

315003  
-05

시설원에 특화를 위한 사과무병종묘 산업화 기반 구축

2020

농림축산식품부  
농림식품기술기획평가원

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( O ), 비공개( )발간등록번호( O )  
농생명산업기술개발사업 2020년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003287-01

# 시설원에 특화를 위한 사과무병종묘 산업화 기반 구축

2020.10.30.

주관연구기관 / 충북대학교  
협동연구기관 / 총림과수묘목영농조합법인  
충북농업기술원

농림축산식품부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “시설원에 특화를 위한 사과무병종묘 산업화기반 구축”(개발기간 : 2015. 07. ~ 2020. 06.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 10. 30.

주관연구기관명 : 충북대학교 산학협력단	이 영 성
협동연구기관명 : 충림과수묘목영농조합법인	임 상 철
협동연구기관명 : 충북농업기술원	송 용 섭



주관연구책임자 : 김 대 일  
협동연구책임자 : 임 상 철, 이 성 균

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....	1
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	27
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	206
4. 연구결과의 활용 계획 등 .....	217
붙임. 참고문헌 .....	219

<별첨 1> 연구개발보고서 초록

<별첨 2> 주관연구기관의 자체평가의견서

<별첨 3> 연구성과 활용계획서

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발 목적

### 가. 연구개발 목표

- 사과무병종묘 시설원에 생산시스템 구축
- 각 분야 전문교수진과 지방자치단체 등 전문연구기관 및 관련 산업체로 구성된 산, 학, 연 융합체계 구축
- 사과무병종묘 기본식물 육성을 통한 대량생산 및 보급 기반확립
- 사과무병종묘 육성 기술 패키지화 및 실증적인 모델 개발
- 지역 농가에 시설원에 이용 종묘 육성 패키지 기술 이전
- 사과무병종묘 대목 대량 생산 및 산업화를 위한 패키지 기술 개발
- 상업적 원예용 시설하우스 및 식물공장 활성화 기반 마련
- 시설원에 활용 사과무병종묘 생산시스템에서 주요 바이러스 고효율검정법 확립
- 사과무병종묘에 발생하는 주요 사과 바이러스 감염 현황 파악
- 검출법에 따른 주요 바이러스 검출 감도 및 속도 비교
- 주요 바이러스별 최적 검출법 확립
- 분자표지를 이용한 사과무병종묘 변이 검정과 품종 동정 : 사과 품종 특이적 분자표지 이용 발생변이체 도태와 품종 동정체계 확립
- 시설재배용 사과무병종묘 포트재배법을 이용한 안정적 증식 및 육묘
- 사과무병종묘 접목번식 및 저장법 개발과 유통 체계 모델화
- 사과무병종묘 특성조사 및 시범포 운영을 통한 현장실증
- 사과무병종묘의 실증 재배를 통한 무병 원원종 전진기지 구축

### 나. 연구내용

구분	목표
1단계	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 사과 우량 왜성대목 및 우수형질 품종 확보</li> <li>○ 변이 및 바이러스 검증을 통한 조직배양 무병주 후보군 선발</li> <li>○ 물리, 화학적 조절을 통한 무병종묘 획득률 증진 기술 개발</li> </ul>
2단계	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 단계별 최적조직배양 시스템 확립과 변이 및 바이러스 검정 시스템 확립</li> </ul>
3단계	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 생물반응기 시스템을 이용한 무병종묘 대량생산 시스템 개발</li> <li>○ 시설원예를 이용한 무병종묘의 생육 안정화 시스템을 구축</li> <li>○ 단계별 생산기술 프로토콜화 및 순화과정 중 변이 및 바이러스를 검정</li> <li>○ 지역산업체로 무병종묘 보급</li> </ul>
4단계	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 사과무병종묘 최적 번식 및 저장 방법 개발</li> <li>○ 사과무병종묘 포트판매 시범화</li> <li>○ 사과포트묘 재배에 따른 생산·유통 과정 중 문제점 개선 및 모델화</li> </ul>



5단계	○ 무독 사과 특성조사 및 현장실증 재배 ○ 사과무병종묘와 보독묘 차이 분석 ○ 재배과원 바이러스 감염 검정
최 중	시설원예를 이용한 사과무병종묘 대량생산체계 및 산업화 구축

다. 연구개발에 따른 기대성과

(1) 기술적 측면

- 충북지역 시설재배 특화 사과무병종묘 생산 기술개발 및 모델화
- 시설 환경 제어 사과무병종묘 발근 촉진 기술 개발
- 시설 수경재배 이용 사과무병우량종묘 생산 체계 확립
- 시설 사과무병종묘 포트재배 기술개발
- 대용량 생물반응기 이용 건전묘 육성법 개발
- 품종별 최적화된 사과무병종묘 육성 배지 개발
- 과수 바이러스 조기진단 기술 개선
- 변이검정 및 품종 동정 기술개발
- 사과 묘목생산 업체와 무병종묘 원종 및 보급종 안정생산 기술 공유

(2) 산업·경제적 측면

- 충북지역 시설원예특화 산업화기반 구축을 통한 지역·농산업 육성
- 새로운 시설원예용 특화작목 창출 통한 충북지역 시설원예 산업 발전 가속화
- 시설 무병종묘 생산 패키지 기술 타 전략 작목 적용 가능
- 지역 재배농가 종묘구입비 절감 및 고품질 과수생산에 기여
- 바이러스 검정시간 단축 및 정밀도 향상으로 사과무병종묘 생산에 기여
- 변이 및 품종 동정 기술개발로 과수묘목시장의 정확한 품종 생산 및 유통에 기여
- 시설재배 사과무병종묘 포트 개발 통한 고정육묘장 이용으로 종묘생산비 절감
- FTA 위기대응 방안으로 고품질 과실 뿐 아니라 묘목 수출 기틀 마련

## 1-2. 연구개발의 필요성

가. 국내 연구 동향

(1) 사과 바이러스와 무병종묘 생산

- 사과의 바이러스는 생육과 생산량, 품질 등에 크게 영향을 미쳐 국내에서도 농식품 지원으로 농협연합회에서 중앙과수묘목관리센터를 설립하고 무병종묘 보급에 힘쓰고 있어 농가의 무병종묘 보급 요구가 급증하고 있음.
- 대규모 무병종묘 번식체계가 확립되지 않아 대목의 경우 네덜란드에서 무병종묘를 수입하여 취목번식하고 있으며, 일부 접수 품종의 무병종묘가 확보되어 있으나 생산량이 부족하여 묘목산업으로부터의 요청에 크게 미치지 못하는 실정임.
- 식물체가 바이러스에 감염되면 품질과 수량이 30~50% 이상 떨어지게 되나, 직접적인 치료방법이 없기 때문에 정단분열조직(생장점) 배양을 통한 무병종묘를 육성, 이용하는

것이 가장 효과적인 방법임.

