

116071
-03

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()
수출전략기술개발사업 제3차 연도 최종보고서

화상병균
유전체
정보를
활용한
바이오마
커 발굴
및 신속
진단법
개발

발간등록번호
11-1543000-002649-01

화상병균 유전체 정보를 활용한 바이오 마커 발굴 및 신속 진단법 개발 최종보고서

2019 . 03. 22.

최
종
보
고
서

주관연구기관 / 지노타입(주)
협동연구기관 / 연세대학교 산학협력단
협동연구기관 / 농림축산검역본부

2018

농
림
식
품
기
술
기
획
평
가
원

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

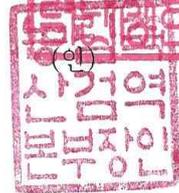
본 보고서를 “화상병균 유전체 정보를 활용한 바이오마커 발굴 및 신속 진단법 개발”
(개발기간 : 2016. 09. 05 - 2018. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 02 .

주관연구기관명 : 지노타입(주) (대표자)

협동연구기관명 : 연세대학교 산학협력단 (대표자)

참 여 기 관 명 : 농림축산검역본부 (대표자)



주관연구책임자 : 남 문

협동연구책임자 : 송주연

참여기관책임자 : 이금희

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

보고서 요약서

과제고유번호	116071-03	해 당 단 계 연구 기 간	2016. 09. 05- 2018. 12. 31 (28개월)	단 계 구 분	1/1
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	수출전략기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	화상병균 유전체 정보를 활용한 바이오마커 발굴 및 신속 진단법 개발			
연구책임자	남문	해당단계 참여연구원 수	총: 16 명 내부: 11 명 외부: 5 명	해당단계 연구개발비	정부: 300,000천원 민간: 39,000천원 계: 339,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 21 명 내부: 13 명 외부: 8 명	총 연구개 발비	정부: 700,000천원 민간: 93,000천원 계: 793,000천원
연구기관명 및 소속부서명	연세대학교 산학협력단 농림축산검역본부 식물검역기술개발센터			참여기업명 지노타입 주식회사	
국제공동연구	상대국명: -			상대국 연구기관명: -	
위탁연구	연구기관명: -			연구책임자: -	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

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

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품중	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약	보고서 면수
<p>– 2016년부터 2018년까지 국내에 발생한 과수화상병의 시료들로부터 균주들을 분리하고, 그 중 화상병균(<i>Erwinia amylovora</i>) 20ro 균주의 유전체 해독 및 분석을 실시하여 완전 유전체(complete genome) 정보를 생산, 확보하였음. 또한 각 기주별, 지역별 분리주의 유전적 특성을 보기 위해 32개 분리주를 대상으로 whole genome shotgun sequencing 및 mapping 기반의 유전체 비교 분석을 완료하였음.</p> <p>– 화상병균의 진단 kit 개발을 위해 기존에 개발된 방법들과 비교 분석을 진행하였으며, 유전체 분석을 통한 probe design, 종특이적 조사, 민감도 조사, 시약 test, 장비 적용 시험 등 다양한 실험을 통해 최적의 진단 kit를 개발하였음. 또한, 기존 방법 대비 뛰어난 민감도를 보여 병징이 보이지 않는 시료에서도 직접 진단이 가능하도록 진단 효율을 높였으며, 화상병균과 유사균인 가지검은마름병(<i>Erwinia pyrifoliae</i>)과의 정확한 구분 능력과 진단의 신뢰도를 향상시켰음.</p> <p>– 유전체 분석을 통해 제작한 화상병균 진단 kit를 대상으로 현장 적용 시험을 위해 2016년부터 2018년까지 화상병균이 발병한 대부분의 포장을 직접 방문하여 주변 시료들을 수집하였고, 이렇게 수집된 시료를 대상으로 새롭게 개발된 진단 kit와 기존에 보고된 conventional PCR 방법을 대상으로 비교 분석을 실시하였음.</p>	169

<요약문>

<p style="text-align: center;">연구의 목적 및 내용</p>	<p>과수에서 발생하고 있는 화상병(fire blight) 진단 및 예찰이 신속하고 정확하게 이루어 질 수 있도록 화상병균 유전체 정보를 활용하여 진단용 바이오마커 발굴 및 생체 진단법을 개발하고 최적화하여 화상병 예찰 및 역학조사용 진단키트를 개발함.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 국내 발병 화상병균 균주 확보 및 gDNA 분리 <ul style="list-style-type: none"> - 화상병균 발생 과원 현장 조사 및 예찰을 통한 시료 채집 - 화상병 균주 분리, 배양을 통한 gDNA 추출 ○ 화상병균 유전체 해독 및 비교 분석을 통한 바이오마커 후보 유전자 발굴 <ul style="list-style-type: none"> - 화상병균의 유전체 서열을 해독 및 유전자 주석화 수행 - 화상병균의 유전체를 비교하여 유전자 구성 및 서열상의 차이를 분석 - 화상병 균주들의 계통유전체학적 분석을 통한 유연관계 파악 - 균주 특이적 유전자 및 염기서열 분석을 통한 바이오마커 후보 유전자 발굴 - 바이오마커 후보 안정성 확인 ○ 과수 화상병균 검출을 위한 민감도 높은 High-throughput 진단 시스템 구축 <ul style="list-style-type: none"> - 화상병균 배양과정을 거치지 않고 식물체에서 직접 화상병균 감염유무를 감별할 수 있도록 nested PCR 기법과 PCR error free PNA probe 기술을 접목하여 정밀 진단 가능한 기법 개발 - 정밀 진단을 위해 real-time PCR 기반 TaqMan 혹은 PNA probe 디자인 - 다양한 진단 방법의 비교 분석을 통한 최적의 진단 시스템 선정 - 화상병균 진단 후 PNA melting curve를 이용한 진단 결과 시스템 구축 - 정밀 진단을 위한 다중 분석 조건 확립 - 바이오마커 진단 kit의 최적화를 통한 시제품 개발 ○ 과수 화상병균 검출용 바이오마커의 현장 적용 시험 및 문제점 개선 <ul style="list-style-type: none"> - 감염된 시료에서 검출능, 민감도 등 조사 - false positive의 진단 여부 검증 - 현장 적용에 최적화된 분석 기법 검증
<p style="text-align: center;">연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 논문게재 및 학술발표 <ul style="list-style-type: none"> - 유전체 정보를 기반으로 하는 정확한 바이오마커 개발을 통해 감염시료에서의 직접적인 종 동정 뿐 아니라 병원성, 기주, strain 등의 진단 가능한 화상병균 진단 시스템 구축으로 국외 학술지 3편 게재 및 학술발표 4편 등 예정 ○ 특허 출원 및 등록 <ul style="list-style-type: none"> - 과수 화상병균 진단을 위해 Real-time PCR과 PNA 프로브를 활용한 바이오마커 개발 ○ 과수 화상병균 진단 바이오마커 kit의 제품화 <ul style="list-style-type: none"> - 유전체 정보와 PNA 진단 기술을 활용한 과수 화상병균 진단 바이오마커의 제품화를 통해 안정적이고 표준화된 진단 시약 제공

	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내 발생 화상병 균주 확보 및 유전체 해독을 통한 유전체 정보 확보 ○ 유전체 기반의 바이오마커 후보 유전자 발굴 ○ 화상병균 바이오마커 검증 및 진단 시스템 개발 ○ 정책활용 <ul style="list-style-type: none"> - 과수화상병 발생지역 역학조사 현장 적용으로 정책 활용 - 과수 수출단지 검역·예찰관리를 위한 예찰조사 정책현장 활용 계획 				
<p style="text-align: center;">연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기술적 측면 <ul style="list-style-type: none"> - 비교 유전체 정보 분석 기반 진단 마커 개발 기술은 유사한 농산물 혹은 경제 동물의 감염성 세균 검출 개발에 활용 가능 ○ 경제적·산업적 측면 <ul style="list-style-type: none"> - 분자 수준의 정확한 화상병 방역현장 기준 제공으로 과수 농가의 경제적 피해를 최소화하고 과수 수출 정상화에 기여 ○ 사회적 측면 <ul style="list-style-type: none"> - 민감하고 신속한 진단 기술 개발로 식물 감염병에 대한 정부 검역·방역 수준에 대한 국내외 신뢰도 상승에 기여 				
<p style="text-align: center;">국문핵심어 (5개 이내)</p>	화상병	유전체	바이오마커	PNA 프로브	진단키트
<p style="text-align: center;">영문핵심어 (5개 이내)</p>	Fire blight	Genome	Biomarker	PNA probe	Diagnostic Kit

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	7
2. 연구수행 내용 및 결과	11
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	163
4. 연구결과의 활용 계획 등	167
붙임. 참고 문헌	168

<별첨 1> 연구개발보고서 초록

<별첨 2> 주관연구기관의 자체평가의견서

<별첨 3> 연구성과 활용계획서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

○ 사과, 배 화상병 및 화상병 원인 세균

- 사과 및 배 등 과수에서 발생하는 화상병(fire blight)은 대표적인 세균성 식물 검역병 중의 하나로, 병 발생국에 대해서는 관련 과수 및 농산물의 수출입이 제한됨. 발병 과수 농가의 경우, 기주 식물 제거 및 인근 발생지역의 범위 매몰, 과수원 폐원 등 농가에 경제적 손실을 야기함으로써 국가적으로 농업 및 경제에 파급효과를 야기 시킬 수 있는 식물 병해임.
- 사과, 배는 국내 생산 주요 농작물이며 과실류 가운데 주요 수출 품목에 속함. 국내 생산되는 사과는 대만, 홍콩 등이 주요 수출 국가이며 수출 금액은 5,430천불, 배의 경우에는 미국, 대만 등을 비롯하여, 홍콩, 베트남, 인도네시아, 캐나다 등으로 수출되어 수출 금액이 62,159천불에 달함(2014년도 기준, 농수산물수출지원정보 통계(www.kati.net)). 그러나 2015년 이후 국내 사과, 배 화상병 발병 보고 이후, 일본에서 수입금지 품목으로 지정되는 등 추후 수출 및 과실 생산량 감소 등으로 이어질 수 있으므로 주요 감시 식물 병원균임.
- 장미과(Rosaceae) 식물 가운데 사과, 배 등 Spiraeoideae(조팝나무아과)에 속하는 과수와 라즈베리 및 블랙베리 등의 *Rubus* 속에 속하는 작물들이 화상병 원인균의 기주 작물로 알려져 있으며, 곤충 매개 또는 농기구 접촉, 묘목 이동 등에 의해 전파되어 화상병이 발병될 수 있음.
- 화상병 원인균에 감염은 주로 개화시기인 것으로 알려져 있으며, 감염된 작물은 꽃, 줄기, 잎 등이 시들고 갈색으로 변하여 불에 탄 것과 같은 증상을 보이면서 나무 전체를 고사시키게 됨. 전염력이 매우 빠르고 강한 것으로 알려져 있으며, 이를 방제하기 위해 streptomycin 항생제를 처리하여 원인균을 억제하는 방법 및 생물학적 방제 방법 등이 있으나 항생제 내성균 발생, 과실 상품성 저하 등의 문제점 등이 보고됨(Miller & Schroth, 1972; Gildemacher et al., 2006).

○ 전 세계적 화상병 발병 분포

- 화상병의 원인 병원균은 *Erwinia amylovora*라고 하는 세균으로서 미국에서 1780년경 처음 발견된 이래, 1957년 영국, 1971년 독일 등 유럽에 전파, 북미, 중동 등에서 추가적으로 발병, 보고되어 옴.
- 최근 일본과 한국에서 화상병과 유사한 가지검은마름병(원인균: *Erwinia pyrifoliae*)이 발견되었으나, 화상병은 현재까지 동북아시아 등 주변 국가에서 발견된 보고는 없었으며, 2015년 국내 배, 사과 과수원에서 화상병 발병 보고 및 원인균 *E. amylovora*가 분리되어 확인되었고(그림 1), 이후 안성, 천안, 제천, 원주, 평창, 충주 등의 과수 농가에서 지속적으로 발생이 확인됨.



그림 2. 2015년 국내 화상병 발생 (농업축산신문 2015.8.4. 보도)

○ 화상병균 유전체 연구

- CRISPR(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) 또는 VNTR(Variable number tandem repeat) 등을 이용하여 화상병균을 비롯하여 병원성 세균의 역학조사에 이용되어옴(Rezzonico et al., 2011; McGhee et al., 2012; Buhmann et al., 2014). 이러한 바이오마커 발굴을 위해 유전체 정보가 주요 기반 자료를 제공할 수 있으며, 미국, 유럽 등지에서 분리된 화상병균의 유전체 연구가 이러한 마커들을 연구, 개발하는데 일조하여 옴.
- 화상병균 유전체 연구는 대표적으로 1970년대 프랑스에서 분리된 유럽균주 *E. amylovora* CFBP 1430 균주와 ATCC 49946(=Ea273) 균주의 유전체 해독으로부터 시작됨(Smits et al., 2010; Sebahia et al., 2010). 두 균주의 whole genome shotgun sequencing 결과, 3.8Mb의 유전체 염기서열이 해독됨. 염색체 외에 두 균주 모두 pEA29 플라스미드(plasmid)를 포함하고 있으며, ATCC 49946은 pEA72 플라스미드를 추가로 가지고 있는 것으로 나타남. CFBP 1430의 유전체 해독 이후, ATCC 49946의 유전체는 염기서열 비교를 통해 99.99%의 유사도를 갖는 것으로 나타났으며, *E. pyrifoliae*, *E. tasmaniensis* 등 다른 *Erwinia* 속 병원균과의 유전체 비교를 통해 화상병균 고유의 유전체학적 특징이 밝혀지게 되고, 병원성과 관련된 유전자 연구의 기본 정보들을 제공함.
- 차세대 염기서열 분석 기술(NGS)의 발달에 따라 CFBP 1430 및 ATCC 49946, 두 대표 균주 외에 여러 화상병 균주들이 추가로 해독됨. 미국이나 유럽 지역 외에 멕시코, 모로코에서 분리된 화상병 균주들이 해독되어 항생제 저항성 획득과 관련한 유전자 분석, 유전체 서열 내 단일염기다형성(SNP) 등의 변이 양상, 진화적 상관관계 등이 분석되어 보고되었음(Smits et al., 2014; Hannou et al., 2013).
- Spiraeoideae(조팝나무아과)의 기주에서 분리된 화상병균 외에 *Rubus* 속에서 분리된 화상병 균주들이 NGS를 통해 다수 해독되어, 기주작물의 종류에 따라 화상병균 유전체 서열 해독 및 비교 분석이 진행됨(Mann et al., 2013). 화상병균 사이에 평균적으로 89%의 보존된 코어 유전자들이 나타났으며, 비교 결과 작물 종류에 따라 화상병균의 유전체가 진화적으로 상관관계가 있음이 관찰됨. 판-유전체(pan-genome) 분석을 통해 기주에 따른 유전적 다양성이 분석됨에 따라 화상병균의 기주 특이적 유전자 연구를 위한 기본 정보들의 확보, 제공이 가능하게 되었음(그림 2).

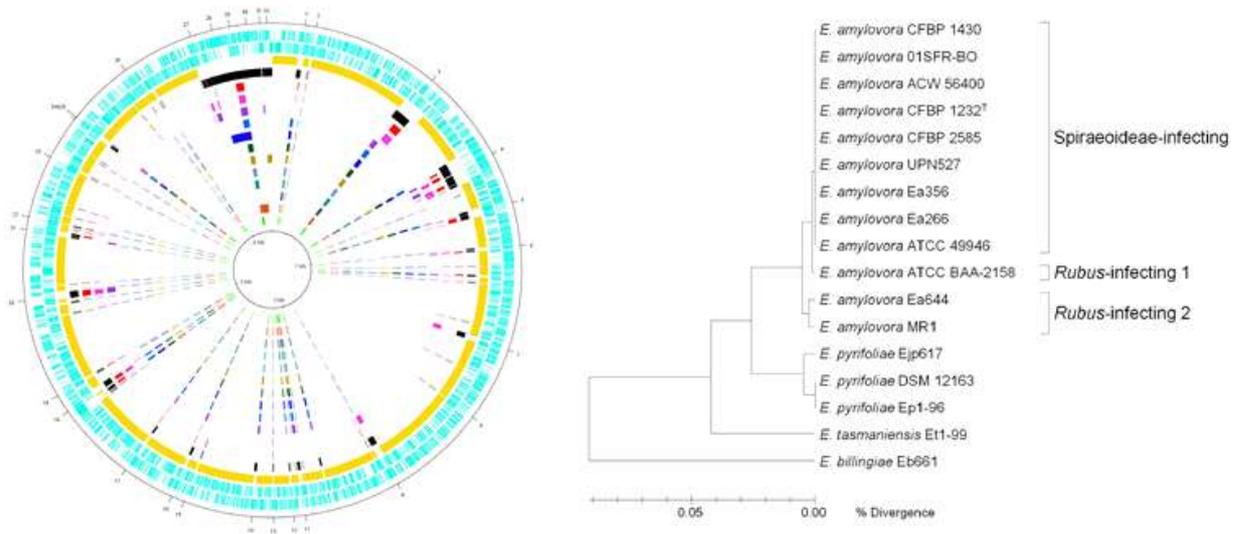


그림 3. 화상병균 판-유전체 분석을 통한 기주 종류에 따른 유전적 다양성 및 진화적 상관관계(Mann et al., 2013)

○ 화상병균 유전체 정보를 기반으로 한 바이오마커 발굴

- 본 연구에서는 사과, 배 등 주요 과수에 발생하는 화상병 원인 세균의 유전체 정보를 이용한 바이오마커를 개발하여 화상병 원인균 발생 진단 및 검출을 통해 신속한 방제 및 농산물 수출입 검역 진단용으로 활용하고자 함(그림 3).
- 현재 화상병증이 관찰되는 과수나무에서 병원균을 배양하여 실험함으로써 예찰의 기능보다는 확인 위주의 기술이 개발되고 있어 화상병 탐지 감도가 높은 진단법을 개발하여 외관상 탐지가 어려운 발생초기에 탐지하여 효율적인 방역에 도움을 주고자 함.
- 개발된 실험법에 대하여 제품안정성 및 최적화 과정을 거쳐 제품화함으로써 보다 많은 기관에서 정확하게 진단할 수 있도록 보급하고자 함.

화상병 신속 방제 및 농산물 수출입 검역 진단

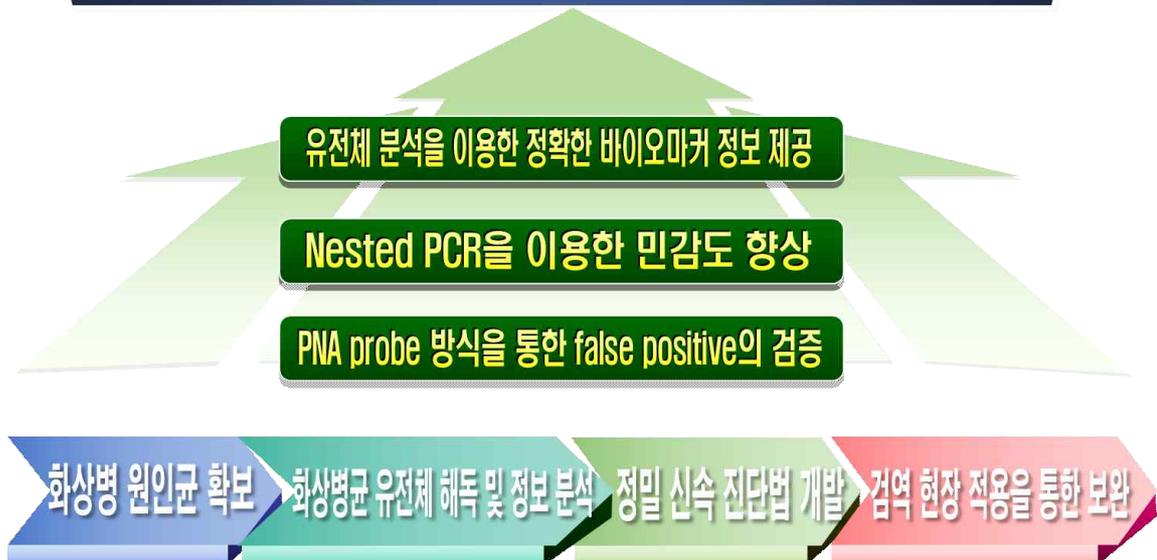


그림 3. 연구개발 주요 내용

1-2. 연구개발의 필요성

- 유전체 서열 기반의 바이오마커 발굴은 이미 널리 알려진 몇몇 유전자를 이용하는 것보다 병원균의 유전체 전체를 포괄적으로 분석하여 최적의 바이오마커 유전자를 탐색하는 것으로 보다 정확하고 효율적인 바이오마커 발굴에 기여할 수 있음.
- 화상병균 분리 연차 및 장소 등에 따른 균주들의 유전체 비교를 통해 시간 흐름과 환경 특징에 따라 화상병균의 유전체 또는 특정 유전자가 어떻게 달라지는지 분석함으로써 앞으로 일어날 화상병균의 유전체 변화 방향에 대해 예측하고 그로부터 발생할 수 있는 일에 대한 대비책을 마련할 수 있음.
- 국내 분리 화상병균과 국외 화상병균의 유전체 비교를 통해 국내 분리 화상병균 특이적인 바이오마커 및 진단 기술을 개발함으로써 국내 생산 농산물의 화상병균 조기 진단과 확산 방지에 크게 기여할 수 있음.
- 화상병균의 조기 신속 진단은 식물 병원균의 확산뿐만 아니라 병 발생을 미연에 방지할 수 있음. 이는 농업 안정성을 증가시킬 뿐만 아니라 식물 병 발생을 미리 예방함으로써 화상병균의 신속 진단은 농업 생산량 증대와 직접적으로 연관되어있다고 할 수 있음.
- 기존 화상병균을 분리 배양 후 진단하는 방식에서 벗어나 감염시료에서 직접적으로 진단이 가능하도록 진단의 민감도를 높이고, 진단 결과의 false positive를 검증 가능한 시스템을 갖추으로써 화상병균의 초기 확산 방지에 기여하여 농가의 수출 피해를 최소화 할 수 있음.

1-3. 연구개발 범위

- 주관기관: 지노타입(주)
 - 화상병균 바이오마커 검증 및 신속 진단법 개발
 - 감염시료에서의 직접적인 진단 시스템 구축
 - 과수에 발생하는 화상병균의 직접적인 진단을 위한 최적의 진단 방법 모색
 - Real-time PCR을 기반으로 하는 화상병균의 High-throughput 진단 시스템 개발 및 바이오마커 개발
 - 화상병균 High-throughput 정밀 진단 kit의 최적화를 통한 제품화
- 제 1협동: 연세대학교
 - 화상병균 유전체 해독 및 바이오마커 후보 유전자 발굴
 - 화상병균 시료 수집 및 발생실태 구명 (농림축산검역본부 협조)
 - 2016년 발병 화상병균 유전체 해독 및 전년도 발병 화상병균과 비교
 - 2017년 발병 화상병균 유전체 해독 및 바이오마커 후보 유전자 발굴
 - 2018년 발병 화상병균 유전체 해독 및 마커 후보 유전자 안정성 확인
- 제 2협동: 농림축산검역본부
 - 국내 발병 화상병균 균주 확보 및 gDNA 분리
 - 국내 화상병균의 발생 피해 조사 및 진단 시스템의 역학조사 정책 현장 검증 실시

2. 연구수행 내용 및 결과

가. 연구내용

(1) 연구개발 추진전략 및 방법

○ 화상병균 수집 및 유전체 서열 해독

- 농림축산검역본부(제 2협동)는 국내외에서 발병되고 있는 화상병 균주를 수집, 분리, 동정 담당
- 연세대학교(대학; 제 1협동)는 화상균주들의 분리 시기 및 분리 과수에 따른 유전체 차이를 분석하기 위해 분리 균주들의 유전체 서열을 해독 및 유전자 주석화(gene annotation) 담당
- 화상균주들의 분리 시기 및 분리 과수에 따른 유전체 차이를 분석하기 위해 분리 균주들의 유전체 서열 해독
- PacBio 시퀀싱을 이용하여 화상병균의 유전체 서열을 해독한 후 *de novo* assembly를 통해 유전체 서열 결정
- 결정된 유전체 서열로부터 CRITICA와 Glimmer 프로그램을 이용하여 유전자 예측
- 예측된 유전자는 GenBank, COG, KEGG, Uniref, Pfam 등 다양한 데이터베이스를 이용하여 주석화 작업 수행

○ 화상병균의 유전체 비교 분석

- OrthoMCL 프로그램을 이용해 화상병균들 내에서의 core genome 정의
- 화상병균의 core genome을 이용해 phylogenomic tree를 작성 후 균주들 간의 계통분류학적 관계 확인
- 균주들간 유전체 서열 차이 분석을 통해 각 균주들의 분화 시기와 장소에 따른 유전체 특징 분석
- 국내 화상병균들의 분화가 균주들의 분리 시기 및 장소와 어떤 연관성이 있는지 분석

○ 화상병균 탐지를 위한 바이오마커 유전자 발굴

- 화상병 유발균주의 정확하고 신속한 탐지를 위해 국내에서 분리된 화상병균과 국외에서 분리된 화상병균들의 유전체 비교 분석 수행
- 유전체 비교 분석을 통해 다른 식물 병원균에는 존재하지 않지만 화상병균 특이적으로 존재하는 유전자 발굴
- 또한 국내에서 분리된 화상병균에만 특이적으로 존재하는 유전자 발굴함. 혹은 국내에서 분리된 화상병균 특이적인 유전체 서열 부위 발굴
- 지노타입(주관기관)은 감염시료로부터 화상병균을 특이적으로 탐지할 수 있는 PCR 기술 확립

○ 과수 화상병균 검출을 위한 바이오마커 진단 kit 제품화

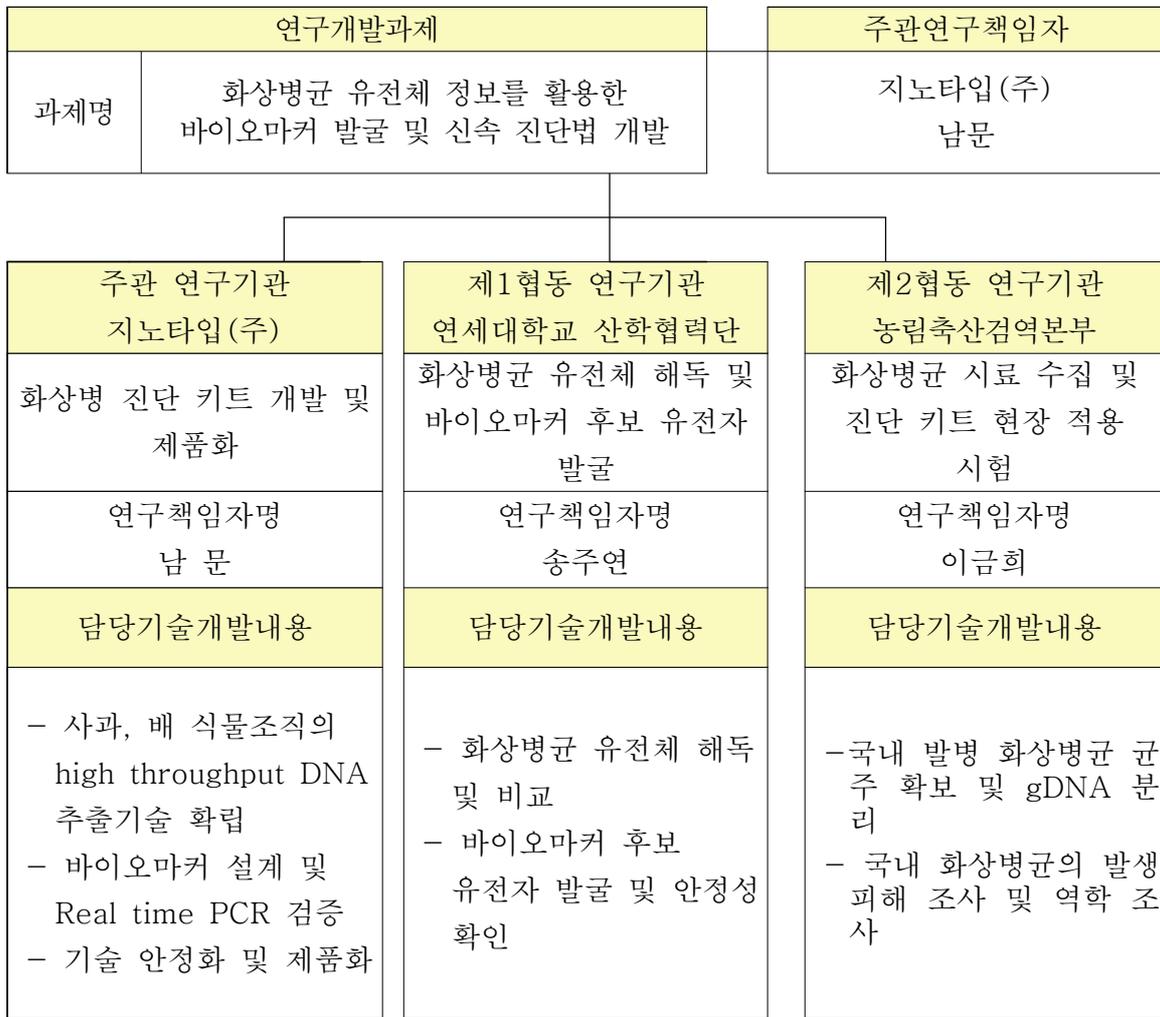
- 정밀 진단을 위해 Real-time PCR을 기반으로 하는 Taqman 혹은 PNA probe 디자인
- 다양한 진단 방법의 비교 분석을 통한 최적의 진단 시스템 선정
- 화상병균 진단 후 PNA melting curve를 이용한 진단 결과 검증 시스템 구축

- 감염 시료의 생체 내에서 화상병 직접 진단 가능 여부 조사
- 정밀 진단을 위한 다중 분석 조건 확립
- 바이오마커 진단 kit의 최적화를 통한 시제품 개발
- (주)메이즈앤어쏘시에츠와 같은 마케팅 전문기업의 자문을 통해 제품설계 및 시장조사를 실시하여 상업화를 기획
- 시선바이오머티리얼스는 PNA 활용에 대한 원천기술 개발 경험을 가지고 있어 본 연구 개발 어려움 발생 시 협력 요청 예정

○ 과수 화상병균 검출용 바이오마커의 현장 적용 실험 및 문제점 개선

- 감염된 시료에서의 검출능, 민감도 등 조사
- false positive의 진단 여부 검증
- 현장 적용에 최적화된 분석 기법 검증
- 농림축산검역본부에서 역학조사용으로 수집되는 다양한 감염의심 시료에 대하여 검출능, 민감도 등 조사
- 지노타입 홈페이지 홍보, 병리학회, 원예학회, 육종학회 등 관련 학회 보고 및 홍보

(2) 연구개발 추진체계



(3) 연구개발 추진일정

1차년도															
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	화상병균 시료 수집 및 발생실태 조사													10,000	송주연 (연세대학교)
2	2016년 발병 화상병균의 유전체 해독													25,000	송주연 (연세대학교)
3	2015년 및 2016년 발병 화상병균 유전체 비교 분석													20,000	송주연 (연세대학교)
4	화상병균 진단 마커 검정													30,000	남문 (지노타입)
5	개놈 수준에서의 화상병 탐지 바이오마커 개발													30,000	남문 (지노타입)
2차년도															
1	2017년 발병 화상병균의 유전체 해독													50,000	송주연 (연세대학교)
2	2015년, 2016년 및 2017년 발병 화상병균 유전체 비교 분석													45,000	송주연 (연세대학교)
3	화상병균 특이 바이오마커 유전자 후보 발굴													40,000	송주연 (연세대학교)
4	Real-time PCR 기반 화상병균의 high-throughput 시스템 구축													50,000	남문 (지노타입)
5	Taqman 및 PNA probe 진단 시스템 검증													50,000	남문 (지노타입)
6	과수 화상병균과 유사종들간의 특이성 및 민감도 조사													27,000	남문 (지노타입)
7	감염시료에서의 직접 진단 가능 여부 조사													27,000	남문 (지노타입)
8	화상병균 시료 수집 및 생물학적 특성 조사													50,000	이금희 (농림축산검역본부)
3차년도															
1	2018년 발병 화상병균의 유전체 해독													50,000	송주연 (연세대학교)
2	2015년, 2016년, 2017년 및 2018년 발병 화상병균 유전체 비교 분석													45,000	송주연 (연세대학교)
3	2018년 발병 화상병균 유전체를 이용하여 발굴한 바이오마커 유전자의 검증 및 안전성 확인													40,000	송주연 (연세대학교)
4	바이오마커를 이용한 과수 화상병균의 병원성, 기주, strain 등의 평가 실시													50,000	남문 (지노타입)
5	과수 화상병균의 정밀 진단 kit 최적화 및 시제품 검증													40,000	남문 (지노타입)
6	화상병균 정밀진단 kit를 활용한 시제품 개발													64,000	남문 (지노타입)
7	화상병균 정밀진단 kit의 현장 적용 조사													50,000	이금희 (농림축산검역본부)

나. 연구결과

(1) 과수화상병 발생실태 조사, 시료 수집 및 화상병균 분리

- 국내 과수화상병 발생 과원 및 인접 과원에서 화상병균 감염이 확인된 나무, 의심되는 나무, 증상이 없는 나무, 주변 기주식물, 곤충 등에서 화상병균 감염 의심 시료들을 수집하고, 균주 배양을 통해 화상병균 균주 순수 분리를 수행하여 균주들을 수집하였음. 2017년 화상병 발생과원 및 인접과원 등 16개 지점에서 시료를 수집하였고, 2018년에는 45개 포장에서 시료를 수집하였음. 또한 분리된 균주 또는 샘플로부터 genomic DNA를 추출하여 주관기관 및 협동기관에 2016년 화상병균 gDNA 시료 정보, 2017, 2018년도에 수집한 시료 및 균주들에 관한 기본 정보를 함께 제공하여 화상병균 진단 바이오마커 개발 실험 및 유전체 분석 등에 사용하였음. (시료 수집 및 균주 분리는 화상병균 진단 마커 개발을 위한 시료 조사와 현장 적용 조사 등에 동시에 수행되어 발생실태, 시료 수집 및 분리 정보 내용은 아래 해당 내용과 함께 비교 기재하였음.

(2) 과수화상병균 유전체 분석 균주 선정 및 유전체 해독·분석

(가) 과수화상병균의 비교유전체 분석을 위한 완전 유전체 정보 분석

- 과수화상병 발생실태 및 화상병균 메타정보 파악을 통한 유전체 해독 균주 선정
 - 농림축산검역본부의 협조 및 협동연구를 통한 화상병균 전국 주요 발생 분포 실태 및 화상병균 분리 균주 메타정보 자료 파악
- 국내에서 발생한 과수화상병의 원인 *Erwinia amylovora* 분리 균주들의 유전체 서열을 해독하여 국내 화상병균 균주들의 유전체 정보 확보 및 유전체 비교 분석, 유전체 서열 기반의 계통유전체학적 관계 등을 분석하고자, 농림축산검역본부의 협조(1차년도) 및 협동연구(2, 3차년도)를 통해 2016년도부터 2018년도까지 발생한 국내 화상병 역학 조사 정보를 제공받고 이를 파악하여 유전체 해독 및 분석에 적용할 국내 화상병균 균주들을 선정하였음. 3년간 국내 과수화상병의 발생 원인을 제공한 *E. amylovora* 분리 균주 가운데 매년 5균주 이상의 균주들의 완전 유전체 서열을 확보, 분석하고자 하였음. 한편, 완전 유전체가 완성된 균주들을 포함하여 총 92개 균주의 유전체 서열을 대용량 분석기기를 이용, 해독 및 분석함으로써 화상병균에 대한 집단 유전체학적 분석을 수행하는 것을 목표로 함. 특히, 완전 유전체 정보 서열을 확보, 완성, 비교 분석을 위해서는 각각의 이전 연도의 서열 해독된 균주의 분리 지역, 기주 자료 등의 분리균주들의 메타정보들을 파악하여 분리 균주들 가운데 이전 해에 발생한 과원의 근접 지역에서 발생, 분리된 균주들을 가능한 우선순위에 두고 완전 유전체 분석 균주로 선정하였음. 2016년도, 2017년도에는 천안, 안성에서 발생한 화상병균 각각 5균주씩 총 10균주, 2018년도에는 천안, 안성, 제천, 원주, 평창에서 10균주를 선정하였음(표 1).

표 1. 완전 유전체 해독(PacBio 시스템 이용) 대상으로 선정된 2016년, 2017, 2018년도 국내 과수화상병 원인 분리 균주

분리년도	균주번호	과원 소재지	기주
2016	FB65	경기도 안성시 서운면 현매리	배나무
2016	FB56	충청남도 천안시 서북구 성환읍 성월리	배나무
2016	FB15	경기도 안성시 서운면 송정리	사과나무
2016	FB80	경기도 안성시 미양면 신기리	배나무
2016	FB34	경기도 안성시 서운면 송정리	배나무
2017	PQEA_A_170608 (0608-1)	충남 천안시 서북구 입장면 독정리	사과나무
2017	PQEA_P_170613 (0613A-1)	경기도 안성시 중리동	배나무
2017	PQEA_A_170615 (0615-SIM-1-1)	경기도 안성시 서운면 산평리	사과나무
2017	PQEA_A_170616 (0616-JANG-1)	경기도 안성시 서운면 송산리	사과나무
2017	PQEA_P_170730 (0730-1)	경기도 안성 서운면 산평리	배나무
2018	0515-1	경기도 안성시 서운면 북산리	배나무
2018	0525-3	충남 천안시 서북구 입장면 홍천리	배나무
2018	0601-1	충북 제천시 백운면 방학리	사과나무
2018	AP3	강원도 원주시 신림면 구학리	사과나무
2018	CB-P1-A	충북 충주시 동량면 손동리	사과나무
2018	DG2	충북 제천시 백운면 도곡리	사과나무
2018	JD3-4-P	충북 충주시 양성면 지당리	사과나무
2018	JL2-1-P	강원도 평창군 평창읍 중리	사과나무
2018	P-21	충남 천안시 성거읍 모전리	사과나무
2018	PC1	강원도 평창군 평창읍 중부리	사과나무

○ 2016년, 2017년, 2018년도 발병 화상병균의 유전체 서열 해독, 결정 및 유전자 주석화를 통한 국내 화상병균 유전체 정보 생산

- 2016년부터 2018년까지 3년간 연차별로 국내에 발생한 과수화상병의 원인 균주들 가운데 20개의 균주들을 대상으로 완전 유전체 서열을 해독 결정하고, 유전자 예측 및 주석화를 수행함으로써 화상병균 비교유전체 분석 및 바이오마커 서열 발굴에 사용될 유전체 정보들을 생산하였음. 유전체 서열 해독 균주로 선정된 균주들에 대해서 농림축산검역본부로부터 gDNA 를 제공받아 대용량 염기서열 해독 기술을 활용하여 각각의 균주들에 대한 유전체 염기서열들을 생산하였음. 완전 유전체 염기서열 해독 및 서열 결정을 위해 먼저 20kb PacBio RS II 염기서열 해독기기를 이용하였음. 20kb genomic library를 제작하여 long read들을 생산하였고 HGAP3 프로그램을 이용하여 서열을 조립하여 contig들을 확보하였음. 이후, PacBio system 및 조립에서 나올 수 있는 오류 서열들을 교정하고 high quality assembly 결과를 생산하기 위해 CLC

Genomics Workbench v.5 및 자동 서열 교정 Pilon 프로그램을 이용하였음. Illumina HiSeq 2500으로부터 생산된 short insert size의 paired end read들을 가지고 CLC Genomics Workbench v.5를 이용하여 contig들에 mapping하고 non-perfect match를 포함하는 서열 부위들을 확인하였음. mapping 파일로부터 consensus sequence를 추출하고, read 들을 consensus sequence에 대해 mapping 하는 작업을 반복 수행하여 non-perfect match 부위를 제거하는 한편, 불완전한 assembly 부분은 해당 부위의 read들을 추출하여 reassembly함으로써 서열들을 교정, 확인하여 서열을 결정하였음. 또한 누락된 plasmid의 여부를 확인하기 위해 alignment 되지 않은 Illumina read들을 따로 수집하고 조립하여 완성된 genome sequence들을 확보하였음.

- 결정된 유전체 염기서열로부터 유전체에 포함된 유전자 및 기능들을 예측한 결과물들을 가지고 기존의 화상병균 유전체와의 비교하기 위해 기존의 화상병균 유전자 정보 분석법과 같은 방법을 사용하고자 하였음.
- 기 공개되어 있는 *E. amylovora* CFBP1430 참조유전체 유전자 예측과 같은 방법인 CRITICA와 Glimmer 프로그램의 유전자 예측 결과물을 종합하는 방법으로 2015년 화상병 분리 균주 유전체들의 주석화 정보를 분석한 바 있음. 이를 신규로 해독한 20개의 화상병균 완전 유전체 서열들에 적용하기 위해 기존의 주석화 정보를 새로운 유전체에 옮길 수 있는 RATT 프로그램을 사용하였음.
- 주석화된 참조 유전체로 유전체 완성 균주인 2015년도 FB-207의 유전체를 사용하였으며, 유전체 정보가 포함된 embl 파일을 작성한 후, RATT 프로그램을 가지고 유사도가 매우 높은 서열에 적용하는 Assembly 옵션을 사용하여 2016, 2017, 2018 국내 화상병균 분리 균주로부터 나온 20개의 완전 유전체들의 유전자 정보들을 생산, 확보하였음(표 2).
- 국내 화상병 균주의 완전 유전체 서열 결정 결과, 균주들의 대부분이 기존의 보고된 *E. amylovora* 균주들과 유전체 크기가 비슷한 약 3.8Mbp의 chromosome 유전체를 보유하고 있으며, *E. amylovora*들의 균주들의 상당수가 보유하고 있어 화상병균 여부를 판별하는 참고 마커로도 사용되는 약 28kb의 plasmid pEA29를 국내 균주들도 대부분이 가지고 있었음. 단, 2017년에 분리된 PQEA_P_170730 균주는 유전체 해독 결과에서 pEA29를 가지고 있지 않는 것으로 나타났음. 분석을 위해 참조유전체로 사용한 미국 화상병균 균주 ATCC 49946의 경우, pEA29 외에도 pEA72 종류의 플라스미드를 보유하고 있으며, 그 외의 다른 국외 화상병균 균주들이 pEA30, pEI70, pEAR5.2 and pEAR4.3와 같은 플라스미드를 가지고 있는 것으로 알려져 있으나, 국내 완전 유전체 서열 결정 결과에서는 pEA29외의 다른 plasmid들을 포함하고 있지 않은 것으로 보였음.

표 2. 2016, 2017, 2018년도에 국내에서 분리, 신규 해독한 *E. amylovora* 균주 유전체 및 유전체 비교 분석을 위해 사용한 완전 참조유전체 정보

신규/ 참조	분리연 도	균주명	Size(bp)	Chromosome			pEA29		pEA72	
				No. of CDSs	No. of rRNA operons	No. of tRNA genes	Size (bp)	No. of CDSs	Size (bp)	No. of CDSs
연차별 신규 해독 유전체	2016	FB15	3,804,036	3,716	7	77	28,251	29	-	-
		FB56	3,803,255	3,716	7	77	28,259	29	-	-
		FB65	3,804,074	3,716	7	77	28,267	29	-	-
		FB80	3,804,073	3,716	7	77	28,259	29	-	-
		FB34	3,804,074	3,716	7	77	28,259	29	-	-
	2017	PQEA_A_170608	3,804,034	3,716	7	77	28,259	29	-	-
		PQEA_P_170613	3,804,074	3,716	7	77	28,259	29	-	-
		PQEA_A_170615	3,804,074	3,716	7	77	28,259	29	-	-
		PQEA_A_170616	3,804,074	3,716	7	77	28,259	29	-	-
		PQEA_P_170730	3,804,073	3,716	7	77	-	-	-	-
	2018	0515-1	3,804,074	3,716	7	77	28,251	29	-	-
		0525-3	3,803,891	3,716	7	77	28,251	29	-	-
		0601-1	3,804,038	3,716	7	77	28,259	29	-	-
		PC1	3,804,038	3,716	7	77	28,259	29	-	-
		DG2	3,804,065	3,716	7	77	28,251	29	-	-
P-21		3,804,078	3,716	7	77	28,251	29	-	-	
AP3		3,804,082	3,716	7	77	28,251	29	-	-	
CB-P-1A		3,804,076	3,716	7	77	28,259	29	-	-	
JD-3-4-P		3,804,074	3,716	7	77	28,251	29	-	-	
2015	JL-2-1-P	3,804,044	3,716	7	77	28,243	29	-	-	
	FB-20	3,803,601	3,716	7	76	28,259	29	-	-	
	FB-86	3,804,074	3,716	7	77	28,259	29	-	-	
	FB-207	3,804,074	3,716	7	77	28,259	29	-	-	
	FB-307	3,803,872	3,716	7	77	28,259	29	-	-	
참조 유전체	TS3238	3,804,073	3,717	7	77	28,259	29	-	-	
	1972 (유럽)	CFBP 1430	3,805,573	3,712	7	77	28,259	29	-	-
	1973 (미국)	ATCC 49946	3,805,874	3,711	7	78	28,243	29	71,487	87

(나) 2015년, 2016년, 2017년 및 2018년 발병 화상병균 유전체 비교 분석

○ *Erwinia* 속(genus)에 속하는 균주 및 화상병균 유전체 염기서열 비교

- 화상병균 유전체 염기서열 및 *Erwinia* 속 균주 중 완전 유전체 해독 서열 정보 수집

– 화상병균과 함께 *Erwinia* 속에 속하는 타 균주들의 유전체 비교 분석을 통하여 화상병균 특이적 염기서열을 발굴하거나, *Erwinia* 속 사이 또는 종(species) 사이의 유연관계를 추정이 가능함. 이를 위해 NCBI GenBank에 기탁되어 있는 화상병균 *E. amylovora*에 속하는 CFBP 1430 및 ATCC 49946 균주의 완전 유전체 서열과 타 화상병균 균주들의 초안 유전체 서열, 2015년에 국내에서 발병되어 분리된 균주 5개의 완전 유전체(FB-20, FB-86, FB-207, FB-307, TS3238)를 포함하여 *Erwinia pyrifoliae*, *Erwinia tasmaniensis*, *Erwinia billingiae*, *Erwinia* sp. 9145, *Erwinia* sp. Ejp617 등 화상병 원인균이 아닌 *Erwinia* 속에 속하는 균주들의 완전 유전체들 또한 수집한 후, 유전체 서열 비교 분석에 사용하였음(표 3).

표 3. 비교 유전체 분석을 위해 수집한 *Erwinia* 속(genus)에 속하는 균주들의 유전체 정보

Strains	Genome size	Chromosome size	Plasmid & size	No. of CDSs	Complete/Dr aft	GenBank Accession No.
<i>E. amylovora</i> 01SFR-BO	3,795,813	3,767,555	pEA29 28,258	3,756	draft	CAPA01000000, HF560647
<i>E. amylovora</i> ACW56400	3,860,835	3,766,745	pEA29 28,250, pEI70 65,840	3,830	draft	AFHN01000000, CP002951
<i>E. amylovora</i> ATCC49946	3,905,604	3,805,874	pEA29 28,243, pEA72 71,487	3,741	complete	FN666575, FN666576, FN666577
<i>E. amylovora</i> CFBP1232	3,795,525	3,767,275	pEA29 28,250	3,762	draft	CAPB01000000, HF560650
<i>E. amylovora</i> CFBP1430	3,833,832	3,805,573	pEA29 28,259	3,740	complete	FN434113, FN434114
<i>E. amylovora</i> CFBP2585	3,821,701	3,763,859	pEA29 28,257, pEA30 29,585	3,784	draft	CAOZ01000000, HF560645, HF560646
<i>E. amylovora</i> Ea266	3,786,928	3,758,662	pEA29 28,266	3,804	draft	CAOY01000000, HF560644
<i>E. amylovora</i> Ea356	3,792,204	3,763,947	pEA29 28,257	3,773	draft	CAOX01000000, HF560643
<i>E. amylovora</i> Ea644	3,832,325	3,803,637	pEA29 28,688	3,940	draft	CAPD01000000, HF560648
<i>E. amylovora</i> FB-207	3,832,333	3,804,074	pEA29 28,259	3,745	complete	2015
<i>E. amylovora</i> FB-20	3,831,860	3,803,601	pEA29 28,259	3,745	complete	2015
<i>E. amylovora</i> FB-307	3,832,131	3,803,872	pEA29 28,259	3,745	complete	2015
<i>E. amylovora</i> FB-86	3,832,333	3,804,074	pEA29 28,259	3,745	complete	2015
<i>E. amylovora</i> IL5	3,845,641	3,807,883	pEA29 28,138, pEAR4.3 4,369, pEAR5.2 5,251	3,857	draft	FR719181-FR719212
<i>E. amylovora</i> LA635	3,791,024	3,762,749	pEA29 28,275	3,413	draft	CBVS01000000, HG793096

<i>E. amylovora</i> LA636	3,789,866	3,762,547	pEA29 27,319	3,411	draft	CBVT000000000, HG793097
<i>E. amylovora</i> LA637	3,869,546	3,762,531	pEA29 28,275, pEA78 78,740	3,505	draft	CBVU000000000, HG793098, HG793099
<i>E. amylovora</i> MR1	3,813,203	3,785,600	pEA29 27,603	4,047	draft	CAPE000000000, HF560649
<i>E. amylovora</i> NBRC12687	3,777,657	3,749,390	pEA29 28,267	3,396	draft	BAYW000000000
<i>E. amylovora</i> TS3238	3,832,332	3,804,073	pEA29 28,259	3,746	complete	2015
<i>E. amylovora</i> UPN527	3,766,970	3,766,970	–	3,729	draft	CAPC000000000
<i>E. pyrifoliae</i> DSM12163	4,072,827	4,026,286	pEP3 3,070, pEP5 4,960, pEP2.6 2,610, pEP36 35,901	3,963	complete	NC_017388, NC_017389, NC_017390, NC_017391, NC_017392
<i>E. pyrifoliae</i> Ep1/96	4,072,846	4,026,322	pEP36 35,909, pEP03 3,070, pEP05 4,955, pEP2.6 2,590	3,645	complete	NC_012214, NC_013263, NC_013264, NC_013265, NC_013954
<i>E. billingiae</i> Eb661	5,372,268	5,100,167	pEB170 169,778, pEB102 102,323	4,583	complete	NC_014304, NC_014305, NC_014306
<i>Erwinia</i> sp. 9145	4,254,300	4,254,300	–	3,859	complete	NZ_JQNE000000000
<i>Erwinia</i> sp. Ejp617	3,957,675	3,909,168	pJE01 30,866, pJE03 6,417, pJE05 2,691, pJE02 5,296, pJE04 3,237	3,600	complete	NC_017442, NC_017443, NC_017444, NC_017445, NC_017446, NC_017447
<i>E. tasmaniensis</i> Et1/99	4,067,864	3,883,467	pET46 46,159, pET09 9,299, pET35 35,494, pET49 48,751, pET45 44,694	3,427	complete	NC_010693, NC_010694, NC_010694, NC_010696, NC_010697, NC_010699

- *Erwinia* 속 균주들 사이의 유전체 서열 유사도 비교
 - *Erwinia* 속에 속하는 균주들의 유전체 서열상의 유사도를 측정, 가늠하기 위해 Jspecies 프로그램을 이용하여 ANI(Average Nucleotide Identity) value들을 계산함 (그림 4). BlastN과 Mummer를 이용한 ANIb와 ANIm 값을 측정한 결과, 화상병균 *E. amylovora* 사이의 ANI 값은 매우 유사도가 높은 값을 나타내었고(99% 이상), 국내 균주 사이에는 ANIm value가 99.97% 이상, ANIb value는 100% 값이 나타났음. 화상병균과 매우 유사하다고 알려진 *E. pyrifoliae* 균주와는 ANIb 값을 기준으로 약 90%의 identity 값이 나타났음. 또한 종이 정해지지 않은 *Erwinia* sp. Ejp617과도 비슷한 유사도로 측정되었으며 Ejp617은 *E. pyrifoliae*와 매우 유사한 종으로 추정되었음. 그 외에 *E. tasmaniensis* Et1/99와는 약 84%, *Erwinia* sp. 9145, *E. billingiae* Eb661는 약 76%의 ANI 값이 화상병균 유전체 서열과 비교 시 나타난 것으로 보아, 화상병균 종 내의 다양성은 매우 낮으나 다른 해독된 *Erwinia* 속의 균주들과는 염기서열 수준에서 많이 상이하며 *Erwinia* 속 단위에서는 유전체 사이의 특이적 서열이 매우 많이 존재함을 추정할 수 있었음.

- *E. amylovora* CFBP 1430을 참조유전체로 하고, 완전 해독된 서열들을 BlastN을 이용하여 alignment 하였음. *E. amylovora* 균주로 미국 분리 균주인 ATCC 49946과 국내 대표 균주로 FB15의 유전체 서열을 이용하였으며, *E. pyrifoliae*의 대표 균주로 DSM 12163, Ejp617, 그 외 *E. tasmaniensis* Et1/99, *Erwinia* sp. 9145, *E. billingiae* Eb661의 유전체 서열을 함께 비교하였음. 그 결과, ATCC 49946, 2016년도에 분리된 FB15 등 화상병 간의 유사도는 매우 높으며 유전체 간의 상이한 영역을 관찰하기 어려웠으나, 타 *Erwinia*와 비교하였을 때에는 화상병균만이 가지고 있는 genomic island로 보이는 영역들이 다수 관찰됨(그림 5). ANI value 측정 결과에서와 마찬가지로, 속(genus) 단위에서는 유전체 서열의 유사도가 낮으므로, 전체 비교 균주 사이의 유사도가 높은 서열 부위를 중심으로 바이오마커를 발굴하는 전략이 필요할 것으로 보여짐.

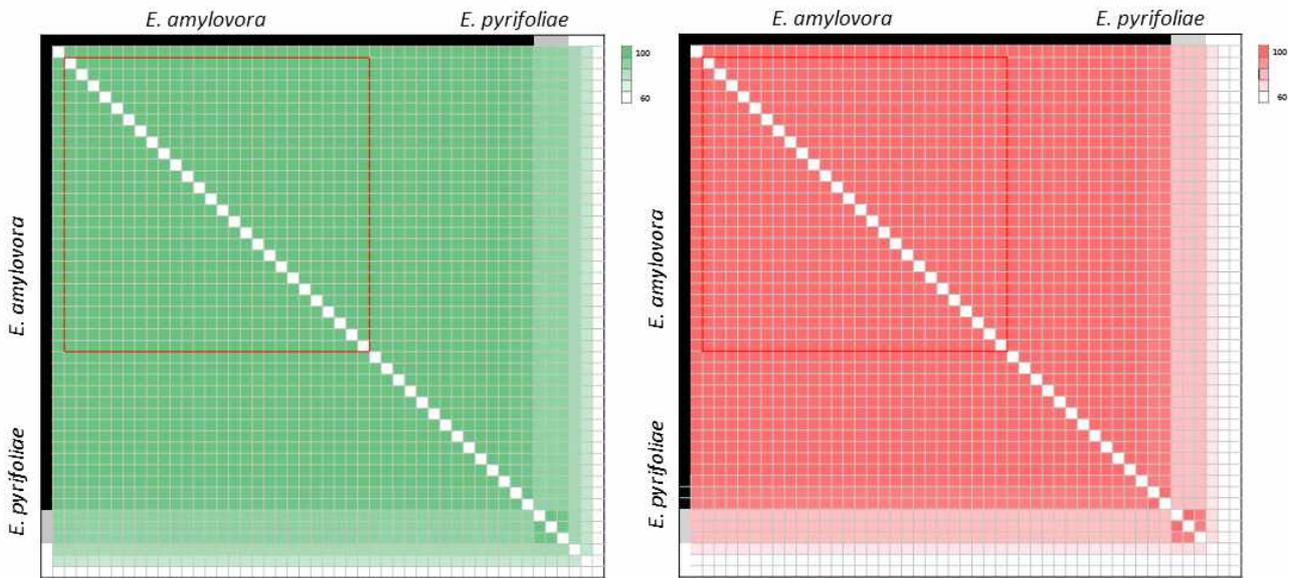


그림 5. *Erwinia* 속 균주들의 유전체 간 유사도를 측정하기 위한 ANIb value 비교 결과

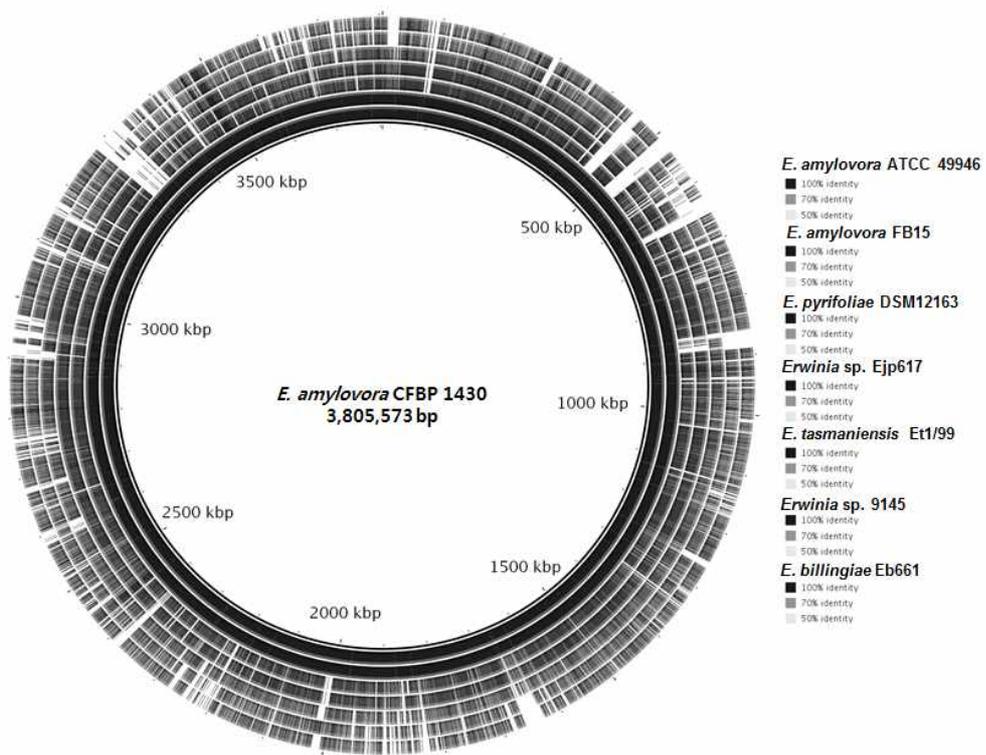


그림 5. *E. amylovora* CFBP 1430 유전체에 대해 국내 *E. amylovora* 균주 FB15 유전체와 다른 *Erwinia* 속의 비교 균주 유전체 서열들을 BlastN으로 정렬, 도식화한 결과

- *Erwinia* 속 균주들 사이의 유전체 구조(synteny) 비교 분석
 - 균주들 사이의 유전체 구조를 비교하기 위해 Mauve와 ProgressiveMauve를 이용하여 *E. amylovora* 완전 유전체들과 그 외의 종에 속하는 완전 유전체들의 chromosome 염기서열을 정렬(alignment)하여 유전체 구조적 synteny를 비교하였음.
 - *E. amylovora* CFBP1430과 ATCC 49946, 두개의 완전 chromosome 구조의 큰 역위(inversion)이 기존에 보고된 바와 같이 나타났으며, 이 참조유전체들과 국내 화상병균 균주들과 비교한 결과, 다른 rRNA operon 부근에서 유전체 구조가 바뀌게 되었음을 관찰할 수 있었음. 2015년부터 2018년까지 분리된 국내 화상병균 유전체 사이에서는 염색체 상의 구조적 변이는 발견되지 않았음.
 - 이러한 synteny 분석으로부터 화상병균 유전체들 사이의 구조적인 큰 차이점으로 재확인됨. 한편, *E. amylovora*와 *E. pyrifoliae* 사이에도 유전체 구조에 역위된 부위가 보였으며 *Erwinia* 속 간의 유전체 구조적 변이가 많이 관찰되었음(그림 6).

