topical treatment b: Sum of means at 24 and 72 hr c: P.I.I.(Primary Irritation Index) = Total/2								

(6) 토끼(New Zealand White계)에 대한 개발제제의 안점막자극성시험

모든 시험동물에 있어서 어떠한 일반증상도 관찰되지 않았으며, 치사동물 또한 발견되지 않았다. 체중측정 결과 모든 동물에서 정상적인 체중증가가 관찰되었다.

안반응평가

[비세척군]

비세척군-1

- 1시간째부터 72시간까지, 결막의 발적 및 부종에 대한 자극성과 배출물이 관찰되지 않았다.

비세척군-2

- 1시간째 관찰 시, 결막의 발적 및 부종에 대한 자극증상이 관찰되었다.
- 24시간째 관찰시, 결막의 발적에 대한 자극증상은 회복되었으나, 결막의 부종에 대한 자극증상이 48시간째까지 관찰되었다.
- 72시간째 관찰시, 모든 반응이 소실되어 정상으로 회복되었다.

비세척군-3

- 1시간째부터 24시간까지, 결막의 발적에 대한 자극증상이 관찰되었다.
- 48시간째 관찰 시, 모든 반응이 소실되어 정상으로 회복되었다.

위 결과를 바탕으로 안반응 평가표에 의해 평가된 안점막자극정도를 적용하여 급성안자극 지수(A.O.I)를 산출한 결과, A.O.I는 "2.0"이었다. 이상의 시험결과, New Zealand White계 토끼에 대한 개발제제의 안점막자극성은 “없음”으로 구분되었다.

- 안반응 평가표

1) 각막		
(A) 혼탁 : 안구의 농후한 정도(가장 농후한 지점을 관찰함)		평점
• 화농이나 혼탁이 없음	0	0
• 혼탁이 분산 혹은 밀집되어 있으나(정상적인 투명성이 약간 둔화 된 것과는 다름)홍채의 말단이 명확히 관찰됨	1	1
• 반투명한 부분이 쉽게 관찰됨, 홍채의 말단이 약간 불명확함	2	2
• 진주색깔을 나타냄, 홍채의 말단이 관찰안됨, 동공의 크기가 가까스로 관측됨	3	3
• 각막이 불투명, 혼탁 때문에 홍채가 관찰안됨	4	4
 (B) 혼탁된 각막의 범위		
• 1/4이하(그러나 0은 아니다)	1	1
• 1/4이상 1/2미만	2	2
• 1/2이상 3/4미만	3	3
• 3/4이상 1까지	4	4
A×B×5		최대치 = 80
2) 홍채		
(C) 반응치		
• 정상.....	0	0

- 안점막자극표

자극성 구분	기 준
없 음	급성안자극지수 (A.O.I)가 10.0 이하
경 도	급성안자극지수 (A.O.I)가 10.1 ~ 30.0
중 도	급성안자극지수 (A.O.I)가 30.1 ~ 60.0
강 도	급성안자극지수 (A.O.I)가 60.1 이상

표 2-9 . Mortality and clinical signs

Group	Animal No	Days after application				Mortality (%)
		0	1	2	3	
No eye washed	1	NOR ^{a)}	NOR	NOR	NOR	0/3 ^{b)}
	2	NOR	NOR	NOR	NOR	
	3	NOR	NOR	NOR	NOR	

a: Normal

b: Number of dead animals/ Number of tested animals

표 2-11. No eye washed evaluation of eye irritation

Time	Animal No	Cornea		Iris (C)	Conjunctive			I.O.I ^{a)}	M.O.I ^{b)}
		Degree of opacity (A)	Diffuse areas of opacity (B)		Redness(D)	Edema (E)	Lacrima(F)		
1 hr	1	0	0	0	0	0	0	2.0	
	2	0	0	0	1	1	0		
	3	0	0	0	1	0	0		
24 hr	1	0	0	0	0	0	0	1.3	
	2	0	0	0	0	1	0		
	3	0	0	0	1	0	0		
48 hr	1	0	0	0	0	0	0	0.7	
	2	0	0	0	0	1	0		
	3	0	0	0	0	0	0		
72 hr	1	0	0	0	0	0	0	0.0	
	2	0	0	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0	0	0		

a) I.O.I = (Individual Ocular Irritation) = (A×B×5)+(C×5)+(D+E+F)×2

b) M.O.I = (Mean Ocular Irritation)

(7) 꿀벌 (*Apis mellifera*)에 대한 개발제제의 급성접촉독성

(가) 누적치사 수 및 중독증상(표 7-10-14, 15)

시험물질 노출 후 48시간동안, 음성대조군과 용매대조군에서 치사 및 어떠한 중독증상도 관찰되지 않았다. 시험물질 처리군에서는 시험물질 노출 후 4시간차에 관찰된 치사 수는 최저약량으로부터 각각 0, 2, 1, 6, 9마리 였다. 48.206, 124.467 및 200.000 μ g/bee 약량에서 무기력한 증상을 보인 개체들이 각각 1, 2, 7마리 관찰되었다.

24시간차 관찰 시, 누적치사 수는 최저약량으로부터 각각 0, 2, 3, 8, 21마리이었고, 48시간차 관찰시, 누적치사 수는 각각 0, 2, 5, 8, 23마리이었다. 24시간과 48시간차의 생존개체 중 이상증상을 보인 개체는 관찰되지 않았다.

(나)LD50의 산출

개발제제의 꿀벌에 대한 24시간 LD50 값은 주원료 투입비율을 기준으로 11.160 ug/bee이었고, 48시간 LD 50값은 11.062 ug/bee이었다.

☞ 2-12. Cumulative mortality of honeybees

Dosage (ug/bee)	Number of honeybee	Cumulative mortality			Mortality(%)	
		4 hr	24 hr	48 hr	24 hr	48 hr
Negative control	10	0	0	0	0	0
	10	0	0	0		
	10	0	0	0		
Solvent control	10	0	0	0	0	0
	10	0	0	0		
	10	0	0	0		
30.000	10	0	0	0	0	0
	10	0	0	0		
	10	0	0	0		
48.206	10	0	0	0	6.7	6.7
	10	1	1	1		
	10	1	1	1		
77.460	10	1	2	3	10.0	16.7
	10	0	1	1		
	10	0	0	1		
124.467	10	1	2	2	26.7	26.7
	10	4	5	5		
	10	1	1	1		
200.000	10	2	7	8	70.0	76.7
	10	6	9	10		
	10	1	5	5		

☞ 2-13. Behavioural abnormalities of honeybees

Dosage (ug/bee)	Number of honeybee	Cumulative mortality		
		4 hr	24 hr	48 hr
Negative control	10	N	N	N
	10	N	N	N
	10	N	N	N
Solvent control	10	N	N	N
	10	N	N	N
	10	N	N	N
30.000	10	N	N	N
	10	N	N	N
	10	N	N	N
48.206	10	N	N	N
	10	N	N	N
	10	C(1 ^b)	N	N
77.460	10	N	N	N
	10	N	N	N
	10	N	N	N
124.467	10	C(1)	N	N
	10	C(1)	N	N
	10	N	N	N
200.000	10	C(4)	N	N
	10	C(1)	N	NA
	10	C(2)	N	N

a: Based on dosage of main ingredient input ratio

b: Number of intoxicated honeybees
 * Observation key
 N : Normal, A : Hyperactivity
 B : Mobile but not working or flying normally
 C : Alive but unable to walk or fly
 NA: Not applicable, not observed because of 100% mortality

표 2-14. LD₅₀ of test substance and dimethoate 99.6% tech

Test substance	24 hrs LD 50 (95% Confidence limits)	48 hrs LD 50 (95% Confidence limits)
Dimethoate 99.6% tech	0.147 ug a.i./bee (0.131~0.165 ug a.i./bee)	0.113 ug a.i./bee (0.101~0.129 ug a.i./bee)
개발제제	164.448 ug a.i./bee (145.879~190.321 ug a.i./bee)	154.771 ug a.i./bee (137.424~178.090 ug a.i./bee)

3. 가루이 방제를 위해 제품화된 공생균 추출물과 천연물 혼합제제(뉴참청)의 안전성 확인

가. 실험방법

(1) 약해test

개발제제(공생균 추출물+천연물 혼합제, 참가루)에 대한 약해 test는 고추(신와매워), 토마토(러브리256), 오이(호동청장), 배추(아시아봄), 상추(적치마)에 대하여 실시하였다. 와그너포트(1/5000a) 당 1주를 정식한 후 처리 방법은 개발제제의 정량, 배량으로 하여 처리하였으며, 시험구 배지는 완전임의 배치법으로 3Pot를 1반복으로 하여 3반복 수행하였다. 약해 조사 방법은 약제 처리 3, 5, 7일 후 외관상 나타나는 약해유무를 약해정도에 따라 0~5로 하여 달관조사하였다.

달관조사 기준(무처리와 기준량 및 배량 비교 시)

- 0 : 육안으로 약해가 인정되지 않음
- 1 : 아주 가벼운 약해로서 작은 약반이 약간 인정됨.
- 2 : 처리된 잎의 소부분에서 약해가 인정됨
- 3 : 처리된 잎의 50퍼센터 정도 약해가 인정 됨
- 4 : 상당한 피해를 받고 있으나 아직 건진한 부분이 남아 있음
- 5 : 거의 심한 피해를 받고 고사된 상태임

(2) 담수어류(잉어, *Cyprinus carpio*)에 대한 급성독성

본 시험에 사용된 어종은 잉어로 수생 생태계의 유해성평가에 널리 사용되고 있고, 본 계

통에 관한 비교할 수 있는 충분한 시험 기초자료가 축적되어 있으며, 농촌진흥청 및 OECD 가이드라인에서 추천된 종이다. 잉어는 20~24℃, 조명 16시간, 암 8시간, 제일사료(주)의 채색 관상어 사료를 이용하여 사육하였다. 사용수조는 시험어류의 단위체중 1g당 시험용수의 양이 1g/L가 넘도록 80L(30*60*45 cm)용량의 직육면체 수조를 사용하였다. 기초시험 결과 기초시험농도인 10.0mg/L에서 치사 개체가 관찰되지 않아 10.0mg/L 단일농도로 재시험을 실시하였으며, 잉어 10마리를 노출시켰다. 대조군은 무처리한 시험용수를 음성대조군으로 하여 시험군과 동일하게 10마리를 노출시켰다. 시험물질은 0.143g을 칭량하여 10L의 시험용수에 직접 처리한 후 충분히 교반하여 10.0mg/L의 시험용액을 제조하였다.

시험생물 투입 후 3시간 및 24시간 간격으로 96시간까지 관찰을 실시하였다. 관찰 시 형태이상, 유영이상, 출혈 등의 중독증상과 치사 개체수를 관찰하였고, 치사어의 판정은 시험생물을 유리막대로 건드렸을 때 움직임이 없거나 아가미 호흡이 중단된 경우 치사로 판정하였다.

(3) 랫드에 대한 개발제제의 급성경구 독성

본 시험동물인 Rat는 한림실험동물연구소에서 구입하여 사용하였다. 사육환경은 온도 23±2℃, 상대습도 50±10%, 환기시설, 조명시간 12시간 및 조도 200~300Lux의 실험실 조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다. 시험용액은 1단계 및 2단계 시험에서 투여직전 각각 동일하게 조제하였 시험에 사용하였고, 시험용액 조제 시 용매는 2차 증류수를 사용하였으며, 액상인 시험물질을 저울로 2.0g 정확히 평량하여 5mL의 volumetric flask에 넣고 2차 증류수를 표선까지 정용한 후 vortex로 충분히 현탁하여 시험용액으로 사용 하였다.

투여량은 투여약량수준별 공히 5.0mL/kg bw으로 설정하였다. 시험물질 투여개시 하룻밤 전부터, 시험물질 투여 후 3시간 동안은 먹이를 주지 않았고, 랫드 경구 투여용 존데(Sonde)를 이용하여 투여 전 체중 측정치를 기준으로 소정의 시험물질 투여약량을 산출한 후, 경구투여 경로로 위내에 1회에 한하여 강제 투여하였다. 처리 당일은 처리 후 30분, 1시간에서 4시간까지 매 시간마다 일반 중독증상 및 치사수를 관찰하였으며, 익일부터는 매일 1회씩, 투여 개시 후 14일 까지 관찰 및 조사하였다.

급성경구독성시험(급성독성등급법)에 의해 시험을 실시하여 GHS(Globaally Harmonized Classification System) 분류기준에 의거 LD50 기준치(mg/kg bw)로 반수치사약량을 산출 하였다.

(4) 랫드에 대한 개발제제의 급성경피 독성

본 시험동물인 Rat는 한림실험동물연구소에서 구입하여 사용하였다. 사육환경은 온도 23±2℃, 상대습도 50±10%, 환기시설, 조명시간 12시간 및 조도 200~300Lux의 실험실

Classification criteria						
Class ^{a)}	LD ₅₀ (mg/kg bw)				GHS ^{b)}	LD ₅₀ (mg/kg bw) Acute Oral
	Acute Oral		Acute Dermal			
	Solids	Liquids	Solids	Liquids		
I (Extremely)	< 5	< 20	< 10	< 40	I	≤ 5
II (Highly)	≥5, <50	≥20, <200	≥10, <100	≥40, <400	II	≤ 50
III (Moderately)	≥50, <500	≥200, <2,000	≥100, <1,000	≥400, <4,000	III	≤ 300
IV (Slightly)	≥500	≥2,000	≥1,000	≥4,000	IV	≤2,000
					V	≤5,000

a) Classification systems of Acute toxicity for pesticides in Korea

b) Globally Harmonized Classification System

조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다. 암수 모두 한 계투여약량인 4000mg/kg bw로 설정하여 시험을 실시하였다. 시험 동물 수는 암수 각각 5마리씩 10마리를 1군으로 하였으며, 개체식별은 피크린산 용액을 이용하여 피모색소 표시를 하고, 사육 상자는 군 식별정보를 부착하여 관리하였다. 시험약제 조제 시 용매는 증류수를 사용하였으며, 시험물질 16.00 g을 정확히 평량하여 20mL의 volumetric flask에 넣고 2차 증류수를 가하여 20mL의 표시선까지 용한 후 vortex로 충분히 현탁하여 시험 용액으로 사용하였다. 투여액량은 투여약량수준별 공히 5 mL/kg bw로 설정하였다. 시험동물은 시험물질처리 하루 전에 흉복배부에 제모기를 이용하여 5×6 cm 이상 크기 넓이로 제모하고, 4×5 cm 크기 면적의 거즈에 조제된 시험용액을 체중 측정치를 기준으로 소정 액량을 산출한 후 균일하게 묻힌다음 제모된 부위에 Coban(self-adherentwrap, 3m 사)으로 고정/유지시켰다. 등부위에 도포시킨 시험물질은 24시간 후 제거하고 피부에 묻은 잔여 물질은 증류수로 잘 닦고 의료용 탈지면으로 물기를 흡수시킨 다음 케이지에 넣어 두었다. 처리 당일 은 처리 후 30분, 1시간에서 4시간까지 매시간 일반중독증상 및 치사수를 관찰하였으며, 익일부터는 매일 1회씩, 투여 개시 후 14일까지 관찰 및 조사하였다. 시험된 모든 동물에 대하여 시험 물질 투여 직전에 체중을 측정하였고, 생존한 동물에 한하여 투여 후 3일, 7일 관찰종료일인 14일 째 개체별 체중을 측정하였다.

(5) 토끼(New Zealand White계)에 대한 개발제제의 피부자극성시험

본 실험동물인 토끼는 한림실험동물연구소에서 구매하여 사용하였다. 동물을 구입한 후 5일 동안 동물실험실의 환경 하에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰하여 건강한 개체만을 시험에 이용하였다. 군 분리 시 제모를 실시하여 피부에 이상이 없는 동물만 선택을 하였다. 사육환경은 온도 23±2℃, 상대습도 50 ± 10%, 환기시설 조명시간 12시간 및 조도 200~300 Lux의 실험실조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다. 실험동물은 건강하고 성숙한 동물 3마리를 사용하여 1군으로 구성하였고, 시험물질이 액상이라 처리부위에 직접 처리함으로 조제하지 않고 처리하였다. 투여량은 투여 군

별 공히 0.5mL로 설정하였다. 투여방법은 실험동물은 시험물질 투여 24시간 전에 전기 면도기를 이용하여 경배부(등부위)의 털을 15×15 cm 넓이로 제모한 다음 건강하고 깨끗한 피부를 가진 동물만을 사용하였다. 2×3 cm로 절개한 거즈를 이용하여 0.5 g의 시험물질을 처리부위에 도포한 후 시험물질의 유실 및 방출을 방지하기 위해 비자극성테이프와 Coban으로 고정 유지시켜 시험물질이 경구 및 안점막 등 타 경로로 유입되지 않게 처리하였다. 대조부위는 증류수로 처리하여 처리부위와 증상관찰 비교 용도로 활용하였다.

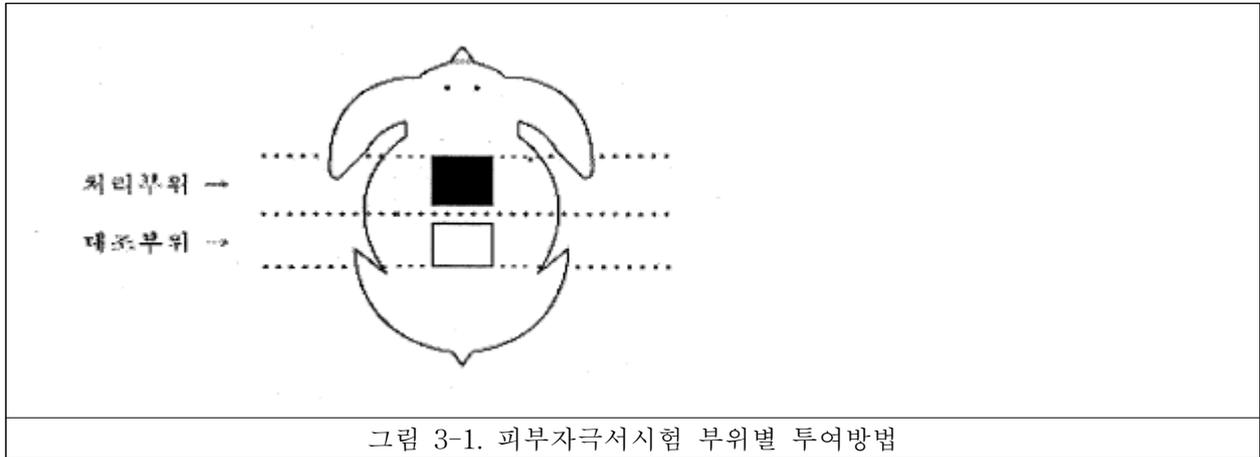


그림 3-1. 피부자극서시험 부위별 투여방법

시험물질 처리 4기간 후 패치를 제거하고 피부에 묻은 잔여물질은 증류수로 세척하여 모두 제거 한 후 의료용 탈지면으로 물기를 흡수시킨 다음 케이지에 넣어 두었다. 시험물질 적용 후 72시간까지 일반증상의 변화, 중독증상 및 치사동물의 유, 무를 관찰하였고, 시험물질 적용직전과 적용 후 48, 72시간에 개체별 체중을 측정하였다. 시험물질 도포 종류 후 1, 24, 48 및 72시간에 홍반, 부종 및 가피형성 유, 무를 관찰하였다. 피부반응의 평가는 [피부반응 평가표]에 준하여 실시하였고, 결과에 대한 자극성의 정도 판정은 [피부 1차 자극표]를 적용하였다.

(6) 토끼(New Zealand White계)에 대한 개발제제의 안점막자극성시험

본 실험동물인 토끼는 한림실험동물연구소에서 구매하여 사용하였다. 동물을 구입한 후 6일 동안 동물실험실의 환경하에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰하여 건강한 개체만을 시험에 이용하였다. 시험동물은 시험물질 투여 24시간 전에 양쪽 눈을 검사하여 눈에 이상이 없는 동물을 사용하였다. 사육환경은 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기시설 조명시간 12시간 및 조도 200~300 Lux의 실험실조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다. 시험물질이 액상이라 조제하지 않고 제품 자체를 직접 처리하였다. 투여량은 투여 군별 공히 0.1mL로 설정하였다. 투여방법은 시험동물 시험개시 전 24시간 이내에 양쪽 눈을 검사하여 눈에 이상이 없는 동물을 사용하였다. 약제처리는 좌안의 하안검을 가볍게 잡아당겨 결막낭 내에 액상인 시험물질 0.1mL를 한 번에 넣어 처리하고 시험물질의 손실을 막기 위해 양안검을 느슨하게 맞춰 잡고 약 1초간 유지하였다. 무처리한 우안은 대조부위로 하여 처리부위와 증상관찰 비교 용도로 활용하였다. 시험물질 처리 후 2분 뒤 물로 세척하였다. 비세척군은 시험물질 적용 후 7일까지 일반증상의 변화, 중독증상 및 치사동물의 유, 무를 관찰하였고, 세척군은 시험물질 적용 후 72시간 까지 관찰

하였다. 시험물질 적용직전과 적용 후 48, 72시간에 개체별 체중을 측정하였다. 안 반응의 평가는 “안반응 평가표”에 따라 실시하였다. 시험물질 처리 후 1, 24, 48시간 및 72시간에 각막혼탁, 홍채이상, 결막발적, 부종, 배출물 등 평점을 기록하였다. 안반응 평가표에 의해 개체별 안자극 지수(I.O.I., Individual ocular irritation) 및 평균 안자극 지수 (M.O.I., mean ocular irritation)를 산출하여 평균안자극 지수 중 최고치를 급성안자극 지수 (A.O.I., acute ocular irritation)로 하였다. 이 결과로 안점막자극표를 이용하여 자극성의 정도를 평가하였다.

(7) 꿀벌 (*Apis mellifera*)에 대한 개발제제의 급성접촉독성

본 시험에 사용된 *Apis mellifera*는 생태환경독성 시험생물로 널리 사용되고 있고, 본 계통에 관한 비교할 수 있는 충분한 시험기초자료가 축적되어 있으며, OECD 가이드라인에서 추천된 종이기 때문에 선정을 하였다. 당 연구소의 기존 생물군으로부터 자연 분봉된 꿀벌 세력을 2014년 7월 28일 입수하여 꿀벌 야외 사육소에서 시험 전까지 순화 및 자연 사육하였다. 스테인리스 철망을 이용하여 길이 15 cm, 직경 5 cm 크기의 원통형으로 만들어진 시험용 케이지에 입구를 유리급식관(직경 1cm, 길이 5 cm정도)을 끼울 수 있도록 구멍을 뚫은 스펀지 마개를 사용하였다. 환기구멍이 있는 밀폐통에 한 벌통에서 생산된 건강하고 활동성이 좋은 일벌을 채집하여 CO₂ gas를 이용하여 마취시킨 후 한 벌통에서 생산된 건강하고 활동성이 좋은 일벌 중 어린 개체를 제외한 후 한 케이지 당 10마리씩 벌을 넣어 25℃ 이상의 암조건에서 회복시킨 다음 시험에 사용하였다. 시험약량은 시험물질의 독성이 낮을 것으로 예상되어 한계시험으로 진행하였고, 주원료 투입비율 기준 100.000ug/bee로 설정하였다. 각 약량수준 당 10마리씩 3반복으로 수행하였다. 시험물질 1.429g을 10 mL volumetric flask에 넣고 methanol을 표선까지 채운 후 vortex mixer를 이용하여 충분히 용해시켜 주원료 투입비율 기준 100.0ug/uL의 농축시험용액을 조제하였다. 케이지 안에 10마리씩 수용된 꿀벌들을 비이커에 넣고 CO₂ gas로 마취시킨 후 여과지 위에 올려놓고, micro applicator를 사용하여 조제된 시험용액을 마취된 꿀벌의 흉부에 각 1uL 씩 처리하여 노출하였다. 시험한 모든 케이지에 대하여 처리 후 4시간, 24시간 및 48시간째에 관찰하였다. 꿀벌의 중독증상관찰은 일반중독증상, 특이증상 및 치사개체를 관찰하였다. 치사개체의 판정은 육안으로 관찰하여 움직임이 없고 주사침을 이용하여 건드렸을 때 더듬이, 다리, 몸통의 움직임이 중단된 경우 치사로 판정하였다. 시험결과, 한계시험에서 종료되어 통계프로그램을 이용한 반수치사약량 (LD50)은 산출하지 않았으며, 주원료 투입비율을 기준으로 한 시험약량 이상으로 결과를 표기하였다.

나. 결과

(1) 약해 test

약해 조사 결과는 표 3-1와 그림 3-2에 나타내었다. 본 결과를 보면, 개발제제는 고추, 배추, 상추, 오이, 토마토 등의 작물에 대한 약해는 전혀 없는 것으로 나타났다.

표 3-1. 개발제제의 약해 조사 결과

시험약제	시험작물	약해정도(0~5)		약해증상
		기준량	배량	
개발제제	고추	0	0	없음
	배추	0	0	없음
	상추	0	0	없음
	오이	0	0	없음
	토마토	0	0	없음

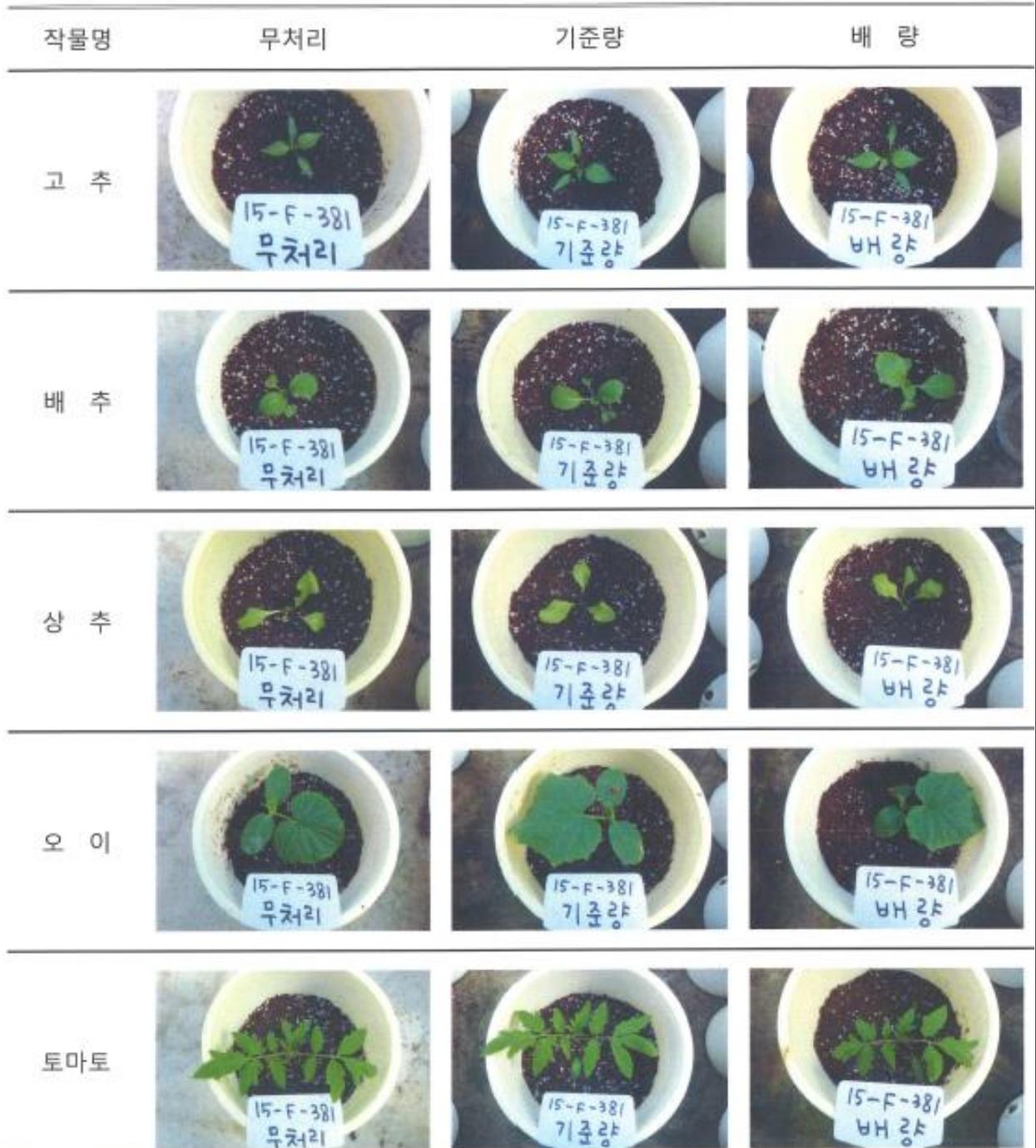


그림 3-2. 개발제제의 약해 Test

(2) 담수어류(잉어, *Cyprinus carpio*)에 대한 급성독성

개발제제의 담수어류에 대한 급성적 영향을 평가하고, 반수치사농도(LC₅₀)를 산출하기 위해 잉어를 이용하여 급성독성시험을 96시간 동안 지수식으로 실시하였다.