- 사과는 1990~2000년대 ACLSV와 ApMV 등의 바이러스 무독화를 위한 다양한 처리방법들이 대학과 농촌진흥청을 중심으로 시험연구 된 바 있고, 최근까지 농협과 민간기업 등에서 사과 왜성대목 생산을 시도하고 있으나 아직까지 기술적 한계로 인해 대량생산 체계는 갖추지 못한 실정임.
- 접목재배를 하는 사과의 특성상 지역에 따라 바이러스 이외에 접목을 통하여 전염되는 파이토플라스마가 문제를 일으키는 경우도 있음.
- 사과 바이러스를 검출하기 위하여 지표식물검정법은 물론, 근래에는 혈청학적 진단법의 일종인 면역효소항체법(ELISA)과 중합효소연쇄반응법(PCR)을 사용하고 있으나, 기주의 품종과 바이러스의 종류 등에 따라 검출감도 등 반응이 다르므로 맞춤형 검출법의 필요성이 높음.
- 특히 국립원예특작과학원의 경우 2~3년 전에 multiplex PCR을 이용하여 ASPV 등 4종의 주요 사과 바이러스를 한꺼번에 진단할 수 있는 유전자다중진단기술을 개발하여 기술이전을 하고 일선 농업기술센터에 보급한 바 있음.
- 국내 사과과원의 바이러스 감염률은 예상보다 훨씬 높아서, 실제로 국립농업과학원에서 2008년도에 영주, 안동, 예산, 대구 등 전국의 13개 주요 사과재배단지로부터 사과 열매와 꽃을 수집하여 ApMV(apple mosaic virus), ACLSV(apple chlorotic leaf spot virus), ASPV(apple stem pitting virus), ASGV(apple stem grooving virus), ASSVd(apple scar skin viroid) 등 주요 바이러스를 검정한 결과, 모든 지역에서, 그리고 검정한 모든 사과 열매에서 바이러스가 검출되었으며, 특히 한 가지 바이러스만 검출된 열매는 전체의 8%에 불과한 반면 나머지 92%는 이들 중 두 종 또는 세 종의 바이러스에 복합감염되었음.
- ApMV 또는 ASSVd에 감염된 것은 하나도 없었으나, 나머지 세 종에 복합감염된 것은 전체의 약 절반가량(48%)이나 되었으며, 꽃에서는 약간 다른 양상을 보였는데, 모든 지역에서 바이러스가 검출되기는 하였지만, 검정 시료의 40%에서는 바이러스가 검출되지 않았고, ASGV에 단독감염된 것이 16%, ASPV에 단독감염된 것이 2%였다. 27%는 ASGV와 ASPV에 복합감염되었으며, 15%는 ASGV, ASPV, ACLSV에 복합감염된 것으로 나타났음.
- 즉, 사과 바이러스는 우리나라 전역에 퍼져 이미 대부분의 사과나무가 바이러스에 감염되어 있으며, 특히 대부분의 나무가 두 가지 이상의 바이러스에 복합감염되어 있다고 할 수 있음.
- 또한, 검정 조직의 종류에 따라서 검출률에 뚜렷한 차이를 보이고 있으므로, 바이러스 검정 시 조직의 종류를 잘 선택하여야 하며, 조직에 따라 다른 검정 방법을 적용해야 할 가능성도 배제할 수 없음.
- 또 다른 과수묘목산업의 큰 문제점 중 하나는 영년생 과수의 특성상 2~3년이 지나야 과실의 확인이 가능하므로 정확한 품종의 확인을 위해서는 상당한 시간이 소요되며 과수묘목업자의 도덕성과 맞물려 현재 농가에서 구매 당시 품종과 다른 품종으로 확인되어 받는 피해가 상당한 실정임.
- 하지만 이를 조기에 판단할 수 있는 분자표지를 이용한 변이의 검정과 품종의 동정을 위한 연구가 전혀 이루어지지 않고 있으며 품종 특이적 분자표지를 이용하여 변이발생 체계의 도태와 품종의 동정체계 확립이 반드시 필요함.

## (2) 시설원예 육묘 산업

- 전국의 공정 육묘장 면적은 1997년 20ha였지만, 그 이후 급격히 성장하여 2010년도에는 159ha에 이릅니다.
- 현재 육묘 생산 품목은 벼, 엽채류, 과채류가 대부분을 차지하고 있으며, 벼와 엽채류는 실생묘를 대부분의 과채류는 접목묘를 일부 생산하고 있음.
- 육묘 생산 기술 부분은 접수와 대목 선택기술, 발아율 향상 기술, 접목 활착률 제고 기술이 선진국보다 우수한 반면, 환경조절이나 병해충 관리 기술은 상대적으로 떨어짐.
- 아직까지 체계적인 과수우량묘목 생산을 위한 시설 내 공정 육묘 관리 체계의 구축이나 산업화는 전무한 상태임.

## (3) 과수 묘목의 발근 및 순화

- 작물 발근에 관련된 연구는 대부분 화훼 작물에 초점이 맞춰져 있으며 기내 조직배양에서의 배지 성장조절제 처리에 따른 효과를 보는 연구가 주를 이루고 있음.
- 기내 배양 사과 대목을 기외 삽목했을 때 발근과 순화에 미치는 배양조건 및 성장 조절 물질의 효과를 본 연구가 2004년에 있었지만 그 내용이 매우 제한적이며, 실용화되고 있지 못함.
- 시설 내 과수 종묘 생산을 위한 연구는 몇 가지 과수품목(무화과, 블루베리 등)에서 산발적으로 이루어졌는데, 주목적은 삽수의 발근 촉진이었으며, 이를 위해 성장조절제 처리 및 발근 촉진제와 삽상의 온도를 조절하였으며, 그 이외의 환경을 조절하여 발근 촉진을 유도한 연구는 제한적이기 때문에, 이와 관련된 연구 수행과 기술개발이 필요한 실정임.

