

발간등록번호
11-1543000-002584-01

# 대표적인 토양병해의 정확한 진단을 위한 식물병 간이신속 진단키트 개발 최종보고서

2019 . 3 . 14 .

주관연구기관 / (주)에이비씨서클  
협동연구기관 / 베토올(주)

농 립 축 산 식 품 부  
(전문기관)  
농림식품기술기획평가원

대표적인 토양병해의 정확한 진단키트에  
의한 식물병 간이신속진단키트 개발  
최종보고서

2019

농림식품기술기획평가원  
농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “대표적인 토양병해의 정확한 진단을 위한 식물병 간이 신속 진단키트 개발”(개발기간 : 2017. 4. ~ 2018. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019 . 02 . 14 .

주관연구기관명 : (주)에이비씨씨클 (대표자) 박 인 서  
협동연구기관명 : 베트올(주) (대표자) 김 정 미  
참여기관명 : 베트올(주) (대표자)



주관연구책임자 : 이 재 준  
협동연구책임자 : 양 미 영  
참여기관책임자 : 양 미 영

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## 보고서 요약서

과제고유번호	117024-2	해당단계 연구기간	2	단계구분	2 / 2
연구사업명	단위사업	농식품기술개발사업			
	사업명	농식품 창업·벤처지원 R&D 바우처사업			
연구과제명	대과제명	(해당 없음)			
	세부과제명	대표적인 토양병해의 정확한 진단을 위한 식물병 간이 신속 진단키트 개발			
연구책임자	이재준	해당단계 참여연구원 수	총: 10명 내부: 10명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부: 150,000천원 민간: 50,000천원 계: 200,000천원
		총연구기간 참여연구원 수	총: 20명 내부: 20명 외부: 0명	총연구개발비	정부: 300,000천원 민간: 100,000천원 계: 400,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)에이비씨씨클 부설연구소			참여기업명 (주)에이비씨씨클	
국제공동연구	상대국명: 해당없음			상대국 연구기관명: 해당없음	
위탁연구	연구기관명: 해당없음			연구책임자: 해당없음	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
----------------------	--

구분	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호		10-2019- 0000926									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

보고서 면수

## <요약문>

<b>연구의 목적 및 내용</b>	토양 시들음병의 정확한 감별을 위한 세균/곰팡이 복합형 간이 검정 키트 개발				
<b>연구개발성과</b>	토양 시들음병의 발생 원인균인 <i>Ralstonia solanacearum</i> 와 <i>Fusarium oxysporum</i> 를 정확하고 신속하게 진단할 수 있는 복합형의 간이 진단 키트의 개발  1. 진단 키트의 상용화 및 효율적인 사용방법 개발 ○ 토양 시들음병의 병원균인 <i>Ralstonia solanacearum</i> 와 <i>Ralstonia solanacearum</i> 의 Cut-off 레벨 설정. ○ 간접 확인을 위한 토양/기주식물체의 미생물 분리 동정 ○ 진단 키트의 적용 방법 개발 ○ 개발 진단키트의 현장 실증 시험 - 병원균의 대표 발현 작물별 진단 정확성 판단 (병원균 동정, 밀도, 식물체 외형적 특이점 확인) ○ 상용화를 위한 마케팅 전략 수립  2. 토양 시들음병의 정확한 감별을 위한 세균/곰팡이 감별 현장검사용 신속진단키트 개발 ○ 토양 시들음병 세균/곰팡이 감별을 위한 항체 원료 개발 - 세균 및 곰팡이 도입 및 배양 진행 - 세균 및 곰팡이의 단클론 및 다클론 항체 개발 - 진단용 유효 항체 선정 및 대량 생산 ○ 토양 시들음병 세균/곰팡이 감별 진단 키트 개발 및 산업화 - 항체 고정화 조건 및 pair 조건 확립 - 항체 골드 콘주게이션(gold conjugation) 조건의 확립 - 샘플패드 최적화, 검체희석액 최적화, 및 멤브레인 최적화 - 진단키트 진단플랫폼에 맞는 조건 확립 및 임상시험을 통한 prototype 개발 - 토양 시들음병 세균/곰팡이 감별 진단 키트 대량생산 시스템 구축 - 진단키트의 실험실내 효능시험 및 야외적용 시험				
<b>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</b>	○ 토양 시들음병 세균/곰팡이 감별을 위한 복합형 간이 진단 키트의 수출 ○ 난방제 병해로 초기 진단이 어려운 시들음병의 조기 예찰 활용 ○ 농자재 판매의 신규 분야 확보로 국내 농자재 산업 신규 분야 확대 및 수출 분야의 확대				
<b>국문핵심어 (5개 이내)</b>	시들음병	슈도모나스 솔라나세아룸	푸사리움 옥스포룸	측면유동면역발 색법	진단키트
<b>영문핵심어 (5개 이내)</b>	Fusarium wit	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Fusarium oxysporum	lateral flow immunochromato graphy	Diagnostic kits

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

## < 목 차 >

제 1 장	연구개발과제의 개요 .....	2
제 1 절	연구개발의 목적 .....	2
1.	연구개발의 중요성 .....	2
제 2 절	연구과제의 필요성.....	3
1.	연구개발의 개요 .....	3
2.	연구개발 대상의 국내외 현황 .....	4
3.	선행 연구 내용 및 특허 .....	6
제 3 절	기술개발로 예상되는 기술적 경제적 파급효과.....	7
제 2 장	연구 수행 내용 및 결과.....	10
제 1 절	연구개발의 목표.....	10
제 2 절	연구개발 내용 및 결과.....	12
1.	세균 및 곰팡이 균주 도입 및 배양.....	12
2.	병원균에 대한 Cu-off 레벨 설정.....	17
3.	간접 확인을 위한 토양/기주식물체의 미생물 동정.....	20
4.	토양 시들음병 세균/곰팡이 감별을 위한 항체 원료 개발.....	24
제 3 절	연구개발 제품의 유효성 및 임상 평가.....	56
제 4 절	현장 적용법 개발 및 효과 시험.....	60
제 3 장	목표 달성도 및 관련 분야 기여도.....	84
제 4 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	88
1.	연구성과.....	88
2.	연구결과의 활용 계획.....	89
1.	참고문헌 .....	91

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

### 1. 연구 개발의 중요성

- 가. 시들음병은 대부분의 원예작물에서 가장 피해를 많이 주는 병해중 하나로 원예작물은 217천ha(2012년 농업면적통계)으로 전체 작물재배 면적의 13%를 차지하고 있으며, 시들음병 발생이 대부분의 작물에서 발생하는 시설작물은 181.5천ha에 해당하여 시들음병은 작물재배 농가에서 대표적인 피해 병해를 보인다.
- 나. 시들음병은 토양병해로 병원균이 발생성기에 이르면 화학농약으로도 방제가 어려워 피해가 크고, 과실이 착과된 시기나 작물체가 크게 성장한 상황에서 다발생하여 수확량에 직접적인 피해를 주어 다발생시 피해 규모가 재난 수준에 이른다.
- 다. 토양에 발생되어지는 시들음병의 원인균은 세균(*Ralstonia solanacearum*)와 곰팡이(*Fusarium Oxysporm*)에 의해서 발병되어지나 발생 시기 및 발병 형태가 유사하여 고가의 장비에 의한 정확한 진단이 없이는 병원균의 정확한 원인을 파악하지 못하는 상황이다.
- 라. 기존의 정확한 진단을 위해서는 미생물 분리 동정과 RNA분석 방법이 있으나, 진단까지 많은 시간이 소요되며, 많은 비용이 드는 상황으로 농가에서는 분석 의뢰가 어렵고 농가 스스로의 경험에 의존하여 판단하는 상황이다.
- 마. 두 종류의 시들음병의 원인균 모두 병 진행 속도가 빨라 다른 식물체로의 이병 및 전이가 매우 급속하게 진행되고 이로 인해 재배를 포기하는 사례가 많은 상황이다
- 바. 또한, 농가의 진단에 대한 불확실성으로 인해 세균병약과 곰팡이병약을 동시에 처리하고 불필요하게 다종의 살균제를 혼용하여 재배 농가의 경영비의 가중을 초래하고 있는 실정이다.
- 사. 따라서, 기존의 고비용 및 신속한 분석이 어려웠던 문제점을 해결할 수 있는 단순

하면서도 과학적이고 정확한 초기 진단 방법이 요구되어지고 있는 상황이다  
아. 해외 또한, 시들음병 증상의 정확한 진단이 없어 농업 컨설턴트와 재배 농민 모두에게 커다란 고민을 제공하고 있는 실정으로 국내 수출 농자재의 효율적인 적용을 위한 보조 수단으로써 기여도가 매우 높을 것으로 판단된다.

자. 따라서, 현장 상황에서 신속하고 정확하게 병을 진단할 수 있는 수단이 무엇보다 필요하며, 이를 위한 방법으로 lateral flow immunochromatography 기술을 기반으로 한 진단키트의 개발을 수행하고자 한다.

## 제 2 절 연구개발의 필요성

### 1. 연구개발의 개요

#### 가. 연구개발 대상 및 기술·제품의 개요

##### (1) 과제수행의 필요성


토양 시들음병은 *Ralstonia solanacearum*에 의해 발생하는 세균성 시들음병과 *Fusarium Oxysporum*에 의해 발생하는 곰팡이성 시들음병으로 나뉘어진다. 위의 두 종류의 시들음병은 발생 시기 및 표면에 나타나는 증상 등이 유사하여 정확한 진단에 의한 명확한 처방이 사실상 이루어지지 않고 있으며, 이에 따라 재배 농가에서는 심각한 작물의 피해 및 경영비의 가중을 가져오고 있는 상황이다. 또한, 시들음병은 병의 진행 속도가 빨라 초기 진단에 의한 명확한 처방이 이루어지지 않으면 병 방제가 사실상 어려워 작기를 중단해야하는 극한 상황으로 악화되기 십상이다. 따라서, 현장 상황에서 신속하고 정확하게 병을 진단할 수 있는 수단이 무엇보다 필요하며, 이를 위한 방법으로 lateral flow immunochromatography 기술을 기반으로 한 진단키트의 개발을 수행하고자 한다.

##### (2) 기술제품의 개요

Lateral flow immunochromatography 기술을 기반으로 하여 병원성 세균 및 곰팡이의 유무를 확인할 수 있는 항체를 포함하며, 개발된 단클론과 다클론 항체를 통해 병원균의 진행 정도를 수분내에 대략적으로 판별할 수 있는 간이진단키트이다.



**<제품 개념도>**

제품명	국문	토양 시들음병 세균/곰팡이 감별 진단 키트
	영문	Diagnostic kits for plant wilt rot by fungus and bacteria
용도	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 식물에서 토양 시들음병의 원인균인 세균(Ralstonia solanacearum)/곰팡이(Fusarium Oxysporm) 감염을 감별 하기 위한 키트.</li> <li>○ 사용되는 시료는 지체부(토양과 접한 줄기부분) 절단 또는 착즙</li> </ul>	
사양	검사용 콤보디바이스, 검체희석액, dilution dropper, 설명서	
방법	검체희석액(지체부 절단 또는 착즙)을 검사키트에 점적한 5-10분 감염명 여부 확인.	
성능	민감도, 특이도 90%이상의 제품개발목표(기존 타 품목의 경우에 근거함)	
예상제품	제품구성도(예시)	
	<p align="center">&lt;제품 구성&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Test device</li> <li>- Diluent (buffer)</li> <li>- Disposable dropper</li> <li>- Insert manual</li> </ul>	
	결과판독	
결과 판정은 Non, 저역가(C > T), 중역가(C = T), 고역가(C < T)		

**<개발제품의 우수성과 차별성>**

구분	기존 제품	개발제품	기기분석	
간이 검정 키트	검정검체	1종 단일	2종 복합	다종
	검체종류	Ralstonia (세균) Virus 단종	Ralstonia(세균) Fusarium(곰팡이) 다중검증	다종
	검정형태	유무	대략 정량 (발병 초기, 중기, 성기)	병원균 포자 유전자분석
	분석소요시간	5-10분	5-10분	2주 정도
	분석 비용	30,000원-35,000원	20,000원 -25,000원	
	분석장소/장치	사용 농가	사용 농가	연구소/ 고가장비
	전문성	영농인 등	영농인 등	전문가

## 2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

### 가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

#### (1) 기술수준

현재 식물병 분야의 lateral flow immunochromatography 기술을 기반의 항체 개발은 일부 세균 및 virus에 국한되어 개발되어지고 있으며, Virus에 대한 진단키트는 CMV-, TMV-, MNSV-W-, MNSV-M-, TBSV-, TSWV-RIGS 등이 개발되어 일부 공급되어지고 있다. 세균 진단키트는 국내에 보급 시판되는 키트는 없으며, 일부 해외에서 개발된 *Erwinia amylovora* 등에 대해서 개발되어 상품화되어지는 상황이다.

#### (2) 시장현황

국내의 진단 키트 시장은 정부 주도형의 개발 보급이 이루어지는 상황으로 예찰 및 돌발병해 발생시 농업관련 기관을 통해 보급 진행되어지고 있고 상용화 판매에 이르지 못하는 상황이다. 특히, 식물분야는 virus 진단 분야에 한정적으로 적용되어지고 있으며, 세균 및 곰팡이에 의해 발생되어지는 병해에는 개발 및 보급이 전무후무한 상태이다.

#### (3) 경쟁기관현황

의료용 및 동물의학 분야에서의 상용화와 개발이 진행되어지고 있으며, 개발하고자하는 식물병해 진단키트 분야는 Virus진단에 국한되어 있어 세균 및 곰팡이병에 대한 lateral flow immunochromatography 기술 간이진단키트의 개발 및 상용화는 아직 미흡한 상태이며 고비용 및 오랜 시간이 소요되어지는 PCR 이용 DNA분자진단에 의존하고 있어 대상으로 하는 토양시들음병과 같이 병 발생이 급격하게 진행되어지는 난방제 병해에 대해서 개발상품의 경쟁성이 매우 높다고 할 수 있다.

#### (4) 지식재산권현황

국내 특허 분석 결과에서도 벼줄무늬잎마름병 바이러스를 비롯한 원예작물의 바이러스 프라이머 세트 등 DNA분자진단에 기준을 둔 방법이 지식재산권으로 등록되어 있으나, 산업화로 활성화되기에는 비용과 장비, 분석 시간의 장기 소요로 일반 현장에 적용되기에는 어려움이 있다. DNA분자진단의 경우에는 기준병해에 대한 다양한 프라이머 세트의 개발이 진행되었으나, lateral flow immunochromatography 기술 간이진단키트는 일부 바이러스에 대해서만 진행이 되어진 상태이며, 이 또한 식물병해보다는 동물의학 분야에 치중되어 개발되어 있는 실정이다.

#### (5) 기타현황

기타 병해진단이외에 GMO(유전자변형) 유무에 대한 검출키트 등으로 활용되어지고 있다.

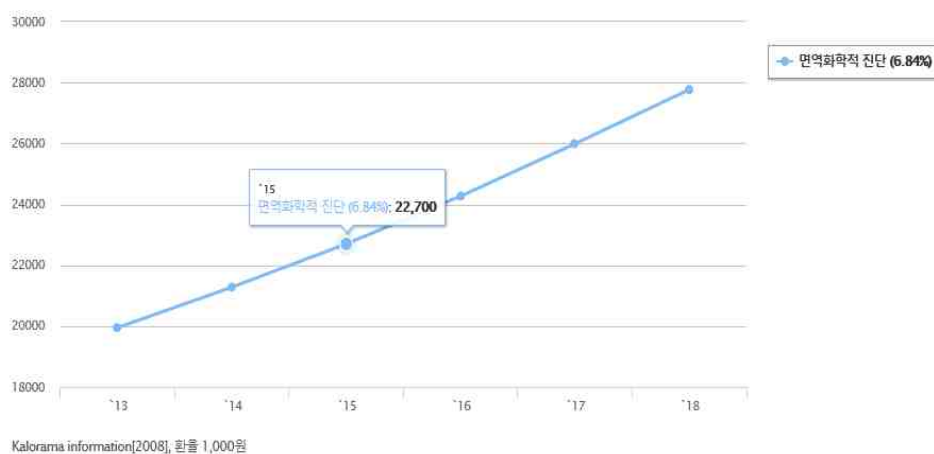
## 나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

### (1) 기술현황

해외에서는 식물 Virus 진단키트 뿐만아니라 Erwinia amylovora 등의 간이키트가 개발되어 상용화된 상태이며, 특히 POKET DIAGNOSTIC사 등은 *Ralstonia solanacearum*에 대해 상용화한 상태이다.

### (2) 시장현황

2014년 면역화학적 진단 시장은 세계시장의 경우 212억 80백만 달러, 국내는 2,263억 원 규모를 형성되어 있으며, 2013년부터 2018년까지 6.84%의 성장률을 보이며 지속적인 성장이 전망되어지고 있다.



### (3) 경쟁현황

POKET DIAGNOSTIC사와 AC Diagnostics사 등에서 Virus를 비롯한 식물병 간이 진단 키트를 판매중이며, 대표적인 세균과 곰팡이 진단 키트도 판매하고 있으나 곰팡이병에 대한 진단키트분야는 미흡한 편이다.

### (4) 지식재산권현황

면역화학적 진단의 대상특허 9,123건에 대한 각 국가의 연도별 출원동향을 살펴보면, 출원규모에 있어서는 미국이 7,451건(82%)으로 가장 높은 점유율을 나타내며, 이어서 유럽이 738건(8%), 일본 602건(6%), 한국 332건(4%)의 순서로 특허점유율을 기록중이다.

## 3. 선행 연구 내용 및 특허

### 가. 종래 선행 연구 및 보유 특허현황

- 1) 본 과제의 목표인 반려동물용 임신 신속진단키트 기술 및 제품의 기반기술 원리는 lateral-flow immunochromatography임.

2) 상기 기술의 핵심이 되는 기술은 1) 항원/항체 기반기술은 제품의 원료가 되는 항원/항체 개발 및 제품화 기술임. 해당 관련 기술은 다년의 다수의 개발과 상용화를 통하여 전문적인 수준을 보유하고 있으며 그 근거로써 본 연구와 관련된 베트올(주) 보유 특허현황은 다음과 같음.

< 베트올(주) 보유 특허현황 >

구분	출원번호 (출원일)	등록번호 (등록일)	국가	출원인	명칭
등록		10-1069391 (2011.09.26)	대한민국	베트올(주)	고양이레트로바이러스탐지용항체 및 이를 포함하는 면역탐지키트
등록		10-1069818 (2011.09.27)	대한민국	베트올(주)	면역분석장치
등록		10-1157621 (2012.06.12)	대한민국	베트올(주)	에를리히아 탐지용 항원, 및 이를 포함하는 면역탐지키트
등록		10-1209264 (2012.11.30)	대한민국	베트올(주)	레이슈마니아 탐지용 항원, 및 이를 포함하는 면역탐지키트
등록		10-1219505 (2013.01.02)	대한민국	베트올(주)	고양이 톡소포자충 감염 진단 방법 및 키트
등록		10-1317417 (2012.10.01)	대한민국	베트올(주)	돼지열병 바이러스의 탐지용 항원, 이를 이용한 항체 검출 방법, 및 이를 포함하는 탐지키트
출원	10-2010-0090561 (2010.09.15)		대한민국	베트올(주)	돼지인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌 검출용 항체 및 이의용도
출원	10-2010-0090654 (2010.09.15)		대한민국	베트올(주)	돼지인플루엔자 바이러스 뉴라미니다아제 검출용 항체 및 이의용도
출원	10-2011-0119163 (2011.11.15)		대한민국	베트올(주)	돼지열병바이러스에 대한 항체 검출용 키트, 및 이를 이용하여 돼지열병바이러스에 대한 항체 유무 및/또는 항체 역가를 측정하는 방법
출원	10-2012-0047512 (2012.05.04)		대한민국	베트올(주)	아나플라즈마 파고사이트필리움 균주의 탐지용 조성물, 및 이를 포함하는 면역진단키트
출원	10-2012-0063911 (2010.06.14)		대한민국	베트올(주)	소바이러스성 설사병 바이러스의 탐지용 항체, 이를 이용한 항원 검출 방법, 및 이를 포함하는 탐지키트
출원	10-2015-0038827 (2015.03.20)		대한민국	베트올(주)	개 렙토스피라 IgG, IgM 항체를 진단하기 위한 재조합 항원 단백질 및 이를 이용한 동시 진단키트
출원	10-2016-0071071 (2016.06.08.)		대한민국	베트올(주)	반정량 수평류 면역기술을 이용한 말 면역글로블린 G 진단키트

### 제 3 절 기술개발로 예상되는 기술적·경제적 파급 효과

#### 1. 기술적 파급 효과

- 가. 기존 식물바이러스 검정 이외의 식물 세균 및 곰팡이병의 lateral flow immuno chromatography 기술 방법의 가능성을 크게 확대하는 계기가 될 것으로 기대되며, 특히 그 동안 분자진단에 의해서만 가능하던 곰팡이병에 신속한 진단 기술 확보의 선도적 자료가 될 것으로 기대됨
- 나. 시들음병의 항체 개발을 통해 각종 병원성 세균과 곰팡이의 항체개발의 확대 개발 가능성을 확보할 수 있는 계기가 될 수 있음
- 다. 간이 항체 정량화를 통한 다클론 형태의 개발로 간이진단키트의 대략적 정량화 가능으로 손쉽고 편리하게 병발생의 정도를 판단할 수 있어 병 발생 초기의 빠른 진단을 통한 예방 및 조기 대응이 가능할 것으로 기대됨
- 라. 시들음병의 항체 개발을 통해 다양한 식물곰팡이병의 항체개발의 선행 연구로써 향후 개발의 참고 자료로써 활용도가 높을 것으로 기대됨

#### 2. 경제적·산업적 파급 효과

- 가. 수입에 의존하던 간이진단 키트 시장의 수입 대체 효과로 20억원/년 이상의 수입 대체 효과 (Virus 진단키트 기준)
- 나. 원예작물의 재배농가의 20% 이상의 농가에서 피해가 발생하는 시들음병의 조기 진단에 의한 예방과 농자재 비용의 절감을 통해 2000만원(1ha당) 이상의 소득증대 효과를 기대.
- 다. 작물 재배 분야 뿐만아니라, 수입/수출 작물의 진단 분야와 산림 분야의 적용 등 다양한 산업의 적용확대가 기대됨.
- 라. 수출 농자재 업체의 해외 수출 확대 품목으로 적용 될 수 있으며, 위의 판매를 통해 정확한 재배 컨설팅으로 기타 농자재의 수출 확대의 보조 수단으로써 수출확대의 기여도가 높을 것으로 기대됨

### 3. 사회적 파급 효과

- 가. 미래 농업으로 주목 받고 있는 스마트농업의 주요 소재로써 활용되어짐으로써 IOT와 함께 미래 농업 환경의 바꾸는 주요 수단으로써 작용할 것으로 기대
- 나. 농업 환경의 과학화를 주도하며, 농업 생산성의 예측과 병해의 예찰 등 국가 농업기관의 농업 정책 추진에 주요한 역할을 담당할 것으로 기대

## 제 2 장 연구 수행 내용 및 결과

### 제 1 절 연구개발 목표

1. 최종 목표 : 토양시들음병 진단을 위한 복합형 간이진단 키트의 개발  
(*Ralstonia solanacearum* 및 *Fusarium oxysporum* 검정을 위한 복합형 kit)
  - 가. 용도 : 식물에서 토양 시들음병의 원인균인 세균(*Ralstonia solanacearum*)/곰팡이(*Fusarium Oxysporum*) 감염을 감별 하기 위한 키트.
  - 나. 사양 : 검사용 콤보디바이스, 검체희석액, dilution dropper, 설명서
  - 다. 방법 : 검체희석액(지체부 절단 또는 착즙)을 검사키트에 점적한 10-15분 감염 여부 확인.
  - 라. 성능 : 민감도, 특이도 90%이상의 제품개발목표(기존 타 품목의 경우에 근거함)

### 2. 연구개발 단계적 목표

#### 가. 개발 기술을 적용한 제품 개발

##### 1) 제품 개발 목표

연도	수행기관	세부 개발 목표
1차년도	주관기관 (주)에이비씨씨클	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 병원균의 Cut-off 레벨 설정</li> <li>• 간접 확인을 위한 토양/기주식물체의 미생물 분리 동정</li> <li>• 현장 상황에 맞는 진단 키트의 적용방법 개발</li> <li>• 진단키트의 현장 실증 시험</li> <li>• 상용화를 위한 마케팅 전략 수립</li> </ul>
	협동기관 (베트올(주))	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 토양 시들음병 세균/곰팡이 감별을 위한 항체 원료 개발</li> </ul>
2차년도	주관기관 (주)에이비씨씨클	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 토양 시들음병 세균/곰팡이 감별 진단 키트의 현장 적용법 개발 및 효과 시험</li> </ul>
	협동기관 (베트올(주))	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 토양 시들음병 세균/곰팡이 감별 진단 키트 개발 및 산업화</li> </ul>

2) 제품 평가 지표

성과지표	계획(A)	실적(B)	가중치	점수(D)
특허 출원	1	1	10	10
특허 등록	0	0	-	-
품종 등록	0	0	-	-
기술이전(건)	0	0	-	-
기술료(백만원)	0	0	-	-
제품화(건)	1	1	50	10
매출액(백만원)	0	5	-	-
수출액(백만원)	0	5	-	-
고용창출(명)	1	10	10	10
투자유치(백만원)	0	0	-	-
기술인증	1	1	20	0
논문(SCI)	0	0	-	-
논문(비SCI)	0	0	-	-
논문평균 IF	0	0	-	-
학술발표	0	0	-	-
교육지도	0	0	-	-
인력양성	0	0	-	-
정책활용	0	0	-	-
홍보전시	1	3	10	10
기타	0	0	-	-
계	4	4		80.00점



## 제 2 절 연구개발 내용 및 결과

### 1. 세균 및 곰팡이 균주 도입 및 배양

(주)베트올의 항체 개발을 위한 시료 제공을 위해서 *Ralstonia solanacearum* 및 *Fusarium oxysporum*의 국내에 유전자은행 분양을 진행하였으며, 현장균에 대한 분리 동정을 실시하여 (주)베트올의 항체 개발을 위한 시료로 사용하였다.

#### 가. 국내 등록균주KACC 분양 / 배양

국립유전자원센터(KACC)를 통해 세균성 시들음병(*Ralstonia solanacearum*) 및 곰팡이성 시들음병(*Fusarium oxysporum*)을 조사하였고, 분리 숙주(기주)는 개발 후 상업성을 고려하여 국내외 피해가 많고 재배면적이 큰 작물을 기주로 하는 대상병원균을 선정하였으며, 분양균의 내용은 아래와 같다.

Table 1. 국립유전자원센터(KACC) 도입 균주 정보

Scientific Name	<i>Ralstonia solanacearum</i>
KACC No.	10695
History	< S.D. Lee (RDA) SL 1172
Location of Isolation	Chungju, Chungbuk, Korea
Source	Tamato ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )
Date of Isolation	19980101
Characteristics	Biovar4, race1.
Media	NA Phosphate
Temperature	28°C



Fig. 1. *Ralstonia solanacearum* 분리 균주 사진

배양 균주는 시료 제공을 위해 NA (OXOID CM3) Phosphate와 TTC배지를 이용하여 배양성을 확인하였고, 각각  $2.0 \times 10^{10}$ cfu/ml과  $1.3 \times 10^{10}$ cfu/ml으로 배양성을 보여 (주)베트올의 항체 형성 제공용으로 충분하였다.

#### 나. 현장균의 분리/동정

병원균의 race 및 기주적 특성, 현장 상황에서의 변이적 특성을 갖는 병원균에 대해서도 항원항체 반응을 갖는지를 확인하기 위하여 현장균에 대한 분리/동정을 실시하였다.

##### 1) *Ralstonia solanacearum* 현장균주의 동정

현장균의 분리는 *Ralstonia solanacearum*의 경우 충북 괴산의 토마토 농가에서 확인 분리하였으며, 청고병 감염으로 예상되어지는 토마토의 줄기를 절단하여, 수액을 채취하고 TTC배지에 농도별로 도말하여 분리하였다.