시험용액 중 시험물의 농도는 주원료 투입비율을 기준으로 10.0mg/L 및 음성대조군으로 구분하였으며, 결과는 표 3-2에 나타내었다.

표 3-2. 개발제제의 담수어류에 대한 급성독성

Time	LC ₅₀ ^a (mg/L)	95% confidence limits	NOEC ^b (mg/L)
48 & 96 hr	> 10.0	-	10.0

a: Median lethal concentration

b: No observed affect concentration

해당 시험 조건하에서, 개발제제의 잉어에 대한 48시간 및 96시간 반수치사농도(LC₅₀)는 모두 10.0mg/L로 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 III급으로 분류되었다.

(3) 랫드에 대한 개발제제의 급성경구 독성

개발제제를 경구 투여한 결과, 1단계 및 2단계 시험 투여약량 2000 mg/kg bw에서 일반 중독증상을 보이거나 치사한 개체가 관찰되지 않았다. 1단계 및 2단계 시험군의 모든 시험 동물은 시험 종료 시 까지 시간이 경과함에 따라 체중이 증가하였다.

표 3-3. Mortality and clinical signs

Group	Dose(mg/kg bw)	Sex	Number of animals	Clinical signs	Mortality (dead/total)	LD ₅₀
1	2000	Female	3	No abnormality detected	0/3 ^a	> 2000~≥5000 mg/kg bw
2	2000	Female	3	No abnormality detected	0/3	

a: Number of dead animals / Number of animals

표 3-4. Mean body weights

Group	Dose(mg/kg bw)	Sex	Number of animals	Days after administration (g)		
				0	7	14
1	2000	Female	3	192.7±9.6 ^a	214.0±9.6	240.8±12.2
2	2000	Female	3	194.5±9.3	218.5±5.9	242.2±4.3

a: Mean ± standard deviation

(4) 랫드에 대한 개발제제의 급성경피 독성

개발제제를 본시험 투여약량 4000 mg/kg bw로 경피 노출한 결과, 모든 시험동물에게서 특이한 일반중독 증상은 관찰되지 않았으며, 치사개체도 관찰되지 않았다. 모든 시험동물의 체중은 약제투여 후 경과 일에 따라 증가추세를 보였다. 랫드에 대한 개발제제의 급성경피독성시험 결과, LD₅₀ 값은 4000 mg/kg bw 이상으로서 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 IV급(저독성)에 해당되었다.

- 급성독성정도에 따른 농약 등의 구분

구 분	시험동물의 반수를 죽일 수 있는 양 (mg/kg 체중)	
	급성경피	
	고 체	액 체
I 급 (맹독성)	10 미만	40 미만
II 급 (고독성)	10 이상 100 미만	40 이상 400 미만
III 급 (보통독성)	100 이상 1000 미만	400 이상 4000 미만
IV 급 (저독성)	1000 이상	4000 이상

※ 고체 및 액체의 분류는 농약 등의 물리적 상태에 의함.

표 3-5. Mortality and clinical signs

Group	Dose(mg/kg bw)	Sex	Number of animals	Clinical signs	Mortality (dead/total)	LD ₅₀
1	4000	Male	5	No abnormality detected	0% (0/5) ^a	> 4000 mg/kg bw
2	4000	Female	5	No abnormality detected	0% (0/5)	

a: Number of dead animals / Number of animals

표 3-6. Mean body weights

Group	Dose(mg/kg bw)	Sex	Number of animals	Clinical signs	Days after administration (g)		
					0	7	14
1	4000	Male	5	No abnormality detected	268.0±2.2a	304.6±6.2	351.2±14.4
2	4000	Female	5	No abnormality detected	191.2±6.0	215.3±6.7	237.4±14.2

a: Mean ± standard deviation

(5) 토끼(New Zealand White계)에 대한 개발제제의 피부자극성시험

모든 시험동물에 있어서 어떠한 일반증상도 관찰되지 않았으며, 치사 동물 또한 발견되지 않았다. 시험물질 적용직전, 적용 후 48시간과 72시간에 개체별 체중을 측정 한 결과, 시험경과 일수에 따라 증가하였으며 시험물질로 기인한 특이한 체중변화는 없었다. 시험물질 노출 종료 후 1, 24, 48 및 72 시간에 피부반응평가표를 기준으로 피부반응을 관찰한 결과, 시험물질 처리 후 홍반 및 부종 등의 어떠한 피부반응도 관찰되지 않았다.

피부반응평가표에 의해 평가된 피부자극정도를 적용하여 1차 피부자극지수를 산출한 결과, P,I,I는 “0.0” 이었고, 피부 1차 자극자료에 의해 자극성을 구분하면 “없음” 으로 나타났다.

이상의 결과로부터 개발제제는 New Zealand White계 토끼의 피부에 처리 시 자극성이 없는 물질로 구분되었다.

- 피부 1차 자극표

자극성 구분	기 준
없 음	1차 피부자극지수 (P.I.I)가 1.0 이하
경 도	1차 피부자극지수 (P.I.I)가 1.1 ~ 2.0
중 도	1차 피부자극지수 (P.I.I)가 2.1 ~ 5.0
강 도	1차 피부자극지수 (P.I.I)가 5.1 이상

- 피부반응 평가표

(1) 홍반과 가피형성		
홍반이 전혀 없음		0
아주 가벼운 홍반 (육안으로 겨우 식별할 정도)		1
분명한 홍반		2
약간 심한 홍반		3
심한 홍반 (홍당무 색의 발적)과 가벼운 정도의 가피형성		4
총 가능한 홍반 점수		4
(2) 부종형성		
부종이 전혀 없음		0
아주 가벼운 부종 (육안으로 겨우 식별할 정도)		1
가벼운 부종 (뚜렷하게 부어 올라서 변연부가 분명히 구별될 경우)		2
보통의 부종 (약 1 mm 정도 부어 올랐을 경우)		3
심한 부종 (1 mm 이상 부어오르고 노출부위 밖까지 확장된 상태)		4
총 가능한 부종 점수		4

표 3-7. Evaluation of skin irritation(1/2)

Phases ^a	Animal No.	Sites	Days after application			
			0	1	2	3
Erythema & Eschar	1	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0
	2	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0
	3	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0
Edema	1	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0
	2	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0
	3	Control sites	0	0	0	0
		Test sites	0	0	0	0

a) Time after topical application

표 3-8. Evaluation of skin irritation(2/2)

Sites	Control sites				Test sites			
	Erythema & Eschar		Edema		Erythema & Eschar		Edema	
Change	24 hrs	72 hrs	24 hrs	72 hrs	24 hrs	72 hrs	24 hrs	72 hrs
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Sum ^{a)}	0.0				0.0			
P.I.I. ^{b)}	0.0				0.0			

a: Time after topical treatment

b: Sum of means at 24 and 72 hr

c: P.I.I.(Primary Irritation Index) = Total/2

(6) 토끼(New Zealand White계)에 대한 개발제제의 안점막자극성시험

모든 시험동물에 있어서 어떠한 일반증상도 관찰되지 않았으며, 치사동물 또한 발견되지 않았다. 체중측정 결과 모든 동물에서 정상적인 체중증가가 관찰되었다.

아래 결과를 바탕으로 안반응 평가표에 의해 평가된 안점막자극정도를 적용하여 급성안자극지수(A.O.I)를 산출한 결과, A.O.I는 "3.3"이었다. 이상의 시험결과, New Zealand White 계 토끼에 대한 개발제제의 안점막자극성은 “없음”으로 구분되었다.

- 안반응 평가표

1) 각막		
(A) 혼탁 : 안구의 농후한 정도(가장 농후한 지점을 관찰함)		평점
• 화농이나 혼탁이 없음	0	0
• 혼탁이 분산 혹은 밀집되어 있으나(정상적인 투명성이 약간 둔화 된 것과는 다름)홍채의 말단이 명확히 관찰됨	1	1
• 반투명한 부분이 쉽게 관찰됨, 홍채의 말단이 약간 불명확함	2	2
• 진주색깔을 나타냄, 홍채의 말단이 관찰안됨, 동공의 크기가 가까스로 관측됨 ...	3	3
• 각막이 불투명, 혼탁 때문에 홍채가 관찰안됨	4	4
(B) 혼탁된 각막의 범위		
• 1/4이하(그러나 0은 아니다)	1	1
• 1/4이상 1/2미만	2	2
• 1/2이상 3/4미만	3	3
• 3/4이상 1까지	4	4
A×B×5		최대치 = 80
2) 홍채		
(C) 반응치		
• 정상.....	0	0

표 3-10. Body weight changes

Group	Animal No	Days after application (g)			
		0	2	3	Gain
No eye washed	1	2139.0	2176.0	2228.0	89.0
	2	2210.0	2262.5	2317.0	107.0
	3	1968.0	2020.5	2078.0	110.0
	Mean	2105.7	2153.0	2207.7	102.0
	S.D ^a	124.4	122.6	120.8	-

표 3-11. No eye washed evaluation of eye irritation

Time	Animal No	Cornea		Iris (C)	Conjunctive			I.O.I ^{a)}	M.O.I ^{b)}
		Degree of opacity (A)	Diffuse areas of opacity (B)		Redness (D)	Edema (E)	Lacrima (F)		
1 hr	1	0	0	0	0	0	0	0.0	
	2	0	0	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0	0	0		
24 hr	1	0	0	0	0	0	0	0.0	
	2	0	0	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0	0	0		
48 hr	1	0	0	0	0	0	0	0.0	
	2	0	0	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0	0	0		
72 hr	1	0	0	0	0	0	0	0.0	
	2	0	0	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0	0	0		

a) I.O.I = (Individual Ocular Irritation) = (A×B×5)+(C×5)+(D+E+F)×2

b) M.O.I = (Mean Ocular Irritation)

표 3-9. Mortality and clinical signs

Group	Animal No	Days after application				Mortality (%)
		0	1	2	3	
No eye washed	1	NOR ^{a)}	NOR	NOR	NOR	0/3 ^{b)}
	2	NOR	NOR	NOR	NOR	
	3	NOR	NOR	NOR	NOR	

a: Normal

b: Number of dead animals/ Number of tested animals

(7) 꿀벌 (*Apis mellifera*)에 대한 개발제제의 급성접촉독성

시험물질 노출 후 48시간동안, 무처리군과 음성대조군에서 치사 및 중독증상도 관찰되지 않았다. 시험물질 처리군에서는 2마리의 치사 개체 및 보행장애, 무기력증상을 보인 개체들이 관찰 되었다.

☒ 3-12. Cumulative mortality of honeybees

Dosage (ug/bee)	Exposed honeybee	Cumulative mortality			Mortality(%)	
		4 hr	24 hr	48 hr	24 hr	48 hr
Non-treatment	10	0	0	0	0 (0/30)	0 (0/30)
	10	0	0	0		
	10	0	0	0		
Negative control (methanol 1 uL/bee)	10	0	0	0	0 (0/30)	0 (0/30)
	10	0	0	0		
	10	0	0	0		
100.000	10	0	0	0	0 (0/30)	0 (0/30)
	10	0	0	0		
	10	0	0	0		

☒ 3-13. Behavioural abnormalities of honeybees

Dosage (ug/bee) ^a	Exposed honeybee	Cumulative mortality		
		4 hr	24 hr	48 hr
Non-treatment	10	N(10 ^b)	N(10)	N(10)
	10	N(10)	N(10)	N(10)
	10	N(10)	N(10)	N(10)
Negative control (methanol 1 uL/bee)	10	N(10)	N(10)	N(10)
	10	N(10)	N(10)	N(10)
	10	N(10)	N(10)	N(10)
100.000	10	N(3),B(3),C(4)	B(6), C(4)	N(4), B(5), C(1)
	10	N(4), B(3), C(3)	B(5), C(5)	B(8)
	10	N(1), B(8), C(1)	B(7), C(3)	N(5), B(3), C(2)

a: Based on dosage of main ingredient input ratio

b: Number of honeybees

* Observation key

N : Normal,

A : Hyperactivity

B : Mobile but not working or flying normally

C : Alive but unable to walk or fly

NA: Not applicable, not observed because of 100% mortality

8장. 제7협동과제 (경북농업기술원)

1절. 가류이류 매개 바이러스병의 종합적 방제기술 개발

1. 서언

토마토황화잎말림바이러스(*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV)는 Geminiviridae과, Begomovirus 속이며 세계적으로 토마토재배지에서 피해를 초래하고 있다(Czosnek와 Laterrot, 1997). 국내에서는 2008년 5월 경상남도 통영지역 시설 재배 토마토에서 처음으로 발생이 확인되었다(Ji 등, 2008; Kwak 등, 2008). 이후 2010년 경남 통영 등 16개 시 군, 경북 10개, 충남 4개, 충북 2개, 전남 13개, 전북 11개, 제주도 2개 시 군 등 전국적으로 확산되었다(Kim 등, 2011). TYLCV 전염양식은 담배가루이가 직접 매개하며, 즙액, 종자 및 접촉 전염은 하지 않는다(Czosnek, 1999; Diener와 Raymer, 1971). 매개충인 담배가루이(*Bemisia tabaci*)의 성충과 약충이 체내 순환식 영속전염을 하나, 산란과정에서 차세대로의 전염은 되지 않는다(Cohen과 Nitzany, 1966). 일본의 경우 1996년에 큐슈 지역에서 처음 발생한 이후 2004년도 서남부 일대에 대발 생하여 큰 피해를 일으킨 사례가 있다(Shigenori 등, 2009).

담배가루이(*Bemisia tabaci* (Gennadius))는 노린재목 가루이과(Aleyrodidae)의 해충으로 열대 및 아열대 지방에서 약 600 여 종의 기주에 발생하는 주요 흡즙성 해충이다. 또한, 담배가루이는 시설재배지의 농작물에 피해를 심각하게 주는 해충으로 알려져 있다. 이 해충은 작물을 흡즙하여 가해할 때 바이러스를 매개하며 이차적인 피해를 주는데, 약 100종 이상의 바이러스를 매개한다. 또한 간접적인 피해인 감로에 의한 그을음병도 작물에 피해를 끼친다. 김과 김(2014)은 담배가루이는 기주작물과 농약 감수성 정도에 따라 다양한 생태형으로 분류되고 있다. 안동 참외밭 11곳에서 Q 생태형 담배가루이를 진단하였고, 이 가운데 4곳의 채집 장소에서 B 생태형도 검출되었다. 경북지역 참외재배지에서 담배가루이가 발생한다는 최초의 보고이며, 특히 두 생태형이 동일한 재배지에서 혼재한다는 것을 나타낸다.

매개충인 담배가루이의 성충과 약충이 체내 순환식 영속전염을 하나, 산란과정에서 차세대로의 전염은 되지 않는다(Cohen과 Nitzany, 1966). 일본의 경우 1966년에 큐슈지역에서 처음 발생한 이후 2004년도 서남부 일대에 대발생하여 큰 피해를 일으킨 사례가 있고(Shigenori 등, 2009), 우리나라에는 1998년 처음 발생한 이래, 최근 들어 급격히 확산되고 있다. 담배가루이는 고온기에 세대가 짧아지고, 발생횟수가 많아져 살충제에 대한 약제 저항성이 발달하여 방제가 잘되지 않으므로(Devine와 Denholm, 1998; Lee 등, 2012; Nauen 등, 2002) 방충망을 이용한 시설 내 유입차단 방법과 트랩식물을 이용한 방제법이 보고되었다(Choi 등, 2016; Chung 등, 2013). 김 등(2013)은 가지 담배가루이 친환경 방제기술을 개발하고자 난황유 등 8종의 천연물을 살포하여 님오일에서 가장 좋은 효과를 나타냈으나 성충과 약충 방제는 화학약제인 디노테퓨란 처리가 가장 우수하다고 하였으며 Lee 등(2013)은 님 오일이 방제가가 우수하였으나 경제적 측면에서 올레산을 이용하는 것이 가장 경제적이라고 하였다.

토마토황화잎말림바이러스(Tomato Yellow Leaf Curl Virus, TYLCV)는 Geminiviridae과 Begomovirus 속이며 세계적으로 토마토 재배지에서 가장 파괴적인 바이러스 병의 하나

이다(Czosnek와 Laterrot, 1997, Moriones와 Navas-Castillo, 2000, Kil 등, 2014). 국내에서는 경남 통영의 시설재배 토마토에서 처음 발생 되었다. 이후 2010년 경남, 경북, 충남, 충북, 전남, 전북, 제주도 등 전국적으로 확산되었다(김 등, 2011). TYLCV는 1960년대 중동에서 처음 발견되었으며 현재, 유럽, 아시아, 아프리카, 중앙아메리카, 호주 등 전 대륙에 확산되어 심각한 피해를 일으키고 있다(Aidawati 등., 2002; Duffy and Holmes, 2007; Maruthi et al., 2005; Tsai et al., 2011a, 2011b). TYLCV는 single-stranded DNA로 구성된 바이러스로, 1964년 이스라엘에서 처음 분리되었으며(Cohen and Harpaz, 1964), 분리지역, 병증차이 등에 따라 10여종의 계통이 보고되어 있다(Abhary 등, 2007; Fauquet 등, 2003). TYLCV에 의해 감염된 토마토는 황화, 잎말림 및 위축 등의 증상으로 토마토에 치명적인 병으로 100%의 손실률이 보고되기도 하였다(Moriones, 2000). TYLCV의 전염양식은 담배가루이가 직접 매개하며, 즙액, 종자 및 접촉 전염은 하지 않는다(Czosnek, 1999; Diener와 Raymer, 1971).

국내 토마토 품종별로 TYLCV 저항성 마커로 유전자 *Ty-1*과 *Ty-3* 분석 및 생물검정 결과 대추형은 티티찰, TY 티니, TY 생생 II, TY 센스큐 등 4종, 방울형은 TY 엔도르핀, TY 스마프사마, 티아라 TY,올레 TY 등 4종, 완속형은 TY 킹덤, TY 에이스, TY 홈런, TY 알토랑, 도테랑 TY 위너, 스틱스 TY 등 6종에서 저항성유전자를 확인하였다(Ko 등 2016).

본 연구에서는 토마토황화잎말림바이러스(TYLCV) 병징발현 및 기주범위 분석 하였으며 농가 현장에서 TYLCV 감염 및 발생에 따른 피해해석을 하였다. TYLCV를 방제하기 위하여 담배가루이 증식밀도 및 방제시기를 결정하였으며 TYLCV 종자전염 양상 및 품종별 종자전염 병징, 유전자 분석을 실시하였다. 또한, 담배가루이 방제를 위하여 화학약제와 친환경 자재 처리효과 및 식물체 유래추출물의 효과를 검정하여 의 효율적인 처리방법과 액실 슈가 및 넘제를 활용한 종합방제방법을 확립 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 토마토황화잎말림바이러스(*Tomato yellow leaf curl virus* : TYLCV) 병징 발현 및 기주범위 분석

(1) 바이러스 접종 및 병징확인 : 토마토 TYLCV 병징발현을 위하여 농가에서 재배중인 저항성 품종인 ‘박커스’와 ‘도테랑TY’, 감수성 품종인 ‘레전드썸머’와 ‘유니콘’을 이용하였다. TYLCV 접종은 형질전환체 *Agrobacterium* (GV3101)을 만든 다음(성균관 대학교 이석찬 교수 제공) 농도를 0.5×10^{10} cells/ml로 조절하여 침으로 상처 접종을 시행하였다. 바이러스의 접종은 TYLCV, TbLCV, HYVV, Beta 등 4개의 단독 바이러스 접종과 TYLCV+HYVV, TYLCV+TbLCV, TbLCV+HYVV, TYLCV+HYVMV beta, TbLCV+HYVMV beta, HYVV+HYVMV beta 등 6종의 복합 접종을 실시하였다. 식물에 대한 토마토황화잎말림바이러스 접종은 기존 연구에서 제작한 감염성 클론을 이용하여 수행하였다(Kil et al, 2014). 식물 발현용 벡터인 pCAMBIA 1303에 토마토황화잎말림바이러스 유전자가 1.7 mer 형태로 삽입이 된 플라스미드를 아그로박테리움 GV3101 분리주에 형질전환한 후, 이를 항생제 (50 μ g/mL 카나마이신, 50 μ g/mL 리팜피신, 10 μ g/mL 젠

타마이신)가 첨가된 LB 배지에 접종하여 28°C, 250 rpm으로 설정된 진탕배양기 내에서 24시간 배양하였다. 접종을 할 3주령 식물 줄기의 정단부를 곤충핀을 이용하여 10회 가량 반복하여 찢러준 후, 배양한 아그로박테리움 배양액 500 µL를 찢러준 부위에 일회용 스포이드를 이용하여 조심스럽게 떨어트리면서 20~30회 가량 추가로 반복해 찢러주어서 흡수가 잘 되도록 하였다. 바이러스 검정은 Poly chain reaction (PCR) 방법 및 외관상 나타나는 황화, 잎말림 등의 병징을 육안검정 하였다. PCR 조건은 특이 프라이머(표 1)을 제작하여 94°C/ 30초, 55°C/60초, 72°C/1분 조건으로 35회 반복 실시하였다.

나. 토마토황화잎말림바이러스 피해분석

(1) 토마토 품종별 바이러스 감염 시기에 따른 피해분석

토마토에 바이러스가 감염될 경우 생육과 수량변화를 분석하기 위하여 TYLCV 저항성 품종(박커스, 도태랑 TY)와 일반품종(토태랑 요꼬, 유니콘)을 공시품종으로 바이러스 감염시기를 조절하여 재배하였다. 감염은 토마토 유묘기, 정식 30일후, 정식 60일 후에 실시하였으며, 접종방법은 형질전환체 Agrobacterium (GV3101)을 만든 다음(성균관 대학교 이석찬 교수 제공) 농도를 0.5×10^{10} cells/ml로 조절하여 그림 1과 같이 침을 이용한 인공접종을 실시하였다. 각 시기별 바이러스를 접종한 다음 담배가루이에 의한 2차 감염을 막기 위하여 7일 간격으로 살충제를 살포 하였으며, 생육 및 바이러스 이병정도 조사는 정식 30일 후부터 90일 까지 조사하였다.

(2) 토마토 시설재배시 담배가루이 증식밀도 분석

시설토마토 재배시 바이러스병 매개충인 담배가루이 적정 방제시기를 결정하기 위하여 담배가루이 초기 밀도에 따른 증식율을 조사하였다. 시설하우스에 길이와 폭이 3×4, 높이 2m인 소형 하우스를 설치한 다음 담배가루이가 이동할 수 없는 방충망을 설치하였다. 토마토 품종은 시판중인 레전드 썸머(바이러스 감수성)와 박커스(바이러스 저항성) 2품종을 정식한 다음 담배가루이를 처리구당 10, 20, 40마리를 접종한 후 2일간격으로 담배가루이 밀도를 조사하였다. 조사방법은 황색유인트랩에 유인된 담배가루이를 조사하였다.

(3) 시설하우스내 담배가루이 조기 예찰방법

담배가루이의 조기 예찰을 위하여 시설하우스에 방충망으로 씌운 길이와 폭이 3×4, 높이 2m인 소형 하우스를 설치한 다음 토마토 정식 및 담배가루이를 10마리 투입하였다. 담배가루이의 증식을 위하여 토마토 정식 30일 후 황색점착트랩(20×30cm, 그린아그로텍)을 0.5, 1, 2m 높이에 설치하여 2일 간격으로 30일간 점착트랩에 유인되는 담배가루이 성충수를 조사하였다..

다. 토마토황화잎말림바이러스(TYLCV) 종자전염 및 증상발현 분석

(1) TYLCV 종자전염 검정

토마토황화잎말림바이러스(TYLCV)는 담배가루이에 의하여 총매전염으로 알려져 있으나 바이러스병 초기 발생이 종자전염에 의한 가능성이 제기되어 2013년 TYLCV 감염된 토마토(품종 : 레전드썸머)를 병징 및 PCR 검정으로 확인 한 다음 종자를 채종하였다. 채종된 종자는 2014년 4월 17일 1,000주를 파종한 다음 20일 간격으로 육안 및 PCR 검정으로 바이러스 감염 유무를 확인하였다. 담배가루이에 의한 2차 감염을 막기 위하여 묘종 관리는

망 재배 포장에서 실시하였으며 7일 간격으로 살충제를 살포하였다. 토마토 품종별 종자전염 검정은 레전드썸머, 박커스, 서광, 라피도TY, 머니메이커, 테프니스, 티티찰, 규티, 텐텐, 라이프TY, 도태랑 TY 11 품종을 공시하여 TYLCV를 인공접종한 다음 감염을 확인 한 다음 채종하여 종자감염 유무를 분석하였다. 종자전염 증상발현은 전형적인 병징의 육안검정과 PCR 검정으로 분석하였다.

(2) TYLCV 저항성 품종 증상발현 원인 및 토마토 품종에 따른 병징의 다양성 분석

저항성 관련 유전자의 이상으로 병징이 나타난 것인지 확인하기 위해 PCR로 TYLCV 저항성 유전자인 Ty-1 유전자를 증폭시킨 뒤 제한효소 TaqI을 처리하여 분석하였다. 토마토 품종에 따라 나타나는 TYLCV 병징의 다양성은 36가지의 다양한 토마토 유전자원 품종을 대상으로 TYLCV를 접종하고 어떤 증상이 나타나며, 그것이 바이러스의 양과 상관관계를 분석하였다.

라. 담배가루이 방제

(1) 육묘장 재배 토마토 묘종 TYLCV 조사 및 담배가루이(TYLCV 보독충) 밀도에 따른 병징발현

TYLCV 초기 전염원을 조사하기 위하여 경북지역 토마토 묘종 공급 육묘장 2곳에 대하여 샘플 100점을 채취하여 바이러스 감염유무를 검정하였다. 담배가루이(TYLCV 보독충) 밀도에 따른 바이러스 병징발현은 레전드 썸머(이병성 품종)를 이용하여 담배가루이 초기밀도를 1, 2, 5마리/주로 조절한 다음 토마토 정식 2일 후에 담배가루이를 투입하였다. 토마토 재배는 방충망으로 씌운 길이와 폭이 3×4, 높이 2m인 소형 하우스에서 실시하였으며 담배가루이 투입 후 5일 간격으로 바이러스 발생주율을 육안조사 및 PCR 검정을 실시하였다.