## (4) 기지현상

- 기지현상은 이전에 같은 종 또는 근연종을 재배한 포장에 다시 재배할 경우 발생하는 수체의 불량한 생장을 뜻하고, 특히 사과, 복숭아, 배나무 등과 같은 장미과 과수에서 많이 발생하며, 주로 나무를 굴취하는 과정에서 뿌리가 절단되며 발생하는 hydrogen cyanide(HCN)가 주원인으로 알려져 있으며, 이외에도 토양 선충, 곰팡이, 박테리아 등에 의해 발생하는 것으로 알려져 있음(Vetter, 2000; Rumberger 등, 2007).
- 영년생 과수묘목은 2~3년간 번식/육묘하여 종묘가 보급되고 있으나 이러한 기지현상에 의해 연작이 어려우며, 이러한 연작장해를 회피하기 위해 대부분의 묘목업자들은 육묘장을 매년 이동하고 있으며, 같은 육묘장에 다시 재배할 경우 methyl bromide(MB)와 같은 훈증제를 이용하고 있으나 토양 지력의 손실 및 토양 환경에 큰 피해를 초래함(Brown과 Koutoulis, 2008; Wilson 등, 2004).
- 또한 산업화 및 도시화로 이동해야 할 대규모 육묘장 확보가 매우 어려워 묘목산업이 규모화되지 못하고 영세함.
- 기지현상 및 산업화, 도시화로 인한 육묘장 확보의 어려움으로 포트재배가 절실히 필요한 실정이나 포트 개발 및 사과묘 규격화를 위한 어떤 연구도 현재 진행되고 있지 않음.

## 나. 국외 연구 동향

### (1) 사과 바이러스와 무병종묘 생산

- 국제원예학회 자료에 따르면 넓게 잡아 총 25종의 바이러스가 각종 사과 품종을 감염하고 있는 것으로 알려져 있으나, 이들 중 현재 사과재배에서 문제가 되고 있는 바이러스는 국내외를 막론하고 Apple Chlorotic Leaf Spot Virus(ACLSV), Apple Stem Pitting Virus(ASPV), Apple Stem Grooving Virus(ASGV), Apple Mosaic Virus(ApMV) 등 네 종임.
- 1952년 Morel과 Martin이 성공적으로 바이러스에 감염된 다알리아의 정단분열조직을 배양한 이래 영양번식 작물의 성장점배양은 무병묘 생산의 주요한 방법이 되고 있음.
- 국외에서 1990년대부터 현재까지 바이러스 무병종묘 생산연구에 대한 학술논문은 1991~1995년 28편, 1996~2000년 34편, 2001~2005년 55편, 2006~2010년 59편으로 점차 증가하고 있어 전 세계적으로 바이러스 진단과 제거 및 성장점 배양을 통한 무병종묘 생산의 중요성이 증가되고 있음.
- 중국의 국립 바이러스무병종묘육성 현지내보존센터에서는 대대적인 현지조사를 통해 80~100%의 재배되고 있는 배와 사과가 ASGV와 ACLSV 등에 감염되어 있음을 확인하고 바이러스 무병종묘를 육성하기 위해 성장점 배양 등 다양한 연구를 시도하고 있음.
- 캐나다 ‘Centre for Plant Health, Canadian Food Inspection Agency’에서는 재배하고 있는 사과 무병종묘 인증프로그램 통해 사과에서 가장 문제가 되고 있는 ASGV-free묘를 생산 및 보급하고 있고, 폴란드 또한 화훼 및 과수생산연구소에서 활발하게 바이러스 무병종묘 육성연구를 실시하고 있음.
- 현재 네덜란드 등 농업선진국을 중심으로 사과의 바이러스 검정에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 국내 연구기관들도 사과, 포도 등 과수의 바이러스를 검출, 진단할 수 있는 방법을 개발하고 있음.
- ‘Golden Delicious’ 사과 유전체의 91.3%에 해당하는 총 contig 603.9Mb가 해독되었고 이로써, 사과 유전체의 크기는 약 742.3Mb로 정확히 추정됨.
- HiDRAS(High-quality Disease Resistant Apples for a Sustainable Agriculture) 프로젝트는 사과유전자원의 수집/분석, 분자유종기술의 동반발전, 사과 흑성병 저항성 유전자의 발굴 및 SSR 마커를 분석을 통한 약 160여개의 유전자지도를 완성하여 HiDRAS reference map을 DB화 함.
- RosBREED : Enabling marker-assisted breeding in Rosaceae 프로젝트는 미국 USDA fund로 지원되며 2010년부터 그간의 유전체 연구를 바탕으로 장미과 과수(사과, 복숭아, 체리, 딸기)를 중심으로 마커를 이용한 품종 연구를 수행중임.
- Microsatellite 마커를 이용한 유연관계 분석 및 homonymy와 synonymy 구별
  - 200개의 사과 샘플 중 60개의 synonyms와 32개의 homonyms 동정 및 불분명한 사과 품종을 구분함(Froni 등, 2012).
- SSR 마커를 이용한 실용적인 사과 품종 동정 방법 및 어버이와의 양친 분석
  - 15개의 SSR 마커셋을 이용하여 95개 사과 품종 중 65개 품종의 양친관계 분석을 수행함(Moriya 등, 2012).
- 유전자원 관리와 품종 동정 적용을 위한 네덜란드 사과 유전자원의 microsatellite genotyping(→ 네덜란드 사과 유전자원의 관리와 품종 동정을 위한 microsatellite

genotyping)

- 16개의 microsatellite 마커를 이용하여 659개 사과 유전자원의 genotyping을 하였으며, 중복된 품종을 제외한 475개의 다른 유전자형을 구분함(van Treuren 등, 2010).

## (2) 시설원예 육묘 산업

- 일본의 경우 육묘 생산 품목은 과채류 접목묘, 과채류와 엽채류의 자근묘, 화훼류의 묘, 벼의 묘 등 다양하며 묘의 품질과 가격이 적절하기 때문에 농업 경영인 및 농업 법인에 의한 수요 증가로 육묘 산업의 규모가 큼.
- 선진국에서는 1980년대부터 UV-B 조사가 온실에서 자란 소나무묘목의 생육, 광합성 그리고 색소에 미치는 영향을 조사하는 등 육묘에 환경조절 처리를 하여 생육을 증대시키는 연구가 진행되어 옴.
- 온실에서 자란 사과 묘목에 구리와 peat(피트)를 공급해주었을 때 사과 묘목의 줄기와 잎의 원소 함량을 측정한 연구가 2000년도에 이루어 졌으며, 유칼립투스 묘목 생산을 위해 온실에서 적절한 환경 조절에 관한 연구도 2011년도에 이루어 짐.
- 현재 육묘 생산은 하우스를 이용하는 경우가 대부분이지만 폐쇄형 육묘 시스템을 이용하여 스트레스 저항성을 증대시키기 위한 연구도 일부 진행 중에 있음.
- 사과 묘목산업은 과수산업의 핵심 고부가 산업으로 네덜란드의 경우 과실생산면적은 미미하나 유럽 사과묘목의 70%를 공급하여 과실생산보다 높은 수익을 얻고 있음.
- 미국 캘리포니아주의 Sierra Gold Nurseries의 경우 복숭아 묘목의 포트재배와 시설재배를 이용하여 재배·판매하고 있으며 포트재배를 통해 묘목의 균일화와 안정적 생산을 통해 높은 수익을 올리고 있음.
- 오스트레일리아의 Australian Nurserymen's Fruit Improvement Company의 경우 모든 과수를 망사를 친 공간에서 포트재배를 통해 토양병원균이 없는 과수(아보카도, 시트러스, 사과, 핵과류 등) 재배법을 개발하고 있음.