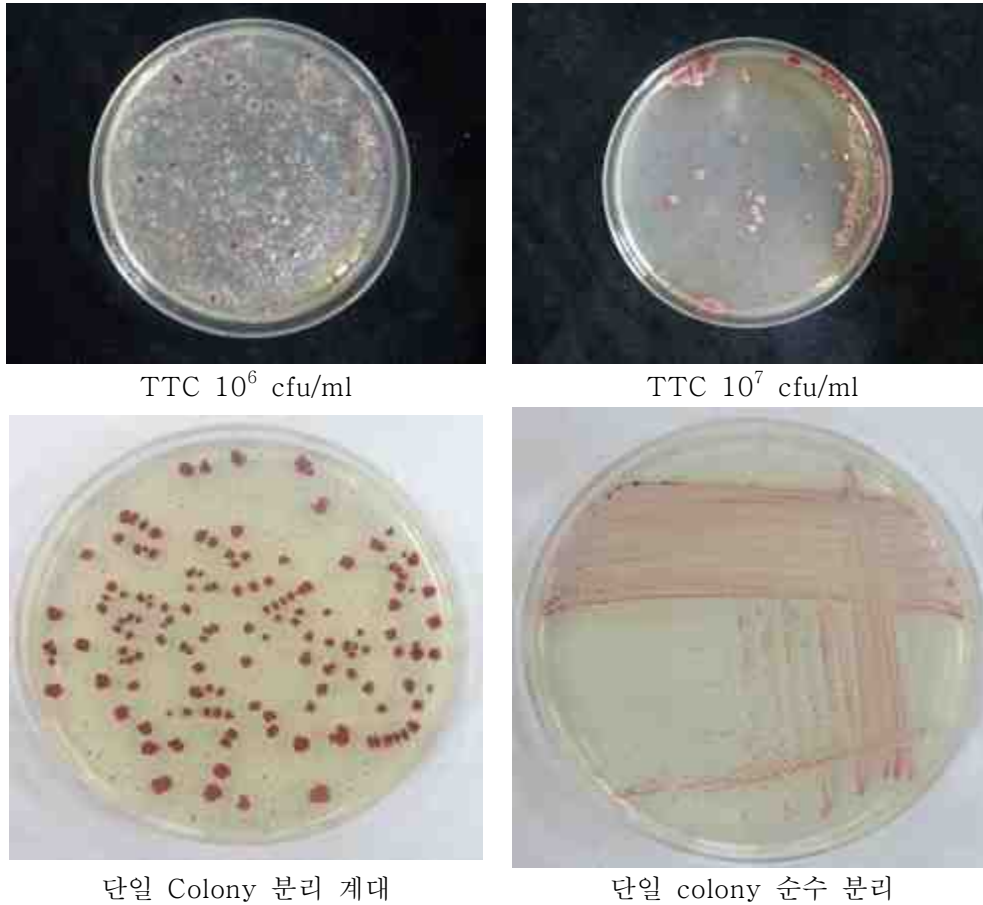


Fig.2 현장 분리균의 순수 분리

계대된 분리균은 *Ralstonia solanacearum*로의 정확한 확인을 위하여 16S rRNA 분석을 실시하였다. 증폭에 사용된 Primer는 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 1492R(5'-GGTTACCTT GTTACGACTT-3')를 사용하였으며, PCR Product Purification Kit (Qiagen)을 이용하여 증폭 산물을 정제하였고, 정제산물은 Genetic analyzer 3730xl(Applied Biosystems)을 이용하여 염기서열을 분석하였다. 데이터의 해석은 DDBJ/NCBI/Genbank의 database에서 진행하였다.

시험 결과 *Ralstonia*속의 종을 포함하는 계통학적 그룹에 속하는 균주로서, *Ralstonia solanacearum* LMG 2299T (EF016361)과 99.2%의 유연관계를 나타내는 것으로 확인되었다.

```

TTTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACG
GGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGCCACTAA
CGAAGCAGAGATGCATTAGGTGCTCGAAAGAGAAAAGTGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGA
TGTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTGTCTCTAGTTGCTACGAAAGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGAC
AAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACGTCATACAATGGTGCATA
CAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCAGAAAATGCATCGTAGTCCGGATCGTAGTCTGCAACTCGACTAC
GTGAAGTGGAAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCA
CACCATGGGAGTGGGCTTTACCAGAAGTAGTTAGCCTAACCGCAAGGAGGGCGATTACCACGGTAGGGTTCATGACTGGG
GTGAAGTCGTAAGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCGGGGGTAGCTTGCTA
CCTGCCGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCCTGTAGTGGGGGATAACTAGTCGAAAGACTAGCT
AATACCGCATACGACCTGAGGGTGAAAAGTGGGGGACCGCAAGGCCTCATGCTATAGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCTA
GTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTG
AAGAAGGCCTTCGGTTGTAAAGCACTTTGTCCGAAAAGAAAATCGCACTGGTTAATACCTGGTGTGGATGACGGTACCG
GAAGAATAAGGACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTCCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCG
TAAAGCGTGCAGCGGGTGTGCAAGACCGATGTGAAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAATTGCATTGGTACTGCACGG
CTAGAGTGTGTCAGAGGGAGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAG
GCAGCC//

```

Fig. 3. 현장균의 16S rRNA 유전자 전염기서열(1,367bp)의 분석결과

Table 2. 현장 분리균의 EzBiocloud 상동성 검색결과

Sequences producing significant alignments			
Accession	Hit taxon name	Hit strain name	Similarity (%)
<a href="#">EF016361</a>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	LMG 2299(T)	99.2
<a href="#">AJ270258</a>	<i>Ralstonia mannitolilytica</i>	LMG 6866(T)	98.64
<a href="#">AF488779</a>	<i>Ralstonia insidiosa</i>	AU2944(T)	98.31
<a href="#">JOVL01000020</a>	<i>Ralstonia pickettii</i>	ATCC 27511(T)	97.17
<a href="#">AF076645</a>	<i>Cupriavidus gilardii</i>	LMG 5886(T)	95.34

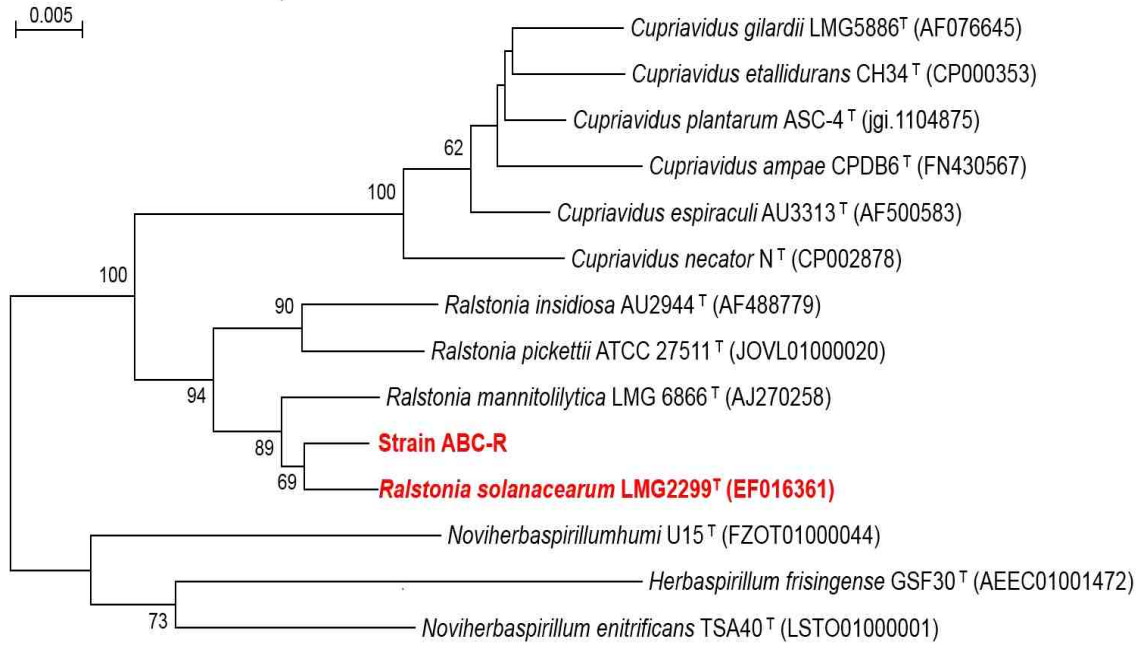


Fig.4. 현장 계대 균주의 계통학적 위치

## 2) *Fusarium oxysporum* 현장균주의 분리 동정

경기 화성의 토마토 농가에서의 시들음병 증상을 확인하고 병 발생 줄기의 지체부 상단을 절단한 후 시험관에 침지하여 1차적으로 *Ralstonia solanacearum*와 같은 유액의 발생 유무를 관찰하였으나 유액의 발생은 없었다. 이를 토대로 2차로 줄기 도관을 절편하여 PDA배지에 접종후 28℃ 항온기에서 3일간 배양하였다. 배양된 균사를 증류수에 약간 희석하여 현미경으로 특이적 포자 양상을 관찰하였다.

아래의 그림과 같이 현장분리균의 포자가 초승달 모양을 가지며, 여러마디로 분리되어 있는 특징을 보여 *Fusarium*속의 특이적 포자 모양과 일치하였다. 생물체 증상과 현미경을 이용한 특이적 포자 관찰을 통해 *Fusarium oxysporum*로 유추되었고, 정확한 확인을 위해 미생물 동정을 실시하였다.

계대된 분리균은 *Fusarium oxysporum*로의 정확한 확인을 위하여 16S rRNA 분석을 실시하였다. 증폭에 사용된 Primer는 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGA TATGC-3')를 사용하였다.



Fig. 5. 시들음병 (*Fusarium oxysporum*) 현장균주 분리

ITS region 유전자 염기서열에 기초한 분자계통학적 분석결과, *Fusarium* 속의 종을 포함하는 계통학적 그룹에 속하는 균주로서, *Fusarium oxysporum* (KU321556)과 100%의 유연관계를 나타내는 것으로 확인되어 (주)베트올의 진단키트 항체 개발의 재료로 제공하였다.

```

AACCCCTGTGACATACCACTTGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAACCGGGACG
GCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTCTGAGTAAAACCATAAATAAA
TCAAAACTTTCACAACGGATCTCTTGGTTCCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGAT
AAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCA
GTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACAGCTTGGTGTTGG
GACTCGCGTTAATTCGCGTTCCTCCAAATTGATTGGCGGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGT
AGTAAAACCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTT
GACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA//

```

Fig. 6. 현장균의 16S rRNA 유전자 전염기서열(1,367bp)의 분석결과

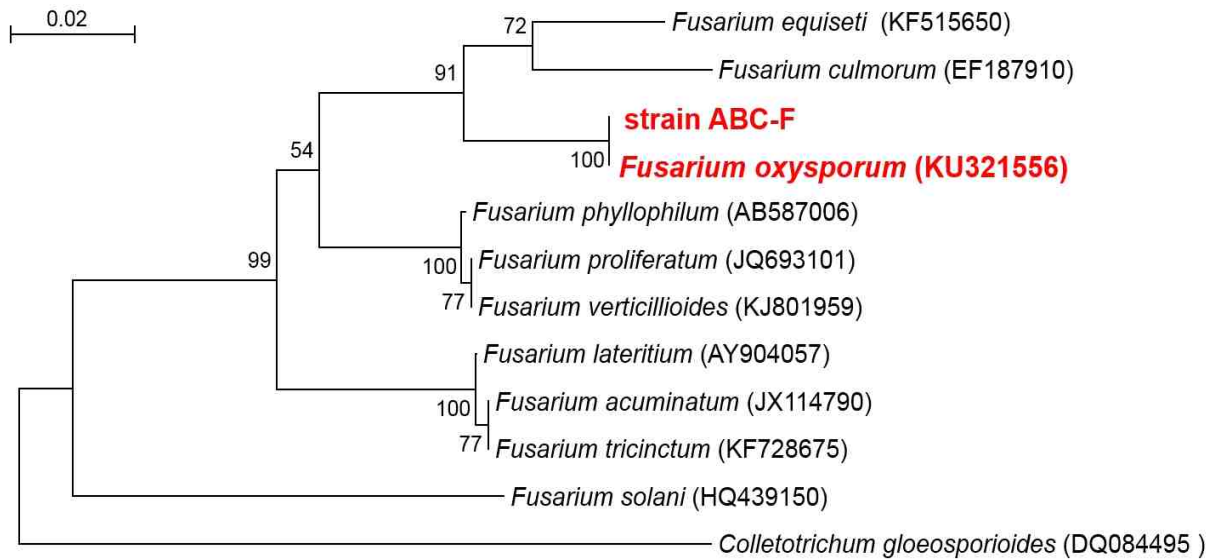


Fig. 7. 의뢰균주의 계통학적 위치

## 2. 병원균에 대한 Cut-Off 레벨 설정

### 가. 식물체 발현 농도 구명 시험(pot 시험)

*Ralstonia solanacearum*, *Fusarium oxysporum* 대부분의 원예작물에서 가장 피해를 많이 주는 병해중 하나로 원예작물은 재면적에 217천ha(2012년 농업면적통계)20%정도의 피해를주어 전체 작물재배 면적의 13%를 차지하고 있는 기주식물체 3종(토마토, 오이, 고추)을 선택하여 유묘를 정식한 후 1화방 착과되도록 재배한다. 병원성미생물의 접종을 위해 *Ralstonia solanacearum*는 TTC배지를 이용하여 30℃에서 72hr 액체 배양하고, *Fusarium oxysporum*은 순수분리 절편을 이용하여 PDA 배지에서 30℃에서 96hr 액체 배양한다. 각각의 접종량은 pot당 병원성미생물 배양액 5ml에 증류수 100ml에 희석하여 접종하였다. 접종후 정상적인 발현을 위해 온실의 온도는 25℃ 이상을 유지하며 접종후 다음날부터 고사될 때까지 5일 간격으로 식물체에 나타나는 증상과 토양과 지체부 상단 절단 부위의 수액의 병원성미생물의 밀도를 분석하였다.

#### 1) 토마토의 토양 및 수액의 병원성 미생물의 밀도 분석

시험 결과 *P.solanacearum*에 의한 청고병의 증상은 처리후 5일경에 증상이 발생되었으며, 처리후 10일경부터는 시들음증상이 급격하게 진행되어 15일 이후에는 고사에 이르렀다. 토양내 미생물의 밀도의 또한, 10일 이후 급격하게 증가하여 15일 이후에는 비슷한 경향을 보였다. 수액내의 미생물 밀도도 마찬가지로 10일 이후 급격하게 증가하였으며,  $10^6$ cfu/ml 이상을 나타내어 적어도 이 이하의 값에서 항원항체 반응을 보여할 것으로 판단

되었다.

*Fusarium oxysporum*에 의한 시들음병 증상은 처리후 15일 이후에 병증이 발생되어지기 시작하였으며, 20일 이후 증상이 급격하게 진행되었다. 토양과 수액의 미생물 분석에서도 15일 이후 미생물의 급격한 증가를 보였으며, 즙액 내에는  $10^5$ cfu/ml 이상을 나타내어 적어도 이 이하의 값에서 항원항체 반응을 보여야 할 것으로 판단되었다.

Table 3. 토마토의 토양 및 수액의 병원성 미생물의 밀도 분석

	접종 병원성 미생물	처리후 일수에 따른 밀도(log cfu/g 또는 ml )			
		5일	10일	15일	20일
토양	<i>Ralstonia solanacearum</i>	5.4	6.8	7.2	7.1
	<i>Fusarium oxysporum</i>	3.5	4.4	6.1	6.3
도관 수액	<i>Ralstonia solanacearum</i>	4.2	7.2	—	—
	<i>Fusarium oxysporum</i>	0	4.1	5.8	5.9

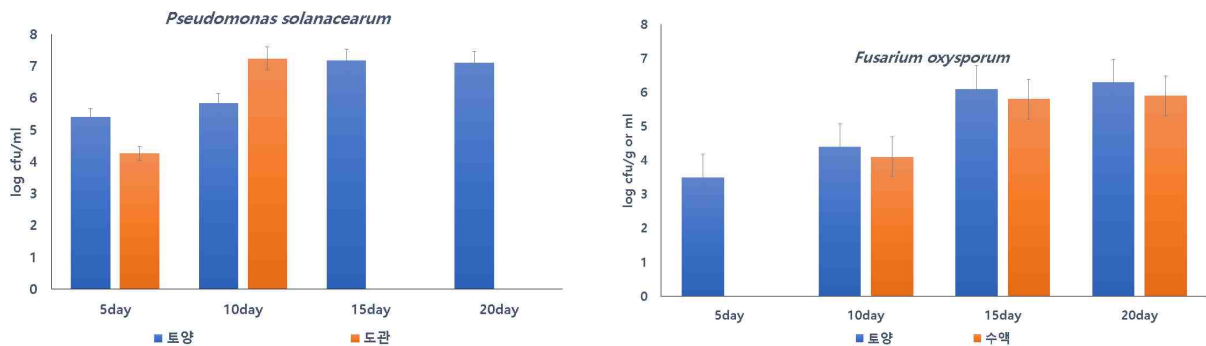


Fig. 8. 토마토의 병원균 접종 토양 및 수액의 병원성 미생물의 밀도 분석

## 2) 고추의 토양 및 수액의 병원성 미생물의 밀도 분석

시험 결과 *R.solanacearum*에 의한 시들의 증상은 토마토에서와 마찬가지로 처리후 5일 경에 증상이 발생되었으며, 처리후 10일경부터는 시들음 증상이 급격하게 진행되어 15일 이후에는 고사에 이르렀다. 토양내 미생물의 밀도의 또한, 10일 이후 급격하게 증가하여 15일 이후에는 비슷한 경향을 보였다. 수액내의 미생물 밀도도 마찬가지로 10일 이후 급격하게 증가하였으며,  $1 \times 10^7$ cfu/ml 이상을 나타내어 적어도  $10^6$  이하의 값에서 항원항체 반응을 보여야 예방적인 처리를 위한 예방 진단이 가능하리라 판단되었다.

*Fusarium oxysporum*에 의한 시들음병 증상은 처리후 15일 이후에 병증이 발생되어지기 시작하였으며, 20일 이후 증상이 급격하게 진행되었다. *Fusarium oxysporum*에 의한

시들음 증상은 *R. solanacearum*에 시들음 증상에 비해 병원미생물의 진행 속도가 낮은 경향을 알 수 있었다. 미생물 밀도 분석에서도 15일 이후 미생물 수가 급격하게 증가하였으며, 즙액내에는  $7 \times 10^5$ cfu/ml 이상을 나타내어 적어도  $10^5$ cfu/ml 이하의 값에서 항원항체 반응을 보여야할 것으로 판단되었다.

Table. 4 고추에 대한 병원균 접종에 따른 토양 및 수액의 병원성 미생물의 밀도 분석

	접종 병원성 미생물	처리후 일수에 따른 밀도(log cfu/g 또는 ml )			
		5일	10일	15일	20일
토양	<i>Ralstonia solanacearum</i>	5.5	6.6	7.0	7.1
	<i>Fusarium oxysporum</i>	4.4	5.1	6.3	6.4
도관 수액	<i>Ralstonia solanacearum</i>	4.3	6.8	—	—
	<i>Fusarium oxysporum</i>	3.1	4.0	5.8	5.8

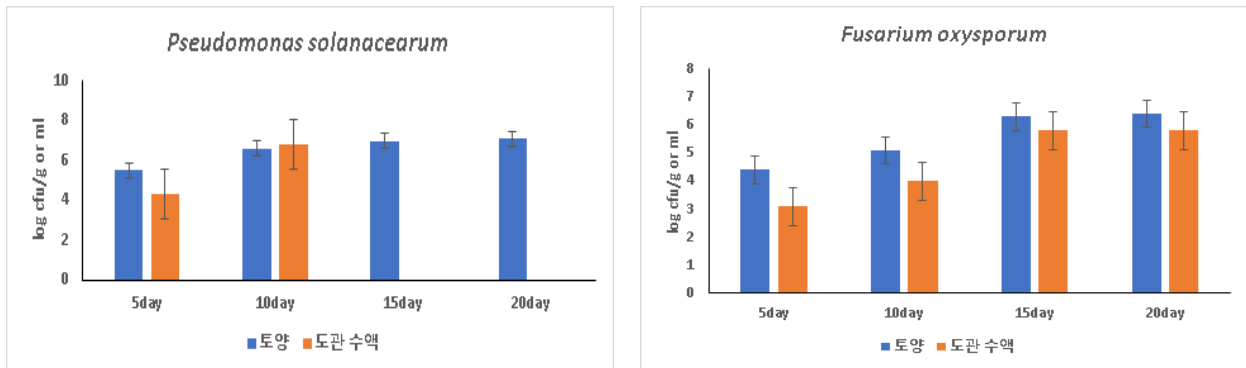


Fig. 9. 고추의 병원균 접종 토양 및 수액의 병원성 미생물의 밀도 분석

### 3) 오이 작물에 대한 접종 미생물의 토양 및 수액의 병원성 미생물의 밀도 분석

오이의 경우 생육이 빠른 상황에서는 *R. solanacearum* 및 *Fusarium oxysporum*에 의해 도관부를 막아 급성으로 진행되어지나 유묘의 경우 생육이 빨라 증상의 발생이 어려울 수 있어 생육이 이루어진 본답에서 시험을 진행하였다. 포장은 충북 괴산군에 있는 오이 시설하우스 포장을 선정하여 시험을 진행하였으며, 각각의 미생물은 *R. solanacearum*은  $2.4 \times 10^9$  cfu/ml, *Fusarium oxysporum*  $2.0 \times 10^8$  cfu/ml로 배양된 배양액을 200배로 희석하여 7월 20일에 관주 처리하였다. 유묘 시험과 마찬가지로 접종후 5일, 10일, 15일, 20일에 걸쳐 토양과 지체부 부분 줄기의 절단 후 수액의 병원성 미생물의 밀도를 분석하였다.

시험 결과 *R. solanacearum*에 의한 시들의 증상은 유묘에서와 달리 병증의 진행 속도



가 늦어 처리후 10일경부터 부분적인 병증이 식물체에 나타났으며, 15일 이후 전체적인 포장에서의 증상이 나타나기 시작하였다. 토양내 미생물의 밀도는 10일 이후 유묘에서 병증이 나타났던 토마토와 고추의 밀도 이상인  $8.4 \times 10^6$ cfu/g이었고 도관수액은  $6.2 \times 10^6$ cfu/ml 이었지만 병증이 심하지 않았다. 이는 오이에서는 *R. solanacearum*에 대한 감수성이 가지고 있으며 타작물에 비해 생육의 속도가 빠른 것에 기인된 것으로 사료된다.

*Fusarium oxysporum*에 의한 시들음병 증상은 처리후 10일 이후에 병증이 발생되어지기 시작하였으며, 15일 이후 증상이 급격하게 진행되어 오이에서는 *R. solanacearum*에 비해 병증이 손쉽게 나타났다. 미생물 밀도 분석에서도 10일 이후부터 미생물 수가 급격하게 증가하였으며, 즙액내에는  $2.0 \times 10^7$ cfu/ml 이상을 나타내어 적어도  $10^5$ cfu/ml 이하의 값에서 항원항체 반응을 보여야할 것으로 판단되었다.

Table.5 오이에 대한 병원균 접종에 따른 토양 및 수액의 병원성 미생물의 밀도 분석

	접종 병원성 미생물	처리후 일수에 따른 밀도(log cfu/g 또는 ml )			
		5일	10일	15일	20일
토양	<i>Ralstonia solanacearum</i>	5.1	6.8	7.2	7.3
	<i>Fusarium oxysporum</i>	4.4	5.6	6.1	6.2
도관수액	<i>Ralstonia solanacearum</i>	0	5.1	6.6	6.8
	<i>Fusarium oxysporum</i>	4.2	5.1	7.2	7.2

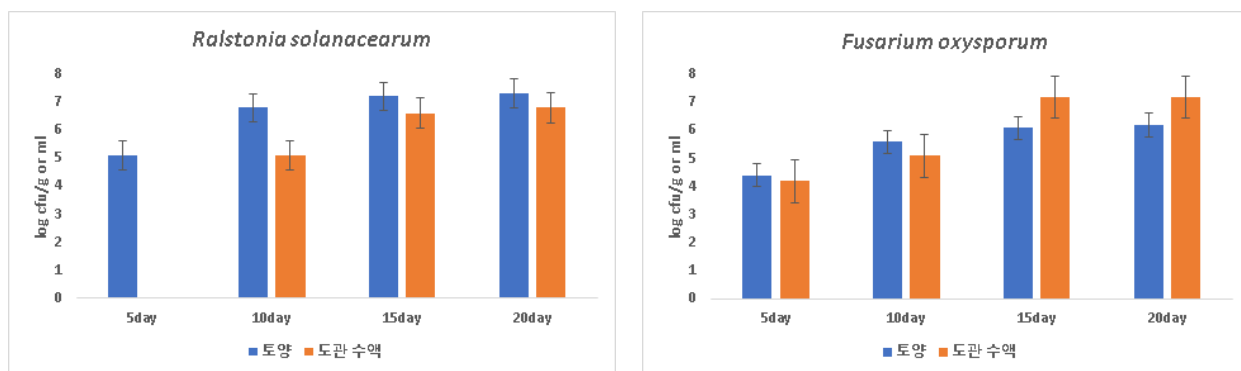


Fig. 10. 오이의 병원균 접종 토양 및 수액의 병원성 미생물의 밀도 분석

### 3. 간접 확인을 위한 토양/기주식물체의 미생물 동정

개발 예정인 (주)베트올의 키트의 항원항체방응에 대해 간접 확인을 위해 토양과 기주 식물체에 대해 다양하게 존재하는 미생물들을 분리하여 항체개발후의 간접확인 시험 시료를 준비하였다.

가. 기주 작물 수액 및 토양내 미생물의 분리 및 밀도 분석

Cut-off 레벨 시험을 수행중인 지역 2개소(경기 화성, 충북 청주)를 대상으로 토양과 병원성 미생물이 발생된 식물체의 수액에 대하여 미생물을 분석하고 분리하였다.

1) 발생지 토양내 미생물의 분리

경기 화성 지역과 충북 청주의 분리 토양의 일반적 토양 분석 결과는 아래와 같다.

Table 6. 시험포의 토양 물성 분석 결과

	유기물 (%)	질소 (%)	유효인산 (mg/kg)	치환성 칼륨 (cmol+/kg)	치환성 칼슘 (cmol+/kg)	치환성 마그네슘 (cmol+/kg)	양이온 치환용량 (cmol+/kg)	pH (1:5)	전기전도도 (dS/m)
경기 화성시	1.21	0.07	35.25	0.26	2.77	0.48	7.8	5.56	0.62
충북 청주시	3.19	0.12	33.87	0.38	4.35	0.5	12.43	6.60	0.93

토양내 미생물 분석은 세균(TSA)과 곰팡이(PDA)를 활용하여 진행하였으며, 토양미생물 분석은 1:20의 비율로 시료를 희석하여 세균의 분리를 위해 TSA배지에 sodium propionate를 0.2%와 nystatin을 1-2ug/ml를 넣은 첨가배지를 활용하 곰팡이 분리배지는 PDA배지에 streptomycin과 penicillin을 25ug/ml를 첨가하여 곰팡이 선택배지를 조제한 후  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ 으로 분주하여 25~30℃에서 2~4일간 배양하여 미생물의 밀도 및 종류를 분석하였다. 분석된 배지는 다시 단일 Clony로 분리하였고 동정과 (주)베트올의 간섭 시험을 위한 시료로 준비하였다.

시험 결과 두 포장 모두  $2 \times 10^7$ cfu/g 이상의 밀도의 세균상을 보였으며, 곰팡이는  $1 \times 10^5$ cfu/g 이상의 밀도를 유지하였으며, 세균은 8~9종, 곰팡이는 4~5종이 각각 분리되었다.