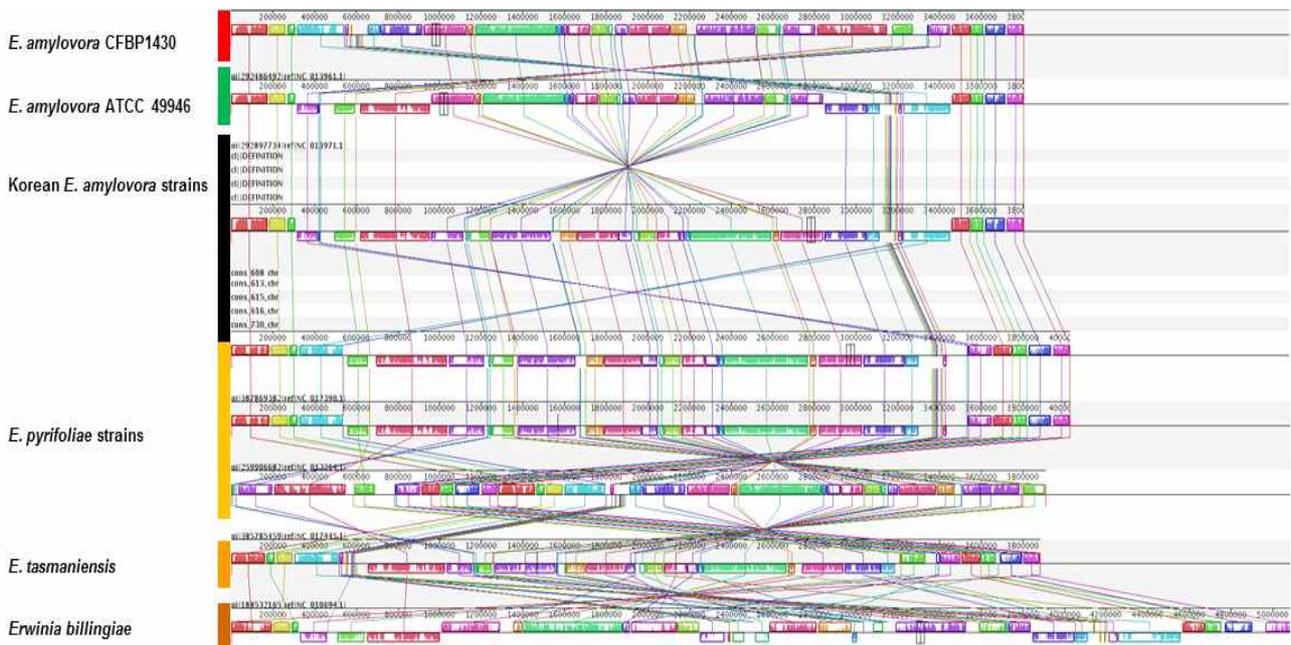


그림 6. *Erwinia* 속의 완전 유전체들 사이의 염기서열 정렬 및 유전체 구조 비교

- *Erwinia amylovora* 균주 간의 유전체 염기서열 비교 분석
 - 국내 분리 화상병균과 국외 분리 균주간의 전장 유전체 서열 alignment 분석 및 비교
 - 2015년에 국내에서 분리된 화상병균 균주들을 참조유전체 서열로 하여 국내 균주들 사이의 염기서열을 비교 분석을 수행함.
 - 국외 화상병균들의 유전체를 비교 분석한 참고문헌에 따르면 화상병균 균주들 사이의 서열 유사도는 99.98% 이상으로 매우 높은 것으로 알려짐. 화상병균의 공개되어 있는 유전체 서열 중, 완전 해독 유전체로서 *Spiraeoideae* 기주에서 분리된 *E. amylovora* CFBP 1430 또는 ATCC 49946 균주의 유전체를 참조유전체로 하여 유전체 전체 서열을 alignment하여 비교 분석을 수행함. 완성되어 있는 참조유전체에 대해 Mauve, progressiveMauve alignment 프로그램을 이용하여 alignment하고, 국내 균주 서열들에서 특이적으로 나타나는 SNP 부위들을 파악함(그림 7, 표 4). CFBP 1430의 유전

체 서열 및 주석화 정보를 이용하여 SNP 서열과 SNP 효과를 분석하기 위해 참조 유전체로 CFBP 1430에 대해 alignment하고 이로부터 SNP 및 short InDel을 분석한 결과, 참조유전체에 대해 총 440여개의 변이 서열이 나타났고, 그 중 CDS 내의 변이는 320개 이상으로 나타남.

- 국내 분리 균주 간의 유전체 전장 유전체 서열 alignment 분석 및 비교
 - 완전 유전체 서열의 alignment 분석 결과, 국내 균주들 사이의 서열 유사도가 매우 높은 것으로 나타났음. 2015년도 유전체 서열들과 함께 2016, 2017, 2018년도 분리균주들의 유전체 서열들만을 가지고 alignment하고, SNP를 분석하였을 때 국내 균주 사이에 총 112개의 SNP가 나타남.
 - SNP 염기서열 외에, CRISPR array나 tandem repeat이 나타나는 부분에 서열 차이가 있어 이로 인해 국내 균주 간의 서열 크기의 차이가 나타나는 것으로 보였으며, RATT을 이용한 유전자 예측 결과를 가지고 유전자의 개수를 비교해 보았을 때에도 유전자 구성에 차이가 보이지 않았음.
 - CFBP143의 유전체 서열과 유전자 주석화 정보를 기반으로 TRAMS 프로그램을 이용하여 국내 화상병균 및 *E. pyrifiliae* 균주들에 존재하는 SNP들에 대한 주석화를 수행하였음.
 - SNP의 위치, 변이로 인한 아미노산 서열의 영향 여부를 파악하였고, 화상병균 속 및 국내 화상병균주들에 대한 특이적 마커를 발굴하기 위한 기본 정보들을 확보하였음(표 4).

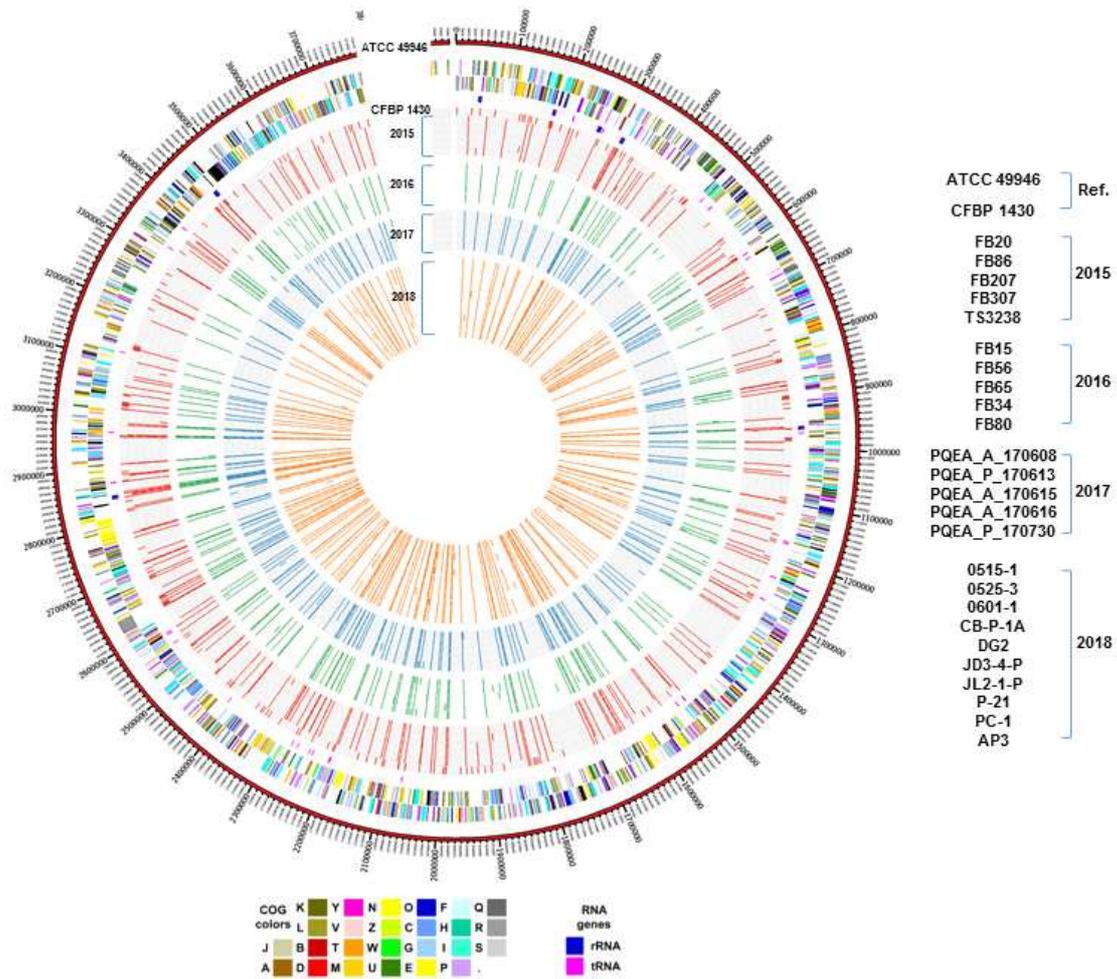


그림 7. 참조유전체 *E. amylovora* ATCC 49946의 유전체 지도 및 *E. amylovora* 전 유전체 서열들을 alignment한 결과로부터 분석된 CFBP 1430 및 2015, 2016, 2017, 2018년도에 국내에서 분리된 *E. amylovora* 균주들의 변이 서열 위치

표 4. *E. amylovora* CFBP 1430을 참조유전체로 한 균주별 SNP 분석 요약

Strain	SNPs	SNPs in CDSs	Synony mous	Non-synonymous	Non-sense	Non-start	Non-stop	Intergenic
ATCC 49946	446	323	5	152	157	5	0	4
FB20	448	325	5	152	158	6	0	4
FB86	447	325	5	151	159	6	0	4
FB207	444	322	5	151	156	6	0	4
FB307	444	322	5	152	156	5	0	4
<i>Erwinia amylovora</i> TS3238	461	325	5	152	158	6	0	4
FB15	448	322	5	152	155	6	0	4
FB56	446	323	5	151	157	6	0	4
FB65	427	266	3	117	139	4	0	3
FB34	443	320	5	152	154	5	0	4
FB80	443	320	5	152	154	5	0	4

PQEA_A_1 70608	443	320	5	152	154	5	0	4
PQEA_A_1 70615	452	327	4	158	156	5	0	4
PQEA_A_1 70616	447	323	5	153	156	5	0	4
PQEA_P_1 70613	448	323	5	151	158	5	0	4
PQEA_P_1 70730	445	320	5	152	154	5	0	4
0515-1	444	322	5	152	155	6	0	4
0525-3	442	321	5	151	156	5	0	4
0601-1	447	323	5	152	157	5	0	4
CB-P-1A	447	322	5	151	156	6	0	4
DG2	444	322	5	151	156	6	0	4
JD3-4-P	439	317	5	150	153	5	0	4
JL2-1-P	445	323	5	152	156	6	0	4
P-21	444	322	5	151	156	6	0	4
PC-1	449	324	5	151	158	6	0	4
AP3	446	320	5	151	155	5	0	4

DSM 12163	309,120	251,527	158,430	67,559	386	139	247	57,495
<i>Erwinia pyrifoliae</i> Ep1/96	309,220	251,616	158,483	67,585	388	139	247	57,505
Ejp617	309,682	252,071	158,403	67,606	416	138	253	57,508

○ *Erwinia* 속의 상동성 유전자(orthologous gene) 분석을 통한 유전체 비교 및 계통유전체학적 분석

- *Erwinia* 균주들의 상동성 유전자 분석을 통한 유전체 비교 분석

- 유전체 내의 유전자 서열을 이용하여 상동성 유전자(orthologous gene)들을 비교 분석을 수행하였음.
- 상동성 유전자들을 50%의 identity와 50% coverage를 갖는 유전자들로 정의하고, BlastP를 수행한 결과를 이용하여 orthoMCL을 실행하였음. 총 5,600 종류의 상동성 유전자 세트 가운데, paralogous gene 또는 duplicated gene을 제외하고 유전체 내에 한 개씩만 존재하는 2,016개의 *Erwinia* 속 코어유전자(core gene)를 도출함.
- 상동성 유전자군 분석 결과를 활용하여 화상병균 *E. amylovora*의이 공통적으로 갖고 있지만, 다른 *Erwinia* 속 유전자로 존재하지 않는 105 종류의 특이적인 유전자들을 비교 분석이 가능했음. 중복하여 존재하는 상동성 유전자를 포함하는 코어 유전자 2,114 종류의 유전자들의 COG(Clusters of Orthologous Groups) category에 따른 기능을 분석한 결과, amino acid transport and metabolisms를 비롯하여 그림 8(A)에 나타난 바와 같이 코어 유전자들의 기능이 분포하였으며, 화상병균 특이적인 유전자들으로써 선별된 유전자들에는 그림 8(B)와 같이 secondary metabolism 및 secretion 과 관련된 유전자들이 분포함을 확인함.
- 이는 화상병균의 병원성 또는 관련 유전자들과 연관 되어 있을 것으로 예상되었음. 또한 특이적 코어 유전자들은 서열 유무에 따른 화상병균 유전체적 특성 분석에 활용될 수 있을 것으로 보여짐.

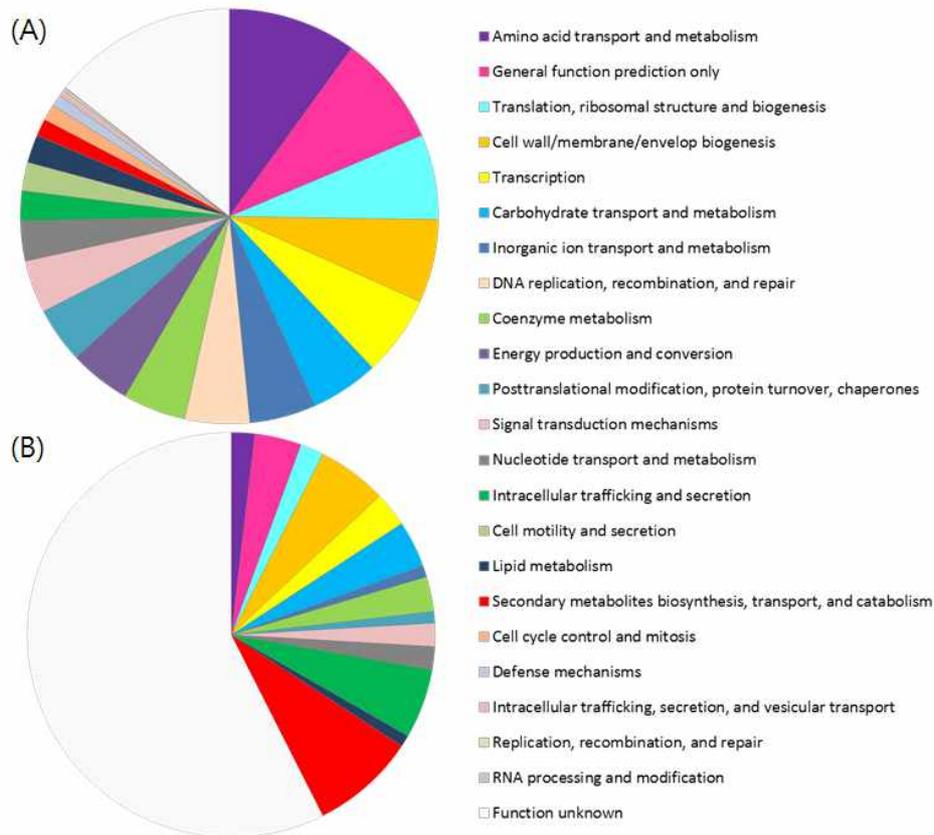


그림 8. *Erwinia* 속의 코어 유전자들의 COG 카테고리에 따른 기능 분류(A) 및 화상병균 *E. amylovora*의 특이적 코어 유전자

- 코어유전자 세트를 이용한 유전체 해독 *Erwinia* 균주 사이의 유연관계 분석
 - 유전체 서열로부터 도출된 코어유전자 세트를 이용하여 화상병균 *E. amylovora*와 그 외의 *Erwinia* 속의 균주들의 유연관계를 파악하고자 2,016개의 상동성 유전자들을 추출한 후, ClustaW alignment 프로그램을 이용하여 각각의 상동성 유전자 세트들의 염기서열의 다중정렬(multiple alignment)을 수행함. 생성된 alignment 파일 내의 서열 세트들은 모두 병합한 후, PhyML 프로그램을 사용하여 maximum-likelihood 방법으로 phylogenomic tree를 구축하였음.
 - 비교 분석에 이용된 *Erwinia* 속 균주들의 유연관계 분석을 통해 유사도 분석에서와 마찬가지로 화상병균 *E. amylovora*이 타 species와는 구별되는 유전자 서열들에 의해 phylogenetic tree에서 *E. amylovora*, *E. pyrifoliae*, 그리고 그 외의 *Erwinia* 등, 종(species)별 각각의 고유의 cluster를 형성함을 확인할 수 있었음(그림 8).
 - *E. amylovora*의 경우, 기보고된 바와 같이 Rubus에 속하는 기주에서 분리된 균주들(Ea644, MR1, IL5)과 에서 *Spiraeoideae*에 속하는 기주로부터 분리된 균주들이 구분된 branch에 clustering 됨을 재확인할 수 있었고, 이와 같은 결과로서, 국내에서 사과, 배나무에서 분리된 화상병균들 또한 국외 *Spiraeoideae* 기주 분리 균주과 함께 같은 그룹에 속하는 것으로 나타났음.

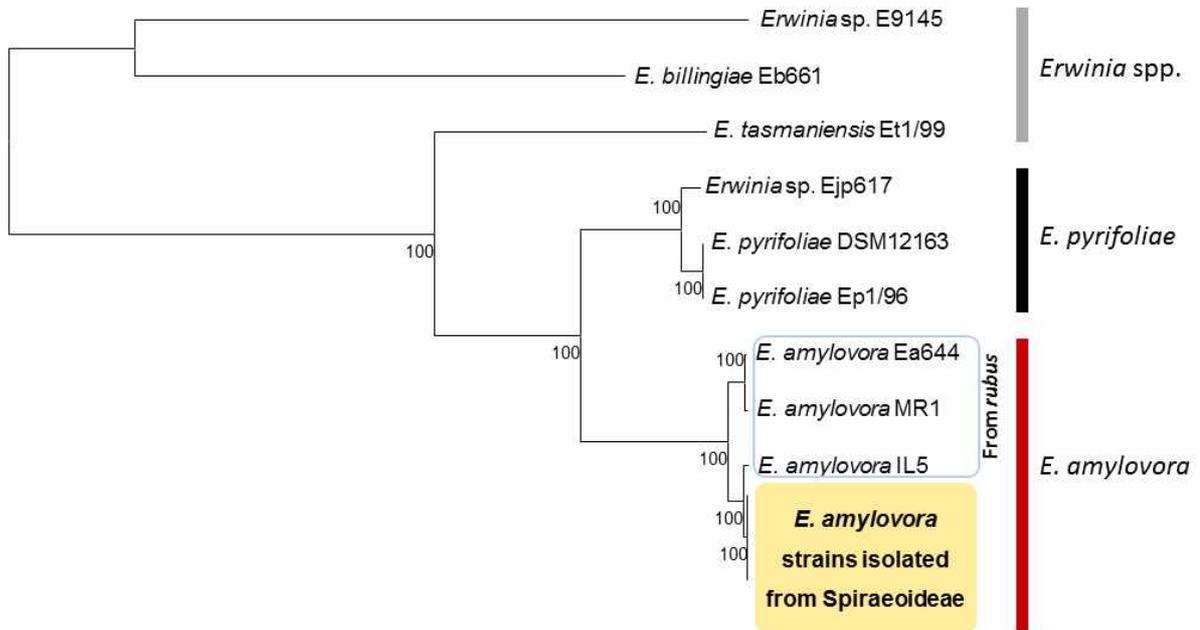


그림 10. 코어 유전자 세트의 염기서열을 이용한 *Erwinia* 속 균주 및 *E. amylovora* 균주들 사이의 계통유전체학적 유연관계

- *Erwinia amylovora* 종에 속하는 균주들을 가지고 분석한 core gene set들을 가지고 위와 같은 방법으로 계통유전체학적 분석을 수행한 결과, phylogenetic tree에서 2015년도 균주들과 함께 2016년 이후 분리된 균주들 모두 북미 지역에서 분리되었던 Ea266(캐나다), LA635, LA636, LA637(멕시코)와 한 cluster를 형성하는 것을 확인함.
- 국내 균주들은 하나의 그룹을 이루고 있었고 계통학적 유연관계는 상대적으로 매우 가까움을 파악할 수 있었음. 완전 유전체 해독 균주들 사이에서 구축한 phylogenomic tree를 보았을 때, 기주, 지역, 연도별 특이적 그룹은 없었음.
- 다만 2016년부터 2018년도에 분리된 균주들에 반해 2015년도 분리균주는 하나의 cluster에만 존재하며 2018년도 분리된 균주들 가운데 제천과 평창에서 발생된 화상병균이 하나의 cluster에 속하는 것을 확인함. 또한 2017년도와 2018년도 충주, 천안, 안성 원주, 제천에서 발생한 화상병균들 가운데 하나의 cluster가 형성되었음. 계통유전체학적 분석을 통해 국내 화상병균 개별 균주들 사이의 유연관계를 파악할 수 있었음.

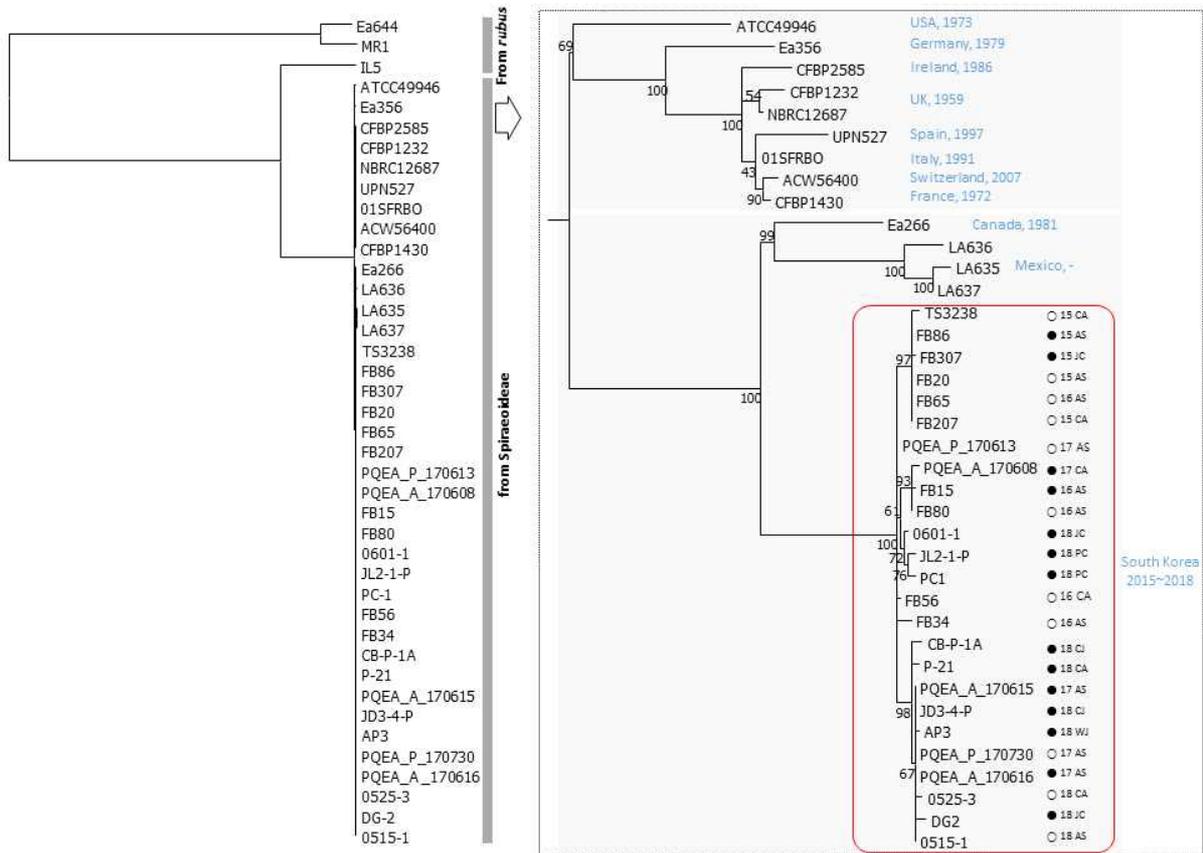


그림 11. 코어 유전자 세트의 염기서열을 이용한 국내외 화상병균 균주들의 계통유전체학적 유연관계(기주: ●사과, ○배, 지역: CA천안, AS안성, JC제천, PC평창, WJ원주, 연도: 15,16,17,18)

(다) 과수화상병균의 집단 유전체 분석을 위한 whole genome shotgun sequencing 및 유전체 서열 분석

○ 대용량 염기서열 해독을 통한 2017, 2018년도 수집 국내 화상병균 집단들에 대한 genome-wide SNP 분석

- 2017, 2018년도에 분리 균주들에 대한 NGS 해독 및 SNP 분석
 - 2, 3차년도 농림축산검역본부의 협동과제 수행 중 분리한 다수의 화상병균 분리 균주들에 대한 NGS 해독 및 분석을 수행함. 염기서열 해독 균주 선정 범위는 NGS 해독 시점 이전에 확보, 분리된 균주들을 최대한 포함하도록 하였고, 한 포장 내에서 분리된 다수의 균주들의 동시에 해독하고자 하였음

표 5. 유전체 분석에 사용된 과수화상병 분리주 목록

기주명	주소	집단	샘플 수	샘플명
배나무	충남 천안시 서북구 입장면 독정리	천안A(배)	3	0530-1 0530-2 0530-3
배나무	충남 천안시 입장면 독정리	천안B(배)	4	0614-KAM-1-1 0614-KAM-1-2 0614-KAM-2-1 0614-KAM-2-2
배나무	천안 서북구 입장면 도림리	천안C(배)	2	1106-1P-3 1106-1P-4
배나무	충남 천안시 홍천리	천안D(배)	2	0515-52 0515-53
배나무	경기도 안성시 중리동	안성A(배)	5	0613A-1 0613A-2 0613A-3 0613A-4 0613A-5
배나무	경기도 안성시 중리동	안성B(배)	5	0613B-1 0613B-2 0613B-3 0613B-4 0613B-5
배나무	경기도 안성시 중리동	안성C(배)	3	0613C-1 0613C-2 0613C-3
배나무	경기도 안성시 중리동	안성D(배)	4	0613D-1-1 0613D-1-2 0613D-1-3 0613D-1-5
배나무	경기도 안성시 중리동	안성E(배)	3	0613D-2-1 0613D-2-4 0613D-2-5
배나무	안성시 서운면 신흥리	안성F(배)	3	1107-11P 1107-17P 1107-23P
배나무	경기도 안성시 공도읍 양기리	안성G(배)	3	0720-1 0720-2 0720-3
배나무	경기도 안성시 미양면 법전리	안성H(배)	2	0729-1 0729-3
배나무	경기도 안성시 서운면 산평리	안성I(배)	5	0730-1 0730-2 0730-3 0730-4 0730-5
배나무	경기도 안성시 송정리	안성J(배)	2	1109-379-16 1109-379-18
배나무	경기도 안성시	안성K(배)	2	0515-1 0515-4
배나무	검역본부보유균주	안성L(배)	9	FB16-0613-7 FB17-8 FB17-9 FB17-10 FB17-11

				FB17-12 FB17-13 FB17-14 FB17-15
사과나무	충남 천안시 서북구 입장면 독정리	천안A(사과)	5	0608-1 0608-2 0608-3 0608-4 0608-5
사과나무	경기도 안성시 서운면 산평리	안성A(사과)	4	0615-SIM-1-1 0615-SIM-1-2 0615-SIM-2-1 0615-SIM-2-2
사과나무	경기도 안성시 서운면 송산리	안성B(사과)	2	0616-JANG-1 0616-JANG-3
사과나무	충북 제천시 백운면 방학리	제천A(사과)	2	0601-1 0601-2
사과나무	충북 제천시 방학리	제천A(사과)	2	0601-3 0601-5
사과나무	충북 제천시 방학리	제천A(사과)	1	0601-7
사과나무	충북 제천시 도곡리	제천B(사과)	1	0604-1P
사과나무	충북 제천시 도곡리	제천B(사과)	1	0604-2P
사과나무	충북 제천시 방학리	제천A(사과)	1	0604-3P
사과나무	강원도 평창군 중부리	평창A(사과)	3	PC1 PC2 PC3
사과나무	강원도 원주시 구학리	원주A(사과)	1	AP3
사과나무	충북 충주시 동량면 손동리	충주A(사과)	2	CB-P-2A CB-P-5B
합계				82

- NGS sequencing을 위한 genomic library 제작
 - 국내에서 분리한 과수화상병균 균주들의 유전적 다양성을 분석하기 위해 차세대염기서열 분석방법인 NGS 분석을 이용하여 whole genome sequencing 진행
 - 국내 여러 지역과 기주에서 분리한 총 82개 분리주를 대상으로 NGS 시퀀싱을 위한 genomic library를 제작함(표 5).
 - 각 과수화상병 분리주의 gDNA는 농림축산검역본부에서 분리하였음. 각각의 gDNA는 shearing 작업을 통해 약 150bp 크기로 절단 한 후, Illumina 시퀀싱 장비에 사용 가능한 바코드 어댑터를 결합하고 PCR 증폭을 통해 genomic library를 제작함
 - 각 82개의 분리주들의 genomic library를 제작 후 Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 장비를 이용하여 QC를 진행함(표 6-12)
 - 각 라이브러리는 약 350bp에서 정규분포 모양으로 제작된 것을 확인함.

표 6. Illumina Hiseq 시퀀싱을 위한 과수화상병균의 genomic library 제작 QC 결과 1

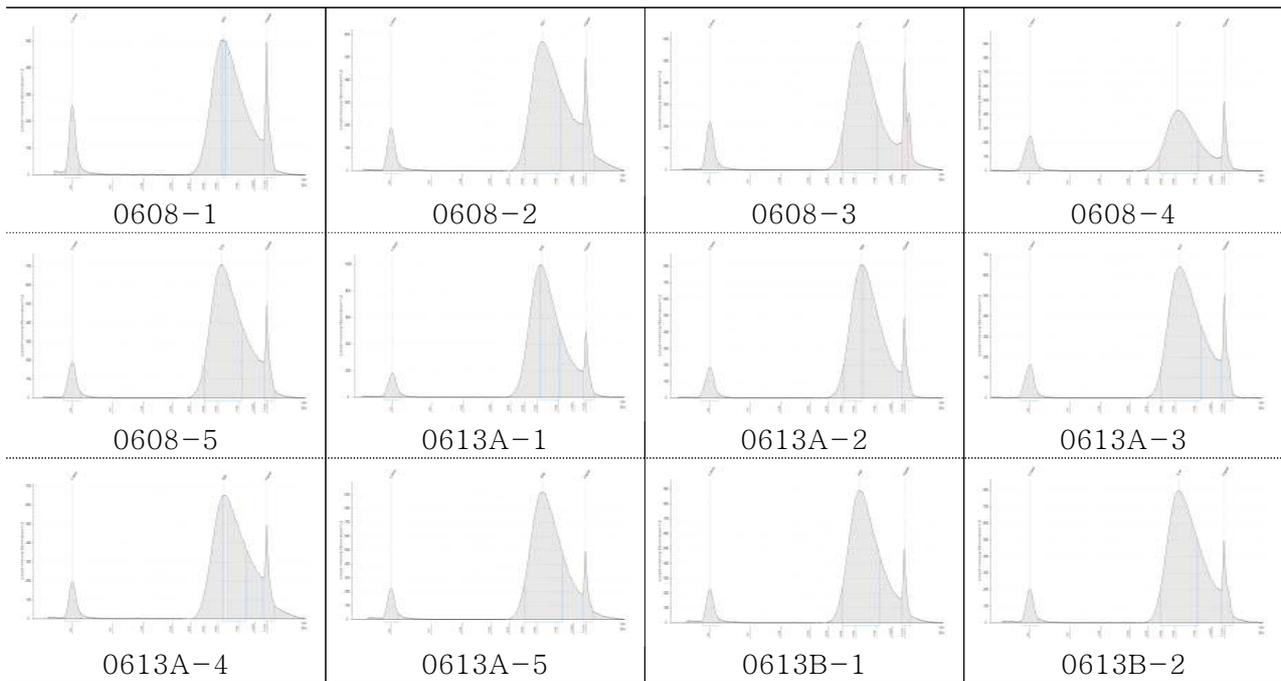


표 7. Illumina Hiseq. 시퀀싱을 위한 과수화상병균의 genomic library 제작 QC 결과 2

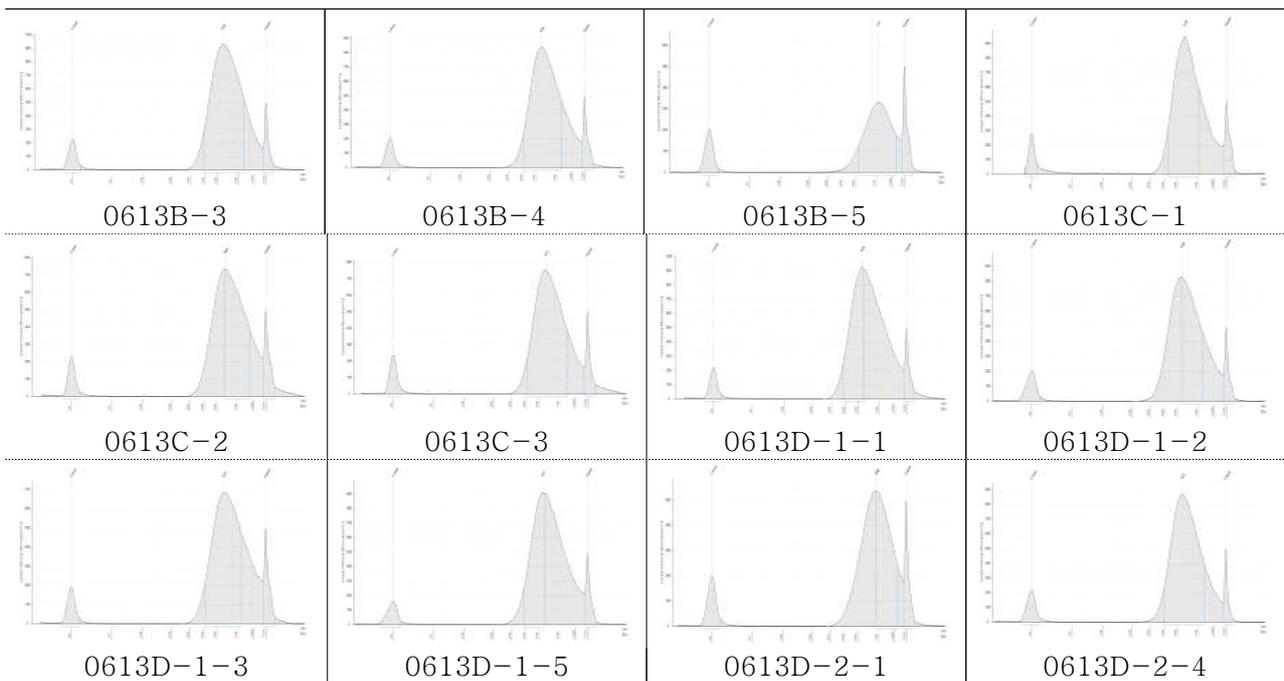


표 8. Illumina Hiseq. 시퀀싱을 위한 과수화상병균의 genomic library 제작 QC 결과 3

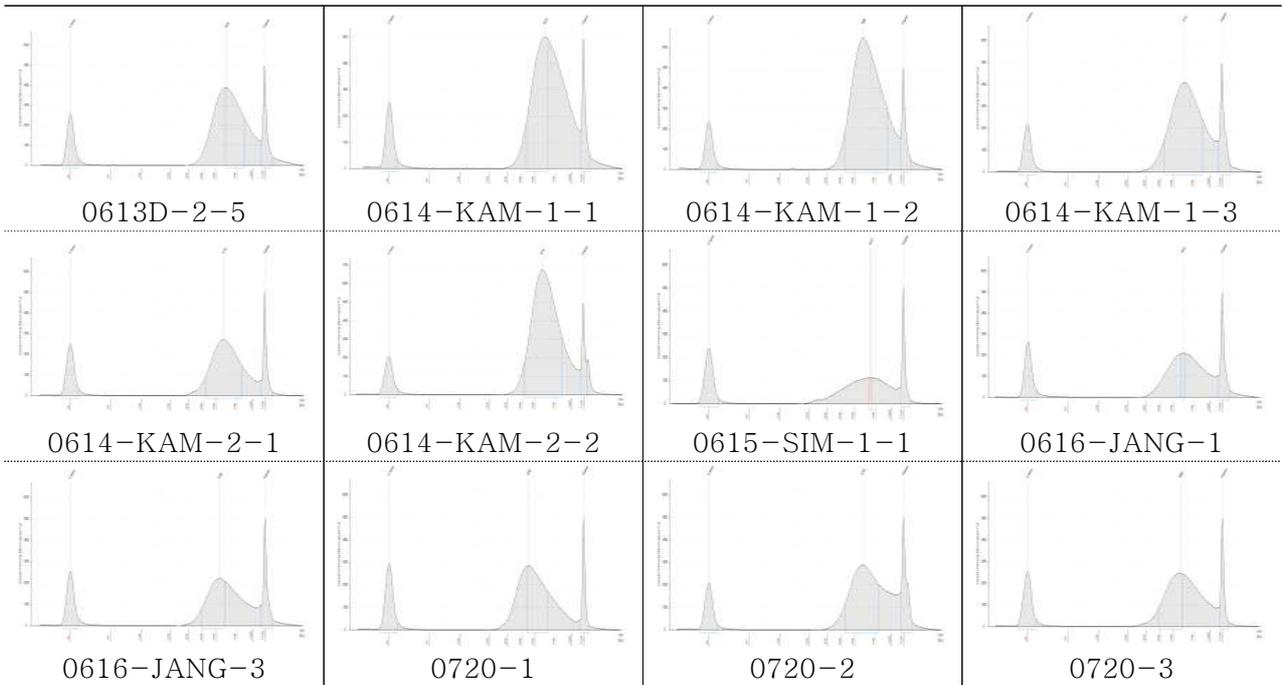


표 9. Illumina Hiseq. 시퀀싱을 위한 과수화상병균의 genomic library 제작 QC 결과 4

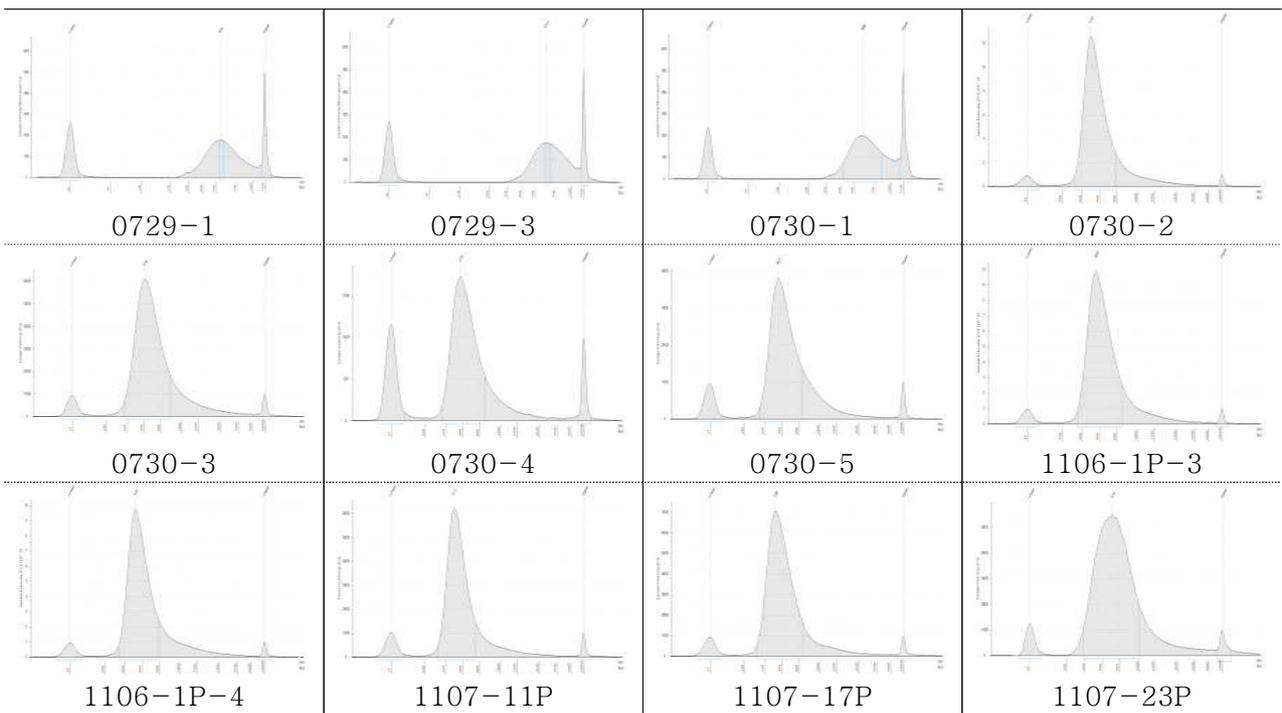


표 10. Illumina Hiseq. 시퀀싱을 위한 과수화상병균의 genomic library 제작 QC 결과 5

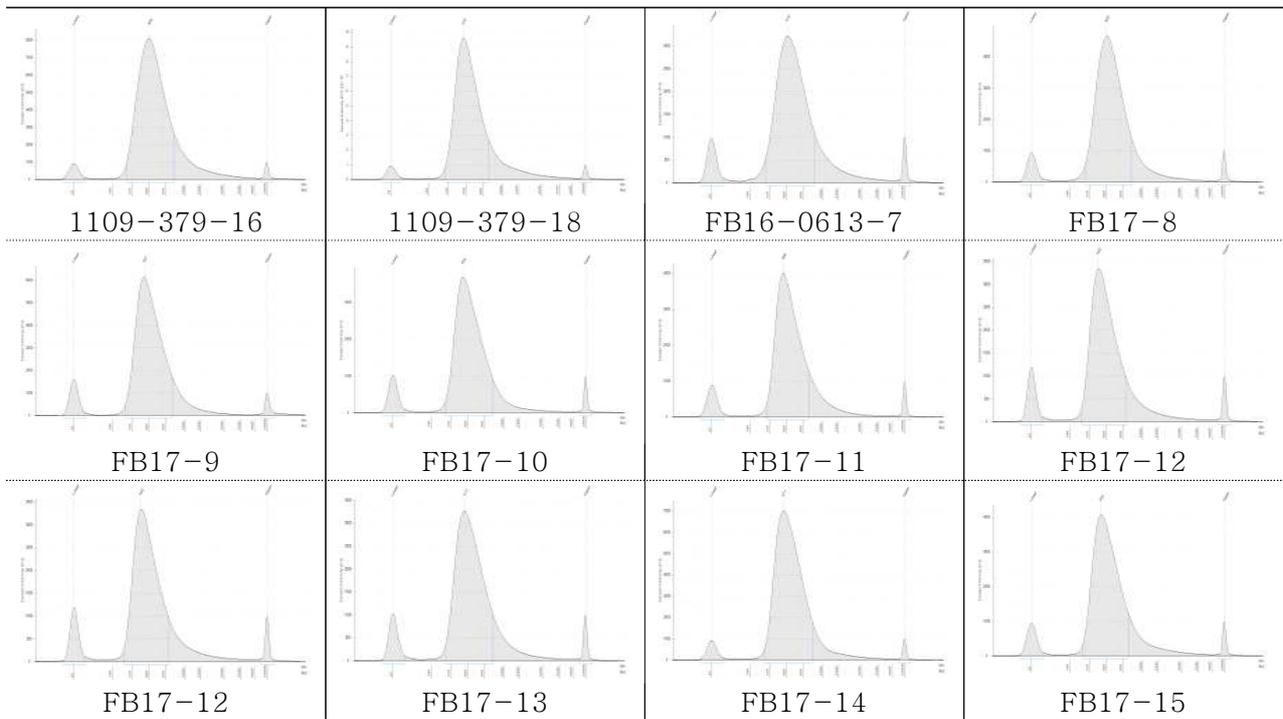


표 11. Illumina Hiseq. 시퀀싱을 위한 과수화상병균의 genomic library 제작 QC 결과 6

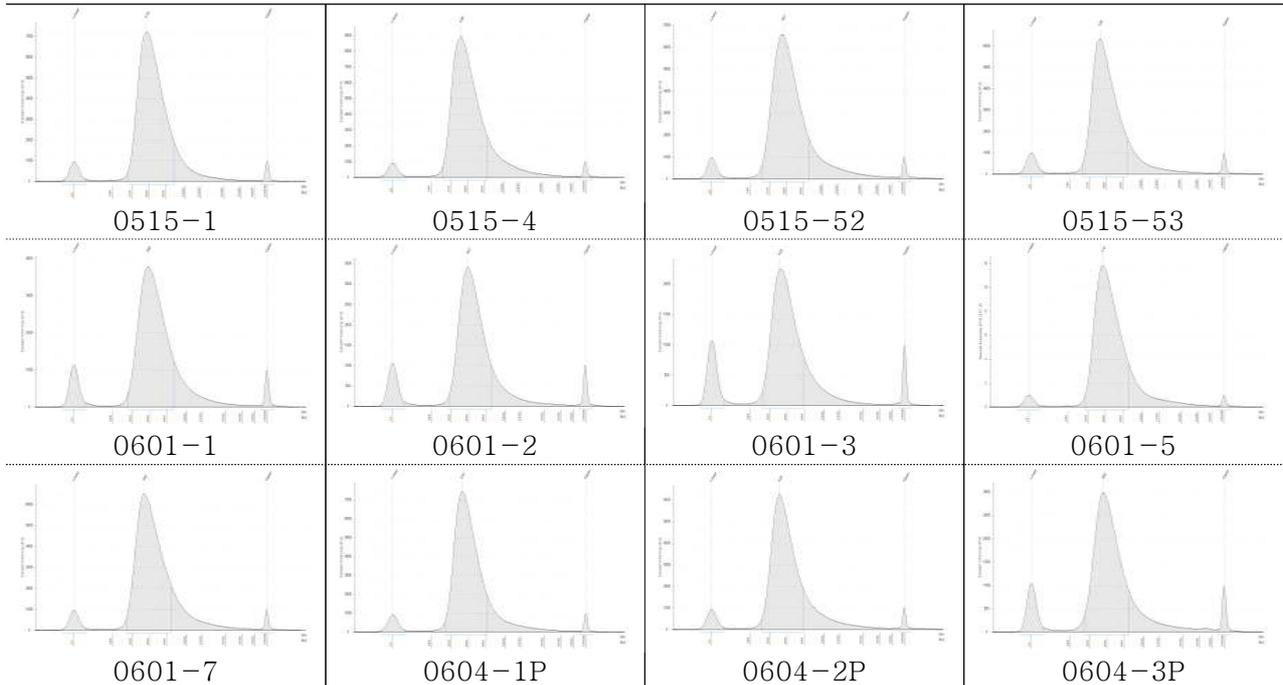
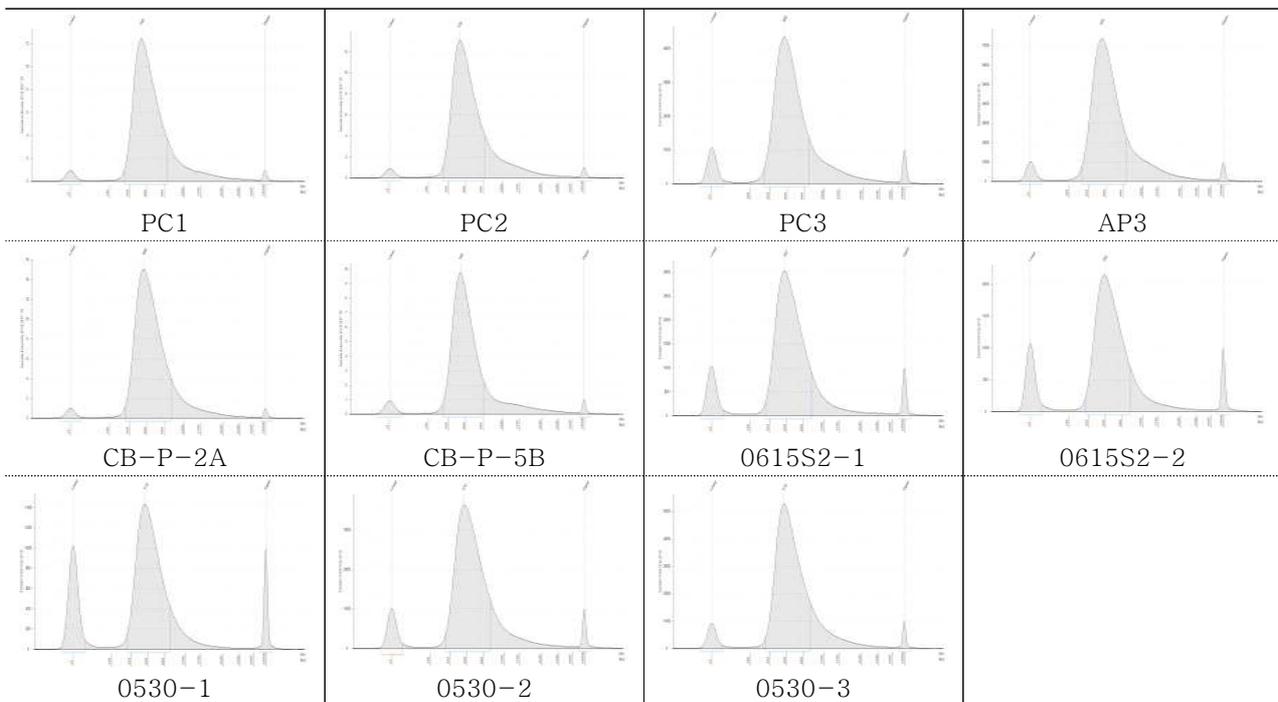


표 12. Illumina Hiseq. 시퀀싱을 위한 과수화상병균의 genomic library 제작 QC 결과 7



- 과수화상병균의 whole genome 시퀀스 분석

- ① Sequence pre-processing

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

- ② Alignment to reference genome

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

③ Raw SNP detection 및 Consensus sequence 추출

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

④ Generate SNP matrix

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

*** SNP 유형 구분 기준 ***

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

*** Nucleotide N, n 의 차이 ***

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

⑤ SNP filtering

- 분석에 이용 가능한 수준의 SNP marker는 아래 기준으로 필터를 수행
- SNP loci of biallelic
- min. depth ≥ 3
- minor allele frequency $> 5\%$
- missing data $< 30\%$

표 13. 각 샘플별 SNP filtering 결과

Sample	Total	No. of homozygous SNP (readrate \geq 90%)	No. of heterozygous SNP (40% \leq readrate \leq 60%)	No. of etc. SNP (20% \leq readrate $<$ 40%, 60% $<$ readrate $<$ 90%)
0530-1	311	263	0	48
0530-2	311	264	1	46
0530-3	307	263	0	44
0614-KAM-1-1	309	265	1	43
0614-KAM-1-2	307	265	1	41
0614-KAM-2-1	305	265	1	39
0614-KAM-2-2	308	264	1	43
1106-1P-3	307	264	0	43
1106-1P-4	305	264	1	40
0515-52	312	268	0	44
0515-53	307	264	0	43
0613A-1	302	258	1	43
0613A-2	303	258	1	44
0613A-3	299	256	1	42
0613A-4	303	259	1	43
0613A-5	301	260	1	40
0613B-1	303	262	1	40
0613B-2	301	260	1	40
0613B-3	303	259	1	43
0613B-4	302	260	1	41
0613B-5	303	261	1	41
0613C-1	302	259	0	43
0613C-2	301	258	1	42
0613C-3	303	260	1	42
0613D-1-1	303	261	1	41
0613D-1-2	303	261	1	41
0613D-1-3	304	262	1	41
0613D-1-5	305	261	1	43
0613D-2-1	302	258	1	43
0613D-2-4	301	258	1	42
0613D-2-5	301	258	1	42
1107-11P	305	266	2	37
1107-17P	313	268	1	44
1107-23P	310	270	0	40
0720-1	307	262	2	43
0720-2	307	261	1	45
0720-3	308	262	0	46
0729-1	308	260	1	47
0729-3	304	261	0	43
0730-1	305	259	1	45
0730-2	307	263	1	43
0730-3	302	261	0	41
0730-4	305	261	0	44
0730-5	303	260	2	41
1109-379-16	308	262	1	45
1109-379-18	307	265	3	39
0515-1	305	264	2	39
0515-4	306	263	0	43
0608-1	312	266	1	45
0608-2	311	266	1	44
0608-3	312	265	2	45
0608-4	309	266	1	42
0608-5	311	265	1	45

0615-SIM-1-1	306	263	1	42
0615-SIM-1-2	309	264	1	44
0615-SIM-2-1	311	266	0	45
0615-SIM-2-2	310	265	1	44
0616-JANG-1	307	262	1	44
0616-JANG-3	304	262	0	42
0601-1	305	259	0	46
0601-2	303	259	1	43
0601-3	301	258	0	43
0601-5	304	259	1	44
0601-7	303	259	0	44
0604-1P	300	261	0	39
0604-2P	306	262	1	43
0604-3P	305	263	0	42
PC1	308	261	1	46
PC2	308	263	2	43
PC3	309	264	1	44
AP3	310	264	2	44
CB-P-2A	305	263	0	42
CB-P-5B	306	261	1	44
FB16-0613-7	304	261	1	42
FB17-8	302	258	0	44
FB17-9	302	259	0	43
FB17-10	302	257	0	45
FB17-11	301	257	0	44
FB17-12	301	259	1	41
FB17-13	303	258	0	45
FB17-14	301	258	2	41
FB17-15	301	259	1	41

○ 국내 지역별, 기주별 수집된 과수 화상병균 분리주들의 NGS 집단 분석

- Phylogenetic tree 분석

- 필터과정을 거쳐 선발된 대표 SNP를 MEGA6 프로그램을 사용하여 유연관계 분석을 수행하였음(그림 11).

- Phylogenetic tree 분석은 Neighbor-joining method를 이용하여 실시하였으며 bootstrap은 1000으로 수행함.

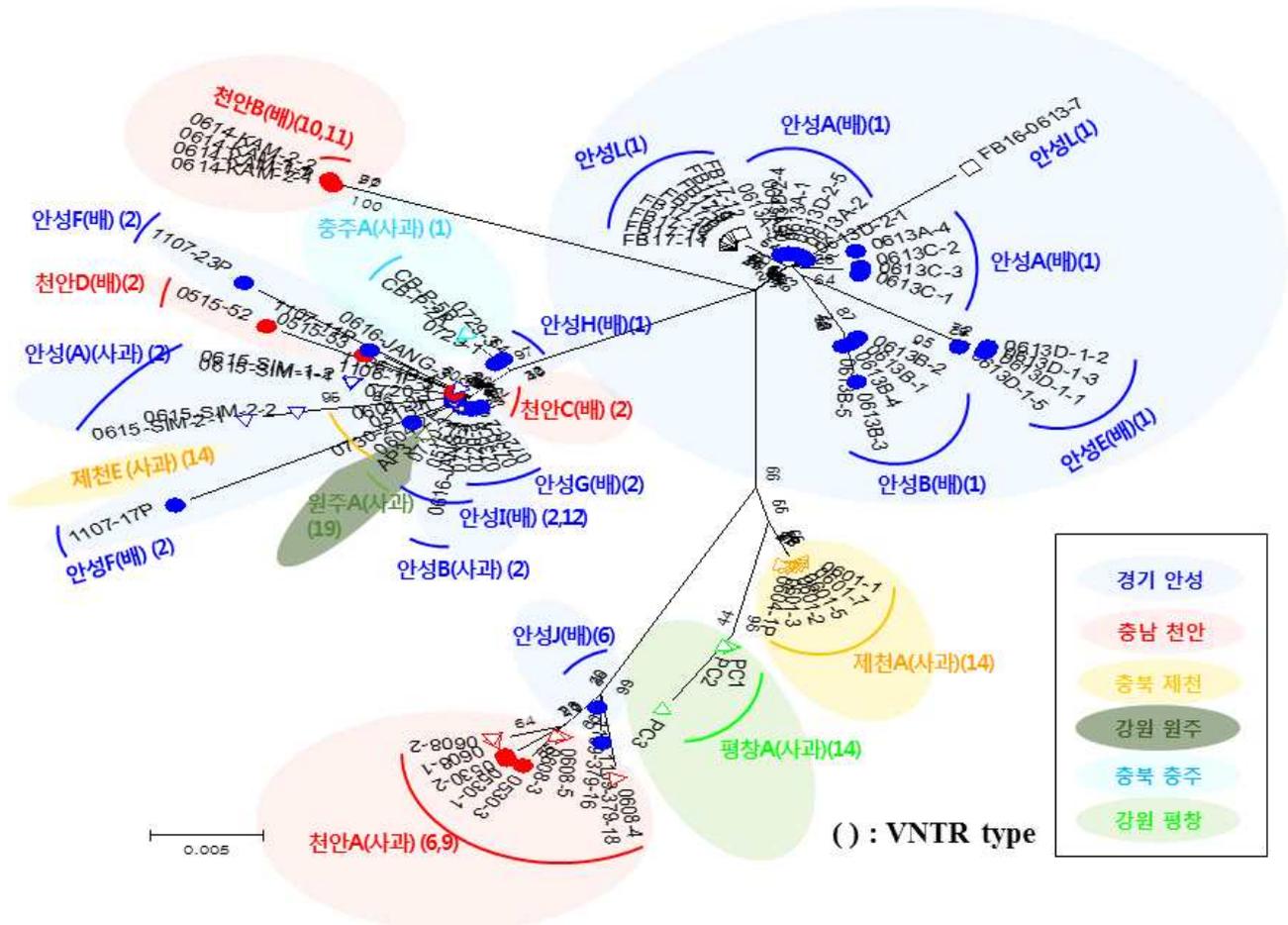


그림 11. Genome-wide SNP를 이용한 과수화상병균 분리주들의 phylogenetic tree 분석

- 화상병균의 유전체를 분석한 후 genome-wide SNP를 이용하여 phylogenetic tree를 작성한 후 각 기주별, 분리 지역별 차이를 확인함

- 화상병균 분리주의 분리 지역은 크게 경기 안성, 충남 천안, 충북 제천, 강원 원주, 충북 충주, 강원 평창으로 구분하였으며 각 지역별 색깔을 통해 표시함

- Phylogenetic tree는 화상병균의 분리 포장별 하나의 clade로 묶이는 것을 확인 할 수 있었으며, 이러한 분석 결과는 향후 화상병균의 국내 확산 경로 추적에 기초 데이터를 제공할 것임.

- Phylogenetic tree에서는 전체 분리주들이 안성 지역에서 분리된 균주로부터 tree가 분지되는 형태를 확인할 수 있음. 참고적으로, 화상병균은 2015년 안성 지역에서 처음 발생이 확인된 이후 천안, 제천, 원주, 평창, 충주 등에서 추가로 발생이 확인되고 있음.