## (3) 과수 묘목의 발근 및 순화

- 시설 내에서 과수 재배에 관한 연구는 열대 또는 아열대 작물 재배가 주를 이루고 있으며 종묘생산을 위한 시설원예 연구는 거의 전무함.
- 일본 국립과수연구소에서는 2000년부터 3년간 아열대과수 망고에 대하여 하우스 시설재배에 적합한 품종 선발연구를 수행하여 시설내의 최저 온도는 5℃로 설정하였으며, 여러 측면의 평가를 통해 최종적으로 7개 품종에 대해 일본에서 시설재배에 적합한 품종으로 선발하였으며, 이러한 품종들은 경제적 재배가치가 있다고 판단함.
- 기내 배양 과수 묘목의 발근 촉진과 순화에 관련된 연구는 유럽과 미국을 중심으로 1970년대 초반부터 수행되었으며, 기내에서 미세 증식된 절편체에 다양한 생장조절제 처리를 한 다음 온실로 옮긴 뒤 생장조절제가 과수의 생육 및 발근에 미치는 영향을 보았음.
- 특히 미국에서는 이미 1990년대 기내 배양된 다양한 품종의 사과묘목 발근과 순화에 대한 프로토콜이 정립되었음.
- 화학적인 처리와 환경 조절 처리로 삼수의 발근을 증가시키는 연구는 소나무와 같은 산

림 작물에서 이루어졌지만 과수에서는 연구가 매우 미흡함.

#### 다. 연구개발의 필요성

- 사과(*Malus domestica*)는 주요 과수원예작물 중 하나로 전체 과실생산액의 20.6%를 차지하고 있으며, 최근 사과 가격의 호조, 신규 과원 조성시 지자체의 지원 등으로 재배면적이 증가하고 있음.
- 이와 더불어 우량 사과묘목의 필요성 또한 증대되고 있으며 사과묘목의 생산은 농업분야의 고부가가치 산업으로 인식되고 있음.
- 하지만 사과를 포함한 영년생 과수묘목은 2~3년간 번식/육묘하여 종묘가 보급되고 있으나 기지현상에 의해 연작이 어렵고, 이러한 연작장해를 회피하기 위해 대부분의 묘목업자들은 육묘장을 매년 이동하고 있으며, 같은 육묘장에 다시 재배할 경우 methyl bromide(MB)와 같은 훈증제를 이용하고 있으나 토양 지력의 손실 및 토양 환경에 큰 위해를 초래함.
- 또한 산업화 및 도시화로 이동해야 할 대규모 육묘장 확보가 매우 어려워 묘목산업이 규모화 되지 못하고 영세한 실정이며 이를 극복하기 위해 시설재배를 통한 정착식 과수묘목 생산시스템의 개발이 절실함.
- 따라서 본 연구를 통한 시설내 우량 사과묘목의 재배를 위한 바이러스 무병종묘의 생산, 시설내 순화를 위한 환경조절, 시설재배용 용기 개발, 최적 번식 및 유통 체계 모델화, 무독사과 현장실증 등을 통한 사과우량무병종묘 생산 기술의 패키지화 및 산업화 기반 구축이 필요함.

### 1-3. 연구개발 범위

#### 가. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

구 분	목 표
1년차 (2015)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 사과 대목 성장점배양 통한 무병종묘 유도체계 확립</li> <li>○ 대목용 소식물체 재배조건 확립 및 재배시스템 선정</li> <li>○ 우리나라 사과 바이러스 유전자원 조사</li> <li>○ 사과 유래 분자마커 선별 및 시설재배용 포트규격 최적화</li> <li>○ 산업현장의 문제점 도출과 개발 기술의 적용</li> <li>○ 사과 바이러스 감염 실태 및 바이러스 접종</li> </ul>
2년차 (2016)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 무병종묘 획득률 증진 기술 개발</li> <li>○ 순화 및 발근 촉진 지하부 환경 제어 기술 개발</li> <li>○ 품종동정 위한 분자마커 개발 및 지하부 최적 배지 환경 개발</li> <li>○ 바이러스 검출법 평가</li> <li>○ 사과무병종묘 최적 번식 방법 개발</li> <li>○ 사과 바이러스 무병묘의 유목기 수체 생육 특성 검정</li> </ul>

3년차 (2017)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 배양단계 및 품종별 배양조건 최적화 및 시스템화</li> <li>○ 순화 및 생장 촉진 지상부 환경 제어 기술 개발</li> <li>○ 품종 특이적 분자마커 개발 및 지하부 최적 배지 환경 개발</li> <li>○ 주요 사과 바이러스 및 묘목생산단계별 최적 검출법 선정</li> <li>○ 사과무병종묘 저장조건 개발</li> <li>○ 사과 바이러스 무병묘의 유목기 수체 생육 특성 검정</li> </ul>
4년차 (2018)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 생물반응기 시스템 이용한 무병종묘 대량생산 시스템 개발</li> <li>○ 기내배양 사과 접목묘 생산을 위한 환경제어 기술 개발</li> <li>○ 변이검정용 고효율 마커 개발 및 지상부 온도, 광환경 구명</li> <li>○ 주요 사과 바이러스 최적 검출법 효율화 연구</li> <li>○ 사과무병종묘 유통체계 개발</li> <li>○ 사과 바이러스 무병묘의 성과기 수체 생육 특성 검정</li> </ul>
5년차 (2019)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 사과무병 기본식물 생산</li> <li>○ 안정적 묘 생산 대규모 하드웨어 구축 및 패키지 기술 개발</li> <li>○ 품종동정 시스템 구축 및 지상부 온도, 광환경 구명</li> <li>○ 주요 사과 바이러스에 대한 고감도 검출법 확립</li> <li>○ 고효율 사과무병종묘 생산 모델화</li> <li>○ 사과 바이러스 무병묘의 성과기 수체 생육 특성 검정</li> </ul>
<b>최 종</b>	시설원예를 이용한 사과무병종묘 대량생산체계 및 산업화 구축