Table 7. 분리 토양내 미생물의 밀도 및 종류 분석

구분	세균(토양 20g)		곰팡이(토양 20g)	
	개체수 (c.f.u./g)	종수	개체수 (c.f.u./g)	종수
경기 화성	20,000,000	8종	100,000	4종
충북 청주	22,000,000	9종	190,000	5종



토양 곰팡이(경기확성)



토양 세균(경기확성)



토양 곰팡이(충북 청주)



토양 세균(충북 청주시)

Fig. 11. 간접 확인을 위한 토양내 존재하는 세균 및 곰팡이의 분석

또한, 확인되어진 토양 미생물은 1차로 각각 순수 분리하여 동정 및 (주)베트올 항체의 간접 확인 원료로 확보하였다.



*Un-known*



*Pseudomonas sp.*



*Bacillus sp.*



*Pseudomonas sp.*



*Un-known*



*Microbacterium sp*



*Flavobacteria sp.*

Fig. 12. *R. solanacearum*의 간접확인을 위해 순수 분리된 세균들



Fig. 13. *Fusarium oxysporum*의 간접확인을 위해 순수분리된 곰팡이의 종류

## 2) 수액내 미생물의 분리

병발생 시료의 수액내 미생물을 분리하여 간접 시험시료로 확보하였다. 시험 방법은 토양 미생물 분석 방법과 동일하게 진행하였다.

미생물 확인 결과 발병주의 수액내에는 *R. solanacearum* 이외에는 일부 바실러스 계열의 확인되었으나 *R. solanacearum*의 우점으로 간접이 우려가 적어 간접 시험은 오히려 유사한 특징을 갖고 농가 사용이 많은 pseudomona속, Flavobacteria속 등을 간접시험 시료로 사용할 예정이다. 또한, 곰팡이 분석도 마찬가지로 수액내 발생이 적어 간접에 큰 영향은 없으리라 판단되었다.



수액(세균)

수액(곰팡이)

Fig. 14. 발병주 수액내 미생물상 확인

## 4. 토양 시들음병 세균/곰팡이 감별을 위한 항체 원료 개발

### 가. 곰팡이 (*Fusarium oxysporum*) 및 세균 (*Ralstonia solanacearum*) 항원 확보

#### 1) 곰팡이 및 세균 균주 도입 및 배양

가) 시들음병을 일으키는 병원성 곰팡이인 *Fusarium oxysporum*과 병원성 세균인

*Ralstonia solanacearum*를 주관기관인 (주)에이비씨씨클을 통해 국립유전자원센터 (KACC)에서 도입 및 배양하였다. *Fusarium oxysporum*은  $1 \times 10^8$  cfu/ml,

*Ralstonia Solanacearum*은  $1 \times 10^{10}$  cfu/ml로 각각 2L를 대량 배양하여 제공 받았다.

나) 제공 받은 곰팡이와 세균을 SDS-PAGE를 통해 성상을 확인 하였으며, PCR을 통해 균주 확인 및 교차 감염 여부를 확인 하였다. PCR 은 아래의 reference 논문을 참고하여 진행 하였다.

① *Fusarium oxysporum* : Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic Fusaria P.K. Mishra et al. / FEMS Microbiology Letters 218 (2003) 329-332

② *Ralstonia solanacearum* : Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control K.H. Pastrok et al. / European Journal of Plant Pathology 108 (2002) 831-842, 2002

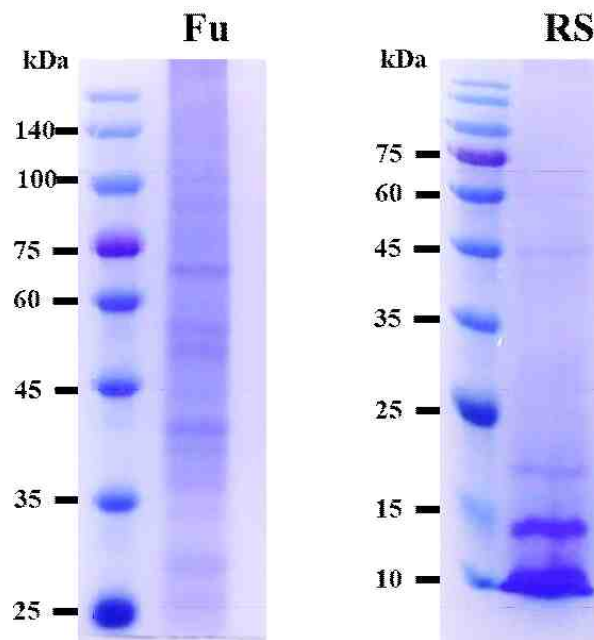
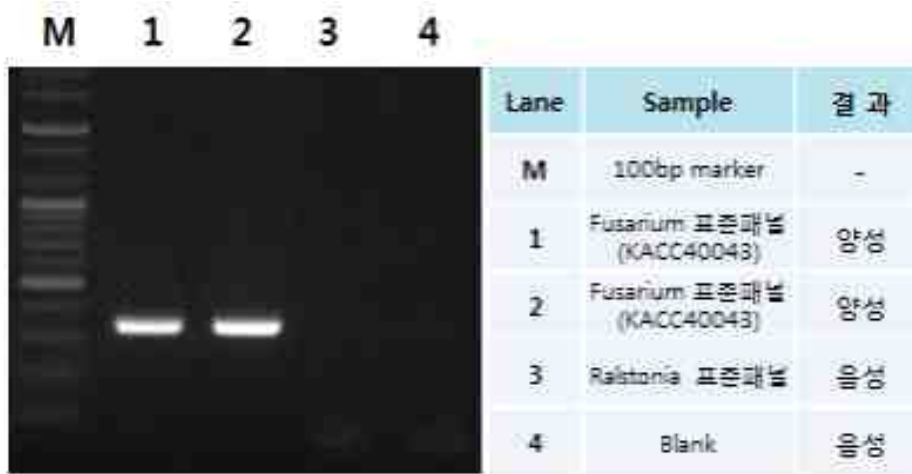


Fig. 15. *Fusarium oxysporum* 과 *Ralstonia solanacearum* 항원 SDS-PAGE 결과



Target Size	Primer 서열	
340bp	Forward	5'- ACA TAC CAC TTG TTG CCT CG -3'
	Reverse	5'- CGC CAA TCA ATT TGA GGA ACG -3'

Fig. 16. *Fusarium oxysporum* PCR 결과와 Primer 서열



Target Size	Primer 서열	
716bp	Forward	5'- ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA -3'
	Reverse	5'- TTC ACG GCA AGA TCG CTC-3'

Fig. 17. *Ralstonia solanacearum* PCR 결과와 Primer 서열

## 2) 곰팡이 및 세균 균주 불활화 항원 준비

가) 배양 및 대량 증식이 완료된 곰팡이와 세균을 불활성화를 실시하여 항원을 준비하였다. 곰팡이와 세균 각각을 원심분리 (8000g, 10분) 실시하고 PBS에 희석을 3회 반복함으로써 Washing을 실시하였다. Heat kill inactivation 방법으로써 곰팡이를 70℃, 3시간 가열하여 불활성화를 실시하였다. 세균은 100℃, 30분간 가열하였다. 불활성화 여부 및 독성 여부를 확인하기 위하여 각각 세포수  $1 \times 10^8$  cfu/ml 개 PBS 100ul에 희석하여 마우스 복강에 주사하고 이상 유무를 관찰하였다. 3일간 관찰 결과 마우스에 이상이 없는 것을 확인 하였으며, 확보된 항원을 면역 스케줄에 따라 토끼와 마우스에 각각 면역을 실시하였다.

## 나. 토양 시들음병 곰팡이/세균 감별 진단을 위한 항체 제작

### 1) 토양 시들음병 곰팡이/세균 감별 진단용 단클론 항체 제작

#### 가) 곰팡이/세균 항원의 마우스 면역

- *Ralstonia solanacearum*과 *Fusarium oxysporum* 각각에 특이적으로 반응하는 항체를 생성해 낼 수 있는 하이브리도마(Hybridoma)를 제작하기 위하여 불활성화된 항원을 면역원으로 하여 Asai 등(1985년)의 따라 면역하였다. 확보된 세균과 곰팡이 항원을 가지고 마우스 면역을 통한 단클론 항체개발을 진행하였다. 불활성화된 세균과 곰팡이 항원을 각각 준비하여 마우스(Balb/c mouse, Female, 8주령) 면역을 실시하였다. 면역방식은 항원을 마우스 복강에 주사하여 비장(Spleen)의 림프구를 확보하는 Spleen method와 항원을 마우스 뒷발바닥에 주사하여 림프절(Lymph node)의 림프구를 확보하는 Footpad method 두가지 방법으로 실시하였다. 1차, 2차 면역은 2주 간격으로 이루어지며, 세포수  $1 \times 10^8$  cfu을 Freund's Complete Adjuvant에 1:1 비율로 섞은 에멀전을 주사하였다. 3차, 4차 면역은 1주 간격으로 이루어지며, 항원을 Freund's Incomplete Adjuvant에 1:1 비율로 섞은 에멀전을 주사한다. 4차 면역 실시 후, 안와채혈을 통해 혈액을 소량 확보하고 항체 역가 테스트를 실시하였다.

- 항체 생성여부 판별은 Indirect ELISA 방법을 사용하였으며 채혈을 통해 확보한 마우스 혈청을 농도별로 희석하여 반응성을 확인하였다. 세균을 세포수  $1 \times 10^5$  cfu/ml 농도로 Carbonate-Bicarbonate buffer에 희석하여 96well ELISA Plate에 100ul 씩 분주하였으며, 4℃, Overnight 하여 Coating을 실시하였다. PBST (0.1% Tween20 with PBS)로 3회 Washing을 실시하고, 3% Skim milk in PBST에 상온에서 1시간 동안 Blocking을 실시하였다. PBST로 3회 Washing을 실시 후, 혈청을 PBST에 희석배수 1:100 부터 1:102400 까지 희석하여 100ul 씩 분주하고 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응 종료 후, PBST로 3회 Washing을 실시하고 Goat anti-mouse IgG HRP를 1:3000 비율로 PBST에 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. PBST로 4회 Washing을 실시하고, TMB substrate reagent를 100ul 씩 반응시켰다. 10분 후, 2N H2SO4 buffer로 반응을 정지시켰다. ELISA Reader 450nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

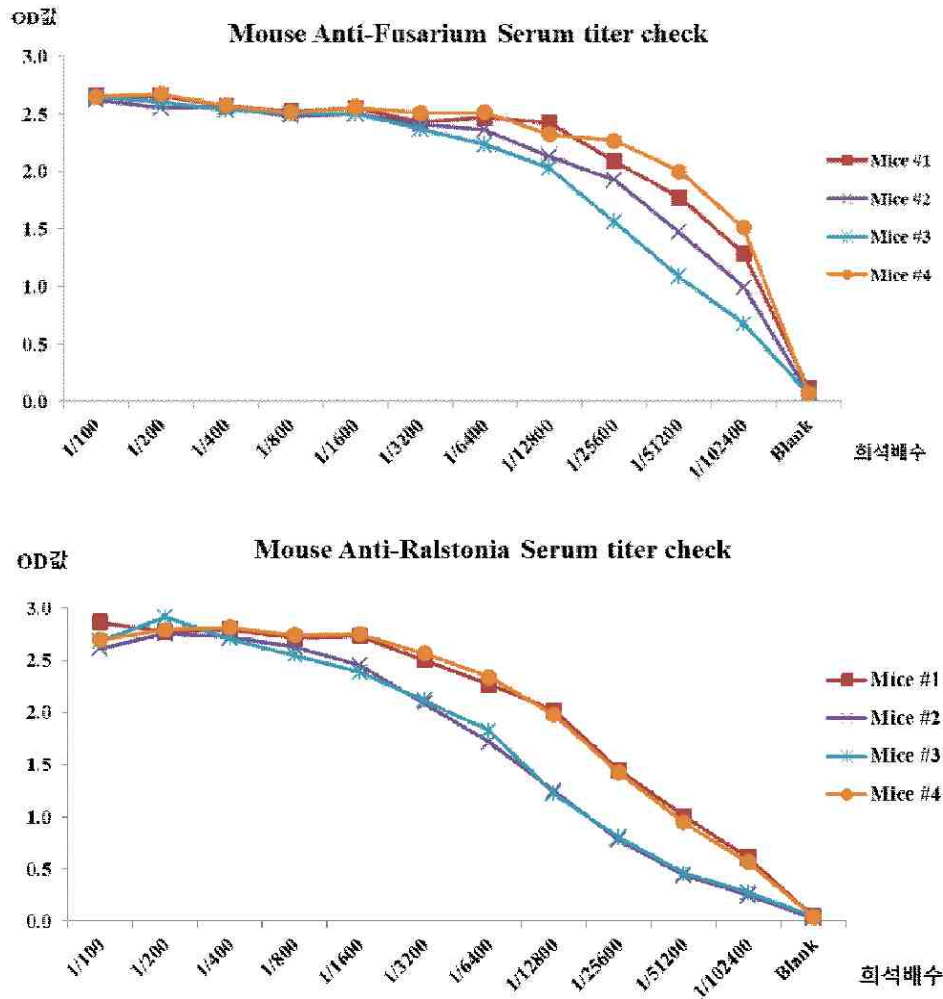


Fig. 18. ELISA를 통한 Fusarium/Ralstonia 마우스 면역 확인

나) 하이브리도마 제작을 위한 세포 융합

- 상기에서 ELISA를 통해 마우스 면역여부 확인 후 세포 융합을 하기 위해서 면역 시킨 마우스의 비장 (spleen)을 무균적으로 적출하여 얻어진 비장세포와 형질종세포 (myeloma cell)인 SP2/0-Ag14 세포의 세포 융합(cell fusion)은 polyehylen glycol 1500 (PEG 1500, Boehringer Mannheim)을 이용하여 Kohler and Milstein(1975)의 방법에 따라 실시하였다. 최종 면역 3-4일 후 마우스의 비장을 무균적으로 적출하고 26-gauge 주사바늘로 적출한 비장을 세절한 후 혈청이 첨가되지 않은 ice-cold DMEM에 부유시켰다. 부유액은 50ml cornical tube에 Spreader를 통해 filtration 하였다. 이를 3000rpm에서 5분씩 원심분리를 수행하여 비장세포를 얻었다. Red blood cell lysis (RBC) buffer를 이용하여 비장 세포내 섞여 있는 적혈구를 파괴하였다. 이를 위해 침전된 비장세포를 RBC buffer로 suspension 하여 4°C에서 10분간 보관하였다. 이를 재 원심 분리를 반복하면서 적혈구가 모두 파괴될 때까지 수행하였다. 이 후, 이를 Serum free DMEM 배지로 suspension하여 원심 분리를 수행하였고, 배양 중인 Sp2/0-Ag 14 세포를 suspension하여 침전된 비장 세포와 섞어 주어 원심 분리 수행하였다. 침전된 비장세포와 myeloma 세포를 37°C에서



PEG 1500을 1ml 투여하여 fusion을 수행하였다. 이후 serum free DMEM을 투여하여 원심분리 하였다. 침전된 hybridoma를 10% Complete DMEM 배지에 1일간 배양하였고, 이후 1X HAT(0.1mM hypoxanthine, 0.4uM aminopteri, 16uM thymidine, SIGMA)가 첨가된 15% complete DMEM 배지로 치환하여 2주에 걸쳐 screening을 수행하였다.

#### 다) 단클론항체 선별을 위한 hybridoma screening 테스트

##### ① ELISA method

- 2주 후, 96 well plate에 자라고 있는 hybridoma의 상층액을 이용하여 1차 screening 을 수행하였다. Screening 방법은 ELISA 방식을 이용하였으며 목적에 맞는 clone을 확보 하고자 하였다. 이를 위해 indirect binding assay 방법을 이용하였으며, Fusarium과 Ralstonia 항원을 ELISA plate에 coating 한 후 hybridoma 세포 배양액과 mouse fusion 당시에 확보하였던 혈청을 양성으로 이용하여 반응성을 확인하였다. 항원을 96 well plate에 well당  $1 \times 10^6$  cfu/ml 로 희석하여 4°C 에서 overnight 반응하였다. 다음날, 0.1% PBST로 상온에서 30초당 3번씩 washing하였고, 5% milk in 0.1% PBST 시약을 이용하여 상온에서 30분 동안 blocking하였다. Blocking 종료 후 0.1% PBST로 상온에서 30초당 3번씩 washing 하였고, 락틴 항원 3종의 hybridoma 세포 배양액을 이용하였으며, 음성 시료로는 myeloma 세포 배양액을 사용하였다. 양성 대조군 시료로는 mouse fusion 당시에 확보하였던 혈청을 1:1000 으로 0.1% PBST에 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응 하였다. 반응 종료 후, 0.1% PBST로 상온에서 30초당 5번씩 washing하였고, secondary antibody (anti mouse-HRP)를 1:10000으로 0.1% PBST에 희석하여 상온에서 1시간동안 반응하였다. 반응 종료 후, 0.1% PBST로 상온에서 30초당 3번씩 washing 하였고, TMB substrate reagent (surmodics, USA)를 첨가 하여 상온에서 5~10분간 암전상태에서 반응하였다. 반응 종료 후, 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> buffer로 반응을 정지 시킨 후, 정지된 well을 ELISA 기계로 흡광도(450nm)를 측정하였다.

##### ② Isotyping method

- Isotyping 항체 (Anti-IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM Antibody, Sigma) 6종을 각각 희석배수 1:1000으로 Carbonate-Bicarbonate buffer에 희석하여 96well ELISA Plate에 순서대로 각 well에 100ul 씩 분주하였으며, 4°C, Overnight 하여 Coating을 실시하였다. PBST (0.1% Tween20 with PBS)로 3회 Washing을 실시하고, 3% Skim milk in PBST에 상온에서 1시간 동안 Blocking을 실시하였다. PBST로 3회 Washing을 실시 후, 각 세포배양액을 6개의 well에 100ul 씩 분주하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응 종료 후, PBST로 3회 Washing을 실시하고 Goat anti-mouse IgG HRP를 1:3000 비율로 PBST에 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. PBST로 4회 Washing을 실시하고, TMB substrate reagent를 100ul 씩 반응시켰다. 10분 후, 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> buffer로 반응을 정지시켰다. ELISA Reader 450nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

③ Western blot method

- 선별 항체의 Ralstonia와 Fusarium 각각에 대한 반응성을 확인하기 위하여 Western blot을 수행하였다. Ralstonia와 Fusarium 각각을 SDS-PAGE 실시 후, Nitrocellulose membrane (Invitrogen)에 트랜스퍼하여 Blotting을 실시하였다. 선별된 항체를 1ug/ml 농도로 희석하여 반응시켰다. Anti-mouse IgG HRP (1:5000)을 반응시켜 각각의 항체 친화성을 분석하였다. 모든 항체는 Ralstonia와 Fusarium 대한 반응성을 나타내었다.

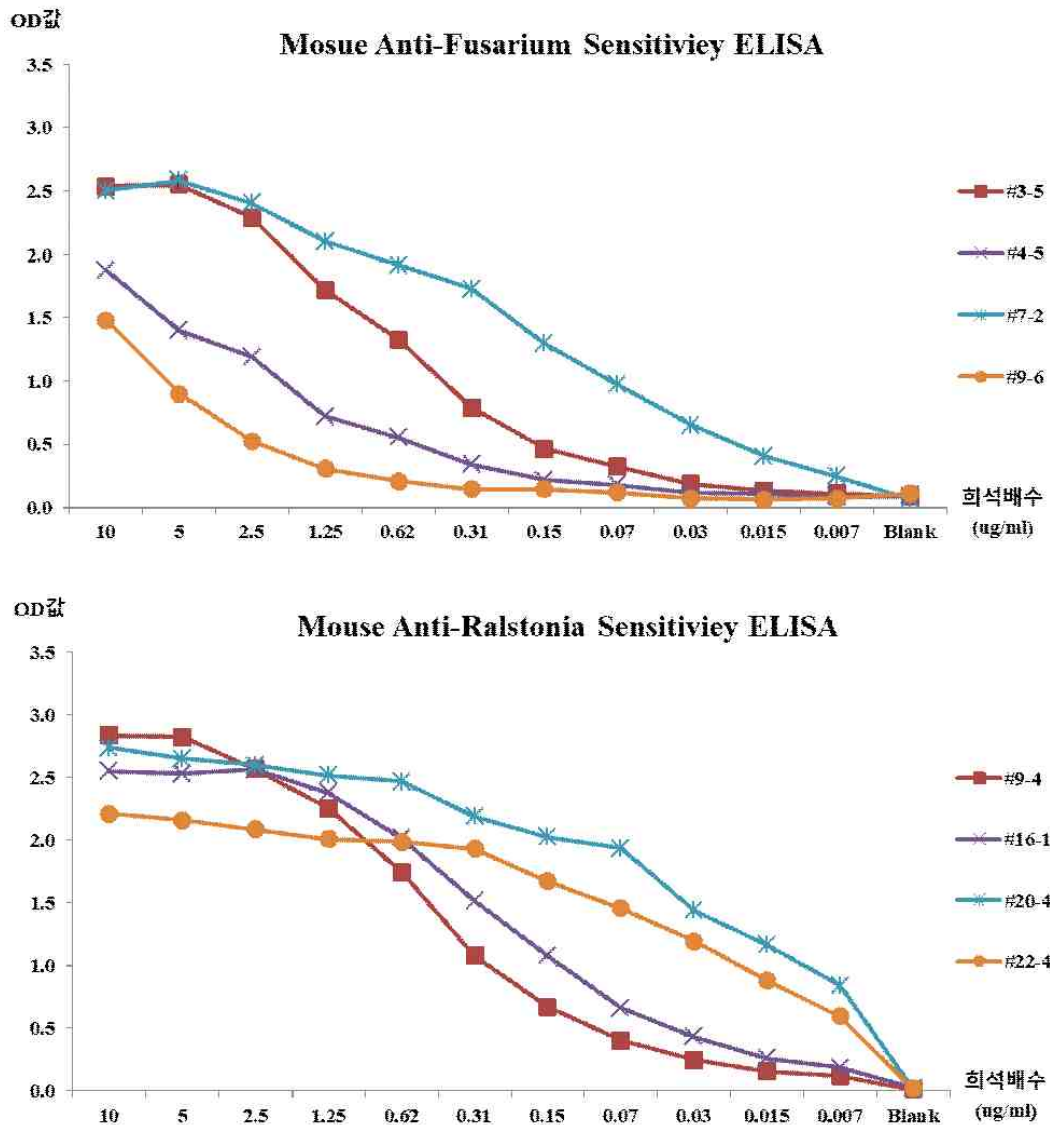


Fig. 19. ELISA를 통한 Fusarium/Ralstonia 항원 8종 단클론 항체 선정

- Fusarium과 Ralstonia 각각의 4개의 clone 대한 isotyping 테스트 결과 모두 IgG clone 으로 확인 되었다.

	항-Fusarium 항체				항-Ralstonia 항체			
	#3-5	#4-5	#7-2	#9-6	#9-4	#16-1	#20-4	#22-4
IgG1	<b>2.202</b>	<b>1.304</b>	0.208	0.043	<b>1.212</b>	0.083	<b>2.105</b>	<b>2.178</b>
IgG2a	0.093	0.060	<b>2.041</b>	0.039	0.049	<b>2.153</b>	0.051	0.050
IgG2b	0.089	0.084	0.057	<b>1.762</b>	0.050	0.059	0.115	0.056
IgG3	0.057	0.074	0.056	0.049	0.048	0.055	0.053	0.045
IgA	0.056	0.070	0.056	0.045	0.046	0.065	0.046	0.054
IgM	0.063	0.085	0.074	0.062	0.048	0.056	0.061	0.046
Isotype	IgG1	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG1	IgG2a	IgG1	IgG1

Fig. 20. Mouse 항-Fusarium, 항-Ralstonia 항체 Isotype 분석

## 2) 토양 시들음병 곰팡이/세균 감별 진단용 다클론 항체 제작

### 가) 곰팡이/세균 항원의 토끼 면역

- *Ralstonia solanacearum*과 *Fusarium oxysporum* 각각에 특이적으로 반응하는 항체 제작을 위하여 토끼 면역을 통한 다클론 항체 개발을 진행 하였다. 불활성화된 항원을 준비하여 토끼(New Zealand White SPF Rabbit, Female, 2kg)에 2마리 씩 면역을 실시하였다. 토끼 등의 털을 깎고 70% Alcohol로 소독 후, 준비한 항원을 피하 부위에 주사하였다. 1차 면역은 4주간 이루어졌으며, Freund's Complete Adjuvant에 1:1 비율로 섞은 유화액을 주사하였다. 2차 면역은 4주간 이루어지며, 항원을 Freund's Incomplete Adjuvant에 1:1 비율로 섞은 유화액을 주사하였다. 3차 면역은 1주간 이루어지며, 동일한 방식으로 실시하였으며, Boosting을 1주 간격으로 2회 실시하며 항원을 PBS에 희석하여 주사하였다. 3차 면역 및 Boosting 실시 후, 토끼 귀정맥에서 혈액을 소량 확보하여 혈중 항체 역가 테스트를 실시하였으며 충분한 항체 역가가 확인된 토끼에서 전체혈을 실시하였다. 확보된 혈액은 Protein G Resin을 사용하여 정제하여 토끼 항-Ralstonia와 항-Fusarium 다클론항체를 확보하였다.

- *Ralstonia solanacearum*과 *Fusarium oxysporum* 항원을 토끼에 면역시킨 뒤 얻은 혈청으로 부터 다클론 항체를 제조 하는 방법을 시도하였다. 3회에 걸쳐 2마리 토끼에 면역을 실시하였으며, 매회 혈청을 분리하여 ELISA를 통해 Fusarium와 Ralstonia 항원에 항체가 만들어진 것을 확인 하였다

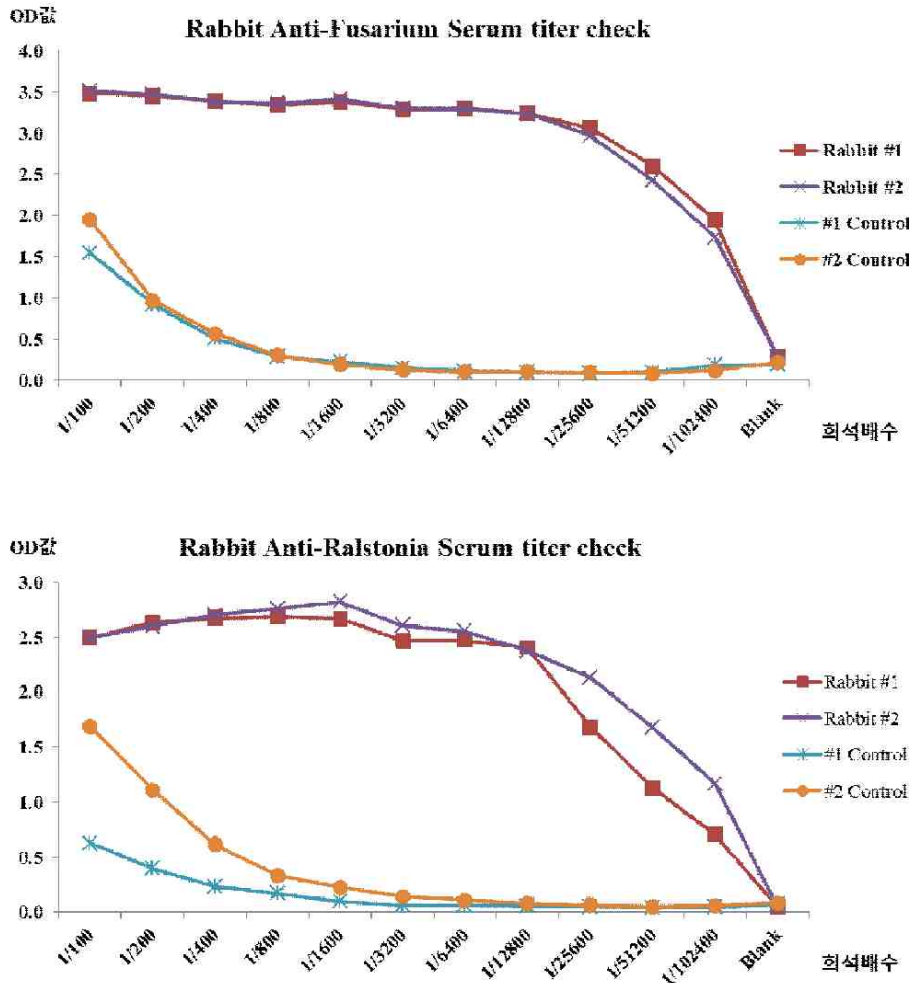


Fig. 21. ELISA를 통한 Fusarium/Ralstonia 토끼 면역 확인

나) 다클론항체 선별을 위한 screening 테스트

- 3차 면역후 얻은 항혈청에 대해 ELISA 수행 하였다. ELISA에 사용된 Fusarium와 Ralstonia 항원을  $1 \times 10^5$  cfu/ml 농도로 플레이트에 coating 하였다. 면역된 토끼로부터 얻은 혈청을 PBS로 1/100 부터 1/102,400으로 희석하여 100ul/well 농도로 상온에서 2시간 반응하였고, PBST (PBS + 0.1% Tween-20)로 5회 세척 후, 1/5000 희석한 Rabbit-IgG HRP를 2차 항체로 사용하여 1시간 반응 시켰다. PBST 3회 세척후 플레이트상에서 항원과 결합한 항체를 검출하기 위해, TMB substrate (SurModics, USA) 로 10분간 상온에서 반응 시킨 후, 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> buffer로 반응을 정지시킨 후, 정지된 well 을 ELISA 기계로 흡광도(450nm)를 측정하였다.
- 테스트 결과, Fusarium와 Ralstonia항원 유래로부터 각각 2개의 다클론 양성 혈청을 확보 하였다.