(2) 담배가루이 방제

시설재배 토마토 포장에서 담배가루이 월동은 2014년 1월 10일 부터 2월 15일 까지 노지, 시설하우스, 시설2중 하우스(지상부, 지하부)에 담배가루이 및 담배가루이 및 기주식물체를 방치한 다음 토마토를 정식하여 담배가루이 발생상황을 조사하여 동계 하우스 개방으로 담배가루이 방제 가능성을 검토하였다. 화학약제 및 친환경자재를 이용한 방제는 디노테퓨란, 스피로메시펜을 7일 간격으로 1, 2, 3회 살포하였으며, 천연물질인 고삼추출물(metrine 4%)을 이용하여 방제회수를 1, 2, 3회로 나누어 살포하였다. 담배가루이 밀도는 토마토 포기당 1, 5, 10마리로 접종하였고 최종 약제처리 30일 후 조사하였다. 담배가루이 친환경 방제는 공동연구로 참여한 (주)에코원에서 개발한 참가루(Oregano oil 5%+Palmarosa oil 5%+Garlic oil 20%)와 참진골드(Matrine 0.5% 함유 식물추출물 50%+Garlic oil 30%)를 이용하여 7일 간격 3회 살포하였으며 대조구로 황색점착트랩을 설치하였다. 모든 시험은 방충망으로 씌운 길이와 폭이 3×4, 높이 2m인 소형 하우스에서 실시하였으며 최종 방제제 처리 30일후 담배가루이 밀도를 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 토마토황화잎말림바이러스(TYLCV) 병징발현 및 기주범위 분석

(1) 병징 발현

현재 문제가 되고 있는 가루이 매개 바이러스(토마토황화잎말림바이러스, *Tomato yellow leaf curl virus* : TYLCV)를 바이러스 저항성 품종(박카스, 도태량 TY)과 일반품종(도태량, 유니콘)에 접종한 다음 바이러스의 식물체내 복제를 Poly chain reaction (PCR) 방법으로, 외관상 나타나는 병징을 육안으로 조사하였다. 바이러스 접종은 형질전환체 *Agrobacterium* (GV3101)을 만든 다음(성균관 대학교 이석찬 교수 제공) 농도를 0.5×10^{10} cells/ml로 조절하여 그림 1과 같이 침을 이용한 인공접종을 실시하였다. 바이러스 검정을 위하여 Total DNA를 분리한 다음 PCR을 실시하였으며, PCR은 표 1과 같은 프라이머 조성으로 94°C/ 30초, 55°C/60초, 72°C/1분 조건으로 35회 반복 실시하였다.

표 1. TYLCV 검정용 프라이머 조성

Virus	Primer	Sequence(5' - 3')	Product size (bp)
TYLCV	TYLC-C-962-F	GCCGCGCCTTTTCTTTT	962
	TYLC-C-962-R	ATACTTGGCTGCCTCCTGATGA	

※반응조건 : 94°C/30sec, 57°C/30sec, 72°C/1min 반응조건으로 35회 반복

식물체내 바이러스 복제는 토마토 4 품종 모두에서 접종 10~12일 사이에 검출 되었으며, 육안으로 관찰되는 병징은 일반품종에서 바이러스 접종 18일 후에 상위 잎이 황화, 위축, 말림 증상 등 전형적인 TYLCV 증상이 나타나기 시작하였다. 병징이 나타나는 토마토는 PCR 결과 모두 포기에서 TYLCV가 검출되었다(그림 2).



그림 1. Agrobacteria GV3101을 이용한 TYLCV 인공접종 및 재배포장



그림 2. 토마토에 나타나는 바이러스 증상 및 PCR을 이용한 TYLCV 검출

A : 바이러스 감염주, B : 건전주, M ; 100bp DNA ladder, 1, 2 ; 바이러스 감염 토마토 잎, N, P ; 음성, 양성 대조구

TYLCV 접종 후 2일 간격으로 PCR을 이용하여 바이러스 감염유무를 조사한 결과 접종 8일 후 까지는 모든 품종에서 바이러스가 검출되지 않았으나 접종 10일 후 도태량 2주에서,

12일 후에는 모든 품종에서 PCR에 의한 바이러스가 검출되었다. 박커스와 도태랑 TY 품종은 TYLCV에 대한 저항성 품종으로 토마토 재배농가에서 현재 재배하고 있는 품종이지만 TYLCV가 식물체내에서 복제되는 것을 확인 할 수 있었다. 육안으로 나타나는 병징은 박커스와 도태랑 TY 품종은 접종 24일 후까지 나타나지 않았으며, TYLCV 이병성 품종인 도태랑 요꼬, 유니콘 품종에서는 바이러스 접종 18일 후부터 나타나기 시작하여 24일 후에는 모든 포기에서 관찰할 수 있었다(표 2).

표 2. 토마토 품종에 따른 바이러스 증상 발현시기

바이러스 접종 후 조사시기	바이러스 및 병징 조사																			
	박카스					도태랑 TY					도태랑 요꼬					유니콘				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
8	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
10	N	N	N	N	N	D	D	N	N	N	N	D	N	N	N	N	N	N	D	N
12	D	D	D	D	N	D	D	D	D	D	D	D	D	N	D	N	D	D	D	D
14	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
16	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
18	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	S	S	D	D	S	D	D	D	D	D
20	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	S	S	S	S	S	D	D	D	D	S
22	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	S	S	S	S	S	S	D	D	S	S
24	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

박카스, 도태랑 TY : 토마토황화잎말림바이러스 저항성, 도태랑 요꼬, 유니콘 : 일반품종
N : 미검출, D : 바이러스 검출, S : 바이러스 병징 발생

이상의 결과에서 토마토는 현재 시판중인 TYLCV에 저항성 품종과 일반품종 모두 바이러스에 감염은 되었으나 육안으로 관찰되는 바이러스 피해 증상은 저항성품종에서 나타나지 않아 저항성 품종은 정상적으로 생육할 수 있었다. 바이러스 증상인 황화와 생육부진 증상이 나타날 경우 토마토는 18~20일 전에 바이러스에 이미 감염된 것을 알 수 있었으며(바이러스 감염 후 18일 이후에 증상 발현), 재배포장에서 이러한 증상이 일부 나타날 경우 정상적으로 생육중인 식물체도 바이러스에 감염되었을 가능성이 매우 높았다.

(2) 가루이 매개 바이러스 4종에 대한 토마토 및 박과 작물에 대한 기주 범위 분석

국내에 보고된 가루이 매개 바이러스 4종에 대해 가지과, 박과의 총 4개 작물 7개 품종을 대상으로 감염실험을 수행하였다.(그림 3). 바이러스를 감염시킨 작물들은 경북 안동 소재 경상북도농업기술원 생물자원연구소의 온실에 재배하면서 60일간 관찰하였으며, 감염 후 60일이 되는 시점에 각각의 시료로부터 gDNA를 분리한 후 PCR과 서던 블롯 (Southern blot)을 통해 감염 여부를 확인하였다.

Tomato 1 (256 개체)	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
Tomato 2 (256 개체)	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
Tomato 3 (256 개체)	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
Tomato 4 (256 개체)	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
Cucumber (256 개체)	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
Oriental melon (256 개체)	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
Water melon (256 개체)	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
	Mock	TYLCV	HYW	TbLCV	beta	TYLCV	TYLCV	TbLCV	TYLCV	TbLCV	HYW
						+HYW	+TbLCV	+HYW	+beta	+beta	+beta

그림 3. 기주 범위 분석 실험에 사용한 작물 품종들 및 바이러스 (표 안의 숫자들 집중한 식물의 수)



그림 4. 작물에 바이러스를 접종했던 과정과 감염시킨 식물체를 재배한 온실

TYLCV를 단독감염시키거나 다른 가루이 매개 바이러스를 함께 감염시켰을 경우 토마토 4개 품종 모두에서 감염되었음을 확인할 수 있었으며, 박과 작물인 수박, 참외와 오이에는 감염되지 않음을 확인하였다. 또한 저항성 품종인 박커스와 도태랑 TY은 이병성 품종 (도태랑 요꼬, 유니콘)에 비해 전반적인 바이러스양이 더 적음을 확인할 수 있었으며 (그림 5), 이병성 품종에서 잎의 말림 (curling), 황화(yellowing), 왜소증 (stunting) 등 전형적인 TYLCV 증상을 확인할 수 있었음 (그림 6).

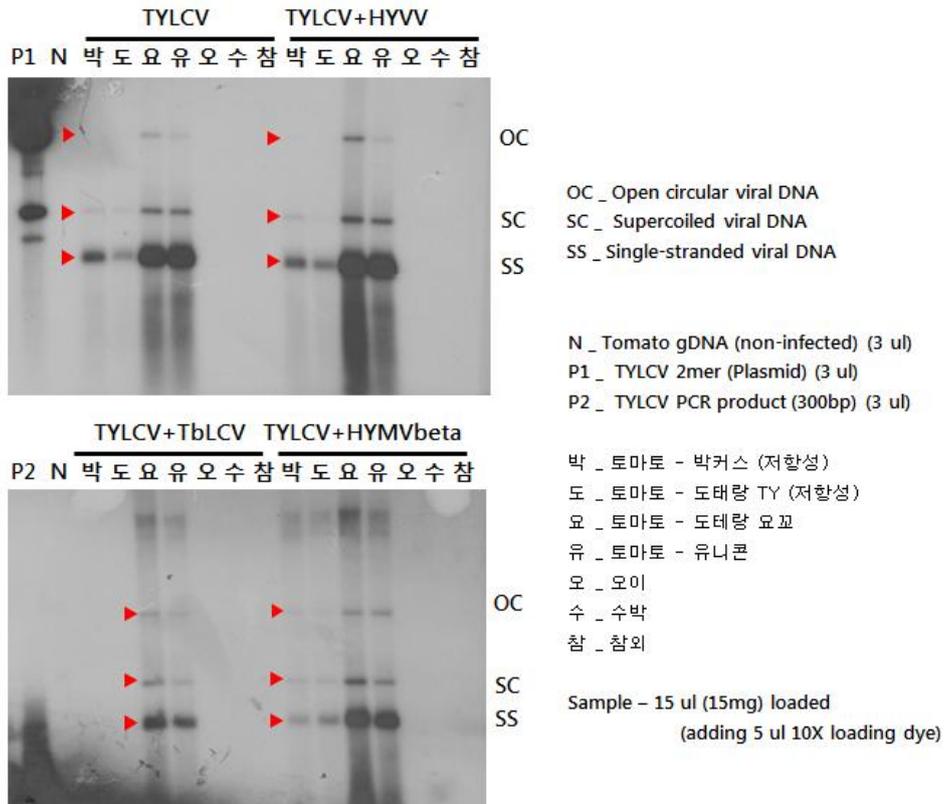


그림 5. TYLCV를 단독감염시킨 경우와 다른 가루이 매개 바이러스와 함께 복합감염시킨 개체들에 대한 서던 블롯 분석 결과

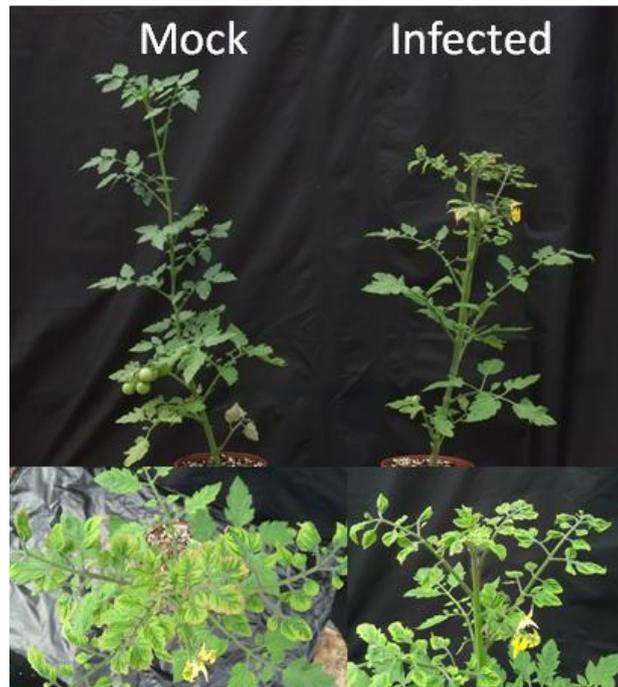


그림 6. TYLCV를 감염시킨 토마토 (유니콘)

TbLCV의 경우 단독감염시켰을 때 토마토 1개 품종에서, TYLCV와 함께 감염시켰을 때 토마토 3개 품종에서 감염되었음을 확인할 수 있었음 (그림7).

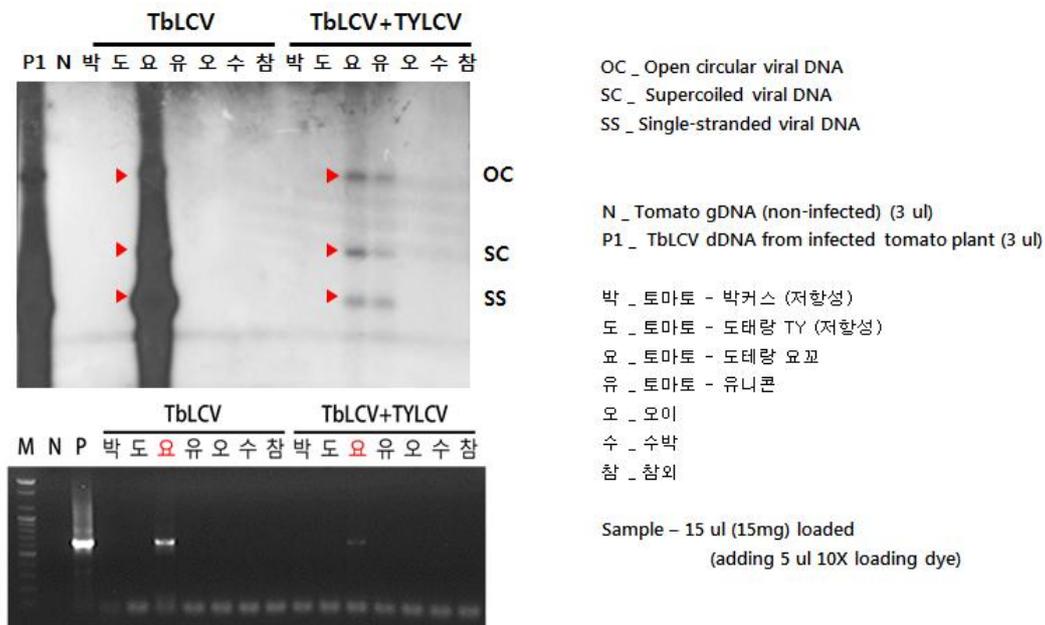


그림 7. TbLCV를 단독 감염시킨 개체들과 TYLCV와 함께 복합 감염시킨 개체들에 대한 서던 블롯 및 PCR 분석 결과

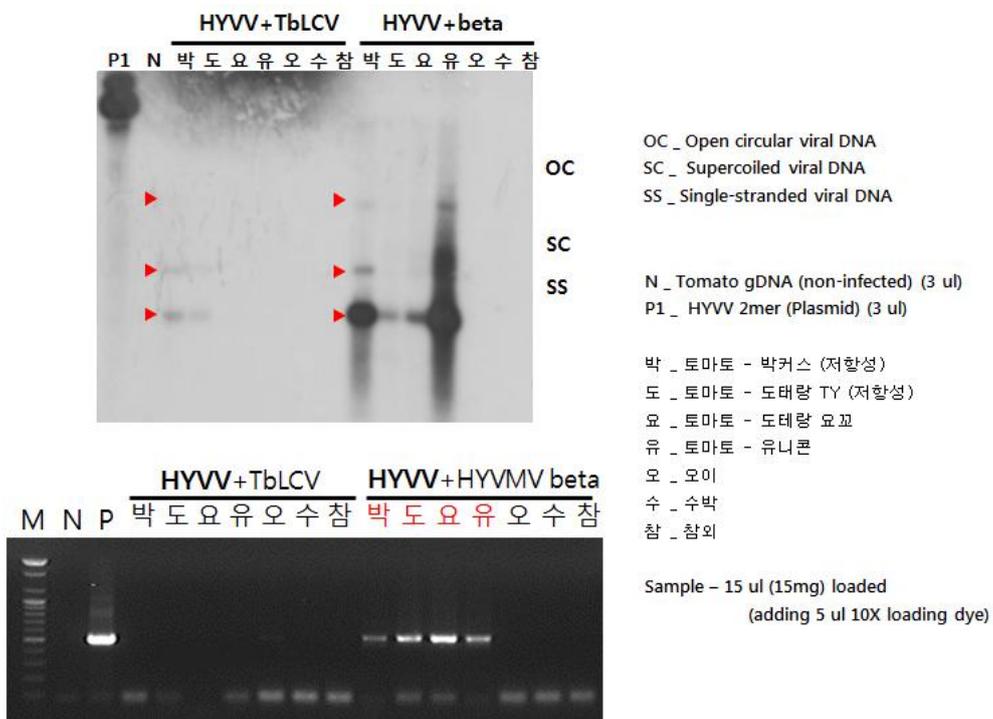


그림 8. HYVV를 TbLCV 혹은 HYVMV beta-satellite와 함께 복합 감염시킨 개체들에

대한 서던 블롯 및 PCR 분석 결과

기존에 토마토에 감염되지 않는 것으로 알려져 있던 HYVV의 경우 토마토에 단독 감염시켰을 때 감염 되지 않았음을 확인할 수 있었다. 하지만 HYVV를 TbLCV혹은 HYVMV beta-satellite DNA와 함께 감염시켰을 때 토마토에 감염된다는 사실을 확인할 수 있었으며 (그림 7), 이 경우 잎의 수가 급격히 적어지고, 잎의 말림, 황화 병증이 TYLCV를 감염시켰을 때보다 심하게 나타남을 확인할 수 있었다(그림 8).



그림 9. HYVV와 HYVMV beta-satellite를 함께 감염시킨 토마토에서 나타나는 병징

HYVMV beta-satellite DNA의 경우 접종 시 식물체 내에서 존재함을 PCR과 서던블롯 상으로 확인할 수 없었으나, 그림 17 등의 현상에서 보듯 다른 가루이 매개 바이러스의 기주 확장 및 병증 심화에 큰 영향을 주는 것으로 확인할 수 있었다. HYVMV beta-satellite의 기주 내 감염 여부 및 복제 양상에 대한 분석은 추가적으로 이루어져야 할 것이다.

나. 토마토황화잎말림바이러스 피해분석

(1) 토마토 품종별 바이러스 감염시기에 따른 피해분석

토마토에 바이러스가 감염될 경우 생육과 수량변화를 분석하기 위하여 TYLCV 저항성 품종(박커스, 도태랑 TY)와 일반품종(토태랑 요꼬, 유니콘)을 공시품종으로 바이러스 감염시기를 조절하여 재배하였다. 감염은 토마토 유묘기, 정식 30일후, 정식 60일 후에 실시하였으며, 접종방법은 형질전환체 Agrobacterium (GV3101)을 만든 다음(성균관 대학교 이석찬 교수 제공) 농도를 0.5×10^{10} cells/ml로 조절하여 그림 1과 같이 침을 이용한 인공

접종을 실시하였다. 각 시기별 바이러스를 접종한 다음 담배가루이에 의한 2차 감염을 막기 위하여 7일 간격으로 살충제를 살포 하였으며, 생육 및 바이러스 이병정도 조사는 정식 30일 후부터 90일 까지 조사하였다.

토마토 품종별 초장을 조사한 결과 저항성품종인 박커스 품종은 건전주와 바이러스 감염주에서 차이가 나지 않았으나 도태랑 TY 품종은 정식 90일 후 바이러스 감염품종의 초장이 작아 바이러스 저항성 품종내에서도 차이를 나타냈다. 토마토 일반품종은 바이러스 접종 후 급속히 생장이 멈추는 경향을 나타내어 연장재배가 불가능하였다(그림 10).

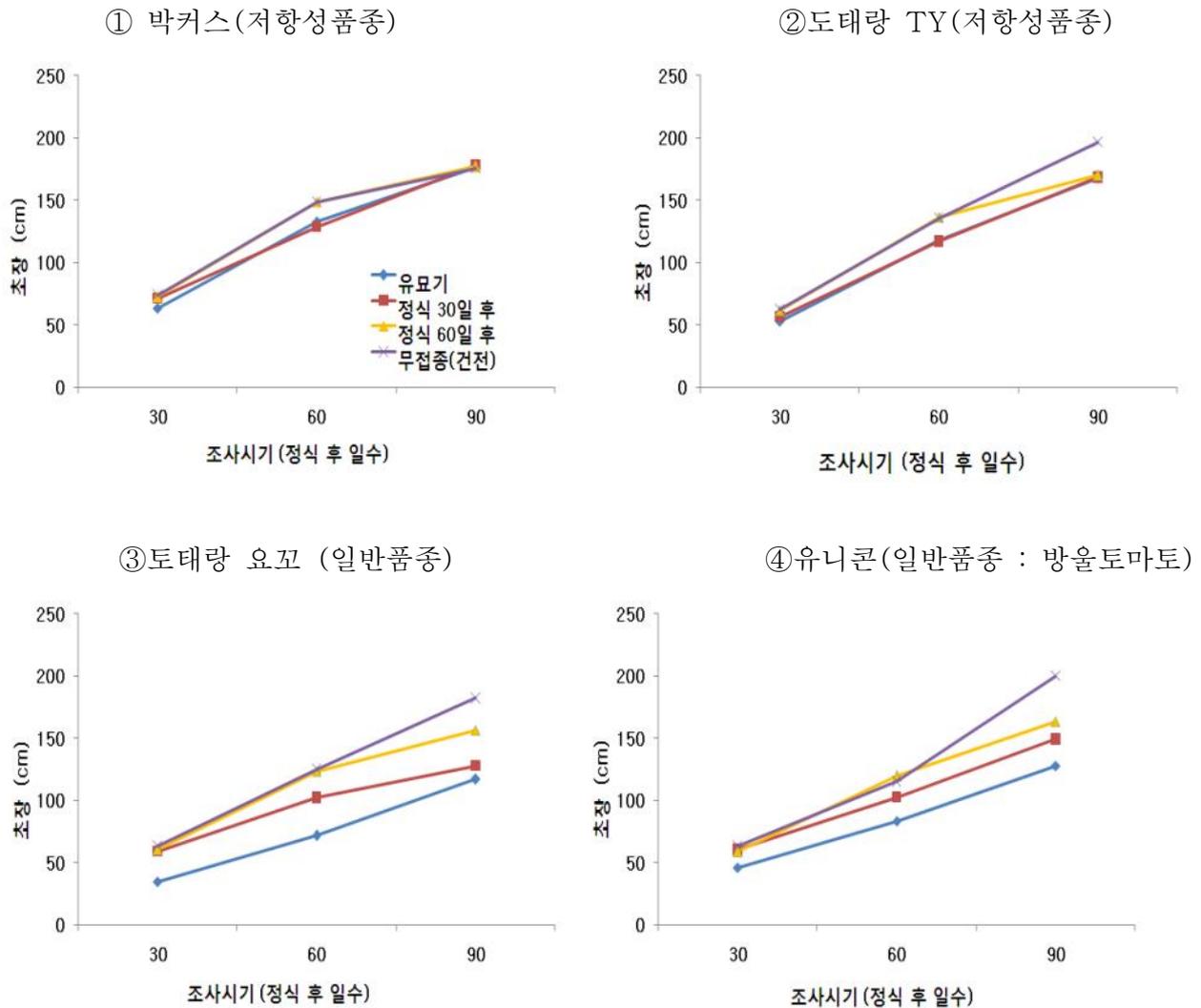


그림 10. 토마토 품종 및 바이러스 접종 시기별 초장변화

토마토 수량구성 요소를 조사한 결과 저항성 품종은 과장, 과중에서 차이가 없었으나 박커스 품종은 유묘기에 바이러스에 감염될 경우 과폭과 수량이 작아지는 경향이였다. TYLCV 저항성 품종도 육안으로 관찰되는 병징은 나타나지 않았으나 바이러스 유묘기에 바이러스에 감염될 경우 건전주에 비하여 25%정도의 수량감소를 나타냈다. 바이러스 감염시기가 정식 30일 이후에는 건전주와 수량지수에서 통계적 유의성이 없어 정상적으로 재배가 가능하였다. TYLCV에 감수성인 일반품종은 유묘기에 바이러스에 감염될 경우 생육이 억제

되어 정상적인 재배가 불가능 하였으며, 바이러스 감염 시기에 따른 토마토 생육의 차이가 뚜렷하게 나타났다(표 3).

표 3. 토마토황화잎말림바이러스 접종 시기에 따른 토마토 품종별 수량 특성

품 종	접종 시기	화방수 (개/주)	과장 (cm)	과중 (g)	과폭 (cm)	주당 과수	주당 수량 (g)	수량 지수 (%)
박카스	유묘기	10.9ab ^a	6.1a	149.8b	6.7c	11	2,736b	74
	30일	11.2ab	6.5a	167.9b	6.8bc	10	3,257ab	88
	60일	11.6ab	6.6a	198.5a	7.5a	11	3,290ab	89
	무접종	12.4a	6.3a	172.6ab	7.2ab	12	3,692a	100
도태랑	유묘기	10.7b	5.7a	125.5a	6.2a	10	2,262b	75
	30일	10.5b	6.0a	145.4a	6.7a	10	2,514ab	84
	60일	10.6b	5.9a	145.0a	6.4a	12	2,905ab	97
	무처리	12.1a	6.2a	141.6a	6.6a	13	2,999a	100
도태랑요꼬	유묘기	8.4c	5.7a	121.5ab	6.2a	4	718c	23
	30일	9.5b	5.7a	116.7b	6.1a	8	2,178b	71
	60일	10.4b	5.8a	141.8a	6.6a	11	2,779ab	90
	무처리	11.4a	5.8a	130.1ab	6.4a	13	3,071a	100
유니콘 (방울)	유묘기	12.0b	2.6a	12.6a	2.8a	72	1,169c	40
	30일	12.2ab	2.7a	13.8a	2.9a	125	2,272b	77
	60일	11.8b	2.6a	13.7a	2.9a	164	2,430b	83
	무처리	13.4a	2.7a	14.3a	2.9a	190	2,940a	100

^aThe same letter within columns means no significant differences between the by Duncans multiple range test(P<0.05).

이상의 결과에서 토마토 재배시 TYLCV 증상이 나타날 경우 초기 증상 발견 30일 후 적 심을 하면 동일한 시기에 적심한 무발생 포장대비 80~90%를 수확할 수 있어 후작을 고려 한 효과적인 재배 방법(그림 11)으로 농가 현장에서 적용할 수 있을 것이다.