나. 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용

(1) 제1세부과제 : 사과무병종묘 변이검정용 마커 개발 및 시설내 안정증식 육묘법 개발

(가) 사과무병종묘 변이검정용 마커 개발

- 1년차 : 사과 다형성 마커 탐색
  - 기존 문헌을 통해 사과 품종 판별에 사용된 마커 탐색
  - 사과 유전자 지도 기반 염색체별 마커 선발
  - 각 마커들의 사과에서 다형성 평가 수행
  
- 2년차 : 국내 사과 품종 동정을 위한 분자마커 탐색 및 선발
  - 사과 품종 동정을 위한 분자마커 탐색
  - 국내 주요 사과 품종 동정을 위한 분자마커 선발
  
- 3년차 : 국내 사과 품종 특이적 분자마커 선발/적용 및 genotyping 데이터 구축
  - 국내 사과 품종 특이적 분자마커 선발 및 적용
  - 마커 genotyping 데이터 구축
  
- 4년차 : 분자마커를 사용한 육묘 변이 검정
  - 국내 사과 품종 특이적 마커 적용
  - 마커 genotyping 데이터 구축
  - 조직배양묘의 변이 확인을 위해 마커를 이용한 변이 검정 수행

- 5년차 : 육묘 단계별 변이 확인을 위한 품종 동정 시스템 구축
  - 마커 genotyping 데이터를 이용한 품종 동정 시스템 구축
  - 육묘 각 단계별 변이 확인을 위한 분자마커 검정 수행

**(나) 환경조절시설을 이용한 안정증식육묘법 개발**

- 1년차 : 조직배양하여 순화/발근된 사과무병대목(M.9/M.26) 재배를 위한 포트 종류/용적 선정
  - 사과무병대목 재배에 최적화 된 포트의 종류 선정
  - 포트에 따른 사과 무병대목의 수체생육 비교/분석
- 2년차 : 접목을 실시하여 사과묘목을 재배하기 위한 포트의 용적 선정
  - 망포트와 일반포트 재배시 사과무병대목의 수체생육 비교/분석
  - 포트 용적에 따른 사과묘목의 수체 생육 비교/분석
- 3년차 : 포트 배지환경 조성에 따른 사과 무병종묘의 최적생육환경 개발
  - 포트 내 배지 조건에 따른 사과 무병대목의 수체 생육 비교/분석
  - 사과대목/묘목 배지 환경 연구
- 4년차 : 지상부 환경 조성에 따른 사과 무병종묘의 최적 생육환경 개발
  - 온도 및 광환경에 따른 사과무병대목의 지상부 생육 비교/분석
  - 사과대목/묘목 지상부 환경 구명
- 5년차 : 사과무병포트종묘의 타당성 확립 및 시설 사과무병종묘 포트재배 기술 개발
  - 기존 사과종묘와 포트종묘의 과실특성 비교/분석

**(2) 제2세부과제 : 사과 왜성대목 및 상업적품종 무병종묘 대량생산 기술 개발**

- 1년차 : 사과 대목 품종별 생장점배양을 통한 효율적 무병종묘 유도체계 확립
  - 우량 왜성대목 및 우수형질의 품종 확보
  - 물리, 화학적 조절을 통한 왜성대목 무병주 유도 기술 개발
- 2년차 : 배양단계별 품종별 증식조건 최적화 및 시스템화
  - 배양단계별 품종별 최적화 배양조건 구명 및 시스템화
  - 기내배양환경 조절을 통한 과수화 발생 억제 조건 구명
- 3년차 : 대용량 생물반응기를 이용한 무병종묘 대량생산 시스템 개발
  - 사과 무병종묘 생산용 생물반응기 시스템 개발
  - Scale-up 대용량 생물반응기 시스템을 이용한 무병종묘 대량생산
  - 접수용 무병종묘 생산 기술개발



- 4년차 : 광독립영양배양을 통한 순화용 무병종묘 육성 기술개발
  - 광독립영양배양을 통한 순화용 무병종묘 및 균일묘 육성기술 개발
  - DNA 함량 분석을 통한 건전묘 조기 스크리닝
  - 무병 왜성대목과 접수를 이용한 micro-grafting 기술개발

- 5년차 : 기내배양을 통한 사과 무병종묘의 대규모 생산과 보급을 위한 기반기술 시스템화
  - 사과 무병종묘 대량배양 시스템 및 기술 프로토콜화 확립
  - 우량 무병종묘의 농가보급 및 관련 지역산업체에 기술보급

**(3) 제3세부과제 : 기내 배양 사과 무병종묘 대량 생산을 위한 환경조절 기술 개발**

- 1년차 : 대목용 기내배양 사과 소식물체를 위한 기본 재배조건 확립 및 재배시스템 선정
  - 기내 배양 사과 대목의 기본 환경 조건 확립
  - 기내 배양 사과 대목의 안정적인 순화 및 발근을 위한 재배 시스템 선정
  
- 2년차 : 대목용 기내배양 사과 소식물체의 순화 및 발근 촉진을 위한 지하부 환경제어 기술 개발
  - 순화 및 발근 촉진을 위한 지하부 물리적 환경조건 구명
  - 순화 및 발근 촉진을 위한 지하부 화학적 처리조건 구명
  
- 3년차 : 대목용 기내배양 사과 소식물체의 순화 및 성장 촉진을 위한 지상부 환경제어 기술 개발
  - 순화 촉진을 위한 지상부 환경조건 구명
  - 성장 촉진을 위한 지상부 환경조건 구명
  
- 4년차 : 기내배양 사과 접목묘 생산을 위한 환경제어 기술 개발
  - 기내 배양 사과 접수의 기외 삼목물 향상을 위한 환경조건 구명
  - 유경 접목을 위한 환경조건 구명
  
- 5년차 : 기내배양 사과 소식물체의 안정적인 묘 생산을 위한 대규모 하드웨어 구축 및 패키지 기술 개발
  - 기내배양 사과 소식물체의 대량 생산을 위한 대규모 시스템 구축
  - 전·후방 기술과의 유기적 연결을 위한 패키지 기술 개발

**(4) 제4세부과제 : 사과무병종묘 바이러스 검정법 확립**

- 1년차 : 우리나라 사과 바이러스 유전자원 및 감염현황 조사
  - 채집 및 유전자은행 등을 통해 사과 바이러스 분리주 확보
  - 국내 유통 사과 묘목의 바이러스 감염 현황 조사