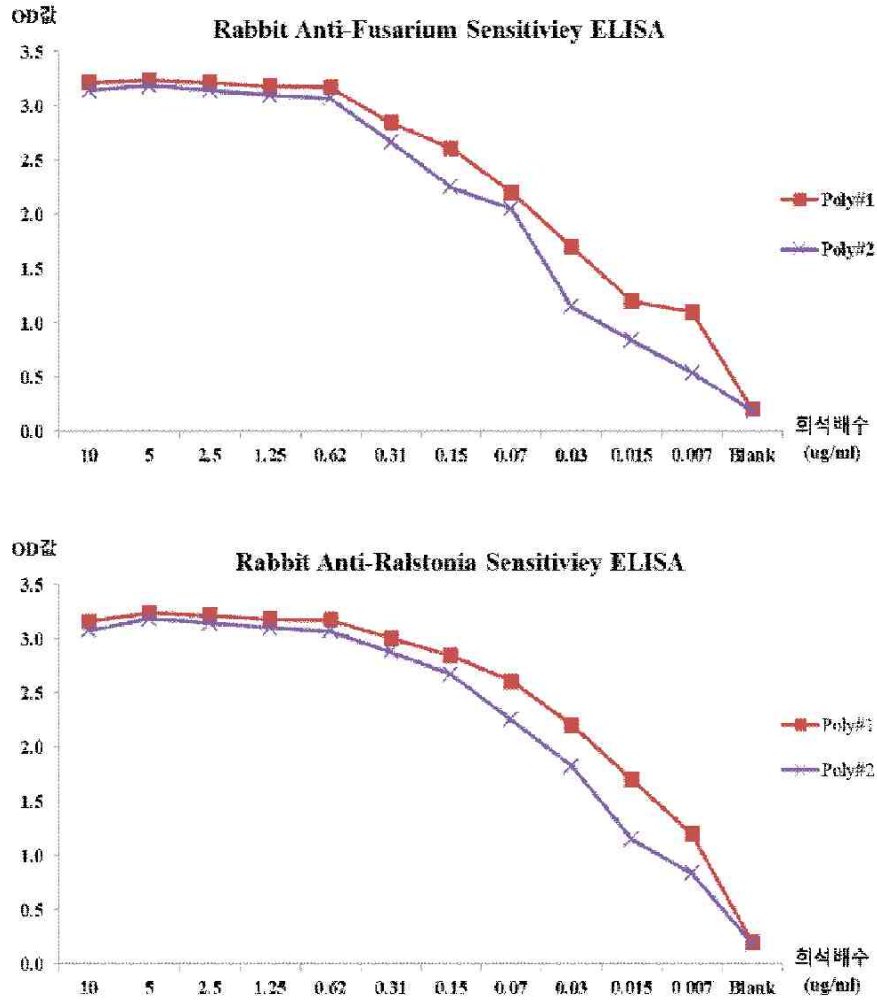


Fig. 22. ELISA를 통한 Fusarium/Ralstonia 항원 4종 다클론 항체 선정

나. 최종 유효 항체 생산 및 정제

1) 최종 유효 항체 생산 및 정제

- ELISA 및 western blot 결과를 분석하여 Fusarium과 Ralstonia 항원에 높은 민감도와 특이도를 보이는 최종 유효 항체 12종을 선정 하였다.

Table 8. 토양 시들음병 곰팡이/세균 감별 진단을 위한 유효 항체 및 최종 선정 항체

구분	유효 항체 선정			
	단클론 항체 (Monoclonal)		다클론 항체 (Polyclonal)	
면역원	후보 항체	유효 항체	후보 항체	유효 항체
Fusarium	23	4	2	2
Ralstonia	22	4	2	2
계	45	8	4	4

구분	항원	최종 제작 항체	비고
단클론 항체 (Monoclonal)	<i>Fusarium oxysporum</i>	#9-4, #16-1, #20-4, #22-4	4
	<i>Ralstonia solanacearum</i>	#3-4, #4-5, #7-2, #9-6	4
다클론 항체 (Polyclonal)	<i>Fusarium oxysporum</i>	Poly#1, Poly#2	2
	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Poly#1, Poly#2	2

구분	항원	구분	항원	구분	항원
마우스 단클론 항체 (Mouse Monoclonal)	Fusarium	#3-5	IgG1	++	4
		#4-5	IgG1	+	
		#7-2	IgG2a	++	
		#9-6	IgG2b	+	
	Ralstonia	#9-4	IgG1	++	4
		#16-1	IgG2a	++	
		#20-4	IgG1	++	
		#22-4	IgG1	++	
토끼 다클론 항체 (Rabbit Polyclonal)	Fusarium	Poly#1	-	+++	2
		Poly#2	-	+++	
	Ralstonia	Poly#1	-	+++	2
		Poly#2	-	+++	

## 2) 단클론 항체의 정제

### 가) 단클론 항체의 복수 생산

- 단클론 항체를 생산하는 것으로 확인된, *Fusarium* 항원 유래 단클론 양성 hybridoma (3-5, 4-5, 7-2, 9-6), *Ralstonia* 항원 유래 1개의 단클론 양성 hybridoma (9-4, 16-1, 20-4, 22-4)를 혈청이 함유되어 있지 않은 DMEM 배지로 1회 세척한 후,  $1 \times 10^6$ 개의 세포를 pristane으로 미리 프라이밍한 BALB/C mouse의 복강에 접종하고 10-15일 후 복수를 채취하였다. 수확한 복수를 10,000xg로 30분간 원심분리하고 상층액을 수확하여 이를 검출용 단클론 항체로 사용하였다.

### 나) 단클론 항체의 정제

- 단일클론항체는 면역친화성 크로마토그래피법을 사용하여 정제하였다. Protein G가 콘쥬게이션 되어있는 아가로스 비드를 컬럼에 충전 한 다음 단클론 항체를 포함하고 있는 마우스 복수를 10,000 rpm으로 4°C, 30분간 원심 분리 후 상층액을 첨가하였다. Protein G 아가로스 비드에 부착된 단클론항체를 용출 완충액 (200mM glycine pH2.5)을 사용하여 1M, pH8.0, Tris buffer가 1/10 볼륨으로 첨가된 1.5 ml 튜브에 연속적으로 용출시킴으로써 순수한 단일클론항체를 분리한 다음 PBS 에 투석하였다. 정제된 단클론항체는 4°C 에 보관하였다.

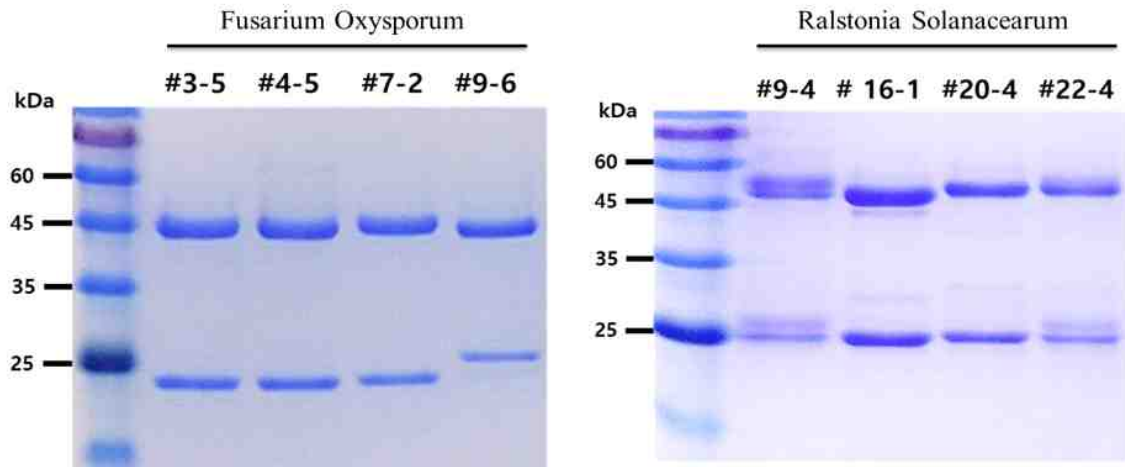


Fig 23. 8종의 정제된 단클론항체 SDS-PAGE

### 3) 다클론 항체의 정제

#### 가) 다클론 항체 생산

- 토끼의 항혈청에 포함 되어 있는 다클론 항체의 경우 단클론 항체의 정제방법과 유사하게 면역친화성 크로마토그래피법을 사용하여 정제 하였다. Protein G가 콘쥬게이션 되어있는 아가로스 비드를 컬럼에 충전한 다음 다클론 항체를 포함하고 있는 항혈청을 10,000 rpm으로 4℃, 30분간 원심 분리 후 상층액을 첨가 하였다. Protein G 아가로스 비드에 부착된 다클론항체를 용출 완충액 (200 mM glycine pH2.5)을 사용하여 1M, pH8.0, Tris buffer가 1/10 볼륨으로 첨가된 1.5 ml 튜브에 연속적으로 용출시킴으로써 순수한 다클론항체를 분리한 다음 PBS에 투석하였다. 정제된 다클론항체는 4℃에 보관하였다.

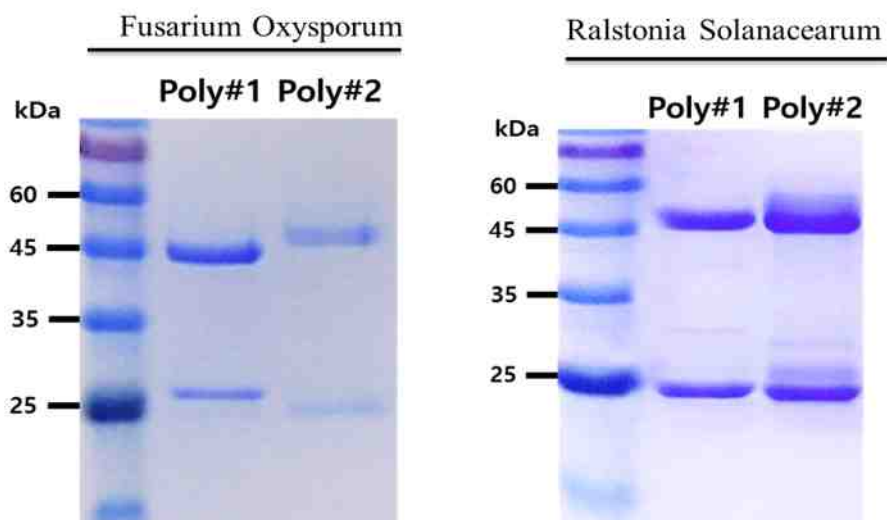


Fig. 24. 4종의 정제된 다클론항체 SDS-PAGE

## 다. 토양 시들음병 곰팡이/세균 감별 진단용 진단 키트 개발

### 1) 토양 시들음병 곰팡이/세균 감별 진단용 진단 키트의 설계

#### 가) 검사 단계의 구성

- ① 검체를 분석 스트립의 샘플패드 영역에 일정량 투입하는 단계
- ② 항체-금 접합체가 상기 검체 중의 시들음병 유발 항원과 결합하여 복합체를 형성하는 단계
- ③ 상기 복합체가 멤브레인에 전개되는 단계
- ④ 멤브레인 상의 검사선 영역에서 항-Fusarium 또는 항-Ralstonia 항체와 시들음병 유발 항원 그리고 항체-골드 접합체가 항체-항원-항체의 반응을 통해 Sandwich를 이루며, 이를 검사선 상의 색 변화를 일으키는 단계
- ⑤ 대조선 색 대비 검사선 색 변화 정도를 비교하여, 검체내에 Fusarium 또는 Ralstonia 항원의 존재 여부 및 미생물 밀도 정도를 반정량 적으로 판단하는 단계

#### 나) 검사 단계의 구성

- ① 검사 스트립의 니트로 셀룰로오즈 멤브레인에서 검사선(Test line) 위치에 항-Fusarium 또는 항-Ralstonia 항체가 흡착되어 있고 대조선(Control line) 위치에는 토끼 항-닭 IgY 항체가 분주되어 흡착되어 있다.
- ② 콘쥬게이트 패드에는 항-Fusarium 항체 또는 항-Ralstonia 항체-금 접합체와 토끼 항-닭 IgY-금 접합체가 처리되어 있다.
- ③ 검사 스트립의 좌측에는 검체패드(Sample pad)와 콘쥬게이트 패드가 부착되어 있고, 중앙 부위에는 검사선과 대조선이 분주된 니트로 셀룰로오즈 멤브레인, 우측에는 흡수패드가 부착되어 스트립을 구성한다.
- ④ 세균성 시들음병을 유발하는 *Ralstonia solanacearum* 또는 곰팡이성 시들음병을 유발하는 *Fusarium oxysporum* 항원에 특이적으로 반응하는 항체와 항체-금 접합체를 이용하여 수평류(Lateral-flow) 원리에 기반으로 한 면역크로마토 그래피법(Immuno-chromatography)과 항체-항원-항체 Sandwich 원리를 이용하여 검사할 수 있게 고안되었다.

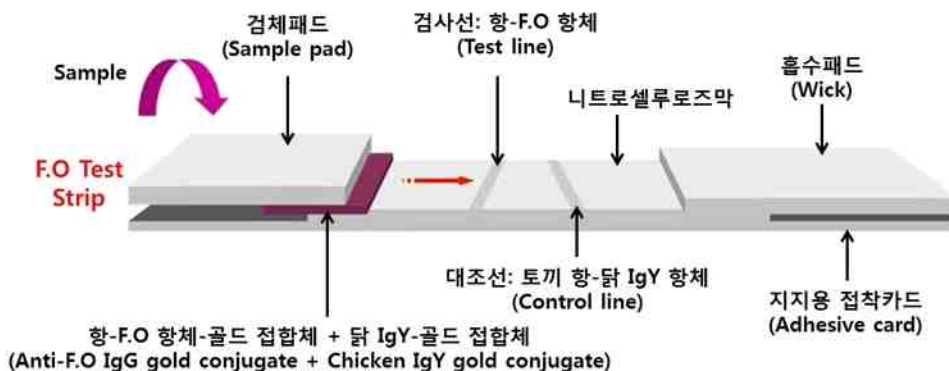


Fig. 25. Fusarium 신속진단키트 스트립 모식도



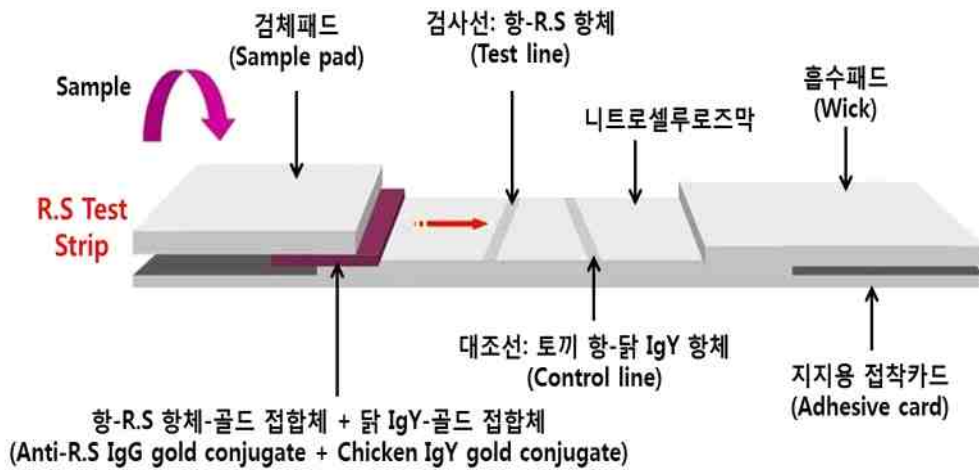


Fig. 26. Ralstonia 신속진단키트 스트립 모식도

다) 항체-금 콘쥬게이션 (Gold conjugate) 조건의 확립

- 확보된 모든 항체에 대하여 항체-금 콘쥬게이션 조건 선정을 진행하였다. 콜로이달 골드(Colloidal gold)의 수소이온 농도별 pH6.0~9.0와 항체 농도별 6ug/ml~20ug/ml 까지 연속 희석하여 10분간 콜로이달골드를 결합하고, 10% NaCl을 추가하여 산화여부를 Spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. 이중 가장 높은 수치의 흡광도를 나타내는 조건의 수소 이온농도 및 항체 농도를 결정하고 이를 콘쥬게이션 조건으로 사용하였다. 추가적으로 제조된 콘쥬게이트의 특이성 및 안정성을 위해 소알부민 또는 카제인 등의 블로킹 단백질을 추가하여 최적화 조건을 조정하였다.

Table 9. 항체-금 콘쥬게이션 조건

면역원	Clone	항체-금 콘쥬게이션 제작 조건
Fusarium Oxysporum	#3-5	40nm Gold / pH6.0 / Ab. 20ug/ml
	#4-5	40nm Gold / pH7.0 / Ab. 14ug/ml
	#7-2	40nm Gold / pH6.0 / Ab. 16ug/ml
	#9-6	40nm Gold / pH7.0 / Ab. 16ug/ml
	Poly#1	40nm Gold / pH7.0 / Ab. 14ug/ml
	Poly#2	40nm Gold / pH7.0 / Ab. 16ug/ml
Ralstonia Solanacearum	#9-4	40nm Gold / pH7.0 / Ab. 16ug/ml
	#16-1	40nm Gold / pH6.0 / Ab. 14ug/ml
	#20-4	40nm Gold / pH6.0 / Ab. 20ug/ml
	#22-4	40nm Gold / pH7.0 / Ab. 16ug/ml
	Poly#1	40nm Gold / pH6.0 / Ab. 14ug/ml
	Poly#2	40nm Gold / pH6.0 / Ab. 12ug/ml



Fig. 27. *Fusarium oxysporum* 40nm Gold conjugation test



Fig. 28. *Ralstonia solanacearum* 40nm Gold conjugation test

2) 토양 시들음병 곰팡이/세균 감별 진단용 진단을 위한 pair 선정

가) 1<sup>st</sup> screen을 위한 항체 코팅 및 gold conjugation

- ① 준비된 곰팡이/세균 각각 6종의 항체를 1.5ug/strip 양이 되도록 정석분석 멤브레인의 검사선 위치에 흡착 하였다.
- ② 준비된 곰팡이/세균 각각 6종의 항체를 사용하여 골드 콘주게이션을 진행 하였다. 각각의 항체-골드 콘주게이션 접합체체의 항체 양이 2.0ug/strip이 되도록 conjugate pad 에 분주 하였다.
- ③ 양성 검체는 면역원으로 사용한 Fusarium과 Ralstonia항원을 사용하였으며, 음성 검체는 buffer 를 사용하여 1<sup>st</sup> screen을 진행 하였다.
- ④ 테스트 방법은 균주를 검체 희석 버퍼에 희석한 후 검액 100ul를 디바이스 하단에 있는 검액 점적부위(S)에 분주 10분 경과 후에 판정을 진행 하였다.
- ⑤ Fusarium의 경우 총 36 antibody-pair 테스트 결과 Fusarium 항원과 반응하고 Ralstonia와 반응하지 않으며 낮은 위양성을 나타내는 #20-4/#20-4 항체 pair를 최종 선정하였다.
- ⑥ Ralstonia의 경우 총 36 antibody-pair 테스트 결과 Ralstonia 항원과 반응하고 Fusarium와 반응하지 않으며 낮은 위양성을 나타내는 #7-2/#7-2 항체 pair를 최종 선정하였다.

Table 10. *Fusarium oxysporum* 항체 pair 테스트 결과

Conjugate	Sample (cfu/ml)	Capture					
		#3-5	#4-5	#7-2	#9-6	Poly#1	Poly#2
#3-5	R.S 10 <sup>7</sup>	-	-	-	-	+	+
	F.O 10 <sup>7</sup>	+	+	-	+	+	+
	Buffer	+	+	-	-	+	+
#4-5	R.S 10 <sup>7</sup>	+	+	+	+	+	+
	F.O 10 <sup>7</sup>	+	+	-	+	+	+
	Buffer	+	+	+	+	+	+
#7-2	R.S 10 <sup>7</sup>	-	-	++	+	+	+
	F.O 10 <sup>7</sup>	-	-	+	+	+	+
	Buffer	-	+	+	+	+	+
#9-6	R.S 10 <sup>7</sup>	-	-	+	-	+	+
	F.O 10 <sup>7</sup>	-	-	+	+	+	+
	Buffer	-	+	-	+	+	+
Poly#1	R.S 10 <sup>7</sup>	+	+	+	+	++++	++++
	F.O 10 <sup>7</sup>	+	+	+	+	+++	+++
	Buffer	+	+	+	+	++	++++
Poly#2	R.S 10 <sup>7</sup>	+	+	+	+	++++	++++
	F.O 10 <sup>7</sup>	+	+	+	+	++++	++++
	Buffer	+	+	+	+	++++	++++

Capture/CGC	#7-2 / #7-2 CGC		Poly#1 / Poly#1 CGC	
Positive sample (10 <sup>8</sup> cfu/ml)		+++		++++
Positive sample (10 <sup>7</sup> cfu/ml)		++		++++
Positive sample (10 <sup>6</sup> cfu/ml)		+		+++
Negative sample (10 <sup>8</sup> cfu/ml)		+		+++
Buffer		+		++

Fig. 29. *Fusarium oxysporum* 선정 항체 pair 민감도 비교

Table 11. *Ralstonia solanacearum* 항체 pair 테스트 결과

Conjugate	Sample (cfu/ml)	Capture					
		#9-4	#16-1	#20-4	#22-4	Poly#1	Poly#2
#9-4	R.S 10 <sup>7</sup>	-	-	-	-	+	+
	F.O 10 <sup>7</sup>	+	+	-	+	+	+
	Buffer	+	+	-	-	+	+
#16-1	R.S 10 <sup>7</sup>	+	+	+	+	+	+
	F.O 10 <sup>7</sup>	+	+	-	+	+	+
	Buffer	+	+	+	+	+	+
#20-4	R.S 10 <sup>7</sup>	-	-	++	+	+	+
	F.O 10 <sup>7</sup>	-	-	-	+	+	+
	Buffer	-	+	-	+	+	+
#22-4	R.S 10 <sup>7</sup>	-	-	+	-	+	+
	F.O 10 <sup>7</sup>	-	-	+	+	+	+
	Buffer	-	+	-	+	+	+
Poly#1	R.S 10 <sup>7</sup>	+	+	+	+	++++	++++
	F.O 10 <sup>7</sup>	+	+	+	+	+++	+++
	Buffer	+	+	+	+	++++	+++
Poly#2	R.S 10 <sup>7</sup>	+	+	+	+	++++	++++
	F.O 10 <sup>7</sup>	+	+	+	+	+++	++
	Buffer	+	+	+	+	+++	++











Capture/CGC	#20-4 / #20-4 CGC		Poly#2 / Poly#2 CGC	
Positive sample (10 <sup>8</sup> cfu/ml)		+++		++++
Positive sample (10 <sup>7</sup> cfu/ml)		++		++++
Positive sample (10 <sup>6</sup> cfu/ml)		+		+++
Negative sample (10 <sup>8</sup> cfu/ml)		+		++
Buffer		+		++

Fig. 30. *Ralstonia solanacearum* 선정 항체 pair 민감도 비교

나) 표준시료 및 교차반응 물질 테스트

① Fusarium과 Ralstonia 항원 진단을 위한 양성 표준시료와 교차반응성을 나타낼 가능성이 있는 세균 5종, 곰팡이 5종을 선정하였다. 각 시료는 (주)에이비씨씨클에서 도입 및 배양되어 제공되었다. Ralstonia와 Fusarium 각각의 항체 pair strip 상에서 교차반응물질과의 반응성 정도를 확인하였다.

시험 결과, Fusarium 진단키트 상에서 교차반응물질 9종에 대하여 반응성이 확인되지 않았으며 Ralstonia 진단키트 상에서 교차반응물질 9종에 대하여 반응성이 확인되지 않았다.

Table 12. 표준시료 및 교차반응 물질

No.	세균/곰팡이	명칭	세포수(cfu/ml)
1	곰팡이	<i>Fusarium oxysporum</i>	1.0x10 <sup>8</sup>
2	곰팡이	<i>Botrysis Cinerea</i>	4.3x10 <sup>8</sup>
3	곰팡이	<i>Colletotrichum Gloeosporioides</i>	3.1x10 <sup>8</sup>
4	곰팡이	<i>Alternaria Ponax</i>	2.7x10 <sup>8</sup>
5	곰팡이	<i>Fusarium Graminearum</i>	2.0x10 <sup>8</sup>
6	세균	<i>Ralstonia solanacearum</i>	1.0x10 <sup>10</sup>
7	세균	<i>Bacillus Subtilis</i>	5.0x10 <sup>8</sup>
8	세균	<i>Lactobacillus Plantarum</i>	3.2x10 <sup>8</sup>
9	세균	<i>Pseudomonas S.P</i>	2.2x10 <sup>9</sup>
10	세균	<i>Bacillus Amyloliquefaciens</i>	2.6x10 <sup>8</sup>











양성표준	교차반응 물질 (1.0x10 <sup>7</sup> cfu/ml)								
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Bacillus Subtilis	Lactobacillus Plantarum	Peseudomona S,P	Bacillus Amyloliuefaciens	Botrysis Cinerea	Colletotrichum Gloeosporioides	Alternaria Ponax	Fusarium Graminearum
									
++	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fig. 31. *Fusarium oxysporum* Strip에 대한 양성 표준물질과, 교차반응물질의 반응성











양성표준	교차반응 물질 (1.0x10 <sup>7</sup> cfu/ml)								
<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Bacillus Subtilis	Lactobacillus Plantarum	Peseudomona S,P	Bacillus Amyloliuefaciens	Botrysis Cinerea	Colletotrichum Gloeosporioides	Alternaria Ponax	Fusarium Graminearum
									
++	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fig. 32. *Ralstonia solanacearum* Strip에 대한 양성 표준물질과, 교차반응물질의 반응성

다) 병원균 Cut-Off 레벨 선정

- Ralstonia와 Fusarium 동시 진단 키트에서의 병원균의 Cut-off 레벨을 선정하기 위하여 시들음병을 유발하는 *Ralstonia solanacearum*와 *Fusarium oxysporum*의 식물체에서 발현 농도 구명 시험을 (주)에이비씨씨클을 통하여 진행하였다. 기주식물체 3종(토마토, 오이, 고추)의 모종을 심어 재배하였으며 배양된 *Ralstonia Solanacearum*와 *Fusarium oxysporum*을 각각 식물체에 접종하였다. 25°C 이상 온실 조건에서 작물에 나타나는 시들음병 발병 증상을 확인하며, 5일 간격으로 수액 내 미생물의 동정 및 밀도를 측정 하였다.
- 결과, Ralstonia 공격접종 식물에서 시들음병 초기 증상이 육안으로 확인 될 시에 병원균 밀도  $1 \times 10^5$  cfu/ml 이상으로 확인되었으며,  $1 \times 10^6$  cfu/ml 이상에서 시들음병이 급격히 진행되어 식물이 사멸하기 시작하였다. *Ralstonia solanacearum*의  $10^4$  cfu/ml 이하에서 미생물 분리동정으로 밀도 측정이 정확히 이루어 지지 않았다.
- *Fusarium oxysporum* 공격접종 식물에서 시들음병 초기 증상이 육안으로 확인 될 시에 병원균 밀도  $1 \times 10^4$  cfu/ml 이상으로 확인되었으며,  $1 \times 10^5$  cfu/ml 이상에서 시들음병이 급격히 진행되어 식물이 사멸하기 시작하였다. *Fusarium oxysporum*의  $10^3$  cfu/ml 이하에서 미생물 분리동정으로 밀도 측정이 정확히 이루어 지지 않았다.
- 시들음병이 발병한 증상과 병원균 밀도에 따라 제조된 *Ralstonia solanacearum*와 *Fusarium oxysporum* 진단 키트에서의 병원균의 Cut-off 레벨을 선정하였으며 이 반정량 적으로 분석하고자 고, 중, 저역가로 선정하였다.