- 과수화상병균의 기주인 사과와 배에 따른 특이적 SNP는 찾지 못하였으며 이는 기주 특이성이 매우 낮거나 없는 것으로 여겨짐
- 과수화상병균의 genetic structure 분석에 주로 사용되고 있는 VNTR 마커 분석 결과와 본 과제에서 수행한 genome-wide SNP 분석 결과를 비교하였을 때 genome-wide SNP 분석이 VNTR 분석 보다 높은 구분력을 나타냈으며 이러한 결과는 향후 과수화상병균의 역학조사에 SNP 마커 활용성이 높아질 것으로 여겨짐.

- Principal Component Analysis(PCA)

- 필터과정을 거쳐 선발된 대표 SNP를 R package SNPRelate을 이용하여 주성분 분석(PCA)을 수행함. 제1주성분과 제2주성분, 제3주성분을 plot으로 도식화하여 유연관계를 확인함(그림 12).
- PCA 결과를 보면 총 5개의 그룹으로 묶이는 것을 확인 할 수 있으며 안성 지역에서 분리된 분리주를 중심으로 평창과 제천에서 분리된 분리주들이 하나의 그룹으로 묶였고 천안 배와 사과에서 분리한 분리주와 안성 지역의 배에서 분리한 분리주가 하나의 그룹으로 묶였음.
- 천안(배), 안성(배), 안성(사과), 충주(사과), 제천(사과), 원주(사과) 등에서 분리한 분리주들이 또한 하나의 그룹으로 묶이는 것을 확인 할 수 있었으며 이는 phylogenetic tree와 동일한 결과로 확인됨.
- 또한 천안 배에서 분리한 분리주들은 기존 그룹들과 유전적 거리가 조금 떨어진 곳에서 spotting을 확인 할 수 있었음.

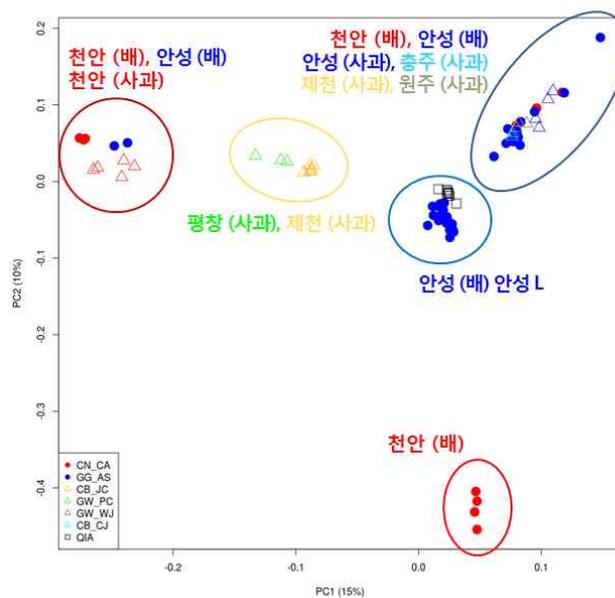


그림 12. Genome-wide SNP를 이용한 과수화상병균 분리주들의 PCA 분석

- Population genetic structure

- Genome-wide SNP는 필터과정을 거쳐 선발된 대표 SNP를 STRUCTURE v2.3.4 프로그램을 이용하여 population structure 분석을 수행함(그림 13).

- 분석에 사용한 화상병균 분리주들이 유전적으로 몇 종류의 조상으로부터 분화되어 내려 왔는지 조사하기 위해 Delta K 분석을 실시하였으며 Delta K 가 가장 높은 값이 3으로 확인되었음.
- 안성과 천안에서 분리된 분리주의 경우 3개의 그룹에 모두 속한 것으로 유전적으로 다양한 분리주들이 혼재되어 있는 것을 확인 할 수 있었음.
- 평창과 제천에서 분리된 분리주는 phylogenetic tree의 결과와 같이 천안과 안성 분리주와 하나의 그룹으로 나타났음.

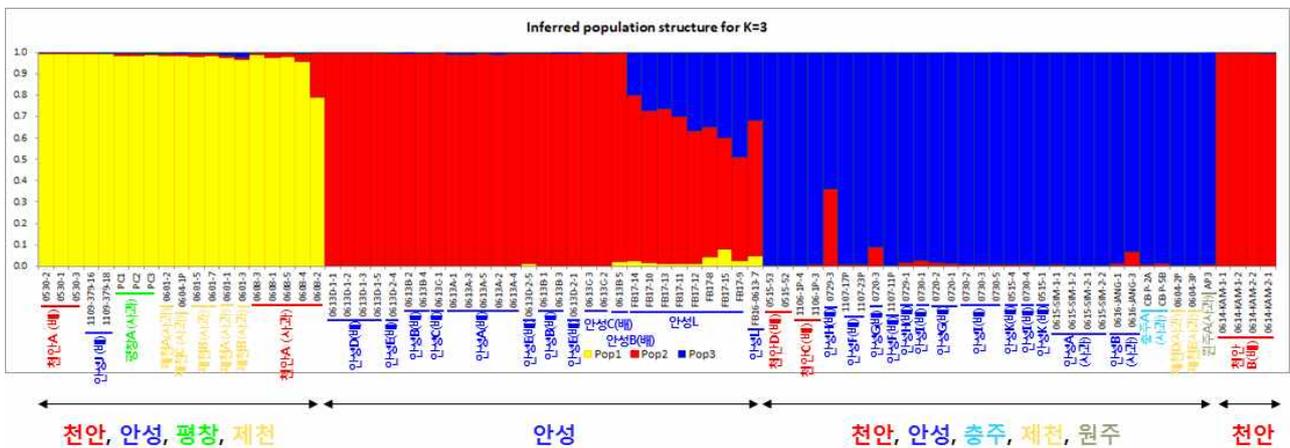
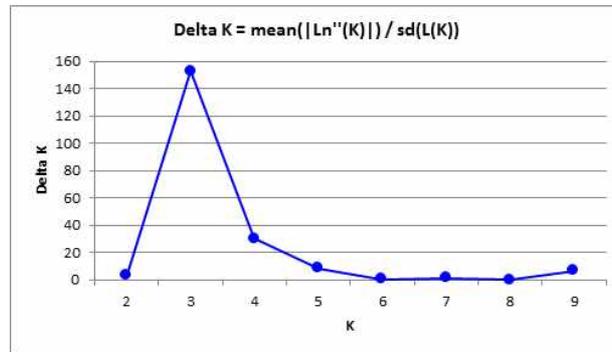
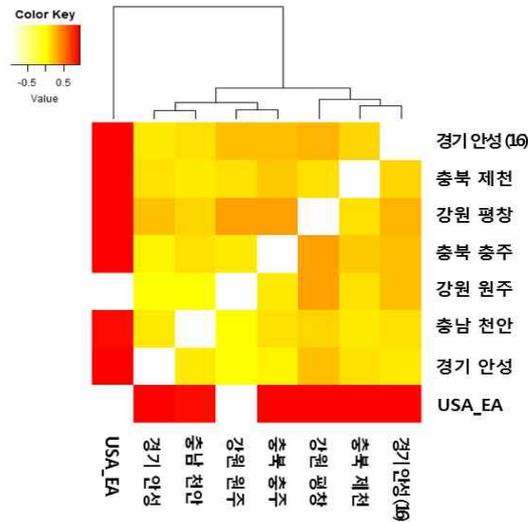


그림 13. Genome-wide SNP를 이용한 과수화상병균 분리주들의 Genetic structure 분석

- Genetic distance 및 distance heat map
 - 화상병균 분리주 집단의 각 지역별 유전적 차이를 확인하기 위해 genetic distance와 distance heat map을 수행하였음(그림 14).
 - Phylogenetic tree, PCA, structure 분석을 통해 각 지역 군집별로 유전적으로 다양한 타입의 분리주들이 혼재되어 있는 것을 확인하였고, 이번 분석에서는 지역적인 관점에서의 각 지역별 유전적 차이를 비교 분석하였음.
 - Genetic distance는 0에서 1까지의 수치로 나타내며 0에 가까울수록 유전적으로 가까운 것이고 1에 가까울수록 유전적으로 거리가 먼 것을 뜻함.
 - 국내에서 분리한 과수 화상병의 경우 reference로 사용한 미국 균주와는 확연히 유전적으로 다른 것을 확인 할 수 있으며, 국내 분리주 사이에서는 대부분 0.3 이하의 유전적 거리를 확인 할 수 있었음.

- Genetic structure 결과와 같이 충북 제천 군주와 안성 군주가 매우 유사한 것을 확인할 수 있었고 이 두 개의 집단 분리주들은 평창 분리주와 가장 가까운 결과를 확인할 수 있었음.
- 충남 천안 분리주는 경기 안성 분리주와 유전적으로 가장 가까운 결과를 확인할 수 있었고 강원 원주 분리주는 충북 충주 분리주와 유전적으로 가장 가까운 결과를 확인할 수 있었음.



	충북충주	충북제천	충남천안	경기안성	강원평창	강원원주	안성(16)	USA_EA
충북충주	NA	0.1931	0.1254	0.055	0.3724	0.0981	0.2321	0.9555
충북제천	0.1931	NA	0.0829	0.12	0.1175	0.146	0.1779	0.9347
충남천안	0.1254	0.0829	NA	0.0841	0.1655	0.0094	0.144	0.9028
경기안성	0.055	0.12	0.0841	NA	0.2571	-0.0183	0.0859	0.9279
강원평창	0.3724	0.1175	0.1655	0.2571	NA	0.3725	0.3007	0.9483
강원원주	0.0981	0.146	0.0094	-0.0183	0.3725	NA	0.2517	NA
안성(16)	0.2321	0.1779	0.144	0.0859	0.3007	0.2517	NA	0.9514
USA_EA	0.9555	0.9347	0.9028	0.9279	0.9483	NA	0.9514	NA

그림 14. Genome-wide SNP를 이용한 과수화상병균 분리주들의 Genetic distance 분석

- 국내에서 분리한 82개의 과수화상병균 분리주의 유전체 분석으로 genome-wide SNP를 선발 할 수 있었고, 이를 바탕으로 다양한 집단 분석 통해 각 분리주들의 집단 내 유전적 차이와 분리 지역간 유전적 차이를 확인할 수 있었음
- Phylogenetic tree 결과를 보면 대부분 화상병균이 분리된 포장별로 하나의 clade로 묶여 분리 지역별 유전적 차이를 확인할 수 있었으며 이를 이용해 향후 과수 화상병균의 국내 확산 경로 등을 추적하는데 기본 정보를 줄 수 있을 것이라고 여겨짐

- 국내 과수화상병균 발병 발견 이후 염기서열이 해독된 전체 화상병균 분리주들의 집단 유전체 분석(2015년 - 2018년 분리주 포함)
 - 2015년 이후 국내에서 과수화상병이 발병된 이후로, 유전체가 완전 해독된 2015, 2016년도의 균주들과 함께 2017, 2018년 균주들의 NGS 데이터와 통합하여 집단 유전체 분석을 수행함
 - 분리주간 변이서열을 이용하여 국내에서 발생한 과수화상병균의 집단 유전체 분석을 수행하기 위해 Illumina HiSeq 2500 대용량 염기서열 해독기기를 사용하여 2015년도 5개의 균주들과 완전 유전체 해독 균주를 포함한 총 97개 균주의 whole-genome shotgun sequencing 서열들을 분석함. 2017, 2018년도에 안성, 천안, 제천, 원주, 충주, 평창 지역에서 발생한 과수 화상병균 균주들이 추가 염기서열 해독 대상이 되었으며, 동일 과원에서 채집, 분리된 균주들이 다수 포함되어있음.
 - HiSeq 2500으로 해독된 유전체 염기서열들은 Sickle 프로그램을 이용하여 quality trimming을 하였고, BWA alignment 프로그램을 이용하여 2015년도 균주 FB207 균주의 완전 유전체 서열에 mapping을 진행함.
 - mapping 결과로부터 Picard 프로그램을 이용하여 duplicate read들을 제거한 후, samtools 프로그램을 이용하여 genotype likelihood를 계산하고, VarScan 프로그램을 이용하여 SNP를 추출함. 그 결과, 국내 균주 사이의 SNP 114개가 도출되었으며, CFBP1430의 서열 비교 결과를 참여시켜 SNP를 추출한 경우, 134개의 SNP가 수집되었음. 국내 화상병균 균주에 대한 집단 구조를 파악하기 위해 non-parametric approach가 적용된 AWcluster 프로그램을 이용하여 allele sharing distance를 계산하고 집단 구조를 분석한 결과, 분석에 포함된 국내 화상병균들이 5개의 cluster로 구성되어 있음을 파악할 수 있었음(그림 15).
 - 추출된 SNP 서열을 가지고 Jukes-Cantor model 사용, bootstrap value를 100으로 하여 ML(Maximum Likelihood) phylogenetic tree를 작성함. 집단 구조 및 계통유전학적 분석 결과를 보았을 때, 본 분석에서 도출된 SNP 정보를 가지고는 크게 두 개의 그룹으로 즉, 2015, 2016, 2017년도 안성, 천안, 제천 평창에서 분리된 균주들과 2017, 2018 년도 충주, 안성, 천안, 원주, 제천에서 분리된 균주들로 나누어지는 것을 파악할 수 있었음.
 - 완전 유전체 서열의 core gene set를 이용한 계통유전체학적 유연관계 분석결과와 같이 기주, 연도, 지역 등 메타정보와의 상관관계가 뚜렷하게 구별 되지는 않았으나, 2015년 균주가 안성, 천안, 제천 등 분리 지역이 다름에도 가까운 근연관계에 있으며, 한 과원에서 분리된 균주는 거의 동일한 SNP genotype을 가지고 있는 것으로 나타났음.

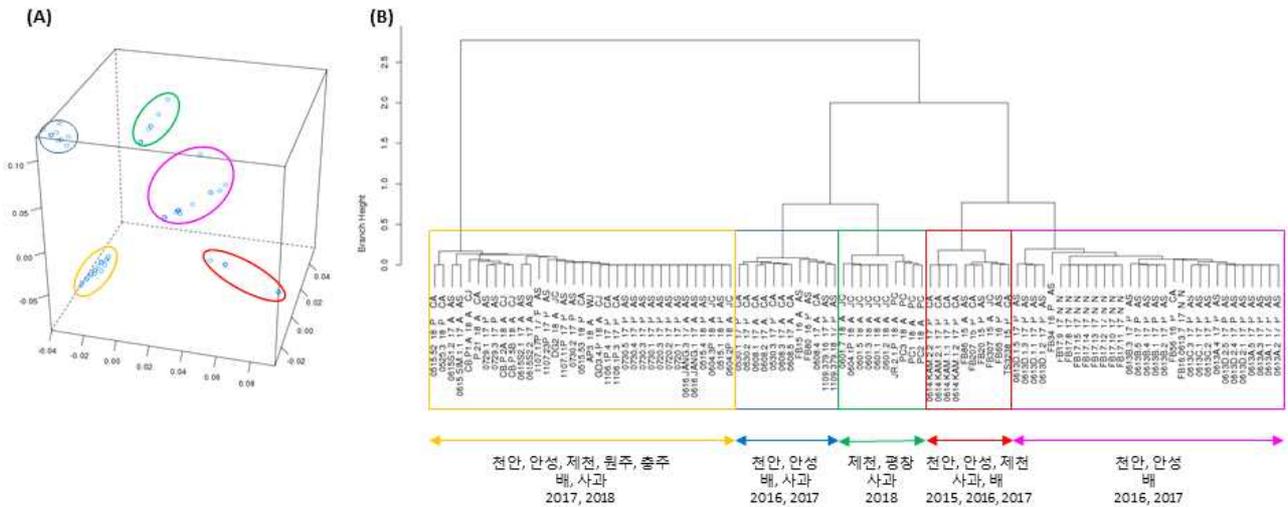


그림 15. 대용량 유전체 염기서열 해독 및 분석을 통한 국내 화상병균 집단 유전체 구조 분석을 3차원 및 hierarchical plot으로 도식화 한 결과

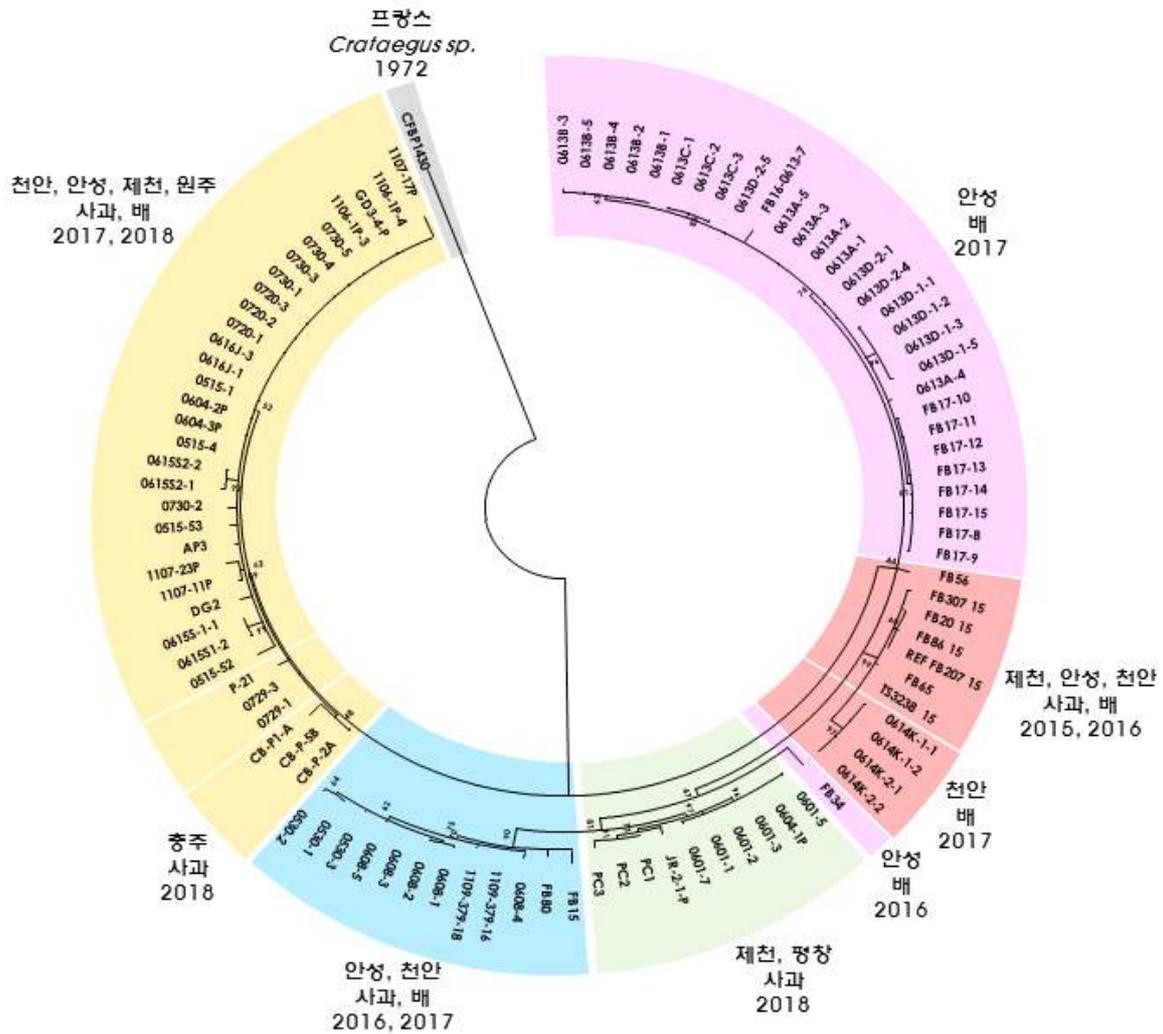


그림 16. 집단 분석을 통해 도출된 SNP를 이용한 phylogenetic tree 작성

(라) 2018년 발병 화상병균 유전체를 이용하여 발굴한 바이오마커 유전자의 검증 및 안정성 확인

○ 화상병균 유전체 비교 분석 기반의 화상병균 탐지 바이오마커 발굴

- *Erwinia* 속 및 국내외 *E. amylovora*를 구별하기 위한 균주 특이적 서열 탐색
 - *E. amylovora*와 다른 *Erwinia* 속의 종들을 구별하기 위한 염기서열을 포함하는 염기서열 단편을 선별, 국내 *E. amylovora*와 국외 *E. amylovora*를 구별할 염기서열을 구별하기 위한 바이오마커를 개발하고자 함. *E. amylovora*는 생리학적, 형태학적으로 유사한 *E. pyrifoliae*와 육안으로 구별하기 어렵고, 병징 또한 유사하여 쉽게 구별하여 화상병을 진단하기 어려운 경우가 있음. 따라서 신속하고 정확하게 균주를 판별하는 것이 화상병의 확산을 방지하는데 중요하므로, *E. amylovora*를 다른 *Erwinia* 속과 구별하기 위한 바이오마커가 필요함.
 - 또한 국내 균주와 국외 균주를 구별함으로써 화상병균의 국내외 도입과 반출과 관련한 검역 통제 기준을 마련하는 것도 중요하다고 판단하여, 이 두 가지 종류의 마커를 유전체 비교를 통해 발굴하고자 하였고, *Erwinia* 속 간의 수많은 SNP와 *E. amylovora* 균주 단위에서의 SNP 분석 결과를 가지고, 각각의 특이적 서열을 동시에 가지고 있는 유전자 부위를 선별하고자 함.
 - PNA probe를 이용하는 Real-time PCR 진단법에 적용 가능한 SNP 서열을 진단 및 판별 타겟으로 사용하기로 하였으므로, 두 가지 전략으로 마커 서열을 발굴하고자 함.
 - 첫 번째는 하나의 PCR 증폭 지역 내에 probe 하나를 사용하여 *E. amylovora*와 *E. pyrifoliae*를 구분하고 동시에 국내외 *E. amylovora*를 구별하는 마커를 개발을 목표로 함(그림 17A, B). 즉, 약 15mer 내외의 염기서열단편 내에 *E. amylovora* 및 다른 *Erwinia* 종 사이의 특이적 서열이 존재할 경우, PNA probe의 Tm 값이 변화되어 균주 구별이 가능할 수 있으므로, PNA probe 내에 포함되어 있는 특이적 서열이 2개의 SNP 혹은 1개의 SNP에 존재하는 조건을 충족하는 마커 후보들을 선별하고자 함.
 - 두 번째 전략은 약 180bp의 PCR 증폭 산물에 대해 *E. amylovora*와 *E. pyrifoliae*를 구분하고 동시에 국내외 *E. amylovora*를 구별할 수 있는 각각의 두 종류의 probe를 제작, 검출하는 방법을 사용하고자 함(그림 17C).

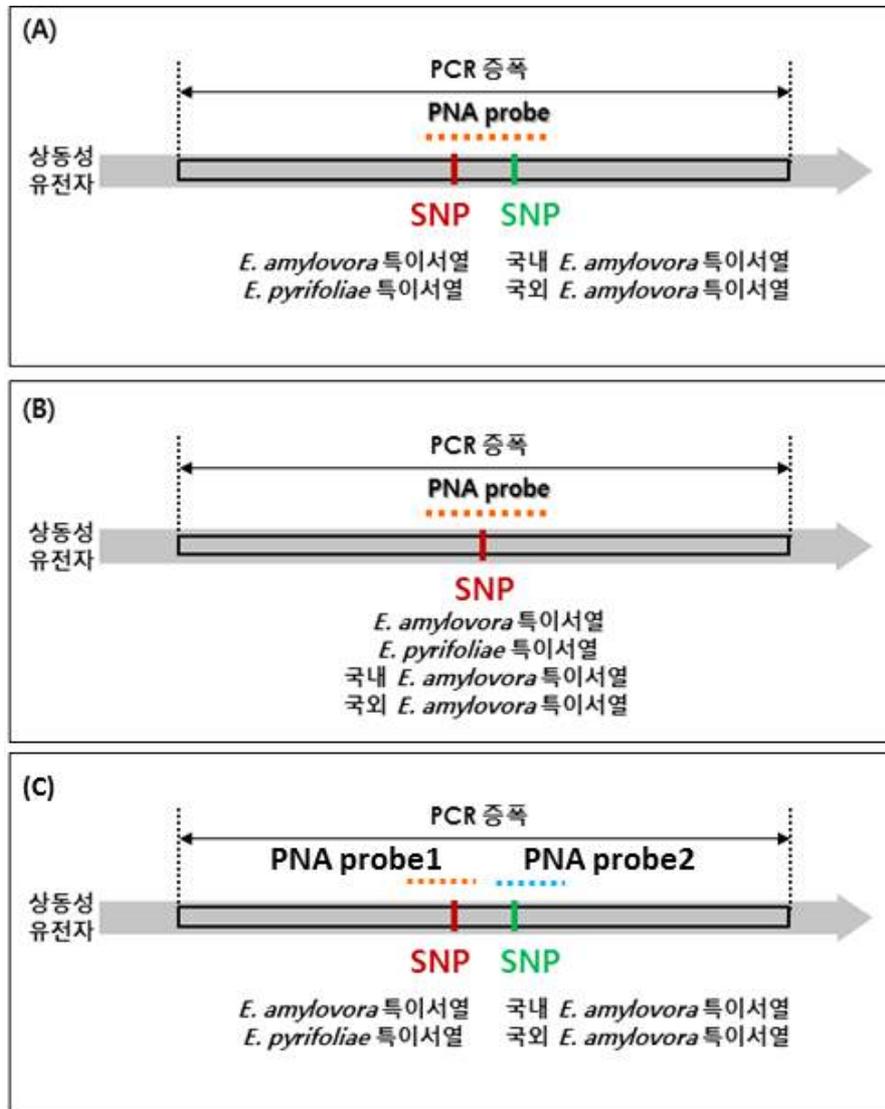


그림 17. *Erwinia* 속 및 국내외 *E. amylovora*를 구별하기 위한 특이적 염기서열 발굴 전략

- 바이오마커로 이용 가능한 SNP의 선별을 위해 먼저 국내 *E. amylovora*를 구분할 수 있는 SNP들을 *E. amylovora* CFBP 1430, ATCC 49946 완전 유전체 서열과 비교하여 국내 특이적 서열을 선별하고, 이후 *E. amylovora* 및 *E. pyrifoliae* 유전체 서열 사이의 alignment를 통해 나온 SNP들의 목록과 위치들을 비교하여 선별할 SNP 목록 범위를 더 한정시킴.
- 또한 유전자 위치에 있는 SNP만을 선별하기로 하였고, 특히 특이적 서열들을 포함하는 유전자가 비교 구별 대상인 모든 균주에 하나씩 존재하는 코어유전자일 경우만을 고려하기로 함.
- 코어유전자를 도출하기 위해 BlastP 실행시, identity 50%, coverage 50%의 조건으로 2,016개의 코어유전자를 선별하는 한편, 코어유전자를 조금 더 엄격한 기준으로 두어 효과적으로 특이적 서열을 포함하는 유전자를 선별하기 위해 identity 85%, coverage 80% 조건을 충족하는 1,009개의 코어유전자들을 구함.

- 먼저 엄격한 기준의 코어유전자세트에 포함된 SNP 서열로부터 특이적 서열을 선별하였고, 이후 identity 50%, coverage 50%의 조건의 코어유전자들 내에 존재하는 SNP 서열도 검토하여, *E. amylovora* 및 국내 *E. amylovora* 를 특이적으로 검출하기 위한 서열 목록을 선별, 수집함.
 - 특이적 서열이 포함된 유전자들을 clustalW를 이용하여 alignment 하였고, 정렬된 유전자 서열 사이에 *E. amylovora* 특이적, 국내 *E. amylovora* 특이적 서열을 모두 포함하는, probe로 사용 가능한 부위들을 확인하여 마커 후보들을 선별함.
 - 한편, 하나의 PCR 산물에 대해 두 개의 특이적 서열을 포함하는 두 종류의 probe가 적용가능한 부위도 함께 탐색함. *E. amylovora* 또는 *E. pyrifoliae*의 특이적 서열 부위는 가능한 다른 *Erwinia* 속의 염기서열과 일치하지 않는 *E. pyrifoliae*에 특이적 서열을 우선으로 하여 선별함.
- *Erwinia*속 및 국내외 *E. amylovora* 판별용 후보 바이오마커 선별
 - 상기의 바이오마커 선별 전략을 통해 총 10개의 유전자 부위에 대한 염기서열 alignment를 확인하여 바이오마커 후보들을 선별하였음(표 14, 15, 그림 18-27). 그림 8-17에는 유전자 alignment 결과가 도식화 되어 있고, 그림에서 첫 번째 마커 발굴 전략에 따라 하나의 probe에 국내외 *E. amylovora* 판별 서열과 *E. amylovora*과 *E. pyrifoliae*를 판별할 수 있는 서열이 포함된 경우는 붉은색 숫자로 표시하고, 두 번째 전략에 따라 약 180bp 내의 간격으로 나누어져 있는 두 개의 probe의 판별 서열이 포함된 경우에는 파란색 숫자로 표시함. 이후, 분석을 통해 발굴된 바이오마커 서열 및 유전자 정보들을 제1세부 과제에 제공함. 선별된 바이오마커 후보 유전자들은 이후 연차별 국내 화상병균 신규 완전 유전체 염기서열 해독 결과로부터 추출하여 마커 후보의 유전자 유실 여부, 변이 여부를 통해 안정성을 검증하였음.
 - 유전체 정보를 통해 선별한 10개의 마커 좌 중에서 SNP loci 주변 시퀀스가 conserve하여 프로브 디자인이 가능한 4개의 후보 군(FB2, FB3, FB4, FB5)을 이용하여 PNA probe를 합성하였음. 4개의 마커 후보 중에서 실제 시료에서 검증한 결과 최종적으로 형광 시그널이 가장 좋게 나오는 FB3(yjcD 유전자)와 FB5(potF 유전자) 마커를 이용하여 진단 kit를 개발하였음.

표 14. 한 probe 내에 화상병균 판별과 국내외 화상병균 판별 서열이 포함된 바이오마커 후보 선별 결과

<i>E. amylovora</i> CFBP1430													국내 <i>E. amylovora</i> SNP			<i>E. pyrifoliae</i> SNP		
번호	CFBP 1430 locus tag	CFBP 1430 유 전체내 SNP위치	Gene	Product	Start	End	CDS Size(bp)	CDS 방향	CDS 내 SNP 위치	Ref. base	Ref. codon	Ref. residue	base	codon	residue	base	codon	residue
1	EAMY _0262	310324	purH	phosphoribosylaminoimidazolecarboxamideformyltransferase	309406	310995	1590	-1	672	G	CAG	Q	a	CAa	Q			
	EAMY _0262	310323	purH	phosphoribosylaminoimidazolecarboxamideformyltransferase	309406	310995	1590	-1	673	G	GAT	D	a	aAT	N			
	EAMY _0262	310312	purH	phosphoribosylaminoimidazolecarboxamideformyltransferase	309406	310995	1590	-1	684	T	TAT	Y				c	TAc	Y
2	EAMY _0860	949123	EAMY _0860	putative ABC transport system, periplasmic component	948440	949225	786	1	684	G	GCG	A				c	GCc	A
	EAMY _0860	949124	EAMY _0860	putative ABC transport system, periplasmic component	948440	949225	786	1	685	A	AAA	K	g	gAA	E			
3	EAMY _1305	1376378	potF	putrescine ABC transport system, periplasmic component	1375698	1376807	1110	1	681	G	CAG	Q				a	CAa	Q
	EAMY _1305	1376390	potF	putrescine ABC transport	1375698	1376807	1110	1	693	C	GAC	D	t	GAt	D			

			system, periplasmic component														
4	EAMY_1676	1741710	sufB	FeS assembly protein SufB	1740451	1741944	1494	1	1257	T	CAT	H			c	CAC	H
	EAMY_1676	1741710	sufB	FeS assembly protein SufB	1740451	1741944	1494	1	1260	C	ACC	T			t	ACt	T
	EAMY_1676	1741716	sufB	FeS assembly protein SufB	1740451	1741944	1494	1	1266	G	CCG	P	a	CCa	P		
	EAMY_1676	1741710	sufB	FeS assembly protein SufB	1740451	1741944	1494	1	1275	G	GAG	E			a	GAa	E
5	EAMY_2263	2312048	yegN	Multidrug resistance protein	2309478	2312597	3120	1	2571	T	CTT	L			g	CTg	L
	EAMY_2263	2312050	yegN	Multidrug resistance protein	2309478	2312597	3120	1	2573	C	GCC	A	t	GtC	V		
	EAMY_2263	2312054	yegN	Multidrug resistance protein	2309478	2312597	3120	1	2577	T	TTT	F			c	TTc	F
6	EAMY_3283	3392174	yjcD	putative AzgA family transporter	3391337	3392686	1350	-1	513	A	GGA	G			t	GGt	G
	EAMY_3283	3392173	yjcD	putative AzgA family transporter	3391337	3392686	1350	-1	514	C	CTG	L	t	tTG	L		
7	EAMY_3487	3583272	livM	branched-chain amino acid ABC transport system, innermembrane component	3583077	3584351	1275	-1	1080	A	GGA	G			g	GGg	G
	EAMY_3487	3583259	livM	branched-chain amino acid ABC transport system, innermembrane component	3583077	3584351	1275	-1	1093	G	GTG	V	a	aTG	M		

				ponent														
8	EAMY_2308	2360008	yeiU	Inner membrane protein yeiU	2359764	2360471	708	1	245	G	CGA	R	a	CaA	Q			
	EAMY_2308	2360009	yeiU	Inner membrane protein yeiU	2359764	2360471	708	1	246	A	CGA	R				g	CGg	R
9	EAMY_2938	3037086	ribF	bifunctional riboflavin kinase/FMNadenyltransferase	3037059	3037997	939	-1	912	T	CGT	R	g	CGg	R	a	CGa	R

표 15. 두 종류의 probe에 화상병균 및 국내외 화상병균 판별 서열을 포함하는 추가 바이오마커 후보 선별 결과

번호	<i>E. amylovora</i> CFBP1430										국내 <i>E. amylovora</i> SNP			<i>E. pyrifoliae</i> SNP				
	CFBP 1430 locus tag	CFBP 1430 유전체내 SNP위치	Gene	Product	Start	End	CDS Size (bp)	CDS 방향	CDS 내 SNP 위치	Ref. base	Ref. codon	Ref. residue	base	codon	residue	base	codon	residue
1	EAMY_0262	310477	purH	phosphoribosylaminoimidazolecarboxamideformyltransferase	309406	310995	1590	-1	519	T	TTT	F				c	TTc	F
	EAMY_0262	310474	purH	phosphoribosylaminoimidazolecarboxamideformyltransferase	309406	310995	1590	-1	522	T	GAT	D				c	GAc	D
2	EAMY_0860	949018	EAMY_0860	putative ABC transport system, periplasmic component	948440	949225	786	1	579	A	GCA	A				g	GCg	A
	EAMY_0860	949185	EAMY_0860	putative ABC transport system, periplasmic component	948440	949225	786	1	746	G	CGG	R				a	CaG	Q

nent															
	EAMY _1676	1741572	sufB	FeS assembly protein SufB	1740451	1741944	1494	1	1257	T	ATT	I	c	ATc	I
3	EAMY _1676	1741621	sufB	FeS assembly protein SufB	1740451	1741944	1494	1	1260	T	TTG	L	c	cTG	L
	EAMY _1676	1741735	sufB	FeS assembly protein SufB	1740451	1741944	1494	1	1266	C	CAC	H	a	aAC	N
	EAMY _3487	3583389	livM	branched-chain amino acid ABC transport system, innermembraneco mponent	3583077	3584351	1275	-1	963	T	GCT	A	c	GCc	A
	EAMY _3487	3583425	livM	branched-chain amino acid ABC transport system, innermembraneco mponent	3583077	3584351	1275	-1	927	A	ACA	T	g	ACg	T
4	EAMY _3487	3583089	livM	branched-chain amino acid ABC transport system, innermembraneco mponent	3583077	3584351	1275	-1	1263	G	GAG	E	a(MN P)		
	EAMY _3487	3583090	livM	branched-chain amino acid ABC transport system, innermembraneco mponent	3583077	3584351	1275	-1	1262	A	GAG	E	g	Gga	G
	EAMY _3487	3583106	livM	branched-chain amino acid ABC transport system, innermembraneco	3583077	3584351	1275	-1	1246	C	CAA	Q	a	aAg	K

	EAMY _3487	3583143	livM	mponent branched-chain amino acid ABC transport system, innermembraneco mponent	3583077	3584351	1275	-1	1209	A	CAA	Q					g	CAG	Q
	EAMY _0274	327148	panF	Na+/panthothena te symporter	326820	328274	1455	-1	1127	G	GGG	G					t	GtG	V
	EAMY _0274	326999	panF	Na+/panthothena te symporter	326820	328274	1455	-1	1276	T	TTA	L	t	tCA	S		c	cTg	L
5	EAMY _0274	326978	panF	Na+/panthothena te symporter	326820	328274	1455	-1	1297	G	GCA	A							
	EAMY _0274	326929	panF	Na+/panthothena te symporter	326820	328274	1455	-1	1346	C	TCC	S					t	TtC	F

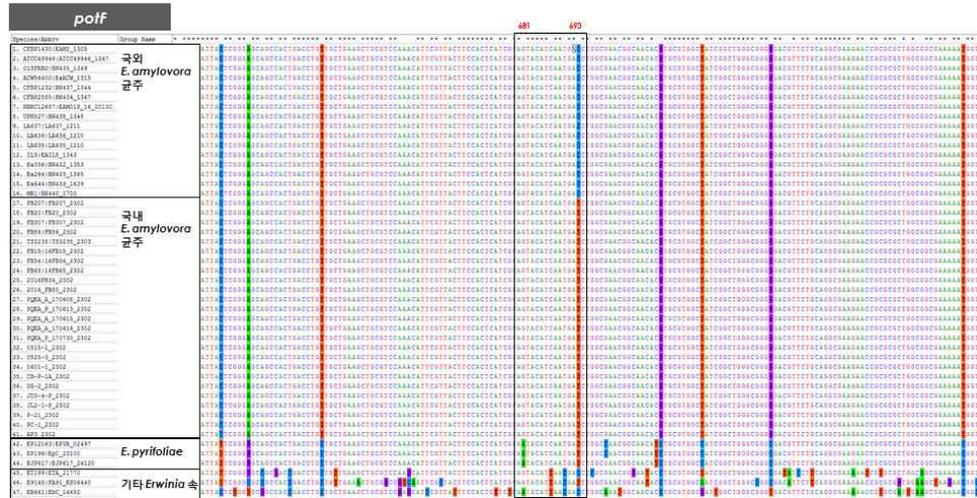


그림 20. *potF* 유전자 alignment 및 국내외 화상병균 *E. amylovora*와 그 외 *E. pyrifoliae* 및 *Erwinia* 속 균주를 위한 PNA probe 단편 서열 부위

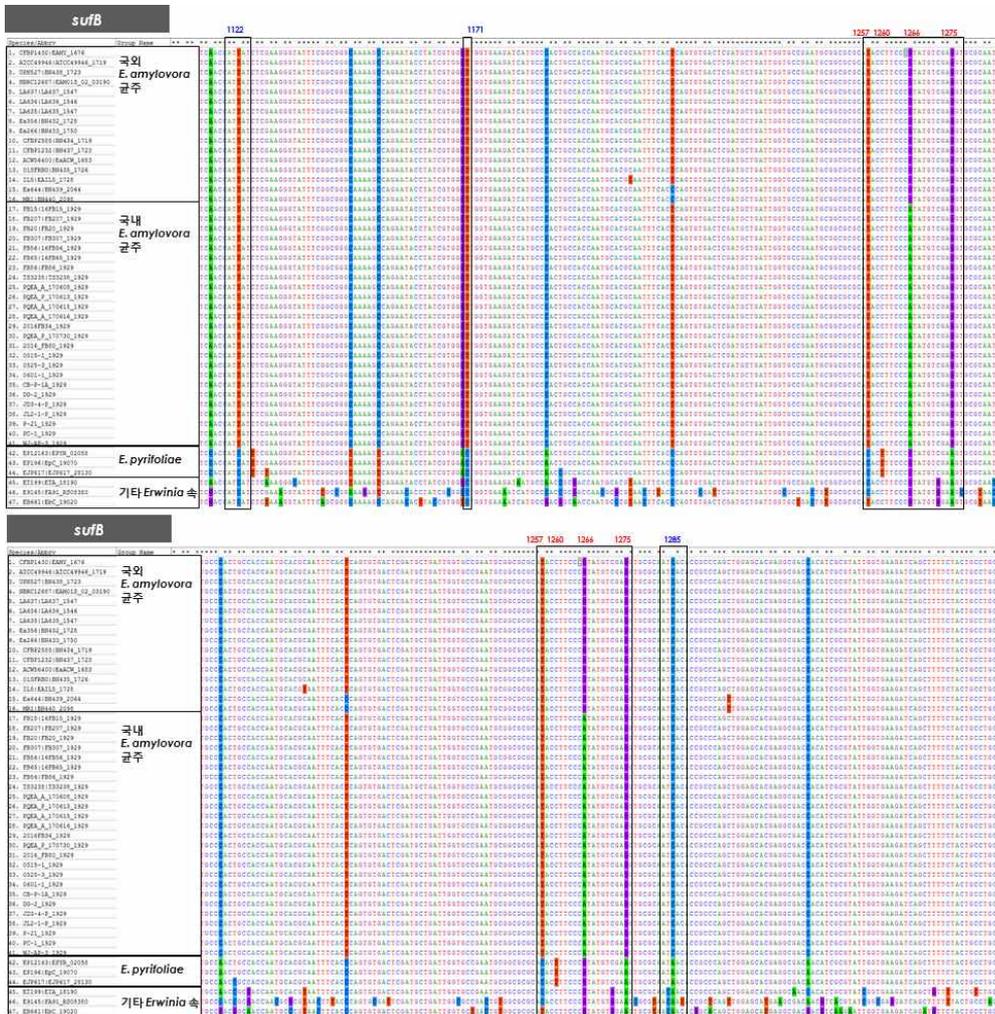


그림 21. *sufB* 유전자 alignment 및 국내외 화상병균 *E. amylovora*와 그 외 *E. pyrifoliae* 및 *Erwinia* 속 균주를 위한 PNA probe 단편 서열 부위

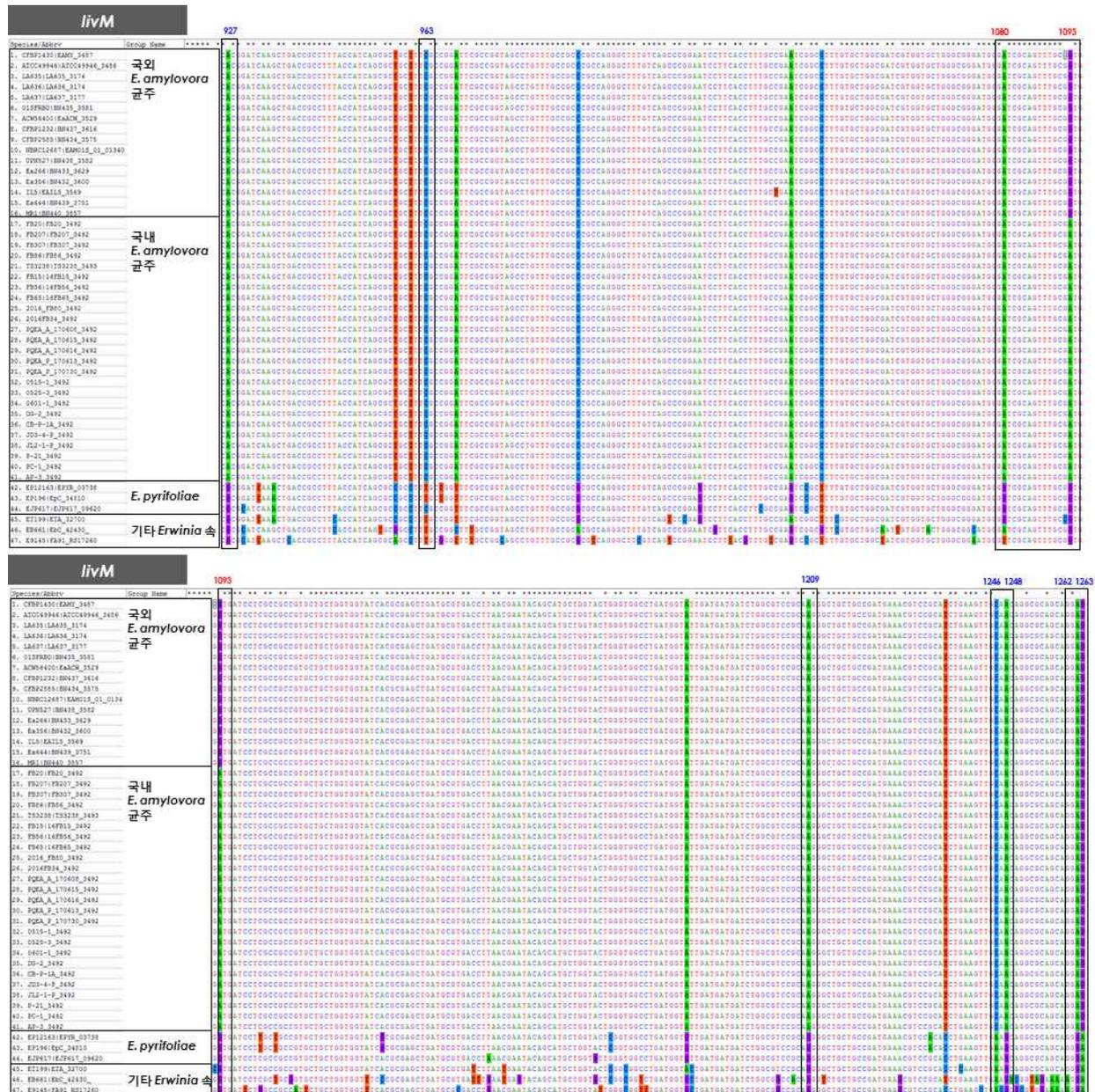


그림 24. *livM* 유전자 alignment 및 국내외 화상병균 *E. amylovora*와 그 외 *E. pyrifoliae* 및 *Erwinia* 속 균주를 위한 PNA probe 단편 서열 부위

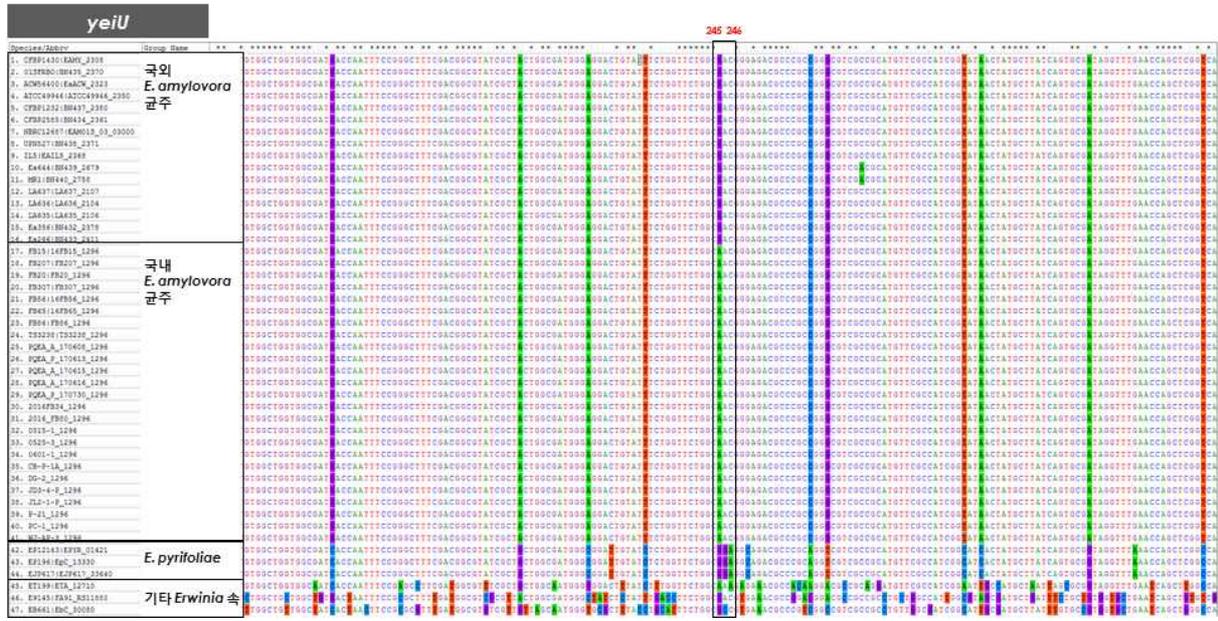


그림 25. *yeiU* 유전자 alignment 및 국내외 화상병균과 그 외 *Erwinia* 속 균주를 위한 PNA probe 서열 단편

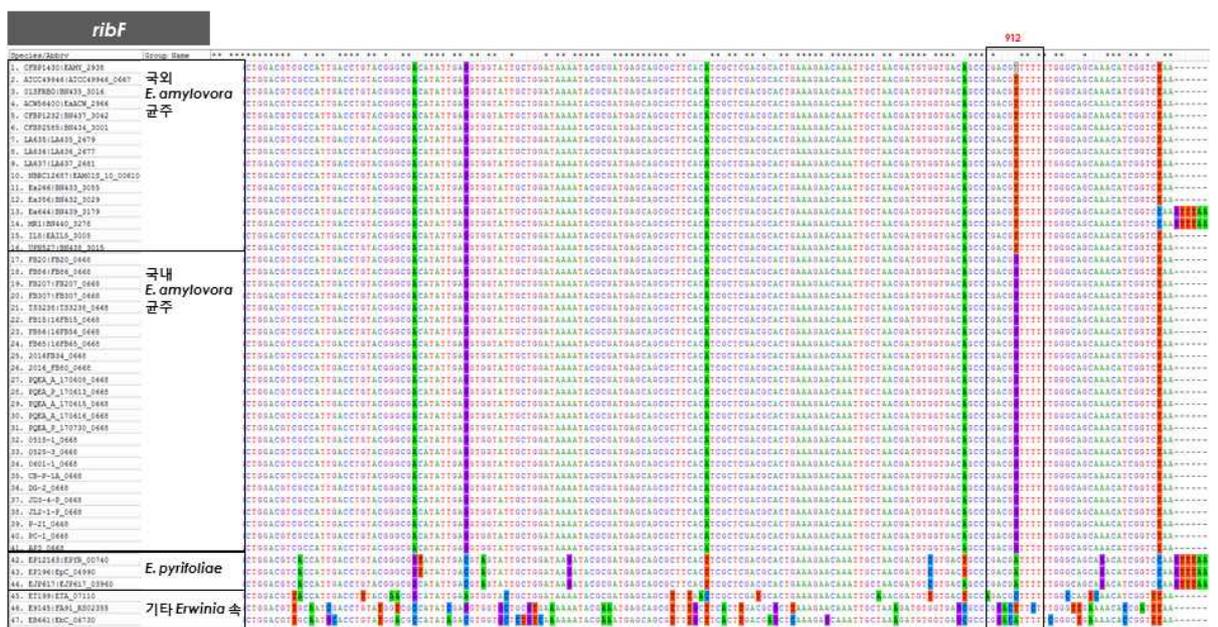


그림 26. *ribF* 유전자 alignment 및 국내외 화상병균 *E. amylovora*와 그 외 *E. pyrifoliae* 및 *Erwinia* 속 균주를 위한 PNA probe 단편 서열 부위

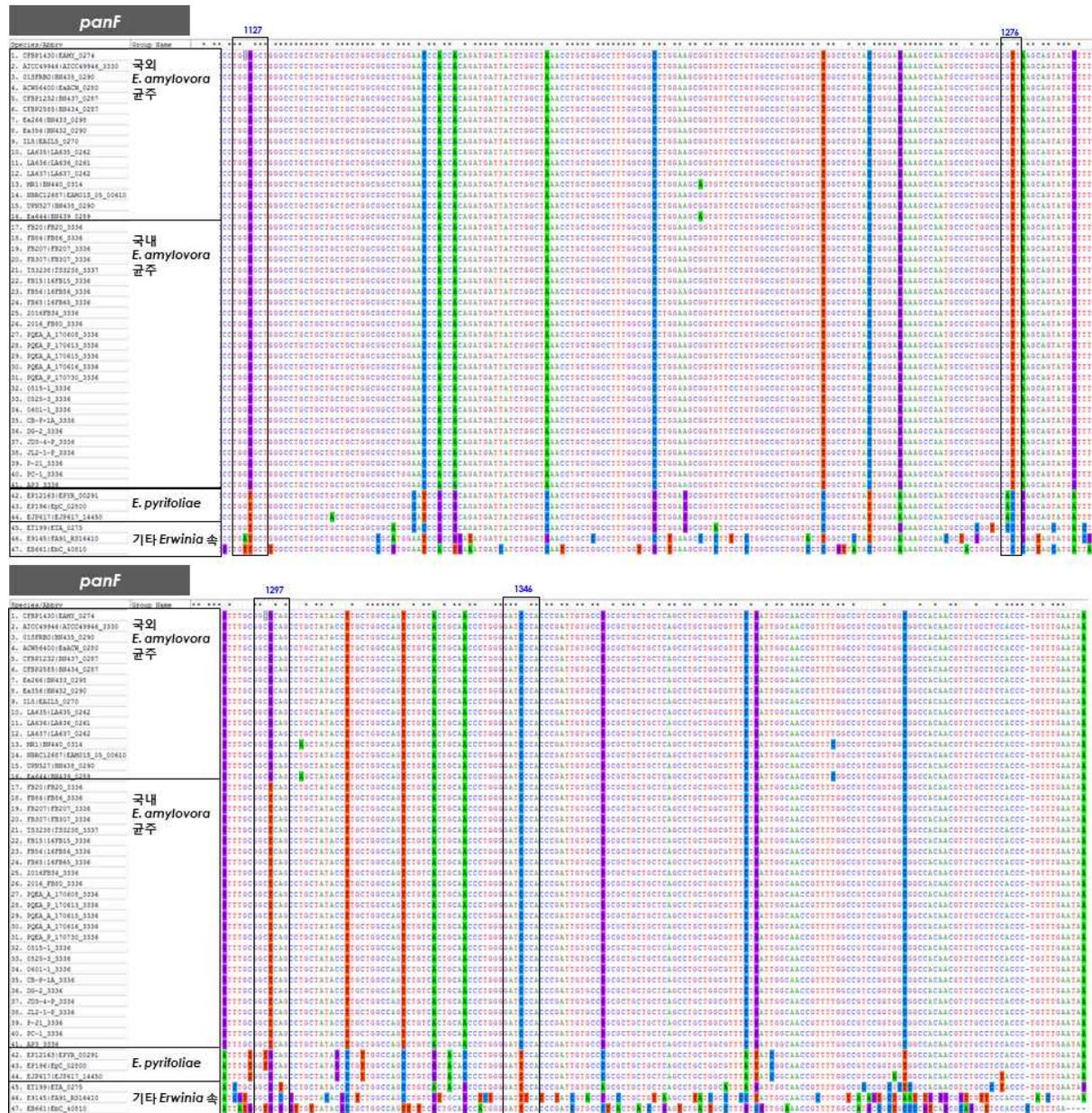


그림 27. *panF* 유전자 alignment 및 국내외 화상병균 *E. amylovora*와 그 외 *E. pyrifoliae* 및 *Erwinia* 속 균주를 위한 PNA probe 단편 서열 부위

(3) 과수화상병균 진단 바이오마커 개발

(가) 과수 화상병에 대한 기존 PCR 진단 marker 종류 및 검증

- 기존 과수 화상병 진단에 사용되는 방법은 크게 2가지 방법으로 PCR 방법과 선택배지를 사용하는 방법 그리고 세균 항혈청을 이용한 스트립 형태의 간이 키트 진단법 등이 있음

○ PCR

- 현재 PCR 방법으로는 conventional PCR 방법과 quantitative PCR 방법이 있음. Conventional PCR(cPCR) 방법은 primer를 제작하여 target으로 하는 band의 유무를 통하여 진단하였고, primer들은 많은 실험들을 통하여 알려져 있음.
- Quantitative PCR(qPCR) 방법으로는 SYBR green, Taqman probe를 사용하여 Real-time PCR을 실시하는 방법임.
- 먼저 cPCR의 진단 marker들을 살펴보면 *Erwinia*속 균주들을 진단 할 수 있는 primer는 표 3에 정리하였음. 이 중 13개 primer set에 대하여 PCR 진행을 실시함. cPCR 이후 염기서열을 확인 하게 되며, similarity와 phylogenetic tree를 통하여 최종 진단을 하게 됨.
- qPCR 의 진단 marker 또한 *Erwinia*속 균주들을 진단할 때 사용하며, 그 primer set은 표 4에 정리하였음. qPCR을 통한 Ct값들은 *E. pyrifoliae* 균주에서 빠르게는 16 cycle에서 나타나며, 가장 늦게 나타나는 값들은 19 cycle로 나타나며, 다른 *Erwinia* 속의 균주에서는 40 cycle이상으로 Ct값이 나타난다는 보고가 되어있음.(A. Wensing et al., 2011)

표 16. Conventional PCR에 사용되는 Primer 정보

No.	Primer set	Sequence	Expected amplicon size	Target strain
1	A	CGGTTTTTAACGCTGGG	900 – 1,100bp	<i>Erwinia amylovora</i>
	B	GGGCAAATACTCGGATT		
2	AJ75	CGTATTCACGGCTTCGCAGAT	844bp	<i>Erwinia amylovora</i>
	AJ76	ACCCGCCAGGATAGTCGCATA		
3	PEANT1	TATCCCTAAAAACCTCAGTGC	391bp	<i>Erwinia amylovora</i>
	PEANT2	GCAACCTTGTGCCCTTTA		
4	AMSbL	GCTACCAGCAGGGTGAG	1.6kb	<i>Erwinia amylovora</i>
	AMSbR	TCATCACGATGGTGTAG		
5	Ea71(1)	CCTGCATAAATCACCGCTGACAGCTC AATG	187bp	<i>Erwinia amylovora</i>
	Ea71(2)	GCTACCACTGATCGCTCGAATCAAAT CGGC		
6	AMSJ14258	TACTGCAGACGTGCTC	600bp	<i>Erwinia amylovora</i>
	AMSK14892c	ATCTTCTCCGCCGACA		
7	AJ245	AGCTGGCGGGCACTTCACT	519bp	<i>Erwinia amylovora</i>
	AJ246	CCCCGCACCGTTCAGTTTT		
8	fd2	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	1.5kb	<i>Erwinia amylovora</i>

	rP1	ACGGTTACCTTGTTACGACTT		<i>Erwinia pyrifoliae</i>
9	GPD1F	TGAAATATGACTCCACTCACGG	500bp	<i>Erwinia amylovora</i>
	GPD1R	TAGAGGACGGGATGATGTTCTG		<i>Erwinia pyrifoliae</i>
10	RECA1	GGTAAAGGGTCTATCATGCG	650bp	<i>Erwinia amylovora</i>
	RECA2c	CCTTCACCATAACATAATTTGGA		<i>Erwinia pyrifoliae</i>
11	HRPN1	ATGAGTCTGAATACAAG	1kb	<i>Erwinia amylovora</i>
	HRPN3C	GCTTGCCAAGTGCCATA		<i>Erwinia pyrifoliae</i>
12	EPYR_00056_F	GTCCAGTGCCAACAGATTACG	400bp	<i>Erwinia pyrifoliae</i>
	EPYR_00056_R	CTCTGACGGCTTCTGCTAAGG		
13	EPPSGL1646	CAGCGCATCATAAGTGTACC	1053bp	<i>Erwinia pyrifoliae</i>
	EPPSGL2698c	TCTGGAATATCGGCTCCGTA		
14	EAPSGL3961	CCGAAGAACGATTGCACTAC		<i>Erwinia amylovora</i>
	EAPSGL4610c	CGGTTAGTTAGCGCAGTCTC		
15	EBPSGL1341	TCAGCTGGTGATCCTTCAAC		<i>Erwinia billingiae</i>
	EBPSGL2183c	CTCAACTGGACGCTGAGAA		
16	ETPSGL4124	GATTGCTGTTCCGAGGTACG		<i>Erwinia tasmaniensis</i>

표 17. Quantitative PCR에 사용되는 primer 정보

No.	Primer set	Sequence	Modification	Target strain
1	P29TF761	CACTGATGGTGCCGTTG	5'- FAM, 3'-TAMRA	<i>Erwinia amylovora</i>
	P29TR872	CGCCAGGATAGTCGCATA		
	P29TM782	TACCTCCCGCAGCCGTCATGG		
2	AMSK14819	AACGAGTTGCTGCTACC	5'- Cy5, 3'- BHQ2	<i>Erwinia amylovora</i>
	AMSK14948c	CATCGCGTAGCTTAAGG		
	AMSK14840Cy5	AGCCGTCTGTGGCAGCACAA		
	AMSK14840FAM	AGCCGTCTGTGGCAGCACAA		
3	AR14819	AACGAGTTGCTGCTACC		<i>Erwinia amylovora</i>
	AR14948c	CATCGCGTAGCTTAAGG		
4	EPPSGS1089Q	GGTTACCGCGTTCGTATGAT		<i>Erwinia pyrifoliae</i>
	EPPSGS1228Qc	TTGTTGTTCGTGAGCGCATAG		
5	EBPSGL1341	TCAGCTGGTGATCCTTCAAC		<i>Erwinia billingiae</i>
	EBPSGL1497c	CCATCTGGCCATTGTGCGAAG		
6	EBWZ503	GGAATGTAGGTCCGTATG	5'-TXR, 3'-BHQ1	<i>Erwinia billingiae</i>
	EBWZ603c	CCAGTTATCCAGCGTCTT		
	EBWZ52TXR	AACTGGCTGAAGTTGCGAGCGA		

7	ETWN101	CCGACTGGCATATCTATC	<i>Erwinia tasmaniensis</i>
	ETWN217c	CTCCGCTATTGACCTACAT	
8	ETPSGL4124	GATTGCTGTTCCGAGGTACG	<i>Erwinia tasmaniensis</i>
	ETPSGL4230Qc	CGGATCGGCAACAATCAGTA	
9	ETWN367	TACCAGTCACCCAGCAAGTC	<i>Erwinia tasmaniensis</i>
	ETWN465c	CGATGAGAAGCAGATACGGAAC	
	ETWN396HEX	ACGGCAAACCGTACCTGAAACAGAA	

- Conventional PCR

- 기존에 알려진 정보를 토대로 본 실험실에서 13개 primer set에 대하여 cPCR을 진행함. 사용한 샘플은 국내에서 채집된 *Erwinia amylovora* 3샘플(FB-2, FB-33, FB-302), *Erwinia pyrifoliae* (연제문) 1샘플을 가지고 진행. 사용한 primer list(표 3)는 1번부터 13번까지의 primer set을 사용하였으며, 해당 primer는 macrogen(Korea)에 의뢰하여 제작함.
- PCR은 SuPrime HF DNA polymerase(GeNet Bio, Korea)을 사용하여 진행. PCR 조건은 95°C 5분 pre-denaturation 과정을 실시하고 denaturation 95°C 30초, annealing은 각 샘플에 해당하는 annealing 온도에 맞춰 30초씩 진행하였고, extension 72°C 30초 수행하였으며 35cycle을 반복함.