- 2년차 : 바이러스 검출법 평가
  - 주요 사과 바이러스에 대한 각 검출법 효율 탐색
  - 사과 품종에 따른 바이러스 검출감도 변화 연구
  - 사과 무병종묘에 발생하는 주요 사과 바이러스 감염 현황 조사
- 3년차 : 주요 사과 바이러스 및 묘목생산단계별 최적 검출법 선정
  - 검출법에 따른 주요 바이러스 검출 감도 및 속도 비교
  - 기내배양, 발근, 순화, 육묘 등 각 묘목생산단계별 바이러스 검출법 탐색
- 4년차 : 주요 사과 바이러스 최적 검출법 생력화 연구
  - 단기간에 많은 양을 처리할 수 있도록 시스템 개선
  - Multiplex PCR 가능성 검토
- 5년차 : 주요 사과 바이러스별, 묘목 생산단계별 검정기술 프로토콜화
  - 최적 검출법 선별
  - 시설원예 활용 사과무병종묘 생산시스템에서 주요 바이러스 고효율검정법 확립

**(5) 제1협동과제 : 사과무병종묘 최적 번식 및 유통 체계 모델화**

- 1년차 : 산업현장의 문제점 도출과 개발 기술의 적용
  - 과수묘목산업의 현장 애로 발굴 및 해결을 위한 개발 기술의 적용
- 2년차 : 사과무병종묘 최적 번식 방법 개발
  - 사과무병종묘의 접목 방법 및 시기 등 실험을 통한 최적 번식 방법 개발
- 3년차 : 사과무병종묘 저장 조건 개발
  - 저장 중 품질에 미치는 환경조건과 저장가능 기간 구명
- 4년차 : 사과무병종묘 유통 체계 개발
  - 시설재배용 사과무병종묘 포트 재배 후 원활한 유통 체계 마련
- 5년차 : 고효율 사과무병종묘 생산 모델화
  - 사과무병포트묘 대량 생산 및 유통 체계 모델화 확립

**(6) 제2협동과제 : 사과 바이러스 무병묘의 생육 단계별 특성검정**

- 1년차 : 국내 유통 사과나무 대목의 바이러스 감염 실태 조사
  - 사과 왜성 대목(M.9 및 M.26) 및 접수별 생산 및 유통 현황 조사
  - 사과 왜성 대목 및 접수의 바이러스 감염률 조사
  - 사과 바이러스 무병 묘목 식재 및 주요 바이러스 접종

- 2년차 : 사과 바이러스 무병 묘목의 유목기 수체 생육 특성 검정
  - 사과나무 수관 부위별(눈, 결과지, 잎 등) 잠복 감염 바이러스 발현 여부 조사
  - 바이러스 접종 묘목과의 수체 생육량 비교
- 3년차 : 사과 바이러스 무병 묘목의 유목기 수체 생육 특성 검정
  - 사과나무 수관 부위별(눈, 결과지, 잎 등) 잠복 감염 바이러스 발현 여부 조사
  - 바이러스 접종 묘목과의 수체 생육량 비교
- 4년차 : 사과 바이러스 무병 묘목의 성과기 수체 생육 특성 검정
  - 사과나무 수관 부위별(과일, 눈, 결과지, 잎 등) 잠복 감염 바이러스 발현 여부 조사
  - 바이러스 접종 묘목과의 상품성 및 수량성 비교
- 5년차 : 사과 바이러스 무병 묘목의 성과기 수체 생육 특성 검정
  - 사과나무 수관 부위별(과일, 눈, 결과지, 잎 등) 잠복 감염 바이러스 발현 여부 조사
  - 바이러스 접종 묘목과의 상품성 및 수량성 비교

다. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

(1) 제1세부과제 : 사과무병종묘 변이검정용 마커 개발 및 시설내 안정증식 육묘법 개발

① 사과무병종묘 변이검정용 분자마커 개발

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2015	사과 다형성 분자마커 탐색	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 기보고 된 사과 품종 판별에 사용된 마커 선발</li> <li>• 사과 유전자 지도 기반 염색체별 마커 선발</li> <li>• 선발 마커 이용 사과에서 다형성 평가 수행</li> </ul>
2차년도	2016	사과 품종 동정을 위한 분자마커 탐색 및 선발	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 사과 품종 동정을 위한 분자마커 선발</li> <li>• 국내 주요 사과 품종의 품종 동정을 위한 분자마커를 선발</li> <li>• 대목(M.9, M.26), 접수(‘자홍’, ‘홍로’, ‘후지’, ‘감홍’ 등)에 적용하여 다형성 평가 수행</li> </ul>
3차년도	2017	국내 사과 품종 특이적 분자마커 선발/적용 및 genotyping 데이터 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 사과 품종 동정을 위한 분자마커 선발 및 적용</li> <li>• 사과의 품종 특이적 분자마커의 genotyping 데이터 구축</li> </ul>

4차년도	2018	분자마커를 사용한 육묘 변이 검정	<ul style="list-style-type: none"> <li>조직배양묘의 변이 확인을 위해 마커 이용 genotyping 수행 및 변이 판별</li> <li>품종 판별용 최소의 분자마커셋 구성</li> </ul>
5차년도	2019	육묘 단계별 변이 확인을 위한 품종 동정 시스템 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>육묘의 각 단계별 변이 확인을 위한 품종 동정 수행</li> <li>품종 동정 시스템 구축</li> </ul>

② 환경조절시설을 이용한 안정증식 육묘법 개발

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2015	조직배양하여 순화/발근된 사과무병대목(M.9/M.26) 재배를 위한 포트 종류/용적 선정	<ul style="list-style-type: none"> <li>조직배양한 사과 무병대목 재배에 최적화 된 포트의 종류 선정</li> <li>포트에 따른 사과 무병대목의 수체생육 비교/분석</li> </ul>
2차년도	2016	접목을 실시하여 사과묘목을 재배하기 위한 포트의 용적 선정	<ul style="list-style-type: none"> <li>망포트와 일반 포트 재배 시 사과 무병대목의 수체 생육 비교/분석</li> <li>포트 용적에 따른 사과묘목의 수체생육 비교/분석</li> </ul>
3차년도	2017	포트 배지환경 조성에 따른 사과무병대목의 최적생육환경 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>포트 내 배지 조건에 따른 사과무병대목의 수체 생육 비교/분석</li> <li>사과대목/묘목 배지 환경 연구</li> </ul>
4차년도	2018	지상부 환경 조성에 따른 사과무병대목의 최적생육환경 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>온도 및 광환경에 따른 사과무병대목의 지상부 생육 비교/분석</li> <li>사과대목/묘목 지상부 환경 구명</li> </ul>
5차년도	2019	사과무병포트종묘의 타당성 확립 및 시설 사과무병종묘 포트재배기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>기존사과종묘와 포트종묘의 과실특성 비교/분석</li> </ul>