Table 13. Ralstonia와 Fusarium 병원균의 Cut-off 레벨 선정

	Fusarium	Ralstonia	시들음병 증상
고역가	$10^6$ cfu/ml 이상	$10^7$ cfu/ml 이상	성기
중역가	$10^5$ cfu/ml	$10^6$ cfu/ml	중기
저역가	$10^4$ cfu/ml 이하	$10^5$ cfu/ml 이하	초기

라) 대조선 항체-금 콘쥬게이트 함량 결정

- ① 닭 IgY 항체-금 콘쥬게이트 농도가 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8, 2.1 ug/strip이 되도록 금 흡착 패드에 고정화 시키고 각각을 절단, 조립하여 시험에 사용하였다. 검체희석액을 100ul를 디바이스 하단의 샘플패드 부위에 한 후, 10~15분에 판정하여 중역가 민감도 해당할 수 있는 함량을 선정하였다.
- ② 검사선은 대조선 상의 닭 IgY 항체-금 접합체 함량에 관계없이 발색을 나타내지 않았다.
- ③ 0.6ug/strip, 0.9ug/strip, 1.2ug/strip 조건에서 민감도 발색의 차이가 확연히 차이가 발생하였다.
- ④ 0.9ug/strip 조건에서 중간 지점의 민감도 발색 정도가 확인되었으며, 이를 중역가로 선정하여 고역가, 저역가를 판정하는 반정량적 판단 기준점으로 분석이 가능하기 때문에 0.9ug/strip을 대조선 항체-금 접합체 함량으로 선정하였다.








	0.3ug/strip	0.6ug/strip	0.9ug/strip	1.2ug/strip	1.5ug/strip	1.8ug/strip	2.1ug/strip
							
민감도	+/-	+	++	+++	++++	++++	++++

Fig. 33. 대조선 항-닭 IgY 항체-금 콘쥬게이트 함량별 반응성 결과

마) 검사선 항체 함량 결정

- ① 항-Ralstonia 항체와 항-Fusarium 항체를 각각 1mg/ml, 1.5mg/ml, 2mg/ml, 2.5mg/ml 농도로 희석하여 멤브레인상의 검사선 위치에 분주 및 흡착시키고, 이를 각각 조립하여 음성검체, 고역가, 중역가, 저역가에 해당하는 검체 희석액 100ul를 디바이스 샘플패드 부위에 분주한 후 10~15분에 판정하였다.
- ② 음성검체는 검사선 상의 항체의 함량에 관계없이 발색을 나타내지 않았다.
- ③ Fusarium Oxysprum 검사선 2.0mg/ml 조건에서 고역가, 중역가, 저역가 검체에 따라 발색의 차이가 확인되었으며, 역가별 판정이 가능하기 때문에 2.0mg/ml 농도를 *Fusarium oxysporum* 검사선 고정화 항체량으로 결정하였다.
- ④ *Ralstonia solanacearum* 검사선 1.5mg/ml 조건에서 고역가, 중역가, 저역가 검체에 따라 발색의 차이가 확인되었으며, 역가별 판정이 가능하기 때문에 1.5mg/ml 농도를 *Ralstonia solanacearum* 검사선 고정화 항체량으로 결정하였다.



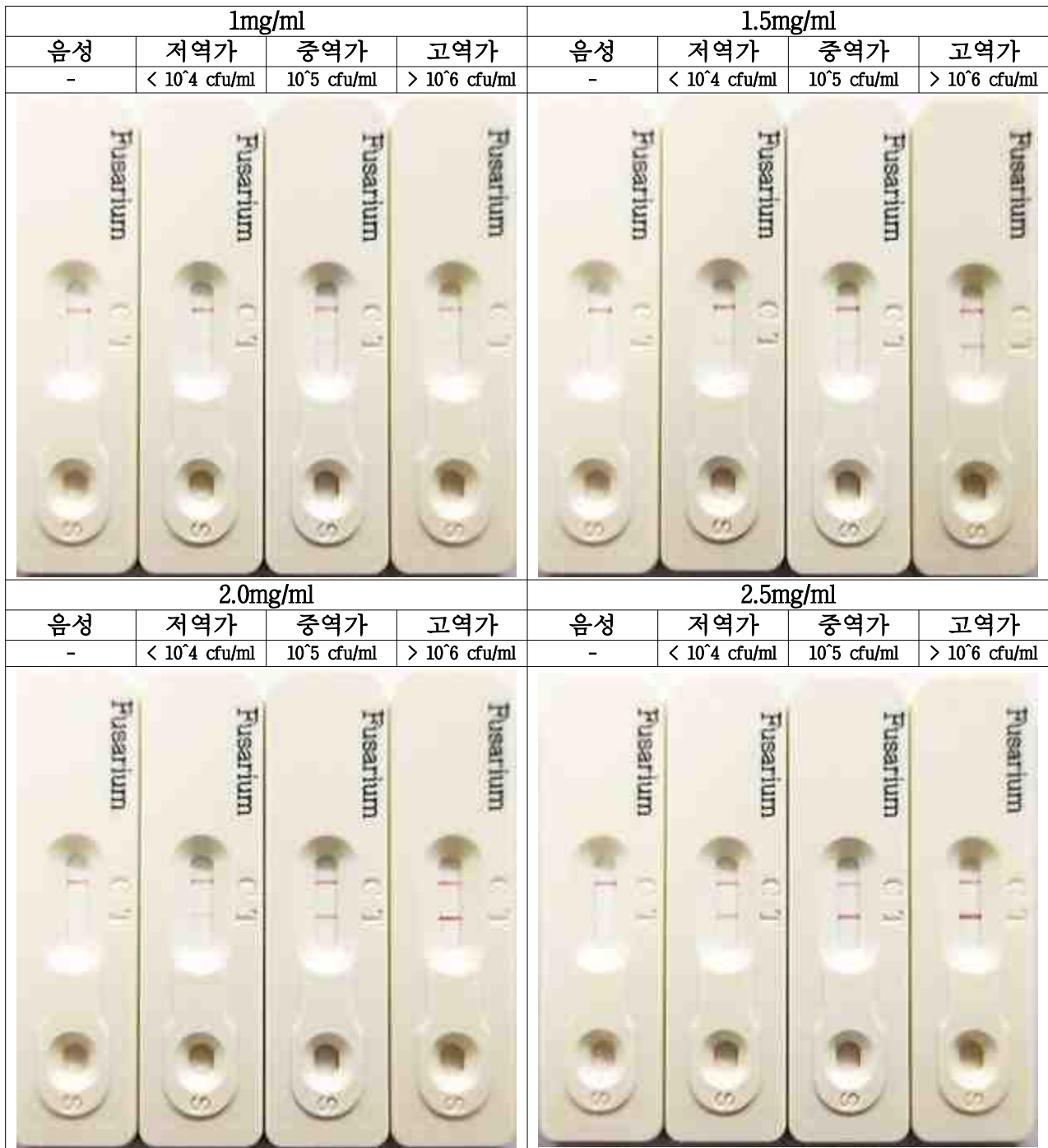


Fig. 34. 검사선 항-Fusarium 항체의 농도별 반응성 결과

Table 14. 검사선 항-Fusarium 항체의 농도별 반응성 결과

	1mg/ml	1.5mg/ml	2.0mg/ml	2.5mg/ml
음성검체	-	-	-	-
저역가	+	+	+	++
중역가	+	+	++	+++
고역가	+	++	+++	++++

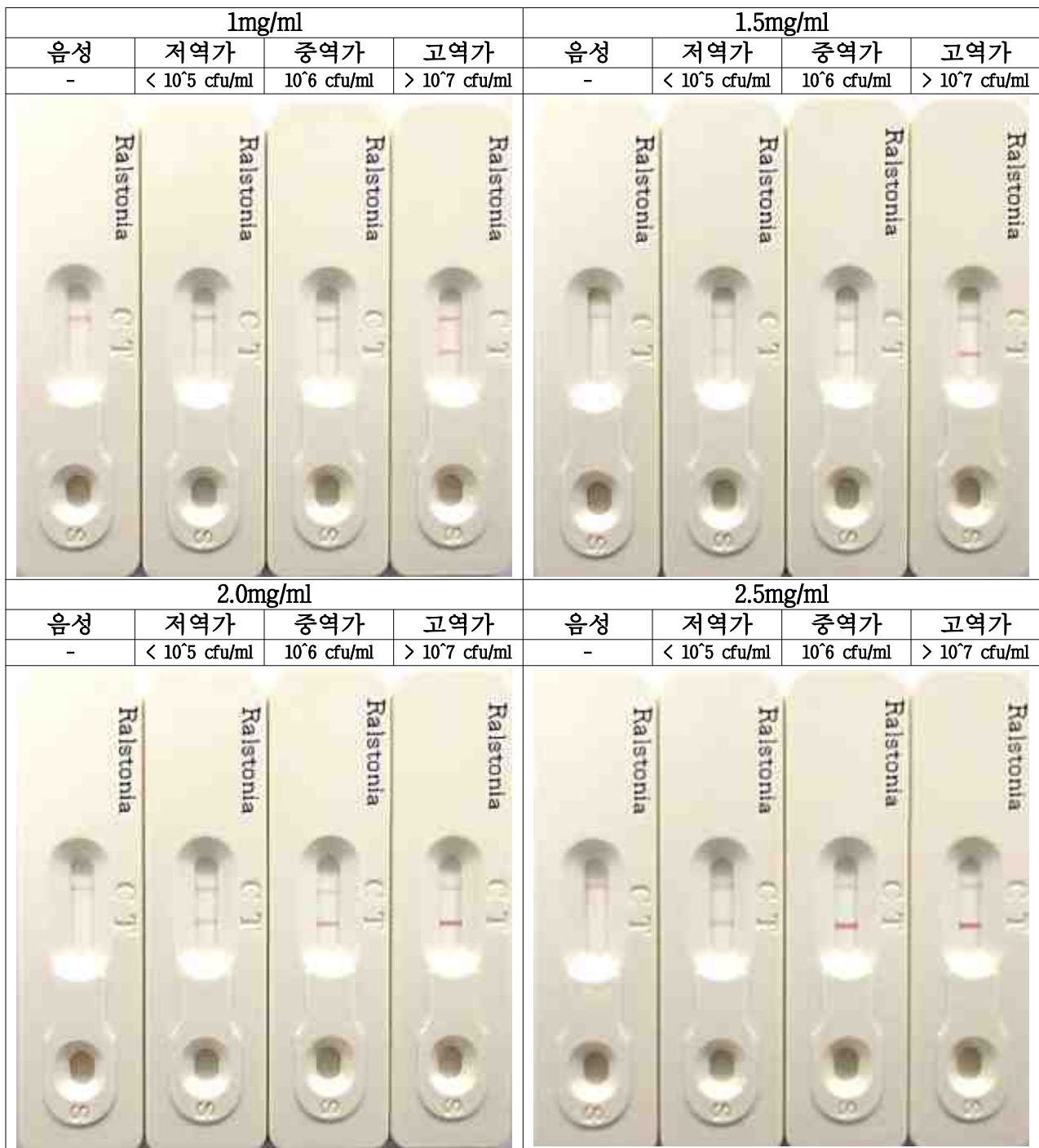


Fig. 35. 검사선 항-Ralstonia 항체의 농도별 반응성 결과

Table 15. 검사선 항-Ralstonia 항체의 농도별 반응성 결과

	1mg/ml	1.5mg/ml	2.0mg/ml	2.5mg/ml
음성검체	-	-	-	-
저역가	+	+	++	+++
중역가	+	++	+++	++++
고역가	++	+++	++++	++++

바) 검사선 항체-금 콘쥬게이트 함량 결정

- ① 항-Ralstonia 항체와 항-Fusarium 항체-금 콘쥬게이트 농도가 1.2, 1.6, 2.0, 2.4 ug/strip이 되도록 금 흡착 패드에 고정화 시키고 각각을 절단, 조립하여 시험에 사용하였다.
- ② 음성검체, 고역가, 중역가, 저역가에 해당하는 검체 희석액 100ul를 디바이스 샘플패드 부위에 분주한 후 10~15분에 판정하였다.
- ③ 항-Fusarium 항체-금 콘쥬게이트 함량이 2.0ug/strip 조건에서 고역가, 중역가, 저역가 검체에 따라 발색의 차이가 확인되었으며, 역가별 판정이 가능하기 때문에 2.0ug/strip 농도를 Fusarium 항체-금 콘쥬게이트 함량으로 결정하였다.
- ④ 항-Ralstonia 항체-금 콘쥬게이트 함량이 1.6ug/strip 조건에서 고역가, 중역가, 저역가 검체에 따라 발색의 차이가 확인되었으며, 역가별 판정이 가능하기 때문에 1.6ug/strip 농도를 Ralstonia 항체-금 콘쥬게이트 함량으로 결정하였다.

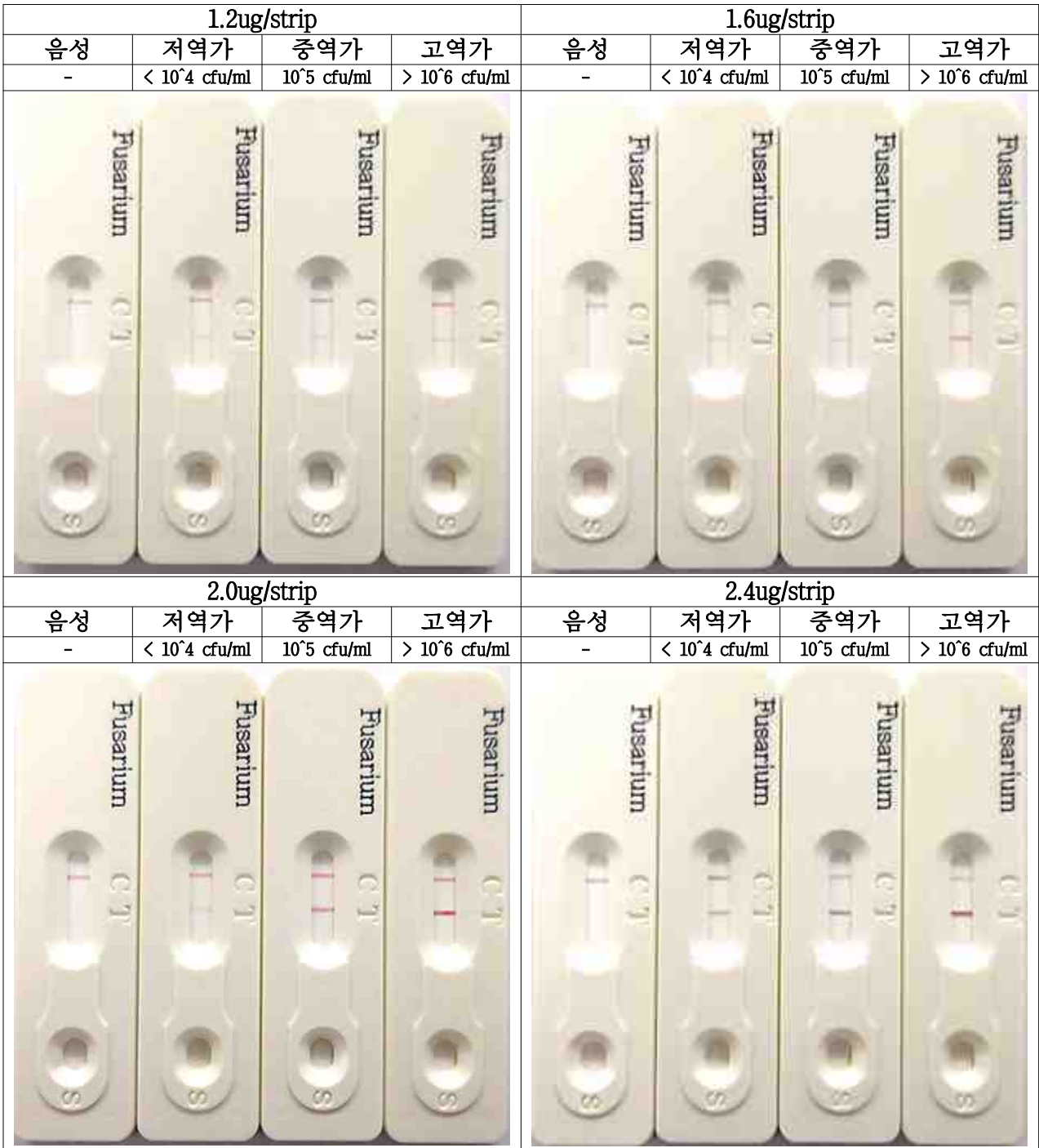


Fig. 36. 검사선 항-Fusarium 항체-금 콘쥬게이트 함량별 반응성 결과

표 16. 검사선 항-Fusarium 항체-금 콘쥬게이트 함량별 반응성 결과

	1.2ug/strip	1.6ug/strip	2.0ug/strip	2.4ug/strip
음성검체	-	-	-	+
저역가	+	+	+	++
중역가	+	+	++	+++
고역가	++	++	+++	+++

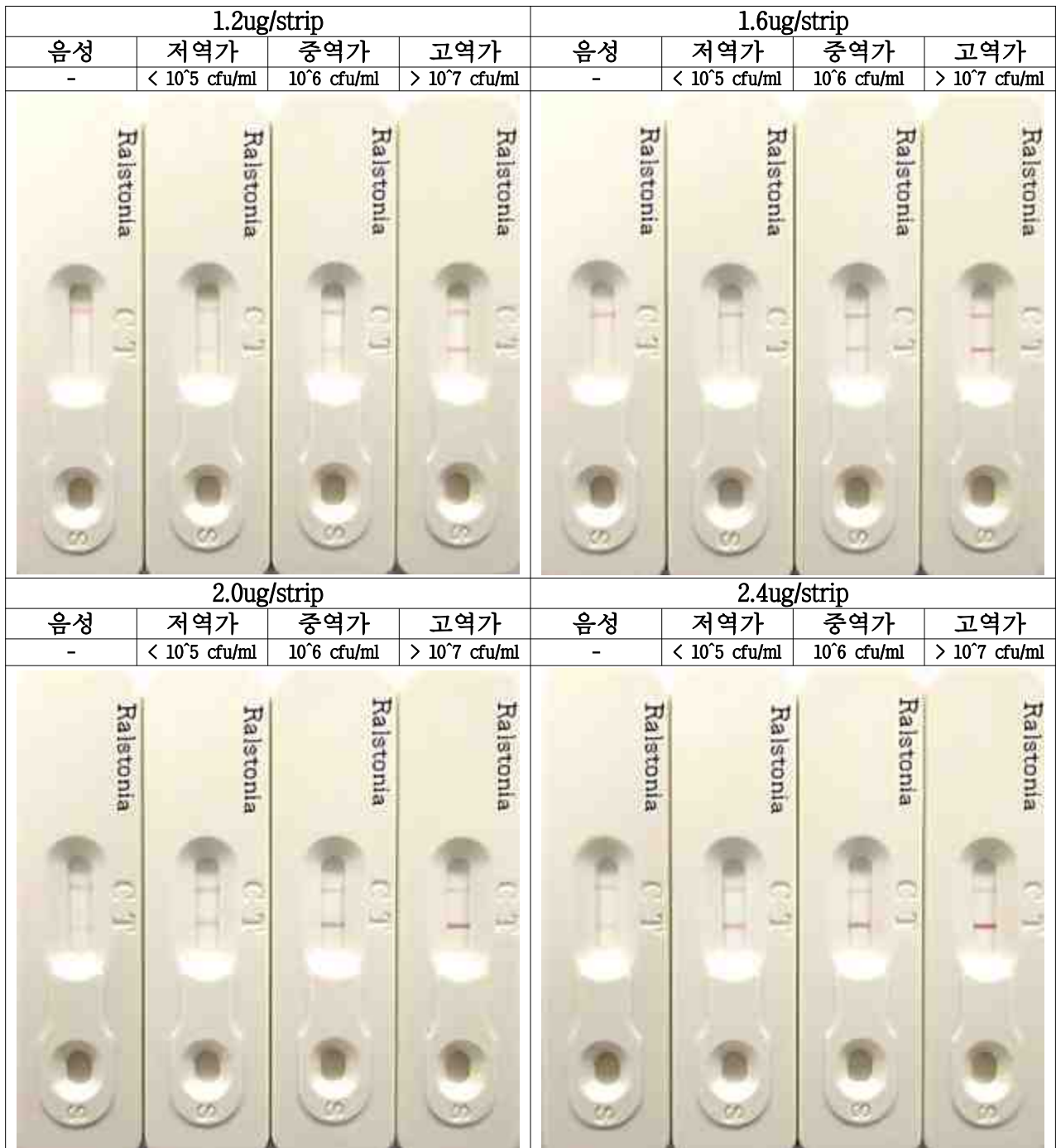


Fig. 37. 검사선 항-Ralstonia 항체-금 콘쥬게이트 함량별 반응성 결과

Table 17. 검사선 항-Ralstonia 항체-금 콘쥬게이트 함량별 반응성 결과

	1.2ug/strip	1.6ug/strip	2.0ug/strip	2.4ug/strip
음성검체	-	-	+	++
저역가	+	+	++	+++
중역가	+	++	+++	++++
고역가	++	+++	++++	++++

사) 식물검체 사용 부위 및 검체희석액 용량 선정

- ① Ralstonia와 Fusarium 동시 진단키트 상에서 식물검체 사용 용법, 용량을 선정하기 위하여 식물 검체 부위에 (잎, 줄기, 지제부) 따라 검체희석액(3ml, 5ml, 7ml, 10ml)에서 파쇄하여 각각의 즙액을 디바이스 검액 점적부위에 분주하고, 10~15분에 판정하였다.
- ② Fusarium 진단키트에서 Fusarium 감염 식물의 부위에 따른 반응성 확인한 결과, 지제부 즙액에서는 양성 반응성이 확인되었으나, 잎과 줄기 검체에서 반응성이 확인되지 않았다. 또한 검체희석액 5ml 조건에서 Test line 중역가 수준의 민감도가 확인되었다.
- ③ Ralstonia 진단키트에서 Ralstonia 양성 식물의 부위에 따른 반응성 확인한 결과, 모든 검체에서 양성 반응성이 확인되었다. 또한 검체희석액 5ml, 7ml 조건에서 Test line 중역가 수준의 민감도가 확인되었다.
- ④ 위와 같은 결과로, 동시진단키트 상에서 식물 검체는 지제부를 사용하며, 검체희석액은 5ml 사용하는 것이 적절한 것으로 확인되었다.

Table. 18. 동시진단키트 상에서 식물 검체사용 부위 및 검체희석액 사용 용량 선정

검체희석	3ml	5ml	7ml	10ml	3ml	5ml	7ml	10ml
	Fusarium 양성 식물 (중역가)				Fusarium 음성 식물			
잎	-	-	-	-	-	-	-	-
줄기	-	-	-	-	-	-	-	-
지제부	+++	++	+	+	-	-	-	-
	Ralstonia 양성 식물 (중역가)				Ralstonia 음성 식물			
잎	+++	++	++	+	-	-	-	-
줄기	+++	++	++	+	+	-	-	-
지제부	+++	++	++	+	+	-	-	-

	Fusarium 양성 식물 (중역가)				Fusarium 음성 식물			
	3ml	5ml	7ml	10ml	3ml	5ml	7ml	10ml
여								
줄기								
지체부								

Fig. 38. Fusarium 진단키트 식물 검체사용 부위 및 검체희석액 용량 선정

	Ralstonia 양성 식물 (중역가)				Ralstonia 음성 식물			
	3ml	5ml	7ml	10ml	3ml	5ml	7ml	10ml
연								
줄기								
지제부								

Fig. 39. Ralstonia 진단키트 식물 검체사용 부위 및 검체희석액 용량 선정



아) 검체 사용량 선정

- ① Ralstonia와 Fusarium 동시 진단키트 상에서 검체 사용량을 선정하기 위하여 검체희석액을 비율에 따라 디바이스 검액 점적부위에 분주하고, 10~15분에 판정하였다.
- ② 음성 식물검체의 경우 검체희석액 60ul, 80ul 사용시, 전개가 모두 이루어지지 않았으며, 120ul 사용시, 약한 위양성이 확인되었다.
- ③ 양성 표준검체(중역가)의 경우 60ul, 80ul 사용시, 전개가 모두 이루어 지지 않았으며, 100ul, 120ul 사용시 양성 반응이 확인되었다.
- ④ 다음과 같은 결과로 검체 사용량에 대하여 검체희석액 100ul에서 양성 판정이 가능하며, 위양성이 확인되지 않기 때문에 최종 검체희석액 사용량으로 선정하였다.

















검체량	음성 식물검체				양성 식물검체 (중역가)			
	60ul	80ul	100ul	120ul	60ul	80ul	100ul	120ul
Fusarium Strip								
Ralstonia Strip								

Fig. 40. 동시진단키트 상에서 검체 사용량에 따른 반응성 결과

Table. 19. 동시진단키트 상에서 검체 사용량에 따른 반응성 결과

검체량	음성 식물검체				양성 표준검체(중역가)			
	60ul	80ul	100ul	120ul	60ul	80ul	100ul	120ul
Fusarium strip	-	-	-	+	+	+	++	+++
Ralstonia strip	-	-	-	-	+	+	++	++

자) 검사선, 콘쥬게이트, 샘플패드, 검체희석액 조성 최적화

- 유효 항체 캡처, 콘쥬게이트 pair에 대하여 항체 고정화 조건선정, 항체-금 콘쥬게이트 양 설정 및 샘플패드, 검체희석액, 멤브레인 조성 최적화를 진행하였으며, 이에 대하여 표준검체 역가별 테스트를 진행하였다.