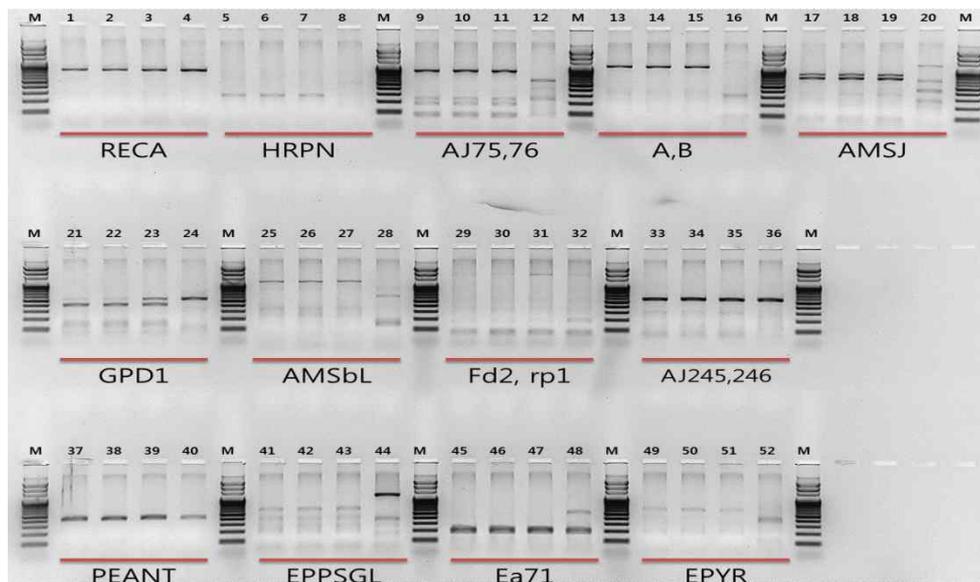


그림 28. Primer set test result

표 18. cPCR 프라이머와 샘플 조건

Lane	Sample	Primer set	Lane	Sample	Primer set	Lane	Sample	Primer set
1	FB-2	RECA1	21	FB-2	GPD1F	41	FB-2	EPPSGL1646

2	FB-33		22	FB-33		42	FB-33	
3	FB-302	RECA2c	23	FB-302	GPD1R	43	FB-302	EPPSGL2698c
4	연제문		24	연제문		44	연제문	
5	FB-2		25	FB-2		45	FB-2	
6	FB-33	HRPN1	26	FB-33	AMSbL	46	FB-33	Ea71(1)
7	FB-302	HRPN3C	27	FB-302	AMSbR	47	FB-302	Ea71(2)
8	연제문		28	연제문		48	연제문	
9	FB-2		29	FB-2		49	FB-2	
10	FB-33	AJ75	30	FB-33	fd2	50	FB-33	EPYR_00056_F
11	FB-302	AJ76	31	FB-302	rP1	51	FB-302	EPYR_00056_R
12	연제문		32	연제문		52	연제문	
13	FB-2		33	FB-2				
14	FB-33	A	34	FB-33	AJ245			
15	FB-302	B	35	FB-302	AJ246			
16	연제문		36	연제문				
17	FB-2		37	FB-2				
18	FB-33	AMSJ14258	38	FB-33	PEANT1			
19	FB-302	AMSK14892c	39	FB-302	PEANT2			
20	연제문		40	연제문				

- Chain elongation 과정은 72℃ 5분 진행. PCR을 수행한 기계는 LifeTouch Thermal Cycler(Bioer Technology, China)을 사용하였으며, 증폭된 산물은 1.2% Agarose gel을 이용하여 전기영동으로 확인하였음. 전기영동법은 Compact Digimage System, UVDI series(Major Science, USA)으로 확인.
- cPCR 결과 기존 보고된 것과 band 위치가 다르게 나타나거나 과수화상병 진단에 적합하지 않은 primer set들이 다수 확인되었음(RECA, HRPN, AMSJ, fd2(rp1), EPPSGL, Ea71), 또한 band 위치와 target strain이 일치하여 화상병균 진단에 사용 가능한 primer set은 A(B), AJ245(AJ246)로 확인되었음.
- 각각의 참고문헌(Susanne Jock et al., 2004, K. Geider et al., 2008, Rachel Powney et al., 2011, A. Wensing et al., 2011)과 다르게 나타나는 이유는 차후 실험을 통하여 확인이 필요함.

- Quantitative PCR

- 기존에 보고된 primer set를 토대로 본 실험실에서 SYBR Green Dye를 이용한 과수화상병 진단 마커 2 set에 대하여 qPCR을 진행함.
- 사용한 샘플은 국내에서 채집된 *E.amylovora* 3샘플(FB-2, FB-33, FB-302), *Erwinia pyrifoliae*(연제문) 1샘플을 가지고 진행함.
- SYBR Green을 이용한 qPCR의 primer set은 *E.amylovora* 를 검출할 수 있는 AR14819, AR14948c set과 *E.pyrifoliae*를 검출할 수 있는 EPPSGS1089Q, EPPSGS1228Qc set을 사용함.
- SYBR Green을 이용한 qPCR에 사용한 enzyme은 Prime Q-Mastermix(GeNet

Bio, Korea)를 사용하였음.

- SYBR Green을 이용한 qPCR 조건은 95℃ 5분 pre-denaturation과정을 실시하고 denaturation 95℃ 30초, annealing 52℃ 20초, extension 72℃ 30초 수행하였으며 40 cycle을 반복함. Melting analysis는 60℃ ~ 95℃ 까지 0.5℃/sec로 진행함.

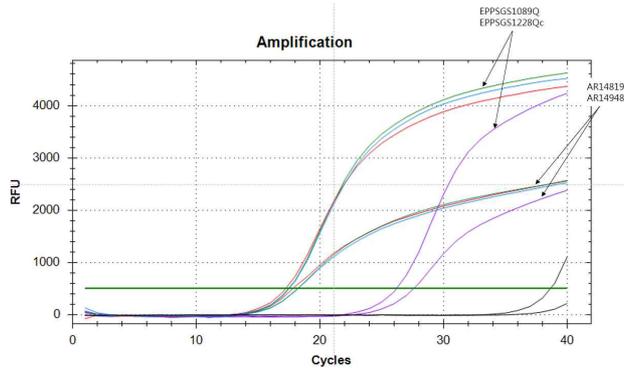


그림 29. SYBR Green qPCR Cq result

*화상병균 - Red : FB-2, Blue : FB-33, Green : FB-302,
 가지검은마름병 - Purple : 연제문,
 Black : Negative control

- SYBR Green을 이용한 real-time PCR 결과 화상병균과 가지검은마름병 진단 프라이머 모두 두 병원균에 대한 변별력을 확인할 수 없었음.
- Melting curve를 확인한 결과 화상병균과 가지검은마름병균 각각의 시료에서 고유한 melting temperature를 나타냈으며 각 병원균 별 증폭 크기가 다른 것으로 예측됨.
- 가지검은마름병 진단 마커인 PSG1089Q, EPPSGS1228Qc set의 결과에서 Negative control에서 Cq값이 나타나는 이유는 Primer dimer로 인해 높은 cycle에서 값이 나타나는 것을 Melt peak 그래프를 이용해서 확인함.

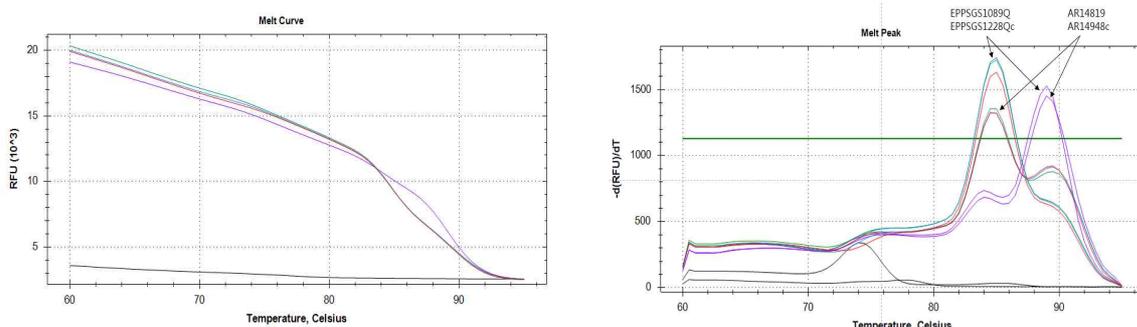


그림 30. SYBR Green qPCR Melt curve result

(Red : FB-2, Blue : FB-33, Green : FB-302, Purple : 연제문, Black : Negative control)

- 기존에 개발된 SYBR Green Dye를 이용한 화상병균 진단 마커는 화상병균 뿐 아니라 유사균인 가지검은마름병도 함께 진단됨으로 화상병균 진단을 위한 새로운 마커들이

필요한 실정임(A Wensing et al., 2011)

표 19. SYBR Green을 이용한 qPCR 결과

Sample	Primer	Cq	Melt temp
FB-2		17.85	84.50
FB-33	AR14819	18.26	84.50
FB-302	AR14948c	18.24	84.50
연제문	<i>Erwinia amylovora</i>	27.61	89.00
NTC			None
FB-2		17.26	85.00
FB-33	EPPSGS1089Q	17.54	85.00
FB-302	EPPSGS1228Qc	17.48	85.00
연제문	<i>Erwinia pyrifoliae</i>	26.22	89.00
NTC		38.67	None

- Quantitative PCR을 이용한 두 번째 방법인 Taqman probe를 이용한 화상병균 진단 마커를 조사하였음.
- Taqman probe를 이용한 qPCR에 사용한 enzyme은 HS Prime qPCR Premix(GeNet Bio, Korea)를 사용.
- qPCR에 사용한 프라이머 정보와 Taqman probe 정보는 표 17에 나타내었음.
- Taqman probe를 이용하여 과수화상병균과 가지검은마름병 시료를 진단한 결과 두 primer set 모두 *E.amylovora*와 *E.pyrifoliae*에서 형광 값을 확인할 수 있었음.
- 각각 시료의 gDNA 농도를 100ng으로 고정시킨 후 qPCR을 진행한 결과 Cq값이 화상병균(*Erwinia amylovora*)보다 가지검은마름병(*E.pyrifoliae*)에서 훨씬 높은 값이 확인되었음.
- Taqman probe를 이용한 진단 결과에서 *E.amylovora*와 *E.pyrifoliae* 균주가 모두 검출되어 Taqman probe 주위의 시퀀스를 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에서 확인함.

Erwinia_amylovora_ATCC_49946_chromosomal_sequence	CATCCGCTAGCTTAAGGTTGAATTTCTGGCTCAATGCCCATGCCGTA	50
Erwinia_amylovora_ATCC_BAA-2158	CATCCGCTAGCTTAAGGTTGAATTTCTGGCTCAATGCCCATGCCGTA	50
Erwinia_amylovora_CFBP1430_complete_genome	CATCCGCTAGCTTAAGGTTGAATTTCTGGCTCAATGCCCATGCCGTA	50
Erwinia_pyrifoliae_DSM_12163_complete_genome	ATCCGCTAGCTTAAGGTTGAATTTCTGGCTCAATGCCCATGCCGTA	49
Erwinia_pyrifoliae_strain_Ep1/96_complete_chromosome	ATCCGCTAGCTTAAGGTTGAATTTCTGGCTCAATGCCCATGCCGTA	49
Consensus	atc cgtagcttaaggtt aat ttt tctggctcaatgcccatgccgct	
Erwinia_amylovora_ATCC_49946_chromosomal_sequence	ACGTTAATTTCTCCGCCGGACAGCCCATAGCAATCAGTTTGTCCTCCA	100
Erwinia_amylovora_ATCC_BAA-2158	ACGTTAATTTCTCCGCCGGACAGCCCATAGCAATCAGTTTGTCCTCCA	100
Erwinia_amylovora_CFBP1430_complete_genome	ACGTTAATTTCTCCGCCGGACAGCCCATAGCAATCAGTTTGTCCTCCA	100
Erwinia_pyrifoliae_DSM_12163_complete_genome	ACGTTAATTTCTCCGCCGGACAGCCCATAGCAATCAGTTTGTCCTCCA	99
Erwinia_pyrifoliae_strain_Ep1/96_complete_chromosome	ACGTTAATTTCTCCGCCGGACAGCCCATAGCAATCAGTTTGTCCTCCA	99
Consensus	acgttaat tttctccgccggacagcccatagcaatcagttt tgtctcca	
Erwinia_amylovora_ATCC_49946_chromosomal_sequence	CAGACGGCTAATGGTACAGCACTCGT	129
Erwinia_amylovora_ATCC_BAA-2158	CAGACGGCTAATGGTACAGCACTCGT	129
Erwinia_amylovora_CFBP1430_complete_genome	CAGACGGCTAATGGTACAGCACTCGT	129
Erwinia_pyrifoliae_DSM_12163_complete_genome	CAGACGGCTAATGGTACAGCACTCGT	128
Erwinia_pyrifoliae_strain_Ep1/96_complete_chromosome	CAGACGGCTAATGGTACAGCACTCGT	128
Consensus	cagacggctgat ggtacagca tctgt	

그림 31. Multiple alignment(AMSK14819, AMSK14947c and AMSK14840FAM)

- NCBI에서 두 균주의 시퀀스를 다운받아 multiple alignment한 결과 두 균주가 매우

비슷한 서열을 지니는 것을 확인함

- 유사 균주인 화상병균과 가지검은마름병의 유사한 서열로 인하여 real-time PCR에서 위와 같은 결과가 나타나는 것으로 확인되었음.

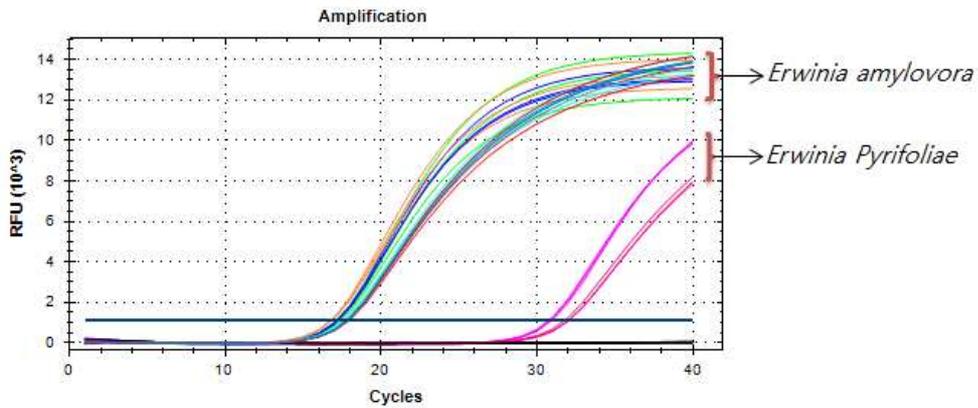


그림 32. Taqman probe qPCR Cq result

- Yellow Green : FB-2, Orange : FB-33, Blue : FB-302, Purple : 연제문 (AMSK14819, AMSK14948c and AMSK14840FAM), Green : FB-2, Red : FB-33, Sky Blue : FB-302, Pink : 연제문 (P29TF761, P29TM782 and P29TR872), Black : Negative control

표 20. Taqman probe를 이용한 결과

Sample	Primer	Cq	Cq mean	Sample	Primer	Cq	Cq mean
		17.17				17.64	
FB-2		17.44	17.32	FB-2		17.7	17.66
		17.37				17.66	
		16.8				18.02	
FB-33		16.89	16.85	FB-33		17.94	17.94
		16.86				17.94	
	P29TF761	17.23			AMSK14819	17.89	
	P29TM782				AMSK14948c		
FB-302		17.32	17.23	FB-302		17.89	17.89
	P29TR872	17.23			AMSK14840FA	17.89	
	(Taqman probe)	30.91			M(Taqmanprobe)	32.01	
연제문		30.91	30.91	연제문		32.01	32.01
		30.91				32.01	
		None				None	
NTC		None	None	NTC		None	None
		None				None	

- 지금까지 기존에 개발된 다양한 화상병균 마커를 PCR과 qPCR 장비를 이용하여 확인한 결과 화상병균과 그 유사균인 가지검은마름병을 구분하지 못하는 경우가 많았으며, 진단 결과들이 명확하지 못한 경우도 확인하였음.
- 따라서 화상병균 진단을 효율적으로 하기 위해서는 유전체 정보를 이용하여 화상병균

에 대해 좀 더 특이적인 마커 선발이 필수적이라 생각되며 진단 결과를 좀 더 정확하고 검증이 가능한 시스템 개발을 위해 PNA probe를 이용한 진단 시스템을 2차년도에 구축하고자 하였음.

(나) Real-time PCR 기반 화상병균의 high-throughput 진단 시스템 구축

○ *E.amylovora*를 진단할 수 있는 PNA probe 디자인

- PNA probe를 이용한 과수 화상병 진단 시스템 구축을 위해 기존에 밝혀진 Taqman probe 서열을 기반으로 PNA probe를 디자인함.
- NCBI에서 *E. amylovora*와 *E. pyrifoliae* 서열 (CP002124, FN392235, FN434113.1, FN666575.1, FP236842.1, FR719191.1, X77921.2)을 다운로드 후, 정렬하여 target SNP의 위치 및 기존 발표된 논문의 Taqman probe 위치를 확인하였음.
- 기존 논문에 기재된 Taqman probe서열을 기반으로 PNA probe 디자인하였음 (Mohammadi et al., 2009).

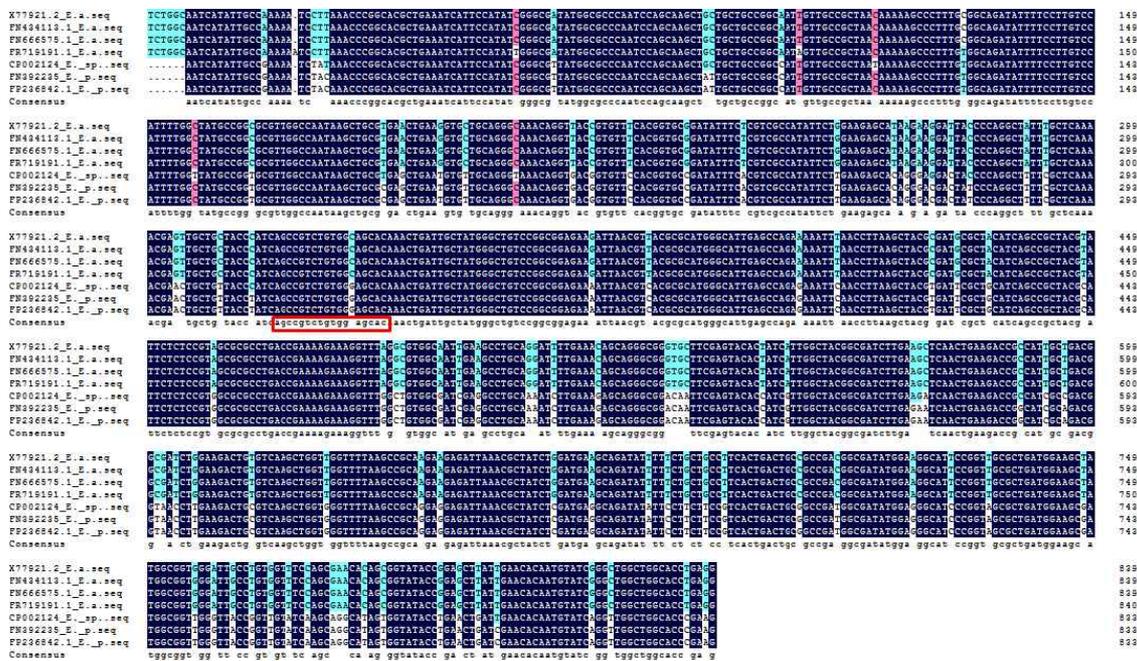


그림 33. NCBI에 등록되어 있는 *E. amylovora*와 *E. pyrifoliae* 서열 alignment

- PNA probe의 적합성을 확인하기 위해 2015년 균주, 2016년 균주 및 분양받은 균주를 토대로 Real-time PCR을 진행함.

표 21. Real-time PCR 실험에 사용한 균주 목록

No.	Name	Species	
1	안성 (FB-2)	<i>Erwinia amylovora</i>	2015년 균주
2	천안 (FB-33)	<i>Erwinia amylovora</i>	
3	제천 (FB-302)	<i>Erwinia amylovora</i>	
4	연제문	<i>Erwinia pyrifoliae</i>	
5	FB-5	<i>Erwinia amylovora</i>	2016년 균주
6	FB-10	<i>Erwinia amylovora</i>	
7	FB-20	<i>Erwinia amylovora</i>	
8	FB-31	<i>Erwinia amylovora</i>	
9	FB-34	<i>Erwinia amylovora</i>	
10	FB-35	<i>Erwinia amylovora</i>	
11	FB-39	<i>Erwinia amylovora</i>	
12	FB-43	<i>Erwinia amylovora</i>	
13	FB-57	<i>Erwinia amylovora</i>	
14	FB-76	<i>Erwinia amylovora</i>	
15	FB-78	<i>Erwinia amylovora</i>	
16	FB-80	<i>Erwinia amylovora</i>	
17	1	<i>Erwinia pyrifoliae</i>	분양균주
18	2	<i>Erwinia pyrifoliae</i>	
19	3	<i>Erwinia pyrifoliae</i>	
20	4	<i>Erwinia pyrifoliae</i>	
21	5	<i>Erwinia pyrifoliae</i>	
22	6	<i>Erwinia pyrifoliae</i>	
23	7	<i>Erwinia pyrifoliae</i>	
24	8	<i>Erwinia rhapontici</i>	
25	9	<i>Erwinia rhapontici</i>	
26	10	<i>Erwinia rhapontici</i>	

- 2015년도 균주 4개, 2016년도 균주 2개, 분양균주 4개를 Taq polymerase를 사용하여 PCR로 증폭여부 확인함. PCR에 사용한 enzyme는 SuPrime HF DNA Polymerase(GeNet Bio, Korea)를 사용하여 진행하였고, 프라이머는 PNA probe assay의 프라이머를 사용함. PCR 조건은 94℃ 2분을 거친 후, 94℃ 30초, 60℃ 30초, 68℃ 30초의 과정을 30cycle 반복하고 68℃ 5분으로 진행하고 전기영동으로 확인함.
- 2015년 균주와 2016년 균주의 PCR 산물에 Forward primer(50pmol/ul)와 PNA probe(10pmol/ul)를 넣은 후 3반복하여 Real-time PCR을 진행함. PCR 조건은 95℃ 5분을 거친 후, 95℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 30초의 과정을 20cycle 반복하여 증폭하고, PCR 증폭 후에 95℃ 5분, 80℃ 30초, 65℃ 30초, 50℃ 30초로 온도를 서서히 낮춘 후, 40℃에서 95℃까지 1℃/s로 온도를 증가시키며 melting analysis를 진행함.

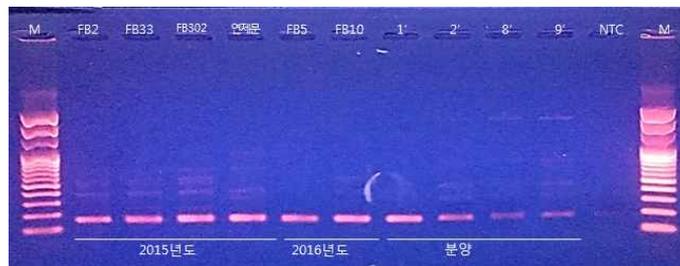


그림 34. Conventional PCR 전기영동 결과

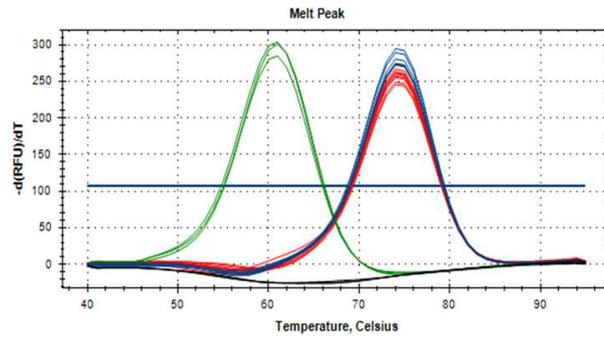


그림 35. Real-time PCR 결과

- Conventional PCR 결과, Target band뿐만 아니라 Non-specific band가 많이 나타났으며 *E. amylovora*가 아닌 샘플에서도 증폭이 일어나는 것을 확인함.
- Real-time PCR 결과, *E. amylovora*는 2015년, 2016년 균주 모두 T_m 값이 74°C이고, *E. pyrifoliae*의 T_m 값은 61°C로 두 균이 T_m 값으로 명확히 구분됨을 확인함.

표 22. Real-time PCR의 다양한 assay에 사용되는 Primer 및 Probe

No.	Primer set	Sequence	Modification	Assay
1	AR14819	AACGAGTTGCTGCTACC		SYBR Green
	AR14948c	CATCGCGTAGCTTAAGG		
2	AMSK14819	AACGAGTTGCTGCTACC		Taqman probe
	AMSK14948c	CATCGCGTAGCTTAAGG		
	AMSK14840FAM	AGCCGTCTGTGGCAGCACAA	5'- FAM, 3'- BHQ1	
3	E.A_Big_F	AATGGCGGTCTTCAGTTGAGCTTC		Single tube nested
	E.A_Big_R	TCTCGTCGCCATATTCTGGAAGAG		
4	AMSK14767	TCGCCATATTCTGGAAGAGCA		PNA probe
	AMSK14948c FB-1	CATCGCGTAGCTTAAGG GTGCTGCCACAGACG	FAM	

(다) Taqman 및 PNA probe 진단 시스템 비교 분석

- 다양한 병징부위의 가지 수피에서 CTAB method로 DNA를 추출한 뒤, Taqman probe, PNA probe, Single tube nested PNA probe로 진단 시스템을 검증하고, 진단 결과를 토대로 다양한 샘플을 선정하여 digital PCR을 통해 진단이 가능한 최소 DNA copy수를 확인함
- Control로 2015년 균주인 FB-33(*E. amylovora*)과 연제문(*E. pyrifoliae*)을 10ng 사용하였고, 정확도를 높이기 위해 전체 2반복으로 진행함

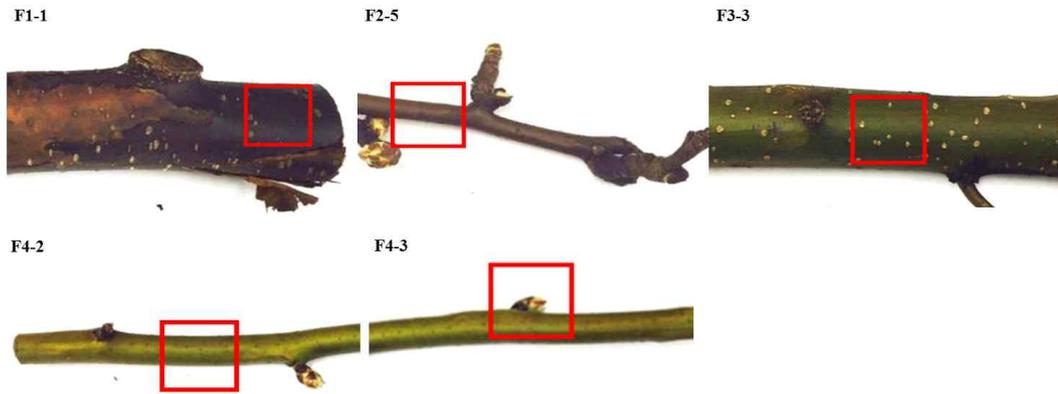


그림 36. 진단에 사용한 시료 부위

표 23. 진단에 사용한 샘플 리스트 및 병징

No.	Name	Species	
1	F1-1	<i>Erwinia amylovora</i>	병징이 심한 가지
2	F2-5	<i>Erwinia amylovora</i>	병징이 보이는 가지의 말단
3	F3-3	<i>Erwinia amylovora</i>	병징이 보이는 가지의 무병징 부위
4	F4-2	<i>Erwinia amylovora</i>	무병징 가지
5	F4-3	<i>Erwinia amylovora</i>	무병징 눈
6	FB-33	<i>Erwinia amylovora</i>	Positive control
7	연제문	<i>Erwinia pyrifoliae</i>	Negative control

○ Taqman probe assay

- 전체 샘플을 2반복하여 Taqman probe assay로 진행함.
- enzyme은 HS Prime qPCR Premix(GeNet Bio, Korea)를 사용함.
- Real-time PCR 조건은 95℃ 5분 동안 pre-denaturation 후, denaturation 95℃ 30초, annealing과 extension은 56℃ 1분으로 40cycle을 반복하였고, Taqman probe의 경우에는 melting analysis를 할 수 없으므로 과정을 생략함.

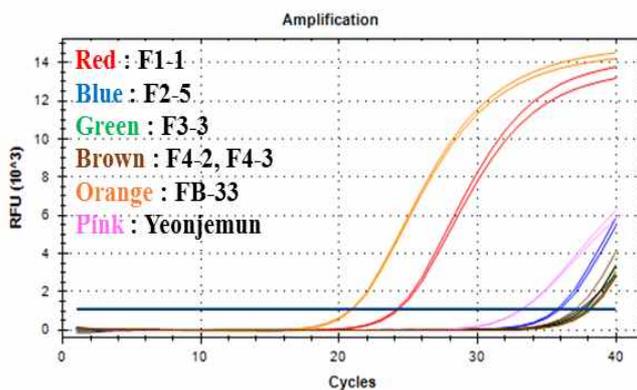


그림 37. Taqman probe assay의 qPCR Ct 결과

표 24. Taqman probe assay의 Ct 값 및 감염여부

Sample	Ct1	Ct2	감염여부
F1-1	24.11	24.25	○
F2-5	35.66	35.91	×
F3-3	37.65	38.06	×
F4-2	38.05	37.06	×
F4-3	37.95	38.16	×
FB-33	20.92	20.80	○
연제문	33.16	33.16	×
NTC	37.61	37.35	

- 감염이 심한 F1-1과 Positive control인 FB-33에서 Ct값이 약 24,21로 확인되었고, F1-1 외의 감염부위가 아닌 시료에서는 *E.pyrifoliae*인 연제문보다 Ct값이 더 높게 나타나는 것을 확인함. 37 cycle이 넘자 NTC에서도 증폭이 일어남.
- Taqman probe assay로 진단할 경우, 시료 내에 화상병균의 밀도가 낮은 샘플의 경우에는 제대로 진단되지 않을 것으로 판단됨.

○ PNA probe assay

- 전체 샘플을 2반복하여 PNA probe assay 진행함.
- enzyme은 2x qPCR PreMix(Seasun Biomaterials, Korea)를 사용하였고, 사용하는 Forward primer, Reverse primer, PNA probe의 농도는 20:6:5의 비율로 진행함.
- Real-time PCR 조건은 95℃에서 5분 동안 pre-denaturation을 거친 후, denaturation 95℃ 30초, annealing 56℃ 30초, extension 72℃ 30초를 수행하였으며 40cycle 반복함.
- PCR 증폭 후에 95℃ 5분, 80℃ 30초, 65℃ 30초, 50℃ 30초로 온도를 서서히 낮춘 후, 40℃에서 95℃까지 1℃/s로 온도를 증가시키며 melting analysis를 진행함.

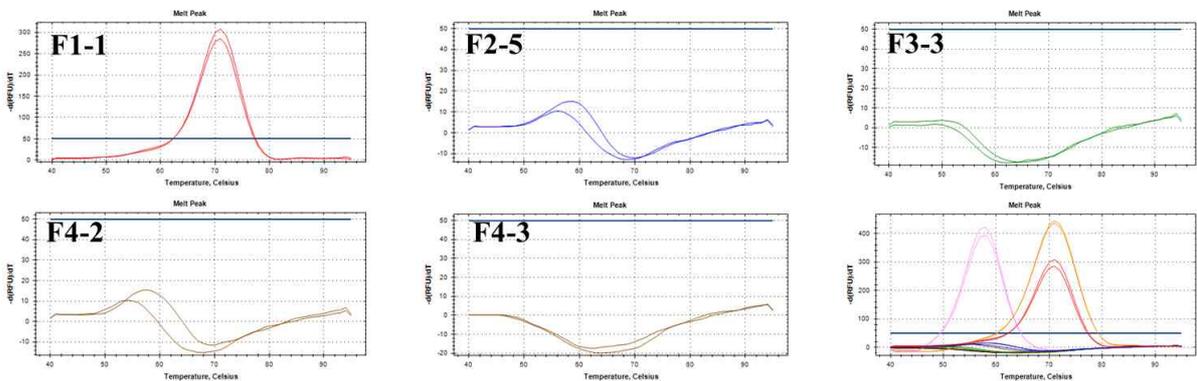


그림 38. PNA probe assay를 이용한 Melting peak 결과

표 25. PNA probe assay를 이용한 Tm값 결과와 감염여부

Sample	Melting curve		감염여부
	Tm1	Tm2	
F1-1	71.00	71.00	○
F2-5	-	-	×
F3-3	-	-	×
F4-2	-	-	×
F4-3	-	-	×
FB-33	71.00	71.00	○
연제문	58.00	58.00	×
NTC	-	-	

- 감염이 심한 가지인 F1-1과 Positive control인 FB-33은 71℃에서 melting peak가 나타났고, Negative control인 연제문에서는 58℃에서 melting peak가 나타남. 병징이 심하지 않은 부위에서는 Tm값이 확인되지 않음.

○ Single tube nested PNA probe assay

- 민감도를 높이기 위해서 single tube nested 방법으로 PNA probe assay를 진행함.
- First primer는 Single tube nested Taqman probe assay와 동일하고 Second primer는 PNA probe와 동일한 primer 및 Probe를 사용함. First primer는 0.03pmol/ul의 농도를 사용하였고, Second primer 및 Probe는 PNA probe assay와 동일하게 20:6:5의 비율로 사용함.
- PCR 조건은 95℃ 5분 pre-denaturation 과정을 실시하고 denaturation 95℃ 30초, annealing 60℃ 30초, extension 72℃ 30초를 수행하였으며 40cycle 반복함.
- PCR 증폭 후에 95℃ 5분, 80℃ 30초, 65℃ 30초, 50℃ 30초로 온도를 서서히 낮춘 후, 40℃에서 95℃까지 1℃/s로 온도를 증가시키며 melting analysis를 진행함.

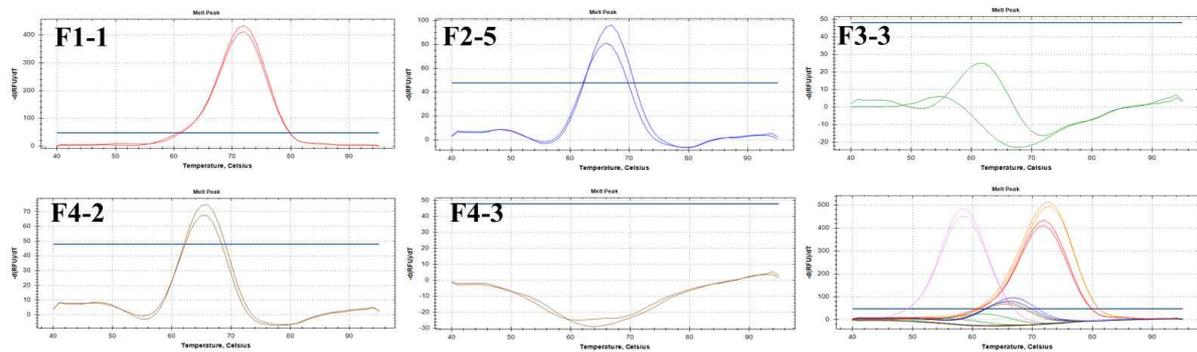


그림 39. Single tube nested PNA assay를 이용한 Melting peak 결과

표 26. Single tube nested PNA probe assay를 이용한 Tm값 결과

Sample	Tm1	Tm2	감염여부
F1-1	72.00	72.00	○
F2-5	67.00	66.00	○
F3-3	-	-	×
F4-2	66.00	65.00	○
F4-3	-	-	×
FB-33	73.00	73.00	○
연계문	59.00	59.00	×
NTC	-	-	

- 감염이 심한 F1-1과 Positive control인 FB-33에서 72, 73℃에서 melting peak가 나타났고, Negative control인 연계문에서는 59℃에서 melting peak가 나타남.
- 병징부위의 주변부분인 F2-5와 무병징 부분인 F4-2에서도 약 66℃에서 melting peak가 나타남. 상대적으로 화상병균의 밀도가 낮아서 Tm값이 낮아지는 것을 확인함.

○ Digital PCR

- Taqman probe를 이용하여 digital PCR로 실제 DNA copy수를 확인함.
- DNA 3ul에 2X Probe Master Mix(qPCR BIO Probe Mix No-Rox)와 20X jnmmedsys solution, Primer와 Taqman probe를 넣고, 95℃ 5분에서 polymerase activation 과정을 거친 뒤에 95℃ 50초, 54℃ 90초, 70℃ 5분의 과정을 40cycle 반복함.

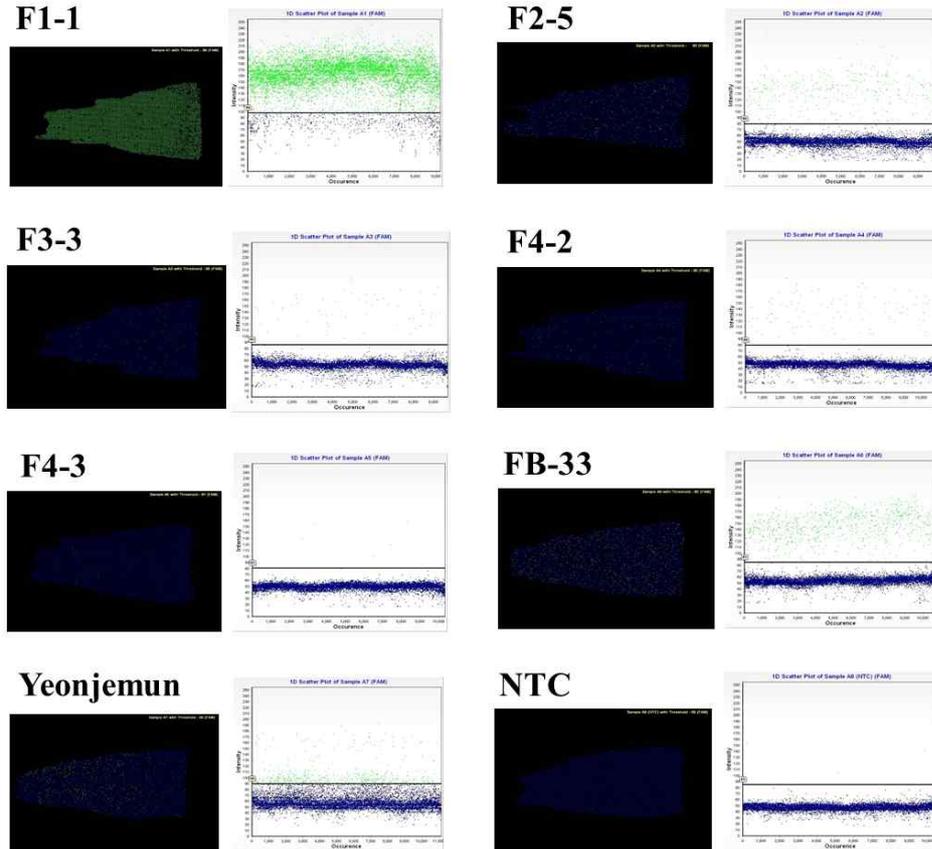


그림 40. Digital PCR 결과

표 27. Digital PCR 결과, 샘플 별 DNA copy 수 결과

Sample	DNA Copies/ul in reaction mix	DNA Copies/ul in samples
F1-1	188,180.10	940,900.60
F2-5	29	144.9
F3-3	4.7	23.7
F4-2	7.4	36.8
F4-3	0.4	1.8
FB-33	6,148.00	30,740.10
연제문	36.9	184.4
NTC	0.2	1.1

- 각 부위별 화상병균의 밀도(시료 내 DNA copy 수)를 조사한 결과, 병징이 보이는 부

위와 무병징 부위의 화상병균 밀도 차이를 확연히 확인함.

- Single tube nested PNA probe assay를 통해 F4-2까지 진단하였으므로 약 30copy까지의 화상병균을 정확하게 진단이 가능함을 확인함.

(라) 과수 화상병균과 유사종들간의 특이성 및 민감도 조사

① Specificity

- 2015년, 2016년 국내에서 채집된 *E.amylovora* 15샘플과 *E.pyrifoliae* (연제문) 1샘플을 비롯한 미생물은행에서 분양받은 *E.pyrifoliae* 7샘플, *E.rhapontici* 3샘플을 10ng 사용하여 진단방법에 따른 화상병균에 대한 specificity를 확인함. 정확도를 높이기 위해 모든 샘플을 2반복하여 진행함.

○ SYBR Green assay

- 사용한 enzyme은 Primer Q-Mastermix(GeNet Bio, Korea)를 사용함.
- Real-time PCR 조건은 95℃ 5분 pre-denaturation과정을 실시하고 denaturation 95℃ 30초, annealing 52℃ 20초, extension 72℃ 30초 수행하였으며 40cycle 반복함.
- Melting analysis는 60℃에서 95℃까지 0.5℃/s로 온도를 증가시키며 진행함.

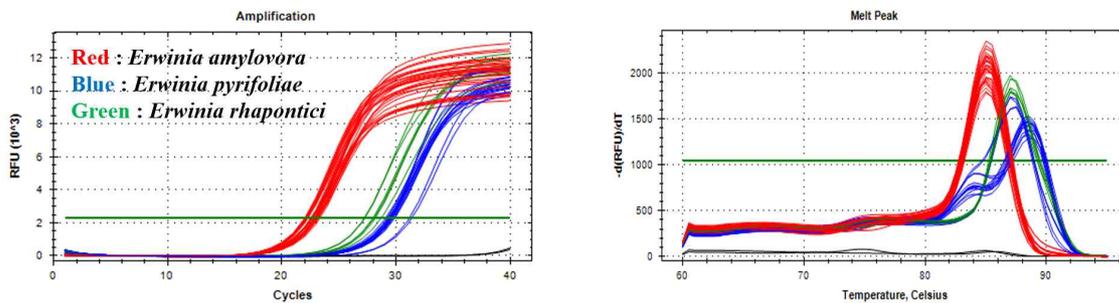


그림 41. SYBR Green assay를 이용한 증폭곡선과 Melting peak 결과

- 평균 Ct는 *E. amylovora*이 22.7, *E. pyrifoliae*는 29.8, *E. rhapontici*는 27.9로 나타났고, Melting peak는 3개 중 간에 Tm값 차이가 크지 않아 3개 종을 구분하는데 명확하지 않음.

○ Taqman probe assay

- enzyme은 HS Prime qPCR Premix(GeNet Bio, Korea)를 사용함.
- Real-time PCR 조건은 95℃ 5분 동안 pre-denaturation 후, denaturation 95℃ 30초, annealing과 extension은 56℃ 1분으로 40cycle을 반복하였고, Taqman probe의 경우에는 melting analysis를 할 수 없으므로 과정을 생략함.

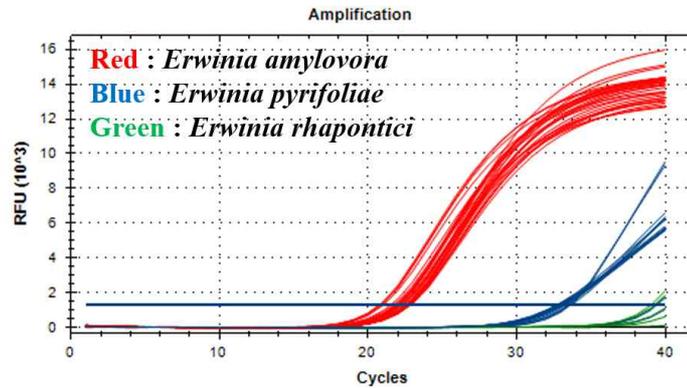


그림 42. Taqman probe assay를 이용한 증폭곡선 결과

- *E. amylovora*는 평균 Ct가 22로 잘 증폭된 것을 확인하였으나, *E. amylovora* 뿐만 아니라 *E. pyrifoliae*에서 33.6, *E. rhapontici*에서 39.3로 증폭이 이루어 짐.
- 같은 농도에서는 중 간 구분이 명확하지만, 감염의 정도가 다양한 실제시료의 경우에는 명확한 진단이 어려울 것으로 예상됨.

○ Single tube nested Taqman probe assay

- 진단에 대한 민감도를 높이기 위해서 single tube nested 방법으로 Taqman probe assay를 진행함.
- First primer는 0.03pmol/ul로 매우 낮은 농도로 사용하고, Second primer와 Probe는 Taqman assay와 동일하게 사용함.
- Real-time PCR 조건은 95℃에서 1분 동안 pre-denaturation을 거친 후, 95℃ 15초, 72℃ 1분을 25cycle 반복하고, 95℃ 15초, 60℃ 1분을 40cycle 반복함.

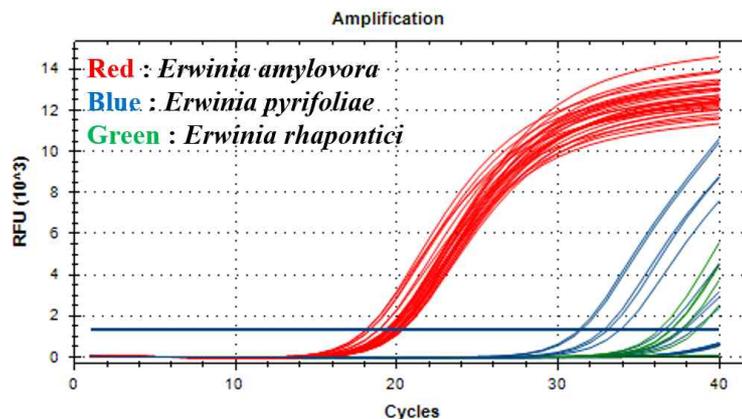


그림 43. Single tube nested Taqman probe assay를 이용한 증폭곡선 결과

- 평균 Ct가 *E. amylovora*는 19.5, *E. pyrifoliae*는 34.8, *E. rhapontici*는 37.3로 Taqman probe assay보다 증폭이 일어나는 Cycle이 전체적으로 2-3정도 당겨진 것으로 약 10배 정도로 민감도가 높아짐.

- Taqman probe assay와 동일하게 *E. amylovora*뿐만 아니라 다른 샘플에서도 증폭이 일어남.

○ PNA probe assay

- enzyme은 2x qPCR PreMix(Seasun Biomaterials, Korea)를 사용하였고, 사용하는 Forward primer, Reverse primer, PNA probe의 농도는 20:6:5의 비율로 진행함.
- Real-time PCR 조건은 95°C에서 5분 동안 pre-denaturation을 거친 후, denaturation 95°C 30초, annealing 56°C 30초, extension 72°C 30초를 수행하였으며 40cycle 반복함.
- PCR 증폭 후에 95°C 5분, 80°C 30초, 65°C 30초, 50°C 30초로 온도를 서서히 낮춘 후, 40°C에서 95°C까지 1°C/s로 온도를 증가시키며 melting analysis를 진행함.

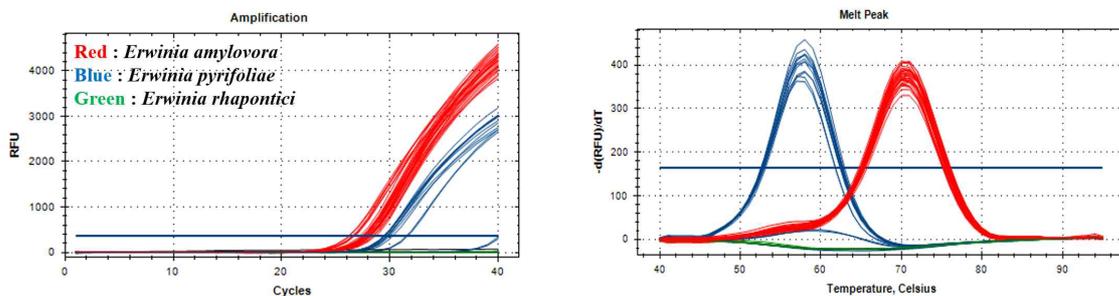


그림 44. PNA probe assay를 이용한 증폭곡선과 Melting peak 결과

- 평균 Ct가 *E. amylovora*는 27.6, *E. pyrifoliae*는 30으로 비슷하게 나타났으며 *E. rhapontici*는 증폭이 이루어지지 않았음.
- Melting temperature는 *E. amylovora*는 70.5°C, *E. pyrifoliae*는 57.8°C로 확연히 구분됨을 확인함.

○ Single tube nested PNA assay

- 민감도를 높이기 위해서 single tube nested 방법으로 PNA probe assay를 진행함.
- First primer는 Single tube nested Taqman probe assay와 동일하고 Second primer는 PNA probe와 동일한 primer 및 Probe를 사용함. First primer는 0.03pmol/ul의 농도를 사용하였고, Second primer 및 Probe는 PNA probe assay와 동일하게 20:6:5의 비율로 사용함.
- PCR 조건은 95°C 5분 pre-denaturation 과정을 실시하고 denaturation 95°C 30초, annealing 60°C 30초, extension 72°C 30초를 수행하였으며 40cycle 반복함.
- PCR 증폭 후에 95°C 5분, 80°C 30초, 65°C 30초, 50°C 30초로 온도를 서서히 낮춘 후, 40°C에서 95°C까지 1°C/s로 온도를 증가시키며 melting analysis를 진행함.

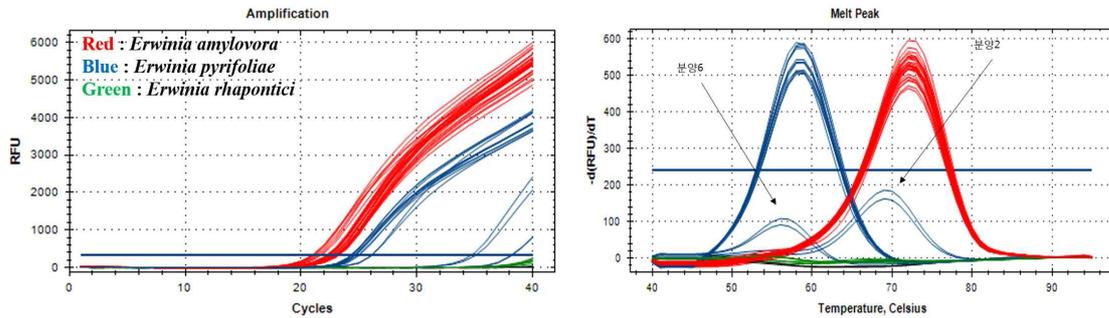


그림 45. Single tube nested PNA probe assay를 이용한 증폭곡선과 Melting peak 결과

- 평균 Ct가 *E. amylovora*는 22.46, *E. pyrifoliae*는 27.74으로 나타났으며 *E. rhapontici*는 증폭이 이루어지지 않았음. *E. pyrifoliae*인 분양 2와 분양 6에서 값이 튀는 것을 확인함.
- Melting temperature는 *E. amylovora*는 72°C, *E. pyrifoliae*는 57°C로 확연히 구분됨을 확인함. 분양 2와 분양 6에서 증폭이 제대로 되지 않았고, 특히 분양 2번은 Tm이 69°C로 나타남.
- PNA probe assay보다 10배 이상으로 민감도가 높아짐을 확인함.
- Melting temperature는 *E. amylovora*는 72°C, *E. pyrifoliae*는 57°C로 확연히 구분됨을 확인함.

② Sensitivity

- 2015년도 균주 FB-33를 사용하여 DNA 10ng~0.1pg까지 진단방법에 따른 민감도를 확인함.

○ SYBR Green assay

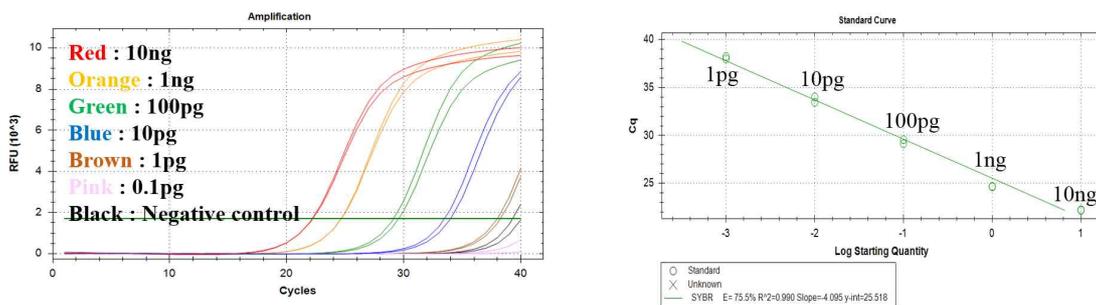


그림 46. SYBR Green assay를 이용한 DNA양에 따른 증폭곡선과 절대정량 그래프

- Ct값이 10ng에서 1pg까지 확인되었고, 1pg의 Ct값은 38.13이었음. 39.3에서 NTC(No Template Control)이 증폭되었고, 0.1pg은 증폭되지 않음.
- 1pg까지 진단이 가능할 것으로 판단됨.

○ Taqman probe assay

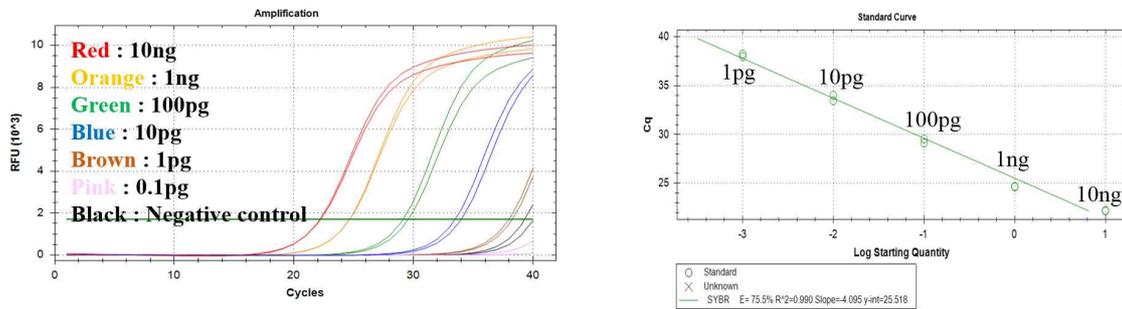


그림 47. Taqman probe assay를 이용한 DNA양에 따른 증폭곡선과 절대정량 그래프

- Ct값이 10ng에서 0.1pg까지 확인되었고, 0.1pg의 Ct값은 38.16이었음. 39.71에서 NTC(No Template Control)이 증폭되었음.
- 0.1pg까지 진단이 가능할 것으로 보이지만 0.1pg과 Ct값 차이가 크지 않음.

○ Single tube nested Taqman probe assay

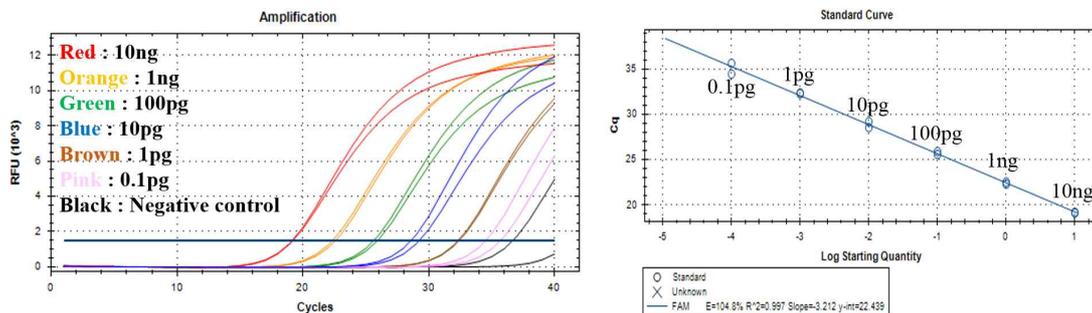


그림 48. Single tube nested Taqman probe assay를 이용한 DNA양에 따른 증폭곡선과 절대정량 그래프

- Ct값이 10ng에서 0.1pg까지 확인되었고, 0.1pg의 Ct값은 35.06이었음. 36.63에서 NTC(No Template Control)이 증폭되었음.
- Taqman probe assay보다 전체적으로 Ct값이 3정도 감소한 것으로 약 10배 정도의 민감도가 높아진 것을 확인하였고, 0.1pg까지 진단이 가능할 것으로 판단됨.