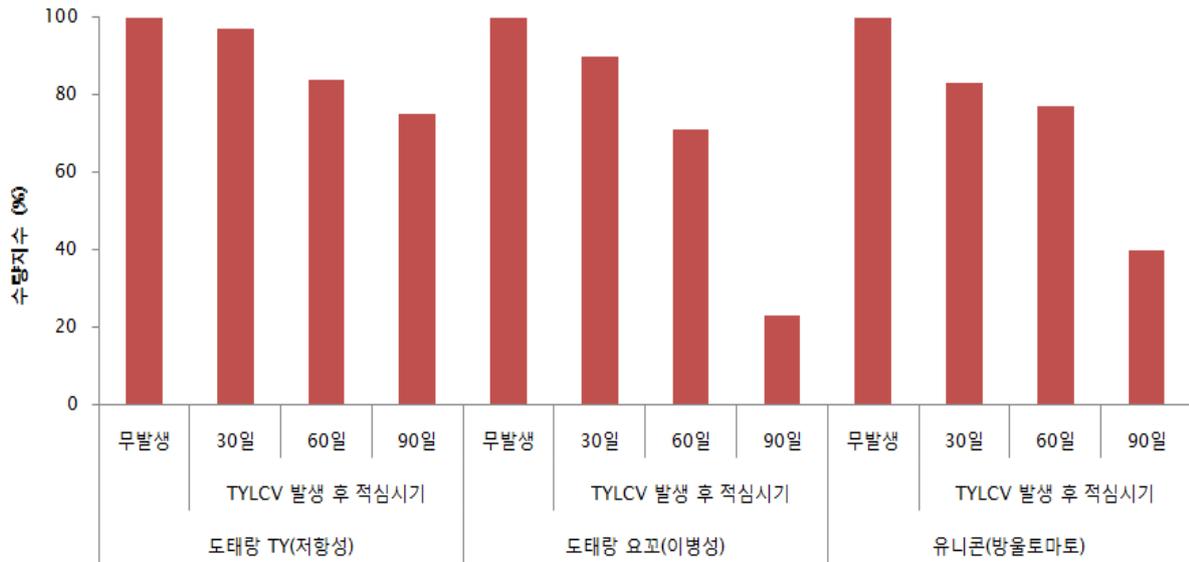


그림 11. 토마토 품종별 적심시기에 따른 수량

(2) 시설고추 담배가루이 발생에 의한 피해해석

담배가루이는 토마토에 TYLCV를 매개하여 바이러스 병을 초래하지만 고추 품종에는 바이러스를 매개하지 않는다. 담배가루이 발생 고추 포장에서 바이러스 증상은 나타나지 않지만 담배가루이 배설물에 의하여 비병원성 곰팡이(그을음병) 증식이 매우 심하여 정상적인 생육이 어려운 실정이다(그림 12).



그림 12. 담배가루이에 2차 피해 그을음 증상(좌) 및 검전주(우)

시설고추 재배지에서 담배가루이에 의한 2차 피해를 방지하기 위하여 방충망 하우스를 설치하고 고추 정식 및 담배가루이를 집중 한 다음 담배가루이 밀도가 5마리, 6~10마리, 11~20마리/주 일 때 적용약제를 이용하여 방제를 하였다. 담배가루이 밀도가 주당 6~10마리일 경우 이미 고추에 그을음 증상이 발생하였으며(엽면적율 : 5.2%) 담배가루이를 방제하지 않을 경우 70%이상의 그을음병 엽면적율을 보였다. 담배가루이에 의한 고추 그을음병을 방제하기 위한 적정 방제시기는 담배가루이 주당 3~5마리로 적용약제를 7일간격 3회 살포하면 담배가루이 증식 및 2차 피해인 그을음 증상을 막을 수 있었다(표 4, 그림 13).

표 4. 담배가루이 방제 시기별 고추생육 및 그을음병 발생정도

방제시기	초장 (cm)	분지수	수량 (g/주)	그을음병 발생정도 (엽면적율%/주)
3~5마리/주	156.5	11.5	1,250	1.5
6~10마리/주	160.0	10.9	1,050	5.2
11~20마리/주	149.6	10.2	885	20.0
무방제	153.5	10.0	420	70.5

- 수량 : 붉은고추 생체중, 상품과 조사
- 그을음병 발생정도 : 병반면적율

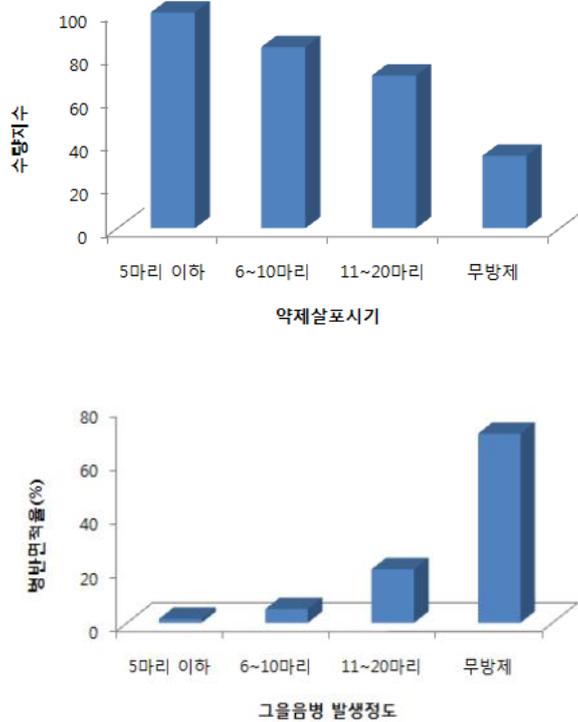


그림 13. 담배가루이 발생 밀도별 고추수량 및 그을음병 발생정도

(3) 토마토 시설재배시 담배가루이 증식밀도 분석

시설토마토 재배시 바이러스병 매개충인 담배가루이 적정 방제시기를 결정하기 위하여 담배가루이 초기 밀도에 따른 증식율을 조사하였다. 시설하우스에 길이와 폭이 3×4, 높이 2m인 소형 하우스를 설치한 다음 담배가루이가 이동할 수 없는 방충망을 설치하였다(그림 14). 토마토 품종은 시판종인 레전드 찜머(바이러스 감수성)와 박커스(바이러스 저항성) 2 품종을 정식 한 다음 담배가루이를 처리구당 10, 20, 40마리를 접종한 후 2일간격으로 담배가루이 밀도를 조사하였다. 조사방법은 황색유인트랩(그림 14)에 유인된 담배가루이를 조사하였다.



그림 14. 담배가루이 증식 시험구 및 조사 황색트랩

황색트랩에 담배가루이 최초 유인은 10마리 집중 구에서는 14일 후, 20, 40마리 집중구에서는 10일 후 로 조사되었다. 담배가루이 증식은 집중 20일 후부터 급속히 증가하였으며, 초기 담배가루이 밀도와 증식된 담배가루이 개체수간에는 차이가 없었다(그림 15).

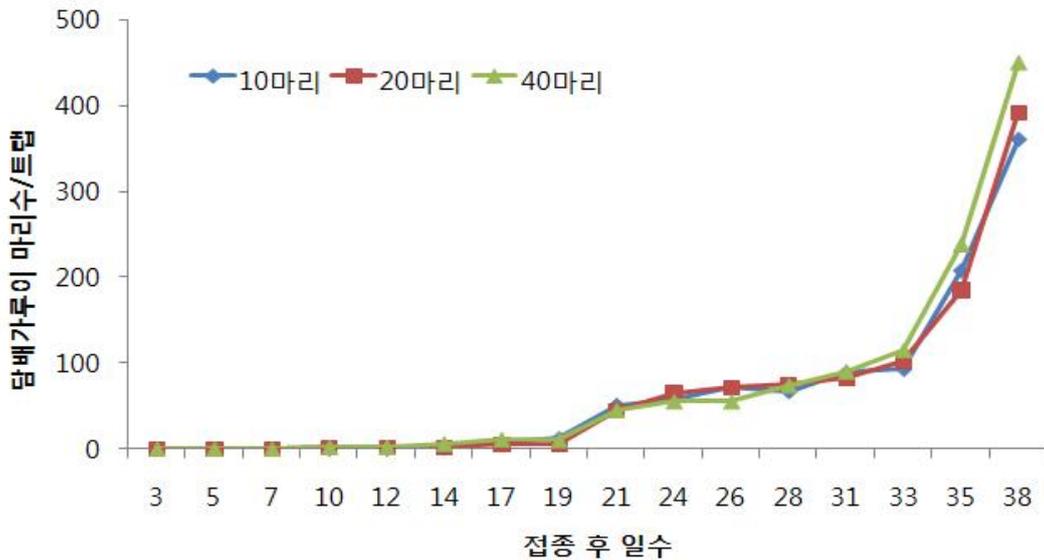


그림 15. 담배가루이 초기 밀도별 황색트랩에 유인된 담배가루이 개체수 변화

처리당 담배가루이 10마리 집중구가 토마토 포기당 1~2마리 발생하는 정도로 TYLCV 방제를 위한 담배가루이 적정 방제시기는 포기당 1~2마리로 분석되었다. 토마토 품종과 담배가루이 증식율에는 차이가 없었으며 바이러스 저항성품종에서도 초기 밀도 대비 40일 후 조사에서 700% 이상 증식되었다(표 5).

표 5. 토마토 품종 및 담배가루이 초기 밀도에 따른 개체수 변화

품 종	접종밀도 (마리/구)	40일 후 밀도 (마리/구)	증식율(%)
레젠드 썸머 (이병성)	10	135	1,350
	20	135	670
	40	1,575	3,930
박커스 (저항성)	10	300	3,000
	20	150	720
	40	550	1,370

※ 조사방법 : 담배가루이 접종 40일 후 토마토 식물체에 붙어있는 생충수 조사

담배가루이의 증식은 초기 밀도와 토마토 품종에 따른 차이가 없어 농가포장에서 저항성 품종을 재배 할 경우에도 담배가루이가 일정한 밀도 이상 발생하면 방제를 해야 할 것으로 판단되었다.

(4) 시설하우스내 담배가루이 조기 예찰방법

담배가루이의 방제는 조기에 발생을 예찰하는 것이 가장 중요하다. 담배가루이가 포장내 식물체당 1마리 정도 발생할 경우 40일 후 600~3,000% 이상 증식(표 5)하기 때문에 조기 예찰에 의한 초기 방제로 약제살포 회수를 줄일 수 있다. 시설하우스내 황색점착트랩을 0.5, 1, 2m 높이별로 설치한 다음 시기별 가루이 유인 밀도를 조사한 결과 초기에는 트랩높이에 따른 차이는 없었으나 접종 30일 후부터 트랩높이가 1m에서 가장 많은 담배가루이를 유인되었으며, 2m 높이에서는 담배가루이 유인량이 매우 낮았다. Park 등(2012)은 트랩을 토마토 재배 포장 상단과 하단에 설치 할 경우 차이가 없었으며, 하단에는 약충에서 막 깨어난 성충이 상단으로 이동하지 못하고 트랩에 포획되었다고 하였으나 토마토 재배 기간이 길어지면 1m 정도의 상단에 포획되는 담배가루이가 증가하는 것을 알 수 있었다.

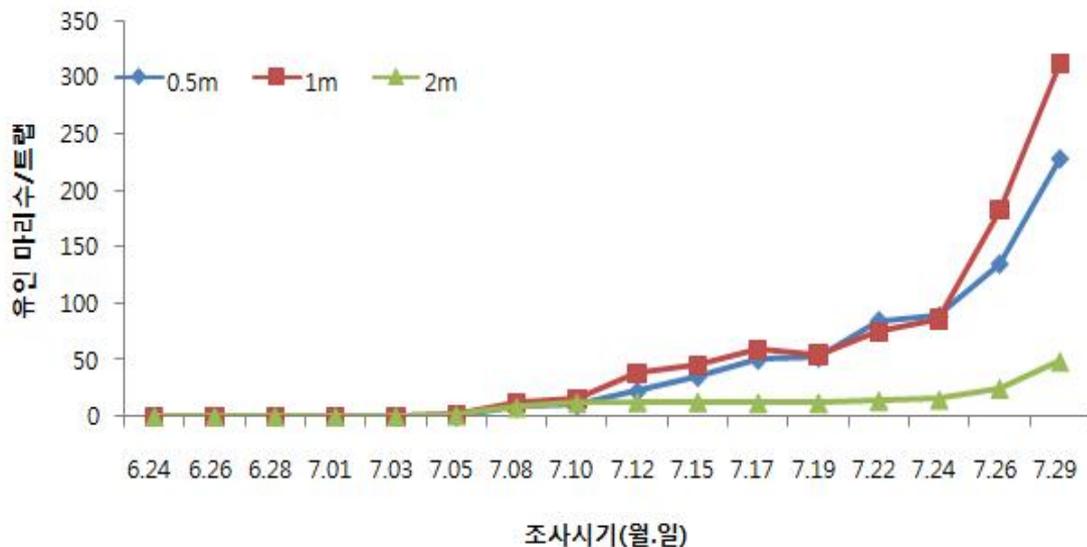


그림 16. 황색트랩 설치 위치별 담배가루이 시기별 유인정도

※ 최초 접종밀도 : 10마리/구(3*4m, 높이 2m)

다. 토마토황화잎말림바이러스(TYLCV) 종자전염 및 증상발현 분석

(1) TYLCV 종자전염 확인

토마토황화잎말림바이러스(TYLCV)는 담배가루이에 의하여 충매전염으로 알려져 있으나 바이러스병 초기 발생이 종자전염에 의한 가능성이 제기되어 2013년 TYLCV 감염된 토마토(품종 : 레전드썸머)를 병징 및 PCR 검정으로 확인 한 다음 종자를 채종하였다.



그림 17. TYLCV 감염 토마토(병징) 및 담배가루이 흡즙

채종된 종자는 2014년 4월 17일 1,000주를 파종한 다음 20일 간격으로 육안 및 PCR 검정으로 바이러스 감염 유무를 확인하였다. 담배가루이에 의한 2차 감염을 막기 위하여 묘종 관리는 망 재배 포장에서 실시하였으며 7일 간격으로 살충제를 살포하였다.

육안으로 나타나는 병징은 7월 10일 최초로 나타났으며 7월 30일 6.5%의 이병주율을 보였다. PCR 검정에서는 육안검정 보다 20일 일찍 6월 20일 최초 5%의 발병율을 나타냈으며, 7월 30일 조사에서는 전 포기가 바이러스에 감염되어 TYLCV가 종자전염 되는 것으로 확인 되었다.

표 6. TYLCV 감염종자 파종시 병징발현 시기 및 바이러스 검정

조사시기	육안조사(월. 일)				PCR 검정(월. 일)			
	5. 30	6. 20	7. 10	7. 30	5. 30	6. 20	7. 10	7. 30
이병주율	0	0	2.5	6.5	0	5.0	65.0	100

※ 육안조사 : 1,000주에 대한 병징발생 포기수

PCR 검정 : TYLCV 병징 의심주 선별 검정(20주 조사)

토마토 품종에 따른 종자전염을 조사하기 위하여 토마토 품종별로 바이러스에 감염을 확인 한 다음(그림 18) 채종 하여 종자감염 유무를 분석하였다.



그림 18. 토마토 품종별 채종 종자로부터 TYLCV 검정

바이러스에 감염된 포기에서 채종한 종자를 파종한 다음 유묘를 PCR 진단 결과 모든 품종의 종자에서 TYLCV 감염이 확인되었다.

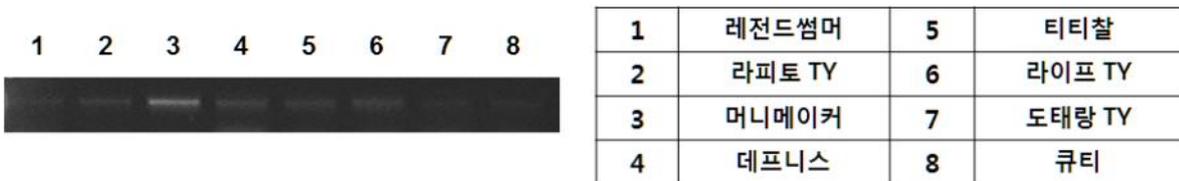


그림 19. 각 품종별 채종 종자로부터 발아된 유묘 TYLCV 검정 결과

채종한 종자를 심어 바이러스 전염 여부를 확인해보았다. 이 경우, 채종당시 종자 상태가 좋지 않았던 3개종을 제외한 모든 발아한 유묘에서 TYLCV 감염이 확인되었다(그림19). 이를 통해 토마토에서의 TYLCV 종자전염이 일부 품종에 국한된 현상이 아님을 확인하였다.

(2) TYLCV 종자전염에서 증상 발현 관찰

현재까지 진행된 TYLCV 종자전염 연구결과에 따르면, 종자전염을 통해 다음 세대로 전이된 TYLCV가 가루이 등 외부 자극없이 다음 세대에서는 병징을 나타내지 못하였다. 본 연구에서는 이병성 품종인 레전드썸머와 저항성 품종인 도태랑TY를 이용해 각각의 품종에 대해 TYLCV의 종자전염 여부와 그로 인한 병징 발현에 대해 조사하였다. 감염성 클론을 이용해 TYLCV를 각 품종에 접종한 후 종자를 받아 2세대 토마토를 재배하였다. 종자전염된 2세대 토마토는 12주간 재배하면서 병징 발현을 관찰했는데 8주가 지난 시기에 레전드썸머에서 조금씩 약한 TYLCV 병징이 보이는 것을 발견했다. 이를 검증하기 위해 레전드썸머와 도태랑TY를 무작위로 9개체 선발하여 PCR 검정을 진행하였는데 두 품종에서 모두 TYLCV가 종자전염으로 전이된 것을 확인할 수 있었으며 특히 병징이 나타난 레전드썸머 개체는 많은 양의 TYLCV가 존재하는 것을 볼 수 있었다 (그림 20).

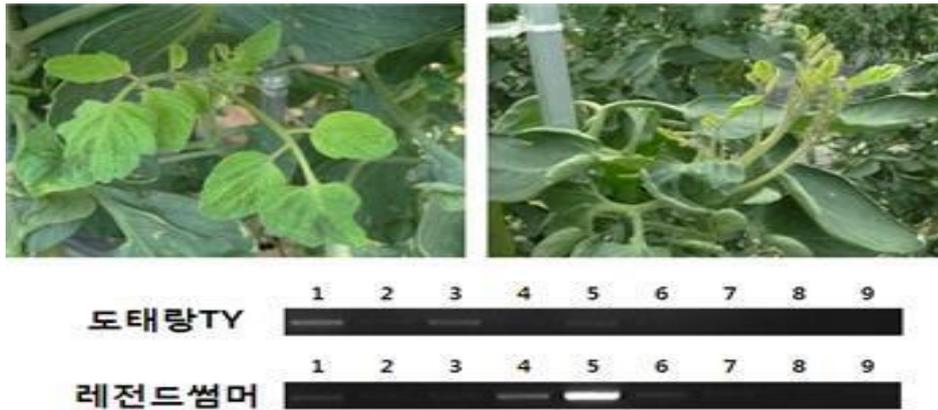


그림 20. TYLCV 종자전염에 의해 증상이 나타난 레전드쌘머 및 도태랑TY, 레전드쌘머 각각 9개체씩 PCR 검정 결과

위 결과는 TYLCV가 종자전염된 후 병징이 나타난 최초 보고로서 현재까지 알려진 충매 전염외에 종자로 전염되어 병징이 발현할 수 있다는 것을 보여준다.

(3) TYLCV 저항성 품종에서의 증상 발현과 그 원인 분석

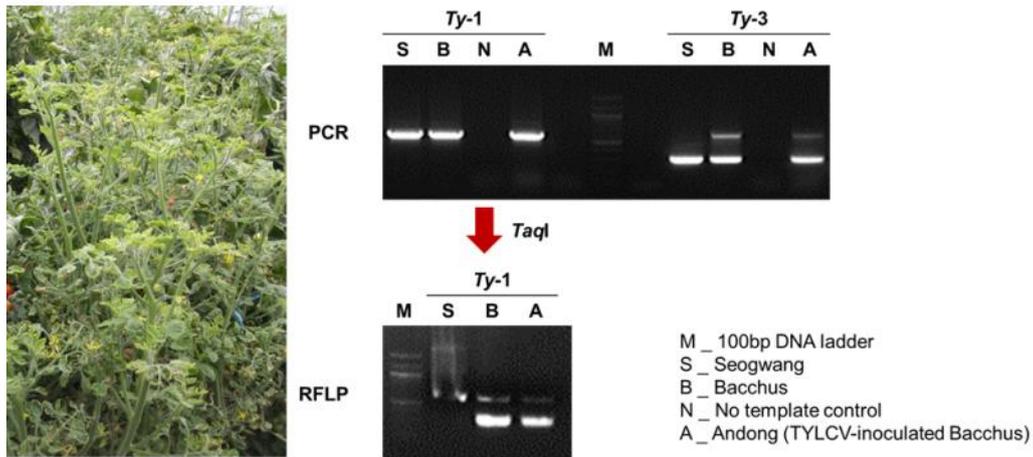


그림 21. 박커스 품종에서 나타난 TYLCV 증상과 저항성 유전자 검정용 PCR 및 RFLP 결과

박커스는 대표적인 TYLCV 저항성 품종으로 TYLCV가 창궐한 국가에서 수확량 확보를 위해 많이 재배된다. 그런데 종자전염 실험을 위해 TYLCV를 접종하고 장기간 재배하던 중 박커스에서 TYLCV의 전형적인 증상인 잎의 황화 및 말림 현상이 관찰되었다. 저항성 관련 유전자의 이상으로 병징이 나타난 것인지 확인하기 위해 PCR로 TYLCV 저항성 유전자인 Ty-1 유전자를 증폭시킨 뒤 제한효소 TaqI을 처리하여 분석하였다 (그림 21). 그 결과 병징이 나타난 식물에서 저항성 품종인 박커스가 갖고 있는 Ty-1 유전자가 존재함을 확인할 수 있었다. 현재까지 TYLCV가 감염된 저항성 토마토에서 저항성 유전자를 가지고 있음에도 불구하고 왜 TYLCV의 증상이 나타났는지를 확인하지 못하였다.

(4) 토마토 품종에 따른 TYLCV 병징의 다양성에 대한 분석

토마토 품종에 따라 나타나는 TYLCV 병징의 다양성에 대해 알아보기 위해, 36가지의 다양한 토마토 유전자원 품종을 대상으로 TYLCV를 접종하고 어떤 증상이 나타나며, 그것이 바이러스의 양과 상관있는지 알아보려고 하였다. 보독 담배가루이를 방사한 후, TYLCV에 감염된 토마토들을 대상으로 병징을 관찰하였다. 그 결과 기존의 TYLCV 병징으로 널리 알려진 잎말림, 잎 가장자리의 황화 현상, 위축 외에도 다양한 증상들을 관찰할 수 있었다. 대표적으로 기존 잎말림 증상과는 다른 잎 말림 병징, 줄기의 모양이 기형적으로 꺾이는 병징, 기존의 황화 병징과는 다른 형태의 퇴록 병징 등이 있었다. 각각의 품종에 나타난 병징과 바이러스량과의 상관관계를 분석하기 위해, 감염된 TYLCV량을 quantitative real-time PCR를 통해 정량적으로 분석하였다 (그림 22). TYLCV의 양을 비교 분석한 결과 병징과 TYLCV의 양 사이에서 직접적인 연관성이 발견되지 않았다.

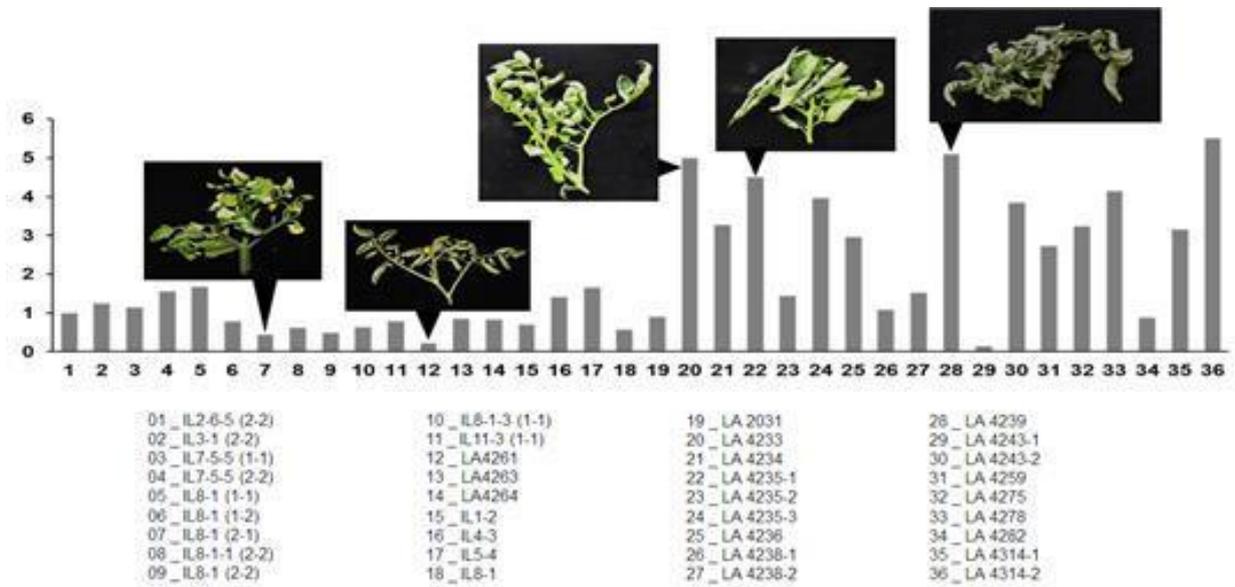


그림 22. qPCR을 이용해 품종별로 TYLCV의 양을 비교 분석한 결과

라. 담배가루이 방제

(1) 육묘장 재배 토마토 묘종 TYLCV 조사 및 담배가루이(TYLCV 보독충) 밀도에 따른 병징발현

TYLCV 초기 감염원으로서 조사하기 위하여 육묘장 환경과 토마토 묘종을 공급하는 육묘장의 토마토 묘종에 대한 바이러스 감염유무를 검정하였다. 경북지역 과채류 육묘장인 논공제일 육묘장과 군위 육묘장에서 토마토 묘종 샘플 각각 100점씩에 대하여 PCR 검정한 결과 모든 포기에서 바이러스가 검출되지 않았다.

표 7. 육묘장 TYLCV 발생실태 조사

일시	샘플수(2주)	바이러스 검출수	병징유무	비고
6. 24	100	0	무	논공제일육묘장
8. 19	100	0	무	군위육묘장

농가 현장에서 일부 조기에 바이러스병이 발생하는 포장은 육묘 단계에서 바이러스에 감염된 것으로 추정되었으나 조사 육묘장에서는 바이러스가 감염되지 않아 개별 육묘장간에 차이가 심한 것으로 추정된다.

대분류	중분류/소분류		조사항목										
시설	○종류		① 유리온실() ② 비닐하우스(√) *비닐상태 양호										
	○면적		① 1,000 평										
	○출입구		① 이중문(Y) ② Air shower(N)										
	○방충망(측창)		① 설치(2*2mm) ② 미설치()										
	○방충망(환기구 및 천창)		① 설치() ② 미설치(√)										
재배 작물	○종류		토마토	고추	파프리카	피망	오이	가지	애호박	딸기	*현재 약 20% 가		
	○육묘기간	일 수(일)	√				√		√	√			
		기간(월~ 월)											
○년 중 육묘 횟수			2~3	1			3						
유통 지역	토마토묘 판매 지역		① 경기() ② 강원() ③ 충남() ④ 충북() ⑤ 경남() ⑥ 경북(√) ⑦ 전남() ⑧ 전남() ⑨ 제주()										
매개충 (내부)	○기주작물 종류		토마토	고추	파프리카	피망	오이	가지	애호박				
	○매개충 밀도 (마리/잎)	담배가루이	0				0		0				
		온실가루이	0				0		0				
	○방제	횟수(년)	① 1회() ② 2회() ③ 3회() ④ 4회() ⑤ 수시(대략 4~5회)										
약종		일반 살균, 살충제											
방법		① 교호 처리() ② 단일약종 처리()											
바이러스 (내부)	○매개충	담배가루이	TYLCV	① 보독(, 보독율: %) ② 비보독()									
			ToCV	① 보독(, 보독율: %) ② 비보독()									
		온실가루이	ToCV	① 보독(, 보독율: %) ② 비보독()									
	○작물	감염여부 및 감염율	토마토	고추	파프리카	피망	오이	가지	애호박				
		TYLCV											
○잡초	TYLCV												

그림 23. 육묘장 TYLCV 조사 목록표

토마토황화잎말림바이러스(TYLCV)를 방제하기 위하여 매개충인 담배가루이(TYLCV 보독충) 밀도에 따른 병징발현시기를 조사하였다. 시험품종은 레전드 썸머(이병성 품종)를 이용하여 담배가루이 초기밀도를 1, 2, 5마리/주로 조절하여 토마토 정식 2일 후에 담배가루이를 투입하였다. TYLCV 보독충은 바이러스 병징이 잘 나타나는 포장에서 채집하여 사용하였으며, 처리 후 5일 간격으로 바이러스 발생주율을 육안조사 및 PCR 검정을 실시하였다.