(2) 제2세부과제 : 사과 왜성대목 및 상업적품종 무병종묘 대량생산 기술 개발

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2015	우량 왜성대목 및 우수형질의 품종 확보	<ul style="list-style-type: none"> <li>우량 왜성대목 품종 확보 : M.9, M.26</li> <li>무병주 유도를 위한 초대배양</li> </ul>
		물리, 화학적 조절을 통한 왜성대목 무병주 유도 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>무병화율 증진 기술 개발</li> <li>- 고온처리, ribavirin 등 처리농도 및 시기 구명</li> <li>대량증식을 위한 품종별 무병주 확보</li> </ul>

2차년도	2016	배양단계별 배양조건 최적화	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1단계: Multiple-shoots 유도 조건 구명</li> <li>- 배지조건, PGRs, 광질 등</li> <li>• 2단계: 성장 최적화 - 배지조건, PGRs, 광질 등</li> <li>• 3단계: 기내발근 조건구명 - 오옥신 종류 및 농도 등</li> </ul>
		기내배양환경 조절을 통한 과수화 억제 조건 구명	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 배지 화학적 삼투압 조절</li> <li>- Sorbitol, mannitol, PEG 등</li> <li>• 배양 환경조절</li> <li>- Vessel 내 상대습도 조절, 광도 등</li> </ul>
3차년도	2017	사과 무병종묘 생산용 생물반응기 시스템 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 생물반응기 배양에 적합한 증식 조건 확립</li> <li>- 배지조건, 공기 공급량 조절</li> <li>• 배양 vessel 내 공기공급량, 공급 방식 조절</li> </ul>
		Scale-up 대용량 생물반응기 시스템을 이용한 무병종묘 대량생산	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1~20L 공기부양식 생물반응기를 이용한 효율적 배양체계 구축</li> <li>• 과수화 억제를 통한 건전묘 획득을 증진</li> </ul>
		접수용 품종의 무병주 유도 및 대량증식	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 접수용 품종의 기내증식 조건 확립</li> <li>- 접수용 품종(‘후지’ 등 5품종)</li> </ul>
4차년도	2018	광독립영양배양을 통한 순화용 무병종묘 육성 기술개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 광독립영양배양이 가능한 우량묘 생산</li> <li>- 배지내 당농도, 광도, 용기내 환기횟수</li> <li>• 플러그묘화를 위한 균일묘 생산기술 개발</li> </ul>
		DNA 함량 분석을 통한 건전묘 조기 스크리닝	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Flow cytometric-based nucleic DNA 분석</li> <li>- 증식기간별 건전묘 획득을 조사</li> </ul>
		무병 왜성대목과 접수를 이용한 micro-grafting 기술개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 기내접목용 배양 조건구명</li> <li>- 배지, 당 농도, 최적대목과 접수의 size 등</li> <li>• 배양환경 조절</li> <li>- Vessel 내 상대습도, 광도 등</li> </ul>
5차년도	2019	사과 무병종묘 대량배양 시스템 및 기술 프로토콜화 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 개발한 기내배양 기술의 프로토콜화</li> <li>• 무병묘 생산 경제성 분석</li> </ul>
		우량 무병종묘의 농가보급 및 관련 지역산업체에 기술보급	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 우량 무병종묘 농가보급</li> <li>• 무병주 유도 및 생산 기술 교육과 기술이전</li> </ul>

	우량 무병종묘의 농가보급 및 관련 지역산업체에 기술보급	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 우량 무병종묘 농가보급</li> <li>• 무병주 유도 및 생산 기술 교육과 기술이전</li> </ul>
--	--------------------------------	---

(3) 제3세부과제 : 기내 배양 사과 무병종묘 대량 생산을 위한 환경조절 기술 개발

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2015	기내 배양 사과 대목의 기본 환경 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 대목 소식물체의 기본적인 재배 환경조건 구명               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 순화에 사용되는 기본 환경 정보 조사 : 온도, 습도, 광조건</li> <li>- 사과 대목용 소식물체(M.9, M.26) 전용 양액개발                   <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 기존 몇 가지 양액에서 재배</li> <li>✓ 소식물체의 이온 분석을 통해 각 원소별 비율 및 전체 농도(EC) 규명 후 최종 전용 양액 개발</li> </ul> </li> <li>- 측정항목 : 무기이온 농도, 생장 특성</li> </ul> </li> </ul>
		기내 배양 사과 대목의 안정적인 순화 및 발근을 위한 재배 시스템 선정	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 대목 소식물체의 수경 재배시스템 선정               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 처리 : 배지경, 순수수경 등</li> <li>- 사용 배지 : 압면, 스펀지, 압축상토, 피트모스 + 펠라이트</li> <li>- 순수수경 : DFT, NFT</li> <li>- 측정항목 : 생장 특성</li> </ul> </li> </ul>
2차년도	2016	순화 및 발근 촉진을 위한 지하부 물리적 환경조건 구명	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 대목의 순화 및 발근촉진을 위한 물리적 환경 조절               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 처리 : 배지 수분함수율, 양액의 용존 산소량</li> <li>- 측정항목 : 뿌리 호흡율, 발근율, 근수, 근장, 순화율</li> </ul> </li> </ul>
		순화 및 발근 촉진을 위한 지하부 화학적 처리조건 구명	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 대목의 순화 및 발근촉진을 위한 화학적 처리               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 처리 : 옥신류, 페놀물질, 기타 생장조절제</li> <li>- 측정항목 : 발근율, 근수, 근장, 순화율</li> </ul> </li> </ul>
3차년도	2017	순화 촉진을 위한 지상부 환경조건 구명	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 대목의 순화 촉진을 위한 지상부 환경 조건               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 처리 : 온도(15~25℃), 습도(60~95%)</li> </ul> </li> </ul>