○ PNA probe assay

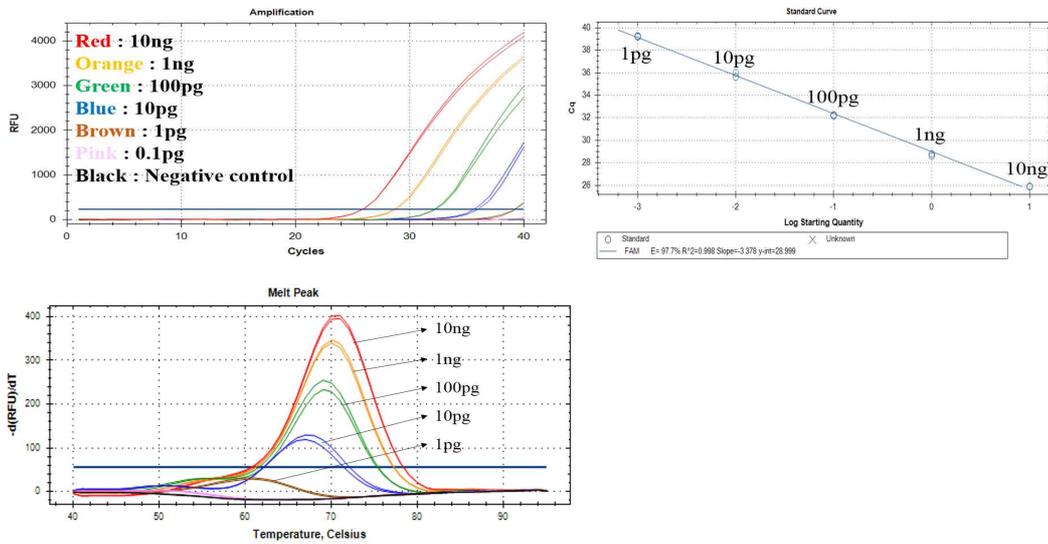


그림 49. PNA probe assay를 이용한 DNA양에 따른 증폭곡선과 절대정량 그래프

- Ct값이 10ng에서 1pg까지 확인되었고, 1pg의 Ct값은 39.24이었음.
- Melting analysis 결과를 통해 1pg에서 낮게 peak가 나타났고, 1pg까지 진단이 가능할 것으로 판단됨.

○ Single tube nested PNA assay

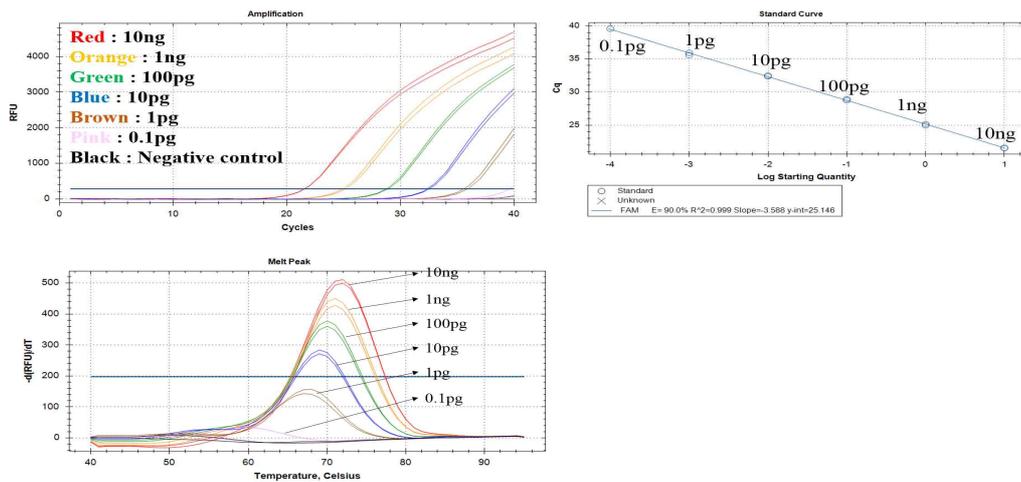


그림 50. Single tube nested PNA probe assay를 이용한 DNA양에 따른 증폭곡선과 절대정량 그래프

- Ct값이 10ng에서 0.1pg까지 확인되었고, 0.1pg의 Ct값은 39.57이었음. 전체적으로 PNA probe assay보다 Ct값이 3정도 감소한 것을 통해 민감도가 약 10배 정도 증가한 것을 확인함.
- Melting analysis 결과를 통해 1pg뿐만 아니라 0.1pg에서도 낮게 peak가 나타났고, 0.1pg까지 진단이 가능할 것으로 판단됨.

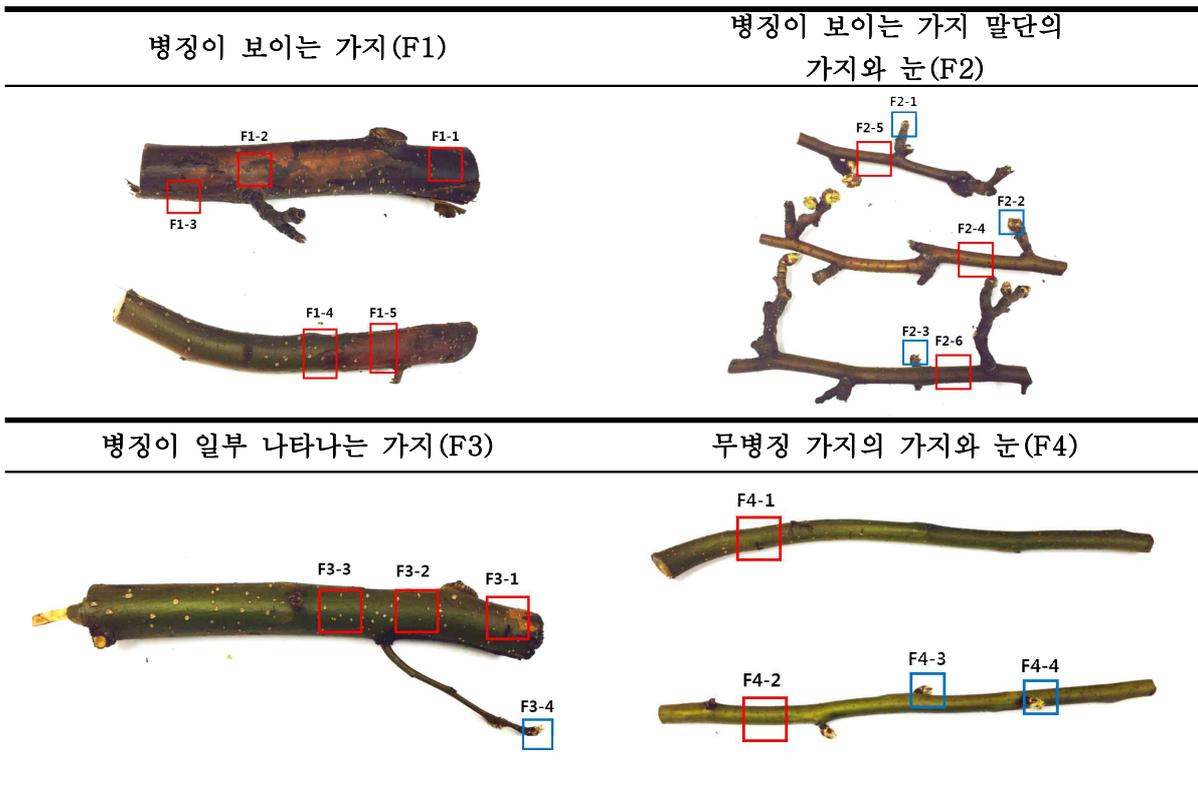
(마) 감염시료에서의 직접 진단 가능 여부 조사

- 과수 화상병균의 감염이 의심되는 나무의 각각 다른 부위에서 시료를 추출하여 실제 감염시료에서 직접 진단 가능 여부를 확인함.
- 정확도를 높이기 위해 모든 샘플은 2반복으로 진행함.

• 2017년 3월 29일 시료

- 경기도 안성시 미양면 신기리에서 3월 29일에 채집된 나무에서 병징의 정도에 따라 각 가지 및 눈의 다양한 부위에서 DNA를 추출하여 진단함.

표 28. 실험에 사용한 병징이 의심되는 가지의 진단 부위



- 가지의 수피 부분을 잘게 자른 뒤, Bead를 이용하여 갈아 준 후 PrimePrep Genomic DNA Extraction Kit from Plant(Genet Bio, Korea) 및 CTAB method를 이용하여 DNA를 추출함.

1) Conventional PCR을 이용하여 진단

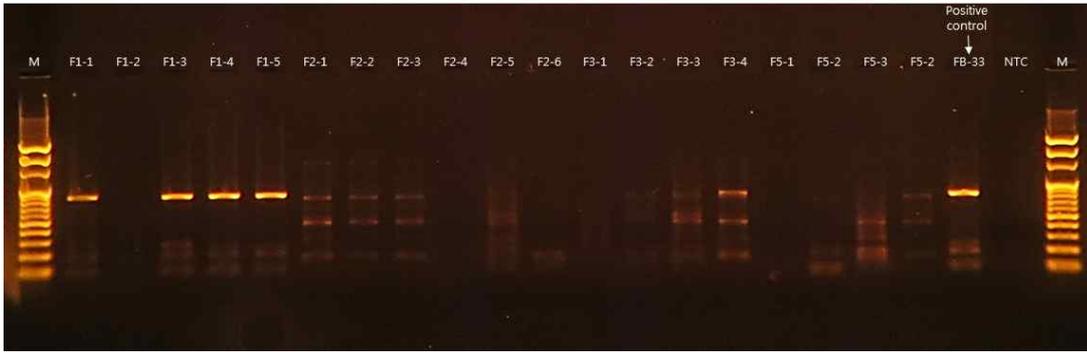


그림 51. Conventional PCR을 이용하여 시료의 과수 화상병 감염여부를 진단한 결과

- 병징이 심한 가지에서 추출한 DNA 중 F1-2에서는 target size에서 band가 나타나지 않았고, target band 외에 non-specific band가 많이 나타남.

2) PNA probe를 이용하여 진단

- 모든 샘플에 대해서 PNA probe assay를 이용하여 진단함.
- 정확도를 높이기 위해 전체 샘플 2반복으로 진행함.
- Real-time PCR 조건과 사용한 enzyme은 이전의 실험과 동일하게 진행함.

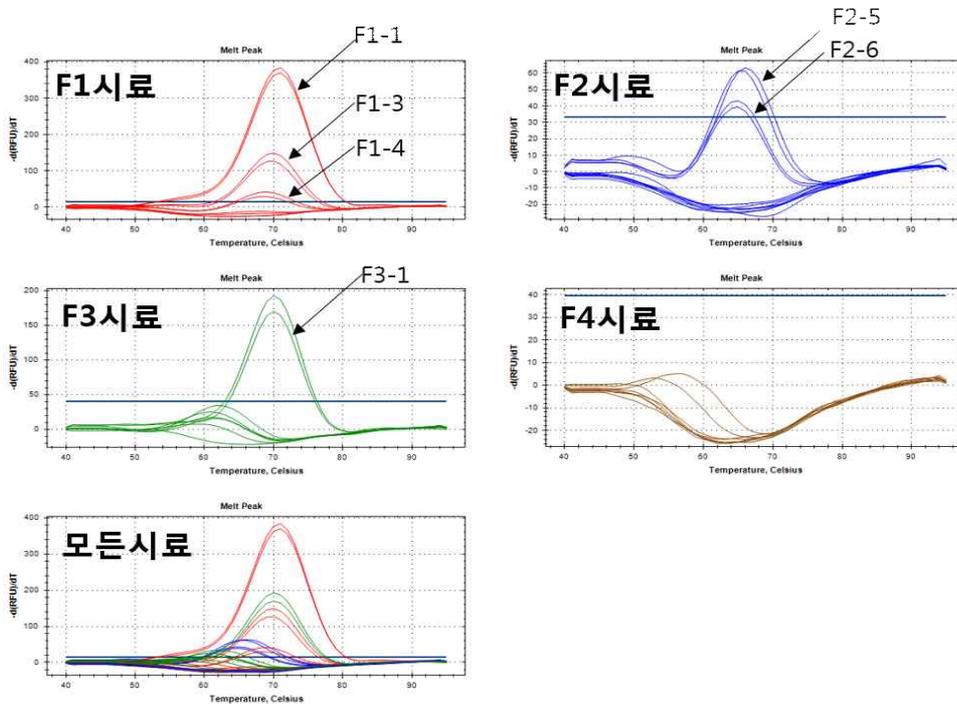


그림 52. PNA probe assay를 이용한 실제시료에서의 Melting peak 결과

표 29. PNA probe assay를 이용한 병징부위에 따른 T_m값과 감염여부

	No.	위치	Melting curve		감염여부
			T _{m1}	T _{m2}	
F1 화상병 병징이 심한 가지	F1-1	병징부위 가지	71	71	○
	F1-2	병징부위 가지	-	-	×
	F1-3	병징부위 가지	70	70	○
	F1-4	병징부위 가지	69	69	○
	F1-5	병징부위 가지	-	-	×
F2 화상병 병징이 있는 가지의 말단	F2-1	눈	-	-	×
	F2-2	눈	-	-	×
	F2-3	눈	-	-	×
	F2-4	가지	-	-	×
	F2-5	가지	65	65	○
	F2-6	가지	66	65	○
F3 화상병 병징이 일부 있는 가지	F3-1	병징부위 가지	70	70	○
	F3-2	No Symptom	-	-	×
	F3-3	No Symptom	-	-	×
	F3-4	눈	-	-	×
F4 무병징	F4-1	가지	-	-	×
	F4-2	가지	-	-	×
	F4-3	눈	-	-	×
	F4-4	눈	-	-	×

- 병징이 심한 가지(F1)의 경우에는 5샘플 중 3샘플에서 T_m값이 69~71℃로 명확하게 진단되었고, 병징이 보이는 가지의 말단(F2)에서는 가지에서만 65~66℃로 진단됨. 화상병 병징이 일부만 있는 가지(F3)에서는 병징이 보이는 일부 가지에서만 진단됨. 무병징 가지에서는 진단되지 않음.

3) Single tube nested PNA assay를 이용한 진단

- 병징이 약한 부위에서도 감염여부를 확인하기 위해 Single tube nested PNA assay로 민감도를 높여 진단함.
- Real-time PCR 조건과 enzyme은 이전 실험과 동일하게 진행함.

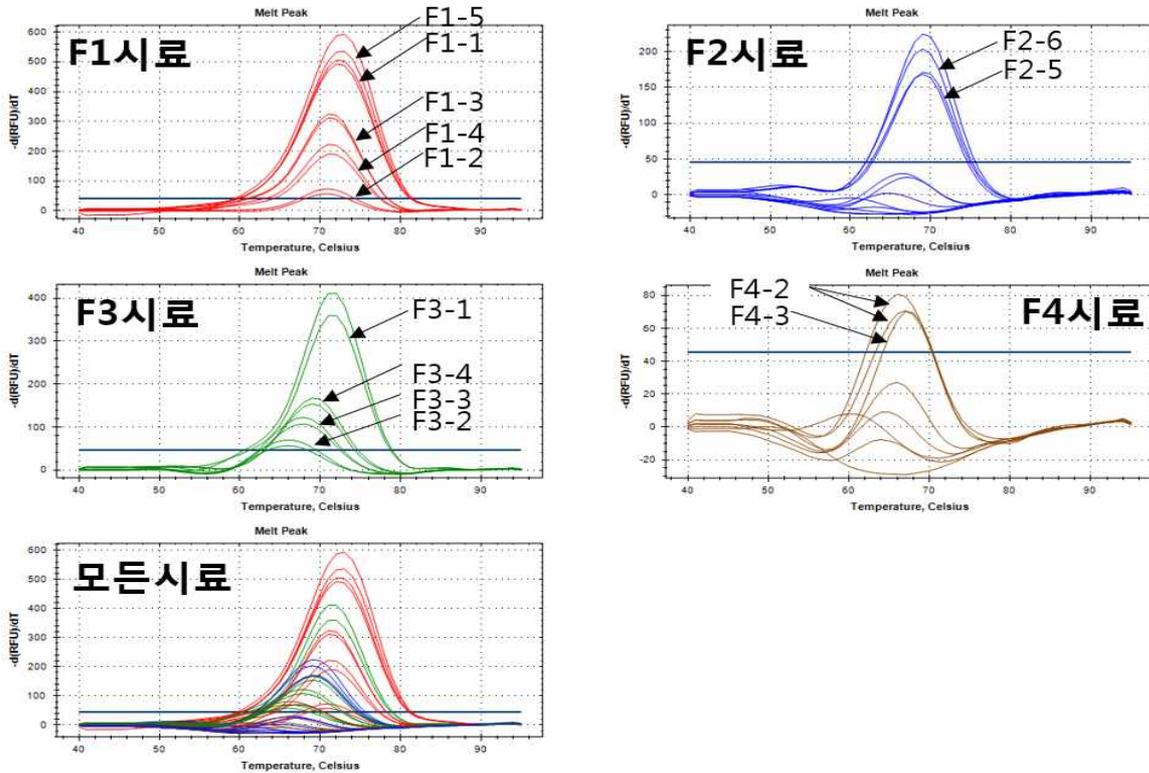


그림 53. Single tube nested PNA probe assay를 이용한 실제시료에서 Melting peak 결과

표 30. Single tube nested PNA proba assay를 이용한 병징부위에 따른 Tm값과 감염여부

	No.	위치	Melting curve		감염여부
			Tm1	Tm2	
F1 화상병 병징이 심한 가지	F1-1	병징부위 가지	72	72	○
	F1-2	병징부위 가지	71	71	○
	F1-3	병징부위 가지	71	71	○
	F1-4	병징부위 가지	71	71	○
	F1-5	병징부위 가지	73	73	○
F2 화상병 병징이 있는 가지의 말단	F2-1	눈	-	-	×
	F2-2	눈	-	-	×
	F2-3	눈	-	-	×
	F2-4	가지	-	-	×
	F2-5	가지	69	69	○
	F2-6	가지	69	69	○
F3 화상병 병징이 일부 있는 가지	F3-1	병징부위 가지	72	72	○
	F3-2	No Symptom	66	66	○
	F3-3	No Symptom	68	68	○
	F3-4	눈	69	69	○
F4 무병징	F4-1	가지	-	-	×
	F4-2	가지	67	66	○
	F4-3	눈	-	67	△
	F4-4	눈	-	-	×

- 병징부위가 눈인 경우를 제외하고는 대부분 감염되었음을 확인하였고, 병징을 보이지 않는 가지에서도 감염을 확인함. 화상병균의 농도가 낮은 샘플의 경우에는 Melting peak의 높이가 낮아지면서 Tm값이 낮아지는 경향이 있음.

- 무병징 가지에서도 감염을 확인함.
- 실험적 오차로 인하여 두 반복 간 결과가 다른 경우, △표시함.

- DNA추출 없이 Biocube를 이용한 진단

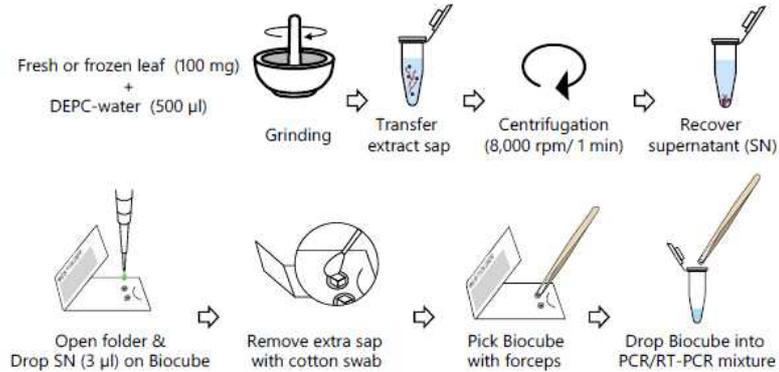


그림 54. Biocube Method

- 일부 샘플을 선정하여 DNA추출 없이 Biocube를 이용하여 Single tube nested PNA probe assay를 진행함.
- 가지의 수피를 잘게 잘라 Bead로 곱게 갈아준 뒤 D.W 100uL를 넣고 잘 섞음. Biocube위에 3~5ul을 분주하고 남은 물기를 제거함. Biocube를 꺼내 PCR mixture가 있는 튜브에 DNA 대신 넣고 Single tube nested PNA probe assay를 진행함.
- Control로는 기존에 추출하고 진단한 동일한 부위의 DNA와 2015년 균주를 사용함.

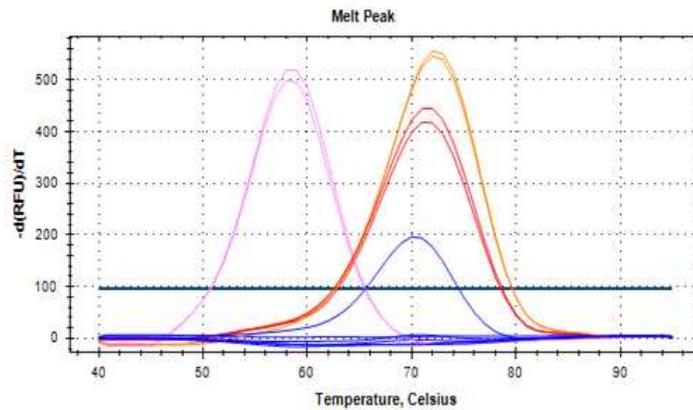


그림 55. Biocube를 사용하여 Single tube nested PNA probe assay로 진단한 Melting peak 결과

표 31. Biocube를 사용하여 확인한 Tm값과 감염여부

Sample	Melting curve		감염여부	
	Tm1	Tm2		
F1-1	-	-	×	Biocube
F2-5	-	-	×	Biocube
F4-2	70.00	-	△	Biocube
F1-1	72.00	71.00	○	DNA
FB-33	72.00	72.00	○	Positive control
연제문	58.00	58.00	×	Negative control

- Biocube를 사용하였을 때, 무병징 가지인 F4-2 샘플에서만 Tm값이 70℃로 화상병 균감염을 확인할 수 있었음. Control로 사용한 F1-1 DNA와 2015년 균주인 FB-33은 71℃와 72℃에서 Tm값이 확인되었고, *E. pyrifoliae*인 연제문은 58℃로 확인됨.
- Biocube를 이용해서 DNA 추출과정 없이 진단이 가능함을 확인함.
- 실험적 오차로 인하여 두 반복 간 결과가 다른 경우, △표시함.

• 2017년 4월 29일 시료

- 경기도 안성시 서운면 송정리의 밭 2곳에서 채집된 의심주의 다양한 발병부위에서 대표적인 샘플(빨간글씨)을 선정하여 DNA를 추출하과 진단함.

표 32. 채집된 샘플 리스트

No.	Sample	특징	
1	AB	감염 본 가지	
2	A1		
3	A2		
4	A3	발병부위 위쪽	
5	A4		
6	A5		
7	A6		
8	B1		
9	B2	발병부위 아래쪽	
10	B3		
11	B4		
12	C1		
13	C2		
14	C3	발병부위 반대쪽 (감염 본 가지와 다른 가지)	
15	C4		
16	C5		
17	C6		
18	C7		
19	C8		
20	C9		
21	C10		
22	D1	A, B, C와 다른 감염주	
23	D2		
24	D3		
25	S1		
26	S2	감염주 옆 나무 (비감염예상)	
27	S3		
28	S4		
29	S5		
30	S6		
밭2	31	E1	감염주
	32	E2	

	33	E3	
	34	E4	
	35	F1	
	36	F2	
안성시 서운면 오촌리	37	F3	감염주
	38	F4	
	39	F5	
	40	F6	
	41	F7	

1) 가지에서 진단

- 가지의 수피부분을 얇게 벗긴 뒤, 잘게 자라 Bead를 이용하여 곱게 갈아 준 후에 CTAB method로 가지의 다양한 발병부위에서 DNA를 추출함



그림 56. 가지의 수피에서 DNA를 추출한 결과

- 추출한 DNA는 Single tube nested PNA probe assay로 진단함
- Real-time PCR 조건과 enzyme은 이전과 동일하게 사용하고, Control은 2015년도 균주를 사용함

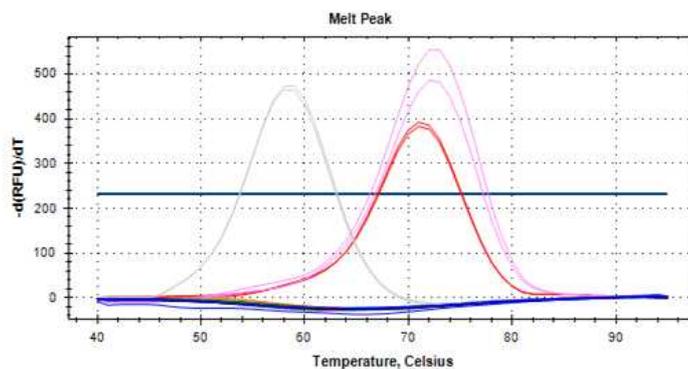


그림 57. Single tube nested PNA probe assay를 이용한 Melting peak 결과

(Red : AB, Orange : A1, B1, C1, Green : D1, D2, Blue : E1, E2, E3, F1, F2, Brown : S1, S2, Pink : FB-33, Gray : 연제문)

표 33. Single tube nested PNA proba assay를 이용한 병징부위에 따른 Tm값과 감염여부

Sample	위치	Melting curve		감염여부
		Tm1	Tm2	
AB	감염 본 가지	71	71	○
A1	발병부위 위쪽	-	-	×
B1	발병부위 아래쪽	-	-	×
C1	발병부위 반대쪽 (감염 본 가지와 다른 가지)	-	-	×
D1	A, B, C와 다른 감염주	-	-	×
D2		-	-	×
E1		-	-	×
E3	감염주	-	-	×
F1		-	-	×
F2		-	-	×
S1		감염주 옆 나무	-	-
S2	(비감염예상)	-	-	×
FB-33	Positive control	72	72	○
연제문	Negative control	59	58	×

- 감염 본 가지와 Positive control에서만 Tm값이 71, 72°C로 감염이 확인되었고, *E. pyrifoliae*인 연제문에서는 59°C로 나타나는 것을 확인함.
- 발병부위의 주변부는 화상병균의 농도가 낮아서 진단이 되지 않는다고 판단하여 이를 진단하기 위해 PCR product를 추가로 15cycle 증폭 후 다시 Melting analysis를 진행함.

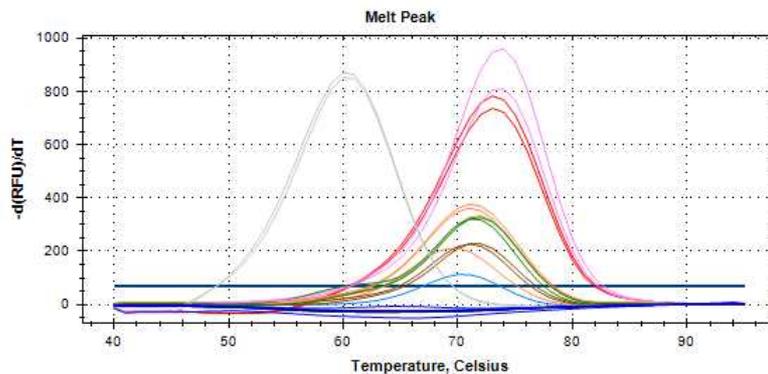


그림 58. 추가 15cycle 증폭 후의 Melting peak 결과
(Red : AB, Orange : A1, B1, C1, Green : D1, D2, Blue : E1, E2, E3, F1, F2, Brown : S1, S2, Pink : FB-33, Gray : 연제문)

표 34. 추가 15cycle 증폭 후의 Tm값과 감염여부

Sample	위치	Melting curve		감염여부
		Tm1	Tm2	
AB	감염 본 가지 (가지에서 추출)	73	73	○
A1	발병부위 위쪽	71	71	○
B1	발병부위 아래쪽	-	70	△
C1	발병부위 반대쪽 (감염 본 가지와 다른 가지)	72	-	△
D1	A, B, C와 다른 감염주	72	71	○
D2		-	-	×
E1		-	-	×
E3	감염주	-	-	×
F1		-	-	×
F2		-	70	△
S1	감염주 옆 나무	71	72	○
S2	(비감염예상)	-	-	×
FB-33	Positive control	74	74	○
연제문	Negative control	60	60	×

- 감염 본 가지뿐만 아니라 발병부위의 주변부에서도 Tm값이 70~73°C로 화상병균에 감염된 것을 진단하였고, 병징이 없는 가지에서도 감염을 확인함.
- 실험적 오차로 인하여 두 반복 간 결과가 다른 경우, △표시함.

2) 잎에서 진단

- 가지에서 DNA 추출이 잘 이루어지지 않아 잎에서 DNA를 CTAB method로 재추출 후 PNA probe assay로 진단함.
- Real-time PCR 조건과 enzyme은 이전과 동일하게 진행함.

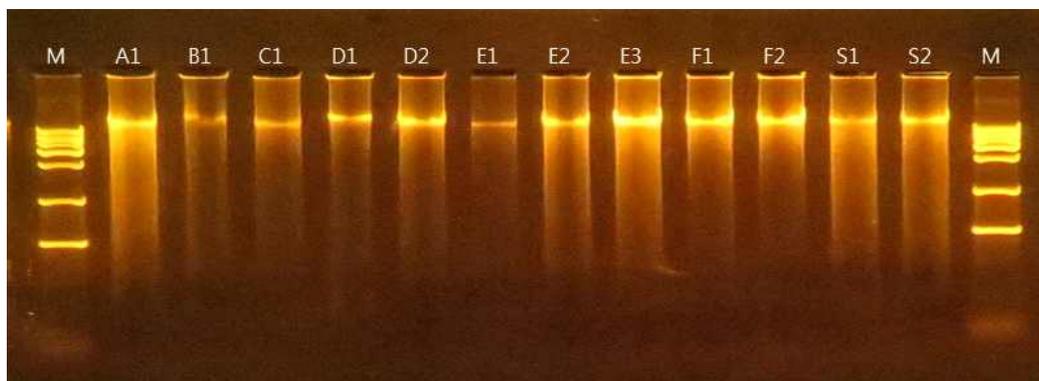


그림 59. 다양한 발병부위의 잎에서 DNA를 추출한 결과

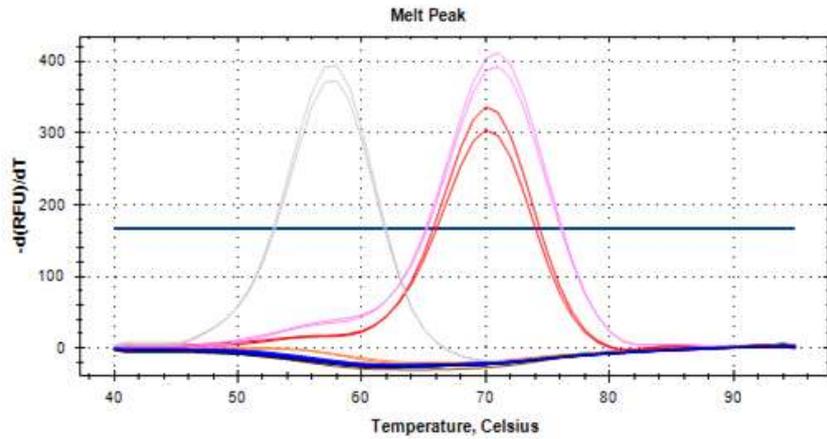


그림 60. PNA probe assay를 이용한 Melting peak 결과
 (Red : AB, Orange : A1, B1, C1, Green : D1, D2, Blue : E1, E2, E3, F1, F2, Brown : S1, S2, Pink : FB-33, Gray : 연제문)

표 35. PNA probe assay를 이용하여 진단한 Tm값과 감염여부

Sample	위치	Melting curve		감염여부
		Tm1	Tm2	
AB	감염 본 가지 (가지에서 추출)	70.00	70.00	○
A1	발병부위 위쪽	-	-	×
B1	발병부위 아래쪽	-	-	×
C1	발병부위 반대쪽 (감염 본 가지와 다른 가지)	-	-	×
D1	A, B, C와 다른 감염주	-	-	×
D2		-	-	×
E1		-	-	×
E2	감염주	-	-	×
E3		-	-	×
F1		-	-	×
F2	감염주 옆 나무 (비감염예상)	-	-	×
S1		-	-	×
S2		-	-	×
FB-33	Positive control	71.00	71.00	○
연제문	Negative control	58.00	58.00	×

- 감염 본 가지와 Positive control인 FB-33에서만 70, 71°C로 감염이 확인되었고, 나머지 시료에서는 DNA추출이 잘 되었음에도 불구하고 화상병균 감염이 진단되지 않았음.
- 화상병균의 병징이 보이지 않는 부위에서도 감염여부를 확인하기 위해 PCR product를 15cycle 추가 증폭 후 Melting analysis 진행함.

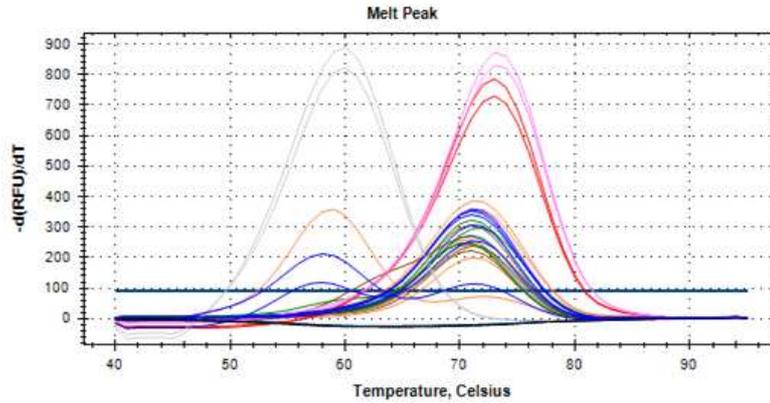


그림 61. cycle 증폭 후 Melting peak 결과

(Red : AB, Orange : A1, B1, C1, Green : D1, D2, Blue : E1, E2, E3, F1, F2, Brown : S1, S2, Pink : FB-33, Gray : 연제문)

표 36. 15cycle 증폭 후 진단한 Tm값과 감염여부

Sample	위치	Melting curve		감염여부
		Tm1	Tm2	
AB	감염 본 가지 (가지에서 추출)	73	73	○
A1	발병부위 위쪽	59/72	71	△
B1	발병부위 아래쪽	71	71	○
C1	발병부위 반대쪽 (감염 본 가지와 다른 가지)	71	71	○
D1	A, B, C와 다른 감염주	70	70	○
D2		71	72	○
E1	감염주	71	71	○
E2		71	58/71	△
E3		71	58/71	△
F1		-	-	×
F2		71	71	○
S1	감염주 옆 나무	71	71	○
S2	(비감염예상)	71	71	○
FB-33	Positive control	73	73	○
연제문	Negative control	60	60	×

- 감염 본 가지와 Positive control뿐만 아니라 F1을 제외한 나머지 샘플에서 모두 Tm 값 70~73°C로 화상병균 감염을 확인함. 추가적으로 15cycle을 증폭하자 일부 샘플에서 Melting peak가 2개로 나타나는 경향을 보임. 증폭 Cycle에 대한 확립이 필요하다고 판단됨.

- 실험적 오차로 인하여 두 반복 간 결과가 다른 경우, △표시함.

- 2017년 5월 15일 시료

1) 가지에서 진단

- 경기도 안성시 서운면 법전리에서 채집된 감염 의심나무의 각각 다른 부위에서 채취한 시료의 DNA를 CTAB method를 이용하여 추출 후, PNA probe assay를 이용하여 진단함.
- Real-time PCR 증폭 조건을 40 cycle로 하여 PNA probe assay를 진행함.

표 37. 진단에 사용한 샘플 리스트

No.	Sample	추출 위치
1	A1	주감염가지
2	A2	가지 밑
3	A3	무병징에서 가까운 위쪽
4	A4	무병징에서 먼 위쪽
5	B1	감염
6	B2	감염
7	B3	감염가지 끝 부분(무병징)
8	B4	주감염가지
9	B5	무병징
10	C1	감염
11	C2	무병징에서 가까운 부분
12	D1	감염주 줄기
13	D2	무병징
14	E	비감염
15	1	매개충
16	2	매개충
17	3	매개충(과리)
18	4	매개충
19	5	매개충(좀)

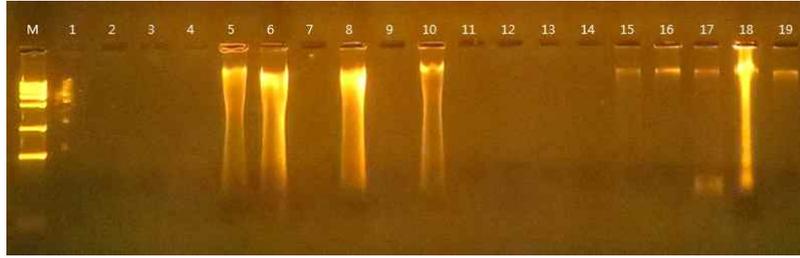


그림 62. 다양한 발병부위에서 DNA를 추출한 결과

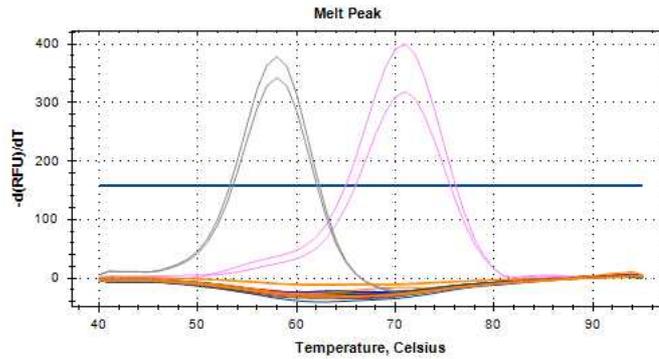


그림 63. PNA probe assay를 이용한 Melting peak 결과 (Red : A, Orange : B, Green : C, Blue : D, Brown : E, Pink : FB-33, Gray : 연제문)

- Positive control인 FB-33과 Negative control인 연제문을 제외하고는 증폭이 이루어지지 않음.
- 충분히 증폭을 하기 위해 동일한 PCR product에 추가로 15cycle을 증폭한 뒤 Melting analysis 진행함.

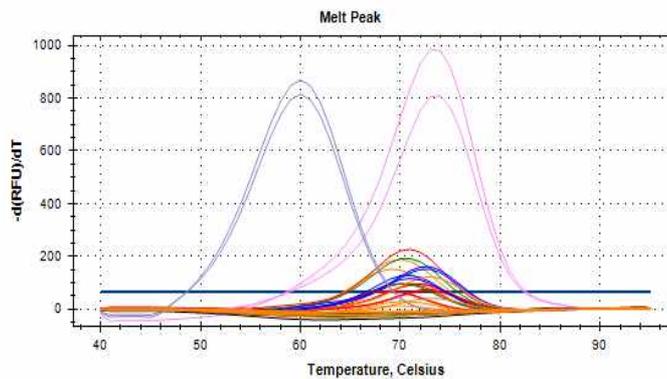


그림 64. 추가 15cycle 증폭 후 Melting peak 결과 (Red : A, Orange : B, Green : C, Blue : D, Brown : E, Pink : FB-33, Gray : 연제문)

표 38. 추가 15cycle 증폭 후 Tm값과 감염여부

구분	Sample	추출 위치	Melting curve		감염여부
			Tm1	Tm2	
1	A1	주감염가지	73	73	○
2	A2	가지 밑	72	72	○
3	A3	무병징에서 가까운 위쪽	71	71	○
4	A4	무병징에서 먼 위쪽	69	69	○
5	B1	감염	73	73	○
6	B2	감염	-	-	×
7	B3	감염가지 끝 부분 (무병징)	70	70	○
8	B4	주감염가지	-	-	×
9	B5	무병징	69	70	○
10	C1	감염	-	-	×
11	C2	무병징에서 가까운 부분	70	71	○
12	D1	감염주 줄기	73	73	○
13	D2	무병징	71	71	○
14	E	비감염	-	-	×
15	FB-33	Positive control	74	73	○
16	연제문	Negative control	60	60	×

- B2, B4, C1, E를 제외하고는 모두 감염되었음을 진단함.

2) 매개충에서 진단

- 매개충이라고 생각되는 5마리의 DNA를 추출 후, PNA probe assay 기준 조건에 추가로 15 cycle을 증폭하여 진단함.
- Control은 기존에 보유하고 있던 애멸구와 2015년 균주를 사용하여 진행함.

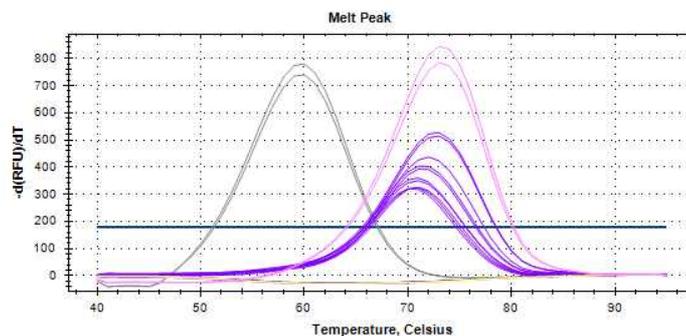


그림 65. PNA probe assay를 이용한 매개충에서의 Melting peak 결과 (1~5번 샘플 : Purple, 애멸구 : Yellow, FB-33 : Pink, 연제문 : Gray)

표 39. PNA probe assay를 이용한 매개충에서의 Tm값과 감염여부 확인결과

No.	Sample	추출 위치	Melting curve		감염여부
			Tm1	Tm2	
1	1	매개충	71	71	○
2	2	매개충	73	73	○
3	3	매개충_파리	70	71	○
4	4	매개충_큰벌레	71	71	○
5	5	매개충_좀	71	72	○
6	애벌레	Negative Control	-	-	×
7	FB-33	Positive control	73	73	○
8	연체문	Negative control	60	60	×

- Negative control로 사용한 애벌레를 제외한 5마리의 곤충 모두 Tm값이 70~73℃로 화상병균 매개충으로 판단됨.

① 2017년 6월 9일 시료

- 충남 천안시 입장면 독정리의 과수원에서 채집한 시료를 사용함.
- A과수원에서 일렬로 10주를 채집하고 B과수원에서 일렬로 19주를 채집하였으며 사과 나무뿐만 아니라 과수원 주변의 매실나무와 찔레나무, 자두나무를 포함한 고사목그루터의 신초를 채집함. 각각 가지의 수피에서 CTAB method로 DNA를 추출한 뒤 PNA probe assay로 진단함.

표 40. 진단에 사용한 시료 리스트

No.	Sample	위치	No.	이름	위치
1	A1	감염주 (무병징)	21	B11	감염의심주
2	A2		22	B12	
3	A3		23	B13	
4	A4		24	B14	
5	A5		25	B15	
6	A6		26	B16	
7	A7		27	B17	
8	A8		28	B18	
9	A9		29	B19	
10	A10		30	B 매실_1	
11	B1	31	B 매실_2		
12	B2	32	B 매실_3		
13	B3	33	B 매실_4		
14	B4	34	B 찔레_1		
15	B5	35	B 찔레_2		
16	B6	36	B 찔레_3		
17	B7	37	B 찔레_4		
18	B8	38	A11	감염의심, 무증상(자두나무)	
19	B9	39	A12	고사목그루터 신초(무증상)	
20	B10	40	A13	사과나무감염주(감염시료)	
		41	A14	건전주(Negative control)	

- 이전 실험에서와 동일하게 PNA probe assay로 진행하는 경우 증폭과정을 40cycle로 한 뒤, 추가로 15cycle을 하는 방법이 아닌 50cycle을 증폭하는 방법으로 변경함. PNA probe를 이용한 화상병균 진단에 대한 조건을 50cycle로 확립함.
- Real-time PCR 조건은 95℃에서 5분 동안 pre-denaturation을 거친 후, denaturation 95℃ 30초, annealing 56℃ 30초, extension 72℃ 30초를 수행하였으며 50cycle 반복함.
- 증폭이 끝난 후, 95℃ 5분, 80℃ 30초, 65℃ 30초, 50℃ 30초로 온도를 서서히 낮추고 40℃에서 95℃까지 1℃/sec로 온도를 증가시키며 Melting analysis를 진행함.

표 41. A과수원에서 채집한 10주의 Melting analysis 결과와 감염여부

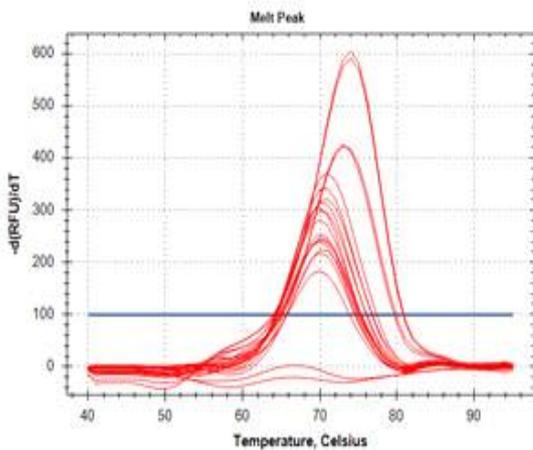


그림 66. A과수원에서 일렬로 채집한 10주의 Melting peak 결과

Sample	Melting curve		RFU 값	감염여부
	Tm1	Tm2		
A1	70	70	250	○
A2	70	70	250	○
A3	70	70	180	○
A4	71	71	320	○
A5	70	70	300	○
A6	70	71	320	○
A7	-	-	-	×
A8	74	74	600	○
A9	73	73	420	○
A10	70	70	300	○

표 42. B과수원에서 채집한 10주의 Melting analysis 결과와 감염여부

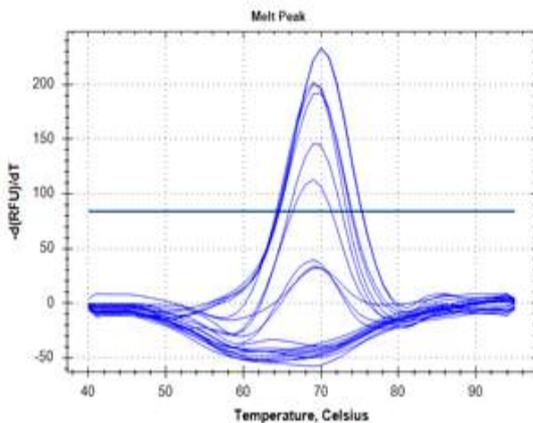


그림 67. B과수원에서 일렬로 채집한 10주의 Melting peak 결과

Sample	Melting curve		RFU 값	감염여부
	Tm1	Tm2		
B1	-	-	-	×
B2	69	69	130	○
B3	-	-	-	×
B4	-	-	-	×
B5	69	-	200	△
B6	69	70	200	○
B7	70	70	240	○
B8	-	-	-	×
B9	-	-	-	×
B10	-	-	-	×

표 43. B과수원에서 채집한 9주의 Melting analysis 결과와 감염여부

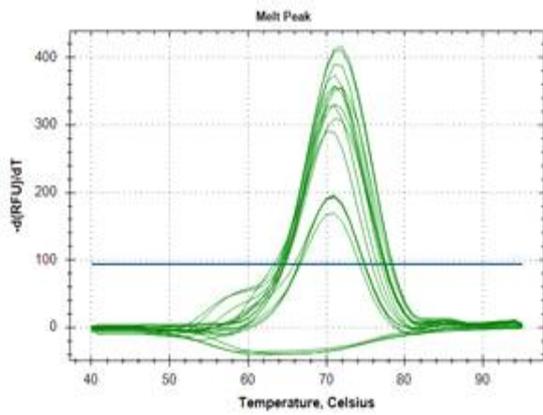


그림 68. B과수원에서 일렬로 채집한 9주의 Melting peak 결과

Sample	Melting curve		RFU 값	감염여부
	Tm1	Tm2		
B11	71	71	340	○
B12	-	-	-	×
B13	71	71	370	○
B14	71	72	360	○
B15	71	71	320	○
B16	-	70	300	△
B17	72	72	420	○
B18	71	71	180	○
B19	71	71	200	○

표 44. 과수원 주변에서 채집한 매실, 찔레의 Melting analysis 결과와 감염여부

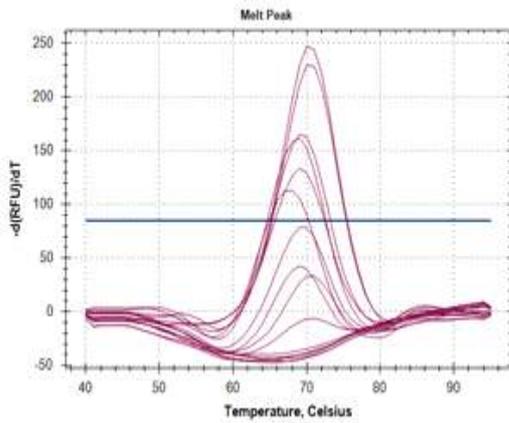


그림 69. B과수원 주변 매실나무와 찔레나무의 Melting peak 결과

Sample	Melting curve		RFU 값	감염여부
	Tm1	Tm2		
매실 1	68	68	120	○
매실 2	70	70	240	○
매실 3	-	-	-	×
매실 4	69	69	140	○
찔레 1	-	-	-	×
찔레 2	-	-	-	×
찔레 3	-	-	-	×
찔레 4	-	-	-	×

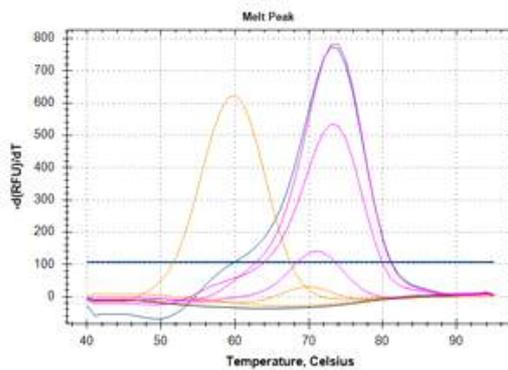


그림 70. 감염의심주 및 건전주의 Melting peak 결과

표 45. 감염의심주, 건전주의 Melting analysis 결과와 감염여부

Sample	Melting curve		RFU 값	감염여부
	Tm1	Tm2		
감염의심 자두나무	-	69	170	△
고사목그루터신초	73	70	400	○
사과나무 감염시료	73	73	420	○
사과 건전주	-	-	-	×
사과 건전주	-	-	-	×
과수화상병 Positive con.	74	74	800	○
가지검은마름병 Positive con.	60	60	700	×
절레 4	-	-	-	×

- 실험적 오차로 인하여 두 반복 간에 결과가 다른 경우, △표시함.
 - 각 과수원에서 한 줄로 위치하는 10주의 사과나무에서 과수 화상병균 감염 여부를 확인한 결과, 병징을 보이지 않는 많은 나무에서도 병원균이 잠재되어 있는 것을 확인함.
 - 무병징 나무들이 향후 발병 조건이 나아진 후에 전염원으로써 역할을 할 것으로 여겨짐.
 - 사과 과수원 B 주변 화상병 감염이 의심되는 매실나무와 절레나무에서 과수 화상병균 감염 여부를 확인한 결과, 화상병균에 감염되어 있는 것을 확인하였고 향후 화상병균의 감염 기주으로써의 역할을 할 것으로 사료됨.
 - 과수 화상병은 주요 기주가 되는 사과, 배 외에 다양한 장미과 식물에 병을 일으키기 때문에 주변 감염주에 의해 병이 확산될 우려가 있음.
 - 과수원 A와 B에서 각 10주씩 샘플링한 후 과수 화상병 감염 여부를 확인한 결과, 병징을 보이지 않는 시료에서도 화상병균에 감염되어 있는 것을 확인함.
 - 과수 화상병균 진단 결과, 병징을 보이지 않는 나무에서도 높은 감염율을 확인함.
- 2017년 6월 12일 시료
 - 경기도 안성리 중리동의 A, B과수원에서 병징의 정도에 따라 다양한 부위에서 샘플을 채집함.
 - 채집된 샘플은 CTAB method를 이용하여 DNA를 추출하고 PNA probe assay로 진단함. 이때, 증폭 cycle은 50cycle로 하여 진행함.

표 46. 진단에 사용한 샘플 리스트

No.	Sample	특이사항
1	A1	무병징
2	A2-1	trunk
3	A2-2	positive 1
4	A2-3	positive 1-no symptom
5	A2-4	positive 2
6	A2-5	positive 2-no symptom
7	A3-1	trunk
8	A3-2	positive 1
9	A3-4	positive 2
10	A3-5	positive 2-no symptom
11	A4-1	trunk
12	A4-2	positive 1
13	A4-3	positive 1-no symptom
14	A5	무병징
15	A6	무병징
16	A7-1	trunk
17	A7-2	positive 1
18	A7-3	positive 1-no symptom
19	A7-4	positive 2
20	A7-5	positive 2-no symptom
21	A8	무병징
22	A9	무병징
23	A10-1	trunk
24	A10-2	positive 1
25	A10-3	positive 1-no symptom
26	B1	
27	B2	감염심한 발에서 감염확인 X
28	B3	
29	B4	- 수출
30	B5	

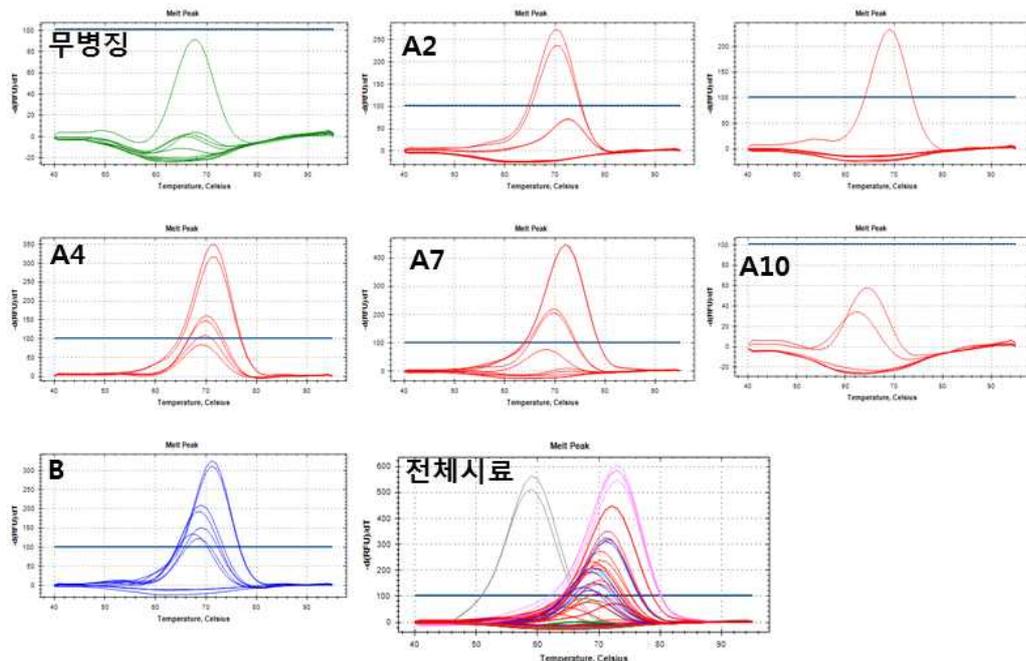


그림 71. PNA probe assay를 이용한 전체 시료의 Melting peak 결과

표 47. PNA probe assay로 진단한 다양한 발병부위의 Tm값과 감염여부

No.	Sample		Melting curve		감염여부
			Tm1	Tm2	
1	A1	무병징	-	-	×
2	A2-1	trunk	-	-	×
3	A2-2	positive 1	-	-	×
4	A2-3	positive 1-no symptom	-	-	×
5	A2-4	positive 2	-	-	×
6	A2-5	positive 2-no symptom	70.00	70.00	○
7	A3-1	trunk	-	-	×
8	A3-2	positive 1	-	-	×
9	A3-4	positive 2	-	-	×
10	A3-5	positive 2-no symptom	69.00	-	△
11	A4-1	trunk	70.00	69.00	○
12	A4-2	positive 1	71.00	71.00	○
13	A4-3	positive 1-no symptom	70.00	70.00	○
14	A5	무병징	-	-	×
15	A6	무병징	-	-	×
16	A7-1	trunk	70.00	70.00	○
17	A7-2	positive 1	72.00	72.00	○
18	A7-3	positive 1-no symptom	-	-	×
19	A7-4	positive 2	-	-	×
20	A7-5	positive 2-no symptom	-	-	×
21	A8	무병징	-	-	×
22	A9	무병징	-	-	×
23	A10-1	trunk	-	-	×
24	A10-2	positive 1	-	-	×
25	A10-3	positive 1-no symptom	-	-	×
26	B1		71.00	71.00	○
27	B2	감염 심한 발에서	69.00	69.00	○
28	B3	감염확인 X	67.00	-	△
29	B4	(수출)	69.00	69.00	○
30	B5		-	-	×
31	A8	positive control(9일)	73.00	73.00	○
32	A14	negative control(9일)	-	-	×
33	일반후지	negative control	-	69.00	
34	천안(FB-33)		73.00	73.00	○
35	연제문		59.00	59.00	×

- A2, A3, A4, A4와 B1~4에서 감염을 확인함. 병징이 없는 경우에도 진단되는 것을 확인함.
- 실험적 오차로 인하여 두 반복 간 결과가 다른 경우, △표시함.
- 같은 나무 내에서도 부위에 따라 진단의 유무가 달랐음.

- 2017년 7월 1일 시료
 - 경기도 안성시 서운면 송산리에서 감염주와 비감염주의 무병징부위, 멧아, 뿌리를 채집하였고, 사과나무뿐만 아니라 주변의 벚나무, 체리나무, 양딸기도 채집하여 전체 2반복으로 하여 PNA probe assay로 진단함.
 - Control로 이전에 감염시료에서 감염(A8), 비감염(A14)이 진단된 샘플과 2015년도 균주를 사용함.