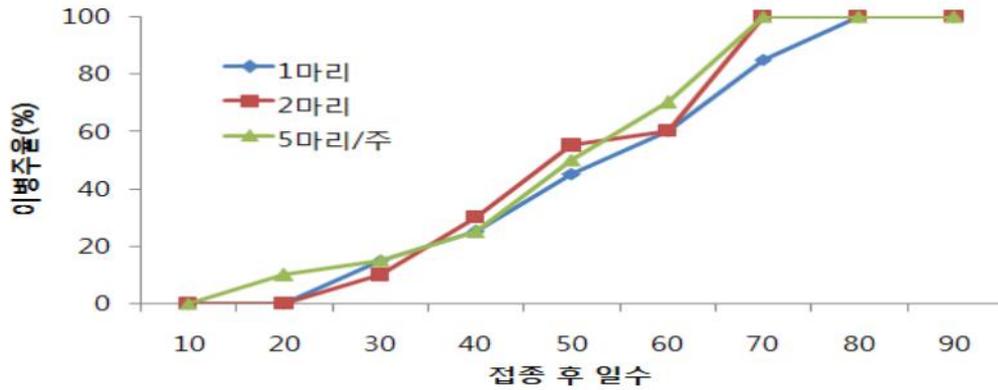


그림 24. 담배가루이 보독충 초기 밀도에 따른 토마토 TYLCV 발생정도

TYLCV 매개충인 담배가루이를 토마토 시설재배지에 1~5마리/주를 접종한 결과 토마토에 최초 병징은 5마리 접종한 처리구에서 15~20일 후 최초 발생하였으며, 담배가루이의 밀도 증가에 따라 바이러스에 감염된 토마토 식물체의 비율은 높아졌다. 담배가루이 밀도에 따라 최초 감염시기는 10일정도 차이가 있었으나 접종 50일 후 50% 이상 병징이 나타났으며, 담배가루이 접종 80일 후 모든 식물체가 바이러스에 감염되었다. 이상의 결과에서 토마토 바이러스병을 막기 위해서는 보독충이 나타날 경우 바로 방제를 해야 할 것으로 판단되었다.

(2) 시설하우스 동계 온도변화 및 담배가루이 월동 조사

시설재배 토마토 포장에서 담배가루이 월동을 조사하기 위하여 2014년 1월 10일 부터 2월 15일 까지 노지, 시설하우스, 시설2중 하우스(지상부, 지하부)에 담배가루이 및 담배가루이 및 기주식물체를 방치한 다음 토마토를 정식하여 담배가루이 발생상황을 조사하였다. 동계 처리기간중 일별 최저온도는 그림 1과 같이 노지는 -20~5℃로 조사되었고, 2중 하우스 토양 온도는 0℃ 이상으로 나타났다. 월동 처리 후 토마토를 정식한 결과 모든처리에서 담배가루이가 발생하지 않아 담배가루이 발생 포장에서는 동계에 하우스를 개방함으로 담배가루이 방제가 가능하였다.

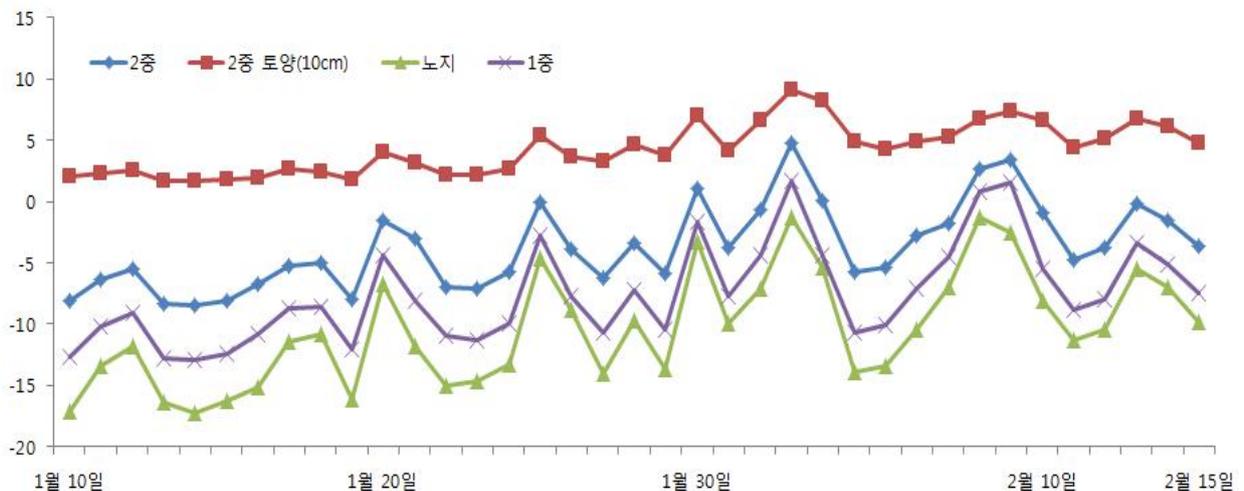


그림 25. 조사 기간중 처리별 일별 최저온도 변화

(3) 담배가루이 방제

(가) 화학약제 및 천연물질을 이용한 방제

시설 토마토 재배 포장에서 담배가루이 방제를 위하여 담배가루이 방제로 등록되어 있는 화학약제인 디노테푸란, 스피로메시펜을 7일간격으로 1, 2, 3회 살포하였으며, 천연물질인 고삼추출물(metrine 4%)을 이용하여 방제회수를 1, 2, 3회로 나누어 살포하였다. 담배가루이 밀도는 토마토 포기당 1, 5, 10마리로 접종하였고 최종 약제처리 30일 후 조사하였다. 화학약제는 1회 방제시 디노테푸란, 2회 방제시 디노테푸란과 스피로메시펜을 각 1회 살포하였으며 3회 방제시 디노테푸란, 스피로메시펜, 디노테푸란 순으로 살포하였다. 고삼추출물은 100배로 희석하여 사용하였다. 토마토는 리젠드썸머 품종을 3월 22일에 파종한 유묘를 4월 25일에 정식하였고, 5단 착과후 적심처리 하였다.

담배가루이를 방제하기 위하여 화학약제를 살포한 결과(표 8) 담배가루이 밀도가 토마토 포기당 1마리일 경우 약제 1회 처리로 방제가 가능하였으며, 약제처리전 밀도가 10마리/주 일 경우 3회 처리를 밀도를 1.2마리/주로 낮출 수 있었다.친환경방제제를 현장에 적용하기 위해서는 담배가루이 밀도가 1마리/주 일 경우 3회 처리로 방제가 가능하였으나 밀도가 10마리/주 일 경우 방제제 3회 처리 후 밀도가 12.5마리/주로 나타나 화학약제와 친환경방제제의 교호살포 연구가 진행되어야 할 것이다.

표 8. 담배가루이 밀도별 약제방제 효과

방제제	방제회수	담배가루이 밀도	
		약제 살포전 (마리/주)	최종 약제살포 30일 후 (마리/주)
화학약제	1	1	0
		5	3.2
		10	25.0
	2	1	0
		5	1.2
		10	3.5
	3	1	0
		5	0
		10	1.2
고삼추출물	1	1	0.2
		5	7.5
		10	50.0
	2	1	0.2
		5	5.0
		10	52.0
	3	1	0
		5	1.0
		10	12.5

Kim 등(2013)은 가지 담배가루이 친환경 방제기술을 개발하고자 난황유 등 8종의 천연

물질을 살포한 결과 친환경자재 중에서는 님제 처리에서 효과가 가장 높았으나 화학제인 디노테퓨란 약제처리가 담배가루이 성충 및 약충 방제에 가장 높은 방제효과를 나타내어 본 실험에서도 담배가루이를 완전 방제하기 위해서는 화학약제를 처리해야 할 것으로 판단되었다. 친환경 자재를 이용한 담배가루이 방제는 담배가루이 밀도가 매우 낮을 경우 가능성이 있었으나 실제 농가현장에서는 토마토 포기당 담배가루이 밀도가 1마리 이하일 경우 담배가루이 예찰이 매우 어려운 실정이다. 또한 친환경자재 단독으로 담배가루이 방제가 어렵고 화학약제 사용량을 줄이기 위하여 친환경자재와 화학약제를 교호 살포하는 효과를 검정하고자 담배가루이 유인 및 살충효과가 있는 *Nicotiana bentamiana* 추출물과 담배가루이 방제 약제인 디노테퓨란, 스피로메시펜을 교호 살포에 대한 방제효과를 검정하였다. *N. bentamiana* 추출물은 *N. bentamiana* 1kg을 물 20L에 20일간 희석하여 추출하였다. 방제제 살포는 표 9와 같이 *N. bentamiana* 단독살포와 화학약제와 교호살포 등 5처리로 실시하였으며, 대조구로 지하수만 살포한 다음 방제효과를 검정하였다.

표 9. *N. bentamiana* 추출물 및 화학약제 살포 처리내용

처리내용	1차	2차	3차
처리 1	N. B	N. B	N. B
처리 2	N. B	디노테퓨란	N. B
처리 3	디노테퓨란	N. B	N. B
처리 4	N. B	디노테퓨란	×
처리 5(대조)	디노테퓨란	스피로메시펜	×
처리 6(무처리)	×	×	×

- 처리방법 : 10일간격 3회(9/2, 9/12, 9/22)

- 초기 담배가루이 밀도 : 150~250마리/주(5~20마리 이상/엽)

조사는 1차 처리시기인 9월 2일부터 최종처리 7일 후까지 3회 실시하였으며, 처리별 10주에 대한 평균 담배가루이 밀도를 조사하였다. 1차 처리에서 화학약제인 디노테퓨란 처리구에서 9월 12일 조사한 결과 담배가루이 밀도가 가장 낮게 나타났으며, 1, 2차 화학약제 처리구는 2회 방제로 9월 29일 조사에서 완전방제가 가능하였다. *N. bentamiana* 단독처리구는 무처리에 비해 담배가루이 밀도를 낮추는 효과는 있었으나 최종 처리 7일후에도 평균 55마리/주 밀도의 담배가루이가 생존해 있어 토마토 바이러스병 발생을 억제할 수 없었다. 화학약제 처리를 줄이기 위해서 *N. bentamiana*를 1차 살포한 다음 화학약제와 *N. bentamiana*를 살포할 경우 담배가루이 방제에 충분한 효과가 있어 화학약제 살포를 줄일 수 있었다(표 10).

표 10. 처리별 담배가루이 밀도변화(마리/주)

처리내용	담배가루이 밀도(마리/주)			
	9/2	9/12	9/22	9/29
처리 1	192	89	115	55
처리 2	230	128	22	1
처리 3	125	52	12	25
처리 4	175	102	25	18
처리 5(대조)	185	67	8	0
처리 6(무처리)	250	450	960	780

※ 9/2일 조사 : 처리전 밀도

*N. bentamiana*를 유인식물로 이용하여 토마토 재배 포장에 토마토 10포기에 1포기 정도를 재배하여 담배가루이 밀도변화 및 바이러스병 방제 가능성을 조사한 결과 *N. bentamiana*가 담배가루이 유인효과는 충분히 있었으나 담배가루이 증식속도가 빨라 토마토에 바이러스 방제 효과는 나타나지 않았으며, 처리구내 담배가루이 증식율이 560%로 농가 포장 현장에 단독으로 적용하기는 어려웠다(표 11).

표 11. 담배가루이 방제를 위한 유인식물 (*N. bentamiana*) 간작효과

재배방법	이병주율(%)	담배가루이 증식율(%)
<i>N. bentamiana</i> 간작	50	560
관행재배	45	800

(나) 식물추출물을 이용한 담배가루이 친환경 방제

비닐하우스 시설 내에서 담배가루이의 증식율을 조사한 결과 초기밀도(1~4마리/주)와 관련없이 담배가루이 접종 40일 후 700~4,000% 정도를 나타냈다. 3×4m 방충망 시설에 토마토 10포기를 정식한 다음 TYLCV를 보독한 담배가루이(10~50마리/처리구)를 접종한 결과 15~20일 후 50마리 접종한 처리구에서 바이러스 병징이 최초 발생하였으며, 접종 30일 후 모든 처리구에서 바이러스 병징이 발생하였다. 담배가루이 방제를 위하여 식물추출물 유래 물질인 참가루(Oregano oil 5%+Palmarosa oil 5%+Garlic oil 20%)와 참진골드(Matrine 0.5% 함유 식물추출물 50%+Garlic oil 30%) 및 황색트랩을 3×4m 방충망 시설에 처리한 다음 담배가루이 밀도변화를 관찰하였다. 참가루와 참진골드는 7일간격 3회 살포 하였고, 황색트랩은 1m 높이에 3장을 설치하여 식물유래 추출물 최종살포 30일 후 담배가루이 밀도를 조사하였다. 무처리 구에서 담배가루이 밀도가 600%이상 증식되었으나 참가루 및 참진골드 살포 처리구에서는 60% 이상 감소되었다. Seo 등(2006)은 마늘오일이 항균효과가 우수하여 일부 식물병원세균과 식물병원 진균에 대하여 강한 항균력을 나타냈으며 특히 오이 흰가루병(*Sphaerotheca fusca*)과 토마토 흰가루병(*Erysiphe cichoracerum*)에 대한 포장 방제효과가 70%이상 이라 보고 하였는데 본 시험에서 사용된 참골드와 참진골드가 마늘유래 추출물로 미소곤충인 담배가루이 증식에도 효과가 있는 것으로 나타났다. 황색

트랩 처리구에서는 담배가루이가 증식은 되지 않았으나 밀도 감소효과는 없었다

표 12. 담배가루이 방제를 위한 식물유래 추출물 및 황색트랩 처리효과

처리내용	처리전 밀도 (마리/구)	처리 30일 후 밀도(마리/구)				비고 (유효성분)
		1반복	2반복	3반복	평균	
참가루	125.0	28.8	36.0	33.6	32.8	Oregano oil : 5% Palmarosa oil : 5% Garlic oil: 20%
참진골드	132.3	31.7	28.7	39.3	33.3	Matrine(0.5%) : 50% Garlic oil : 30%
황색트랩	145.6	112.0	164.0	135.6	138.0	-
무처리	112.0	501.8	764.3	683.0	649.7	-

Park 등(2013)은 토마토 유묘가 있는 스크린케이지 안에 황색점착트랩을 설치한 결과 담배가루이와 온실가루이 밀도가 80% 이상 감소한 결과를 나타냈는데 본 연구에서는 감소효과가 없어 상이한 결과를 나타냈다. Park 등(2013)의 실험에서는 케이지 크기가 W40×D40×H50cm로 토마토가 정상적으로 생육하는 환경이 아닌 매우 좁은 범위에서 효과를 조사한 결과로 본 실험의 W3×D4×H2m 정상적인 토마토 재배 환경에서는 황색트랩 단독으로는 담배가루이 밀도를 억제할 수 없었다. 참가루 및 참진골드는 주(에코원)에서 개발한 제품으로 과제 공동연구 수행중에 개발하였으며, 본 시험에서 현장적용을 실시했다.

4. 종합 결론

- 토마토 저항성 품종 및 감수성 품종에서 TYLCV는 접종 10~12일 사이에 PCR에 의해 검출 되었으며, 육안으로 관찰되는 병징은 일반품종에서 바이러스 접종 18일 후에 상위 잎이 황화, 위축, 말림 증상 등 전형적인 TYLCV 증상이 나타나기 시작하였다.
- 바이러스 증상인 황화와 생육부진 증상이 나타날 경우 토마토는 18~20일 전에 바이러스에 이미 감염된 것을 알 수 있었으며(바이러스 감염 후 18일 이후에 증상 발현), 재배포장에서 이러한 증상이 일부 나타날 경우 정상적으로 생육중인 식물체도 바이러스에 감염되었을 가능성이 매우 높았다.
- TYLCV를 단독 감염시키거나 다른 가루이 매개 바이러스를 함께 감염시켰을 경우 토마토 이병성 및 저항성 품종 모두에서 감염되었음을 확인할 수 있었으며, 박과 작물인 수박, 참외와 오이에는 감염되지 않음을 확인하였다.
- 기존에 토마토에 감염되지 않는 것으로 알려져 있던 HYVV의 경우 토마토에 단독 감염시켰을 때 감염 되지 않았음을 확인할 수 있었으나 HYVV를 TbLCV혹은 HYVMV beta-satellite DNA와 함께 감염시켰을 때 토마토에 감염된다는 사실을 확인했다.
- 토마토 품종별 TYLCV 감염 시기에 따른 피해해석 결과 TYLCV 저항성 품종도 육안으로 관찰되는 병징은 나타나지 않았으나 바이러스 유묘기에 바이러스에 감염될 경우 건전주에 비하여 25%정도의 수량감소를 나타냈다. 바이러스 감염시기가 정식 30일 이후에는 건전주와 수량지수에서 통계적 유의성이 없어 정상적으로 재배가 가능하였다. TYLCV에 감수성인 일반품종은 유묘기에 바이러스에 감염 시 생육이 억제되어 정상적인 재배가 불가능 하였으며, 바이러스 감염 시기에 따른 토마토 생육의 차이가 뚜렷했다

- 담배가루이를 방제하지 않을 경우 시설하우스내 증식율은 초기밀도 대비 40일 후 조사에서 700% 이상 증식되었으며 토마토 품종간에는 차이가 없었다.
- 담배가루이 예찰을 위하여 황색점착트랩은 높이 1m 정도에서 유인량이 가장 많아 농가 현장에서 1m 높이에 설치하여야 할 것이다.
- TYLCV에 감염된 토마토에서 종자를 채종한 다음 파종할 경우 육안으로 나타나는 6.5% 정도,PCR 검정에서는 100% 바이러스가 검출되어 TYLCV가 종자전염이 되었다.
- 인공 접종한 토마토에서 바이러스병을 확인한 다음 채종한 모든 품종에서 종자감염이 확인되어 토마토에서의 TYLCV 종자전염이 일부 품종에 국한된 현상이 아니었다.
- 저항성 관련 유전자의 이상으로 병징이 나타난 것인지 확인하기 위해 PCR로 TYLCV 저항성 유전자인 Ty-1 유전자를 증폭시킨 뒤 제한효소 TaqI을 처리하여 분석한 결과 병징이 나타난 식물에서 저항성 품종인 박커스가 갖고 있는 Ty-1 유전자가 존재함을 확인할 수 있었다.
- TYLCV 병징으로 널리 알려진 잎말림, 잎 가장자리의 황화 현상, 위축 외에도 다양한 증상들을 관찰할 수 있었으며 대표적으로 기존 잎말림 증상과는 다른 잎 말림 병징, 줄기의 모양이 기형적으로 꺾이는 병징, 기존의 황화 병징과는 다른 형태의 퇴록 병징 등이 있었다. 각각의 품종에 나타난 병징과 바이러스량과의 상관관계를 분석하기 위해, 감염된 TYLCV량을 quantitative real-time PCR를 통해 정량적으로 분석한 결과 TYLCV의 양을 비교 분석한 결과 병징과 TYLCV의 양 사이에서 직접적인 연관성이 발견되지 않았다.
- 경북지역 과채류 육묘장인 논공제일 육묘장과 군위 육묘장에서 토마토 묘종 샘플 각각 100점씩에 대하여 PCR 검정한 결과 모든 포기에서 바이러스가 검출되지 않았다.
- YLCV 매개충인 담배가루이를 토마토 시설재배지에 1~5마리/주를 접종한 결과 토마토에 최초 병징은 5마리 접종한 처리구에서 15~20일 후 최초 발생하였으며, 담배가루이의 밀도 증가에 따라 바이러스에 감염된 토마토 식물체의 비율은 높아졌다. 담배가루이 밀도에 따라 최초 감염시기는 10일정도 차이가 있었으나 접종 50일 후 50% 이상 병징이 나타났으며, 담배가루이 접종 80일 후 모든 식물체가 바이러스에 감염되었다.
- 월동 처리 후 토마토를 정식한 결과 모든처리에서 담배가루이가 발생하지 않아 담배가루이 발생 포장에서는 동계에 하우스를 개방함으로써 담배가루이 방제가 가능하였다.
- 담배가루이를 방제하기 위하여 화학약제를 살포한 결과 담배가루이 밀도가 토마토 포기당 1마리일 경우 약제 1회 처리로 방제가 가능하였으며, 약제처리전 밀도가 10마리/주일 경우 3회 처리를 밀도를 1.2마리/주로 낮출 수 있었다.친환경방제제를 현장에 적용하기 위해서는 담배가루이 밀도가 1마리/주일 경우 3회 처리로 방제가 가능하였으나 밀도가 10마리/주일 경우 방제제 3회 처리 후 밀도가 12.5마리/주로 나타나 화학약제와 친환경방제제의 교호살포 연구가 진행되어야 할 것이다.
- ㈜에코원에서 개발한 친환경 자재인 참가루와 참진골드를 7일간격 3회 살포한 결과 담배가루이 밀도가 60%이상 감소되어 담배가루이 방제용 친환경자재로 가능성이 있었다.

3.3 연구결과(정량적)

성과목표	사업화지표										연구기반지표							
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과		교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	유전 자원 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문						
												SCI	비SCI			학술 발표	정책 활용	
최종목표	17	4	50	4	-	3	-	-	-	-	20	10	75	4	-	2	4	4
연구기간내 달성실적	20	15	50	4		3					24	6	79	12	7	2	4	6
달성율(%)	117.6	375	100	100		100					120	60	105.3	300		150	100	150

(1) 논문게재 (SCI 20 + 비SCI 10 = 총 30)

번호	게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI
			주저자	교신저자	공동저자				
1	2012	Upregulation of temperature susceptibility in <i>Bemisia tabaci</i> upon acquisition of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)	Joseph Carlo A. Pusag	이경열	Hemayet Jahan, 이관석, 이석찬	Journal of Insect Physiology	58 (10)	국외	SCI
2	2012	Molecular characterization and an infectious clone construction of <i>Sweet potato leaf curl virus</i> (SPLCV) isolated from Korea.	최은석	이석찬	이건섭, 박정안, 이택건, 최홍수	Acta Virologica	56 (3)	국외	SCI
3	2012	Upregulation of Endosymbiont Densities in <i>Bemisia tabaci</i> by Acquisition of Tomato Yellow Leaf Curl Virus	Hemayet Jahan	이경열		Current Research on Agriculture and Life Sciences	30 (2)	국내	비SCI
4	2012	Molecular Variation of Endosymbiotic Bacteria <i>Wolbachia</i> in <i>Bemisia tabaci</i> and Related Whiteflies	Hemayet Jahan	이경열		Current Research on Agriculture and Life Sciences	30 (2)	국내	비SCI
5	2013	Taxonomic Status of the <i>Bemisia tabaci</i> Complex (Hemiptera: Aleyrodidae) and Reassessment of the Number of Its Constituent Species	Wonhoon Lee	Seunghwan Lee, Shin-ichi Akimoto	Jongsun Park, Gwan-Seok Lee	PLOS ONE	8(5)	국외	SCI
6	2013	Altered invertase activities of symptomatic tissues on <i>Beet severe curly top virus</i> (BSCTV) infected <i>Arabidopsis thaliana</i>	박정안, 김소연	이석찬, 이택건	최은석, 오정균, 박종범, 김동균, 정영재	Journal of Plant Research	126 (5)	국외	SCI
7	2014	First Report of <i>Tomato yellow leaf curl virus</i> Infecting <i>Eustoma (Eustoma grandiflorum)</i> in Korea	길의준	이석찬	변희성, 김선후, 황현식, 김미경, 김창석, 최홍수	Plant Disease	98 (8)	국외	SCI
8	2014	<i>Lamium amplexicaule</i> (Lamiaceae): a weed reservoir for tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in Korea	길의준, 박정안	이석찬, 김창석	이혜정, 김재덕, 최홍수, 이경열	Archives of Virology	159 (6)	국외	SCI
9	2014	First Report of <i>Sweet potato golden vein associated virus</i> Infecting Sweet Potato in Korea	길의준	이석찬	김재덕, 변희성, 김선후, 광해련, 김미경, 최홍수, 정미남	Plant Disease	98 (8)	국외	SCI

10	2014	Differential identification of three species of Curtovirus using loop-mediated isothermal amplification.	길의준	이석찬	조상호, 변희성, 김재덕, 황현식, 오정균, 허노열, 신용길	Acta Virologica	58 (2)	국외	SCI
11	2014	Rapid Detection and Identification of Six <i>Tomato yellow leaf curl virus</i> Isolates from Different Regions Using Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis	박정안, 길의준	이석찬	김재덕, 신용길, 허노열	Journal of Phytopathology	162 (4)	국외	SCI
12	2014	Sweet pepper confirmed as a reservoir host for tomato yellow leaf curl virus by both agro-inoculation and whitefly-mediated inoculation	길의준, 변희성	이석찬, 김지광	김선후, 김재덕, 박정안, 양동철, 이경열, 최홍수	Archives of Virology	159 (9)	국외	SCI
13	2014	First Report of <i>Chickpea chlorotic dwarf virus</i> Infecting Hot pepper in India	변희성	이석찬	길의준, 김선후, 황현식, 이장하, 정영재	Plant Disease	98 (11)	국외	SCI
14	2014	Three species of the <i>Bemisia tabaci</i> (Hemiptera: Aleyrodidae) complex in the Republic of Korea; Detection by an extensive field survey combined with a phylogenetic analysis	이원훈	이관석	이설매, 김창석, 최홍수, 아키토모 신이치, 이경열	Florida Entomologist	97 (1)	국외	SCI
15	2014	Upregulation of probing- and feeding-related behavioural frequencies in <i>Bemisia tabaci</i> upon acquisition of Tomato yellow leaf curl virus	Hemayet Jahan	이경열	이관석, 이석찬	Pest Management Science	70 (10)	국외	SCI
16	2014	Acquisition of <i>Tomato yellow leaf curl virus</i> enhances attraction of <i>Bemisia tabaci</i> to green light emitting diodes	Hemayet Jahan	이경열	이관석, 이석찬	Journal of Asia-Pacific Entomology	17 (1)	국외	SCI
17	2014	Molecular identification of parasitoid, <i>Encarsia formosa gahan</i> in <i>Bemisia tabaci</i> (Gennadius) and determination of its secondary endosymbionts	Hemayet Jahan	Hemayet Jahan	이경열, MIA Howlader, HMK Bashar, GN Hasan	Bangladesh Journal of Agricultural Research	39 (4)	방글라데시	비SCI
18	2015	Oral ingestion of heat shock protein 70 dsRNA is lethal under normal and thermal stress conditions in the sweetpotato whitefly, <i>Bemisia tabaci</i>	심재경	이경열	이관석, 이석찬	Journal of Asia-Pacific Entomology	18 (4)	대한민국	SCI
19	2015	Advanced loop-mediated isothermal amplification method for sensitive and specific detection of <i>Tomato chlorosis virus</i> using a uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination	길의준	이석찬	김선후, 이지, 강은하, 이민지, 조상호, 김미경, 이경열, 허노열, 최홍수, 권석태	Journal of Virological Methods	213	네덜란드	SCI
20	2015	Identification of natural weed hosts of <i>Tomato chlorosis virus</i> in Korea by RT-PCR with root tissues	길의준, 이지	이석찬, 김창석	조승찬, 오정균, 김동균, 이경열, 김미경, 최홍수	European Journal of Plant Pathology	142 (2)	네덜란드	SCI
21	2015	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> can overwinter in <i>Stellaria aquatica</i> , a winter-hardy TYLCV-reservoir weed	길의준	이석찬, 김창석	변희성, 김선후, 조승찬, 조성래, 노강산, 이경열, 최홍수	Plant Disease	99 (5)	미국	SCI
22	2015	Seed transmission of <i>Sweet potato leaf curl virus</i> in sweet potato (<i>Ipomoea batatas</i>)	김재덕	이석찬	길의준, 김선후, 서하늘, 변희성, 박정안, 정미남, 광해린, 김미경, 김창석, 양정욱, 이경열, 최홍수	Plant Pathology	64 (6)	영국	SCI
23	2015	The third genotypic clusters of <i>Bemisia tabaci</i> (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) found in Bangladesh	Hemayet Jahan	Hemayet Jahan	이경열, MIA Howlader	Bangladesh Journal of Agricultural Research	40 (1)	방글라데시	비SCI