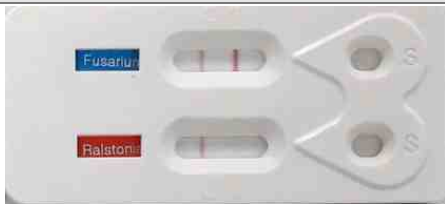
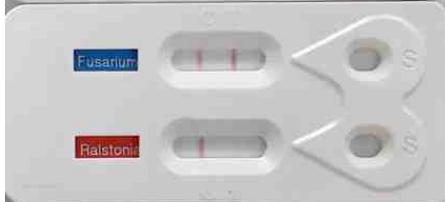


Fusarium 표준검체	라인강도 (Control Vs Test)	감염 수준 (역가)
	C < T	Fusarium 고역가 ≥ 10 <sup>6</sup> cfu/ml
	C = T	Fusarium 중역가 = 10 <sup>5</sup> cfu/ml
	C > T	Fusarium 저역가 ≤ 10 <sup>4</sup> cfu/ml
	Non	Fusarium Negative Or ≤ 10 <sup>3</sup> cfu/ml

Fig. 41. Fusarium 진단키트 최적화 조건 표준검체 테스트

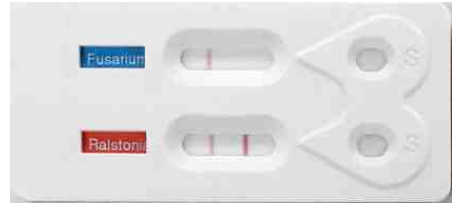
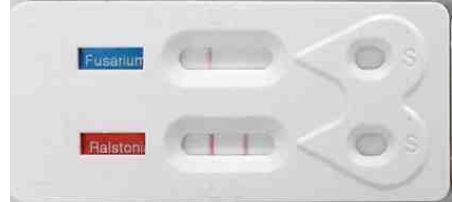

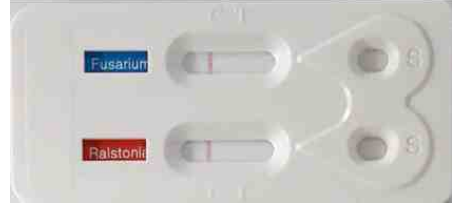
Ralstonia 표준검체	라인강도 (Control Vs Test)	감염 수준 (역가)
	C < T	Ralstonia 고역가 ≥ 10 <sup>7</sup> cfu/ml
	C = T	Ralstonia 중역가 = 10 <sup>6</sup> cfu/ml
	C > T	Ralstonia 저역가 ≤ 10 <sup>5</sup> cfu/ml
	Non	Ralstonia Negative Or ≤ 10 <sup>4</sup> cfu/ml

Fig. 42. Ralstonia 진단키트 최적화 조건 표준검체 테스트

차) 토양 시들음병 곰팡이/세균 감별 진단 키트 개발 최종 조건 선정

- 위의 실험들을 통하여 토양 시들음병 곰팡이/세균 감별 진단 키트 개발 최종 조건을 선정 하였다.

Table. 20. 동시 진단키트 최적화 조성 선정

구분	Fusarium 진단키트 함량 및 조성
검사선	2.0ug/ml, 0.1% Casien, 0.1% Trehalose, Control 1ug/ml
콘주게이트	CGC 2.0ug/strip, 5% Trehalose, 0.3% Casein, Control CGC 0.9ug/strip
샘플패드	50mM Tris pH8.0, 1% Tween20, 0.2% Casein
검체희석액	PBS pH7.2, 0.5% Tween20 (검체희석액 5ml)
구분	Ralstonia 진단키트 함량 및 조성
검사선	1.5ug/ml, 0.2% Casien, 0.1% Trehalose, Control 1ug/ml
콘주게이트	CGC 1.6ug/strip, 5% Trehalose, 0.2% Casein, Control CGC 0.9ug/strip
샘플패드	50mM Tris pH8.0, 1% Tween20, 0.2% Casein
검체희석액	PBS pH7.2, 0.5% Tween20 (검체희석액 5ml)

### 제 3 절 연구개발 제품의 유효성 및 임상 평가

#### 1. 토양 시들음병 곰팡이/세균 감별 진단 키트의 실험실내 효능 시험

##### 가. 임상 검체 확보

- 1) (주)에이비씨씨클을 통하여 국내 농가로부터 식물 검체 50종을 공급 받았다.
- 2) 식물검체는 세균성 시들음병 또는 곰팡이성 시들음병 감염 여부를 확인 하였으며, 감염 여부는 미생물 분리 동정을 통하여 병원균 밀도를 측정하여 이를 표에 나타내었다.  
Fusarium 미생물 밀도  $10^3$  cfu/ml 이하에서, Ralstonia 미생물 밀도  $10^4$  cfu/ml 이하에서 정확한 분리 동정이 이루어 지지 않았다.

##### 나. 임상 검체 테스트

- 1) 토양 시들음병 곰팡이/세균 감별 진단 키트 시제품으로 제조된 3 Lot. 를 사용하여 식물검체의 민감도 및 특이도를 분석 하였다.
- 2) Ralstonia의 경우 시판되고 있는 Agida Rs Immuno strip test 키트와 비교 실험을 진행 하였으나, Fusarium의 경우 시판되고 있는 제품이 없어 비교 실험을 진행 하지 못하였다.

Table. 21 식물검체 미생물 분리동정, Agida RS Immuno strip test, 시제품 테스트 비교 결과

No.	시료	Ralstonia 분리동정 (cfu/ml)	Agida Rs ImmunoStrip	베트올(주) SensPERT Ralstonia	Fusarium 분리동정 (cfu/ml)	베트올(주) SensPERT Fusarium
1	토마토	$4.8 \times 10^7$	양성	고역가	$\leq 10^3$	음성
2	토마토	$1.2 \times 10^5$	양성	저역가	$\leq 10^3$	음성
3	토마토	$\leq 10^3$	음성	음성	$5.4 \times 10^6$	고역가
4	토마토	$2.6 \times 10^5$	양성	저역가	$\leq 10^3$	음성
5	오이	$1.0 \times 10^5$	양성	저역가	$\leq 10^3$	음성
6	오이	$4.0 \times 10^6$	양성	중역가	$\leq 10^3$	음성
7	고추	$5.4 \times 10^5$	양성	중역가	$\leq 10^3$	음성
8	고추	$1.8 \times 10^8$	양성	고역가	$\leq 10^3$	음성
9	고추	$1.1 \times 10^5$	양성	저역가	$2.6 \times 10^5$	중역가
10	토마토	$1.4 \times 10^5$	양성	저역가	$7.0 \times 10^6$	고역가
11	고추	$2.6 \times 10^5$	양성	저역가	$1.6 \times 10^5$	저역가
12	오이	$\leq 10^4$	음성	음성	$\leq 10^3$	저역가
13	고추	$\leq 10^3$	음성	음성	$\leq 10^3$	저역가
14	고추	$\leq 10^3$	음성	음성	$3.8 \times 10^4$	저역가
15	토마토	$\leq 10^3$	음성	음성	$2.2 \times 10^4$	저역가
16	토마토	$4.2 \times 10^7$	양성	고역가	$\leq 10^3$	음성
17	토마토	$5.2 \times 10^4$	음성	음성	$\leq 10^3$	음성
18	고추	$\leq 10^4$	음성	음성	$8.6 \times 10^5$	중역가
19	오이	$5.1 \times 10^6$	양성	중역가	$\leq 10^3$	음성
20	오이	$1.2 \times 10^6$	양성	중역가	$\leq 10^3$	음성

21	오이	$4.2 \times 10^4$	음성	음성	$\leq 10^3$	음성
22	토마토	$3.2 \times 10^6$	양성	고역가	$\leq 10^3$	음성
23	토마토	$\leq 10^3$	음성	음성	$\leq 10^3$	음성
24	토마토	$\leq 10^3$	음성	음성	$\leq 10^3$	음성
25	오이	$\leq 10^3$	음성	음성	$\leq 10^3$	음성
26	고추	$8.4 \times 10^4$	음성	음성	$\leq 10^3$	음성
27	오이	$\leq 10^3$	음성	음성	$1.0 \times 10^7$	고역가
28	토마토	$\leq 10^3$	음성	음성	$9.2 \times 10^6$	고역가
29	오이	$\leq 10^3$	양성	저역가	$\leq 10^3$	음성
30	고추	$7.2 \times 10^5$	양성	저역가	$\leq 10^3$	음성
31	고추	$2.6 \times 10^4$	음성	음성	$\leq 10^3$	음성
32	오이	$\leq 10^3$	음성	음성	$5.5 \times 10^5$	중역가
33	오이	$\leq 10^4$	음성	음성	$1.2 \times 10^5$	중역가
34	고추	$4.6 \times 10^4$	음성	음성	$3.2 \times 10^5$	중역가
35	토마토	$\leq 10^3$	양성	저역가	$\leq 10^3$	음성
36	토마토	$\leq 10^3$	음성	음성	$\leq 10^3$	음성
37	토마토	$\leq 10^3$	음성	음성	$6.8 \times 10^5$	중역가
38	토마토	$6.2 \times 10^7$	양성	고역가	$1.2 \times 10^4$	저역가
39	토마토	$1.2 \times 10^8$	양성	고역가	$5.0 \times 10^4$	저역가
40	토마토	$5.4 \times 10^6$	양성	중역가	$3.4 \times 10^4$	저역가
41	토마토	$4.0 \times 10^5$	양성	저역가	$\leq 10^3$	음성
42	토마토	$6.0 \times 10^5$	양성	저역가	$2.8 \times 10^5$	중역가
43	고추	$6.0 \times 10^6$	양성	중역가	$\leq 10^3$	음성
44	고추	$2.4 \times 10^6$	양성	중역가	$\leq 10^3$	음성
45	고추	$2.6 \times 10^5$	양성	저역가	$6.0 \times 10^5$	중역가
46	오이	$5.2 \times 10^5$	양성	저역가	$7.6 \times 10^5$	중역가
47	오이	$3.0 \times 10^5$	양성	저역가	$\leq 10^3$	음성
48	오이	$3.8 \times 10^6$	양성	중역가	$\leq 10^3$	음성
49	토마토	$4.4 \times 10^6$	양성	중역가	$\leq 10^3$	음성
50	토마토	$5.8 \times 10^6$	양성	중역가	$\leq 10^3$	음성

3) 시제품 Fusarium 진단키트와 미생물 분리동정법을 통하여 확인된 곰팡이성 시들음병 병원균 밀도를 비교하였으며, Fusarium 진단키트의 상대 민감도(Relative sensitivity) 및 상대 특이도(Relative Specificity)를 분석하였다.

역가별 상대 민감도는 미생물 분리동정법을 통하여 병원균 밀도가 확인된 19종 검체가 시제품 Fusarium 진단키트에서 동일한 역가 판정을 받은 비율을 말하며, 상대 특이도는 음성으로 확인된 31종 검체가 진단 키트에서 음성 판정을 받은 비율을 말한다. 그 결과 역가별 상대 민감도는 고역가 100%, 중역가 90%, 저역가 100%를 나타내었으며, 상대 특이도는 93%를 보였다.

Table. 22. Fusarium 진단키트와 미생물 역가별 상대 민감도, 특이도

Fusarium 진단키트		미생물 분리동정 ( <i>Fusarium oxysporum</i> )				
		>10 <sup>6</sup> cfu/ml	=10 <sup>5</sup> cfu/ml	<10 <sup>5</sup> cfu/ml	음성 <10 <sup>3</sup> cfu/ml	합계
검체 50종	고역가 >10 <sup>6</sup> cfu/ml	4	0	0	0	4
	중역가 =10 <sup>5</sup> cfu/ml	0	9	0	0	9
	저역가 <10 <sup>4</sup> cfu/ml	0	1	5	2	8
	음성	0	0	0	29	29
합계		4	10	5	31	50
고역가 상대 민감도		100%				
중역가 상대 민감도		90%				
저역가 상대 민감도		100%				
상대 특이도		93%				

4) 시제품 Ralstonia 진단키트와 미생물 분리동정법을 통하여 확인된 세균성 시들음병 병원균 밀도를 비교하였으며, Ralstonia 진단키트의 상대 민감도(Relative sensitivity) 및 상대 특이도(Relative Specificity)를 분석하였다.

역가별 상대 민감도는 미생물 분리동정법을 통하여 병원균 밀도가 확인된 30종 검체가 시제품 Ralstonia 진단키트에서 동일한 역가 판정을 받은 비율을 말하며, 상대 특이도는 음성으로 확인된 20종 검체가 진단 키트에서 음성 판정을 받은 비율을 말한다. 그 결과 역가별 상대 민감도는 고역가 100%, 중역가 90%, 저역가 92%를 나타내었으며, 상대 특이도는 90%를 보였다.

Table 23. Ralstonia 진단키트와 미생물 역가별 상대 민감도, 특이도

Ralstonia 진단키트		미생물 분리동정 ( <i>Ralstonia solanacearum</i> )				
		>10 <sup>7</sup> cfu/ml	=10 <sup>6</sup> cfu/ml	<10 <sup>5</sup> cfu/ml	음성 <10 <sup>4</sup> cfu/ml	합계
검체 50종	고역가 >10 <sup>7</sup> cfu/ml	5	1	0	0	6
	중역가 =10 <sup>6</sup> cfu/ml	0	9	1	0	10
	저역가 <10 <sup>5</sup> cfu/ml	0	0	12	2	14
	음성	0	0	0	20	20
합계		5	10	13	22	50
고역가 상대 민감도		100%				
중역가 상대 민감도		90%				
저역가 상대 민감도		92%				
상대 특이도		90%				

5) 시제품 Ralstonia 진단키트와 Agida Rs Immuno strip test에 대하여 비교 검사하였으며, 검출된 시료 수를 측정하여 Ralstonia 진단키트의 상대 민감도(Relative sensitivity) 및 상대 특이도(Relative Specificity)를 분석하였다. 상대 민감도는 Agida Rs Immuno strip test에서 양성으로 확인된 검체가 본 시제품 진단키트에서 양성판정을 받은 비율을 말하며, 상대 특이도는 음성으로 확인된 검체가 상기 진단 키트에서 음성판정을 받은 비율을 말한다.

그 결과 Agida Rs Immuno strip test 대비 50 검체 중 50 검체 모두에서 동일한 결과를 확인하여 상대 민감도 및 특이도 100%를 보였다.

Table 24. Agida RS ImmunoStrip Test과의 상대 민감도, 특이도

Ralstonia 시제품		Agida RS ImmunoStrip Test		
		양성	음성	합계
검체 50종	양성	30	0	30
	음성	0	20	20
합계		30	20	50
상대 민감도		100%		
상대 특이도		100%		

## 제 4 절 현장 적용법 개발 및 효과 시험

### 1. 현장 진단에 맞는 진단 키트의 적용방법 개발

개발 시제품의 현장 진단을 위해 pot시험된 육묘를 대상으로 토양, 식물 수액, 즙액 등의 방법으로 측정 시료를 적용하여 현장에서의 최적의 진단 방법을 모색하고자 하였다. 시험 pot는 직경 30cm\*40cm로 적정 배수 및 유인을 위해 원예용 상토 : 수도용상토=8:2의 비율로 30주를 정식하였으며, 정식후 45일 2화방 착과 및 1화방 착색이 이루어지는 생육중기에 접종을 시작하여 병원균 발생 표현형 및 진단을 실시하였다. 접종은 *Ralstonia solanacearum*  $1 \times 10^9$ cfu/ml의 배양액을 100배 희석하여 pot당 500ml씩 관주하였고, *Fusarium oxysporum*  $1 \times 10^8$ cfu/ml 배양액을 homogenizing시킨 후 100배 희석하여 마찬가지로 pot당 500ml를 관주하였다.

#### 가. 토양 희석에 대한 시제품 진단 Test

##### 1) 토양 희석에 대한 농도별 진단 확인

토양 희석에 대한 농도별 진단은 접종전과 사전 토양 사전 Test를 진행하였으며, Test 토양의 토양 분석을 통해 간접 가능한 우려 미생물들의 발생 유무를 관찰하였다. 이후 병 진행 양상 표현형을 주기적으로 관찰하여 발생 시점부터 진단하였다.

##### 가) 토양 희석액 농도별 진단 확인

토양 접종 전, 병 발생시로 나누어 토양 희석 농도별로 진단키트의 감응도와 cut-off 기준과의 밴드 정확성을 확인하였다.



토양 희석액 상태 (토양:buffer=1:2.5, 1:5, 1:10, 1:50)







시들음병 발생 상황

Fig. 43. 발병 토양 희석액 상태 및 진단 작물의 발병 상태



① *Fusarium oxysporum* 진단시제품의 토양 희석액 적용 발현 양상

Table 25. 토양 희석액 농도별 시들음병 진단키트(*Fusarium*)의 발현 양상

항목		토양농도			
		1:2.5	1:5	1:10	1:50
병 발생 중기	진단 키트				

시험 결과 토양 접종 전에서는 대조선(C)에서만 밴드가 분홍색의 밴드가 형성되었으며, 검사선(T)에서는 밴드 형성이 없는 것으로 나타났으며, 토양 희석액 농도 분액별로 육안 관찰을 위한 선명도 판별에서는 1:5 이상의 희석액까지 분홍색의 밴드 형성의 관찰이 용이하여 토양 1g당 5ml이상의 희석액이 소요되는 것으로 관찰되었다. 수액의 양이 증가할 수록 관찰이 용이하였으나 추출을 위한 Extraction Buffer의 과량의 적용시 포장용기의 부피 확대로 편이성면에서 결여되어 시료량을 1g 적용하는 것이 용이할 것으로 판단되었다.

병 발생 성기에서는 대조선(C)와 검사선(T) 모두에서 밴드 형성이 나타났으며, 토양 농도별 관찰에서는 접종 전과 마찬가지로 1:5의 희석 농도 이상에서 관찰이 가능한 것으로 나타났습니다.

② *Ralstonia solanacearum* 진단시제품의 토양 희석액 적용 발현 양상

*Ralstonia solanacearum* 처리구도 마찬가지로 접종전 토양에서는 대조선(C)에서만 밴드가 분홍색의 밴드가 형성되고, 검사선(T)에서는 밴드 형성이 없어 토양내 기타 미생물 및 유기산 등의 다른 물질에 의한 간섭이 없음이 확인되었다. 토양 희석액 농도 분액별로 육안 관찰에서도 *Fusarium* Test구와 마찬가지로 1:5 이상에서 관찰이 용이하였다. 최종적으로 토양 적용 Test를 위한 희석액 진단을 위해서는 토양과 extract buffer(지하수 활용)의 비율은 1:5 이상의 희석 조건이 가장 적합하게 나타났으며, 각각의 진단 키트에 대한 간섭의 우려 사항은 나타나지 않았다.

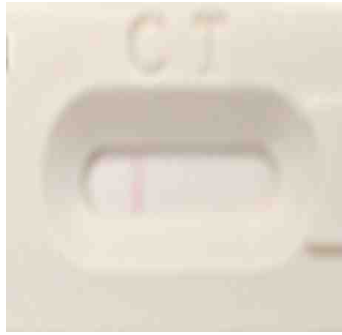






Fig. 44. 무처리구 진단 키트 발현 대조구









Table 26. 토양 희석액 농도별 시들음병 진단키트(*Ralstonia*)의 발현 양상

항목		토양농도			
		1:2.5	1:5	1:10	1:50
병 발생 중기	진단 키트 감응도 특이도				

### ③ 각각의 진단 Test 토양의 미생물상 확인

각각의 병원균의 접종 토양을 대상으로 미생물상의 확인과 병원균의 밀도 확인을 통해 발현 양상 등을 관찰하였다. 무처리의 경우 세균상 9종 이상, 곰팡이상이 5종 이상의 다양성을 나타내었으며, 토양 미생물의 밀도 또한 세균은  $10^8$ cfu/g 이상, 곰팡이는  $10^6$ cfu/g 이상의 밀도를 보였다. 대조적으로 세균성 시들음병(*Ralstonia solanacearum*) 발현 토양은 세균상은 7종으로 종의 다양성이 많이 결여되었으며, 곰팡이의 종류와 수도 무처리구에 비해 적었다. 선택배지를 활용한 관찰에서는 *Ralstonia solanacearum*이  $8.4 \times 10^5$ cfu/g이 관찰되어 검사선에서 발현과 일치하는 결과를 보였다. 곰팡이성 시들음병(*Fusarium oxysporum*) 접종구에서는 선택배지의 활용이 어려워 밀도의 측정과 확인의 어려움이 있었으나, 군사 특징(자색의 발현)을 임의 계수하여  $4 \times 10^5$ cfu/g로 확인되었고, 이의 현미경 관찰을 통해 *Fusarium*속 고유의 초승달 모양의 포자상을 관찰하여 동일균임을 확인하였다. 곰팡이성 시들음병(*Fusarium oxysporum*)의 경우도 F.O 진단키트 시제품의 검사선(T)에서 밴드가 확인되어 감염성을 확인하였고, 대조선(C)보다 선명한 값을 보였다.


Table 27. 병 감염 토양의 미생물상 확인

	세균상	곰팡이상	접종균 밀도 (1*10 <sup>5</sup> )
무접종 토양			-
<i>Ralstonia solanacearum</i> 발현 토양			
<i>Fusarium oxysporum</i> 발현 토양			

나) 토양내 대상 병원균의 발현 농도 확인

토양 접종 전, 병 발생 초기, 발생 중기, 발생 성기로 나누어 토양 희석 농도별로 진단 키트의 감응도와 cut-off 기준과의 밴드 정확성을 확인하였다. 또한, 식물시료의 표면상 나타나는 병증의 특징을 관찰하였다.

Table 28. 진단키트와 토양내 대상 병원균의 발병 농도 및 표현형 비교

토양농도		접종처전	병 발생 초기	발생 중기	발생 성기
항목					
R · S	진단 키트				
	감응도	우수	양호	우수	양호
	cut-off(C)	10 <sup>6</sup> cfu/ml(C)	10 <sup>6</sup> cfu/ml	10 <sup>6</sup> cfu/ml	10 <sup>6</sup> cfu/ml
	R.S 분석값(×10)	-	2.8 × 10 <sup>6</sup> cfu/g	1.8 × 10 <sup>7</sup> cfu/g	6.2 × 10 <sup>7</sup> cfu/g
	식물체 표현형	정상 생육	▪ 하위엽 시들음	▪ 중위엽 시들음	▪ 전체엽 시들음 ▪ 중하위엽 고사

시험 결과 접종전 토양의 진단키트의 경우 대조선(C)만이 발현되었으며, 이를 토양내에 간섭을 유도할만한 미생물의 없어 감응도는 양호하게 나타났다. 병 발생 초기는 *Ralstonia*의 경우 접종후 7일경부터 하위엽에서부터 일부 시들음 증상이 나타났으며, 진단키트의 발현은 대조선(C)에 비해 옅은색으로의 발현을 보였다. 미생물 동정에서도 선택배지상의 밀도가  $2.8 \times 10^6$  cfu/g ( $\times 10$  토양희석배수량) 나타나 대조선(C)의  $10^6$  cfu/ml 보다도 낮은 결과로 Cut-off 라인에 양호한 값을 보였다.

발생 중기의 진단 키트의 밴드 양상은 대조선(T)의 발현과 유사한 농도와 값을 보였으며, 토양분석을 통한 미생물 동정에서는  $1.8 \times 10^7$  cfu/g 값을 보여 대조선(C)의  $10^6$  유사한 밀도를 나타내었다.

작물체의 병증상으로 발생성기에 해당하는 시기의 진단선(T)의 발현은 특이하게도 대조선(C)와 유사한 값을 보였고, 병원균의 토양 밀도 확인에서도  $4.2 \times 10^7$  cfu/g의 밀도 값을 보였다. 이는 토양내의 병원균의 밀도가 타미생물 등의 경합과 토양 조건의 한정으로 더 이상의 증가를 보이지 않고 식물체 도관으로 이동된 많아지고 이에따라 식물체내에서의 활성이 확대되어 병증은 보다 심해진 것으로 판단되었다.

## 2) 식물 수액 적용에 따른 진단 Test

토양 Test와 마찬가지로 무처리, 병 발생 초기, 발생 중기, 발생 성기로 나누어 토양 희석 농도별로 진단키트의 감도와 cut-off 기준과의 밴드 정확성, 그리고 기타 주변 미생물에 의한 교차반응성을 확인하였다. 또한, 식물시료의 표면상 나타나는 병증의 관찰을 통해 발병 정도(피해도)와의 표현형을 비교함으로써 반정량의 결과와의 일치성을 확인하였다. 시료의 채취는 곰팡이성 시들음병(*Fusarium oxysporum*)과 세균성 시들음병(*Ralstonia solanacearum*)의 정확한 원인규명이 목적이기 때문에 두 병원체의 발병부위인 식물체 지체부를 채취 절단하여 소량의 수액을 진단 키트의 시료로 사용하였다.



Fig. 45. 수액 진단을 위한 토마토 지체부 절단





시험 결과는 아래 표와 같이 무처리구에서는 주변의 간섭에 의한 교차반응이 일어나지 않아 명확한 진단이 가능하였다. 또한, 토양에서와 달리 진단 확인 뒤 오랜 시간(1hr 이상)이 지나도 발현선의 번짐 현상이 없었고 토양의 배경색의 어둡게 변색되어 육안에 의한 관찰 오류가 없어 진단 관찰의 용이성이 높았다

*Fusarium oxysporum*에 의한 곰팡이성 시들음병의 병 발생 초기 Fusarium 진단 키트의 발현 정도는 대조선(C)보다 낮게 발현되었으며, 수액내 *F. oxysporum*의 밀도 분석에서  $1.8 \times 10^4$ cfu/ml의 값을 나타내어 Cut-off 라인인  $10^5$ cfu/ml과 명확한 차이를 보였다. 식물체 병 발생 표현형에 있어서도 성장점 끝부분과 하위엽의 시들음 증상이 나타나 식물체 발병양상과 Cut-off 레벨에 맞는 진단키트의 정확한 발현 정도가 나타났다.

병 발생 중기 Fusarium 진단 키트의 발현 정도는 대조선(C)과 거의 유사한 발현 정도를 나타내었으며, 수액내의 병원균의 밀도는  $3.6 \times 10^5$ cfu/ml를 나타내었다. 대조선(C)의  $10^5$ cfu/ml의 범위와 병원균의 밀도가 정확성을 띄었으며, 표현형의 발현에서는 발생초기의 신엽끝 성장점의 시들음과 하위 오래된 성엽에서 보다 진행되어 중위엽과 분얼에서도 시들음 현상이 반복되었다.

병 발생 성기에도 대조선(C)에 비해 발현이 큰 차이를 보였으며, 토양진단에서와 달리 발생중기와도 수액에 의한 진단은 교차 반응의 우려성을 없고, 감응도가 매우 우수하여 발병의 정도에 따른 반정량이 가능하였다.

Table 26. 곰팡이성 시들음병(*Fusarium oxyporum*)의 병 발생 정도에 따른 F.O.진단키트의 발현 정도

토양농도		무처리구	병 발생 초기	발생 중기	발생 성기
F.O	진단 키트				
	감응도	우수	우수	우수	우수
	교차반응	없음	없음	없음	없음
	cut-off(C)	$10^5$ cfu/ml(C)	$10^5$ cfu/ml	$10^5$ cfu/ml	$10^5$ cfu/ml
	F.O 분석값		$1.8 \times 10^4$ cfu/ml	$3.6 \times 10^5$ cfu/ml	$2.2 \times 10^6$ fu/ml
식물체 표현형	정상 생육	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 하위엽 시들음</li> <li>▪ 성장점 일부 시들음</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 중위엽 및 줄기 시들음</li> <li>▪ 도관부 갈변 진행</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 전체엽 시들음</li> <li>▪ 중하위엽 고사</li> </ul>	

*Ralstonia solanacearum*에 의한 세균성 시들음병(Bacterial wilt)의 병 발생 정도에 따른 R.O.진단키트의 발현 양상 결과 수액에서의 감응성은 모두에서 우수하게 나타났으며, 반

정량을 위한 발현 정도의 차이가 분명하게 나타났다.

세균성 시들음병(Bacterial wilt)의 발병 초기 수액 내의 병원성 미생물(*Ralstonia solanacearum*)의 미생물 밀도는  $2.0 \times 10^5$ cfu/ml으로 나타났으며, 대조선(C)의 Cut-off 라인인  $10^6$ cfu/ml에 비교하여 낮은 발현 정도를 보였다. 발생 중기의 경우 대조선(C)와 유사한 발현 양상을 보였으며, *Ralstonia solanacearum*  $5.2 \times 10^6$ cfu/ml의 병원성 미생물 밀도를 보여 발생중기의 진단키트 기준과 유사한 결과를 보였다. 또한, 발생중기의 표현형태인 중위엽 시들음 증상의 반복과 지체부 시료 침지시 유액의 발생이 진행되고 있음을 확인하였다. 발생성기도 마찬가지로 Cut-off 라인 이상의 병원성 미생물의 검출( $3.4 \times 10^7$ cfu/ml)로 인하여 대조선(C)보다 짙은 발현 정도를 나타내어 육안으로써 발생성기를 진단하기에 충분하였다.