표 48. 진단에 사용한 샘플 리스트

No.	Sample	특징
1	감염주1	무병징
2	감염주1	멧아
3	감염주1	뿌리
4	감염주2	무병징
5	감염주2	뿌리
6	비감염주1(차고쪽)	
7	비감염주2(가지)	
8	비감염주3	무병징
9	비감염주4	
10	비감염주5(멧아)	
11	비감염주6	
12	벚나무1	
13	벚나무2	
14	벚나무3	무병징
15	벚나무4	
16	벚나무5	
17	체리1(가지)	일반병징은 있으나 화상병징은 확실하지 않음
18	양딸기1	
19	양딸기2	무병징
20	양딸기3	

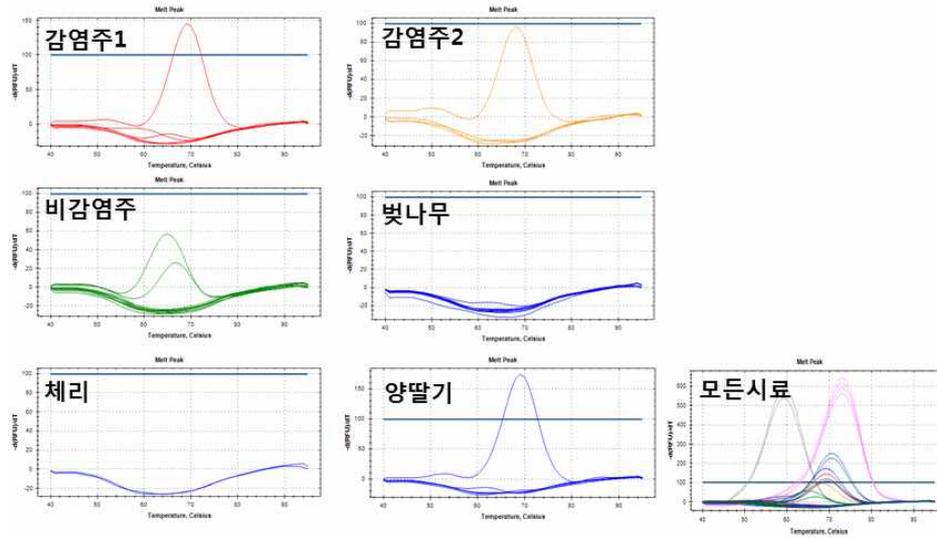


그림 72. PNA probe assay를 사용하여 진단한 Melting peak 결과

표 49. PNA probe assay를 사용하여 진단한 Tm값과 감염여부

Sample	Melting curve		감염여부
	Tm1	Tm2	
1_감염주1무병징	—	—	×
2_감염주1맹아	69.00	—	△
3_감염주1뿌리	—	—	×
4_감염주2무병징	—	—	×
5_감염주2뿌리	—	—	×
6_비감염주1차고쪽	—	—	×
7_비감염주2가지	—	—	×
8_비감염주3	—	—	×
9_비감염주4	—	—	×
10_비감염주5맹아	—	—	×
11_비감염주6	—	—	×
12_벚나무1	—	—	×
13_벚나무2	—	—	×
14_벚나무3	—	—	×
15_벚나무4	—	—	×
16_벚나무5	—	—	×
17_체리1가지	—	—	×
18_양딸기1	—	—	×
19_양딸기2	—	—	×
20_양딸기3	—	69.00	△
A8 (6/9 positive)	73.00	73.00	○
A14 (6/9 negative)	—	—	×
일반후지 (control)	—	—	×
천안 (FB-33)	73.00	73.00	○
연제문	59.00	59.00	×

- 감염주의 여러 부위 중에서 맹아에서만 화상병균을 진단함. 또한, 양딸기 3샘플 중 1

개 샘플에서 화상병균을 진단함.

- 실험적 오차로 인하여 두 반복 간 결과가 다른 경우, △ 표시함.

• 2017년 7월 12일 시료

- 경기도 안성시 서운면 청용리에서 화상병 또는 부란병 가능성을 보이는 4개의 사과나무와 주변 2개의 자두나무, 그리고 매개충으로 의심되는 선녀벌레 1마리를 채집하여 DNA 추출 후에 PNA probe assay로 진단함.

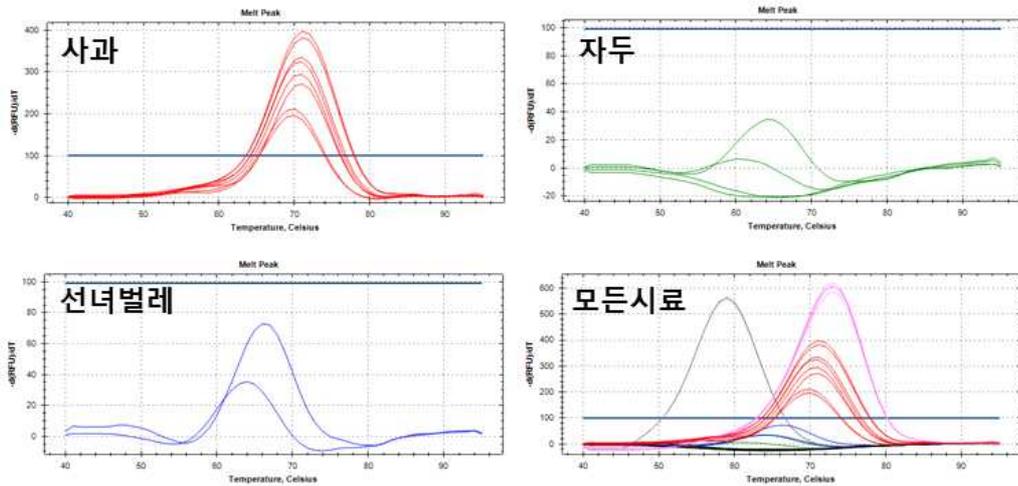


그림 73. PNA probe assay를 이용하여 진단한 Melting peak 결과

표 50. PNA probe assay를 이용하여 확인한 Tm값과 감염여부

Sample	Melting curve		감염여부
	Tm1	Tm2	
사과1	70.00	70.00	○
사과2	71.00	71.00	○
사과3	71.00	71.00	○
사과4	71.00	71.00	○
자두1	-	-	×
자두2	-	-	×
선녀벌레	-	-	×
A8(9일 positive)	73.00	73.00	○
A14(9일 negative)	-	-	×
일반후지(control)	69.00	-	×
천안(FB-33)	73.00	73.00	○
연제문	59.00	59.00	×

- 사과나무에서는 모두 화상병균 감염을 확인하였고, 자두에서는 감염되지 않았음.

- 또한, 매개충으로 생각했던 선녀벌레에서도 화상병균이 진단되지 않음.

- 잎 침지액으로 진단

- 화상병균 감염증상을 보이는 잎의 가운데를 잘라 상온에서 D.W 100uL에 잘린 부위를 30분동안 담궈두었음. 30분 뒤 잎을 꺼내고 DNA 대신 잎의 단면을 담궈두었던 D.W 를 사용하여 PNA probe assay를 진행함.
- Control로 동일한 잎에서 추출한 DNA와 2015년 균주를 사용하여 결과를 비교하였음.

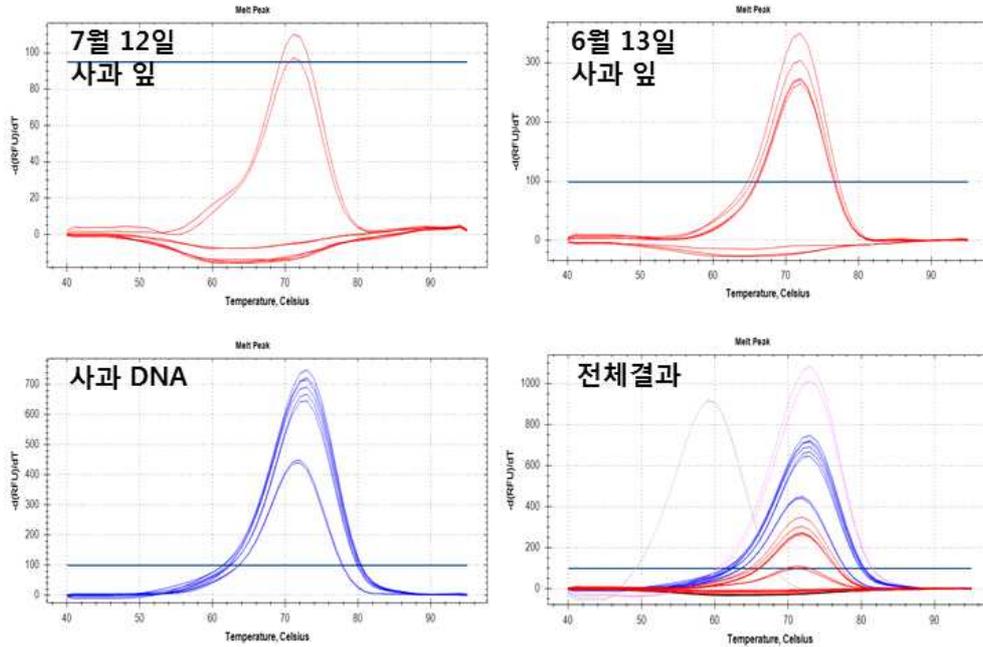


그림 74. 침지액으로 진행한 Melting analysis 결과

표 51. 침지액으로 진단한 Melting curver 결과와 감염여부

No.	Sample		Melting curve		감염여부
			Tm1	Tm2	
1	7월 12일 사과2		-	-	×
2	7월 12일 사과2		-	-	×
3	7월 12일 사과4		-	-	×
4	7월 12일 사과4	잎 침지액	71.00	71.00	○
5	6월 13일 A4-2		72.00	72.00	○
6	6월 13일 A4-2		-	-	×
7	6월 13일 A7-2		-	72.00	△
8	6월 13일 A7-2		72.00	72.00	○

9	7월 12일 사과2	DNA	73.00	73.00	○
10	7월 12일 사과4		73.00	73.00	○
11	6월 13일 A4-2		72.00	72.00	○
12	6월 13일 A7-2		73.00	73.00	○
13	6월 9일 B9	Negative control	-	-	×
14	FB-33(천안)	Positive control	73.00	73.00	○
15	연제문	Negative control	59.00	59.00	×

- Control로 사용한 동일한 나무 DNA와 동일하게 침지액 8샘플 중 4샘플에서 화상병균이 진단되었음
- 실험적 오차로 인하여 두 반복 간 결과가 다른 경우, △ 표시함.
- 별도의 DNA 추출 과정 없이 침지액만으로도 화상병균 진단이 가능함을 확인함.

(바) 화상병균 정밀 진단 kit를 활용한 시제품 개발

○ 과수화상병균 정밀 진단 kit 제품 Manual 제작

- 과수화상병균 진단 kit는 2가지 버전으로 제작하였으며, 일반 real-time PCR과 같은 기반의 ‘PNA probe assay’ 와 병징이 보이지 않는 화상병 시료 같은 좀 더 민감한 진단 결과가 필요할 때 사용하는 ‘single tube nested PNA probe assay’ 로 시제품을 개발하였음(그림 115-116).

**XENO-Erwinia amylovora
Detection Kit**
(for PNA probe assay)

● **Composition** 500rxn

XENO 2x qPCR Premix	1mℓ	5ea
XENO <i>E. amylovora</i> Primer set	1mℓ	1ea
XENO <i>E. amylovora</i> Probe	250μℓ	1ea

● **Caution**

Avoid to direct light

● **Storage condition**

Store at -20°C

● **Description**

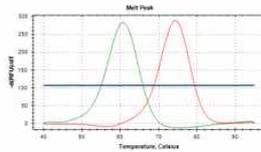
XENO-*Erwinia amylovora* Detection Kit is possible to detection Fire blight by plant DNA(10pg/μℓ) and to discrimination between *Erwinia amylovora* and *Erwinia pyrifoliae*.

● **Distinction**

Fluorescence : FAM

Erwinia amylovora : 72 ± 3°C

Erwinia pyrifoliae : 60 ± 3°C



Tm values of 72°C represents a *Erwinia amylovora*(Red) and 60°C represents a *Erwinia pyrifoliae*(Green) genotype. (above figure)

Cat. NO. : XE-2017015-S

● **Standard reaction condition**

PCR mixture (Reaction volume : 20μℓ)	
Template DNA	- μℓ
XENO 2x qPCR Premix	10.0μℓ
XENO <i>E. amylovora</i> Primer set	2.0μℓ
XENO <i>E. amylovora</i> Probe	0.5μℓ
Add D.W to	20.0μℓ

Vortexing and spin down all components make a previous

● **Real time PCR condition**

Step	Temp.	Time(mm:ss)	Cycle
Amplification	95°C	10:00	1
	95°C	0:30	
	56°C	0:30 *	
	72°C	0:30	
Melting	95°C	5:00	1
	80°C	0:30	1
	65°C	0:30	1
	50°C	0:30	1
	1) 40°C~95°C	Increment 1°C 5 sec hold **	1
	2) 40°C~95°C	Increment 0.15°C 2 sec hold ***	1

1) CFX96 system

2) QuantStudio system

* Fluorescence Detection

** Increment 1°C at 40°C after 5sec stay and check to plate Read

*** Increment 0.15°C at 40°C after 2sec stay and check to plate Read

그림 75. 과수화상병 정밀 진단 kit(PNA probe assay) 매뉴얼-1

XENO-*Erwinia amylovora* Detection Kit

(for Single tube nested PNA probe assay)

● Composition 500rxn

XENO 2x qPCR Premix	1mℓ	5ea
XENO <i>E. amylovora</i> Primer set	1mℓ	1ea
XENO <i>E. amylovora</i> Outer Primer set	1mℓ	1ea
XENO <i>E. amylovora</i> Probe	250μℓ	1ea

● Caution

Avoid to direct light

● Storage condition

Store at -20°C

● Description

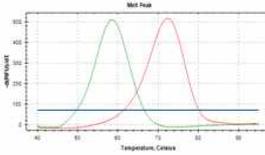
XENO-*Erwinia amylovora* Detection Kit is possible to detection Fire blight by plant DNA(10pg/μℓ) and to discrimination between *Erwinia amylovora* and *Erwinia pyrifoliae*.

● Distinction

Fluorescence : FAM

Erwinia amylovora : 72 ± 3°C

Erwinia pyrifoliae : 59 ± 3°C



Tm values of 72°C represents a *Erwinia amylovora*(Red) and 59°C represents a *Erwinia pyrifoliae*(Green) genotype. (above figure)

Cat. NO. : XE-2017015-S

● Standard reaction condition

PCR mixture (Reaction volume : 20μℓ)	
Template DNA	- μℓ
XENO 2x qPCR Premix	10 μℓ
XENO <i>E. amylovora</i> Primer set	2 μℓ
XENO <i>E. amylovora</i> Outer Primer set	2 μℓ
XENO <i>E. amylovora</i> Probe	0.5 μℓ
Add D.W to	20 μℓ

Vortexing and spin down all components make a previous

● Real time PCR condition

Step	Temp.	Time(mm:ss)	Cycle
Amplification	95°C	10:00	1
	95°C	0:30	
	72°C	0:15	25
	95°C	0:30	
	56°C	0:30 *	
	72°C	0:30	
Melting	95°C	5:00	1
	80°C	0:30	1
	65°C	0:30	1
	50°C	0:30	1
	1) 40°C~95°C	Increment 1°C 5 sec hold **	1
	2) 40°C~95°C	Increment 0.15°C 2 sec hold ***	1

1) CFX96 system

2) QuantStudio system

* Fluorescence Detection

** Increment 1°C at 40°C after 5sec stay and check to plate Read

*** Increment 0.15°C at 40°C after 2sec stay and check to plate Read

그림 76. 과수화상병 정밀 진단 kit(Single tube nested PNA probe assay) 매뉴얼-2

○ 과수화상병균 정밀 진단 kit 시제품 제작

- 과수화상병균의 진단 결과의 신뢰성과 실험의 편의성을 높이기 위해 kit 내에 positive control과 각 프라이머 세트를 하나의 튜브에 담았음
- PNA probe assay는 asymmetric primer를 사용하기 때문에 각 프라이머 세트는 각 마커별 최적의 결과를 얻을 수 있는 조합으로 혼합하여 하나의 튜브로 제작하였음



그림 77. Positive control과 각 프라이머 세트를 포함한 진단 kit 시제품 제작 결과

(4) 과수화상병균 시료 수집 및 정밀 진단 kit의 현장 적용(농림축산검역본부)

○ 2017년도 화상병균 시료 수집 및 생물학적 특성 조사

- '17년 화상병 발생과원 및 인접과원 등 16개 지점에서 현장 적용시험을 실시함.
- 화상병균 감염이 확인된 나무, 의심되는 나무, 증상이 없는 나무, 주변 기주식물, 곤충 등에서 DNA를 추출하여 직접 진단 가능 여부, 잠복된 병원균의 진단 여부 등을 조사함.

표 52. 현장 적용시험 현황(2017년도)

No.	채집일	시료명	시료분류	채집지역
1	'17.3.29	F1-1~F4-4	배나무	경기 안성 미양 신기리
2	'17.4.29	AB, A1~S6	배나무	경기 안성 서운 송정리
3	'17.4.29	E1~F7	배나무	경기 안성 서운 오촌리
4	'17.5.15	A1~E, 1~5	배나무, 곤충	경기 안성 서운 법전리
5	'17.6.9	A1~A14	사과나무	충남 천안 입장 독정리
6	'17.6.9	B1~B20, 등	사과, 매화, 찔레	"
7	'17.6.12	A1~A10-3	배나무	경기 안성 중리동
8	'17.6.12	B1~B5	배나무	"
9	'17.7.1	감염주1~양딸기3	사과, 체리, 딸기 등	경기 안성 서운 송산리
10	'17.7.12	사과1~선너별레	사과, 자두, 곤충	경기 안성 서운 청용리
11	'17.7.12	1-P~42P 등	배나무	"
12	'17.7.20	A-N-1~5 등	배나무	경기 안성 공도 양기리
13	'17.7.20	B-N-1~5 등	배나무	"
14	'17.7.29	P-nos-1~9 등	배나무, 자두나무	경기 안성 서운 법전리
15	'17.7.30	A-nos-1~10 등	배나무	경기 안성 서운 산평리
16	'17.7.30	P-1~14 등	사과나무	"



그림 78. 현장적용 시험 과수재배지(2017년도)
(화상병 발생과원 및 인접과원, 파란색 글상자는 조사일자임)

- 2017년 7월 12일
 - 경기도 안성시 서운면에서 7월 12일에 채집된 이병주의 감염증상 및 무증상 부위에서 DNA를 추출하고 진단함.
 - DNeasy plant mini kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 시료의 gDNA을 추출함.

표 53. 진단에 사용한 샘플 리스트

No.	시료명	분류	특징	No.	시료명	분류	특징
1	1-P	배나무	이병주(감염시료)	30	37-P	배나무	이병주(감염시료)
2	2-P	배나무	이병주(감염시료)	31	38-P	배나무	이병주(감염시료)
3	3-P	배나무	이병주(감염시료)	32	39-P	배나무	이병주(감염시료)
4	4-P	배나무	이병주(감염시료)	33	40-P	배나무	이병주(감염시료)
5	5-P	배나무	이병주(감염시료)	34	41-P	배나무	이병주(감염시료)
6	6-P	배나무	이병주(감염시료)	35	42-P	배나무	이병주(감염시료)
7	7-P	배나무	이병주(감염시료)	36	4-P-near	배나무	이병주(무병징)
8	8-P	배나무	이병주(감염시료)	37	5-P-near	배나무	이병주(무병징)
9	9-P	배나무	이병주(감염시료)	38	6-P-near	배나무	이병주(무병징)
10	10-P	배나무	이병주(감염시료)	39	7-P-near	배나무	이병주(무병징)
11	11-P	배나무	이병주(감염시료)	40	8-P-near	배나무	이병주(무병징)
12	12-P	배나무	이병주(감염시료)	41	9-P-near	배나무	이병주(무병징)
13	13-P	배나무	이병주(감염시료)	42	10-P-near	배나무	이병주(무병징)
14	14-P	배나무	이병주(감염시료)	43	1-P-줄기	배나무	이병주(무병징)
15	15-P	배나무	이병주(감염시료)	44	3-P-줄기	배나무	이병주(무병징)
16	16-P	배나무	이병주(감염시료)	45	4-P-줄기	배나무	이병주(무병징)
17	17-P	배나무	이병주(감염시료)	46	5-P-줄기	배나무	이병주(무병징)
18	18-P	배나무	이병주(감염시료)	47	6-P-줄기	배나무	이병주(무병징)
19	19-P	배나무	이병주(감염시료)	48	7-P-줄기	배나무	이병주(무병징)
20	27-P	배나무	이병주(감염시료)	49	8-P-줄기	배나무	이병주(무병징)
21	28-P	배나무	이병주(감염시료)	50	9-P-줄기	배나무	이병주(무병징)
22	29-P	배나무	이병주(감염시료)	51	10-P-줄기	배나무	이병주(무병징)
23	30-P	배나무	이병주(감염시료)	52	1-P-No symptom	배나무	이병주(무병징)
24	31-P	배나무	이병주(감염시료)	53	3-P-No symptom	배나무	이병주(무병징)
25	32-P	배나무	이병주(감염시료)				
26	33-P	배나무	이병주(감염시료)		A13(감염시료)		Positive control
27	34-P	배나무	이병주(감염시료)		A14(건전주)		Negative control
28	35-P	배나무	이병주(감염시료)		FB-33		Positive control
29	36-P	배나무	이병주(감염시료)		연제문(<i>Erwinia pyrifoliae</i>)		Neagtive control

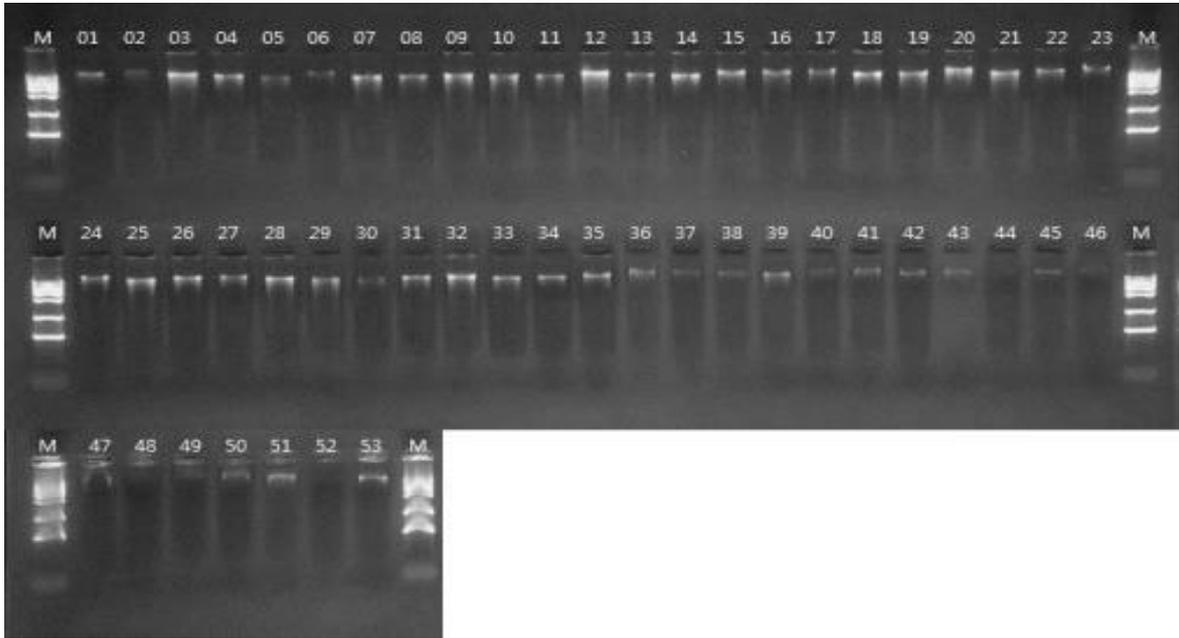


그림 79. 진단에 사용한 샘플 DNA를 추출한 결과 (M : 1kb DNA ladder)

- 전기영동을 통해 시료의 DNA가 추출되었음을 확인함.
- 시료에서 추출한 DNA를 주형으로 하여 기본조건으로 PNA probe assay를 진행하였을 때, 감염시료에서 모두 양성반응을 보였음.

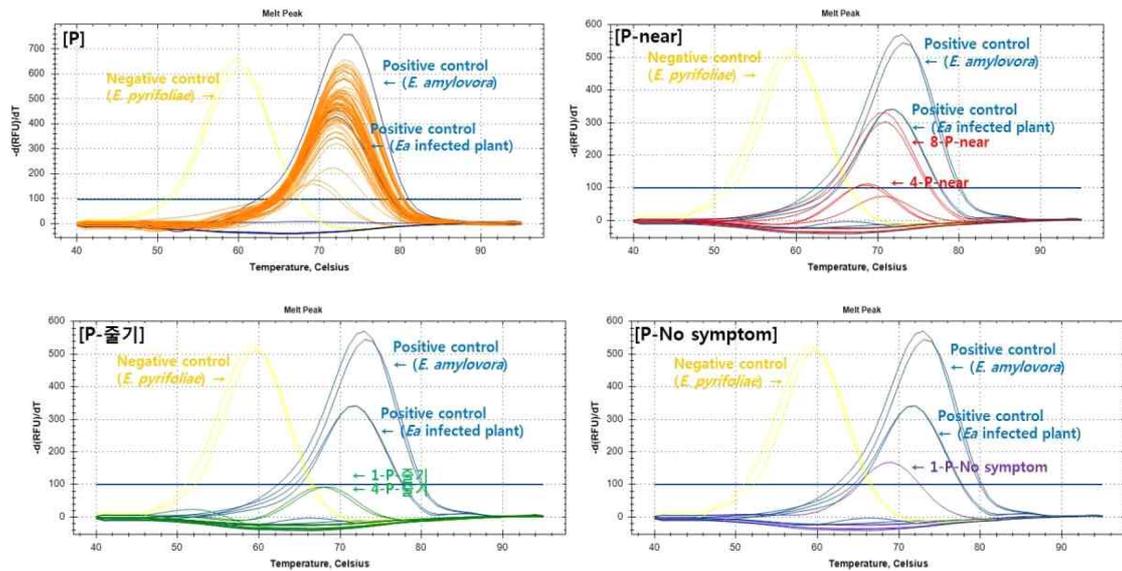


그림 80. PNA probe assay를 이용한 Melting peak 결과

표 54. PNA probe assay를 이용하여 진단한 Tm값과 감염여부

Sample	Melting curve		RFU값	감염여부
	Tm1	Tm2		
1-P	72	73	465	○
2-P	70	69	167	○
3-P	72	72	506	○
4-P	72	73	524	○
5-P	72	72	470	○
6-P	73	73	604	○
7-P	72	72	511	○
8-P	73	73	559	○
9-P	72	72	412	○
10-P	72	72	446	○
11-P	73	73	636	○
12-P	72	73	522	○
13-P	73	73	601	○
14-P	73	73	609	○
15-P	72	72	482	○
16-P	73	73	466	○
17-P	73	73	535	○
18-P	73	73	595	○
19-P	72	72	492	○
27-P	73	73	648	○
28-P	72	72	444	○
29-P	72	72	491	○
30-P	73	73	511	○
31-P	72	72	387	○
32-P	72	72	285	○
33-P	72	72	439	○
34-P	72	72	481	○
35-P	72	72	458	○
36-P	72	72	358	○
37-P	72	72	422	○
38-P	72	72	434	○
39-P	72	72	395	○
40-P	72	72	409	○
41-P	73	72	507	○
42-P	72	72	485	○
A9(9일 positive)	72	72	446	○
A14(9일 negative)	-	-	-	×
천안(FB-33)(positive)	73	-	759	○
연제문(negative)	60	60	639	×

표 55. PNA probe assay를 이용하여 진단한 Tm값과 감염여부

Sample	Melting curve		RFU값	감염여부
	Tm1	Tm2		
4-P-near	-	69	113	△
5-P-near	-	-	-	×
6-P-near	-	68	107	△
7-P-near	-	-	-	×
8-P-near	71	71	318	○
9-P-near	-	-	-	×
10-P-near	-	-	-	×
1-P-줄기	-	-	-	×
3-P-줄기	-	-	-	×
4-P-줄기	-	-	-	×
5-P-줄기	-	-	-	×
6-P-줄기	-	-	-	×
7-P-줄기	-	-	-	×
8-P-줄기	-	-	-	×
9-P-줄기	-	-	-	×
10-P-줄기	-	-	-	×
1-P-No symptom	69	-	169	△
3-P-No symptom	-	-	-	×
A9(9일 positive)	72	72	342	○
A14(9일 negative)	-	-	-	×
천안(FB-33)(positive)	73	73	558	○
연제문(negative)	59	60	520	×

- 병징을 나타낸 감염시료의 경우에도 모두 Tm값 70~73℃로 화상병균 감염을 확인함.
- PNA probe를 이용한 과수 화상병균 진단은 실험의 정확도를 높이기 위해 각 샘플별 2반복씩 진행함
- 실험적 오차로 인하여 두 반복 간 결과가 다른 경우, △표시함.
- 이병주 주변부의 무증상 시료에서는 28.57%의 확률로 진단이 되었으나, 이병주의 다른 가지에서 채집한 무증상 시료에서는 전부 진단되지 않았음.

• 2017년 7월 20일

- 경기도 안성시 공도읍 양기리 521-23(A농가) 및 양기리 521-16(B농가)에서 7월 20일에 채집된 이병주의 감염증상 및 무증상 부위에서 DNA를 추출하고 진단함.
- DNeasy plant mini kit(Qiagen, Germany)를 이용하여 시료의 gDNA를 추출함.

표 56. 진단에 사용한 샘플 리스트

No.	Sample	분류	상세설명
1	A-N-1	A농가/배나무	이병주1 주변목
2	A-N-2	A농가/배나무	이병주1 주변목
3	A-N-3	A농가/배나무	이병주1 주변목
4	A-N-4	A농가/배나무	이병주1 주변목
5	A-N-5	A농가/배나무	이병주1 주변목
6	A-1번-NoS-1	A농가/배나무	이병주1 (무증상)
7	A-1번-NoS-2	A농가/배나무	이병주1 (무증상)
8	A-1번-NoS-3	A농가/배나무	이병주1 (무증상)
9	A-2번-1	A농가/배나무	이병주2 (무증상-있)
10	A-2번-1-1	A농가/배나무	이병주2 (무증상 -열매)
11	A-2번-2	A농가/배나무	이병주2(무증상 (near) 줄기)
12	A-2번-3	A농가/배나무	이병주2 (무증상 (far) 줄기)
13	A-2번-4	A농가/배나무	이병주2(무증상)
14	A-2번-5	A농가/배나무	이병주2 (무증상)
15	A-2번-6	A농가/배나무	이병주2 (무증상)
16	A-3번	A농가/배나무	이의심주 (무증상)
17	B-N-1	B농가/배나무	이병주 중심 주변목 무증상 가지
18	B-N-2	B농가/배나무	이병주 중심 주변목 무증상 가지
19	B-N-3	B농가/배나무	이병주 중심 주변목 무증상 가지
20	B-N-4	B농가/배나무	이병주 중심 주변목 무증상 가지
21	B-N-5	B농가/배나무	이병주 중심 주변목 무증상 가지
22	B-P-1	B농가/배나무	이병주(감염증상)
23	B-P-2	B농가/배나무	이병주(감염증상)
24	B-P-Nos-1	B농가/배나무	이병주 (무증상 다른 가지)
25	B-P-Nos-2	B농가/배나무	이병주 (무증상 far 가지)
26	B-P-Nos-3	B농가/배나무	이병주 (무증상 near 가지)

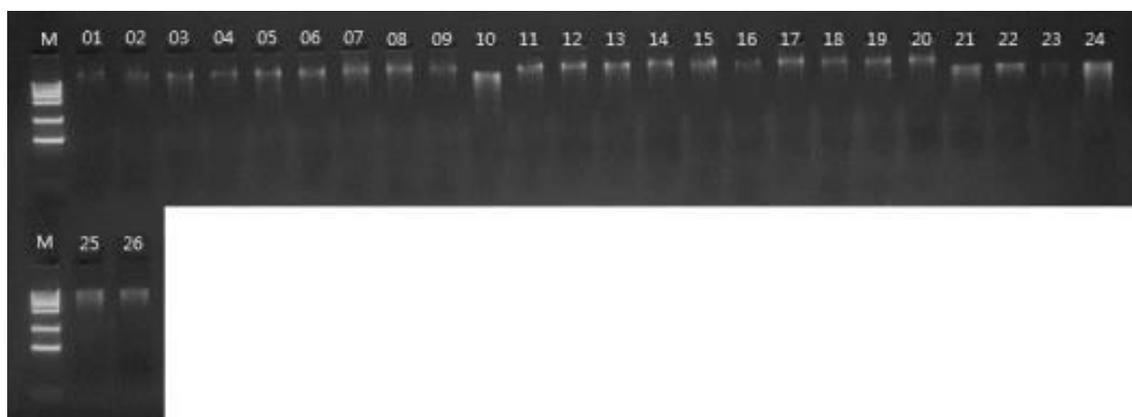


그림 81. 진단에 사용한 샘플 DNA를 추출한 결과

- 전기영동을 통해 시료의 DNA가 추출되었음을 확인함
- Real-time PCR 조건과 enzyme은 이전과 동일하게 사용하고 반복 없이 진행함.
Control은 2015년도 균주를 사용함,
- 시료에서 추출한 DNA를 주형으로 하여 Single tube nested PNA probe assay를 진행하였으며 그 결과, 일부에서만 양성 반응을 보였음.

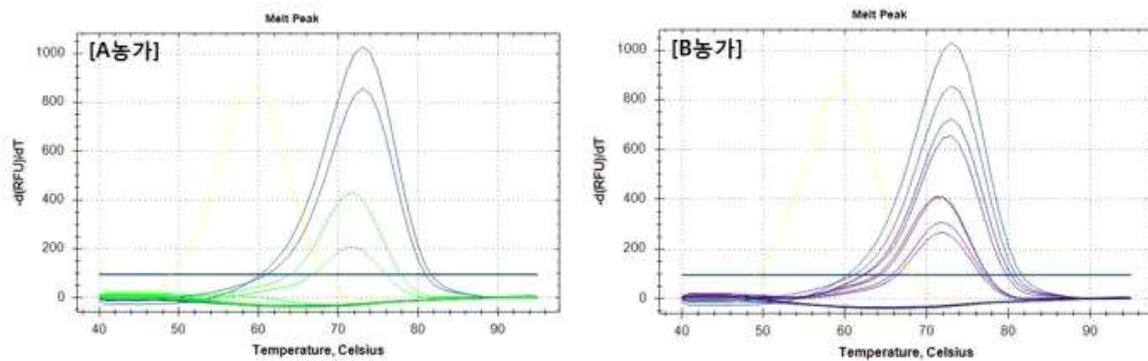


그림 82. Single tube nested PNA probe assay를 이용한 Melting peak 결과
(Yellow : *E. pyrifoliae*(Negative control), Blue : FB-33, A-13(Positive control))

표 57. Single tube nested PNA probe assay를 이용하여 진단한 Tm값과 감염여부

No.	Sample	상세설명	Tm	RFU값	감염여부
1	A-N-1	이병주1 주변목 (무증상)	-	-	×
2	A-N-2	이병주1 주변목 (무증상)	-	-	×
3	A-N-3	이병주1 주변목 (무증상)	-	-	×
4	A-N-4	이병주1 주변목 (무증상)	-	-	×
5	A-N-5	이병주1 주변목 (무증상)	-	-	×
6	A-1번-NoS-1	이병주1 (무증상)	-	-	×
7	A-1번-NoS-2	이병주1 (무증상)	-	-	×
8	A-1번-NoS-3	이병주1 (무증상)	-	-	×
9	A-2번-1	이병주2 (무증상 옆)	72.0	207.59	○
10	A-2번-1-1	이병주2 (무증상 열매)	-	-	×
11	A-2번-2	이병주2(무증상 (near) 가지)	-	-	×
12	A-2번-3	이병주2 (무증상 (far) 가지)	-	-	×
13	A-2번-4	이병주2(무증상)	-	-	×
14	A-2번-5	이병주2 (무증상)	72.0	429.01	○
15	A-2번-6	이병주2 (무증상)	-	-	×
16	A-3번	의심주 (무증상)	-	-	×
17	B-N-1	이병주 중심 주변목 (무증상)	-	-	×
18	B-N-2	이병주 중심 주변목 (무증상)	-	-	×
19	B-N-3	이병주 중심 주변목 (무증상)	-	-	×
20	B-N-4	이병주 중심 주변목 (무증상)	-	-	×
21	B-N-5	이병주 중심 주변목 (무증상)	72.0	409.13	○
22	B-P-1	이병주(감염증상)	73.0	655.63	○
23	B-P-2	이병주(감염증상)	73.0	723.56	○
24	B-P-Nos-1	이병주 (무증상 다른 가지)	71.0	409.99	○
25	B-P-Nos-2	이병주 (무증상 (far) 가지)	72.0	267.38	○
26	B-P-Nos-3	이병주 (무증상 (near) 가지)	72.0	308.93	○
	A13(감염시료)	Positive control	73.0	856.03	○
	A14(건진주)	Negative control	-	-	×
	FB-33(<i>Erwinia amylovora</i>)	Positive control	73.0	1028.95	○
	연재문(<i>Erwinia pyrifoliae</i>)	Neagtive control	59.0	862.52	×

- 병증을 나타낸 감염시료(B-P-1,2)의 경우에는 모두 Tm값 70~73℃로 화상병균 감염을 확인함.

- A농가의 경우, 이병주2 주변부의 무증상 시료에서는 28.57%의 확률로 화상병균이 진단되었으나, 그 이외의 시료에서는 전부 진단되지 않았음.

- B농가의 경우, 이병주 시료에서는 무증상 및 감염증상 시료 모두 화상병균이 진단되었

으며, 주변목 시료에서는 20.00%의 확률로 화상병균이 진단되었음.

- 2017년 7월 29일
 - 경기도 안성시 미양면 법전리에서 7월29일에 채집된 이병주의 감염증상 및 무증상 부위에서 DNA를 추출하고 진단함.
 - DNeasy plant mini kit (Qiagen, Germany)을 이용하여 시료의 gDNA를 추출함,

표 58. 진단에 사용한 샘플 리스트

No.	Sample	분류	상세설명
1	N-Nos	배나무	이병주 주변목(무증상)
2	N-N-nos	배나무	의심주 주변목(무증상)
3	P-Nos-1	배나무	이병주 (무증상)
4	P-Nos-2	배나무	이병주 (무증상)
5	P-Nos-3	배나무	이병주 (무증상)
6	P-Nos-4	배나무	이병주 (무증상)
7	P-Nos-5	배나무	이병주 (무증상)
8	P-Nos-6	배나무	이병주 (무증상)
9	P-Nos-7	배나무	이병주 (무증상)
10	P-Nos-8	배나무	이병주 (무증상)
11	P-Nos-9	배나무	이병주 (무증상)
12	Y	배나무	황화 가지
13	P-1	배나무	이병주 (감염시료)
14	P-2	배나무	이병주 (감염시료)
15	P-3	배나무	이병주 (감염시료)
16	P-4	배나무	이병주 (감염시료)
17	WRR	배나무	백문우병(white root rot) 의심주
18	자두	자두나무	이병주 주변 기주식물인 자두나무시료

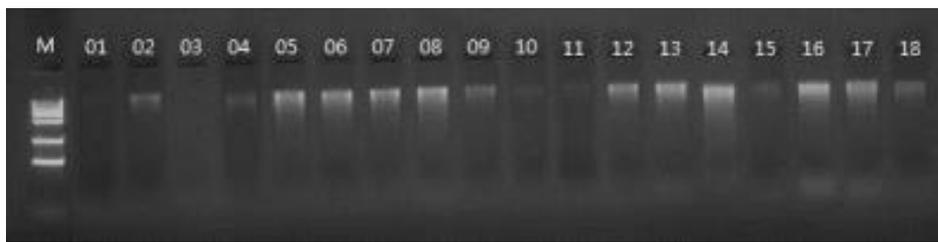


그림 83. 진단에 사용한 샘플 DNA를 추출한 결과

- 전기영동을 통해 시료의 DNA가 추출되었음을 확인함.
- Real-time PCR 조건과 enzyme은 이전과 동일하게 사용하고, Control은 2015년도 균주를 사용함.
- 시료에서 추출한 DNA를 주형으로 하여 Single tube nested PNA probe assay를 진행하였음.

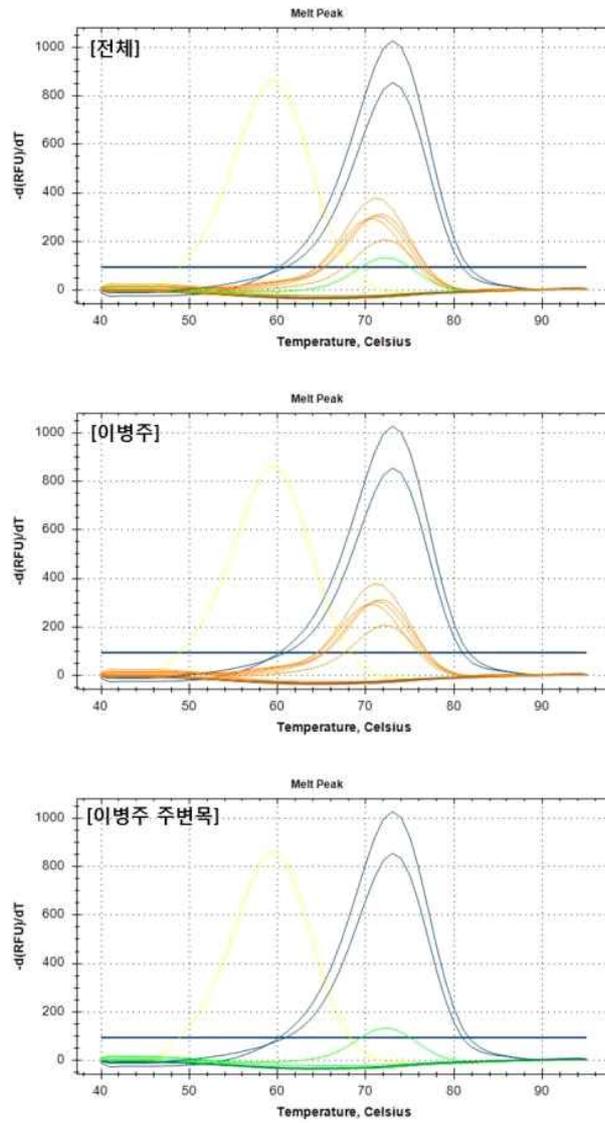


그림 84. Single tube nested PNA probe assay를 이용한 Melting peak 결과
 (Yellow : *E. pyrifoliae*(Negative control),
 Blue : FB-33, A13(Positive control))

표 59. Single tube nested PNA probe assay를 이용하여 진단한 Tm값과 감염여부

No.	Sample	상세설명	Tm	RFU	감염여부
1	N-Nos	이병주 주변목(무증상)	-	-	×
2	N-N-nos	의심주 주변목(무증상)	-	-	×
3	P-Nos-1	이병주 (무증상)	-	-	×
4	P-Nos-2	이병주 (무증상)	-	-	×
5	P-Nos-3	이병주 (무증상)	71.0	378.84	○
6	P-Nos-4	이병주 (무증상)	72.0	206.63	○
7	P-Nos-5	이병주 (무증상)	71.0	304.85	○
8	P-Nos-6	이병주 (무증상)	-	-	×
9	P-Nos-7	이병주 (무증상)	-	-	×
10	P-Nos-8	이병주 (무증상)	-	-	×
11	P-Nos-9	이병주 (무증상)	72.0	311.97	○
12	Y	황화 가지	72.0	132.75	○
13	P-1	이병주 (감염시료)	-	-	×
14	P-2	이병주 (감염시료)	-	-	×
15	P-3	이병주 (감염시료)	71.0	293.63	○
16	P-4	이병주 (감염시료)	-	-	×
17	WRR	백문우병(white root rot) 의심주	-	-	×
18	자두	이병주 주변 기주식물인 자두나무시료	-	-	×
	A13(감염시료)	Positive control	73.0	856.03	○
	A14(건강주)	Negative control	-	-	×
	FB-33(<i>Erwinia amylovora</i>)	Positive control	73.0	1028.95	○
	연제문(<i>Erwinia pyrifoliae</i>)	Neagtive control	-	-	×

- 병증을 나타낸 감염시료(P-1~4)의 경우에는 P-3 시료에서만 Tm값 70~73℃로 화상병균 감염을 확인함.

- 이병주(감염시료 및 무증상시료) 시료에서 35.71%가 화상병균이 진단되었음.

- 그 이외의 주변목 시료에서는 황색 병변이 나타난 시료를 제외하고 모두 진단이 되지 않았음.

• 2017년 7월 30일

- 경기도 안성시 서운면 산평리 127-1 (사과농가) 및 경기도 안성시 서운면 산평리 136-1 (배농가)에서 7월 30일에 채집된 이병주의 감염증상 및 무증상 부위에서 DNA를 추출하고 진단함.

- DNeasy Plant mini kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 시료의 gDNA를 추출함.

표 60. 진단에 사용한 샘플 리스트

No.	Sample	시료분류	상세설명	No.	Sample	시료분류	상세설명
1	A-nos-1	사과나무	이병주 주변목(무증상)	31	P-14	배나무	이병주(감염증상)
2	A-nos-2	사과나무	이병주 주변목(무증상)	32	P-N-1	배나무	이병주(무증상)
3	A-nos-3	사과나무	이병주 주변목(무증상)	33	P-N-2	배나무	이병주(무증상)
4	A-nos-4	사과나무	이병주 주변목(무증상)	34	P-N-3	배나무	이병주(무증상)
5	A-nos-5	사과나무	이병주 주변목(무증상)	35	P-N-4	배나무	이병주(무증상)
6	A-nos-6	사과나무	이병주 주변목(무증상)	36	P-N-5	배나무	이병주(무증상)
7	A-nos-7	사과나무	이병주 주변목(무증상)	37	P-N-6	배나무	이병주(무증상)
8	A-nos-8	사과나무	이병주 주변목(무증상)	38	P-N-7	배나무	이병주(무증상)
9	A-nos-9	사과나무	이병주 주변목(무증상)	39	P-N-8	배나무	이병주(무증상)
10	A-nos-10	사과나무	이병주 주변목(무증상)	40	P-N-9	배나무	이병주(무증상)
11	A-d-1	사과나무	의심주(의심증상)	41	P-N-10	배나무	이병주(무증상)
12	A-d-2	사과나무	의심주(의심증상)	42	P-N-11	배나무	이병주(무증상)
13	A-d-3	사과나무	의심주(무증상)	43	P-N-12	배나무	이병주(무증상)
14	A-d-4	사과나무	의심주(의심증상)	44	P-N-13	배나무	이병주(무증상)
15	A-d-5	사과나무	의심주(의심증상)	45	P-N-14	배나무	이병주(무증상)
16	A-d-6	사과나무	의심주(무증상)	46	P-T-4	배나무	이병주 trunk(무증상)
17	A-d-7	사과나무	의심주(의심증상)	47	P-T-5	배나무	이병주 trunk(무증상)
18	P-1	배나무	이병주(감염증상)	48	P-T-6	배나무	이병주 다른 가지(무증상)
19	P-2	배나무	이병주(감염증상)	49	P-T-7	배나무	이병주 trunk(무증상)
20	P-3	배나무	이병주(감염증상)	50	P-T-8	배나무	이병주 trunk(무증상)
21	P-4	배나무	이병주(감염증상)	51	P-T-9	배나무	이병주 trunk(무증상)
22	P-5	배나무	이병주(감염증상)	52	P-T-10	배나무	이병주 trunk(무증상)
23	P-6	배나무	이병주(감염증상)	53	P-T-11	배나무	이병주 trunk(무증상)
24	P-7	배나무	이병주(감염증상)	54	P-T-12	배나무	이병주 trunk(무증상)
25	P-8	배나무	이병주(감염증상)	55	P-T-13	배나무	이병주 trunk(무증상)
26	P-9	배나무	이병주(감염증상)	56	P-T-14	배나무	이병주 trunk(무증상)
27	P-10	배나무	이병주(감염증상)		A13(감염시료)		Positive control
28	P-11	배나무	이병주(감염증상)		A14(건전주)		Negative control

29	P-12	배나무	이병주(감염증상)	FB-33(<i>Erwinia amylovora</i>)	Positive control
30	P-13	배나무	이병주(감염증상)	연제문(<i>Erwinia pyrifoliae</i>)	Neagtive control

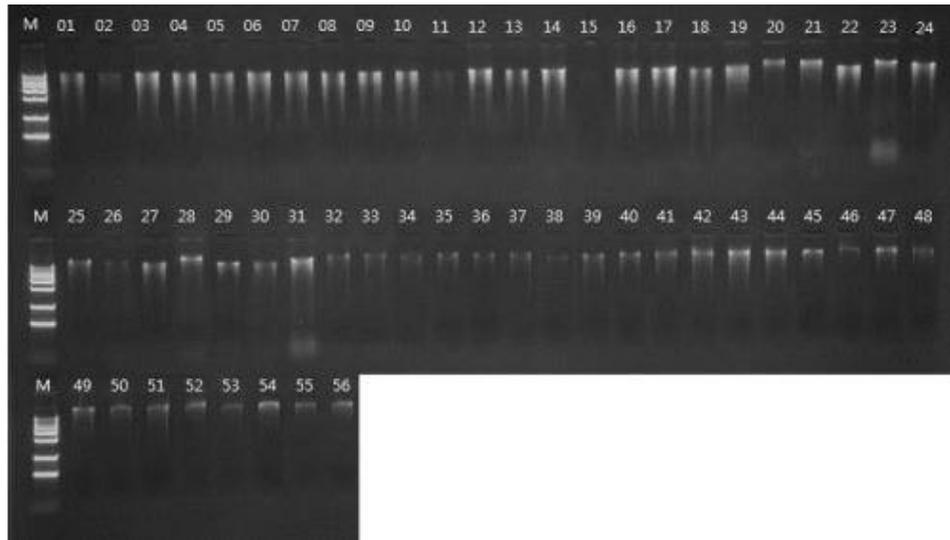


그림 85. 진단에 사용한 샘플 DNA를 추출한 결과

- 전기영동을 통해 시료의 DNA가 추출되었음을 확인함.
- Real-time PCR 조건과 enzyme은 이전과 동일하게 사용하고, Control은 2015년도 균주를 사용함.
- 시료에서 추출한 DNA를 주형으로 하여 Single tube nested PNA probe assay를 진행하였음.

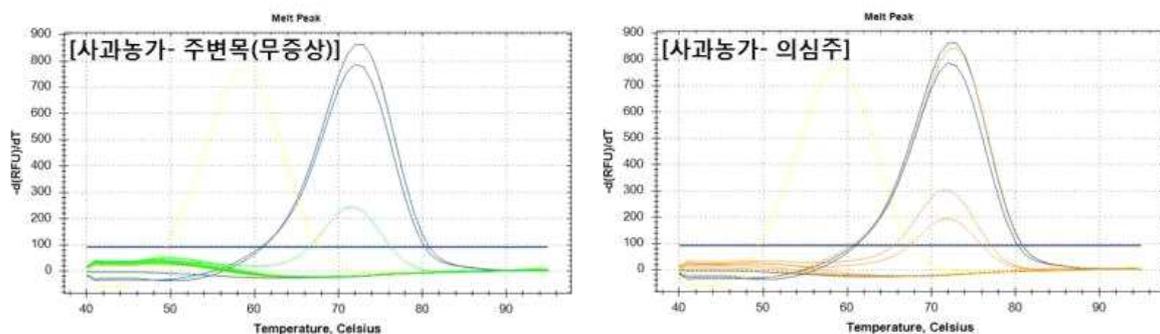


그림 86. 사과농가 시료의 Single tube nested PNA probe assay를 이용한 Melting peak 결과. (Yellow : *E. prifoliae*, A14(Negative control), Blue : FB-33, A13(Positive control))

표 61. Single tube nested PNA probe assay를 이용하여 진단한 Tm값과 감염여부

No.	Sample	상세설명	Tm	RFU	감염여부
1	A-nos-1	이병주 주변목(무증상)	-	-	×
2	A-nos-2	이병주 주변목(무증상)	-	-	×
3	A-nos-3	이병주 주변목(무증상)	-	-	×
4	A-nos-4	이병주 주변목(무증상)	-	-	×
5	A-nos-5	이병주 주변목(무증상)	-	-	×
6	A-nos-6	이병주 주변목(무증상)	-	-	×
7	A-nos-7	이병주 주변목(무증상)	-	-	×
8	A-nos-8	이병주 주변목(무증상)	72.0	244.89	○
9	A-nos-9	이병주 주변목(무증상)	-	-	×
10	A-nos-10	이병주 주변목(무증상)	-	-	×
11	A-d-1	의심주(의심증상)	-	-	×
12	A-d-2	의심주(의심증상)	73.0	846.34	○
13	A-d-3	의심주(무증상)	-	-	×
14	A-d-4	의심주(의심증상)	72.0	304.12	○
15	A-d-5	의심주(의심증상)	-	-	×
16	A-d-6	의심주(무증상)	-	-	×
17	A-d-7	의심주(의심증상)	72.0	195.29	○
	A13(감염시료)	Positive control	72.0	787.86	○
	A14(건전주)	Negative control	-	-	×
	FB-33(<i>Erwinia amylovora</i>)	Positive control	73.0	863.63	○
	연체분(<i>Erwinia pyrifoliae</i>)	Neagtive control	59.0	779.94	×

- 의심주(의심증상 및 무증상시료) 시료에서 42.85%가 화상병균이 진단되었음.
- 의심증상을 나타낸 시료(A-d-1,2,4,5,7)의 경우에는 A-d-5 시료를 제외한 모든 시료에서 Tm값 70~73℃로 화상병균 감염을 확인하였으며 그 중 A-d-2 시료는 846.34로 매우 높은 RFU 값을 보임.
- 주변목(무증상) 시료에서는 A-nos-8 시료를 제외하고 모두 진단이 되지 않았음.

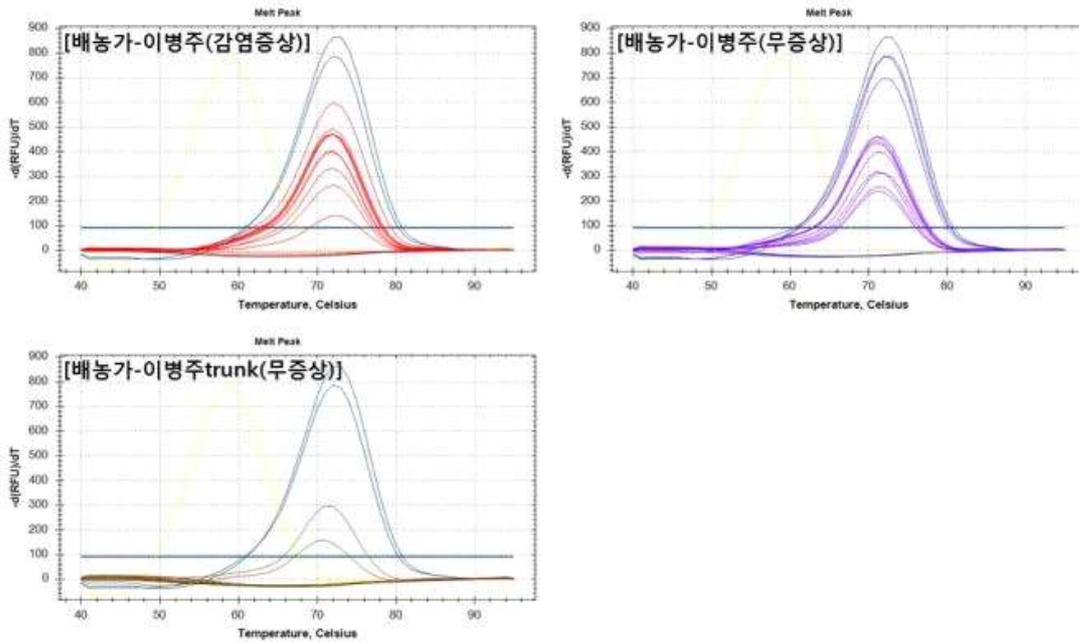


그림 87. 사과농가 시료의 Single tube nested PNA probe assay를 이용한 Melting peak 결과. (Yellow : *E. pyrifoliae*, A14(Negative control), Blue : FB-33, A13(Positive control))

표 62. Single tube nested PNA probe assay를 이용하여 진단한 Tm값과 감염여부

No.	Sample	상세설명	Tm	RFU	감염여부	No.	Sample	상세설명	Tm	RFU	감염여부
1	P-1	이병주 (감염증상)	72.0	472.39	○	40	P-N-9	이병주(무증상)	72.0	315.62	○
2	P-2	이병주 (감염증상)	-	-	×	41	P-N-10	이병주(무증상)	-	-	×
3	P-3	이병주 (감염증상)	72.0	265.19	○	42	P-N-11	이병주(무증상)	-	-	×
4	P-4	이병주 (감염증상)	72.0	403.95	○	43	P-N-12	이병주(무증상)	-	-	×
5	P-5	이병주 (감염증상)	72.0	471.72	○	44	P-N-13	이병주(무증상)	72.0	786.77	○
6	P-6	이병주 (감염증상)	-	-	×	45	P-N-14	이병주(무증상)	71.0	240.89	○
7	P-7	이병주 (감염증상)	72.0	141	○	46	P-T-4	이병주 trunk(무증상)	-	-	×
8	P-8	이병주 (감염증상)	72.0	334.11	○	47	P-T-5	이병주 trunk(무증상)	-	-	×
9	P-9	이병주 (감염증상)	72.0	492.28	○	48	P-T-6	이병주 다른가지(무증상)	-	-	×
10	P-10	이병주 (감염증상)	72.0	400.08	○	49	P-T-7	이병주 trunk(무증상)	-	-	×
11	P-11	이병주 (감염증상)	72.0	471.73	○	50	P-T-8	이병주 trunk(무증상)	-	-	×
12	P-12	이병주 (감염증상)	72.0	598.29	○	51	P-T-9	이병주 trunk(무증상)	-	-	×
13	P-13	이병주 (감염증상)	72.0	472.05	○	52	P-T-10	이병주 trunk(무증상)	-	-	×
14	P-14	이병주 (감염증상)	-	-	×	53	P-T-11	이병주 trunk(무증상)	71.0	297.9	○

15	P-N-1	이병주(무증상)	71.0	437.06	○	54	P-T-12	이병주 trunk (무증상)	-	-	×
16	P-N-2	이병주(무증상)	71.0	446.4	○	55	P-T-13	이병주 trunk (무증상)	-	-	×
17	P-N-3	이병주(무증상)	72.0	700.28	○	56	P-T-14	이병주 trunk (무증상)	71.0	158.56	○
18	P-N-4	이병주(무증상)	71.0	258.24	○						×
19	P-N-5	이병주(무증상)	71.0	462.93	○		A13 (감염시료)	Positive control	72.0	787.86	○
20	P-N-6	이병주(무증상)	71.0	398.74	○		A14(건진주)	Negative control	-		×
21	P-N-7	이병주(무증상)	71.0	462.91	○		FB-33 (<i>Erwinia amylovora</i>) 연제문	Positive control	73.0	863.63	○
22	P-N-8	이병주(무증상)	71.0	320.22	○		(<i>Erwinia pyrifoliae</i>)	Neagtive control	59.0	779.94	×

- 이병주(감염증상) 시료(P-1~14)의 경우에는 P-2,6,14 시료를 제외한 모든 시료에서 Tm값 70~73℃로 화상병균 감염을 확인하였음.
- 이병주(무증상) 시료(P-N-1~14)의 경우에는 P-N-11,12,13 시료를 제외한 모든 시료에서 화상병균 감염을 확인하였음
- 이병주trunk 및 다른 가지(무증상) 시료에서는 P-T-10,14 시료를 제외하고 모두 진단이 되지 않았음.