24	2015	Molecular divergence of secondary endosymbiont, <i>Cardinium</i> in <i>Bemisia tabaci</i> (Gennadius) and associates	Hemayet Jahan	Hemayet Jahan	이경열, MIA Howlader, HMK Bashar, GN Hasan	Bangladesh Journal of Agricultural Research	40 (1)	방글라데시	비SCI
25	2016	The JpL species of the <i>Bemisia tabaci</i> complex in Korea: Detection by an extensive field survey and analysis of COI sequence variability	이원훈	이관석	김창석, 이경열	Journal of Asia-Pacific Entomology	19 (1)	대한민국	SCI
26	2016	Azadirachtin ingestion is lethal and inhibits expression of ferritin and thioredoxin peroxidase genes of the sweetpotato whitefly <i>Bemisia tabaci</i>	M. Asaduzza man	이경열	심재경, 이석찬	Journal of Asia-Pacific Entomology	19 (1)	대한민국	SCI
27	2016	Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-IL): a seed-transmissible geminivirus in tomatoes	길의준, 김선후	이석찬, 최홍수	이예지, 변희성, 박정호, 서하늘, 김창석, 심재경, 이중환, 김지광, 이경열	Scientific Reports	6	미국	SCI
28	2016	First report of <i>Euphorbia leaf curl virus</i> in passion fruits in South Korea and its natural occurrence in papaya	길의준	이석찬	서하늘, 서승석, 이택건, 이경열, 이중환, 김지광, 고숙주, 최홍수, 김창석	Plant Disease	100 (4)	미국	SCI
29	2016	First report of <i>Papaya leaf curl virus</i> in papayas in Korea and recovery of its symptoms	변희성	이석찬	길의준, 서하늘, 서승석, 이택건, 이중환, 김지광, 이경열, 고숙주, 최홍수, 김창석, 이관석	Plant Disease	100 (9)	미국	SCI
30	2017	미토콘드리아 COI 유전자 분석을 통한 담배가루이 종복합군의 분류학적 재평가	이원훈	이관석		한국응용곤충학회지	56	한국	비SCI

(2) 지식재산권 (특허 출원 20, 특허 등록 15)

지식재산권[발명특허, 실용신안, 의장, 상표, 규격], **신품종, 프로그램개발** 등으로 구분하고, 세부적으로 전부(건별로)기록하며, 국외인 경우 반드시 국명을 기록합니다

구분	연도	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기타
				출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	2012	국내 토마토황화잎말림바이러스의 DNA-A 및 무늬인동황화잎맥모자이크바이러스의 베타 위성 DNA에 대한 바이러스 유전자 및 재조합 플라스미드	대한민국	성균관대학교 산학협력단	20120503	10-2012-0046970				
2	2012	담배잎말림바이러스를 검출하기 위한 등온 증폭 반응용 프라이머 조성물, 및 이의 이용	대한민국	성균관대학교 산학협력단	20121102	10-2012-0123842				
3	2012	무늬인동황화잎맥모자이크바이러스의 베타 위성 DNA를 검출하기 위한 등온 증폭 반응용 프라이머 조성물, 및 이의 이용	대한민국	성균관대학교 산학협력단	20121102	10-2012-0123844				
4	2012	무늬인동식물바이러스를 검출하기 위한 등온 증폭 반응용 프라이머 조성물, 및 이의 이용	대한민국	성균관대학교 산학협력단	20121102	10-2012-0123843				
5	2012	고구마잎말림바이러스를 검출하기 위한 등온 증폭 반응용 프라이머 조성물, 및 이의 이용	대한민국	성균관대학교 산학협력단	20121102	10-2012-0123845				
6	2012	토마토황화잎말림바이러스를 검출하기 위한 등온 증폭 반응용 프라이머 조성물, 및 이의 이용	대한민국	성균관대학교 산학협력단	20121105	10-2012-0124504				
7	2012	순무황화모자이크바이러스를 검출하기 위한 등온 증폭 반응용 프라이머 조성물, 및 이의 이용	대한민국	성균관대학교 산학협력단	20121228	10-2012-0156467				

8	2012	잠두위조바이러스를 검출하기 위한 등온증폭 반응용 프라이머 조성물, 및 이의 이용	대한민국	성균관대학교 산학협력단	20121228	10-2012-0156469					
9	2012	사탕무황화바이러스를 검출하기 위한 등온증폭 반응용 프라이머 조성물, 및 이의 이용	대한민국	성균관대학교 산학협력단	20121228	10-2012-0156470					
10	2012	오이모자이크바이러스를 검출하기 위한 등온증폭 반응용 프라이머 조성물, 및 이의 이용	대한민국	성균관대학교 산학협력단	20121228	10-2012-0156471					
11	2012	스퀴시모자이크바이러스를 검출하기 위한 등온증폭 반응용 프라이머 조성물, 및 이의 이용	대한민국	성균관대학교 산학협력단	20121228	10-2012-0156472					
12	2012	주박모자이크바이러스를 검출하기 위한 등온증폭 반응용 프라이머 조성물, 및 이의 이용	대한민국	성균관대학교 산학협력단	20121228	10-2012-0156473					
13	2013	무늬인동황화잎맥모자이크바이러스 베타위성 DNA검출용 프라이머 세트 및 이를 이용한 무늬인동황화잎맥모자이크바이러스 베타위성 DNA검출방법	대한민국	성균관대학교 산학협력단	20130701	10-2013-0076517					
14	2013	니코티아나 벤타미아나 추출물을 유효성분으로 포함하는 해충 방제용 조성물	대한민국	경북대학교 산학협력단	20131022	10-2013-0126055					
15	2013	온실가루이 진단을 위한 특이 프라이머 및 이의 용도	대한민국	경북대학교 산학협력단	20131031	10-2013-0131423					
16	2013	등온증폭법을 이용한 토마토포록바이러스 검출 방법	대한민국	농촌진흥청	20131104	10-2013-0132701					
17	2013	가루이 매개 토마토 바이러스 다중 진단용 프라이머 세트 및 이를 이용한 진단 방법	대한민국	농촌진흥청	20131119	10-2013-0140576					
18	2013	국내 토마토포록바이러스의 DNA-A 유전자 및 무늬인동황화잎맥모자이크바이러스의 베타 위성 DNA 유전자, 및 이를 이용한 식물체 감염시스템	대한민국	농촌진흥청	20131223	10-2013-0161195					
19	2015	등온증폭법을 이용한 토마토포록바이러스 검출 방법	대한민국	농촌진흥청	20150617	10-2015-0086190					
20	2016	해충방제용 끈끈이트랩	대한민국	경북대학교 산학협력단	20160705	10-2016-0084726					
21	2014	담배잎말림바이러스를 검출하기 위한 등온증폭반응용 프라이머 조성물, 및 이의 이용	대한민국				성균관대학교 산학협력단	20140515	101398286		
22	2014	토마토포록바이러스를 검출하기 위한 등온증폭반응용 프라이머 조성물, 및 이의 이용	대한민국				성균관대학교 산학협력단	20140718	101423395		
23	2014	고구마잎말림바이러스를 검출하기 위한 등온증폭반응용 프라이머 조성물, 및 이의 이용	대한민국				성균관대학교 산학협력단	20140725	101425725		
24	2014	무늬인동황화잎맥모자이크바이러스의 베타 위성 DNA를 검출하기 위한 등온증폭반응용 프라이머 조성물, 및 이의 이용	대한민국				성균관대학교 산학협력단	20140725	101425724		
25	2014	무늬인동식물바이러스를 검출하기 위한 등온증폭 반응용 프라이머 조성물, 및 이의 이용	대한민국				성균관대학교 산학협력단	20140725	101425723		
26	2014	국내 토마토포록바이러스의 -A 유전자 및 무늬인동황화잎맥모자이크바이러스의 베타 위성 DNA 유전자, 및 이를 이용한 식물체 감염시스템	대한민국				성균관대학교 산학협력단	20140808	101430805		
27	2014	국내 토마토포록바이러스의 -A 유전자 및 무늬인동황화잎맥모자이크바이러스의 베타 위성 DNA 유전자, 및 이를 이용한 식물체 감염시스템 (분할특허)	대한민국				성균관대학교 산학협력단	20141027	101457310		

28	2014	순무황화모자이크바이러스를 검출하기 위한 등온증폭 반응용 프라이머 조성물, 및 이의 이용	대한민국			성균관대학교 산학협력단	20141027	101457273	
29	2014	잠두위조바이러스 2를 검출하기 위한 등온증폭 반응용 프라이머 조성물, 및 이의 이용	대한민국			성균관대학교 산학협력단	20141027	101457274	
30	2014	사탕무황화바이러스를 검출하기 위한 등온증폭 반응용 프라이머 조성물, 및 이의 이용	대한민국			성균관대학교 산학협력단	20141027	101457275	
31	2015	수박모자이크바이러스를 검출하기 위한 등온증폭 반응용 프라이머 조성물, 및 이의 이용	대한민국			성균관대학교 산학협력단	20150105	101481246	
32	2015	스퀴시모자이크바이러스를 검출하기 위한 등온증폭 반응용 프라이머 조성물, 및 이의 이용	대한민국			성균관대학교 산학협력단	20150105	101481245	
33	2015	가루이 매개 토마토 바이러스 다중 진단용 프라이머 세트 및 이를 이용한 진단 방법	대한민국			성균관대학교 산학협력단	20150818	101546758	
34	2015	등온증폭법을 이용한 토마토포록바이러스 검출 방법	대한민국			성균관대학교 산학협력단	20151030	101566480	
35	2015	니코티아나 벤타미아나 추출물을 유효성분으로 포함하는 해충 방제용 조성물	대한민국			경북대학교 산학협력단	20151201	101575411	

(3) 국내 및 국제 학술회의 발표 (총 77건)

국내 및 국제 학술회의 발표(학술회의명을 세부적으로 전부(건별로) 기록하고, 국외인 경우 반드시 국명을 기록.- 본 연구과제의 수행결과로 발표한 것만 기재합니다.)

번호	제목	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	Development of a reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of five potato viruses	2012 KSPP International Conference	조상호, 강술, 김의준, 변희성, 김선무, 오정균, 이영규, 이석찬	2012.10.24	서울대학교	대한민국
2	Oral toxicity of entomopathogenic symbiotic bacterium <i>Photobacterium</i> <i>temperata</i> against various insects and nematodes	24th International Congress of Entomology	M. Asaduzzaman, 양쿠마르, 안준영, 심재경, 이영진, 이경열	2012.08.20	대구 EXCO	대한민국
3	Identification of biotypes and secondary endosymbionts of <i>Bemisia tabaci</i> in Korea and relationships with the occurrence of TYLCV disease	24th International Congress of Entomology	S.M.H.Jahan, 박정안, 최홍수, 이관석, 김창석, 이석찬, 이경열	2012.08.20	대구 EXCO	대한민국
4	Molecular identification of spiraling whitefly <i>Aleurodicus dispersus</i> (Hemiptera: Aleyrodidae) and prevalence of secondary endosymbionts	24th International Congress of Entomology	S.M.H. Jahan, 이관석, 이석찬, 이경열	2012.08.20	대구 EXCO	대한민국
5	TYLCV acquisition influenced the attraction of whiteflies <i>Bemisia tabaci</i> to the green light emitting diodes (LED)	24th International Congress of Entomology	S.M.H. Jahan, 이관석, 이석찬, 이경열	2012.08.20	대구 EXCO	대한민국
6	Up-regulation of temperature susceptibility in <i>Bemisia tabaci</i> upon acquisition of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)	24th International Congress of Entomology	J.C.A. Pusag, S.M.H.Jahan, 이관석, 이석찬, 이경열	2012.08.20	대구 EXCO	대한민국
7	Identification of <i>Lamium amplexicaule</i> (Lamiaceae) as a reservoir host for Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in Korea	2012 KSPP International Conference	박정안, 김창석, 김의준, 김재덕, 이민지, 채지숙, 이석찬, 최홍수	2012.10.24	서울대학교	대한민국
8	Visual detection of ribosomal RNA sequences of secondary endosymbionts held by <i>Bemisia tabaci</i> using loop-mediated isothermal amplification (LAMP)	2012 KSPP International Conference	이민지, 박정안, 조상호, 변희성, 김의준, 김재덕, 이경열, 이석찬	2012.08.20	서울대학교	대한민국
9	Use of the loop-mediated isothermal amplification method for identification of Begomovirus and its satellite DNA isolated in Korea	2012 KSPP International Conference	박정안, 김의준, 정유철, 김재덕, 노강산, 조성래, 이석찬, 최홍수	2012.10.24	서울대학교	대한민국

10	TYLCV Korean isolate can infect sweet peppers by agro-inoculation	2012 KSPP International Conference	길의준, 변희성, 박정안, 김재덕, 조승찬, 최홍수, 이석찬, 김지광	2012.10.24	서울대학교	대한민국
11	Synergistic effects on infectivity and symptom severity of beta-satellite DNA to Honeysuckle yellow vein virus in tomato and <i>N.benthamiana</i>	2012 KSPP International Conference	길의준, 변희성, 박정안, 김재덕, 강술, 최홍수, 이석찬, 이중환	2012.10.24	서울대학교	대한민국
12	Sweet potato leaf curl virus transmission via seeds	2012 KSPP International Conference	김재덕, 정미남, 안승현, 광해련, 박정안, 길의준, 김미경, 이석찬, 최홍수	2012.10.24	서울대학교	대한민국
13	Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification methods for rapid detection of plant RNA viruses which affect several economically import	2012 KSPP International Conference	변희성, 길의준, 김미경, 조상호, 이민지, 박정안, 김재덕, 이석찬, 최홍수	2012.10.24	서울대학교	대한민국
14	Molecular evidence of Apple stem grooving virus host adaptation based on sequence analysis	2012 KSPP International Conference	김재덕, 광해련, 이준성, 박정안, 길의준, 김미경, 이석찬, 최홍수	2012.10.24	서울대학교	대한민국
15	외래집입해충 담배가루이의 확산 및 위해성 분석	2012 한국응용곤충학회	이경열, 이관석, 이석찬	2012.10.11	강원도 평창	대한민국
16	Effect of TYLCV acquisition on the behavior and physiological changes of vector insects, <i>Bemisia tabaci</i>	2012 한국응용곤충학회 추계학술발표회	헤마엣자한, 이관석, 이석찬, 이경열	2012.10.11	강원도 용평	대한민국
17	Discovery of a Bemisia genetic group (Hemiptera: Aleyrodidae) infected with Tobacco leaf curl virus (TbLCV) on a wild host in Koea.	2012 한국응용곤충학회 추계학술발표회	이관석, 이설미, 권희련, 김창석, 최홍수, 이석찬, 이경열	2012.10.11	강원도 용평	대한민국
18	Effects of TYLCV acquisition on the behavioral and physiological changes of vector insect, <i>Bemisia tabaci</i>	First International Whitefly Symposium	이경열, 헤마엣자한, 이석찬	2013. 5. 20-24	Crete, Greece	Greece
19	Acquisition of TYLCV enhances attraction of <i>Bemisia tabaci</i> to green light emitting diodes	First International Whitefly Symposium	헤마엣자한, 이관석, 김창석, 최홍수, 이영진, 이경열	2013. 5. 20-24	Crete, Greece	Greece
20	Upregulation of temperature susceptibility in <i>Bemisia tabaci</i> upon acquisition of TYLCV	First International Whitefly Symposium	조셉 푸사, 헤마엣자한, 이중환, 김지광, 이석찬, 이경열	2013. 5. 20-24	Crete, Greece	Greece
21	An indigenous geentic group of <i>Bemisia tabaci</i> infected 재소 TbLCV on a wild plant in Korea	First International Whitefly Symposium	이관석, 외 7명	2013. 5. 20-24	Crete, Greece	Greece
22	Host weed for reproduction of TYLCV-viruliferous <i>Bemisia tabaci</i> and TYLCV in Korea	First International Whitefly Symposium	김창석 외 7명	2013. 5. 20-24	Crete, Greece	Greece
23	Upregulation of Temperature Susceptibility in <i>Bemisia tabaci</i> upon Acquisition of Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV)	7차 국제 제미니바이러스 심포지움	조셉 푸사, 헤마엣자한, 이관석, 김창석, 이석찬, 이경열	2013,11, 3-9	항주우	중국
24	Temperature effects on plant virus transmission of vector insect <i>Bemisia tabaci</i>	한국응용곤충학회 추계학술발표회	이경열, 이관석, 김창석, 이석찬	2013.10.24-25	강원도 횡성	대한민국
25	Insecticidal and repellent effects of <i>Nicotiana benthamiana</i> against the sweetpotato whitefly <i>Bemisia tabaci</i>	한국응용곤충학회 추계학술발표회	살마 수산트, 심재경, 이경열	2013.10.24-25	강원도 횡성	대한민국
26	Three species of the <i>Bemisia tabaci</i> complex in Korea: detection by an extensive field survey combined with a phylogenetic analysis	한국응용곤충학회 추계학술발표회	이관석, 이설매, 최홍수, 이경열, 이원훈	2013.10.24-25	강원도 횡성	대한민국
27	Taxonomic status of the <i>Bemisia tabaci</i> complex (Hemiptera: Aleyrodidae) and reassessment of the number of its constituent species	한국응용곤충학회 추계학술발표회	이원훈, 이승환, 아키모토 신이치, 이관석	2013.10.24-25	강원도 횡성	대한민국
28	Identification of alternative weed hosts for Tomato chlorosis virus in Korea 토마토휘록바이러스(ToCV) 및	한국식물병리학회 추계학술발표회	김창석, 이예지, 길의준, 최상호, 김미경, 광해련, 서장균, 이석찬, 최홍수	2013.10.17	전남 순천	대한민국
29	토마토휘록바이러스(TYLCV)에 보독된 담배가루이의 증식 및 TYLCV 감염 잡초기주	한국잡초학회 추계학술발표회	김창석 외 6명	2013.10.35	강원도 강릉	대한민국
30	Determination and phylogenetic analysis of complete nucleotide sequences of Tomato chlorosis virus isolates from tomato in Korea	한국식물병리학회 추계학술발표회	이예지, 길의준, 김주희, 송정협, 광해련, 서장균, 최홍수, 이석찬, 김미경	2013.10.17	전남 순천	대한민국
31	First report of Tomato chlorosis virus from tomato in Korea	한국식물병리학회 추계학술발표회	이예지, 김주희, 광미란, 광해련, 서장균, 정성수, 최홍수, 이석찬, 김미경	2013.10.17	충남대	대한민국
32	Taxonomic status of the <i>Bemisia tabaci</i> complex (Hemiptera: Aleyrodidae) and reassessment of the number of its constituent species	한국응용곤충학회 추계학술발표회	이원훈, 이승환, 아키모토 신이치, 이관석	2014. 4.23-24	강원도 평창	한국

33	Three species of the Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae) complex in the Republic of Korea; Detection by an extensive field survey combined with a phylogenetic analysis	한국응용곤충학회 추계학술발표회	이관석, 이설매, 최홍수, 이경열, 이원훈	2014. 10.16-17	경북 문경	한국
34	Effects of Nicotiana benthamiana extracts on toxicity and gene expression of the Bemisia tabaci	한국응용곤충학회 추계학술발표회	Sharma Sushant Raj, Jae-Kyoung Shim, Bong-gi Choi, Shafeeq Tahir, Kyeong-Yeoll Lee	2014. 4.23-24	강원도 평창	한국
35	Phylogenetic relationships, recombination analysis, and genetic variability among tomato yellow leaf curl virus in Korea	2014년 한국식물병리학회 추계학술발표회	이예지, 광혜린, 서장균, 최홍수, 이석찬, 김미경	2014. 4.24-26	안동대학교	대한민국
36	Identification of weed reservoirs for Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in Korea and overwintering in a winter-hardy TYLCV-reservoir weed	2014년 한국식물병리학회 추계학술발표회 및 제3회 한일공동심포지엄	길의준, 변희성, 김선후, 서하늘, 조승찬, 조성래, 황마이풍, 김동준, 정영재, 최홍수, 이경열, 김창석, 이석찬	2014년 10월 23일	부산 부경대학교	대한민국
37	Sweet pepper and hot pepper confirmed as a reservoir host for Tomato yellow leaf curl virus by both agro-inoculation and whitefly-mediated inoculation	2014년 한국식물병리학회 추계학술발표회 및 제3회 한일공동심포지엄	길의준, 변희성, 김선후, 서하늘, 조승찬, 조성래, 황마이풍, 김동준, 오정균, 김동균, 최홍수, 이경열, 김창석, 김지광, 이석찬	2014년 10월 23일	부산 부경대학교	대한민국
38	First report of Tomato yellow leaf curl virus infecting eustoma (Eustoma grandiflorum) in Korea	2014년 한국식물병리학회 추계학술발표회 및 제3회 한일공동심포지엄	길의준, 변희성, 김선후, 서하늘, 조승찬, 황마이풍, 조성래, 김동준, 황현식, 김미경, 김창석, 최홍수, 이경열, 이석찬	2014년 10월 23일	부산 부경대학교	대한민국
39	Identification of natural weed hosts of Tomato chlorosis virus in Korea by RT-PCR with root tissues	2014년 한국식물병리학회 추계학술발표회 및 제3회 한일공동심포지엄	길의준, 이예지, 조승찬, 변희성, 김선후, 서하늘, 조성래, 김동준, 김동균, 정영재, 이경열, 김미경, 최홍수, 김창석, 이석찬	2014년 10월 23일	부산 부경대학교	대한민국
40	Advanced loop-mediated isothermal amplification method for sensitive and specific detection of Tomato chlorosis virus using a uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination	2014년 한국식물병리학회 추계학술발표회 및 제3회 한일공동심포지엄	길의준, 김선후, 이예지, 변희성, 서하늘, 조승찬, 황마이풍, 조상호, 조성래, 김동준, 김미경, 이경열, 허노열, 최홍수, 권석태, 이석찬	2014년 10월 23일	부산 부경대학교	대한민국
41	First report of Chickpea chlorotic dwarf virus infecting hot pepper in India	2014년 한국식물병리학회 추계학술발표회 및 제3회 한일공동심포지엄	변희성, 길의준, 김선후, 서하늘, 황마이풍, 조성래, 조승찬, 김동준, 황현식, 오정균, 김동균, 이장하, 정영재, 이석찬	2014년 10월 23일	부산 부경대학교	대한민국
42	Loop-mediated isothermal amplification of sweet potato infecting viruses	2014년 한국식물병리학회 추계학술발표회 및 제3회 한일공동심포지엄	김선후, 길의준, 변희성, 서하늘, 황마이풍, 조성래, 조승찬, 김동준, 김미경, 이경열, 최홍수, 김창석, 이석찬	2014년 10월 23일	부산 부경대학교	대한민국
43	Seed transmission of Sweet potato leaf curl virus in sweet potato (Ipomoea batatas)	2014년 한국식물병리학회 추계학술발표회 및 제3회 한일공동심포지엄	김재덕, 길의준, 김선후, 변희성, 서하늘, 황마이풍, 조승찬, 김동준, 조성래, 정미남, 광혜린, 김미경, 양정욱, 이경열, 최홍수, 이석찬	2014년 10월 23일	부산 부경대학교	대한민국
44	Advanced loop-mediated isothermal amplification method for sensitive and specific detection of Tomato chlorosis virus using a uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination	2014년 한국식물병리학회 추계학술발표회 및 제9회 한일국제공동심포지엄	길의준, 김선후, 이예지, 변희성, 조승찬, 황마이풍, 조상호, 조성래, 김동준, 김미경, 이경열, 허노열, 최홍수, 권석태, 이석찬	2014년 10월 30일	대구 경북대학교	대한민국
45	Advanced loop-mediated isothermal amplification method for sensitive and specific detection of Tomato chlorosis virus using a uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination	한국분자세포생물학회 2014년도 정기학술대회	길의준, 김선후, 이예지, 변희성, 조승찬, 황마이풍, 조상호, 조성래, 김동준, 김미경, 이경열, 허노열, 최홍수, 권석태, 이석찬	2014년 10월 22일	서울 코엑스	대한민국
46	Identification of weed reservoirs for Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in Korea and overwintering in a winter-hardy TYLCV-reservoir weed	5th Asian Conference of Plant Pathology	길의준, 변희성, 김선후, 서하늘, 조승찬, 조성래, 황마이풍, 김동준, 이석찬	2014년 11월 3일 ~ 6일	치앙마이 엠프레스 컨벤션 센터	태국
47	Sweet pepper and hot pepper confirmed as reservoir hosts for Tomato yellow leaf curl virus by both agro-inoculation and whitefly-mediated inoculation	5th Asian Conference of Plant Pathology	변희성, 길의준, 김선후, 서하늘, 조승찬, 조성래, 황마이풍, 김동준, 이석찬	2014년 11월 3일 ~ 6일	치앙마이 엠프레스 컨벤션 센터	태국
48	Identification of weed reservoirs for Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in Korea and overwintering in a winter-hardy TYLCV-reservoir weed	The 5th International Conference of Clinical Plant Science 2014	길의준, 변희성, 김선후, 서하늘, 조승찬, 조성래, 황마이풍, 김동준, 심재경, 정영재, 최홍수, 김창석, 이석찬, 이경열	2014년 12월 5일 ~ 7일	평등 國立屏東科技大學	대만