Table 27. 세균성 시들음병(*R. solanacearum*)의 발병 정도에 따른 R.O진단키트의 발현 정도

발병정도		무처리구	병 발생 초기	발생 중기	발생 성기
R. O.	진단 키트				
	감응도	우수	우수	우수	우수
	교차반응	없음	없음	없음	없음
	cut-off(C)	$10^6$ cfu/ml	$10^6$ cfu/ml	$10^6$ cfu/ml	$10^6$ cfu/ml
	R.O. 분석값		$2.0 \times 10^5$ cfu/ml	$5.2 \times 10^6$ cfu/ml	$3.4 \times 10^7$ cfu/ml
	식물체 표현형	정상 생육	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 하위엽 시들음</li> <li>▪ 성장점 일부 시들음</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 중위엽 시들음</li> <li>▪ 침지시 유액 발생</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 전체엽 시들음</li> <li>▪ 중하위엽 고사</li> </ul>





Fig. 46. *Ralstonia solanacearum* 병 발생 중기 이후 절단면 유액 발생

### 3) 식물체 즙액 농도별 시제품 진단 Test

지체부의 경우 목질화(lignification)가 빨라 시들음병의 발생이 빈번한 생육 중반 이후 도관부의 수액 채취가 쉽지 않은 편이다. 또한, 어린 생육기에는 수액의 양이 많지 않아 부위 절단을 통한 즙액 상태의 진단이 필요하다. 이에 따라 무처리구, 병 발생 초기, 발생 중기, 발생 성기에 지체부위의 절단 및 도관부 위주를 절편을 만들어 진단을 시도하였다. 절단 시료: Extraction buffer의 기준은 1:5로 하여 즙액의 채취를 하였으며, 담체가 정체된 후(10분후) 상등액을 채취하여 시료로 사용하였다. 진단키트의 감도와 cut-off 기준과의 밴드 정확성, 그리고 우려되어지는 교차반응성을 확인하였고, 미생물을 분석하여 다른 병원균에 의한 잘못된 진단 위험성을 검증하였다.

즙액을 이용한 시료의 진단은 수액에 비해 교차반응성의 우려가 높아 더블형 진단 키트를 이용하여 식물체 표면 및 주변 환경으로부터 유입될 수 있는 미생물 상황에서 다양하게 진행하였다.

Table 28. 감염 식물체 착즙액 진단 시험

	<i>Fusarium oxysporum</i> 접종구	<i>Ralstonia solanacearum</i> 접종구
진단 키트		
감응도	우수	우수
교차반응성	없음	없음
cut-off(C)	$10^5$ cfu/ml (C)	$10^5$ cfu/ml
일치성 F.O	<	$1.8 \times 10^4$ cfu/ml
분석값		
식물체 표현형	정상 생육	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 하위엽 시들음</li> <li>▪ 성장점 일부 시들음</li> </ul>

시험 결과 멀티형의 진단키트에 착즙된 동일 시료의 진단에서 교차 반응성은 나타나지 않았으며, 우려되었던 타미생물 및 주변조건에 의한 간섭은 나타나지 않았다. *Fusarium oxysporum* 접종구에서는 F.O.진단 라인의 대조선(C)와 진단선(T) 모두에서 발현이 이루어졌으며, R.O 진단 라인에서는 대조선(C)에서만 발현이 이루어졌다. *Ralstonia solanacearum* 접종구에서도 마찬가지로의 결과를 나타내었다. 또한, 미생물 분석에 의한 Cut-off 라인과의 일치성에서도 1차년도에 설정한 값과 유사도를 나타내었다.

#### 나. 진단키트의 현장 실증 시험

현장 포장에서의 진단키트 시제품의 정확성 및 사용방법의 적합성을 확인하기 위하여 포장 시험을 진행하였다. 시험 포장은 3곳에서 이루어져 발생초기, 중기, 성기의 시기로 나뉘어 진단하였고, 임대 계약 당시 시들음병 의심 증상이 포장 일부에서 진행되었으며, 시험 진행 동안 일제의 살균제의 처리는 실행하지 않았다. 키트상의 발현 정도와 병원성 미생물의 수액내 밀도, 표현현상에 나타나는 발병 양상 등을 관찰하여 비교하였다. 또한, 병원균에 대한 현미경상의 특징 및 동정을 진행하여 진단의 정확성을 확인하였다.

##### 1) 곰팡이성 시들음병(*Fusarium wilt*)에 대한 현장 진단

충북 괴산군 불정면 소재 김수영씨 포장에서 진단을 확인 하였다. 시험 포장은 토경재배 시설로 포장 전경 및 발생 초기의 작물 증상은 아래와 같았다. 시험 포장은 매년 시들음병에 의한 피해가 높았던 포장으로 병원균의 동정에 의한 정확한 진단이 이루어지지 않은 상태였다.





Fig.47. 발생 초기 시험 포장 상황

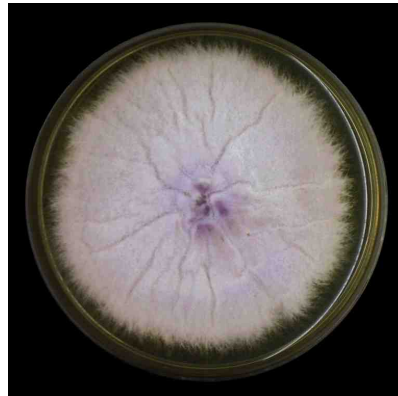
가) 현장균 분리에 의한 병원성 미생물 분리 및 동정

시험 포장에 부분적으로 발생되어지는 시들음증상 작물체의 지체부를 채취 절단하고 도관부위의 절편을 채취하여 PDA배지와 TTC배지에 절편을 올려 미생물을 확대 배양하였으며, 현미경 관찰과 배양상 미생물 특징을 확인하여 *Ralstonia*와 *Fusarium*의 가능성을 확인하였으며, 단일 균주를 분리하고 동정 의뢰를 통해 원인균을 확인하였다.

분리 결과 아래의 그림과 같이 *Fusarium*과 유사하게 PDA배지상 자색을 띄게 자랐으며, 곰팡이 포자의 형태가 초승달 모양의 *Fusarium*속 고유의 특징을 나타내어 단일균주로 분리 배양하여 최종적인 동정을 의뢰하였다.



도관 및 지체부 배양



분리 배양(PDA)



현미경상 관찰

Fig. 48. 현장균 분리에 의한 병원성 미생물 분리 및 동정

미생물 동정은 (주)마크로젠에 의뢰하여 진행하였으며, 시험 결과 *Fusarium oxysporum* 으로 판명되었다.

>Strain ABC-FO2019

```
AACCCCTGTGACATACCACTTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCGTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAG
AGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAACCTTTCAACAACGG
ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGA
ATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTCA
ACCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCCCAAATTGATTGGCGGTCACGTCGA
GCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCACTTCTG
AATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATA//
```

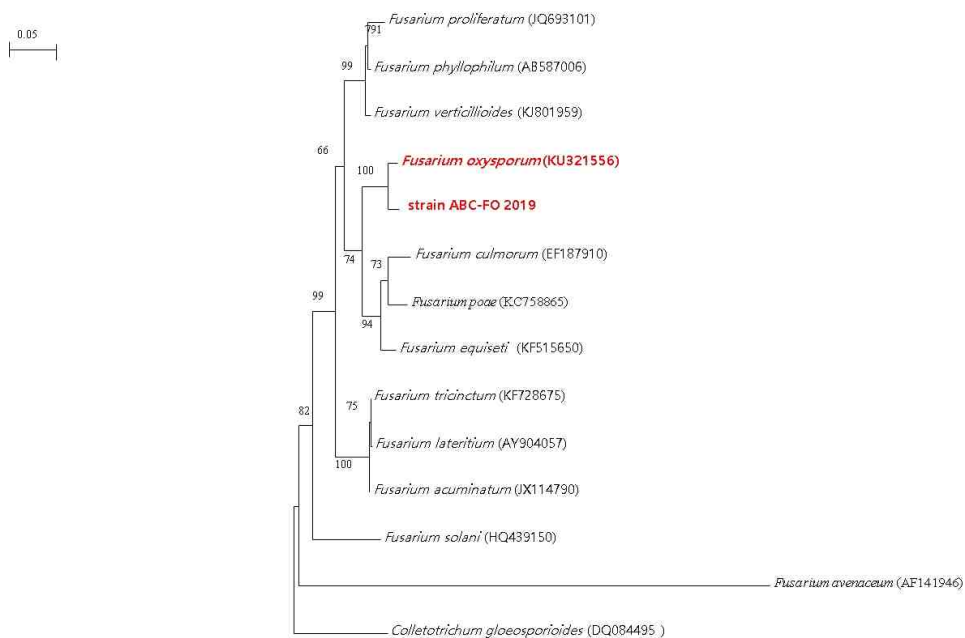
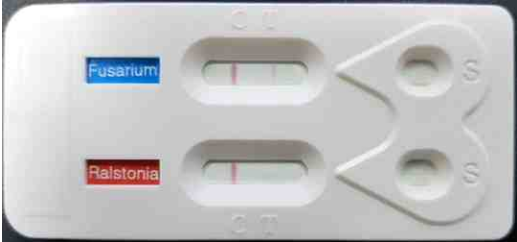
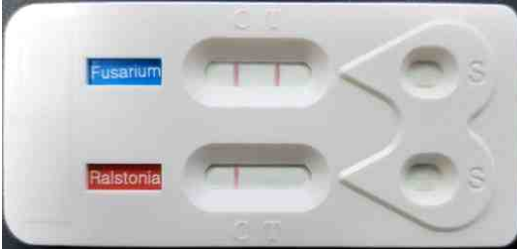
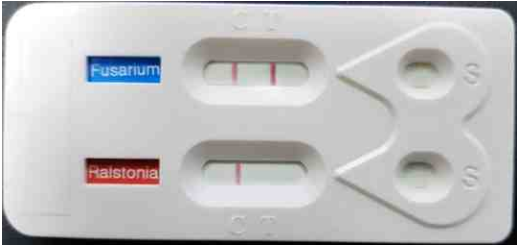


Fig. 49. 현장균의 미생물 동정 확인

동정의뢰에 의한 균주의 현장 진단을 위해 멀티형 진단키트와의 정확성을 확인하여 보았다. 진단은 정확성 확보를 위해 발병 상태별 20주 이상을 대상으로 수액진단을 진행하였으며, 결과는 아래와 같다. 시험 결과 발병 초기인 8월 21일에는 pot 시험과 마찬가지로 개발된 멀티형의 시들음병 간이 진단 키트는 Fusarium 진단 라인에서는 대조선(C)에 비해 진단선(T)는 낮은 농도 발현으로 표현형과의 동일한 결과(C>T)를 나타냈으며, Ralstonia 진단 라인에서는 대조선(C)만을 나타내어 교차반응 없이 정확한 진단을 나타내었다. 발병 초기의 시제품 멀티형 진단 test의 20주에 대한 평균 민감도는 85%를 나타내었다. 발생 중기(8/29)의 진단 결과에서는 대조선(C)와 진단선(T) 발현 정도가 C=T의 값을 나타내었으며, 기준 감염밀도와 일치하는 주수의 비율인 민감도는 90% 이상을 나타내었다. 발생성기(9/5)의 진단에서는 대조선(C)보다 진단선(T)의 발현 강도가 높아 대부분이 C<T값을 나타내었고, 진단 식물체의 평균 민감도는 90%를 나타내었다.

멀티형 진단 키트는 대부분의 식물 시료에서 기준 감염 수준에 맞는 발현 강도를 나타내었으며, 90% 이상의 높은 민감도를 나타내어 실제 포장에서도 반정량이 가능하였다.

Table 29. 농가 포장에서의 멀티형 간이 진단 키트 시제품의 정확성 확인(충북 괴산군)

발병 상태	현장 간이 진단	기준 감염 수준	<i>Fusarium oxysporum</i> (Log cfu/ml)	민감도 <sup>a</sup> (%)
발생 초기 (8/21)		Fusarium 저역가 10 <sup>4</sup> cfu/ml  (C>T)	3.8	90
발생 중기 (8/29)		Fusarium 중역가 10 <sup>5</sup> cfu/ml	5.4	90
발생 성기 (9/5)		Fusarium 고역가 10 <sup>6</sup> cfu/ml	6.2	100

민감도<sup>a</sup> = 기준감염밀도 일치 주수/전체 조사주수×100

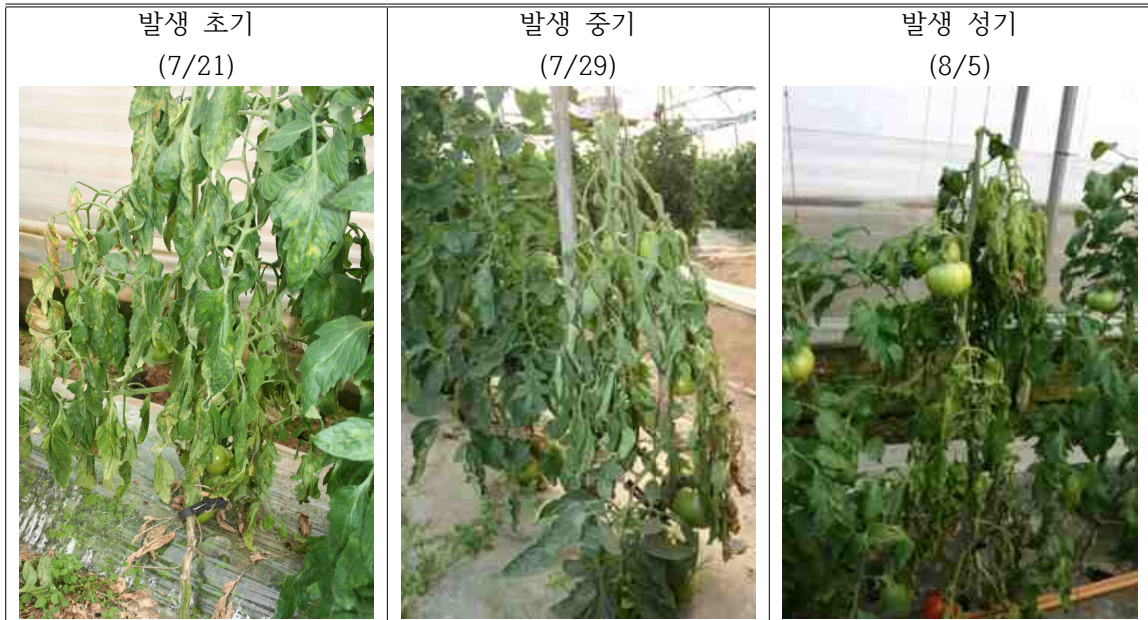


Fig. 50. 농가 포장의 곰팡이성 시들음병(Fusarium wilt)발병시기별 작물체 증상

## 2) 세균성 시들음병(Bacterial wilt)에 대한 현장 진단

*Ralstonia solanacearum*에 의한 세균성 시들음병에 대한 현장 진단은 경기도 화성시 소재 이만근씨 포장에서 진단 시험을 진행하였다. 시험 포장은 토마토 토경재배시설로 포장 전경 및 발생 초기의 작물 증상은 아래와 같았다. 시험 포장은 무농약 재배로 인해 매년 청고병 발생 빈도가 높았으나 약제 처리가 이루어지지 않아 지속적인 피해가 나타나는 포장이었다.



Fig. 51. 시험 포장 상황

가) 현장균 분리에 의한 병원성 미생물 분리 및 동정

시험 포장에 시들음증상 작물체의 지체부를 채취 절단하고 도관부위의 절편을 채취하여 멸균수에 Homogenizing하여 PDA배지와 TTC배지에 미생물을 배양하였으며, 현미경 관찰과 배양상 미생물 특징을 확인하여 *Ralstonia*와 *Fusarium*의 가능성을 확인하였으며, 단일 균주를 분리하고 동정 의뢰를 통해 원인균을 확인하였다.

분리 결과 아래의 그림과 같이 TTC(청고균 선택배지)에서 유백색의 점액질을 가지며 일부 분홍색을 띄는 *Ralstonia solanacearum* 고유의 특징을 나타내어 단일균주로 분리 배양하였고 최종적인 동정을 의뢰하였다.



분리 배양(PDA)

분리 배양(TTC)

현미경상 관찰

Fig. 52. 현장균 *Ralstonia solanacearum*의 분리 확인

미생물 동정은 (주)마크로젠에 의뢰하여 진행하였으며, 동정 시험 결과 *Ralstonia solanacearum* 으로 확인되었다.

>Strain ABC-FO2019

```
CCGCCTCCTCCCTCCTCTCCTCGCGCCGCCACCCACCCACGCGCGCCTCGCTCCCCGCGCCACC
CCCCCTCCCCCCCCCTGTGATCCCCCCCCCCCCCGCGCCGATACCCCCCCCCTTTACCCCACT
TCCCCCTCTTATATATATTTTTTTTTTCCGTGCGATTAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAG
TCGAACGGCAGCGGGGGTAGCTTGCTACCTGCCGGCGAGTGCGGAACGGGTGAGTAATACATC
GGAACGTGCCCTGTAGTGGGGGATAACTAGTCGAAAGACTAGCTAATACCGCATAACGACCTGAG
GGTGAAAGTGGGGGACCGCAAGGCCTCATGCTATAGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCTAGTTG
GTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACT
GGGACTGAGACACGGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGACAATGGGG
GCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTGTC
CGGAAAGAAATCGCACTGGTTAATACCTGGTGTGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGGACCGG
CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTCCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCG
TAAAGCGTGCAGGCGGTTGTGCAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAATTG
CATTGGTGACTGCACGGCTAGAGTGTGTCAGAGGGAGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAAT
GCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCTCCTGGGATAACACTGACGCTCAT
GCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTC
AACTAGTTGTTGGGGATTCAATTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTGACCGCTGGAGACT
CCAATTTT//
```

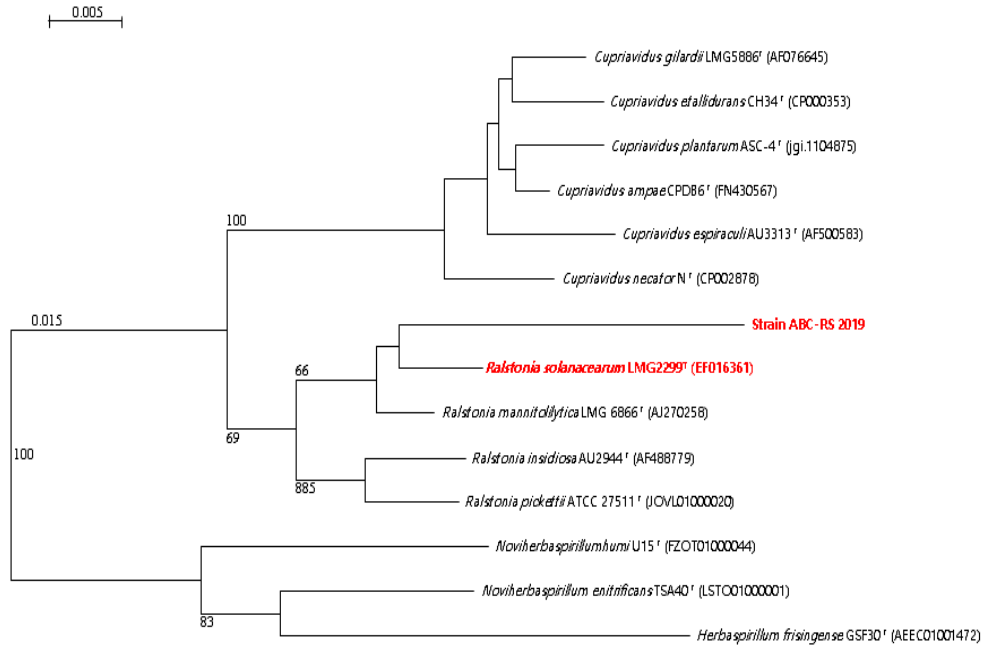


Fig. 53. 현장균의 미생물 동정 확인




*Ralstonia solanacearum*에 의한 감염이 확인되어 멀티형 진단키트와의 정확성을 확인하여 보았다. 진단 및 관찰은 발병초기인 7월 22일 시작하여 주기적인 관찰을 통해 발생 양상을 확인하였으며, 식물체 시료는 20주 이상을 대상으로 수액 진단을 진행하였다.

시험 결과 *Ralstonia* 진단 라인에서는 대조선(C)와 진단선(T) 모두에서 발현을 나타내었고, *Fusarium* 진단 라인에서는 대조선(C)만 발현되어 현장에서 두 병원성균에 대한 감염여부의 판단이 정확할 것으로 판단되었다.

발병 초기(7월 22일) 진단 결과 멀티형의 시들음병 간이 진단 키트는 *Ralstonia* 진단 라인에서는 대조선(C)에 비해 진단선(T)가 낮은 발현 강도를 나타내어 평균 병원균의 밀도 값(Log cfu/ml)인 4.8과 일치하는 경향을 나타내어 민감도가 92%로 높았다. 발생 중기의 진단 결과에서는 대조선(C)와 진단선(T) 발현 강도가 유사하게 나타났으며, 기준 감염 밀도와 일치하는 주수의 비율인 민감도는 90% 이상을 나타내었다. 발생성기의 진단에서는 대조선(C)보다 진단선(T)의 발현 강도가 높아 C<T값을 나타내었고, 진단 식물체의 평균 민감도는 100%에 이르렀다.

멀티형 진단 키트는 대부분의 식물 시료에서 기준 감염 수준에 맞는 발현 강도를 나타내었으며, 92% 이상의 높은 민감도를 나타내었다. 교차 반응성 또한 나타나지 않아 간이 진단 장비로써의 활용성이 높을 것으로 판단되었다.

Table 30. 농가 포장에서의 멀티형 간이 진단 키트 시제품의 정확성 확인(경기 화성시)

발병 상태	현장 간이 진단	기준 감염 수준	<i>Ralstonia solanacearum</i> (Log cfu/ml)	민감도 <sup>a</sup> (%)
발생 초기 (7/22)		Ralstonia 저역가 $\leq 10^5$ cfu/ml (C>T)	4.8	92 (22/25)
발생 중기 (7/29)		Ralstonia 중역가 $10^6$ cfu/ml (C=T)	6.2	90 (20/22)
발생 성기 (8/6)		Ralstonia 고역가 $10^7$ cfu/ml (C<T)	7.2	95 (22/23)

민감도<sup>a</sup> = 기준감염밀도 일치 주수/전체 조사주수×100

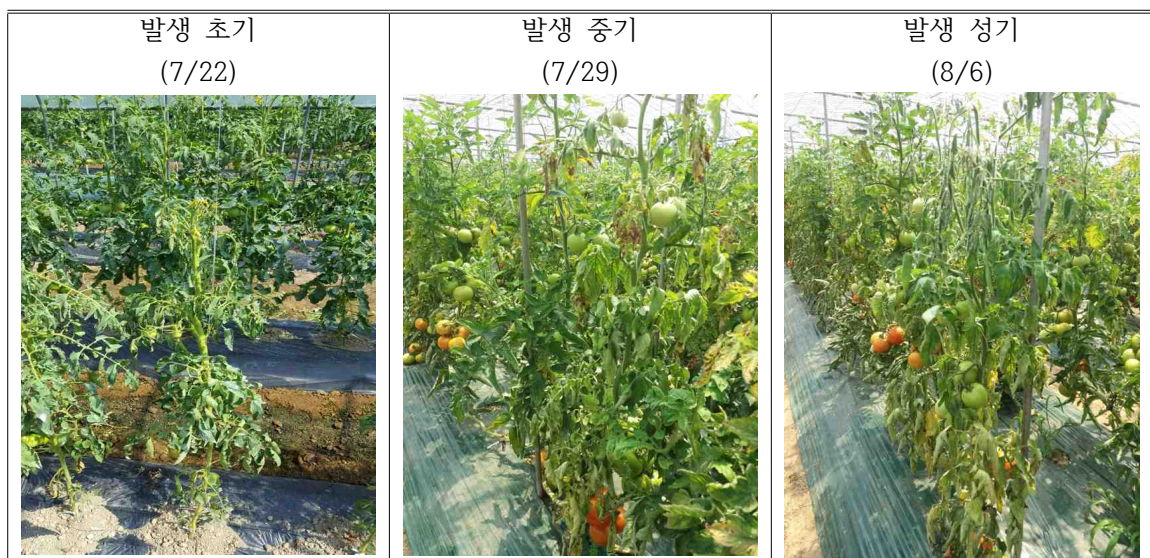


Fig. 54. 농가 포장의 곰팡이성 시들음병(Fusarium wilt) 발병시기별 작물체 증상

### 3) 현장에서의 간이 진단 키트 활용

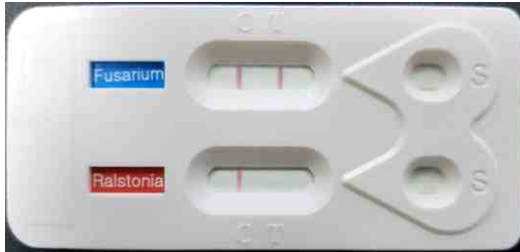

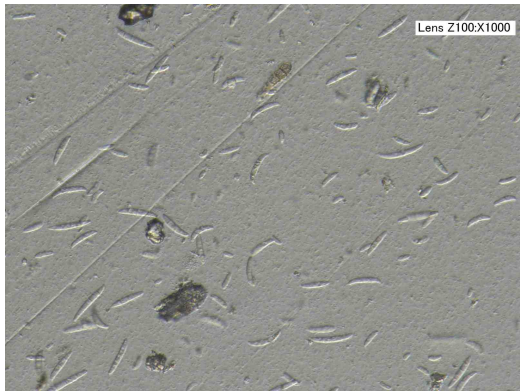

시들음병에 감수성을 갖는 다양한 작물에 대해 진단 키트 시제품의 Test를 진행하였다. 시들음병에 감수성을 갖는 작물로는 고추, 오이 등이 있으며, 위의 작물에 대해서는 시설 및 노지를 가리지 않고 다발생하는 경향을 나타낸다. 뿐만아니라, 본 과제를 통해 확인하고자 하는 곰팡이성 시들음병(Fusarium wilt)와 세균성 시들음증상(Bacterial wilt) 위의 작물에서는 모두 발현 되는 양상을 보인다.

고추에 대한 시들음병 증상은 충북 괴산군 불정면에 소재한 시설과 노지 포장 2곳에서 진단 Test를 진행하였으며, 오이는 충남 병천의 발생 농가에서 진행하였다.

#### 가) 고추에 대한 진단 결과

시들음성 병징이 발현된 고추의 진단 시험을 위한 미생물의 확인은 토마토와 동일한 방법으로 PDA배지와 TTC배지를 활용하였고, 균주 각각의 배양 특성 및 균체 특성으로 확인하였다. 다만, 고추의 경우 토마토에 비해 목질화가 빨라 수액으로의 시험보다는 Homogenizing(1:5)을 통한 즙액을 활용하여 검체로 적용하였다.

Table 31. 고추 시들음병 발생 부위의 시제품 활용 현장 진단 결과

시료 채취	시설 고추	노지 고추
시제품		
분리균 특성 분석		

고추 시설 재배에서는 시들음병 의심 검체시료 모두에서 Fusarium 라인에서만 진단선(T)에서의 발현이 나타났으며, Ralstonia 라인에서의 반응성은 나타나지 않았다. 노지 고추에 대한 진단 Test 결과에서는 반대로 Ralstonia 라인에서만 발현 밴드가 형성되었으며, Ralstonia 저역가( $\leq 10^5$  cfu/ml) 값을 나타냈다.