○ 2018년도 화상병균 시료 수집 및 진단법 검증시험 포장 현황

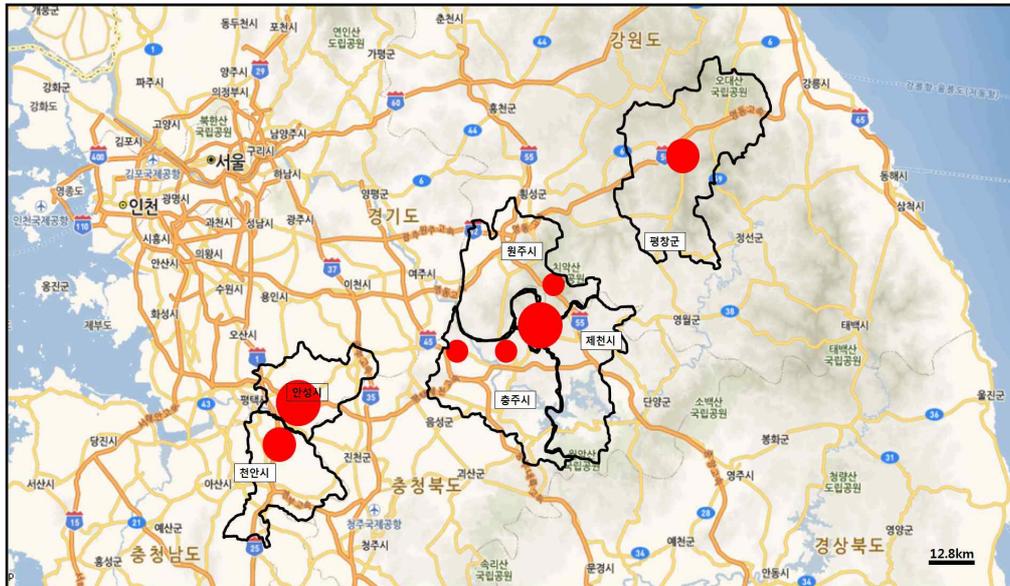


그림 88. 현장적용 시험 과수재배지(2018년도)

(안성, 천안, 제천, 원주, 충주, 평창 6개의 시·군을 대상으로 조사)

- '18년 화상병 발생과원 및 인접과원 등 45개 포장에서 검증 실시(12건 대조구, 16건 시험구)
- 양성대조구 포장에서 화상병 균주분리, 기존 검사법(cPCR)과 신규 검사법(PNA)을 진행하여 검출효과를 검증함.
- 화상병균 감염이 확인된 나무, 의심되는 나무, 증상이 없는 나무에서 DNA를 추출하여

직접 진단 가능 여부, 잠복된 병원균의 진단여부 등을 조사

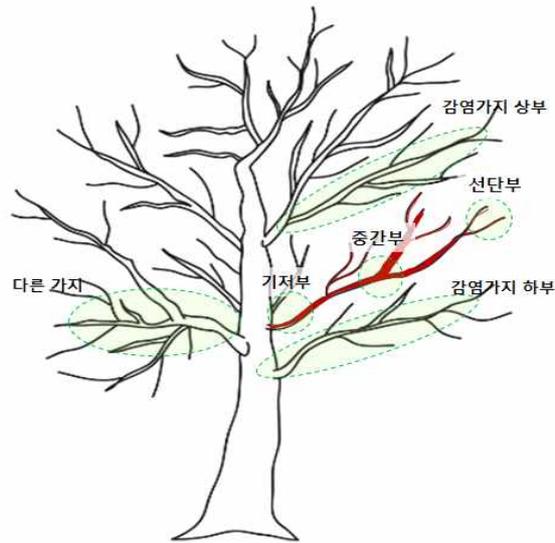


그림 89. 화상병 시료 채취 부위

표 63. 18 ‘ 화상병균 시료 수집 및 진단법 검증시험 포장 현황 (양성대조구 포장, 감염시료)

조사 포장	시료채집일	시료명	기주	채집지역	대조구
1	'18.06.15	평창28~30	사과나무	강원 평창 평창 중부리	
2	'18.06.15	평창1~5	사과나무	강원 평창 평창 중부리	
3	'18.06.15	평창6~7	사과나무	강원 평창 평창 중부리	
4	'18.06.15	평창8~9	사과나무	강원 평창 평창 중부리	
5	'18.06.15	평창10~16	사과나무	강원 평창 평창 중부리	1
6	'18.06.15	평창17	사과나무	강원 평창 평창 중부리	
7	'18.06.15	평창18~21	사과나무	강원 평창 평창 중부리	
8	'18.06.15	평창22	사과나무	강원 평창 평창 중부리	
9	'18.05.31	0601-1~2	사과나무	충북 제천 백운 방학리	2
10	'18.06.21	P-5~20	배나무	충남 천안 입장 독정리	3
11	'18.06.21	P-21~22	사과나무	충남 천안 입장 모전리	
12	'18.06.21	P-23~37	사과나무	충남 천안 입장 모전리	4
13	'18.06.22	원주 A1-T~DP-5	사과나무	강원 원주 신림 구학리	5
14	'18.06.22-23	원주 A-near1~4	사과나무	강원 원주 신림 구학리	
15	'18.06.23	원주GH200-P1 ~6	사과나무	강원 원주 신림 구학리	6

16	'18.06.23	원주GH227-P1~21	사과나무	강원 원주 신림 구학리	
17	'18.06.27	충북P-1A~9B	사과나무	충북 충주 동량 손동리	
18	'18.06.29~30	충주 3-1~3-7	사과나무	충북 충주 동량 손동리	7
19	'18.06.29~30	충주 4-1~4-2	사과나무	충북 충주 동량 손동리	
20	'18.06.29~30	제천 5	사과나무	충북 충주 동량 방학리	8
21	'18.06.29~30	제천 6-1~6-6	사과나무	충북 충주 동량 방학리	
22	'18.06.29~30	제천 7-1~8-10	사과나무	충북 충주 동량 도곡리	9
23	'18.07.16.-17.	인리P-1~NS	사과나무,	경기 안성 서운 인 리	10
24	'18.07.27.-28.	북산 P1~P9	배나무	경기 안성 서운 북산리	11
25	'18.11.26	송정 1-1~1-6	배나무	경기 안성 서운 송정리	12
26	'18.11.26	송정 2-1~2-14	배나무	경기 안성 서운 송정리	
계	26포장	183점			

표 64. '18 화상병 시료 수집 및 진단법 검증시험 포장 현황 (시험구 포장)

조사 포장	시료채집일	시료명	기주	채집지역	시험구
27	'18.05.15-1 6	1-P~28T	배나무	경기 안성 서운 북산리	1
28	'18.05.16. '18.05.25	16-P~0525-4	배나무	충남 천안 입장 홍천리	2
29	'18.05.31. '18.06.04	0601-3~AX10	사과나무	충북 제천 백운 방학리	3
30	'18.05.31. '18.06.04	0601-6~BX-일년생 10	사과나무	충북 제천 백운 방학리	4
31	'18.06.04./	0604-1P	사과나무	충북 제천 백운 도곡리	5
32	'18.06.04. '18.06.06. '18.06.13	0604-2P~19-29	사과나무	충북 제천 백운 도곡리	6
33	'18.06.04	0604-3P	사과나무	충북 제천 백운 방학리	7
34	'18.06.08. '18.06.13. '18.06.16	180608-1~살구1	사과, 살구나무	충북 제천 백운 방학리	8
35	'18.06.08. '18.06.16	180608-3~화당P-5	사과나무	충북 제천 백운 화당리	9
36	'18.07.22.-2 3.	도곡1-P~백운13-P2	사과나무	충북 제천 백운 도곡리	10
37	'18.06.21	도곡리2-T~13-T	사과나무	충북 제천 백운 도곡리	11
38	'18.06.22	원주 A1-T~11-B	사과나무	강원 원주 신림 구학리	12
39	'18.06.29~3 0	제천 7-1~8-10	사과나무	충북 충주 동량 도곡리	13
40	'18.07.06~0 7	평창1-1~5	사과나무	강원 평창 평창 중부리	14
41	'18.07.06~0 7	평창6	배나무	강원 평창 평창 중부리	15
42	'18.07.18.-1 9.	지당3 1-P~6-NS	사과나무	충북 충주 양성 지당리	16
43	'18.07.18.-1 9.	지당4 1-M~12-M3	사과나무	충북 충주 양성 지당리	17
44	'18.06.20	방학리1~4-2	사과나무	충북 제천 백운 방학리	18
45	'18.06.21	화당리1~3	사과나무	충북 제천 백운 화당리	19
계	19포장	524점			

- 실험방법

- 추출된 DNA를 주형으로 하여, 다음과 같은 조건에서 cPCR을 진행함.

표 65. cPCR 실험방법

Step	Condition	Cycles
Final denaturation	95°C for 5 min	1
Denaturation	95°C for 15 sec	
Annealing	52°C for 15 sec	30
Extension	72°C for 30 sec	
Final extension	72°C for 2 min	1
EAPSGL3961(F)	CCGAAGAACGATTGCACTAC	
EAPSGL4610c(R)	CGGTTAGTTAGCGCAGTCTC	

- cPCR 실험 결과와 PNA probe assay 분석 결과를 비교하기 위하여 다음과 같은 조건을 통하여 실험을 진행함.

표 66. PNA probe assay 실험 방법

	Condition	Cycles
1	95°C for 1 min	1
2	95°C for 15 sec	
3	72°C for 1 min	25
4	95°C for 30 sec	
5	56°C for 30 sec	
	Plate read	50
6	72°C for 30 sec	
7	95°C for 5 min	1
8	80°C for 30 sec	1
9	65°C for 30 sec	1
10	50°C for 30 sec	1
11	40°C to 90°C increment 1°C for 5 sec	1
	Plate read	1

- 과수화상병의 특이적인 Melt peak T_m 값(70~73°C)을 확인하여, 화상병의 감염여부를 확인.

표 67. 전체 시료 대비 Single tube nested PNA probe assay와 cPCR 진단법 비교

시료종류* (앞·가지 시료)	시료(점)	진단결과(점,비율)			비고
		기존 검사법(cPCR)	신규 검사법(PNA)	화상병균 분리	
(A)	153	135 (88.2%)	152 (99.3%)	124 (81.0%)	1.1배 향상
(B)	324	61 (18.8%)	166 (51.2%)	0 (0%)	2.7배 향상
(C)	47	8 (17.0%)	34 (72.3%)	0 (0%)	4.2배 향상
계	524	204 (38.9%)	352 (67.2%)	124 (23.7%)	1.7배 향상

*육안상 감염기주의 병징 시료 (A), 무병징 시료(B)와 육안상 무감염 기주의 시료(C)

- 기존 검사법(cPCR) 결과와 비교하였을 때, 신규 검사법(PNA qPCR)의 검출율은 (A), (B), (C)에서 각각 113%, 272%, 425% 높은 것으로 확인되었으며, 평균 172% 높은 것으로 확인.

• 대조구 1(시험포장 1-8, 2018년 6월 15일)

- 강원 평창군 평창읍 중부리에서 6월 15일에 채집된 사과나무에서 병징의 정도에 따라 다양한 부위에서 DNA를 추출하여 진단함.

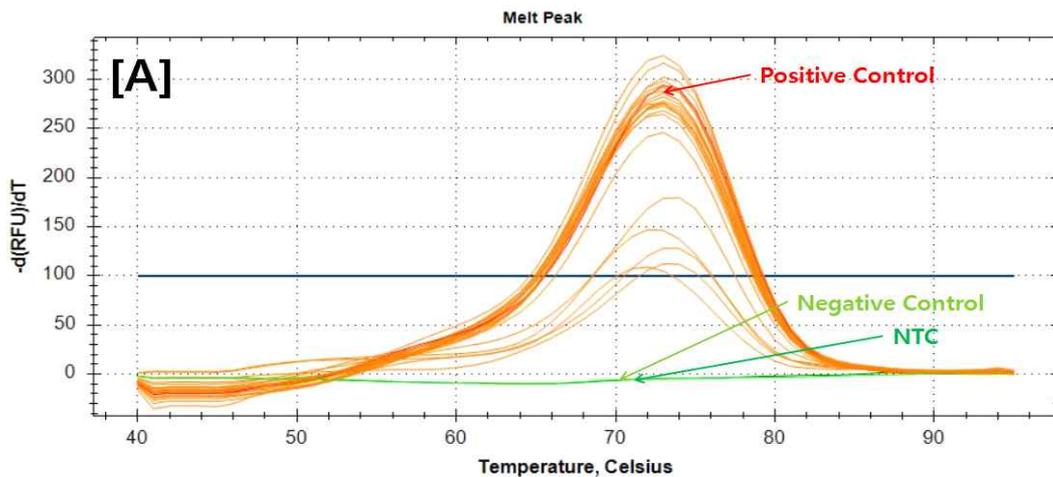


그림 90. 대조구 1 시료의 Single tube nested PNA probe assay를 이용한 Melting peak 결과
빨간색-Positive control, 연두색-Negative control, 녹색-NTC, [A]-육안상 감염기주의
병징시료(주황).

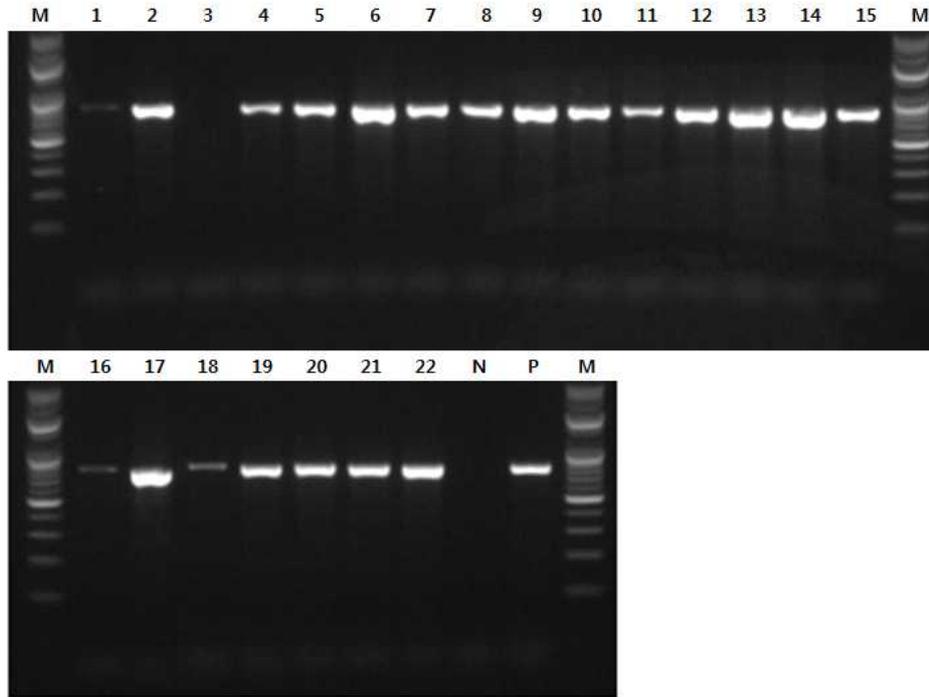


그림 91. 대조구 1 시료의 cPCR 진단 결과

M: 100bp plus DNA Ladder, N: Negative control, P: Positive control.

표 68. Single tube nested PNA probe assay와 cPCR 진단법 비교 검증(대조구 1)

시료 채집일	기주명	감염주 여부	시료명	병징 유무	채취부위	진단결과		균검 출	구분*
						cPCR	PNA		
1 18.06.15	사과나무	0	평창 2	0	선단부	0	0	0	(A)
2 18.06.15	사과나무	0	평창 2	0	선단부	0	0	0	(A)
3 18.06.15	사과나무	0	평창 3	0	선단부	-	0	0	(A)
4 18.06.15	사과나무	0	평창 4	0	선단부	0	0	0	(A)
5 18.06.15	사과나무	0	평창 7	0	선단부	0	0	0	(A)
6 18.06.15	사과나무	0	평창 8	0	선단부	0	0	0	(A)
7 18.06.15	사과나무	0	평창 9	0	선단부	0	0	0	(A)
8 18.06.15	사과나무	0	평창 10	0	선단부	0	0	0	(A)
9 18.06.15	사과나무	0	평창 11	0	선단부	0	0	0	(A)
10 18.06.15	사과나무	0	평창 12	0	선단부	0	0	0	(A)

11	18.06.15	사과나무	0	평창 13	0	중간부	0	0	0	(A)
12	18.06.15	사과나무	0	평창 14	0	선단부	0	0	0	(A)
13	18.06.15	사과나무	0	평창 15	0	선단부	0	0	0	(A)
14	18.06.15	사과나무	0	평창 16	0	선단부	0	0	0	(A)
15	18.06.15	사과나무	0	평창 17	0	선단부	0	0	0	(A)
16	18.06.15	사과나무	0	평창 18	0	선단부	0	0	0	(A)
17	18.06.15	사과나무	0	평창 20	0	선단부	0	0	0	(A)
18	18.06.15	사과나무	0	평창 21	0	선단부	0	0	0	(A)
19	18.06.15	사과나무	0	평창 22	0	중간부	0	0	0	(A)
20	18.06.15	사과나무	0	평창 28	0	중간부	0	0	0	(A)
21	18.06.15	사과나무	0	평창 29	0	중간부	0	0	0	(A)
22	18.06.15	사과나무	0	평창 30	0	기저부	0	0	0	(A)

* 육안상 감염기주의 병징 시료(A), 무병징 시료(B); 육안상 무감염 기주의 시료(C)

** PNA 진단결과: (A) 2/2, (B) -, (C) - ,

** cPCR 진단결과: (A) 2/2, (B) -, (C) -

- 감염증상을 나타낸 감염시료의 경우, PNA qPCR로 진단하였을 때 모든 시료에서 Tm 값 70~73℃로 화상병균 감염을 확인함.

• 대조구 2 (조사포장 9, 2018년 5월 31일)

- 충북 제천시 백운면 방학리에서 5월 31일에 채집된 사과나무에서 병징의 정도에 따라 다양한 부위에서 DNA를 추출하여 진단함.

표 69. Single tube nested PNA probe assay와 cPCR 진단법 비교 검증(대조구 2)

시료 채집일	기주명	감염주 여부	시료명	병징 유무	채취부위	진단결과			구분*	
						cPCR	PNA	검출		
1	18.05.31	사과나 무	0	0601-1	0	선단부	0	0	0	(A)
2	18.05.31	사과나 무	0	0601-2	0	선단부	0	0	0	(A)

* 육안상 감염기주의 병징 시료(A), 무병징 시료(B); 육안상 무감염 기주의 시료(C)

** PNA 진단결과: (A) 2/2, (B) -, (C) - ,

** cPCR 진단결과: (A) 2/2, (B) -, (C) -

- 대조구 3 (시험포장 10, 2018년 6월 21일)
 - 충남 천안시 입장면 독정리에서 6월 21일에 채집된 배나무에서 병징의 정도에 따라 다양한 부위에서 DNA를 추출하여 진단함.

표 70. Single tube nested PNA probe assay와 cPCR 진단법 비교 검증 (대조구 3)

시료 채집일	기주명	감염주 여부	시료명	병징 유무	채취부위	진단결과			구분*	
						cPCR	PNA	균검출		
1	18.06.21	배나무	O	P-5	O	선단부	O	O	O	(A)
2	18.06.21	배나무	O	P-6	O	선단부	O	O	O	(A)
3	18.06.21	배나무	O	P-7	O	선단부	-	O	O	(A)
4	18.06.21	배나무	O	P-8	O	선단부	O	O	O	(A)
5	18.06.21	배나무	O	P-9	O	선단부	O	O	O	(A)
6	18.06.21	배나무	O	P-10	O	선단부	O	O	O	(A)
7	18.06.21	배나무	O	P-11	O	선단부	O	O	O	(A)
8	18.06.21	배나무	O	P-12	O	선단부	O	O	O	(A)
9	18.06.21	배나무	O	P-13	O	중간부	O	O	O	(A)
10	18.06.21	배나무	O	P-14	O	중간부	O	O	O	(A)
11	18.06.21	배나무	O	P-16	O	중간부	O	O	O	(A)
12	18.06.21	배나무	O	P-17	O	중간부	O	O	O	(A)
13	18.06.21	배나무	O	P-18	O	선단부	O	O	O	(A)
14	18.06.21	배나무	O	P-19	O	선단부	O	O	O	(A)
15	18.06.21	배나무	O	P-20	O	기저부	O	O	O	(A)

* 육안상 감염기주의 병징 시료(A), 무병징 시료(B); 육안상 무감염 기주의 시료(C)

** PNA 진단결과: (A) 15/15, (B) -, (C) - ,

** cPCR 진단결과: (A) 14/15, (B) -, (C) -

- 감염증상을 나타낸 감염시료의 경우, PNA qPCR로 진단하였을 때 P-15을 제외한 모든 시료에서 Tm값 70~73℃로 화상병균 감염을 확인함.

- 대조구 4 (시험포장 11·12, 2018년 6월 21일)
 - 충남 천안시 입장면 모전리에서 6월 21일에 채집된 사과나무에서 병징의 정도에 따라 다양한 부위에서 DNA를 추출하여 진단함.

표 71. Single tube nested PNA probe assay와 cPCR 진단법 비교 검증 (대조구 4)

시료 채집일	기주명	감염 주 여부	시료명	병징 유무	채취부위	진단결과			구분*	
						cPCR	PNA	균검 출		
1	18.06.21	사과나 무	0	P-21	0	선단부	0	0	0	(A)
2	18.06.21	사과나 무	0	P-22	0	선단부	0	0	0	(A)
3	18.06.21	사과나 무	0	P-23	0	선단부	0	0	0	(A)
4	18.06.21	사과나 무	0	P-24	0	선단부	0	0	0	(A)
5	18.06.21	사과나 무	0	P-25	0	선단부	0	0	0	(A)
6	18.06.21	사과나 무	0	P-26	0	선단부	0	0	0	(A)
7	18.06.21	사과나 무	0	P-27	0	선단부	0	0	0	(A)
8	18.06.21	사과나 무	0	P-28	0	선단부	0	0	0	(A)
9	18.06.21	사과나 무	0	P-29	0	선단부	0	0	0	(A)
10	18.06.21	사과나 무	0	P-30	0	선단부	0	0	0	(A)
11	18.06.21	사과나 무	0	P-31	0	중간부	0	0	0	(A)
12	18.06.21	사과나 무	0	P-32	0	중간부	0	0	0	(A)
13	18.06.21	사과나 무	0	P-33	0	중간부	0	0	0	(A)
14	18.06.21	사과나 무	0	P-34	0	중간부	0	0	0	(A)
15	18.06.21	사과나 무	0	P-35	0	중간부	0	0	0	(A)
16	18.06.21	사과나 무	0	P-36	0	선단부	0	0	0	(A)
17	18.06.21	사과나 무	0	P-37	0	기저부	0	0	0	(A)

* 육안상 감염기주의 병징 시료(A), 무병징 시료(B); 육안상 무감염 기주의 시료(C)

** PNA 진단결과: (A) 17/17, (B) -, (C) -

** cPCR 진단결과: (A) 17/17, (B) -, (C) -

- 감염증상을 나타낸 감염시료의 경우, PNA qPCR로 진단하였을 때 모든 시료에서 Tm값 70~73℃로 화상병균 감염을 확인함.

- 대조구 5 (시험포장 13, 2018년 6월 22일)

- 강원 원주시 신림면 구학리에서 6월 22일에 채집된 사과나무에서 병징의 정도에 따라 다양한 부위에서 DNA를 추출하여 진단함.

표 72. Single tube nested PNA probe assay와 cPCR 진단법 비교 검증 (대조구 5)

	시료 채집일	기주명	감염주 여부	시료명	병징 유무	채취부위	진단결과			구분*
							cPCR	PNA	균검출	
1	18.06.22	사과나무	0	원주 AP-1	0	선단부	0	0	0	(A)
2	18.06.22	사과나무	0	원주 AP-2	0	선단부	0	0	0	(A)
3	18.06.22	사과나무	0	원주 AP-3	0	선단부	0	0	0	(A)
4	18.06.22	사과나무	0	원주 AP-4	0	중간부	0	0	0	(A)
5	18.06.22	사과나무	0	원주 AP-5	0	중간부	0	0	0	(A)
6	18.06.22	사과나무	0	원주 AP-6	0	중간부	0	0	0	(A)
7	18.06.22	사과나무	0	원주 AP-7	0	선단부	0	0	0	(A)
8	18.06.22	사과나무	0	원주AP-8	0	선단부	0	0	0	(A)
9	18.06.22	사과나무	0	원주AP-9	0	선단부	0	0	0	(A)
10	18.06.22	사과나무	0	원주AP-10	0	선단부	0	0	0	(A)
11	18.06.22	사과나무	0	원주AP-11	0	선단부	0	0	0	(A)
12	18.06.22	사과나무	0	원주AP-12	0	선단부	0	0	0	(A)
13	18.06.22	사과나무	0	원주BP-1	0	선단부	0	0	0	(A)
14	18.06.22	사과나무	0	원주BP-2	0	선단부	-	0	-	(A)
15	18.06.22	사과나무	0	원주BP-3	0	중간부	0	0	0	(A)
16	18.06.22	사과나무	0	원주BP-4	0	중간부	0	0	0	(A)
17	18.06.22	사과나무	0	원주BP-5	0	중간부	0	0	0	(A)
18	18.06.22	사과나무	0	원주BP-6	0	중간부	0	0	0	(A)
19	18.06.22	사과나무	0	원주BP-7	0	선단부	0	0	0	(A)
20	18.06.22	사과나무	0	원주 CP-1	0	선단부	0	0	0	(A)
21	18.06.22	사과나무	0	원주 CP-2	0	선단부	0	0	0	(A)
22	18.06.22	사과나무	0	원주 CP-3	0	선단부	0	0	0	(A)
23	18.06.22	사과나무	0	원주 CP-4	0	선단부	0	0	0	(A)
24	18.06.22	사과나무	0	원주 CP-5	0	중간부	0	0	0	(A)
25	18.06.22	사과나무	0	원주 CP-6	0	중간부	0	0	0	(A)
26	18.06.22	사과나무	0	원주 CP-7	0	중간부	-	0	-	(A)
27	18.06.22	사과나무	0	원주 CP-8	0	선단부	0	0	0	(A)

28	18.06.22	사과나무	0	원주 DP-1	0	선단부	0	0	0	(A)
29	18.06.22	사과나무	0	원주 DP-2	0	선단부	0	0	0	(A)
30	18.06.22	사과나무	0	원주 DP-3	0	선단부	0	0	0	(A)
31	18.06.22	사과나무	0	원주 DP-4	0	중간부	0	0	0	(A)
32	18.06.22	사과나무	0	원주 DP-5	0	기저부	0	0	0	(A)

* 육안상 감염기주의 병징 시료(A), 무병징 시료(B); 육안상 무감염 기주의 시료(C)

** PNA 진단결과: (A) 32/32, (B) -, (C) -

** cPCR 진단결과: (A) 30/32, (B) -, (C) -

- 감염증상을 나타낸 감염시료의 경우, PNA qPCR로 진단하였을 때 모든 시료에서 Tm 값 70~73℃로 화상병균 감염을 확인함.

- 대조구 6 (시험포장 14-16, 2018년 6월 22-23일)

- 강원 원주시 신림면 구학리에서 6월 22-23일에 채집된 사과나무에서 병징의 정도에 따라 다양한 부위에서 DNA를 추출하여 진단함.

표 73. Single tube nested PNA probe assay와 cPCR 진단법 비교 검증(대조구 6)

시료 채집일	기주명	감염주 여부	시료명	병징 유무	채취부위	진단결과			구분*	
						cPCR	PNA	균검출		
1	18.06.22	사과나무	0	A-near 1	0	선단부	0	0	0	(A)
2	18.06.22	사과나무	0	A-near 2	0	선단부	0	0	0	(A)
3	18.06.23	사과나무	0	A-near 3	0	선단부	0	0	0	(A)
4	18.06.23	사과나무	0	A-near 4	0	선단부	0	0	0	(A)
5	18.06.23	사과나무	0	GH200-P1	0	선단부	0	0	0	(A)
6	18.06.23	사과나무	0	GH200-P2	0	선단부	0	0	0	(A)
7	18.06.23	사과나무	0	GH200-P3	0	선단부	0	0	0	(A)
8	18.06.23	사과나무	0	GH200-P4	0	중간부	0	0	0	(A)
9	18.06.23	사과나무	0	GH200-P5	0	중간부	0	0	0	(A)
10	18.06.23	사과나무	0	GH200-P6	0	선단부	0	0	0	(A)
11	18.06.23	사과나무	0	GH227-P2	0	선단부	0	0	0	(A)
12	18.06.23	사과나무	0	GH227-P4	0	선단부	0	0	0	(A)
13	18.06.23	사과나무	0	GH227-P7	0	중간부	0	0	0	(A)
14	18.06.23	사과나무	0	GH227-P8	0	중간부	0	0	0	(A)
15	18.06.23	사과나무	0	GH227-P9	0	중간부	0	0	0	(A)
16	18.06.23	사과나무	0	GH227-P1 ₀	0	중간부	0	0	0	(A)
17	18.06.23	사과나무	0	GH227-P1 ₁	0	선단부	0	0	0	(A)
18	18.06.23	사과나무	0	GH227-P1 ₂	0	선단부	0	0	0	(A)
19	18.06.23	사과나무	0	GH227-P1	0	선단부	0	0	0	(A)

20	18.06.23	사과나무	0	GH227-P1 ₃ 4	0	선단부	0	0	0	(A)
21	18.06.23	사과나무	0	GH227-P1 ₆	0	선단부	0	0	0	(A)
22	18.06.23	사과나무	0	GH227-P1 ₈	0	선단부	0	0	0	(A)
23	18.06.23	사과나무	0	GH227-P1 ₉	0	선단부	0	0	0	(A)
24	18.06.23	사과나무	0	GH227-P2 ₀	0	기저부	0	0	0	(A)
25	18.06.23	사과나무	0	GH227-P2 ₁	0	기저부	0	0	0	(A)

* 육안상 감염기주의 병징 시료(A), 무병징 시료(B); 육안상 무감염 기주의 시료(C)

** PNA 진단결과: (A) 25/25, (B) -, (C) -

** cPCR 진단결과: (A) 25/25, (B) -, (C) -

- PNA qPCR로 진단하였을 때, 검출된 시료는 Tm값 70~73℃을 나타내어 화상병균 감염 확인.

• 대조구 7 (시험포장 17-19, 6월 25일, 27일, 29일, 30일)

- 충북 충주시 동량면 손동리에서 6월 25일,27일,29일,30일에 채집된 사과나무에서 병징의 정도에 따라 다양한 부위에서 DNA를 추출하여 진단함.

표 74. Single tube nested PNA probe assay와 cPCR 진단법 비교 검증 (대조구 7)

시료	채집일	기주명	감염주 여부	시료명	병징 유무	채취부위	진단결과			구분*
							cPCR	PNA	균검출	
1	18.06.27	사과나무	0	충북P-1A	0	선단부	0	0	0	(A)
2	18.06.27	사과나무	0	충북P-2A	0	선단부	0	0	0	(A)
3	18.06.27	사과나무	0	충북P-3A	0	선단부	0	0	0	(A)
4	18.06.27	사과나무	0	충북P-4B	0	선단부	0	0	0	(A)
5	18.06.27	사과나무	0	충북P-5B	0	선단부	0	0	0	(A)
6	18.06.27	사과나무	0	충북P-6B	0	선단부	0	0	0	(A)
7	18.06.27	사과나무	0	충북P-7B	0	선단부	0	0	0	(A)
8	18.06.27	사과나무	0	충북P-8B	0	선단부	0	0	0	(A)
9	18.06.27	사과나무	0	충북P-9B	0	선단부	0	0	0	(A)
10	18.06.29-30	사과나무	0	충주 3-1	0	선단부	0	0	0	(A)
11	18.06.29-30	사과나무	0	충주 3-2	0	중간부	0	0	0	(A)
12	18.06.29-30	사과나무	0	충주 3-3	0	중간부	0	0	0	(A)

13	18.06.29-30	사과나무	0	충주 3-4	0	중간부	0	0	0	(A)
14	18.06.29-30	사과나무	0	충주 3-5	0	중간부	0	0	0	(A)
15	18.06.29-30	사과나무	0	충주 3-7	0	기저부	0	0	0	(A)
16	18.06.29-30	사과나무	0	충주 4-1	0	기저부	0	0	0	(A)
17	18.06.29-30	사과나무	0	충주 4-2	0	기저부	0	0	0	(A)

* 육안상 감염기주의 병징 시료(A), 무병징 시료(B); 육안상 무감염 기주의 시료(C)

** PNA 진단결과: (A) 17/17, (B) -, (C) -

** cPCR 진단결과: (A) 17/17, (B) -, (C) -

- 감염증상을 나타낸 감염시료의 경우, PNA qPCR로 진단하였을 때 충주3-7을 제외한 모든 시료에서 Tm값 70~73℃로 화상병균 감염을 확인함.

• 대조구 8 (시험포장 20·21, 6월 29-30일)

- 충북 충주시 동량면 방학리에서 6월 29-30일에 채집된 사과나무에서 병징의 정도에 따라 다양한 부위에서 DNA를 추출하여 진단함.

표 75. Single tube nested PNA probe assay와 cPCR 진단법 비교 검증 (대조구 8)

	시료 채집일	기주명	감염주 여부	시료명	병징 유무	채취부위	진단결과			구분*
							cPCR	PNA	균검출	
1	18.06.29-30	사과	0	제천 5	0	선단부	0	0	0	(A)
2	18.06.29-30	사과	0	제천 6-1	0	선단부	0	0	0	(A)
3	18.06.29-30	사과	0	제천 6-2	0	선단부	0	0	0	(A)
4	18.06.29-30	사과	0	제천 6-3	0	중간부	0	0	0	(A)
5	18.06.29-30	사과	0	제천 6-4	0	중간부	0	0	0	(A)
6	18.06.29-30	사과	0	제천 6-5	0	중간부	0	0	0	(A)
7	18.06.29-30	사과	0	제천 6-6	0	기저부	0	0	0	(A)

* 육안상 감염기주의 병징 시료(A), 무병징 시료(B); 육안상 무감염 기주의 시료(C)

** PNA 진단결과: (A) 7/7, (B) -, (C) -

** cPCR 진단결과: (A) 7/7, (B) -, (C) -

- 감염증상을 나타낸 감염시료의 경우, PNA qPCR로 진단하였을 때 모든 시료에서 Tm 값 70~73℃로 화상병균 감염을 확인함.

- 대조구 9 (시험포장 22, 2018년 6월 29-30일)
 - 충북 제천시 백운면 방학리에서 6월 29-30일에 채집된 사과나무에서 병징의 정도에 따라 다양한 부위에서 DNA를 추출하여 진단함.

표 76. Single tube nested PNA probe assay와 cPCR 진단법 비교 검증 (대조구 9)

시료	채집일	기주명	감염주 여부	시료명	병징 유무	채취부위	진단결과			구분*
							cPCR	PNA	균검출	
1	18.06.29-30	사과	0	제천 7-1	0	선단부	0	0	-	(A)
2	18.06.29-30	사과	0	제천 7-2	0	선단부	0	0	0	(A)
3	18.06.29-30	사과	0	제천 7-3	0	선단부	0	0	-	(A)
4	18.06.29-30	사과	0	제천 7-4	0	선단부	0	0	-	(A)
5	18.06.29-30	사과	0	제천 7-5	0	선단부	0	0	0	(A)
6	18.06.29-30	사과	0	제천 7-6	0	선단부	0	0	0	(A)
7	18.06.29-30	사과	0	제천 7-7	0	중간부	0	0	0	(A)
8	18.06.29-30	사과	0	제천 7-8	0	중간부	0	0	0	(A)
9	18.06.29-30	사과	0	제천 7-9	0	중간부	0	0	0	(A)
10	18.06.29-30	사과	0	제천 7-10	0	중간부	0	0	-	(A)
11	18.06.29-30	사과	0	제천 7-11	0	중간부	0	0	-	(A)
12	18.06.29-30	사과	0	제천 7-12	0	기저부	0	0	-	(A)

* 육안상 감염기주의 병징 시료(A), 무병징 시료(B); 육안상 무감염 기주의 시료(C)

** PNA 진단결과: (A) 12/12, (B) -, (C) -

** cPCR 진단결과: (A) 12/12, (B) -, (C) -

- 감염증상을 나타낸 감염시료의 경우, PNA qPCR로 진단하였을 때 모든 시료에서 Tm 값 70~73℃로 화상병균 감염을 확인함.

- 대조구 10 (시험포장 23, 2018년 7월 16-17일)
 - 경기 안성시 서운면 인리에서 7월 16-17일에 채집된 사과나무에서 병징의 정도에 따라 다양한 부위에서 DNA를 추출하여 진단함.

표 77. Single tube nested PNA probe assay와 cPCR 진단법 비교 검증 (대조구 10)

시료	채집일	기주명	감염주 여부	시료명	병징 유무	채취부위	진단결과			구분*
							cPCR	PNA	균검출	
1	18.07.16.-17	배(신고)	0	인리P-2	0	선단부	0	0	0	(A)
2	18.07.16.-17	배(신고)	0	인리P-5	0	선단부	0	0	0	(A)
3	18.07.16.-17	배(신고)	0	인리P-7	0	선단부	0	0	0	(A)
4	18.07.16.-17	배(신고)	0	인리P-9	0	중간부	0	0	0	(A)
5	18.07.16.-17	배(신고)	0	인리P-12	0	중간부	0	0	0	(A)
6	18.07.16.-17	배(신고)	0	인리P-13	0	중간부	0	0	0	(A)
7	18.07.16.-17	배(신고)	0	인리P-14	0	선단부	0	0	0	(A)
8	18.07.16.-17	배(신고)	0	인리P-15	0	선단부	0	0	0	(A)
9	18.07.16.-17	배(신고)	0	인리P-16	0	기저부	0	0	0	(A)

* 육안상 감염기주의 병징 시료(A), 무병징 시료(B); 육안상 무감염 기주의 시료(C)

** PNA 진단결과: (A) 9/9, (B) -, (C) -

** cPCR 진단결과: (A) 9/9, (B) -, (C) -

- 감염증상을 나타낸 감염시료의 경우, PNA qPCR로 진단하였을 때 모든 시료에서 Tm 값 70~73℃로 화상병균 감염을 확인함.

- 대조구 11 (시험포장 24, 2018년 7월 27-28일)
 - 경기 안성시 서운면 북산리에서 7월 27-28일에 채집된 배나무에서 병징의 정도에 따라 다양한 부위에서 DNA를 추출하여 진단함.

표 78. Single tube nested PNA probe assay와 cPCR 진단법 비교 검증 (대조구 11)

시료	채집일	기주명	감염주 여부	시료명	병징 유무	채취부위	진단결과			구분 *
							cPCR	PNA	균검 출	
1	18.07.27.- 28	배나무	0	북산 P1	0	선단부	0	0	0	(A)
2	18.07.27.- 28	배나무	0	북산 P2	0	선단부	0	0	0	(A)
3	18.07.27.- 28	배나무	0	북산 P3	0	선단부	0	0	0	(A)
4	18.07.27.- 28	배나무	0	북산 P4	0	선단부	0	0	0	(A)
5	18.07.27.- 28	배나무	0	북산 P6	0	중간부	0	0	0	(A)
6	18.07.27.- 28	배나무	0	북산 P7	0	중간부	0	0	0	(A)
7	18.07.27.- 28	배나무	0	북산 P8	0	중간부	0	0	0	(A)
8	18.07.27.- 28	배나무	0	북산 P9	0	선단부	0	0	0	(A)

* 육안상 감염기주의 병징 시료(A), 무병징 시료(B); 육안상 무감염 기주의 시료(C)

** PNA 진단결과: (A) 8/8, (B) -, (C) -

** cPCR 진단결과: (A) 8/8, (B) -, (C) -

- 감염증상을 나타낸 감염시료의 경우, PNA qPCR로 진단하였을 때 북산 P5를 제외한 모든 시료에서 Tm값 70~73℃로 화상병균 감염을 확인함.

- 대조구 12 (시험포장 25·26, 2018년 11월 26일)
 - 경기 안성시 서운면 송정리에서 11월 26일에 채집된 배나무에서 병징의 정도에 따라 다양한 부위에서 DNA를 추출하여 진단함.

표 79. Single tube nested PNA probe assay와 cPCR 진단법 비교 검증 (대조구 12)

시료 채집일	기주명	감염주 여부	시료명	병징 유무	채취부위	진단결과			구분*	
						cPCR	PNA	균검출		
1	18.11.26	배나무	0	송정 1-1	0	선단부	0	0	0	(A)
2	18.11.26	배나무	0	송정 1-2	0	선단부	-	0	0	(A)
3	18.11.26	배나무	0	송정 1-3	0	선단부	0	0	0	(A)
4	18.11.26	배나무	0	송정 1-4	0	선단부	0	0	-	(A)
5	18.11.26	배나무	0	송정 1-5	0	선단부	0	0	0	(A)
6	18.11.26	배나무	0	송정 1-6	0	선단부	0	0	0	(A)
7	18.11.26	배나무	0	송정 2-1	0	선단부	-	0	0	(A)
8	18.11.26	배나무	0	송정 2-3	0	선단부	0	0	-	(A)
9	18.11.26	배나무	0	송정 2-5	0	선단부	0	0	0	(A)
10	18.11.26	배나무	0	송정 2-6	0	선단부	0	0	0	(A)
11	18.11.26	배나무	0	송정 2-7	0	선단부	0	0	0	(A)
12	18.11.26	배나무	0	송정 2-8	0	선단부	0	0	-	(A)
13	18.11.26	배나무	0	송정 2-9	0	중간부	0	0	-	(A)
14	18.11.26	배나무	0	송정 2-10	0	중간부	0	0	0	(A)
15	18.11.26	배나무	0	송정 2-11	0	중간부	0	0	0	(A)
16	18.11.26	배나무	0	송정 2-12	0	중간부	0	0	-	(A)
17	18.11.26	배나무	0	송정 2-13	0	중간부	0	0	-	(A)
18	18.11.26	배나무	0	송정 2-14	0	선단부	0	0	0	(A)

* 육안상 감염기주의 병징 시료(A), 무병징 시료(B); 육안상 무감염 기주의 시료(C)

** PNA 진단결과: (A) 18/18, (B) -, (C) -

** cPCR 진단결과: (A) 16/18, (B) -, (C) -

- 감염증상을 나타낸 감염시료의 경우, PNA qPCR로 진단하였을 때 송정2-4를 제외한 모든 시료에서 Tm값 70~73℃로 화상병균 감염을 확인함.

- 시험구 1 (시험포장 27, 2018년 5월 15-16일)
 - 경기도 안성시 서운면 북산리에서 5월 15-16일에 채집된 배나무에서 병징의 정도에 따라 다양한 부위에서 DNA를 추출하여 진단함.

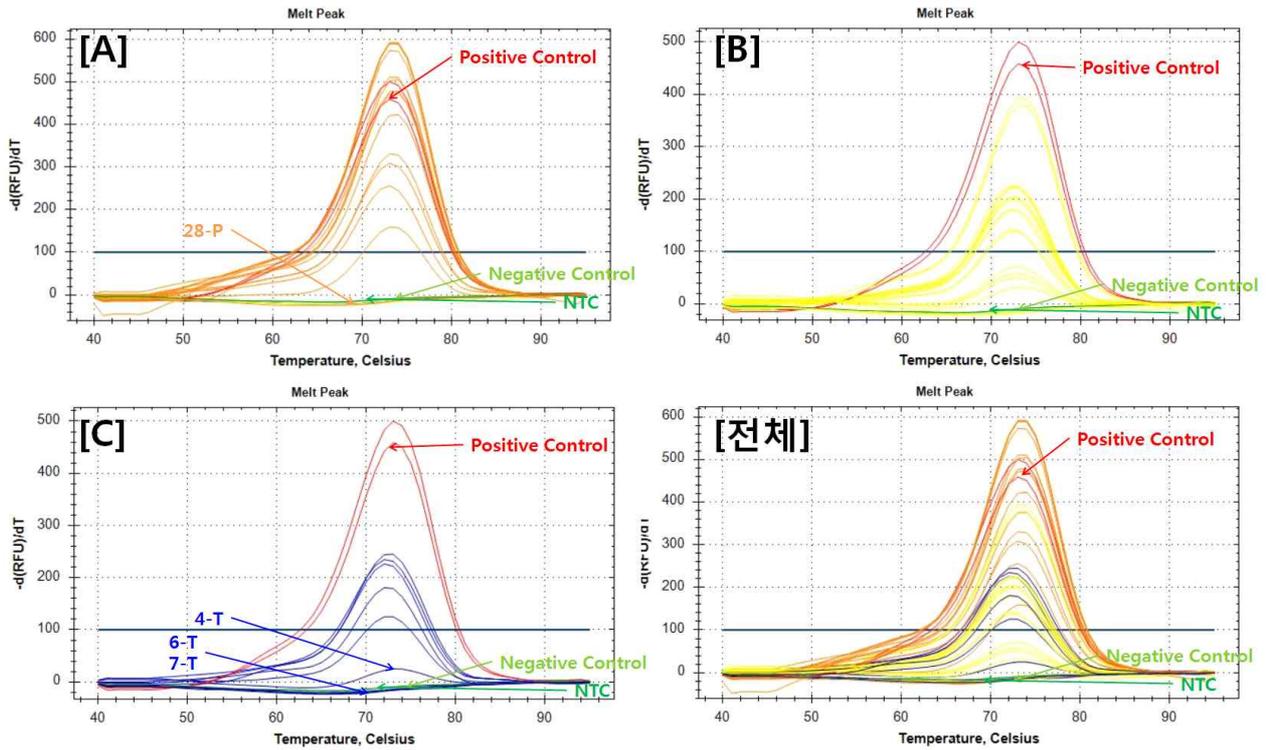


그림 92. 시험구 1 시료의 Single tube nested PNA probe assay를 이용한 Melting peak 결과. 빨간색-Positive control, 연두색-Negative control, 녹색-NTC, [A]-육안상 감염기주의 병징시료 (주황), [B]-육안상 감염시료의 무병징시료(노랑), [C]-육안상 무감염기주의 시료(파랑).

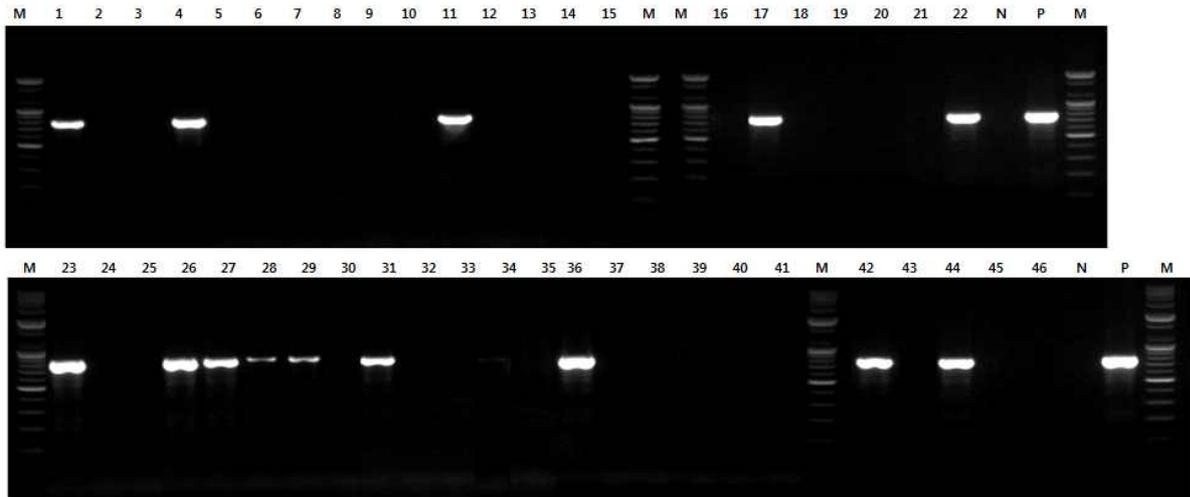


그림 93. 시험구 1 시료의 cPCR 진단 결과
M: 100bp plus DNA Ladder, N: Negative control, P: Positive control.

표 80. Single tube nested PNA probe assay와 cPCR 진단법 비교 검증 (시험구 1)

시료 채집일	기주명	감염주 여부	시료명	병징 유무	채취부위	진단결과			구분*
						cPCR	PNA	균검출	
1			1-P	O	중간부	O	O	O	(A)
2	18.05.15	배나무	1-B	X	기저부	-	-	-	(B)
3			1-T	X	선단부	-	O	-	(B)
4	18.05.15	배나무	2-P	O	중간부	O	O	O	(A)
5	18.05.15	배나무	4-T	X	선단부	-	-	-	(C)
6			5-P	O	중간부	-	O	O	(A)
7	18.05.15	배나무	5-B	X	기저부	-	-	-	(B)
8			5-T	X	선단부	-	-	-	(B)
9	18.05.15	배나무	6-T	X	중간부	-	-	-	(C)
10	18.05.15	배나무	7-T	X	선단부	-	-	-	(C)
11			8-P	O	중간부	O	O	O	(A)
12	18.05.15	배나무	8-B	X	기저부	-	O	-	(B)
13			8-T	X	선단부	-	-	-	(B)
14	18.05.15	배나무	10-T	X	선단부	-	O	-	(C)
15	18.05.15	배나무	11-T	X	선단부	-	O	-	(C)
16	18.05.15	배나무	12-T	X	선단부	-	O	-	(C)
17			13-P	O	중간부	O	O	O	(A)
18	18.05.15	배나무	13-B	X	기저부	-	O	-	(B)
19			13-T	X	선단부	-	O	-	(B)
20	18.05.15	배나무	14-T	X	선단부	-	O	-	(C)
21	18.05.15	배나무	15-T	X	선단부	-	O	-	(C)
22	18.05.15	배나무	17-P	O	선단부	O	O	O	(A)
23			18-P	O	중간부	O	O	O	(A)
24	18.05.15	배나무	18-B	X	기저부	-	O	-	(B)
25			18-T	X	선단부	-	O	-	(B)
26			19-P	O	중간부	O	O	O	(A)
27	18.05.15	배나무	19-P2	O	기저부	O	O	-	(A)
28			19-B	X	선단부	O	O	-	(B)
29	18.05.15	배나무	20-P	O	중간부	O	O	O	(A)
30			20-B	X	기저부	-	O	-	(B)
31			21-P	O	중간부	O	O	O	(A)
32	18.05.15	배나무	21-B	X	기저부	-	-	-	(B)
33			21-T	X	선단부	O	O	-	(B)

34	18.05.16	배나무	X	22-T	X	선단부	-	O	-	(C)
35	18.05.16	배나무	O	23-P	O	중간부	O	O	O	(A)
36				23-T	X	선단부	-	O	-	(B)
37	18.05.16	배나무	X	24-T	X	선단부	-	O	-	(C)
38				25-P	O	중간부	-	O	O	(A)
39	18.05.15	배나무	O	25-B	X	기저부	-	O	-	(B)
40				25-T	X	선단부	-	O	-	(B)
41	18.05.15	배나무	O	26-P	O	중간부	O	O	O	(A)
42				26-T	X	선단부	-	O	-	(B)
43				27-P	O	중간부	O	O	O	(A)
44	18.05.15	배나무	O	27-B	X	기저부	-	-	-	(B)
45				27-T	X	선단부	-	O	-	(B)
46	18.05.15	배나무	O	28-P	O	중간부	-	-	-	(A)
47				28-T	X	선단부	-	-	-	(B)

* 육안상 감염기주의 병징 시료(A), 무병징 시료(B); 육안상 무감염 기주의 시료(C)

** PNA 진단결과: (A) 16/16, (B) 14/21, (C) 7/10

** cPCR 진단결과: (A) 13/16, (B) 2/21, (C) 0/10

- 감염증상을 나타낸 감염시료(P)의 경우, PNA qPCR로 진단하였을 때 28-P 시료를 제외한 모든 시료에서 Tm값 70~73℃로 화상병균 감염을 확인함.
- cPCR 결과와 비교하였을 때, PNA qPCR의 검출율은 (A), (B), (C)에서 각각 115%, 700%, 700% 높은 것으로 확인 되었음.

• 시험구 2 (시험포장 28, 2018년 5월 16일,25일)

- 충남 천안시 입장면 홍천리에서 5월 16일, 26일에 채집된 배나무에서 병징의 정도에 따라 다양한 부위에서 DNA를 추출하여 진단함.

표 81. Single tube nested PNA probe assay와 cPCR 진단법 비교 검증 (시험구 2)

시료 채집일	기주명	감염주 여부	시료명	병징 유무	채취부위	진단결과			구분*	
						cPCR	PNA	검출		
1		O	16-P	O	중간부	O	O	O	(A)	
2	18.05.16	배나무	O	16-B	X	기저부	-	O	-	(B)
3		O	16-T	X	선단부	-	-	-	(B)	

* 육안상 감염기주의 병징 시료(A), 무병징 시료(B); 육안상 무감염 기주의 시료(C)

** PNA 진단결과: (A) 1/1, (B) 1/2, (C) -

** cPCR 진단결과: (A) 1/1, (B) 0/2, (C) -

- 감염증상을 나타낸 감염시료의 경우, PNA qPCR로 진단하였을 때 모든 시료에서 Tm 값 70~73°C로 화상병원균 감염을 확인함.
 - cPCR 결과와 비교하였을 때, PNA qPCR의 검출률은 (A)에서는 동일하였지만, (B)에서는 200% 높은 것으로 확인 되었음.
- 시험구 3 (시험포장 29, 2018년 5월 31일, 6월 4일)
 - 충북 제천시 백운면 방학리에서 5월 31일, 6월 4일에 채집된 사과나무에서 병징의 정도에 따라 다양한 부위에서 DNA를 추출하여 진단함.

표 82. Single tube nested PNA probe assay와 cPCR 진단법 비교 검증 (시험구 3)

시료	채집일	기주명	감염주여부	시료명	병징유무	채취부위	진단결과			구분*
							cPCR	PNA	균검출	
1			O	A1-1P	O	중간부	O	O	-	(A)
2	18.06.04	사과나무	O	A1-1B	X	기저부	-	O	-	(B)
3			O	A1-1N	X	선단부	-	-	-	(B)
4			O	A2-2P	O	중간부	O	O	O	(A)
5	18.06.04	사과나무	O	A2-2B	X	기저부	-	O	-	(B)
6			O	A2-2N	X	선단부	-	O	-	(B)
7			O	A3-3P	O	중간부	O	O	O	(A)
8	18.06.04	사과나무	O	A3-3B	X	기저부	-	-	-	(B)
9			O	A3-3N	X	선단부	-	O	-	(B)
10			O	A4-4P	O	중간부	O	O	O	(A)
11	18.06.04	사과나무	O	A4-4B	X	기저부	-	-	-	(B)
12			O	A4-4N	X	선단부	-	-	-	(B)
13			O	A5-5P	O	중간부	O	O	O	(A)
14	18.06.04	사과나무	O	A5-5T	X	선단부	O	O	-	(B)
15			O	A5-5N	X	기저부	-	O	-	(B)
16			O	A6-6P	O	중간부	O	O	O	(A)
17	18.06.04	사과나무	O	A6-6B	X	기저부	-	O	-	(B)
18			O	A6-6N	X	선단부	-	O	-	(B)
19			O	A7-7P	O	중간부	O	O	-	(A)
20	18.06.04	사과나무	O	A7-7B	X	기저부	-	O	-	(B)
21			O	A7-7N	X	선단부	-	O	-	(B)
22			O	A8-8P	O	중간부	O	O	-	(A)
23	18.06.04	사과나무	O	A8-8B	X	기저부	-	O	-	(B)
24			O	A8-8N	X	선단부	O	O	-	(B)
25			O	A9-9P	O	중간부	O	O	O	(A)
26	18.06.04	사과나무	O	A9-9B	X	기저부	O	O	-	(B)
27			O	A9-9N	X	선단부	-	O	-	(B)
28			O	A10-10P	O	중간부	O	O	O	(A)
29	18.06.04	사과나무	O	A10-10B	X	기저부	-	-	-	(B)
30			O	A10-10N	X	선단부	-	O	-	(B)

31	18.06.04	사과나무	X	AX1	X	선단부	-	-	-	(B)
32	18.06.04	사과나무	X	AX2	X	선단부	-	-	-	(B)
33	18.06.04	사과나무	X	AX3	X	선단부	-	-	-	(B)
34	18.06.04	사과나무	X	AX4	X	선단부	-	-	-	(B)
35	18.06.04	사과나무	X	AX5	X	선단부	-	O	-	(B)
36	18.06.04	사과나무	X	AX6	X	선단부	-	O	-	(B)
37	18.06.04	사과나무	X	AX7	X	선단부	-	-	-	(B)
38	18.06.04	사과나무	X	AX8	X	선단부	-	-	-	(B)
39	18.06.04	사과나무	X	AX9	X	선단부	-	O	-	(B)
40	18.06.04	사과나무	X	AX10	X	선단부	-	-	-	(B)

* 육안상 감염기주의 병징 시료(A), 무병징 시료(B); 육안상 무감염 기주의 시료(C)

** PNA 진단결과: (A) 10/10, (B) 18/30, (C) -

** cPCR 진단결과: (A) 10/10, (B) 3/30, (C) -

- PNA qPCR로 진단하였을 때 검출된 모든 시료에서 Tm값 70~73℃로 화상병균 감염을 확인.

- cPCR 결과와 비교하였을 때, PNA qPCR의 검출률은 (A)에서는 동일하였지만 (B)에서는 600% 높은 것으로 확인되었음.

• 시험구 4 (시험포장 30, 2018년 5월 31일, 6월 4일)

- 충북 제천시 백운면 방학리에서 5월 31일, 6월 4일에 채집된 사과나무에서 병징의 정도에 따라 다양한 부위에서 DNA를 추출하여 진단함.

표 83. Single tube nested PNA probe assay와 cPCR 진단법 비교 검증 (시험구 4)

시료	채집일	기주명	감염주 여부	시료명	병징 유무	채취부위	진단결과			구분*
							cPCR	PNA	균검출	
1				B1-1P	O	선단부	O	O	-	(A)
2	18.06.04	사과나무	O	B1-1B	X	기저부	-	-	-	(B)
3				B1-1N	X	중간부	-	-	-	(B)
4				B2-2P	O	선단부	O	O	O	(A)
5	18.06.04	사과나무	O	B2-2B	X	기저부	-	O	-	(B)
6				B2-2N	X	중간부	-	O	-	(B)
7				B3-3P	O	선단부	O	O	O	(A)
8	18.06.04	사과나무	O	B3-3B	X	기저부	-	O	-	(B)
9				B3-3N	X	중간부	-	O	-	(B)

10				B4-4P	O	선단부	O	O	O	(A)
11	18.06.04	사과나무	O	B4-4B	X	기저부	O	O	-	(B)
12				B4-4N	X	중간부	-	O	-	(B)
13				B5-5P	O	선단부	O	O	O	(A)
14	18.06.04	사과나무	O	B5-5B	X	기저부	O	O	-	(B)
15				B5-5N	X	중간부	O	O	-	(B)
16				B6-6P	O	선단부	O	O	O	(A)
17	18.06.04	사과나무	O	B6-6B	X	기저부	O	O	-	(B)
18				B6-6N	X	중간부	O	O	-	(B)
19				B7-7P	O	선단부	O	O	O	(A)
20	18.06.04	사과나무	O	B7-7B	X	기저부	O	O	-	(B)
21				B7-7N	X	중간부	O	O	-	(B)
22				B8-8P	O	선단부	O	O	O	(A)
23	18.06.04	사과나무	O	B8-8B	X	기저부	-	O	-	(B)
24				B8-8N	X	중간부	O	O	-	(B)
25				B9-9P	O	선단부	O	O	O	(A)
26	18.06.04	사과나무	O	B9-9B	X	기저부	-	O	-	(B)
27				B9-9N	X	중간부	-	O	-	(B)
28				B10-10P	O	선단부	O	O	O	(A)
29	18.06.04	사과나무	O	B10-10B	X	기저부	-	O	-	(B)
30				B10-10N	X	중간부	-	O	-	(B)
31	18.06.04	사과나무	O	B11P	O	중간부	O	O	O	(A)
32	18.06.04	사과나무	O	B12P	O	선단부	O	O	O	(A)
33	18.06.04	사과나무	O	B13P	O	선단부	O	O	O	(A)
34	18.06.04	사과나무	O	B14P	O	중간부	O	O	O	(A)
35	18.06.04	사과나무	O	B15P	O	중간부	O	O	O	(A)
36	18.06.04	사과나무	O	B16P	O	선단부	O	O	O	(A)
37	18.06.04	사과나무	X	BX1	X	선단부	-	O	-	(C)
38	18.06.04	사과나무	X	BX2	X	선단부	-	O	-	(C)
39	18.06.04	사과나무	X	BX3	X	선단부	-	O	-	(C)
40	18.06.04	사과나무	X	BX4	X	선단부	-	O	-	(C)
41	18.06.04	사과나무	X	BX5	X	선단부	-	O	-	(C)
42	18.06.04	사과나무	X	BX6	X	선단부	-	O	-	(C)
43	18.06.04	사과나무	X	BX7	X	선단부	-	O	-	(C)
44	18.06.04	사과나무	X	BX8	X	선단부	-	O	-	(C)

45	18.06.04	사과나무	X	BX9	X	선단부	-	0	-	(C)
46	18.06.04	사과나무	X	BX-일년생1	X	선단부	-	0	-	(C)
47	18.06.04	사과나무	X	BX-일년생2	X	선단부	-	0	-	(C)
48	18.06.04	사과나무	X	BX-일년생3	X	선단부	-	-	-	(C)
49	18.06.04	사과나무	X	BX-일년생4	X	선단부	-	0	-	(C)
50	18.06.04	사과나무	X	BX-일년생5	X	선단부	-	0	-	(C)
51	18.06.04	사과나무	X	BX-일년생6	X	선단부	-	0	-	(C)
52	18.06.04	사과나무	X	BX-일년생7	X	선단부	-	0	-	(C)
53	18.06.04	사과나무	X	BX-일년생8	X	선단부	-	0	-	(C)
54	18.06.04	사과나무	X	BX-일년생9	X	선단부	-	-	-	(C)
55	18.06.04	사과나무	X	BX-일년생10	X	선단부	-	-	-	(C)

* 육안상 감염기주의 병징 시료(A), 무병징 시료(B); 육안상 무감염 기주의 시료(C)

** PNA 진단결과: (A) 16/16, (B) 18/20, (C) 16/19

** cPCR 진단결과: (A) 16/16, (B) 8/20, (C) 0/19

- 감염증상을 나타낸 감염시료의 경우, PNA qPCR로 진단하였을 때 B1-1P을 제외한 모든 시료에서 Tm값 70~73°C로 화상병균 감염을 확인함.
- cPCR 결과와 비교하였을 때, PNA qPCR의 검출율은 (A)에서는 동일하였지만 (B), (C)에서는 각각 225%, 1600% 높은 것으로 확인되었음.