49	Advanced loop-mediated isothermal amplification method for sensitive and specific detection of <i>Tomato chlorosis virus</i> using a uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination	The 5 th International Conference of Clinical Plant Science 2014	길의준, 김선후, 이에지, 변희성, 조승찬, 황마이풍, 조상호, 조성래, 김동준, 심재경, 김미경, 최홍수, 이석찬, 이경열	2014년 12월 5일 ~ 7일	핑둥 國立屏東科技大學	대만
50	Sweet pepper and hot pepper confirmed as a reservoir host for <i>Tomato yellow leaf curl virus</i> by both agro-inoculation and whitefly-mediated inoculation	The 5 th International Conference of Clinical Plant Science 2014	길의준, 변희성, 김선후, 서하늘, 조승찬, 조성래, 황마이풍, 김동준, 심재경, 최홍수, 김창석, 김지광, 이석찬, 이경열	2014년 12월 5일 ~ 7일	핑둥 國立屏東科技大學	대만
51	The recent invasion of plant virus and vector insects in Korea Physiological changes of vector insect <i>Bemisia tabaci</i> on the transmission of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)	The 5 th International Conference of Clinical Plant Science 2014	이경열, 김정수, 최홍수, 이관석, 이석찬	2014년 12월 5일 ~ 7일	핑둥 國立屏東科技大學 Pingtung National University	대만
52	RNAi regulation of heat shock protein gene of <i>Bemisia tabaci</i>	The 5 th International Conference of Clinical Plant Science 2014	심재경, 최봉기, 구진모, 정덕용, 길의준, 변희성, 서하늘, 이석찬, 이경열	2014년 12월 5일 ~ 7일	핑둥 國立屏東科技大學 Pingtung National University	대만
53	Effects of TYLCV acquisition on the pesticide susceptibility of a vector insect <i>Bemisia tabaci</i>	The 5 th International Conference of Clinical Plant Science 2014	최봉기, 심재경, 김동우, 김선후, 변희성, 조승찬, 이석찬, 이경열	2014년 12월 5일 ~ 7일	핑둥 國立屏東科技大學 Pingtung National University	대만
54	담배가루이 방제를 위한 식물유래 추출물 처리 효과 Controlling Effect of Plant Extracts on <i>Bemisia</i> in Tomato Plants	한국유기농업학회 2015년도 정기총회 및 국제심포지엄	이중환, 손창기, 구경분, 이형철, 이경열	2015.10.15.-16	전라남도 농업기술원	대한민국
55	토마토 제배 시 담배가루이의 화학적 방제 효과 Effect for Chemical Control of Flies in Protected Cultivation of Cherry Tomato	한국원예학회 103차 추계학술발표회	김지광, 인민식, 이정, 이순계	2015.10.30	여수	대한민국
56	The JpL species of the <i>Bemisia tabaci</i> complex in Korea: detection by an extensive field survey and analysis of COI sequence variability	2015년도 한국응용곤충학회 추계학술발표회	Wonhoon Lee, Gwan-Seok Lee	2015.10.15.-16	군산GSCO	대한민국
57	Effect of oral ingestion of dsRNA of the sweetpotato whitefly, <i>Bemisia tabaci</i>	2015년도 한국응용곤충학회 춘계학술발표회	Jae-Kyoung Shim, Duck-Oung Jung, Bong-Gi Choi, Kyeong-Yeoll Lee	2015.4.22.-24	리솜스파캐슬(충남 예산)	대한민국
58	Acquisition of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) change the pesticide susceptibility on the vector <i>Bemisia tabaci</i>	2015년도 한국응용곤충학회 춘계학술발표회	Bong-Gi Choi, Jae-Kyoung Shim, Kyeong-Yeoll Lee	2015.4.22.-24	리솜스파캐슬(충남 예산)	대한민국
59	Seed transmission of Tomato yellow leaf curl virus	2015년도 한국식물병리학회 추계국제학술대회	길의준, 김선후, 이에지, 변희성, 박정호, 서하늘, 최은영, 김창석, 심재경, 이중환, 김지광, 이경열, 최홍수, 이석찬	2015. 10. 22	거제 대명리조트	대한민국
60	First report of <i>Euphorbia leaf curl virus</i> infecting papaya	2015년도 한국식물병리학회 추계국제학술대회	길의준, 변희성, 박정호, 최은영, 조승찬, 조성래, 오정관, 이경열, 이중환, 김지광, 고숙주, 최홍수, 김창석, 이석찬	2015. 10. 22	거제 대명리조트	대한민국
61	First report of <i>Papaya leaf curl virus</i> in papaya and recovery of its symptom in Korea	2015년도 한국식물병리학회 추계국제학술대회	변희성, 길의준, 서하늘, 박정호, 최은영, 노강산, 김동준, 이경열, 이중환, 김지광, 고숙주, 최홍수, 김창석, 이석찬	2015. 10. 22	거제 대명리조트	대한민국
62	이온화에너지를 이용한 과수해충 적용과 문제점	2015 한국응용곤충학회 임시총회 및 추계학술발표회	이경열	2015.10.15.-16	군산GSCO	대한민국
63	곤충을 이용하는 식물바이러스의 확산 전략: 담배가루이와 토마토황화잎말림바이러스	2015년도 한국응용곤충학회 추계학술발표회	김경종, 류형주, 박동현, 최기표, 한경미, 최봉기, 이경열	2015.10.15.-16	군산GSCO	대한민국
64	Molecular cloning of the glucose regulated protein 78 (Grp78) gene of <i>Bemisia tabaci</i> , and its expression in response to thermal and nutrient stress	2015년도 한국응용곤충학회 추계학술발표회	최봉기, 심재경, 이경열	2015.10.15.-16	군산GSCO	대한민국
65	Oral ingestion of heat shock protein 70 dsRNA is lethal under normal and thermal stress conditions in the sweetpotato whitefly, <i>Bemisia tabaci</i>	The 6 th International Conference of Clinical Plant Science 2015	심재경, 이관석, 이석찬, 이경열	2015.12.5	도쿄, 일본	대한민국
66	Oral and contact toxicity of <i>Nicotiana benthamiana</i> against the sweetpotato whitefly <i>Bemisia tabaci</i>	2016년도 한국곤충학회 국제심포지움 하계학술연구발표회	Jae-Kyeong Shim, MS. Fatema Khatun, Kyeong-Yeoll Lee	2016년 8월 14일 ~ 15일	경북 예천군 예천웨딩홀	대한민국
67	RNAi suppression of the vitality of the sweetpotato whitefly, <i>Bemisia tabaci</i>	2016년도 한국곤충학회 국제심포지움 하계학술연구발표회	Jae-Kyoung Shim, Gwan-Seok Lee, Sukchan Lee, Kyeong-Yeoll Lee	2016년 8월 14일 ~ 15일	경북 예천군 예천웨딩홀	대한민국
68	침입곤충의 온도감수성과 기후변화의 영향	2016 한국응용곤충학회 임시총회 및 추계학술발표회	이경열	2016년 10월 20일~21일	롯데 부여리조트	대한민국

69	Phylogenetic Analysis of Sweetpotato Whitefly Bemisia tabaci in Bangladesh	2016 한국응용곤충학회 임시총회 및 추계 학술발표회	MS. Fatema Khatun, Pijush Kanti Jhan, Kyeong-Yeoll Lee	2016년 10월 20일~21일	롯데 부여리조트	대한민국
70	담배가루이에 대한 남 추출물의 경구독성 및 현장 적용 효과	2016 한국응용곤충학회 임시총회 및 추계 학술발표회	심재경, 황활수, 정덕웅, 이형철, 구경분, 이경열	2016년 10월 20일~21일	롯데 부여리조트	대한민국
71	Highly specific and rapid detection of Hamiltonella defense, a secondary endosymbiont of Bemisia tabaci, which plays critical roles on TYLCV transmission by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay	2016 한국응용곤충학회 임시총회 및 추계학술발표회	최은영, 서하늘, 김의준, 변희성, 심재경, 김지광, 이중환, 이관석, 김창석, 최홍수, 이석찬, 이경열	2016년 10월 20일~21일	롯데 부여리조트	대한민국
72	Phylogeographic analysis of Sweepvirus full genome to trace the virus introduction to Korea	2016년 한국식물병리학회 추계학술발표회	김재덕, 광해린, 김미경, 서장관, 정미남, 양정욱, 이정보, 남상식, 김정수, 이석찬, 최홍수	2016년 10월 19일~21일	서울대학교 평창캠퍼스	대한민국
73	First report of seed transmission of Tomato yellow leaf curl Thailand virus in tomato	2016년 한국식물병리학회 추계학술발표회	김의준, 변희성, 최은영, 박정호, 김동준, 조문주, 이용준, 조성래, 박동훈, 오정관, 김지광, 이중환, 이관석, 최홍수, 김창석, 이경열, 이석찬	2016년 10월 19일~21일	서울대학교 평창캠퍼스	대한민국
74	Seed transmission of Tomato yellow leaf curl virus in sweet pepper (Capsicum annuum)	2016년 한국식물병리학회 추계학술발표회	김의준, 변희성, 최은영, 박정호, 김동준, 조문주, 이용준, 노강산, 박동훈, 신호철, 이경열, 김지광, 이중환, 이관석, 최홍수, 김창석, 이석찬	2016년 10월 19일~21일	서울대학교 평창캠퍼스	대한민국
75	Seed transmission of Tomato yellow leaf curl virus in white soybean (Glycine max)	2016년 한국식물병리학회 추계학술발표회	김의준, 최은영, 박정호, 변희성, 서하늘, 김동준, 조문주, 노강산, 조성래, 이경열, 김지광, 이중환, 이관석, 최홍수, 김창석, 이석찬	2016년 10월 19일~21일	서울대학교 평창캠퍼스	대한민국
76	Tomato yellow leaf curl virus from commercially available tomato seeds can be transmitted to their seedlings and produce typical symptoms	2016년 한국식물병리학회 추계학술발표회	김의준, 박정호, 최은영, 변희성, 서하늘, 조승찬, 노강산, 조상호, 강하, 이경열, 김지광, 이중환, 이관석, 김창석, 최홍수, 이석찬	2016년 10월 19일~21일	서울대학교 평창캠퍼스	대한민국
77	Highly specific and rapid detection of Hamiltonella defense, a secondary endosymbiont of Bemisia tabaci, which plays critical roles on TYLCV transmission by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay	2016년 한국식물병리학회 추계학술발표회	최은영, 서하늘, 김의준, 변희성, 박정호, 조문주, 조승찬, 조상호, 조성래, 박동훈, 심재경, 김지광, 이중환, 이관석, 김창석, 최홍수, 이경열, 이석찬	2016년 10월 19일~21일	서울대학교 평창캠퍼스	대한민국

(4) 유전자원 등록

No	Name of Specimen	Host	Location	Gene	GenBank Accession no.
1	<i>B. tabaci</i>	Bean	Patuakhali	mtCOI	JN018066
2	<i>B. tabaci</i>	Eggplant	Patuakhali	mtCOI	JN018067
3	<i>B. tabaci</i>	Eggplant	Kurigram	mtCOI	JQ305088
4	<i>B. tabaci</i>	Okra	Kurigram	mtCOI	JQ305089
5	<i>B. tabaci</i>	Ridge gourd	Myanmar	mtCOI	JN018065
6	<i>B. tabaci</i>	Eggplant	Myanmar	mtCOI	JN018068
7	<i>B. tabaci</i>	Bean	Patuakhali	16S rRNA	JQ305696
8	<i>B. tabaci</i>	Eggplant	Patuakhali	16S rRNA	JQ305697
9	<i>B. tabaci</i>	Eggplant	Kurigram	16S rRNA	JQ305698
10	<i>B. tabaci</i>	Eggplant	Kurigram	16S rRNA	JQ305699
11	<i>B. tabaci</i>	Okra	Kurigram	16S rRNA	JQ305700
12	<i>Arsenophonus</i>	<i>B. tabaci</i> (bean)	Patuakhali	23S rDNA	JN018060
13	<i>Arsenophonus</i>	<i>B. tabaci</i> (eggplant)	Patuakhali	23S rDNA	JN018061
14	<i>Arsenophonus</i>	<i>B. tabaci</i> (eggplant)	Kurigram	23S rDNA	JQ305708
15	<i>Arsenophonus</i>	<i>B. tabaci</i> (okra)	Kurigram	23S rDNA	JQ305709
16	<i>Cardinium</i>	<i>B. tabaci</i> (bean)	Patuakhali	16S rDNA	JN018062
17	<i>Cardinium</i>	<i>B. tabaci</i> (eggplant)	Kurigram	16S rDNA	JQ305701
18	<i>Cardinium</i>	<i>B. tabaci</i> (eggplant)	Kurigram	16S rDNA	JQ305702
19	<i>Cardinium</i>	<i>B. tabaci</i> (okra)	Kurigram	16S rDNA	JQ305703
20	<i>Rickettsia</i>	<i>B. tabaci</i> (okra)	Kurigram	16S rDNA	JQ305704
21	<i>Wolbachia</i>	<i>B. tabaci</i> (bean)	Patuakhali	16S rDNA	JN018064
22	<i>Wolbachia</i>	<i>B. tabaci</i> (eggplant)	Kurigram	16S rDNA	JQ305705

23	<i>Wolbachia</i>	<i>B. tabaci</i> (eggplant)	Kurigram	16S rDNA	JQ305706
24	<i>Wolbachia</i>	<i>B. tabaci</i> (okra)	Kurigram	16S rDNA	JQ305707
25	<i>Wolbachia</i>	<i>B. tabaci</i> (eggplant)	Kurigram	wsp	JQ305095
26	<i>Wolbachia</i>	<i>B. tabaci</i> (okra)	Kurigram	wsp	JQ305096
27	<i>A. dispersus</i>	Guava	Patuakhali	16S rRNA	JQ305694
28	<i>A. dispersus</i>	Brinjal	Philippines	16S rRNA	JQ305695
29	<i>A. dispersus</i>	Guava	Patuakhali	mtCOI	JQ305091
30	<i>A. dispersus</i>	Brinjal	Philippines	mtCOI	JQ305090
31	<i>TYLCV</i>	<i>B. tabaci</i> (eggplant)	Kurigram	Coat Protein	JQ305092
32	<i>TYLCV</i>	Tomato	Patuakhali	Coat Protein	JQ305093
33	<i>B. tabaci</i>	<i>Lamium amplexicaule</i>	Jeju	mtCOI	KF468455
34	<i>B. tabaci</i>	<i>Conyza sumatrensis</i>	Jeju	mtCOI	KF468456
35	<i>B. tabaci</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Seogwipo	mtCOI	KF468457
36	<i>B. tabaci</i>	<i>Lamium amplexicaule</i>	Seogwipo	mtCOI	KF468458
37	<i>B. tabaci</i>	<i>Conyza sumatrensis</i>	Seogwipo	mtCOI	KF468459
38	<i>B. tabaci</i>	<i>Malva pusilla</i>	Seogwipo	mtCOI	KF468460
39	<i>B. tabaci</i>	<i>Lamium amplexicaule</i>	Seogwipo	mtCOI	KF468461
40	<i>B. tabaci</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jeju	mtCOI	KF468462
41	<i>B. tabaci</i>	<i>Leonurus sibiricus</i>	Seogwipo	mtCOI	KF468463
42	<i>B. tabaci</i>	<i>Conyza sumatrensis</i>	Jeju	mtCOI	KF468464

○ 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	사업화 완료			
	소요예산(백만원)	사업화 완료			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		1.1	10	25	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0.4	3.3	8.3
국외		-	-	-	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 다 모델, 제품 개발계획	- 천연물 살충, 살균제 개발			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	1.1	10	25	
	수 출	-	3	10	

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	1.1 억원	
			향후 3년간 매출	10 억원	
		관련제품	개발후 현재까지	1.1 억원	
			향후 3년간 매출	10 억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0.4 % 국외 : - %	
			향후 3년간 매출	국내 : 3.3 % 국외 : - %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 0.4 % 국외 : - %	
			향후 3년간 매출	국내 : 3.3 % 국외 : - %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			- 위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			- 위

- 본 연구과제의 결과를 토대로 한 가루이 매개 바이러스의 예찰 진단 및 방제 매뉴얼
1. 무병 종자 : 토마토 종자의 바이러스 감염 여부에 대한 철저한 진단 필수
 2. 무병 육묘 : 육묘에 대한 바이러스 감염 여부 철저 진단 필요
 3. 매개충 : 재배지 내의 가루이 발생 및 매개충의 바이러스 보독 여부 주기적 진단 필수
 4. 중간기주 : 시설재배지 주변 잡초의 종류, 바이러스 병 발생 진단 필수
 5. 재배시설 : 재배지 시설을 세밀하게 조사하여 외부로부터 가루이 유입 철저히 차단함
 6. 조기 예찰 : 매개충 발생의 주기적 진단을 통한 바이러스 발생 조기 차단
 7. 감염주 제거 : 조기 진단을 통하여 바이러스 감염주는 신속하게 제거함
 8. 정보 공유 : 바이러스/매개충 관리정보를 주변농가, 기관, 연구소 등과 수시로 공유함

○ 총괄과제가 있는 경우 세부과제별 결과를 종합 분석하고 고찰한 결론

본 연구과제는 8개팀으로 구성되어 예찰, 진단, 기작 및 방제 4주제에 관해서 연구하였다. 각 연구분야와 관련된 세부과제팀들이 상호협력하여 연구를 수행하였다. 이 4개 분야에 관해서 종합적으로 연구결과를 분석하고 고찰하고자 한다.

담배가루이와 온실가루이는 외래해충으로서 직접적으로 가해하거나 식물바이러스 매개하면서 전 세계적으로 심각한 피해를 끼친다(Ghanim et al., 1998). 또한, 기후변화와 농산물의 국제교역 증가로 인해서 다양한 고위해성 해외 바이러스가 종자 및 매개충을 통하여 국내에 유입이 되고 있다. 그러므로, 효율적인 관리를 위하여 전염원의 정확한 진단, 예찰 및 방제 기술의 개발이 시급하다.

담배가루이는 전 세계적으로 적어도 36개의 biotype이 분포하는데 우리나라에는 B, Q, JpL, 3 계통이 존재했다(Lee et al., 2014, 2016). 그러나, 열대 및 아열대지역에는 농작물에 피해를 끼치는 가루이류 해충이 많이 분포하는데 최근의 기후변화 및 증가한 농산물 교역으로 인해서 새로운 가루이류 해충이 국내에 유입될 가능성이 높아지고 있다. 그리고 가루이 및 진딧물과 같은 흡즙성 곤충은 주로 식물바이러스를 매개하는 이차적인 피해를 끼친다. 그래서, 이 분야에 대한 지속적인 예찰 및 진단이 수행되어야 한다.

고위해성 바이러스인 토마토황화잎말림바이러스(TYLCV)는 2008년 통영 토마토농가에서 국내

처음 발생하여 2010년에는 전국적으로 확산되어 큰 피해를 끼쳤다(Park et al., 2012). 본 연구에 의하면 TYLCV는 토마토 이외의 파프리카, 고추 등 다양한 박과작물에도 발생할 뿐만 아니라 화훼류 및 잡초등에도 감염이 되는 등 아주 넓은 기주범위를 나타내었다((Kil et al., 2014a,b,c). 그래서, TYLCV의 발생으로 인한 피해가 토마토에 국한되는 것이 아니고 다른 작물에서도 피해가 발생할 가능성이 아주 높다고 판단된다. 이에 대한 지속적인 예찰 및 진단이 이루어져야 한다고 판단된다. 또한, TYLCV 뿐만 아니라 SPLCV, ToCV, HYVV 등 신규 가루이매개 바이러스에 대한 국내분포를 처음으로 발표했다. 즉, 고위해성 외래 바이러스들이 지속적으로 국내에 유입이 되는데 이에 대한 역학조사가 시급한 실정이다.

바이러스-매개충 상호작용에 대한 연구는 활발하게 이루어지지 않았다(Ghanim et al., 2001). 본 연구에 의하면 매개충이 식물바이러스를 보독하게 되었을 때에 단순한 전달자가 아니고 매개충내에서도 생리적 변화가 나타났다. 즉, 담배가루이는 TYLCV-보독충이 비보독충보다 빨리 자랐지만 수명이 짧아졌다. 또한 섭식행동을 비교해 본 결과 탐침율(구기를 흡즙하는 빈도)와 운동성이 보독충이 훨씬 더 높게 나타났다. 열악한 환경조건(고온, 살충제)에서 감수성이 증가해서 살충율이 높았다. 다양한 유전자들의 발현패턴을 비교해 본 결과 근육 및 활동성 관련 유전자들이 보독충에서 높게 나타났다. 즉, 매개충이 바이러스를 보독하면 발달 및 활동성이 증가해서 궁극적으로 바이러스 매개율을 증가시킬 것으로 판단된다. 이러한 연구결과를 토대로 매개충의 바이러스 매개기능을 제어할 수 있을 것으로 판단한다.

지난 20여년 동안 전 세계적으로 해충을 방제하기 위하여 화학살충제를 과다하게 사용했으며 이로 인하여 환경문제 및 살충제 저항성을 키우게 되었다. 그러나, 미래의 병해충관리전략은 환경친화적으로 변화하고 있다. 본 연구에서는 친환경적인 다양한 가루이 방제방법을 개발했으며 이를 활용한 종합적 관리방안을 개발했다.

곤충병원성 선충은 생물농약으로서 활용되는데 실질적인 살충기작은 선충 장내의 공생균이 생산 분비하는 살충독소 때문이다. 이 독소는 단일 단백질로 구성되는 BT세균의 독소와는 달리 20여종의 독소로 구성되는 복합체이다. 그러나, 이러한 독소는 경구독성을 나타내기 때문에 반드시 섭식이 되어야 한다. 본 연구에서 가루이 성충에 대한 3종류의 공생균 배양액의 섭식살충효과를 분석해 본 결과 *Photorhabdus tempeprata*의 배양액이 가장 효과가 높았고 이 배양액에서 살충율이 높은 두 종류의 anthraquinone을 순수분리해서 새로운 천연살충제를 개발했다(Shrestha and Lee, 2012). 또한, 다양한 LED광원을 이용하여 가루이 유인효과를 분석해 본 결과 녹색파장 LED가 가장 높았으며 이를 이용하여 녹색 LED 유인등을 제작하였다(Jahan et al., 2014b).

식물의 다양한 이차대사물질은 곤충을 제어하는데 효과가 있다. 본 연구에서 조사한 야생담배 (*Nicotiana benthamiana*)는 잎 뒷면에 분비성 trichome이 분포하기 때문에 유인된 가루이가 흡착되어 살충효과가 높게 나타났다. 야생담배 추출물의 엽면시비를 통하여 가루이 살충율 증가 및 부화율 감소효과를 밝혔으며 야생담배 추출물을 이용한 친환경 살충제로 개발하였다. 또한, 천연 곤충생장저해제로 알려진 Neem 성분은 곤충의 발달, 생식 및 섭식작용을 억제하는데 이 작용은 섭식이 되어야 가능하다(Lynn et al., 2010). 그래서, 그 효과를 극대화하기 위하여 님액제를 토양에 관주함으로써 식물을 흡즙하는 가루이의 경구독성 방제방법을 개발했다. 즉, 님 주성분인 azadirachtin을 10ppm 섭식시에 가루이의 100% 살충율을 나타냈고 토마토 재배농가에 님액제(10ppm azadirachtin)을 관주처리했을 때에 가루이의 발생이 무처리구에 비하여 60.3% 감소하였다. 님액제 관주처리법 현장적용 매뉴얼을 개발했다. 본 연구에서 개발한 기술과 기작을 바탕으로 바이러스 및 매개충을 효과적으로 방제할 수 있는 관리방안을 구축했다. 본 연구에서 개발한 다양한 친환경적인 가루이 방제기술을 체계적으로 활용하면 가루이 및 가루이매개 바이러스의 방제에 큰 기여를 할 것이라고 판단한다.

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

				코드번호	D-06
4-1. 목표달성도					
세부연구목표 (연구계획서상의 목표)		비중 (%)	달성도 (%)	자체평가	
제1세부	가루이류의 바이러스 매개기작 구명 및 제어기술 개발	20	20	<ul style="list-style-type: none"> ○ 담배가루이의 바이러스 매개관련 생리적 작용기작 분석함 <ul style="list-style-type: none"> - TYLCV 매개시 발달 및 행동이 촉진되었지만 고온 및 살충제 등 환경요인에 대한 내성이 감소함 ○ RNAi법(hsp70 dsRNA)을 이용한 담배가루이의 살충기술 개발함 ○ 곤충병원성선충의 공생균 독소를 이용한 친환경적 살충제 개발함 ○ 녹색 LED의 가루이 유인효과 분석 및 가루이 유인등 개발함 	
제1협동	바이러스 매개 가루이류의 유전적 변이 분석	10	10	<ul style="list-style-type: none"> ○ 2008년 이후 국내외 담배가루이의 염기서열을 이용한 유전적 변이 및 계통분석함 <ul style="list-style-type: none"> - 국내 3계통(B, Q, JpL)의 COI 및 내부공생균 염기서열 분석함 ○ 온실가루이의 유전적 변이 분석 및 진단 프라이머 개발함 ○ 국내 지역별 담배가루이의 살충제 저항성 검정함 	
제2협동	가루이류 매개 바이러스의 유전적 변이 분석 및 DNA 칩 개발	10	10	<ul style="list-style-type: none"> ○ 가루이류 매개 TYLCV의 확산패턴 및 유전적 변이 분석함 ○ 가루이류 매개 신규 바이러스(7종)에 대한 발생 및 확산 분석 ○ 가루이류 매개 바이러스진단용 DNA 칩 개발함 	
제3협동	잡초기주의 바이러스병 확산 역학 조사 및 관리 기술 개발	10	10	<ul style="list-style-type: none"> ○ 가루이류 및 TYLCV의 증식 잡초기주 구명함 <ul style="list-style-type: none"> - 작물 5종, 잡초 12종을 새로운 가루이 기주식물로 기재함 ○ 잡초기주-가루이류-매개 바이러스 상호작용 구명함 ○ 가루이 및 바이러스의 잡초기주 관리 매뉴얼 제작함 	
제4협동	가루이류 매개 바이러스 정밀진단기술 개발 및 복합감염 분석	20	20	<ul style="list-style-type: none"> ○ 가루이 매개 바이러스의 정밀진단기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 식물바이러스 7종의 LAMP-PCR 진단기술 개발함 - 국내 담배가루이 매개 바이러스(TYLCV, TbLCV, HYVV, HYVMB) 동시 진단 multiplex PCR 프라이머를 개발함 - TYLCV의 종자전염을 확인하는 진단기술을 개발함 ○ Geminivirus 바이러스 복합감염에 따른 감염성 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 가루이 매개 바이러스 4종의 감염성클론을 이용하여 가지과 작물과 박과 작물에 대한 기주 범위 분석을 수행함 ○ 국내 DNA-beta의 분포 양상 분석 및 병원성 기능 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 국내 geminivirus DNA-beta 분포 및 감염성 클론을 제작함 - DNA와 RNA virus 복합 감염에 의한 담배가루이 매개 바이러스의 변이 분석함 	
제5협동	가루이류 매개 바이러스 변이와 복합감염 현장 실증 연구	10	10	<ul style="list-style-type: none"> ○ TYLCV의 종자감염 확인 및 국내외 상업용 토마토 종자의 TYLCV 감염실태 조사함 ○ 토마토 재배현장 및 육묘장의 TYLCV발생 실태 조사함 ○ 박과류에 대한 가루이류 매개 바이러스 병징 분석함 	
제6협동	바이러스 매개 가루이류의 환경친화적 방제제 개발	10	10	<ul style="list-style-type: none"> ○ 곤충병원성 선충의 공생균 배양액을 이용한 살충 물질의 대량생산 및 상품화 기술 개발함 ○ 천연물을 이용한 가루이류 살충활성이 높은 방제제 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 생물농약 1건, 천연물살충제 1건, 유인살충식물 1건 개발 	
제7협동	가루이류 매개 바이러스병의 종합적 방제기술 개발	10	10	<ul style="list-style-type: none"> ○ 토마토 품종,별 가루이류 매개 바이러스의 피해분석 ○ 님액제의 관주처리에 대한 가루이 방제효과 현장적용 실시함 ○ 토마토 가루이류 및 매개바이러스 종합적방제기술개발 	
합계		100	100		

4-2. 관련분야 기여도

□ 학술적 측면

- 식물바이러스의 매개에 대한 매개충의 작용기작, 제미니바이러스의 국내 발생현황, 유전적 변이, 중간기주로서 잡초의 영향, 친환경적 병해충 방제제 개발 등에 관해서 30편의 SCI급 연구논문을 발표하면서 매개충과 식물바이러스병 방제의 학술적 기반을 확립함으로써 이 분야의 국제적 선도적인 역할을 담당함

□ 기술적 측면

- 가루이와 가루이매개 바이러스의 중- 및 계통-특이적 프라이머, LAMP-PCR, DNA chip등을 개발함으로써 바이러스 및 매개충의 정확하고 신속한 진단이 가능하며 세계적인 선도적인 역할을 담당함

□ 경제·사회적 측면

- 병해충방제기술의 선진화에 따른 차세대 농생명산업의 국가경쟁력을 강화함
- 친환경적 병해충방제기술을 적용함으로써 농산물의 고부가가치를 향상시킴

□ 추진 성과로 인하여 바뀌게 될 미래생활상

- 친환경적 병해충관리기술의 확립으로 청정 농산물 생산 및 공급
 - 생물농약 및 천연물 살충제의 개발을 통하여 살충제-free 농산물의 생산
- DNA chip을 이용한 신속정확한 병해충 진단
 - 외래병해충의 국내 유입을 신속 정확하게 예찰 및 진단함으로써 조기에 병해충을 방제하여 고품질의 농산물을 생산할 수 있음

DNA Chip을 이용한 병해충 진단	생물농약을 이용한 친환경 방제	종합적 병해충 관리	청정 농산물 생산

- 고부가가치 농산물 생산으로 농가소득 향상 및 국가 경쟁력 강화
 - 병해충의 조기진단 및 친환경적 방제를 통하여 청정 농산물을 생산함으로써 농가소득을 향상시키고 질 좋은 농산물의 수출농업을 통한 국가 경쟁력을 향상할 수 있음

5. 연구결과의 활용계획

코드번호	D-07
------	------

- 본 연구를 수행하면서 가장 필요하다고 판단되는 것은 외래병해충이 국내에 유입이 되기 전에 조기차단 및 발생을 억제할 수 있는 방법을 개발하는 것이다. 그래야 재배현장에서 큰 피해를 없앨 수 있기 때문이다.