#### 4) 상용화를 위한 마케팅 전략 수립

##### 가) 상용화 형태

##### ① 제품 디자인 및 구성품 구성



##### <제품 구성>

- Test device
- Diluent (buffer)
- Disposable dropper
- Insert manual



Fig. 55.진단 키트 set의 구성 및 포장지 디자인

## ② 제품 영문 설명서



### Principles

#### Fusarium Oxysporum Test Kit

The SensPERT Fusarium Oxysporum test kit is designed to detect Fusarium Oxysporum that causes fungal wilt in plant. Fusarium Oxysporum titer is measured by solid phase immunochromatographic assay for the rapid and semi-quantitative detection fungi in plant extract. Two monoclonal antibodies in the kit specifically bind with different epitopes of the antigens. After being absorbed into the cellulose pad, the antigens of Fusarium Oxysporum move and bind with gold-colloid complex of monoclonal anti-Fusarium Oxysporum of the conjugate pad, forming Ab-Ag complex. This complex, then, forms Ab-Ag-Ab direct sandwich binding with the antibody of another monoclonal anti-Fusarium Oxysporum in the nitrocellulose membrane. The test results can appear on Control and Test lines where the principles of immunochromatography are applied.

#### Ralstonia Solanacearum Test Kit

The SensPERT Ralstonia Solanacearum test kit is designed to detect Ralstonia Solanacearum that causes bacterial wilt in plant. Ralstonia Solanacearum titer is measured by solid phase immunochromatographic assay for the rapid and semi-quantitative detection bacteria in plant extract. The Ralstonia Solanacearum Test Device has a letter of "T" and "C" as test line and control line on the surface of the card. Both the test line and control line in result window are not visible before applying any samples. The control line is used for procedural control. Control line should be always appear if the test procedure is performed properly and the test reagents of control line are working. A purple test line will be visible in the result window if there are enough Ralstonia Solanacearum antigen in the specimen. The specially selected antibodies are used in test band as both capture and detector materials. These enable the device to identify Ralstonia Solanacearum antigen in plate extract with a high degree of accuracy.

### Characteristics

- 1) One-step rapid test of Fusarium Oxysporum and Ralstonia Solanacearum
- 2) Rapid test results between 10 minutes
- 3) Expensive equipment not required
- 4) Easy storage and maintenance
- 5) High-purity and high-quality materials of the test kit increases its sensitivity and Specificity

### Materials (5 tests/kit)

- 1) Test ..... 5 units
- 2) Diluent (Extraction buffer ) ..... 5 ml x 5 units
- 3) Disposable dropper ..... 5 units

### Composition

Specimen well (S: for dropping), Test line (T), and Control line (C) are marked on the device. Inside of it, the strip is composed of sample pad, conjugate pad, nitrocellulose membrane (test paper) and absorbent pad.

### Effect

Detection of Fusarium Oxysporum and Ralstonia Solanacearum from wilt disease plant extract

### Uses

#### 1) Specimen

Plant tissue extract

#### 2) Test procedure

- a) Collect Plant tissue sample into a sample bottle containing 5ml of buffer
  - b) Shaking Bottle for 30 seconds to 1 minutes
  - c) Drop 4 drops (100 µl) into the specimen well (S).
  - d) Read the test results 10 minutes.
- ◆ Invalid result after 10 minutes

#### 3) Interpretation of the results

A purple band should appear on the control line regardless of the test result. The presence of another band on the test line determines the result

Control Line (C): The line should always appear regardless of the presence of the antigens of Fusarium Oxysporum or Ralstonia Solanacearum. If this line does not appear, the test should be considered invalid. This is might be because of impure buffer or the lack of specimen. It should be tested again with another kit.

Test Line (T): The presence of Fusarium Oxysporum and /or Ralstonia Solanacearum determines the test line.

### 1) Fusarium Oxysporum and Ralstonia Solanacearum Interpretation

Interpretation	Line Intensity	(C vs T)	Fusarium Titer	Ralstonia Titer
Low		C >>> T	≤ 10 <sup>3</sup> cfu/ml	≤ 10 <sup>4</sup> cfu/ml
Low (Early stage)		C > T	≤ 10 <sup>4</sup> cfu/ml	≤ 10 <sup>5</sup> cfu/ml
Middle (Middle stage)		C = T	10 <sup>5</sup> cfu/ml	10 <sup>6</sup> cfu/ml
High (Late stage)		C <<< T	≥ 10 <sup>6</sup> cfu/ml	≥ 10 <sup>7</sup> cfu/ml

### 2) Retesting

- (a) Both Test and Control lines do not appear.



- (b) Test line only appears.



### 4) Further examinations

This test is for primary screening only. Consult veterinarians for further necessary examinations to obtain clinical test results.

### Precautions

- 1) Use for feline *in-vitro* diagnostic purposes only.
- 2) Use within 10 minutes after opening the pouch because the test kit is very sensitive to moisture and its effect may diminish.
- 3) Be careful of not touching the result window.
- 4) Every specimen should be used with different droppers.
- 5) For testing, the buffer included should be used.
- 6) Do not use specimen being contaminated with microbes, which may cause false positive or false negative result.
- 7) Deal with specimen carefully. They can deliver unknown virus or infectious bacteria.
- 8) Use disposable gloves when you suspect the infection cause by specimen. And wash your hands later.
- 9) Dispose solid wastes after sterilizing them at 121 °C for over 1 hour.
- 10) Do not use the kit when its pouch is torn, sealing is not good in shape or expiration date is passed.

### Storage method

The test kits stored at 2~30 °C can be used for 24 months after manufacturing. Do not keep them in a refrigerator. However, if they are stored under cold circumstances, keep them at room temperature for 15 ~ 30 minutes before use.

### Exchange

The test kits are manufactured under strict quality control system. Nevertheless, if they are deteriorated during delivery, ask our distributors for exchange.

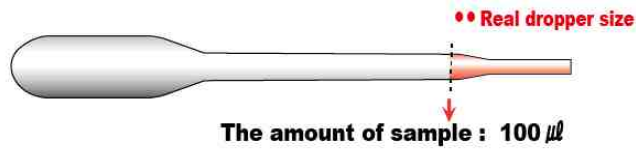
### Liability

The entire risk due to the performance of this product is assumed by the purchaser. The manufacturer shall not be liable for indirect, special or consequential damages of any kind resulting from use of this product.

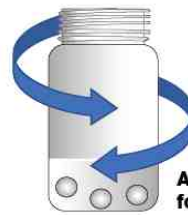
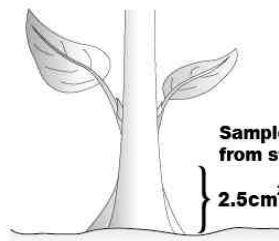
Date issued: Jan 14, 2019  
AG01-01E-01



# Instruction for Fusarium / Ralstonia test



## 1 Sampling

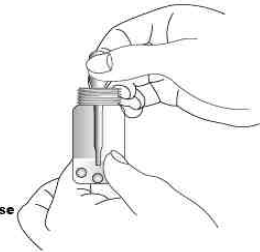


Add sample and shake for 30 seconds to 1 minutes

## 2 Use the Supernatant layer

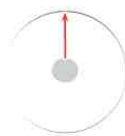


Wait until large particles sink to the bottom



## 3 Loading

00 : 00 : 00



4 drops (100ul) of the diluted sample  
\*\* Do not overload the sample



## 4 Reading

00 : 10 : 00



+



Read the result 10 min

-



## 5 Discard

00 : 10 : 00



Discard the used device  
In valid result after 10 min



## 나) 수요처 및 판매 전략

적용 소비자는 시들음병 피해가 높은 대상 작물의 재배농가, 농업단체, 농업전문기관, 농업컨설턴트, 해외바이어를 대상으로 판매를 진행하고자 한다. 전략적으로 『누구나, 손쉽게, 현장에서 정확한 진단 대처』 최대의 장점을 가지고 있다. 가격에서는 손쉬운 접근이 가능한 가격책을 선정하여 추가적 구매를 유도하는 한편, 상황에 맞는 구성품의 변화로 접근성을 높일 예정이다. 시제품의 소비자는 농민, 컨설턴트, 농업기관을 주요 고객으로 하여 대량생산화를 통한 가격 경쟁력 확보할 예정이다. 또한, 기존 농약/비료 국내 판매망과 단지별 컨설팅을 통한 일반 판매를 진행할 예정이며, 시범 사업, 교육/강의를 통해 농업기관의 농업교육 교보재 등의 판매를 진행하고자 한다. 추가적으로 개발 제품의 지속적인 판매 확대를 위해 공동 연구를 통한 객관적 자료 확보와 적용 작물의 확대를 위한 지속적인 연구를 진행할 예정이다.

수출 분야는 기존의 거래처를 통해 단일 상품화 뿐만아니라 국내 농자재(농약, 비료 등)의 판매를 위한 확대 판매 수단으로써도 적용할 예정이다.

Table 32. 시장 진입 전략(4P)

	특성	접근 전략
Product	<ul style="list-style-type: none"> <li>복합형의 다클론 간이진단 키트</li> <li>멀티형의 반정량 원리</li> <li>3분이내의 정확한 현장 진단</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>『누구나, 손쉽게, 현장에서, 정확한 진단』</li> <li>특이성/희소성 강조</li> </ul>
Price	<ul style="list-style-type: none"> <li>20,000~25,000원/set</li> <li>5set/box</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>접근성 있는 가격으로 추가 구매 유도</li> <li>구성품의 유동적 변화로 가격 다변화</li> </ul>
Place	<ul style="list-style-type: none"> <li>시들음병 감수성 작물 대상 (토마토/파프리카/오이/고추)</li> <li>선도농가/작목반</li> <li>시군 155개 기술센터</li> <li>농자재 대리점(농협/농약사)</li> <li>수출</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>단지별 농업컨설팅 직영 판매</li> <li>교육/강의 및 시범사업</li> <li>시범사업/보조사업/농업교보재</li> <li>기존 비료 판매망</li> <li>기존 수출국 Buyer 컨설턴트 판매 수단</li> </ul>
Promotion	<ul style="list-style-type: none"> <li>농업기관 추가적인 공동연구</li> <li>산학연 공동 국책 과제 확대</li> <li>나라장터 등록</li> <li>전시회/박람회 참관</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>지역별/특화작목별 적용 확대</li> <li>객관적 자료 확보</li> <li>정책건의(스마트농업, 예찰, 빅데이터)</li> <li>수출 분야 확대</li> </ul>

## 다) 사업화를 위한 비즈니스 모델

### ① BM 수립 배경

- 미래 신규 사업분야로 정확한 마케팅 전략 구축에 따른 성공 유무의 폭이 크다.
- 개발/성장 단계의 분야로 기초 단계 구축의 성공의 관건
- 선도적인 국내 기업 부재로 비즈니스의 개척 요구

### ② BM 목표 및 핵심경쟁요인

- 블루오션 분야로 탄탄한 판매망 구축을 통해 시장 개척의 선도적 역할 담당
- 농업분야의 신규 아이টে으로 기업 성장의 확대 분야로 중점적 역할 담당
- 정확성, 편리성, 신속성의 3박자 구축
- 미래형 농업형태인 IOT(사물인터넷)를 근간으로한 스마트 농업의 적용 가능성
- 초기 단계로 기술적 우위 점유 필요(계속적인 업그레이드 요구)

### ③ 목표 시장 구조

- 경쟁기업 현황 : 국내 Virus진단과 분자진단 기업과의 경쟁력 확보하고 편리성, 신속성 및 저비용의 장점 부각, 국외로는 POKET DIAGNOSTIC사, AC Diagnostics사와 복합형 및 정량적인 측정 범위의 차별성 강조
- 경쟁구조 : 국내에서는 Virus 진단분야 이외의 식물병해 진단분야에서의 접근 하고 선도적 기업으로써 국가기관과의 연계 시범 사업 추진으로 공인된 자료 확보 및 접근성 확대한다. 이에 공공기관의 예찰 프로그램, 스마트팜과의 연결 방향 모색한다. 해외에서는 단일 클론 간이 진단키트의 한계점 극복(복합, 간이 정량 측정)하고, 신규 시장의 판매 접근성 확보를 위한 가격 경쟁력 확보로 조기 시장 점유를 노린다.

### ④ 시장진입 장벽

- 국내 : 국가의 보호적 판매 적용으로 농가에 필요에 의한 구매의 영향으로 가격 결정 및 판매망 구축의 어려울 수 있으며, 자연스러운 구매도에 의한 판매의 장해 요인이 될 수 있음. 등록 형태의 기준이 모호로 관리 및 판매에 혼선 야기 우려가 있음.
- 해외 : 손쉬운 등록 장벽으로 인한 진입 이후 유사 품목의 저가공세 등의 우려가 있으므로 개발 제품의 차별성 강조 및 지속적인 업그레이드 진행으로 판매망의 우선적 점유가 필요할 것으로 판단됨

### ⑤ 수익 확보 전략

- 주요 고객군

국내의 주요 고객을 우선적 접근을 위한 재배농가, 농자재 판매상, 국가기관, 농업컨설턴트

등으로 판매를 다양화하고 신규 분야의 홍보와 판매를 동시에 진행하여 보다 많은 접근성을 확보하는 노력을 가질 예정이다. 국외의 주요 고객은 현재 (주)에이비씨가 각종 농자재를 판매하고 있는 기업형 컨설턴트와 대규모 재배농장을 대상으로 접근하며, 기타 농자재(비료, 바이오 농약)의 판매와 연결 판매 수단으로써도 접근할 예정이다. 또한, 베트올(주)의 동물진단 해외 국가농업기관 및 기업을 통해서도 접근성을 확대할 예정이다

- BM의 수익창출 방안

상기의 분석을 토대로 국내 시장의 고객군의 다양한 접근을 통한 접근성 확보로 우선적 시장의 형성 및 확대를 꾀할 예정이며, 국외 시장은 초기 기존 농자재 유통망을 토대로의 접근과 향후 대량화에 의한 가격경쟁력 확보, 기능적 차별성의 지속적인 개발을 통해 수익창출을 진행해 나갈 예정이다.

## 관인생략

## 출원번호통지서

출원일자 2019.01.03  
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)  
 출원번호 10-2019-0000926 (접수번호 1-1-2019-0008940-38)  
 출원인명칭 베트올(주)(1-2007-009199-2) 외 1명  
 대리인성명 김영식(9-2007-000845-7)  
 발명자성명 김지현 양미영 김정미 박인서 이재준  
 발명의명칭 반정량 수평류 면역진단 기술을 이용한 칼스토니아 솔라나세아룸과 푸사리움 옥시스포룸의 동시 진단 방법과 여기에 사용되는 키트

## 특 허 청 장

&lt;&lt; 안내 &gt;&gt;

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
 ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 만원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허-실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
 ※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드  
 ※ 우선권 인정기간 : 특허-실용신안은 12개월, 상표-디자인은 6개월 이내  
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
 ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

# 제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

## 1. 연구개발의 목표 및 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도	진단 키트의 상용화 및 효율적인 사용방법 개발	세균 및 곰팡이 균주 도입 및 배양	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 국내 등록균주KACC 분양 / 배양</li> <li>○ 현장균의 분리/동정                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Ralstonia solanacearum</i> 현장균주 동정</li> <li>- <i>Fusarium oxysporum</i> 현장균주 분리 동정</li> </ul> </li> </ul>
		병원균에 대한 Cut-Off 레벨 설정	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 식물체 발현 농도 구명 시험(pot 시험)</li> </ul>
		간접 확인을 위한 토양/ 기주 식물체의 미생물 동정	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기주 작물 수액 및 토양내 미생물의 분리 및 밀도 분석                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 발생지 토양내 미생물의 분리</li> <li>- 수액내 미생물의 분리</li> </ul> </li> </ul>
	토양 시들음병의 정확한 감별을 위한 세균/곰팡 이 감별 현장검사용 신 속진단키트 개발	세균 ( <i>Ralstonia solanacearum</i> ) 및 곰팡이 ( <i>Fusarium oxysporum</i> ) 원료 확보	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 배양 및 대량 증식</li> <li>○ 불활화 항원 준비</li> </ul>
		세균( <i>Ralstonia solanacearum</i> ) 원료 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 세균 다클론 항체 개발을 위한 면역 진행</li> <li>○ 마우스 단클론 항체 개발을 위한 면역진행</li> <li>○ 세균 면역에 의한 항체 역가 측정</li> <li>○ 항체 개발을 위한 세포융합 (Hybridoma)</li> <li>○ 항체형성 Clone 선별</li> <li>○ Clone Isotyping</li> </ul>
		곰팡이 ( <i>Fusarium oxysporum</i> ) 원료 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 곰팡이 다클론 항체 개발을 위한 면역진행</li> <li>○ 곰팡이 마우스 단클론 항체 개발을 위한 면역 진행</li> <li>○ 곰팡이 면역에 의한 항체 역가 측정</li> </ul>



구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도	진단 키트의 상용화 및 효율적인 사용방법 개발	현장 상황에 맞는 진단 키트의 적용방법 개발	100	○ 토양 회석에 대한 시제품 진단 ○ 식물 수액 침지에 따른 진단 ○ 식물체 즙액 농도별 시제품 진단
		진단키트의 현장 실증 시험	100	○ 토마토, 고추, 오이 ○ 2곳 이상
		상용화를 위한 마케팅전략수립	100	○ 상용화를 위한 마케팅 전략 수립 (BM 수립)
	토양 시들음병의 정확한 감별을 위한 세균/곰팡이 감별 현장검사용 신 속진단키트 개발	항체 고정화 조건 및 pair 조건 확립	100	○ 유효항체의 용도를 결정하기 위해 각 항체를 멤브레인에 분주하여 그 성능을 검증. ○ 검증 결과에 따라 캡처와 콘쥬게이 트 항체의 용도를 결정하고 분주농 도를 결정.
		항체 골드 콘쥬게이션(gold conjugation) 조건의 확립	100	○ 포획항체의 함량 결정 ○ 금-나노입자 규격 및 콘쥬게이션 조건의 최적화 ○ 금-나노입자 코팅 패드 및 검체흡 수 패드의 처리 조건의 최적화 ○ 검체 회석액의 이온농도 및 단백질 농도의 최적화
		샘플패드 최적화, 검체회석액 최적화, 및 멤브레인 최적화	100	○ 샘플패드 최적화, 검체회석액 최적 화, 및 멤브레인 최적화
		진단키트 진단플랫폼에 맞는 조건 확립 및 임상시험을 통한 prototype 개발	100	○ 진단키트 진단플랫폼에 맞는 조건 확립 및 임상시험을 통한 prototype 개발
		토양 시들음병 세균/곰팡이 감 별 진단 키트 대량생산 시스템 구축	100	○ 3lot 생산을 통한 lot간 균질성 분석 및 공정 개선
		진단키트의 실험실내 효능시험 및 야외적용 시험	100	○ 감염식물의 시료를 확보하여 키트 의 민감도 및 특이도 평가 ○ 시제품을 제작하여 야외 검체를 대 상으로 적용 시험 실시

## 2. 관련분야에서의 기여도

농업쪽 활용이 기대되어지는 현장진단(POCT) 및 분자진단 등의 시장성은 진단분야에서도 독보적인 증가 추이를 보이고 있으며, 이중 현장진단의 경우 년 16.7%의 고도성장세를 유지하고 있다. 위는 비용 및 규제 문제를 해결할 수 있는 분야로 각광을 받고 있으며, 저비용을 장점으로 개발도상국에서의 수요도가 급속히 증가세를 보이는 분야이다. 비록 농업 분야는 아직 미흡한 개발을 이루고 있으나, 본 과제로 개발된 시들음병 간이진단키트처럼 비전문인력의 자가진단 가능, 소형화/IT 융합가능 등의 장점을 갖고 있어 향후 시장성의 확대가 클 것으로 판단된다. 뿐만아니라 저비용, 광범위성, 신속성의 겸비로 빅데이터 산출에 의한 예찰 및 예측 가능 소재의 기술로 미래형 스마트팜 시장의 소재로 생체진단 센서링 소재로 그 역할이 클 것으로 기대하고 있다.

### 가. 기술적 측면

기존 식물바이러스 검정 이외의 식물 세균 및 곰팡이병의 lateral flow immuno chromatography 기술 방법의 가능성을 크게 확대하는 계기가 될 것으로 기대되며, 특히 그 동안 분자진단에 의해서만 가능하던 곰팡이병에 신속한 진단 기술 확보의 선도적 자료가 될 것으로 기대된다. 또한, 시들음병의 항체 개발을 통해 각종 병원성 세균과 곰팡이의 항체개발의 확대 개발 가능성을 확보할 수 있는 계기가 될 수 있다.

간이 항체 정량화를 통한 다클론 형태의 개발로 간이진단키트의 대략적 정량화 가능으로 손쉽고 편리하게 병발생의 정도를 판단할 수 있어 병 발생 초기의 빠른 진단을 통한 예방 및 조기 대응이 가능할 것으로 기대된다. 추가적으로 시들음병의 항체 개발을 통해 다양한 식물곰팡이병의 항체개발의 선행 연구로써 활용될 것이며, 향후 개발의 참고 자료로써 활용도가 높을 것으로 기대된다.

### 나. 시장 경제성 및 산업적 측면

수입에 의존하던 간이진단 키트 시장의 수입 대체 효과로 20억원/년 이상의 수입 대체 효과를 나타낼 것으로 기대되며(Virus 진단키트 기준), 원예작물의 재배농가의 20% 이상의 농가에서 피해가 발생하는 시들음병의 조기 진단에 의한 예방과 농자재 비용의 절감을 통해 2000만원(1ha당) 이상의 소득증대 효과를 기대하고 있다.

또한, 작물 재배 분야 뿐만아니라, 수입/수출 작물의 진단 분야와 산림 분야의 적용 등 다양한 산업의 적용확대가 기대되며, 기후 변화로 인해 야기되어지고 있는 각종 예찰 및 정보 수집 분야에서도 폭넓게 활용되어질 것으로 기대되어 진다

상기 개발된 시들음병 간이진단 키트의 경우 수출 농자재 업체의 해외 수출 확대 품목으로 적용 될 수 있으며, 위의 판매를 통해 정확한 재배 컨설팅으로 기타 농자재의 수출 확대의 보조 수단으로써 수출확대의 기여도가 높을 것으로 기대된다.

#### 다. 사회적 측면

미래 농업으로 주목 받고 있는 스마트농업의 주요 소재로써 활용되어짐으로써 IOT와 함께 미래 농업 환경의 바꾸는 주요 수단으로써 작용할 것으로 기대된다.

스마트 농업의 생체진단 소재로 농업 환경의 과학화를 주도하며, 농업 생산성의 예측과 병해의 예찰 등 국가 농업기관의 농업 정책 추진에 주요한 역할을 담당할 것으로 기대하고 있다.

# 제 4 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

## 1. 연구성과

### 가. 연구성과 목표 및 달성도

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인 증	학술성과			교육 지 도	인 력 양 성	정책 활용·홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)	
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 중 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문		논 문 평 균 IF			학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
												SCI	비 SCI							
단 위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	USD	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	10					50			10		20						10			
최종목표	1					1			1		1						1			
실적	1					1	500	4500	10		0						3			
달성율(%)	100					100			1000								300			

### 나. 지식재산권

「반정량 수평류 면역진단 기술을 이용한 랄스토니아 솔라니세아룸과 푸사리움 옥시시포룸의 동시 진단 방법과 여기에 사용되는 키트」 1개의 발명특허를 출원하였습니다.

구 분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기 타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
발명특허	반정량 수평류 면역진단 기술을 이용한 랄스토니아 솔라니세아룸과 푸사리움 옥시시포룸의 동시 진단 방법과 여기에 사용되는 키트	대한민국	베트올(주) (주)에이비씨클	2019. 01. 03	10-2019-0000926				

## 다. 사업화

기술사업화								
번호	제품(상품)명	제품(상품)설명	활용 업체명	사업화 여부	매출 발생여부	제품 매출액 (천원)	고용 창출	R&D 기여율
1	토양시들음병 간이진단키트 ( <i>Fusarium oxysporum</i> & <i>Ralstonia solanacearum</i> Test Kit)	시들음병 반정량 키트	베트올(주) (주)에이비 씨씨클	사업화*	有	5,000 (수출 계약: 4,500\$)	10	100%

\* **사업화 관련:** 최초 사업구상 계획에서 베트올(주)는 제품개발 및 사업화, 농자재 전문업체 인 (주)에이비씨씨클에서는 토양 시들음병 세균/곰팡이 감별 진단 키트의 현장 적용법 개발 및 효과 시험을 하기로 하였으나, 추후 연구 연구 개발 과정 중 협의하여 베트올(주)는 제품개발 및 제품화, (주)에이비씨씨클에서는 컨설팅 및 판매를 하여 사업화 하기로 하였다.

## 라. 홍보/전시

### 1) 전시회 등 참여

전시회 등 참여(전시회, 박람회, 제품설명회 등)					
번호	유형	행사명	전시품목	장소	활용년도
1	전시회	Oil Palm Production Through New Technology Application & Mechanizan Approaches 2018	진단키트(시제품) 및 친환경방제제	Sibu, sarawak, Malaysia	2018
2	전시회	AGRI Malaysia 2018	진단키트(시제품) 및 친환경방제제	Setia City, Malaysia	2018
3	박람회	INTERNATIONAL AGRICULTURE FAIR	<i>Fusarium oxysporum</i> & <i>Ralstonia solanacearum</i> Test Kit 외	Ptak Warsaw Expo, Poland	2019 (2018년 11월에서 연기됨)

## 2. 연구결과의 활용 계획

### 가. 기술개발 성과물의 활용 방안

본 연구개발의 성과물인 시들음병 간이 진단키트는 베트올(주)에서 직접 제조하여, 1차적으로 국내 판매는 시들음병 발생 피해가 많은 원예작물(토마토, 파프리카, 고추, 멜론, 수박 등)을 대상으로 지역별 주산지의 작목반 및 농업연구기관의 예찰, 농업컨설팅을 위한 신규 농업자재로의 판매를 유도할 예정이며, 관련 기관과의 객관적 자료 확보를 위한 시범 사업 연계로 판매 확대를 기획하고 있습니다. 국내 경쟁업체는 기산바이오(주), 퓨어시스,

진매트릭스, 바이오코아(주), 상록바이오랩 등이 있으나 Virus 진단키트에 특화되어 있고 수입 판매 진행에 따른 가격 경쟁력의 우위를 강점으로 부각하고 세균과 곰팡이병 진단의 특색을 강조하여 신규 시장의 점유를 강화할 예정입니다. 또한, 반정량의 특징으로 경쟁업체와 차별화할 방안입니다.

수출에서는 (주)에이비씨씨클의 기존 거래처 및 현지 합작법인을 활용하여 시범화 사업과 판매를 진행할 예정이며, 높은 가격으로 현장 실용화에 뒤처지고 있는 기존 POKET DIAGNOSTIC사, AC Diagnostics사와의 가격적인 우위와 단일 클론 간이 진단키트의 한계를 극복(현, 복합형/간이 정량 측정)하여 개발도상국에서의 우선적 점유를 진행할 예정입니다. 뿐만아니라, (주)에이비씨씨클의 농자재를 판매하고 있는 기업형 컨설턴트와 대규모 재배농장을 대상으로 기타 농자재(비료, 바이오농약, 화학농약)와의 연결 판매 수단으로써의 마케팅을 유도하여 접근성의 확대를 진행할 예정입니다. 추가적으로 해외 현지 작물의 적합성 확보와 업그레이드를 통해 확보된 자료를 토대로 베트올(주)의 해외 농업기관 및 거래처로의 확대 판매를 유도할 예정입니다.

## 참고문헌

- 여운수, 예완해, 배신철, 이신우, 미생물과 식물과의 분자생물학적 상호반응 연구  
이중섭, 2002, 신기술을 이용한 채소·화훼 병해 진단 및 방제 연구  
최국선, 2011. 나노 바이오 기술 융합 식물병원균 신속 다량진단 키트개발  
고농연, 이영규, 2010, 감자바이러스 현장진단 키트 개발 및 보급  
강효중, 2015, 시설수박 시들음병 발생생태 및 정밀 진단 기술 연구  
조점덕, 한경숙, 박동석, 나노 바이오 기술 융합 식물병미생물 신속다량 진단 키트개발

주 의

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