- 시험구 5 (시험포장 31·32, 2018년 6월 4일,6일,13일)
 - 충북 제천시 백운면 도곡리(시험포장 6,7)에서 6월 4일,6일,13일에 채집된 사과나무에서 병징의 정도에 따라 다양한 부위에서 DNA를 추출하여 진단함.

표 84. Single tube nested PNA probe assay와 cPCR 진단법 비교 검증 (시험구 5)

시료 채집일	기주명	감염주 여부	시료명	병징 유무	채취부위	진단결과			구분*
						cPCR	PNA	균검 출	
1			1P-B	X	기저부	-	-	-	(B)
2	18.06.06	사과나무	1P-M	X	중간부	0	0	-	(B)
3			1P	O	선단부	0	0	0	(A)
4			2P-B	X	기저부	-	-	-	(B)
5	18.06.06	사과나무	2P-M	X	중간부	-	0	-	(B)
6			2P	O	선단부	0	0	0	(A)
7			3P-B	X	기저부	-	-	-	(B)
8	18.06.06	사과나무	3P-M	X	중간부	-	0	-	(B)
9			3P	O	선단부	0	0	0	(A)
10			4P-B	O	기저부	0	0	0	(A)
11	18.06.06	사과나무	4P-M	X	중간부	-	-	-	(B)
12			4P-T	X	선단부	-	-	-	(B)
13			5P-B	O	기저부	0	0	-	(A)
14	18.06.06	사과나무	5P-M	X	중간부	-	-	-	(B)
15			5P-T	X	선단부	-	-	-	(B)
16			6P-B	O	기저부	0	0	0	(A)
17	18.06.06	사과나무	6P-M	X	중간부	-	0	-	(B)
18			6P-T	X	선단부	-	-	-	(B)
19			7P-B	X	기저부	-	0	-	(B)
20	18.06.06	사과나무	7P-M	O	중간부	0	0	0	(A)
21			7P-T	X	선단부	-	0	-	(B)
22			8P-B	O	기저부	0	0	-	(A)
23	18.06.06	사과나무	8P-M	X	중간부	-	-	-	(B)
24			8P-T	X	선단부	-	-	-	(B)
25			9P-B	X	기저부	-	0	-	(C)
26	18.06.06	사과나무	9P-M	X	중간부	-	-	-	(C)
27			9P-T	X	선단부	-	-	-	(C)
28			10P-B	O	기저부	0	0	0	(A)
29	18.06.06	사과나무	10P-M	X	중간부	-	-	-	(B)
30			10P-T	X	선단부	-	0	-	(B)
31	18.06.06	사과나무	11P	O	선단부	0	0	0	(A)
32	18.06.06	사과나무	12P	O	선단부	-	0	0	(A)

33	18.06.13	사과나무	0	19-2	0	선단부	0	0	0	(A)
34	18.06.13	사과나무	0	19-3	0	선단부	0	0	-	(A)
35	18.06.13	사과나무	0	19-4	0	선단부	0	0	0	(A)
36	18.06.13	사과나무	0	19-5	0	선단부	0	0	0	(A)
37	18.06.13	사과나무	0	19-6	X	선단부	-	0	-	(B)
38	18.06.13	사과나무	0	19-7	X	선단부	-	0	-	(B)
39	18.06.13	사과나무	0	19-8	X	선단부	-	0	-	(B)
40	18.06.13	사과나무	0	19-9	0	선단부	0	0	0	(A)
41	18.06.13	사과나무	0	19-10	0	선단부	0	0	0	(A)
42	18.06.13	사과나무	0	19-11	0	선단부	0	0	0	(A)
43	18.06.13	사과나무	0	19-12	0	선단부	0	0	0	(A)
44	18.06.13	사과나무	0	19-13	0	선단부	0	0	0	(A)
45	18.06.13	사과나무	0	19-14	0	선단부	0	0	0	(A)
46	18.06.13	사과나무	0	19-15	0	선단부	0	0	0	(A)
47	18.06.13	사과나무	0	19-16	0	선단부	0	0	0	(A)
48	18.06.13	사과나무	0	19-17	0	선단부	0	0	0	(A)
49	18.06.13	사과나무	0	19-18	0	선단부	0	0	0	(A)
50	18.06.13	사과나무	0	19-19	0	선단부	0	0	0	(A)
51	18.06.13	사과나무	0	19-20	0	선단부	0	0	-	(A)
52	18.06.13	사과나무	0	19-21	X	선단부	0	0	-	(B)
53	18.06.13	사과나무	0	19-22	X	선단부	-	-	-	(B)
54	18.06.13	사과나무	0	19-23	X	선단부	-	-	-	(B)

* 육안상 감염기주의 병징 시료(A), 무병징 시료(B); 육안상 무감염 기주의 시료(C)

** PNA 진단결과: (A) 27/27, (B) 11/24, (C) 1/3

** cPCR 진단결과: (A) 26/27, (B) 1/24, (C) 0/3

- 감염증상을 나타낸 감염시료의 경우, PNA qPCR로 진단하였을 때 모든 시료에서 Tm 값 70~73°C로 화상병균 감염을 확인함.

- cPCR 결과와 비교하였을 때, PNA qPCR의 검출률은 (A), (B), (C)에서 각각 104%, 550%, 200% 높은 것으로 확인되었음.

• 시험구 6 (시험포장 33·34, 2018년 6월 4일, 8일, 13일, 16일)

- 충북 제천시 백운면 방학리에서 6월 4일, 8일, 13일, 16일에 채집된 사과, 살구나무에서 병징의 정도에 따라 다양한 부위에서 DNA를 추출하여 진단함.

표 85. Single tube nested PNA probe assay와 cPCR 진단법 비교 검증 (시험구 6)

시료 채집일	기주명	감염 주 여부	시료명	병징 유무	채취부위	진단결과			구분 *	
						cPCR	PNA	균검출		
1	18.06.04	사과나무	0	0604-3P	0	중간부	0	0	0	(A)

2	18.06.08	사과나무	O	180608-1	O	선단부	O	O	-	(A)
3	18.06.08	사과나무	O	180608-2	O	중간부	-	O	-	(A)
4	18.06.13	사과나무	O	544-2	X	선단부	O	O	-	(B)
5				방학1P	O	선단부	O	O	O	(A)
6				방학1P-PN	X	중간부	-	O	-	(B)
7	18.06.16	사과나무	O	방학1P-PB	X	기저부	-	-	-	(B)
8				방학1P-PS	X	다른 가지	-	-	-	(B)
9				방학2P	O	선단부	O	O	O	(A)
10				방학2P-PN	X	중간부	-	-	-	(B)
11	18.06.16	사과나무	O	방학2P-PB	X	기저부	-	O	-	(B)
12				방학2P-PS	X	다른 가지	-	-	-	(B)
13				방학3P	O	선단부	-	O	-	(A)
14				방학3P-PN	X	중간부	-	-	-	(B)
15	18.06.16	사과나무	O	방학3P-PB	X	기저부	-	-	-	(B)
16				방학3P-PS	X	다른 가지	-	-	-	(B)
17				방학4P	O	선단부	O	O	O	(A)
18				방학4P-PN	X	중간부	-	O	-	(B)
19	18.06.16	사과나무	O	방학4P-PB	X	기저부	-	-	-	(B)
20				방학4P-PS	X	다른 가지	-	-	-	(B)
21				방학5P	O	선단부	O	O	O	(A)
22	18.06.16	사과나무	O	방학5P-PN	X	중간부	O	O	-	(B)
23				방학5P-PB	X	기저부	O	O	-	(B)
24				방학5P-PS	X	다른 가지	-	-	-	(B)
25				방학6P	O	선단부	-	O	-	(A)
26				방학6P-PN	X	중간부	O	O	-	(B)
27	18.06.16	사과나무	O	방학6P-PB	X	기저부	-	-	-	(B)
28				방학6P-PS	X	다른 가지	O	O	-	(B)

29				방학7P	O	선단부	O	O	O	(A)
30	18.06.16	사과나무	O	방학7P-PN	X	중간부	-	O	-	(B)
31				방학7P-PB	X	기저부	O	O	-	(B)
32				방학7P-PS	X	다른 가지	-	O	-	(B)
33				방학8P	O	선단부	O	O	O	(A)
34	18.06.16	사과나무	O	방학8P-PN	X	중간부	O	O	-	(B)
35				방학8P-PB	X	기저부	-	-	-	(B)
36				방학8P-PS	X	다른 가지	-	-	-	(B)
37				방학9P	O	선단부	O	O	O	(A)
38	18.06.16	사과나무	O	방학9P-PN	X	중간부	O	O	-	(B)
39				방학9P-PB	X	기저부	O	O	-	(B)
40				방학9P-PS	X	다른 가지	-	O	-	(B)
41	18.06.16	사과나무	O	P-6	O	선단부	-	O	-	(A)
42	18.06.16	사과나무	O	P-7	O	중간부	O	O	O	(A)
43	18.06.16	살구나무	X	살구-1	X	선단부	-	O	-	(C)

* 육안상 감염기주의 병징 시료(A), 무병징 시료(B); 육안상 무감염 기주의 시료(C)

** PNA 진단결과: (A) 14/14, (B) 15/28, (C) 1/1,

** cPCR 진단결과: (A) 10/14, (B) 9/28, (C) 0/1

- 감염증상을 나타낸 감염시료의 경우, PNA qPCR로 진단하였을 때 모든 시료에서 Tm 값 70~73℃로 화상병균 감염을 확인함.

- cPCR 결과와 비교하였을 때, PNA qPCR의 검출율은 (A), (B), (C)에서 각각 140%, 167%, 200% 높은 것으로 확인 되었음.

• 시험구 7 (시험포장 35, 2018년 6월 8일, 16일)

- 충북 제천시 백운면 화당리에서 6월 8일, 16일에 채집된 사과나무에서 병징의 정도에 따라 다양한 부위에서 DNA를 추출하여 진단함.

표 86. Single tube nested PNA probe assay와 cPCR 진단법 비교 검증 (시험구 7)

시료 채집일	기주명	감염 주 여부	시료명	병징 유무	채취부위	진단결과			구분*	
						cPCR	PNA	균검출		
1	18.06.08	사과나무	O	180608-3	O	선단부	O	O	-	(A)

2	18.06.08	사과나무	O	180608-4	O	중간부	O	O	-	(A)
3	18.06.08	사과나무	O	180608-6	O	기저부	O	O	O	(A)
4	18.06.16	사과나무	O	화당1P	O	선단부	-	O	-	(A)
5				화당1P-PN	X	중간부	O	O	-	(B)
6	18.06.16	사과나무	O	화당1P-PB	X	기저부	-	-	-	(B)
7				화당1P-PS	X	다른 가지	-	-	-	(B)
8				화당2P	O	선단부	O	O	O	(A)
9	18.06.16	사과나무	O	화당2P-PN	X	중간부	O	O	-	(B)
10				화당2P-PB	X	기저부	O	O	-	(B)
11				화당2P-PS	X	다른 가지	-	-	-	(B)
12				화당3P	O	선단부	O	O	O	(A)
13	18.06.16	사과나무	O	화당3P-PN	X	중간부	O	O	-	(B)
14				화당3P-PB	X	기저부	-	O	-	(B)
15				화당3P-PS	X	다른 가지	-	-	-	(B)
16				화당4P	O	선단부	O	O	O	(A)
17	18.06.16	사과나무	O	화당4P-PN	X	중간부	-	-	-	(B)
18				화당4P-PB	X	기저부	-	-	-	(B)
19				화당4P-PS	X	다른 가지	-	-	-	(B)
20				화당5P	O	선단부	O	O	O	(A)
21	18.06.16	사과나무	O	화당5P-PN	X	중간부	O	O	-	(B)
22				화당5P-PB	X	기저부	O	O	-	(B)
23				화당5P-PS	X	다른 가지	-	O	-	(B)
24				화당6P	O	선단부	O	O	O	(A)
25	18.06.16	사과나무	O	화당6P-PN	X	중간부	O	O	-	(B)
26				화당6P-PB	X	기저부	O	O	-	(B)
27				화당6P-PS	X	다른 가지	-	O	-	(B)
28				화당7P	O	선단부	O	O	O	(A)
29	18.06.16	사과나무	O	화당7P-PN	X	중간부	-	O	-	(B)
30				화당7P-PB	X	기저부	O	O	-	(B)
31				화당7P-PS	X	다른 가지	-	O	-	(B)
32				화당8P	O	선단부	-	O	-	(A)
33	18.06.16	사과나무	O	화당8P-PN	X	중간부	-	O	-	(B)
34				화당8P-PB	X	기저부	O	O	-	(B)
35				화당8P-PS	X	다른 가지	-	O	-	(B)
36				화당9P	O	선단부	-	O	-	(A)
37	18.06.16	사과나무	O	화당9P-PN	X	중간부	O	O	-	(B)
38				화당9P-PB	X	기저부	-	-	-	(B)
39				화당9P-PS	X	다른 가지	-	-	-	(B)
40	18.06.16	사과나무	O	화당10P	O	선단부	O	O	O	(A)
41				화당10P-PN	X	중간부	O	O	-	(B)

42				화당10P-PB	X	기저부	O	O	-	(B)
43				화당10P-PS	X	다른 가지	O	O	-	(B)
44				화당11P	O	선단부	O	O	O	(A)
45	18.06.16	사과나무	O	화당11P-PN	X	중간부	O	O	-	(B)
46				화당11P-PB	X	기저부	O	O	-	(B)
47				화당11P-PS	X	다른 가지	-	O	-	(B)
48				화당12P	O	선단부	O	O	O	(A)
49	18.06.16	사과나무	O	화당12P-PN	X	중간부	O	O	-	(B)
50				화당12P-PB	X	기저부	O	O	-	(B)
51				화당12P-PS	X	다른 가지	-	-	-	(B)
52				화당13P	O	선단부	O	O	O	(A)
53	18.06.16	사과나무	O	화당13P-PN	X	중간부	O	O	-	(B)
54				화당13P-PB	X	기저부	-	O	-	(B)
55				화당13P-PS	X	다른 가지	-	O	-	(B)
56				화당14P	O	선단부	O	O	O	(A)
57	18.06.16	사과나무	O	화당14P-PN	X	중간부	-	O	-	(B)
58				화당14P-PB	X	기저부	-	O	-	(B)
59				화당14P-PS	X	다른 가지	-	-	-	(B)
60	18.06.16	사과나무	O	P-1	O	선단부	O	O	O	(A)
61	18.06.16	사과나무	O	P-2	O	선단부	O	O	O	(A)
62	18.06.16	사과나무	O	P-3	O	선단부	O	O	O	(A)
63	18.06.16	사과나무	O	P-4	O	선단부	O	O	O	(A)
64	18.06.16	사과나무	O	P-5	O	선단부	-	O	-	(A)

* 육안상 감염기주의 병징 시료(A), 무병징 시료(B); 육안상 무감염 기주의 시료(C)

** PNA 진단결과: (A) 22/22, (B) 31/42, (C) -

** cPCR 진단결과: (A) 18/22, (B) 19/42, (C) -

- 감염증상을 나타낸 감염시료의 경우, PNA qPCR로 진단하였을 때 모든 시료에서 Tm 값 70~73℃로 화상병균 감염을 확인함.

- cPCR 결과와 비교하였을 때, PNA qPCR의 검출률은 (A), (B)에서 각각 122%, 163% 높은 것으로 확인 되었음.

• 시험구 8 (시험포장 36, 2018년 6월 16일, 7월 22일, 23일)

- 충북 제천시 백운면 도곡리에서 6월 16일, 7월 22일, 23일에 채집된 사과나무에서 병징의 정도에 따라 다양한 부위에서 DNA를 추출하여 진단함.

표 87. Single tube nested PNA probe assay와 cPCR 진단법 비교 검증 (시험구 8)

시료 채집일	기주명	감염주 여부	시료명	병징 유무	채취부위	진단결과			구분*	
						cPCR	PNA	균검출		
1			도곡1-P	O	선단부	0	0	0	(A)	
2	18.06.16	사과나무	0	도곡1-PN	X	중간부	0	0	-	(B)
3				도곡1-PB	X	기저부	-	0	-	(B)
4				도곡1-PS	X	다른 가지	-	0	-	(B)
5				도곡2-P	O	선단부	0	0	0	(A)
6	18.06.16	사과나무	0	도곡2-PN	X	중간부	0	0	-	(B)
7				도곡2-PB	X	기저부	-	-	-	(B)
8				도곡2-PS	X	다른 가지	-	-	-	(B)
9				도곡3-P	O	선단부	0	0	0	(A)
10	18.06.16	사과나무	0	도곡3-PN	X	중간부	0	0	-	(B)
11				도곡3-PB	X	기저부	0	0	-	(B)
12				도곡3-PS	X	다른 가지	0	0	-	(B)
13				18.06.16	사과나무	0	P-8	O	선단부	-
14	18.06.16	사과나무	0	P-9	O	선단부	0	0	0	(A)
15	18.06.16	사과나무	0	P-10	O	선단부	0	0	0	(A)
16	18.06.16	사과나무	0	P-11	O	중간부	-	0	-	(A)
17				도곡4-P	O	선단부	0	0	0	(A)
18	18.06.16	사과나무	0	도곡4-PN	X	중간부	-	0	-	(B)
19				도곡4-PB	X	기저부	0	0	-	(B)
20				도곡4-PS	X	다른 가지	0	0	-	(B)
21				도곡5-P	O	선단부	0	0	0	(A)
22	18.06.16	사과나무	0	도곡5-PN	X	중간부	0	0	-	(B)
23				도곡5-PB	X	기저부	0	0	-	(B)
24				도곡5-PS	X	다른 가지	0	0	-	(B)
25				도곡6-P	O	선단부	-	0	-	(A)
26				도곡6-P2	O	중간부	0	0	-	(B)
27	18.06.16	사과나무	0	도곡6-PN	X	중간부	-	-	-	(B)
28				도곡6-PB	X	기저부	-	-	-	(B)
29				도곡6-PS	X	다른 가지	-	-	-	(B)
30				도곡7-P	O	선단부	0	0	0	(A)
31	18.06.16	사과나무	0	도곡7-PN	X	중간부	0	0	-	(B)
32				도곡7-PB	X	기저부	-	-	-	(B)
33				도곡7-PS	X	다른 가지	-	-	-	(B)
34				도곡8-P	O	선단부	0	0	0	(A)
35				도곡8-P2	X	중간부	-	-	-	(B)
36	18.06.16	사과나무	0	도곡8-PN	X	중간부	-	-	-	(B)
37				도곡8-PB	X	기저부	0	-	-	(B)
38				도곡8-PS	X	다른 가지	-	-	-	(B)
39				도곡9-P	O	선단부	0	0	0	(A)
40	18.06.16	사과나무	0	도곡9-PN	X	중간부	0	0	-	(B)
41				도곡9-PB	X	기저부	-	-	-	(B)
42				도곡9-PS	X	다른 가지	-	-	-	(B)
43				도곡10-P	O	선단부	0	0	0	(A)
44	18.06.16	사과나무	0	도곡10-PB	X	중간부	-	-	-	(B)
45				도곡10-PS	X	기저부	-	-	-	(B)

* 육안상 감염기주의 병징 시료(A), 무병징 시료(B); 육안상 무감염 기주의 시료(C)

** PNA 진단결과: (A) 14/14, (B) 16/31, (C) -

** cPCR 진단결과: (A) 14/14, (B) 14/31, (C) -

- PNA qPCR로 진단하였을 때, 검출된 시료는 Tm값 70~73℃을 나타내어 화상병균 감

염을 확인.

- cPCR 결과와 비교하였을 때, PNA qPCR의 검출율은 (A), (B)에서 각각 127%, 114% 높은 것으로 확인 되었음.

• 시험구 9 (시험포장 37, 2018년 6월 21일)

- 충북 제천시 백운면 도곡리에서 6월 21일에 채집된 사과나무에서 병징의 정도에 따라 다양한 부위에서 DNA를 추출하여 진단함.

표 88. Single tube nested PNA probe assay와 cPCR 진단법 비교 검증 (시험구 9)

시료 채집일	기주명	감염주 여부	시료명	병징 유무	채취부위	진단결과			구분*	
						cPCR	PNA	균검출		
1	18.06.21	사과나무	O	도곡리2-T	X	선단부	-	-	-	(B)
2				도곡리2-M	X	중간부	-	-	-	(B)
3				도곡리2-PB	O	기저부	O	O	-	(A)
4				도곡리2-S	X	다른 가지	-	-	-	(B)
5	18.06.21	사과나무	O	도곡리3-T	X	선단부	-	-	-	(B)
6				도곡리3-PM	O	중간부	O	O	O	(A)
7				도곡리3-B	X	기저부	-	-	-	(B)
8				도곡리3-S	X	다른 가지	-	-	-	(B)
9	18.06.21	사과나무	O	도곡리4-T	X	선단부	-	-	-	(B)
10				도곡리4-M	X	중간부	-	O	-	(B)
11				도곡리4-PB	O	기저부	O	O	O	(A)
12				도곡리4-S	X	다른 가지	-	-	-	(B)
13	18.06.21	사과나무	O	도곡리5-T	X	선단부	-	-	-	(B)
14				도곡리5-MP	O	중간부	O	O	O	(A)
15				도곡리5-B	X	기저부	-	-	-	(B)
16				도곡리5-S	X	다른 가지	-	-	-	(B)
17	18.06.21	사과나무	O	도곡리6-PN	X	선단부	-	O	-	(B)
18	18.06.21	사과나무	O	도곡리7-T	X	선단부	-	-	-	(B)
19				도곡리7-P	O	중간부	O	O	O	(A)
20				도곡리7-M	X	중간부	-	-	-	(B)
21				도곡리7-B	X	기저부	-	-	-	(B)
22				도곡리7-S	X	다른 가지	-	-	-	(B)
23				P-1	O	선단부	O	O	O	(A)
24	P-2	O	선단부	O	O	O	(A)			
25	P-3	O	선단부	O	O	O	(A)			

26				도곡리8-P	O	선단부	-	O	-	(A)
27				도곡리8-M	X	중간부	-	O	-	(B)
28	18.06.21	사과나무	O	도곡리8-B	X	기저부	-	O	-	(B)
29				도곡리8-S	X	다른 가지	-	O	-	(B)
30	18.06.21	사과나무	O	도곡리9-PN	X	선단부	-	-	-	(B)
31				도곡리10-PT	O	선단부	O	O	O	(A)
32	18.06.21	사과나무	O	도곡리10-M	X	중간부	-	O	-	(B)
33				도곡리10-B	X	기저부	-	O	-	(B)
34				도곡리10-S	X	다른 가지	-	O	-	(B)
35	18.06.21	사과나무	O	P-4	O	선단부	O	O	-	(A)
36				도곡리11-T	X	선단부	-	-	-	(B)
37	18.06.21	사과나무	O	도곡리11-M	X	중간부	-	-	-	(B)
38				도곡리11-P	O	기저부	O	O	O	(A)
39				도곡리11-S	X	다른 가지	-	-	-	(B)
40				도곡리12-PT	O	선단부	O	O	O	(A)
41	18.06.21	사과나무	O	도곡리12-PN	X	선단부	-	O	-	(B)
42				도곡리12-B	X	기저부	-	-	-	(B)
43				도곡리12-S	X	다른 가지	-	-	-	(B)
44				도곡리13-T	X	선단부	-	-	-	(B)
45	18.06.21	사과나무	O	도곡리13-PM	O	중간부	O	O	O	(A)
46				도곡리13-B	X	기저부	O	O	-	(B)
47				도곡리13-S	X	다른 가지	-	-	-	(B)

* 육안상 감염기주의 병징 시료(A), 무병징 시료(B); 육안상 무감염 기주의 시료(C)

** PNA 진단결과: (A) 14/14, (B) 10/33, (C) -

** cPCR 진단결과: (A) 13/14, (B) 1/33, (C) -

- 감염증상을 나타낸 감염시료의 경우, PNA qPCR로 진단하였을 때 모든 시료에서 Tm 값 70~73℃로 화상병균 감염을 확인함.

- cPCR 결과와 비교하였을 때, PNA qPCR의 검출율은 (A), (B)에서 각각 108%, 1000% 높은 것으로 확인되었음.

- 시험구 10 (시험포장 38, 2018년 6월 22일)

- 강원 원주시 신림면 구학리에서 6월 22일에 채집된 사과, 꽃사과나무에서 병징의 정도에 따라 다양한 부위에서 DNA를 추출하여 진단함.

표 89. Single tube nested PNA probe assay와 cPCR 진단법 비교 검증 (시험구 10)

시료 채집일	기주명	감염주 여부	시료명	병징 유무	채취부위	진단결과			구분*	
						cPCR	PNA	균검출		
1			원주 A1-T	X	선단부	-	-	-	(B)	
2	18.06.22	사과나무	O	원주 A1-M	O	중간부	O	O	O	(A)
3			원주 A1-B	X	기저부	-	-	-	(B)	
4			원주 A2-T	X	선단부	-	-	-	(B)	
5	18.06.22	사과나무	O	원주 A2-M	O	중간부	-	O	-	(A)
6			원주 A2-B	X	기저부	-	-	-	(B)	
7			원주 A3-T	X	선단부	-	-	-	(B)	
8	18.06.22	사과나무	O	원주 A3-M	O	중간부	O	O	O	(A)
9			원주 A3-B	X	기저부	-	O	-	(B)	
10			원주 A4-T	O	선단부	O	O	O	(A)	
11	18.06.22	사과나무	O	원주 A4-M	X	중간부	-	-	-	(B)
12			원주 A4-B	X	기저부	-	-	-	(B)	
13			원주 A5-T	X	선단부	-	-	-	(B)	
14	18.06.22	사과나무	O	원주 A5-M	O	중간부	O	O	O	(A)
15			원주 A5-B	X	기저부	-	-	-	(B)	
16			원주 A6-T	O	선단부	O	O	O	(A)	
17	18.06.22	사과나무	O	원주 A6-M	X	중간부	O	O	-	(B)
18			원주 A6-B	X	기저부	-	-	-	(B)	
19	18.06.22	사과나무	O	원주 A7-T	O	선단부	-	O	-	(A)
20			원주 A7-M	X	중간부	-	O	-	(B)	

21				원주 A7-B	X	기저부	-	-	-	(B)
22				원주 A8-T	O	선단부	O	O	O	(A)
23	18.06.22	사과나무	O	원주 A8-M	X	중간부	-	-	-	(B)
24				원주 A8-B	X	기저부	-	-	-	(B)
25				원주 A9-T	X	선단부	-	-	-	(B)
26	18.06.22	사과나무	O	원주 A9-M	O	중간부	O	O	O	(A)
27				원주 A9-B	X	기저부	-	-	-	(B)
28				원주 A10-T	O	선단부	O	O	O	(A)
29	18.06.22	사과나무	O	원주 A10-M	X	중간부	-	-	-	(B)
30				원주 A10-B	X	기저부	-	-	-	(B)
31				원주 A11-T	X	선단부	-	-	-	(B)
32	18.06.22	사과나무	O	원주 A11-M	O	중간부	O	O	O	(A)
33				원주 A11-B	X	기저부	-	O	-	(B)
34	18.06.22	꽃사과	X	원주 A-NS	X	선단부	-	-	-	(C)

* 육안상 감염기주의 병징 시료(A), 무병징 시료(B); 육안상 무감염 기주의 시료(C)

** PNA 진단결과: (A) 11/11 (B) 4/22, (C) 0/1

** cPCR 진단결과: (A) 9/11, (B) 1/22, (C) 0/1

- 감염증상을 나타낸 감염시료의 경우, PNA qPCR로 진단하였을 때 모든 시료에서 Tm 값 70~73℃로 화상병균 감염을 확인함.

- cPCR 결과와 비교하였을 때, PNA qPCR의 검출율은 (A), (B)에서 각각 122%, 400% 높은 것으로 확인되었음.

- 시험구 11 (시험포장 39, 2018년 6월 29-30일)
 - 충북 제천시 백운면 방학리에서 6월 29-30일에 채집된 사과나무에서 병징의 정도에 따라 다양한 부위에서 DNA를 추출하여 진단함.

표 90. Single tube nested PNA probe assay와 cPCR 진단법 비교 검증 (시험구 11)

	시료 채집일	기주명	감염주 여부	시료명	병징 유무	채취부위	진단결과			구분*
							cPCR	PNA	균검출	
1	18.06.29-30	사과	X	제천 8-1	X	선단부	-	O	-	(B)
2	18.06.29-30	사과	X	제천 8-2	X	선단부	O	O	-	(B)
3	18.06.29-30	사과	X	제천 8-3	X	선단부	O	O	-	(B)
4	18.06.29-30	사과	X	제천 8-4	X	선단부	-	O	-	(B)
5	18.06.29-30	사과	X	제천 8-5	X	선단부	-	-	-	(B)
6	18.06.29-30	사과	X	제천 8-6	X	선단부	-	O	-	(B)
7	18.06.29-30	사과	X	제천 8-7	X	선단부	-	O	-	(B)
8	18.06.29-30	사과	X	제천 8-8	X	선단부	-	O	-	(B)
9	18.06.29-30	사과	X	제천 8-9	X	선단부	-	O	-	(B)
10	18.06.29-30	사과	X	제천 8-10	X	선단부	-	O	-	(B)

* 육안상 감염기주의 병징 시료(A), 무병징 시료(B); 육안상 무감염 기주의 시료(C)

** PNA 진단결과: (A) -, (B) 9/10, (C) -

** cPCR 진단결과: (A) -, (B) 2/10, (C) -

- 감염증상을 나타낸 감염시료의 경우, PNA qPCR로 진단하였을 때 모든 시료에서 Tm 값 70~73℃로 화상병균 감염을 확인함.
- cPCR 결과와 비교하였을 때, PNA qPCR의 검출률은 450% 높은 것으로 확인되었음.

- 시험구 12 (시험포장 40·41, 2018년 7월 6-7일)
 - 강원 평창군 평창읍 중부리에서 7월 6-7일에 채집된 사과, 배나무에서 병징의 정도에 따라 다양한 부위에서 DNA를 추출하여 진단함.

표 91. Single tube nested PNA probe assay와 cPCR 진단법 비교 검증 (시험구 12)

시료	채집일	기주명	감염주 여부	시료명	병징 유무	채취부위	진단결과			구분
							cPCR	PNA	균검출	
1				평창1-2	X	선단부	-	O	-	(B)
2				평창1-3	X	중간부	-	O	-	(B)
3	18.07.06.-07.	사과나무	O	평창1-4	X	중간부	-	O	-	(B)
4				평창1-5	X	중간부	-	-	-	(B)
5				평창1-6	X	기저부	-	-	-	(B)
6	18.07.06.-07.	사과나무	O	평창2-2	X	선단부	-	O	-	(B)
7	18.07.06.-07.	사과나무	O	평창2-3	X	선단부	-	O	-	(B)
8	18.07.06.-07.	사과나무	O	평창2-4	X	선단부	-	-	-	(B)
9	18.07.06.-07.	사과나무	O	평창2-5	X	선단부	-	-	-	(B)
10	18.07.06.-07.	사과나무	O	평창2-6	X	선단부	-	-	-	(B)
11	18.07.06.-07.	사과나무	O	평창2-7	X	선단부	-	-	-	(B)
12	18.07.06.-07.	사과나무	O	평창3-1	X	선단부	-	O	-	(B)
13	18.07.06.-07.	사과나무	O	평창3-2	X	선단부	-	O	-	(B)
14	18.07.06.-07.	사과나무	O	평창3-3	X	선단부	-	O	-	(B)
15	18.07.06.-07.	사과나무	O	평창3-4	X	선단부	-	O	-	(B)
16	18.07.06.-07.	사과나무	O	평창4	X	선단부	-	-	-	(C)
17	18.07.06.-07.	사과나무	X	평창5	X	선단부	-	-	-	(B)

* 육안상 감염기주의 병징 시료(A), 무병징 시료(B); 육안상 무감염 기주의 시료(C)

** PNA 진단결과: (A) -, (B) 9/16, (C) 0/1

** cPCR 진단결과: (A) -, (B) 0/16, (C) 0/1

- 감염증상을 나타낸 감염시료의 경우, PNA qPCR로 진단하였을 때 모든 시료에서 Tm 값 70~73℃로 화상병균 감염을 확인함.

- cPCR 결과와 비교하였을 때, PNA qPCR의 검출률은 900% 높은 것으로 확인되었음.

- 시험구 13 (시험포장 42, 2018년 7월 18-19일)
 - 충북 충주시 양성면 지당리에서 7월 18-19일에 채집된 사과나무에서 병징의 정도에 따라 다양한 부위에서 DNA를 추출하여 진단함.

표 92. Single tube nested PNA probe assay와 cPCR 진단법 비교 검증 (시험구 13)

시료	채집일	기주명	감염주 여부	시료명	병징 유무	채취부위	진단결과			구분 *
							cPCR	PNA	균검출	
1				지당3 1-P	O	기저부	O	O	O	(A)
2	18.07.06.- 07	사과 (미니)	O	지당3 1-T	X	선단부	-	-	-	(B)
3				지당3 1-M	X	중간부	-	-	-	(B)
4				지당3 1-OS	X	다른 가지	-	-	-	(B)

5				지당3 2-P	O	기저부	O	O	O	(A)
6	18.07.06.- 07	사과 (미니)	O	지당3 2-OS1	X	다른 가지	-	O	-	(B)
7				지당3 2-OS2	X	다른 가지	-	O	-	(B)

8				지당3 3-P	O	선단부	O	O	O	(A)
9				지당3 3-T	X	선단부	-	-	-	(B)
10	18.07.06.- 07	사과 (미니)	O	지당3 3-M	X	중간부	-	-	-	(B)
11				지당3 3-B	X	기저부	-	-	-	(B)
12				지당3 3-OS	X	다른 가지	-	-	-	(B)

13	18.07.06.- 07	사과 (홍로)	O	지당3 4-P	O	기저부	O	O	O	(A)
14				지당3 4-OS	X	다른 가지	-	-	-	(B)

15	18.07.06.- 07	사과 (미니)	X	지당3 5-NS	X	선단부	-	-	-	(C)

16	18.07.06.- 07	사과 (부사)	X	지당3 6-NS	X	선단부	-	-	-	(C)

* 육안상 감염기주의 병징 시료(A), 무병징 시료(B); 육안상 무감염 기주의 시료(C)

** PNA 진단결과: (A) 4/4, (B) 2/10, (C) 0/2

** cPCR 진단결과: (A) 4/4, (B) 0/10, (C) 0/2

- 감염증상을 나타낸 감염시료의 경우, PNA qPCR로 진단하였을 때 모든 시료에서 Tm 값 70~73°C로 화상병균 감염을 확인함.
- cPCR 결과와 비교하였을 때, PNA qPCR의 검출율은 (A)에서는 동일하였지만 (B)에서는 200% 높은 것으로 확인되었음..

- 시험구 14 (시험포장 43, 2018년 7월 18-19일)
 - 충북 충주시 양성면 지당리에서 7월 18-19일에 채집된 사과나무에서 병징의 정도에 따라 다양한 부위에서 DNA를 추출하여 진단함.

표 93. Single tube nested PNA probe assay와 cPCR 진단법 비교 검증 (시험구 14)

시료 채집일	기주명	감염 주 여부	시료명	병징 유무	채취부위	진단결과			구분 *
						cPCR	PNA	균검 출	
18.07.18.-19	사과	O	지당4 1-M	X	중간부	-	O	-	(B)
			지당4 1-B	X	기저부	-	-	-	(B)
18.07.18.-19	사과	O	지당4 2-T	X	선단부	-	-	-	(B)
			지당4 2-M1	X	중간부	-	-	-	(B)
			지당4 2-M2	X	중간부	-	-	-	(B)
			지당4 2-B	X	기저부	-	O	-	(B)
			지당4 2-OS1	X	다른 가지	-	-	-	(B)
			지당4 2-OS2	X	다른 가지	-	-	-	(B)
			지당4 3-T	X	선단부	-	-	-	(B)
			지당4 3-M	X	중간부	-	O	-	(B)
18.07.18.-19	사과	O	지당4 3-B	X	기저부	-	-	-	(B)
			지당4 3-OS1	X	다른 가지	-	-	-	(B)
			지당4 3-OS2	X	다른 가지	-	-	-	(B)
			지당4 4-T	X	선단부	-	-	-	(B)
18.07.18.-19	사과	O	지당4 4-M1	X	중간부	-	-	-	(B)
			지당4 4-M2	X	중간부	-	-	-	(B)
18.07.18.-19	사과	O	지당4 5-T	X	선단부	-	-	-	(B)
			지당4 5-M	X	중간부	-	-	-	(B)
			지당4 5-B	X	기저부	-	-	-	(B)
			지당4 5-OS	X	다른 가지	-	-	-	(B)
			지당4 6-T	X	선단부	-	-	-	(B)
			지당4 6-M	X	중간부	-	O	-	(B)
18.07.18.-19	사과	O	지당4 6-B	X	기저부	-	-	-	(B)
			지당4 6-OS1	X	다른 가지	-	-	-	(B)
			지당4 6-OS2	X	다른 가지	-	-	-	(B)
			지당4 6-OS3	X	다른 가지	-	-	-	(B)
18.07.18.-19	사과 (홍로)	O	지당4 7-Top	X	감염부위 상부	-	O	-	(B)
			지당4 7-Under1	X	감염부위 하부	-	O	-	(B)
			지당4 7-Under2	X	감염부위 하부	-	O	-	(B)
			지당4 7-Under3	X	감염부위 하부	-	O	-	(B)

31				지당4 7-Under4	X	감염부위 하부	-	-	-	(B)
32	18.07.18.-19	사과	O	지당4 8-P1	O	선단부	O	O	O	(A)
33	18.07.18.-19	사과	O	지당4 8-P3	O	선단부	O	O	O	(A)
34	18.07.18.-19	사과	O	지당4 8-P5	O	선단부	O	O	O	(A)
35	18.07.18.-19	사과	O	지당4 8-P10	O	선단부	O	O	O	(A)
36	18.07.18.-19	사과	X	지당4 9-NS	X	선단부	-	-	-	(C)
37	18.07.18.-19	사과	O	지당4 10-Near	O	중간부	-	-	-	(B)
38	18.07.18.-19	사과	O	지당4 10-T	X	선단부	-	-	-	(B)
39	18.07.18.-19	사과	O	지당4 11-Near	O	중간부	-	-	-	(B)
40	18.07.18.-19	사과	O	지당4 11-T	X	선단부	-	-	-	(B)

* 육안상 감염기주의 병징 시료(A), 무병징 시료(B); 육안상 무감염 기주의 시료(C)

** PNA 진단결과: (A) 4/4 (B) 8/35, (C) 0/1

** cPCR 진단결과: (A) 4/4 (B) 0/35, (C) 0/1

- 감염증상을 나타낸 감염시료의 경우, PNA qPCR로 진단하였을 때 모든 시료에서 Tm 값 70~73℃로 화상병균 감염을 확인함.

- cPCR 결과와 비교하였을 때, PNA qPCR의 검출률은 (A)에서는 동일하였지만 (B)에서는 800% 높은 것으로 확인되었음.

• 시험구 15 (시험포장 44, 비감염 농가)

- 충북 제천시 백운면 방학리에서 채집된 사과나무에서 병징의 정도에 따라 다양한 부위에서 DNA를 추출하여 진단함.

표 94. Single tube nested PNA probe assay와 cPCR 진단법 비교 검증 (시험구 15)

시료 채집일	기주명	감염 주 여부	시료명	병징 유무	채취부위	진단결과			구분*	
						cPCR	PNA	균검 출		
1	18.06.13	사과나무	X	방학리 1	X	선단부	O	O	-	(C)
2	18.06.20	사과나무	X	방학리 2	X	선단부	O	O	-	(C)
3	18.06.20	사과나무	X	방학리 3	X	선단부	O	O	-	(C)
4	18.06.20	사과나무	X	방학리 4	X	선단부	O	O	-	(C)
5	18.06.20	사과나무	X	방학리 4-1	X	선단부	O	O	-	(C)
6	18.06.20	사과나무	X	방학리 4-2	X	선단부	-	O	-	(C)

* 육안상 감염기주의 병징 시료(A), 무병징 시료(B); 육안상 무감염 기주의 시료(C)

** PNA 진단결과: (A) -, (B) -, (C) 6/6

** cPCR 진단결과: (A) -, (B) -, (C) 5/6

- PNA qPCR로 진단하였을 때, 검출된 시료는 Tm값 70~73℃을 나타내어 화상병균 감염을 확인.
- cPCR 결과와 비교하였을 때, PNA qPCR의 검출율은 120% 높은 것으로 확인되었음.
- 시험구 16 (시험포장 45, 비감염 농가)
 - 충북 제천시 백운면 화당리에서 채집된 사과나무에서 병징의 정도에 따라 다양한 부위에서 DNA를 추출하여 진단함.

표 95. Single tube nested PNA probe assay와 cPCR 진단법 비교 검증

	시료 채집일	기주명	감염주 여부	시료명	병징 유무	채취부위	진단결과			구분*
							cPCR	PNA	균검출	
1	18.06.21	사과나무	X	화당리 1	X	선단부	0	0	-	(C)
2	18.06.21	사과나무	X	화당리 2	X	선단부	0	0	-	(C)
3	18.06.21	사과나무	X	화당리 3	X	선단부	0	0	-	(C)

* 육안상 감염기주의 병징 시료(A), 무병징 시료(B); 육안상 무감염 기주의 시료(C)

** PNA 진단결과: (A) -, (B) -, (C) 3/3 ,

** cPCR 진단결과: (A) -, (B) -, (C) 3/3

- PNA qPCR로 진단하였을 때, 검출된 시료는 Tm값 70~73℃을 나타내어 화상병균 감염을 확인.
- cPCR 결과와 비교하였을 때, PNA qPCR의 검출율은 동일한 것으로 확인되었음.
- 화상병 진단 kit의 현장 적용 시험 결과 기존의 conventional PCR 방법 보다 우수한 진단 결과를 보여 주었음.
- 새롭게 개발된 과수 화상병 진단 kit는 PNA probe를 이용하여 real-time PCR 장비를 통해 병원균의 감염 여부를 진단하는 kit로 기존 진단 kit 보다 민감도와 정확도 (fidelity) 등이 우수하여 병징이 보이지 않는 감염 시료에서의 진단 능력이 우수한 것으로 나타났음.
- PNA probe는 SNP 타입을 구분하는 능력이 있어 과수화상병균과 가지검은마름병을 SNP를 통해 구분이 가능하여 활용 범위가 높음을 확인하였음.
- 따라서, 새롭게 개발된 과수화상병균 진단 kit는 감염 초기 진단을 위한 병원균 예찰용 혹은 가지검은마름병과 화상병균을 구분하는 지노타입핑 용 등으로 활용할 경우 과수화상병균의 조기 진단에 매우 유용한 역할을 할 것으로 기대함.
- 하지만, 과수화상병 진단 kit는 병원균 감염부위에서의 병원균 농도에 따라 진단 여부가 달라질 수 있기 때문에 의심 시료의 경우 다양한 부위에서의 반복 실험 등이 필요함.

다. 연구개발성과

(1) 국내 및 국제 학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	한국미생물학회연합 국제학술대회	송주연	2016.11.04	일산 Kintex	대한민국
2	한국미생물학회연합 국제학술대회	송주연	2017.4.26	부산 BEXCO	대한민국
3	한국원예학회	남문	2017.5.25	대전컨벤션센터	대한민국
4	아시아식물병리학회	남문	2017.9.14	제주 ICC	대한민국
5	International Congress of Plant Pathology(ICPP)	남문	2018.07.30	보스턴	미국
6	한국식물병리학회	송주연	2018.10.25	광주 김대중컨벤션센터	대한민국

(2) 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품중, 프로그램)

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	어위니아 아밀로보라 검출용 분자 마커 및 이의 용도	대한 민국	연세대학교 산학협력단, 지노타입 주식회사	2018. 10.18 (2017. 10.31)	10-2018-0 124643 (10-2017- 0143857)	연세대학교 산학협력단, 지노타입 주식회사	2019. 02.26	10-19543 92	100

() 우선권주장

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

과수작물에서 발생하고 있는 화상병(fire blight) 진단 및 예찰이 신속하고 정확하게 이루어 질 수 있도록 화상병균 유전체 정보를 활용하여 바이오마커 발굴 및 생체 진단법을 개발하고 최적화하여 화상병 예찰용 진단키트를 개발함.

- 국내 발병 화상병균 균주 확보 및 gDNA 분리
- 화상병균 유전체 해독 및 비교 분석을 통한 바이오마커 후보 유전자 발굴
- 과수 화상병균 검출을 위한 민감도 높은 High-throughput 진단 시스템 구축
- 과수 화상병균 검출용 바이오마커의 현장 적용 실험 및 문제점 개선

3-2. 목표 달성여부

구분 (연도)	세부연구목표	달성 도	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2016)	○ 화상병균 시료 수집 및 발생실태 구명 (농림축산검역본부 협조)	100%	<ul style="list-style-type: none"> • 화상병균 주요 발생 지역의 다양한 시료 수집과 전국 발생 분포 조사(농림축산검역본부 협조) 	- 2016년에 발생한 과수 화상병 발병 지역, 시기, 기주 등의 역학 정보와 화상병균 분리 균주 관련 자료 확보
	○ 2016년 발병 화상병균 유전체 해독 및 전년도 발병 화상병균과 비교	100%	- 농림축산검역본부로부터 2016년도 발병 화상병균 gDNA 확보	- 유전체 해독 균주 선정을 위한 자료를 검토하고 화상병균의 gDNA 15종을 농림축산검역본부로부터 제공받아 이 중 3종에 대한 유전체 서열 분석을 우선적으로 추진함
	○ 화상병균과 유연관계에 있는 <i>Erwinia</i> 속의 균주들 간 유전체 비교 분석	100%	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Erwinia</i> 속에 속하는 균주 및 화상병균 유전체 염기서열 비교 	<ul style="list-style-type: none"> - 화상병균 유전체 염기서열 및 <i>Erwinia</i> 속 균주 중 완전 유전체 해독 서열 정보 수집 - <i>Erwinia</i> 균주들 사이의 유전체 서열 유사도 비교를 통해 화상병균 균주간의 높은 유사도와 <i>Erwinia</i> 속간의 유사도 확인 - <i>Erwinia</i> 균주들 사이의 유전체 synteny 분석 및 구조적 차이 비교

		100%	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Erwinia</i> 속의 상동성 유전자(orthologous gene) 분석을 통한 유전자 구성 비교 및 화상병균 특이적 유전자 서열 탐색 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Erwinia</i> 균주들의 상동성 유전자군 분석 - 상동성 유전자군 분석 결과로부터 도출한 코어유전자 세트(core gene set)를 이용하여 유전체 분석 균주들 사이의 계통유전체학적 유연관계 파악
2차 년도 (2017)	○ 2017년 발병 화상병균의 유전체 해독	100%	<ul style="list-style-type: none"> • 2016, 2017년 발병 화상병균의 유전체 서열을 해독 및 완전 유전체 서열 결정 후, 유전자 주석화 수행 	<ul style="list-style-type: none"> - 2016, 2017년도에 농림축산검역본부에서 분리한 국내 <i>E. amylovora</i> 균주 10종(2016년 분리한 5 균주, 2017년 분리한 5균주)의 염기서열 해독 후, 각 균주의 chromosome과 plasmid의 염기서열 결정 - 참조유전체 정보를 이용하여 유전자 예측 및 주석화를 수행하여 신규 해독한 국내 화상병균 유전자 정보 생산
	○ 2015년, 2016년 및 2017년 발병 화상병균 유전체 비교 분석	100%	<ul style="list-style-type: none"> • 2015년 및 2016년 분리 화상병균의 유전체와 2017년 화상병균의 유전체를 비교하여 연차별로 유전자 구성 및 서열상의 차이 분석함. 또한 분리 지역 및 과수에 따른 유전체 서열간의 차이를 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 전 유전체 염기서열의 정렬(whole genome alignment)을 통해 연차별로 국내에서 발생한 화상병균의 유전체 비교 분석을 수행하여 국내 균주 유전체 염기서열간의 매우 높은 유사도를 확인 - 단일염기다형성(SNP) 및 짧은 길이의 삽입 또는 삭제된 InDel 서열들을 확인
			<ul style="list-style-type: none"> • 국내 분리 화상병균과 국외 분리 균주간의 유전체 비교를 통해 국내 분리 화상병균 특이적인 유전자 및 서열 발굴 	<ul style="list-style-type: none"> - 국외에서 분리되어 완전 유전체 서열이 공개되어 있는 미국 분리 균주 <i>E. amylovora</i> ATCC 49946과 유럽 분리 균주 CFBP 1430를 비롯하여 초안 유전체 서열로 공개되어 있는 타 <i>E. amylovora</i> 균주와의 서열 비교시, 국외 및 국내 균주 사이의 서열간 유사도

				<p>확인</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1차년도에 수집하였던 <i>Erwinia</i> 종(genus)에 속하는 유전체 및 유전자 정보들을 가지고 분석 조건을 달리하여 상동성 유전자 분석을 수행하고, 유전자 및 특이적 유전자 서열 분석을 수행
	<p>○ 2016, 2017년 발병 화상병균 유전체 해독 및 바이오마커 후보 유전자 발굴</p>	100%	<ul style="list-style-type: none"> • 발굴한 국내 분리 화상병균 특이 유전자들 중 화상병균 탐지를 위한 바이오마커 후보를 선별 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>E. amylovora</i>, <i>E. pyrifoliae</i> 외에 <i>Erwinia</i> 종(sepcies)에 속하는 여러 속(genus)의 전 유전체 다중정렬(multiple alignment)로부터 SNP 분석 - <i>Erwinia</i>에 속하는 균주들에 공통적으로 존재하는 상동성 유전자들 사이에서 SNP를 가지는 유전자들을 중심으로 분석을 수행하여 PNA probe로 사용가능한 9개의 바이오마커 후보 선별
	<p>○ 2018년 발병 화상병균의 유전체 해독</p>	100%	<ul style="list-style-type: none"> • 2018년도 국내 화상병균 20 균주의 완전 유전체 해독, 서열 결정 및 주석화 수행 • 추가 72개 균주의 whole-genome shotgun sequencing을 통한 short read 생산 	<ul style="list-style-type: none"> • 전 유전체 염기서열 alignment를 통한 국내 화상병균의 SNP변이 분석 완료
3차년도 (2018)	<p>○ 2015년, 2016년, 2017년 및 2018년 발병 화상병균 유전체 비교 분석</p>	100%	<ul style="list-style-type: none"> • 연차별 발생한 화상병균의 whole genome alignment 및 상동성 유전자군 분석을 통한 비교 유전체학적 분석 • whole-genome shotgun resequencing으로부터 나온 해독 서열의 참조유전체 서열에 대한 mapping 분석 	<ul style="list-style-type: none"> • 신규 해독 유전체로부터 이전 연도에 수집한 상동성 유전자군 분석 • 상동성 유전자군 정보를 기반으로 한 계통유전체학적 분석 • 전 유전체 염기서열의 정렬 (whole genome alignment) 및 국내 화상병균 추가 변이 서열 분석 • 대용량 유전체 서열 정보를 활용한 국내 화상병균 집단 구조 분석 및 계통유전체학적 분석

<p>○ 2018년 발병 화상병균 유전체를 이용하여 발굴한 바이오마커 유전자의 검증 및 안정성 확인</p>	<p>100%</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 하나의 PCR 산물 내 두개의 probe를 활용하여 <i>E. amylovora</i> 와 <i>E. pyrifoliae</i> 구별 및 국내외 <i>E. amylovora</i>를 판별할 수 있는 유전자 서열 부위 선별 • 발굴된 바이오마커 염기서열 부위에 대해 신규 완전 해독 유전체의 해당 유전자 서열을 추출, alignment하여 변이 여부 확인 	<ul style="list-style-type: none"> • 전년도에 발굴한 화상병균 진단 마커 부위를 포함하여 총 10개의 유전자로부터 바이오마커 후보 서열 발굴 • 발굴된 마커 유전자의 변이 여부를 확인함으로써 안정성 확인 • 과수화상병균 진단을 위한 바이오마커 kit의 제품화 및 안정적이고 표준화된 진단 시약 제공 준비 완료
<p>○ 화상병균 시료 수집 및 화상병균 정밀진단 kit를 활용한 현장 적용 시험</p>	<p>100%</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 2017년도에 과수화상병 발생이 확인된 사과·배나무 등 과원 16개소에서 진단 키트의 현장 검증 시험 • 2018년도에 과수화상병 발생이 확인된 45개 사과·배나무 등 과수원에서 진단 키트의 현장 검증 시험 	<ul style="list-style-type: none"> • 2015~2018년 국내 사과·배나무 등 과수원에서 발생된 모든 화상병균의 계통을 수집 • 개발된 진단법의 역학조사 현장 검증 시험 결과 기존의 방법에 비해 우수한 진단효과를 확인 • 국가단위 예찰조사에서 확인이 되지 않았던 잠복·은폐된 화상병균 또는 감염식물의 진단·색출 가능 확인

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

4. 연구결과의 활용 계획 등

- 본 과제는 2016년부터 2018년까지 수집된 과수화상병균의 유전체 정보 확보·분석하였고, 다양한 기주와 다양한 지역에서 분리한 화상병균 분리주들의 유전체 정보를 분석하였음.
- 과수화상병균의 유전체 정보는 연도별 화상병균의 변이 형성 추적과 지역별 화상병균의 genetic structure 등에 대한 분석을 통해 과수화상병균의 국내 확산 경로 분석 같은 역학조사를 위해 많은 정보를 제공할 수 있을 것임.
- 과제를 통해 개발한 과수화상병균 진단 kit는 병징이 보이지 않는 병 초기 시기에서도 높은 검출률을 나타내어 화상병균의 병 확산 조기 방지를 위한 병 초기 스크리닝에 활용 가능성이 매우 높음.
- 2017~2018년도 농림축산검역본부의 역학조사 정책현장에서 검증 및 적용시험을 한 결과, 잠복되어 발현되지 않거나 농민 등에 의해 은폐된 감염 과원을 색출하는데 효과가 높은 것으로 확인되어 2019년 역학조사 및 예찰조사 현장 적용을 할 계획임.
- 2017~2018년 농림축산검역본부의 역학조사 정책현장 적용을 통해 얻어진 결과는 농림축산식품부 장관 현안 업무보고, 과수화상병 예찰방제 대책회의 등 보고자료에 활용되었음.
- 본 연구를 통해 개발된 진단법은 국내 사과·배나무 등 과수에서 발생하는 과수화상병과 과수가지검은마름병을 동시에 구분 진단이 가능하여 국내 예찰조사 현장에 활용도가 매우 높을 것으로 생각됨
- 본 연구를 통해 분석된 국내 발생 화상병균의 유전체 정보를 이용하여 국내 여러 지역에 걸쳐 발생하고 있는 화상병균의 변이형 분석에 활용이 가능하며, 국내 확산경로 분석을 위한 역학조사 정책 현장에 적용 및 활용도가 매우 높아, 본 연구결과 및 정보를 활용한 후속으로 농식품부 기획 연구과제(과제명: 과수화상병균 genome-wide SNP를 활용한 역학조사 시스템 구축)를 설계·제안하여 2018년 12월부터 착수하였음
- 본 과제를 수행하며 확보한 연구내용은 현재 SCI 논문 게재를 위해 논문 작성 중에 있으며 향후 유전체 분석 부분과 진단 마커 부분에 대한 논문으로 각각 발표할 예정임.

붙임. 참고문헌

- Miller, T. D. and Schroth, M. N. (1972) Monitoring the Epiphytic Population of *Erwinia amylovora* on Pear with a Selective Medium. *Phytopathology*, 62, 1175-1182
- Gildemacher P. et al., (2006) Interactions between yeasts, fungicides and apple fruit russetting. *FEMS Yeast Research* 6, 1149-56
- Rezzonico, F., Smits, T. H. & Duffy, B. (2011) Diversity, evolution, and functionality of clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) regions in the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 3819-3829
- McGhee, G. C. & Sundin, G. W. (2012) *Erwinia amylovora* CRISPR elements provide new tools for evaluating strain diversity and for microbial source tracking. *Plos One* **7**, e41706
- Buhlmann, A. et al. (2014) Phylogeography and population structure of the biologically invasive phytopathogen *Erwinia amylovora* inferred using minisatellites. *Environ. Microbiol.* **16**, 2112-2125
- Smits, T. H. et al. (2010) Complete genome sequence of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* CFBP 1430 and comparison to other *Erwinia* spp. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **23**, 384-393
- Sebahia, M. et al. (2010) Complete genome sequence of the plant pathogen *Erwinia amylovora* strain ATCC 49946. *J. Bacteriol.* **192**, 2020-2021
- Smits, T. H. et al. (2014) Whole-genome sequencing of *Erwinia amylovora* strains from Mexico detects single nucleotide polymorphisms in *rpsL* conferring streptomycin resistance and in the *avrRpt2* effector altering host interactions. *Genome Announc.* **2**, e01229-01213
- Hannou, N. et al. (2013) Deep sequencing revealed genome-wide single-nucleotide polymorphism and plasmid content of *Erwinia amylovora* strains isolated in Middle Atlas, Morocco. *Res. Microbiol.* **164**, 815-820
- Mann, R. A. et al. (2013) Comparative genomics of 12 strains of *Erwinia amylovora* Identifies a pan-genome with a large conserved core. *Plos One* **8**
- Jock S, Geider k. (2004) Molecular differentiation of *Erwinia amylovora* strains from North America and of two Asian pear pathogens by analyses of PFGE patterns and *hrpN* genes. *Environ Microbiol*, **6** (2004), pp. 480-490
- Powney R, Beer SV, Plummer K, Luck J, Rodoni B (2011) The specificity of PCR-based protocols for detection of *Erwinia amylovora*. *Australas Plant Pathol* **40**:87-97
- Wensing A, Gernold M, Geider K. (2011) Detection of *Erwinia* species from the apple and pear flora by mass spectroscopy of whole cells and with novel PCR primers. *J Appl Microbiol* **112**:147-158

– Mohammadi M, Moltmann E, Zeller W, Geider K. (2009) Characterisation of naturally occurring *Erwinia amylovora* strains lacking the common plasmid pEA29 and their detection with real-time PCR. J Plant Pathol 124:293–302

주 의

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