- 그래서, 본 연구와 연계하여 추가적으로 필요하다고 판단되는 연구는 국내 유입가능한 고위해성 외래 병해충의 해외 이동현황에 대한 정확한 모니터링에 대한 연구가 절실하다. 최근 기후변화와 농산물의 국제교역이 증가함으로 인해서 전세계의 식물 병해충이 국내 유입할 수 있다. 특히, 기후온난화로 인한 동남아시아 지역 병해충의 한반도 유입현상은 매년 일어나고 있는 실정이다. 그 중에서 조류독감이나 구제역과 같은 고위해성 식물 바이러스 및 해충이 유입된다면 똑같은 피해를 반복하는 것이 된다.
- 본 연구에 기반하여 아래와 같은 주제로 추후 연구를 제시한다.
 1. 국내 유입이 우려되는 잠재적 고위해성 열대/아열대 국가 유래 병해충 및 바이러스 매개충을 대상으로 생물적 특성 조사 및 DB 구축
 2. 잠재적 고위해성 열대/아열대 국가 유래 병해충 진단용 첨단 바이오마커 개발
 3. 기후변화에 따른 잠재적 고위해성 열대/아열대 국가 유래 병해충 및 바이러스 매개충의 발생 가능성 및 농작물 피해 예측 기술 개발
 4. 열대/아열대 국가 유래 고위해성 돌발 병해충 및 바이러스 매개충유입 및 발생 대응 기술 개발
 5. 국제교류를 통한 열대/아열대 국가 유래 고위해성 돌발 병해충 및 바이러스 매개충의 글로벌 모니터링 시스템 개발

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
<ul style="list-style-type: none"> ○ 국제학술발표 및 국제협력 <ul style="list-style-type: none"> - 2013.5.19.-5.24 국제가루이학회 참석 및 초청연사 발표 구두 발표 (1편), 포스터 발표 (4편) - 2016.11.16.-11.20 국제동물학회 참석 및 초청연사 발표 구두발표: Differential regulation of isoforms of heat shock protein 70 family in relation to diapause and other stresses 포스터 발표: Oral ingestion of heat shock protein 70 dsRNA is lethal under normal and thermal stress conditions in the sweetpotato whitefly, <i>Bemisia tabaci</i> - 2016.12.03 2016 Conference for Plant Clinical Sciences, Tokyo Univ. 구부발표: Development of the sustainable agriculture system for the pest and disease management in Korea 포스터 발표: Control of Whiteflies by the Oral Ingestion of Neem Extracts ○ 국제협력 <ul style="list-style-type: none"> - 2014.3.14. Dr Sheshen Liu (중국 절강대학교)방문 : 담배가루이 및 베미니바이러스의 글로벌 확산 방지에 대한 정보 교류 담배가루이 및 바이러스 증식에 대한 사육 및 콜로니 보존 기술 확보 - 2016.1.25. Dr Hamayet Jahan (Bangladesh, Patuakhali Science and technology Institute) 방문 : 담배가루이 및 바이러스 감염 식물 채집 및 유전자원 80점 확보 및 국제협력 - 2016. 1.28 Dr TinTin Aye (Myanmar, Yezin agricultural University) 방문 		

: 담배가루이 및 바이러스 감염 식물 채집 및 유전자원 80점 확보 및 국제협력

7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○ 해당사항 없음		

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

					코드번호	D-10		
구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
○ 해당사항 없음		

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 (5건)

						코드번호	D-12			
번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인용 횟수 등)	
1	논문	Upregulation of temperature susceptibility in <i>Bemisia tabaci</i> upon acquisition of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)	경북대학교	주저자	Journal of Insect Physiology	2.379	2012	단독사사	SCI	
2	논문	Taxonomic Status of the <i>Bemisia tabaci</i> Complex (Hemiptera: Aleyrodidae) and Reassessment of the Number of Its Constituent Species	농촌진흥청	주저자	PLOS ONE	3.534	2013	중복사사	SCI	
3	논문	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> can overwinter in <i>Stellaria aquatica</i> , a winter-hardy TYLCV-reservoir weed	성균관대학교	주저자	Plant Disease	3.192	2015	단독사사	SCI	

4	논문	The JpL species of the Bemisia tabaci complex in Korea: Detection by an extensive field survey and analysis of COI sequence variability	농촌진흥청	주저자	Journal of Asia-Pacific Entomology	0.824	2016	단독사사	SCI
5	논문	Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-IL): a seed-transmissible geminivirus in tomatoes	성균관대학교	주저자	Scientific Reports	5.228	2016	단독사사	SCI

11. 기타사항

	코드번호	D-13
○		

12. 참고문헌

	코드번호	D-14
<p>Abhary, M. Patil, B. Fauquet, C. 2007. Molecular biodiversity, taxonomy and nomenclature of tomato yellow leaf curl-like viruses. in : Tomato yellow leaf curl virus disease ed. by H. Czosnek, pp.85-118.</p> <p>Aidawati, N., S. H. Hidayat, R. Suseno, S. Sosromarsono. 2002. Transmission of an Indonesian isolate of tobacco leaf curl virus (geminivirus) by <i>Bemisia tabaci</i> Genn. (Hemiptera: Aleyrodidae). Plant Pathol. J. 18, 231-236.</p> <p>Anfoka G., F. H. Ahmad, M. Abhary, A. Hussein. 2009. Detection and molecular characterization of viruses associated with tomato yellow leaf curl disease in cucurbit crops in Jordan. plant Pathology. 58, 754-762.</p> <p>Asaduzzaman, M., Shim, J.-K., Lee, S., Lee, K.Y., 2016. Azadirachtin ingestion is lethal and inhibits expression of ferritin and thioredoxin peroxidase genes of the sweetpotato whitefly <i>Bemisia tabaci</i>. J. Asia Pac. Entomol. 19, 1-4.</p> <p>Blanc, S., Uzest M., and M. Drucker. 2011. New research horizons in vector-transmission of plant viruses. Current Opinion in Microbiology. 14, 483-491.</p> <p>Brunt, A. A., and S. Cohen. 1988. Tomato yellow leaf curl virus geminivirus, Plant viruses online Descriptions and lists from the VIDE database. http://sdb.im.ac.cn/vidе/descr840.htm.</p> <p>Byun, H.-S., Kil, E.-J., Kim, S., Hwang, H., Lee, J.-H., Chung, Y.-J., Lee, S., 2014. First Report of Chickpea chlorotic dwarf virus Infecting Hot Pepper in India. Plant Disease. 98(11), 1590.</p> <p>Choen, S., and F. E. Nitzany. 1966. Transmission and host range of the tomato yellow leaf curl virus. Phytopathology. 56, 1127-1131.</p> <p>Choi, E., Lee, G., Park, J., Lee, T. K., Choi, H. S., Lee, S., 2012. Molecular characterization and an infectious clone construction of <i>Sweet potato leaf curl virus</i> (SPLCV) isolated from Korea. Acta. Virol. 56(3), 187-198.</p> <p>Choi, Y. S., Hwang, I. S., Lee, G. J. and Kim, G. J. 2016. Control of <i>Bemisia tabaci</i> Genn. (Hemiptera: Aleyrodidae) adults on tomato plants using trap plants with systemic insecticide. Korean J. Appl. Entomol. 55, 109-117.</p> <p>Chung, B. G., Lee, H. S. and Kim, Y. B. 2013. Establishment of 60 mesh nets to reduce crop loss by <i>Bemisia tabaci</i> (Gennadius)(Homoptera: Aleyrodidae) in tomato greenhouse. Korean J. Appl. Entomol. 52, 23-27.</p> <p>Choi S. K., H. S. Choi, E. Y. Yang, I. S. Cho, J. D. Cho, and B. N. Chung. 2013. Construction of tomato yellow leaf curl virus clones for resistance assessment in tomato plants. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 31(2), 246-254.</p> <p>Cohen, S. and L. Harpaz. 1964. Periodic, rather than continual, acquisition of a new tomato virus by it's rector, the tobacco whitefly (<i>Bemisia tabaci</i>) Entomol. Exp. Appl. 7, 155-166.</p> <p>Cohen, S. and Nitzany, F. E. 1966. Transmission and host range of the tomato yellow leaf curl virus. Phytopathology. 56, 1127-1131.</p> <p>Cohen, S., and Y. Antignus. 1994. Tomato yellow leaf curl virus, a whitefly-borne geminivirus of tomatoes.</p>		

- Ady. Dis. Vector Res. 10, 259-288.
- Cordoba-Selles, M. C., Garcia-Randez, A., Alfaro-Fernandez, A., and Jorda-Gutierrez, C. 2007. Seed transmission of pepino mosaic virus and efficacy of tomato seed disinfection treatments. *Plant Disease*. 91(10), 1250-1254.
- Czosnek H. 1999. Tomato yellow leaf curl virus. CMI/AAB Descriptions of plant viruses, No. 368.
- Czosnek. H., and H. Laterrot. 1997. A worldwide survey of tomato yellow leaf curl viruses. *Archives of virology*. 142, 1391-1406.
- Devine, G. J. and Denholm, I. 1998. An unconventional use of piperonyl butoxide of managing the cotton whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Bull. Entomol. Res.* 88, 601-610.
- Diener, T. O., and Raymer, W. B. 1971. Potato spindle tuber viroid. CMI/AAB Descriptions of plant viruses. No.66.
- Duffy, S., and E. Holmes. 2007. Multiple introduction of the old world begomovirus Tomato yellow leaf curl virus into the new world. *Amer. Soc. Microbiol.* 73, 7114-7117.
- Elisabeth, J., M. C. Edwards, and R. O. Hampton. 1994. Seed Transmission Of Viruses: Current Perspectives. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32, 363-386.
- Fauquet, C. M., Bisaro, D. M., D. M. Briddon, R. W., Brown, J. K., Harrison, B. D., Rybicki, E. P., Stenger, D. C., and stanley, J. 2003. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family geminiviridae, and an updated list of begomovirus species, *Arch. Virol.* 148, 405-421.
- Ghanim, M., Morin, S., Zeidan, M., and H. Czosnek. 2001. Rate of tomato yellow leaf curl virus translocation in the circulative transmission pathway of its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. 188 *Phytopathology*. 91(2), 188-196.
- Ghanim, M., Morin, S. Zeidan, M. and H. Czosnek. 1998. Evidence for transovarial transmission of tomato yellow leaf curl virus by its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Virology*. 240, 295-303.
- H.-S., Byun, Kil, E.-J., Seo, H., Suh, S.-S., Lee, T.-K., Lee, Lee, J.-H., Kim, J.-K., Lee, K.-Y., Ko, S.-J., Lee, G.-S., Choi, H.-S., Kim, C.-S., Lee, S., 2016. First Report of Papaya leaf curl virus in Papayas in Korea and Recovery of its Symptoms. 100(9), 1958.
- Jahan, S.M.H., Lee, K.-Y., 2012a. Molecular Variation of Endosymbiotic Bacteria Wolbachia in *Bemisia tabaci* and Related Whiteflies. *Current Research on Agriculture and Life Sciences*. 30(2), 115-123.
- Jahan, S.M.H., Lee, K.-Y., 2012b. Upregulation of endosymbiont densities in *Bemisia tabaci* by acquisition of Tomato yellow leaf curl virus. *Current Research on Agriculture and Life Sciences*. 30(2), 124-130.
- Jahan, S.M.H., Lee, G.-S., Lee, S., Lee, K.-Y., 2014a. Upregulation of probing and feeding related behavioural frequencies in *Bemisia tabaci* upon acquisition of Tomato yellow leaf curl virus. 70(10), 1497-1502.
- Jahan, S.M.H., Lee, G.-S., Lee, S., Lee, K.-Y., 2014b. Acquisition of Tomato yellow leaf curl virus enhances attraction of *Bemisia tabaci* to green light emitting diodes. 17, 79-82.
- Jahan, S.M.H., Lee, K.-Y., Howlader, M.I.A., Bashar, H.M., Hasan, G.N., 2014c. Molecular identification of parasitoid, *Encarsia formosa* in *Bemisia tabaci* (Gennadius) and determination of its secondary endosymbionts. *Bangladesh J. Agricul. Res.* 39(4), 563-578.
- Jahan, S.M.H., Lee, K.-Y., Howlader, M.I.A., 2015a. The third genotypic clusters of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) found in Bangladesh. *Bangladesh J. Agricul. Res.* 40(1), 1-16.
- Jahan, S.M.H., Lee, K.-Y., Howlader, M.I.A., Bashar, H.M., Hasan, G.N., 2015b. Molecular divergence of secondary endosymbiont, *Cardinium* in *Bemisia tabaci* (Gennadius) and associates. *Bangladesh J. Agricul. Res.* 40(1), 121-135.
- Kil, E.-J., Byun, H.-S., Kim, S., Hwang, H., Kim, M.-K., Kim, C.-S., Choi, H.-S., Lee, K.-Y., Lee, S., 2014a. First Report of Tomato yellow leaf curl virus Infecting *Eustoma* (*Eustoma grandiflorum*) in Korea. *Plant Disease*. 98(8), 1163.
- Kil, E.-J., Byun, H.-S., Kim, S., Kim, J., Park, J., Cho, S., Yang, D.-C., Lee, K.-Y., Choi, H.-S., Kim, J.-K., Lee, S., 2014b. Sweet pepper confirmed as a reservoir host for tomato yellow leaf curl virus by both agro-inoculation and whitefly-mediated inoculation. 159(9), 2387-2395.
- Kil, E.-J., Cho, S., Byun, H., Kim, J., Hwang, H., Auh, C., Heo, N., Shin, Y., Lee, S., 2014c. Differential identification of three species of Curtovirus using loop-mediated isothermal amplification. *Acta Virol.* 58(2), 160-166.
- Kil, E.-J., Kim, J., Byun, H.-S., Kim, S., Kwak, H.-R., Kim, M.-K., Choi, H.-S., Chung, M.-N., Lee, S., 2014d. First Report of Sweet potato golden vein associated virus Infecting Sweet Potato in Korea. *Plant Disease*. 98(8), 1163.1-1163.1
- Kil, E.-J., Park, J., Lee, H., Kim, J., Choi, H.-S., Lee, K.-Y., Kim, C.-S., Lee, S., 2014e. *Lamium amplexicaule* (Lamiaceae): a weed reservoir for tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in Korea. *Arch Virol.* 159(6), 1305-1311.
- Kil, E.-J., Kim, S., Lee, Y.-J., Kang, E.-H., Lee, M., Cho, S.-H., Kim, M.-K., Lee, K.-Y., Heo, N.-Y., Choi,

- H.-S., Kwon, S.-T., Lee, S., 2015a. Advanced loop-mediated isothermal amplification method for sensitive and specific detection of Tomato chlorosis virus using a uracil DNA glycosylase to control carryover contamination. *J. Virol. Methods.* 213, 68-74.
- Kil, E.-J., Lee, Y.-J., Cho, S., Auh, C.-K., Kim, D., Lee, K.-Y., Kim, M.-K., Choi, H.-S., Kim, C.-S., Lee, S., 2015b. Identification of natural weed hosts of Tomato chlorosis virus in Korea by RT-PCR with root tissues. *E. J. Plant Pathol.* 142(2), 419-426.
- Kil, E.-J., Byun, H.-S., Kim, S., Cho, S., Cho, S., Roh, K., Lee, K.-Y., Choi, H.-S., Kim, C.-S., Lee, S., 2015c. *Tomato yellow leaf curl virus* Can Overwinter in *Stellaria aquatica*, a Winter-Hardy TYLCV-Reservoir Weed. 99(5), 588-592.
- Kil, E.-J., Kim, S., Lee, Y.-J., Byun, H.-S., Park, J., Seo, H., Kim, C.-S., Shim, J.-K., Lee, J.-H., Kim, J.-K., Lee, K.-Y., Choi, H.-S., Lee, S., 2016a. *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV-IL): a seed-transmissible geminivirus in tomatoes. *Scientific Rep.* 6, 19013.
- Kil, E.-J., Seo, H.-S., Byun, H.-S., Suh, S.-S., Lee, T.-K., Lee, K.-Y., Lee, J.-H., Kim, J.-K., Ko, S.-J., Choi, H.-S., Kim, C.-S., Lee, S., 2016b. First Report of *Euphorbia leaf curl virus* in Passion Fruits in South Korea and its Natural Occurrence in Papaya. 100(4), 865.
- Kim E. S., and Y. G. Kim. 2014. A report on mixed occurrence of tobacco whitefly (*Bemisia tabaci*) biotypes B and Q in oriental melon farms in Kyungpook province. *Korean J. Appl. Entomol.* 53(4), 465-472.
- Kim, J. K., M. S. In, J. Lee, and S. G. Lee. 2015a. Effect for Chemical Control of Flies in protected Cultivation of Cherry Tomato. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 33 [Suppl. II]: 94.
- Kim, J., Kil, E.-J., Kim, S., Seo, H., Byun, H.-S., Park, J., Chung, M.-N., Kwak, H.-R., Kim, M.-K., Kim, C.-S., Yang, J.-W., Lee, K.-Y., Choi, H.-S., Lee, S., 2015b. Seed transmission of *Sweet potato leaf curl virus* in sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Plant Pathol.* 64(6), 1284-1291.
- Kim, J. S., Lee, S. H., Choi, H. S., Kim, M. K., Kwak, H. R., Nam, M., Kim, J. S., Choi, G. S., Cho, J. D., Cho, I. S., and Chung, B. N. 2011. Occurrence of virus diseases on major crops in 2010. *Res. Plant Dis.* 17, 334-341.
- Kim, W. I., K. H. Kim, Y. B. Kim, H. S. Lee, G. M. Shon, and Y. H. Park. 2013. Selection and characterization of horticultural traits of tomato leaf curl virus (TYLCV)-resistant tomato cultivars. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 31(3), 328-336.
- Ko S. J., D. S. Choi, K. C. Ma, D. I. Kim, M. K. Kim, H. S. Choi, and H. W. Kim. 2014. Pattern of the occurrence of tomato yellow leaf curl virus on cultivation. *Res. Plant Dis.* 20(4), 303-306.
- Kwak, H. R., Kim, M. K., Lee, G. S., Kim, C. S., Kim, M. J., Kim, J. D., Lee, S. H., Kim, J. S., Lee, S. C., and Choi, H. S. 2008. Molecular characterization of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) isolated firstly in Korea. *Res. Plant Dis.* 24, 238.
- Kweon, L., H. W. Do, D. W. Choi, J. D. Cheung, J. E. Lee, and D. W. Suh. 2011. The luring effect of *Bemisia tabaci* by LED light-sources and various colors sticky-traps. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 29(suppl. I).
- Lapidot, M., and M. Friedmann. 2002. Breeding for resistance to whitefly-transmitted geminiviruses. *Ann. Appl. Biol.* 140, 109-127.
- Lee, H. J., W. G. Song, H. R. Kwak, J. D. Kim, J. G. Park, C. K. Auh, D. H. Kim, K. Y. Lee, S. C. Lee, and H. S. Choi. 2010. Phylogenetic analysis and inflow route of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) and *Bemisia tabaci* in Korea. *Mol. Cells.* 30, 467-476.
- Lee, M. H., Y. S. Lee, Y. H. Park, C. W. Choi, Y. S. Kim, and H. K. Lee. 2012. Investigation of TYLCV resistance genes and resistance degree of commercial tomato varieties. *Kor. J. Hort. sci. Technol.* 30 (suppl. II).
- Lee, M. H., Kim, S. E., Kim, Y. s., Lee, H. K., Lee, H. G., Jee, H. J., Kim, Y. k., Shim, C. K., Kim, M. J., Hong, S. J and Lee, Y. S. 2013. Studies on the eco-friendly management of whiteflies on organic tomatoes with oleic acid. *Korean J. Organic Agri.* 21, 95-104.
- Lee, Y. S., Kim, J. Y., Hong, S. S., Park, J. and Park, H. H. 2012. Occurrence of sweet-potato whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) and its response to insecticide in Gyeonggi area. *Korean J. Appl. Entomol.* 51, 377-382.
- Lee, W., Park, J., Lee, G.-S., Lee, S., Akimoto, S., 2013. Taxonomic status of the *Bemisia tabaci* complex (Hemiptera: Aleyrodidae) and reassessment of the number of its constituent species. *PLoS One.* 8(5), e63817.
- Lee, W., Lee, S.-M., Kim, C.-S., Choi, H.-S., Akimoto, S.-I., Lee, K.-Y., Lee, G.-S., 2014. Three species of the *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) complex in the Republic of Korea; Detection by an extensive field survey combined with a phylogenetic analysis. *Florida Entomologist.* 97(1), 155-161.
- Lee, W., Kim, C.-S., Lee, K.-Y., Lee, G.-S., 2016. The *JpL* species of the *Bemisia tabaci* complex in Korea:

- Detection by an extensive field survey and analysis of *COI* sequence variability J. Asia Pac. Entomol. 19, 23-29.
- Lynn, O. M., W. G. Song, J. K. Shim, J. O. Kim, and K. Y. Lee. 2010. Effects of azadirachtin and neem-based formulations for the control of sweetpotato whitefly and root-knot nematode. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 53(5), 598-604.
- Maruthi, M. N., S. N. Alam, K. A. Kader, A. R. Rekha, A. Cork, and J. Colvin. 2005. Nucleotide sequencing whitefly transmission and screening tomato for resistance against two newly described Begomoviruses in Bangladesh. Phytopathology. 95, 1472-1481.
- Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. 2015. Greenhouse present condition of facility vegetable and production result of vegetables.
- Moriones, E. and J. Navas-Castillo. 2000. Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. Virus Research 71, 123-134.
- Nauen, R., Stumpf, N. and Elbert, A. 2002. Toxicological and mechanistic studies on neonicotinoid cross resistance in Q-type *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). Pest Manag. Sci. 58, 868-875.
- Navas-Castillo, J., Sanchez-Campos, S., Diaz, J. A., Saez-Alonso, E., and Moriones, E. 1999. Tomato yellow leaf curl virus-Is causes a novel disease of common bean and severe epidemics in Tomato in Spain. Plant Disease. 83, 29-32.
- Oh, J. J., T. K. Lee, H. J. Kim, S. H. Rajangam, U. Kim, S. C. Kim, Y. S., and Choi, C. W. 2008. Molecular characterization of tomato infecting Tobacco leaf curl geminivirus isolated from Jeju island. Res. Plant Dis. 24, 238.
- Park, J. H., Hong, S. J., Han, E. J., Shim, C. K., Lee, M. H., Kim, M. J and Kim, Y. K. 2012. Effect of yellow sticky trap for controlling whitefly on Tomato cultivated in greenhouse. Korean J. Organic Agri. 20(4), 643-654.
- Park, J., Kil, E.-J., Kim, J., Shin, Y.-G., Heo, N.-Y., Lee, S., 2013. Rapid detection and identification of six Tomato yellow leaf curl virus Isolates from different regions using polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J. Phytopathol. 162(4), 209-217.
- Park, J., Kim, S., Choi, E., Auh, C.-K., Park, J.-B., Kim, D.-G., Chung, Y.-J., Lee, T.-K., Lee, S., 2013. Altered invertase activities of symptomatic tissues on Beet severe curly top virus (BSCTV) infected *Arabidopsis thaliana*. J. Plant Res. 126(5), 743-752.
- Pusag, J.C.A., Jahan, S.M.H., Lee, K.-S., Lee, S., Lee, K.-Y., 2012. Upregulation of temperature susceptibility in *Bemisia tabaci* upon acquisition of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). J. Insect Physiol. 58(10), 1343 - 1348.
- Seo, S. T., Lee, J. S., Park, J. H., Han, K. S and Jang, H. I. 2006. Control of powdery mildew by garlic oil in cucumber and tomato. Res. Plant Dis. 12(1), 51-51.
- Sherestha, Y.K., Lee, K.Y., 2012. Oral toxicity of *Photographus* culture and media on gene expression of the adult sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*. J. Invert. Pathol. 109, 91-96.
- Shigenori, U., Masatoshi, O., Keisuke, K. Kazuyasu, F., Kinue, K., Yuko, M., Masahiro, T. and Shinji. 2009. Introduction and molecular characterization of *Tomato yellow leaf curl virus* in Okinawa, Japan. JARQ 43, 19-24.
- Shim, J.-K., Lee, G.-S., Lee, S., Lee, K.-Y., 2015. Oral ingestion of heat shock protein 70 dsRNA is lethal under normal and thermal stress conditions in the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*. J. Asia Pac. Entomol. 18(4), 797-800.
- Simmons, H. E., E. C. Holmes, F. E. Gildow, M. A. Bothe-Goralczyk, and A. G. Stephenson. 2011. Experimental verification of seed transmission of zucchini yellow mosaic virus. Plant Disease. 95(6), 751-754.
- Tsai, W. S., S. L. shih, L. Kenyon, S. K. Green, and F. J. Jan. 2011a. Temporal distribution and pathogenicity of the predominant tomato-infecting begomoviruses in Taiwan, Plant Pathol. 60, 787-799.
- Tsai, W. S., S. L. Shih, S. G. Venkatesan, M. U. Aquino, S. K. Green, L. Kenyon, and F. J. Jan. 2011b. Distribution and genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and pepper plants in the Philippines. Ann. Appl. Biol. 158, 275-287.
- Yamaguchi, M. 1983. World Vegetables. Solanaceous Fruit: Tomato, eggplant, peppers, and others. AVI Publishing company. P. 291-295.

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 아니 됩니다.