			<ul style="list-style-type: none"> <li>- 측정항목 : 광합성율, 생장특성, 엽록소 형광, 순화율</li> </ul>
		생장 촉진을 위한 지상부 환경 조건 구명	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 대목의 생장 촉진을 위한 지상부 환경 조건</li> <li>- 처리: 광(광도, 광질), 이산화탄소</li> <li>- 측정항목: 광합성율, 생장특성, 엽록소 형광</li> </ul>
4차년도	2018	기내 배양 사과 접수의 기외 삼목물향상을 위한 환경조건 구명	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 기내 배양 사과 접수의 기외 삼목물향상을 위한 환경 조건</li> <li>- 처리 : 1~3차년도 대목의 결과를 토대로 처리조건 결정(물리적 처리조건, 화학적 처리조건)</li> <li>- 측정항목 : 광합성율, 생장특성, 발근율, 근수, 근장</li> </ul>
		유경 접목을 위한 환경조건 구명	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 기내 배양된 사과 대목과 접수의 유경 접목을 위한 환경 조건</li> <li>- 처리 : 1~3차년도 대목의 결과를 토대로 처리조건 결정(온도, 습도)</li> <li>- 측정항목 : 접목율, 생장특성, 광합성율, 엽록소 형광</li> </ul>
5차년도	2019	기내배양 사과 소식물체의 대량생산을 위한 대규모 시스템 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 향후 무병종묘의 대량생산을 위한 기내배양 소식물체의 대규모 하드웨어 구축</li> <li>- 배양실과 순화실이 연동된 생산 시스템 구축</li> <li>- 최종 프로토콜을 적용하여 사과 소식물체의 대량생산</li> <li>• 대량의 기내배양 소식물체를 순화 및 발근시킬 때 발생하는 문제점 발견 및 해결 기술 개발</li> </ul>
		전·후방 기술과의 유기적 연결을 위한 패키지 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 최종 결과와 전·후방 공정의 결과를 토대로 한 특화된 재배 패키지 기술 구축</li> <li>• 인건비 절감 또는 공정효율의 증대 확인</li> </ul>

(4) 제4세부과제 : 사과무병종묘 바이러스 검정법 확립

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2015	채집 및 유전자은행 등을 통해 사과 바이러스 분리주 확보	<ul style="list-style-type: none"> <li>주요 사과 재배지 선정 및 바이러스 검정 시료 채집</li> <li>주요 사과 바이러스 검정 및 분리</li> <li>분리주 유지</li> <li>유전자은행으로부터 미확보 사과 바이러스 유전자원 추가 확보</li> </ul>
		국내 유통 사과 묘목의 바이러스 감염 현황 조사	<ul style="list-style-type: none"> <li>시중에 유통되는 사과 묘목 무작위 구입 또는 묘목생산 업체로부터 분양</li> <li>사과 주요 바이러스 검정</li> </ul>
2차년도	2016	주요 사과 바이러스에 대한 각 검출법 효율 탐색 및 사과 품종에 따른 바이러스 검출감도 변화 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>ELISA와 PCR의 감도 및 경제성 비교</li> <li>사과 품종별 바이러스 접종 및 검출</li> <li>품종별 바이러스에 대한 반응 조사</li> </ul>
		사과 무병대목에 발생하는 주요 사과 바이러스 감염 현황 조사	<ul style="list-style-type: none"> <li>다른 세부과제로부터의 기내배양 또는 생산 무병대목 확보</li> <li>바이러스 검정</li> </ul>
3차년도	2017	검출법에 따른 주요 바이러스 검출 감도 및 속도 비교	<ul style="list-style-type: none"> <li>ELISA와 PCR의 dilution end point 탐색</li> <li>In vivo 검출률 비교</li> <li>단위 시료별 검정 시간 비교</li> </ul>
		기내배양, 발근, 순화, 육묘 등 각 묘목생산단계별 바이러스 검출법 탐색	<ul style="list-style-type: none"> <li>다른 세부과제로부터 발근, 순화 등 각 생산단계의 무병대목 확보</li> <li>위에서 선발한 최적 검출법을 이용한 바이러스의 검정</li> <li>바이러스 검정 최적 단계 선발 및 생육단계별 바이러스 감염률 확인</li> </ul>
4차년도	2018	사과 바이러스 oligonucleotide chip의 특이성 검정	<ul style="list-style-type: none"> <li>사과 바이러스의 진단용 칩 검정 조건 확립</li> <li>사과 바이러스 정밀진단 검정조건 확립 및 응용성 검증</li> </ul>
		Multiplex PCR 방법 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>동시에 사용할 수 있는 primer set 선발</li> <li>적정 PCR 조건 탐색</li> </ul>
5차년도	2019	시설원예 활용 사과무병종묘 생산 시스템에서 주요 바이러스 고효율 검정법 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>최적 생육단계에서 최적 검정법으로 바이러스 검출 확인 및 개선요인 탐색</li> </ul>



		주요 사과 바이러스별, 묘목 생산단계별 검정기술 프로토콜화	<ul style="list-style-type: none"> <li>주요 바이러스별로 검정의 시작부터 결과 해석까지 프로토콜 작성</li> </ul>
--	--	----------------------------------	--

(5) 제1협동과제 : 사과무병종묘 접목번식법 및 저장법 개발과 유통 체계 모델화

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2015	산업현장의 문제점 도출과 개발 기술의 적용	<ul style="list-style-type: none"> <li>과수산업현장의 애로사항 도출</li> <li>문제점 해결을 위한 개발 기술의 적용</li> </ul>
2차년도	2016	사과무병종묘 최적 번식 방법 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>사과무병종묘 번식을 위한 접목 방법 개발</li> <li>최적의 접목 시기 및 장소 개발</li> </ul>
3차년도	2017	사과무병종묘 저장 조건 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>사과무병종묘의 최적 수확 시기 선정</li> <li>저온저장을 위한 저장 조건 및 기간 개발</li> </ul>
4차년도	2018	사과무병종묘 유통 체계 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>사과무병종묘 포장 및 운송 방법 개발</li> </ul>
5차년도	2019	고효율 사과무병종묘 생산 모델화	<ul style="list-style-type: none"> <li>사과무병종묘의 대량생산 실시</li> <li>시설재배 특화 사과무병종묘 생산 체계 모델화</li> </ul>

(6) 제2협동과제 : 사과 바이러스 무병묘의 생육 단계별 특성검정

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2015	사과 왜성 대목(M.9, M.26) 및 접수별 생산 및 유통 현황 조사	<ul style="list-style-type: none"> <li>대목종류 : M.9, M.26</li> <li>접수종류 : ‘홍로’, ‘후지’ 등</li> <li>조사내용 : 구입처, 자가증식 여부, 연간 생산량, 사업기간 등</li> </ul>
		사과 왜성 대목 및 접수의 바이러스 감염률 조사	<ul style="list-style-type: none"> <li>시중 유통 묘목의 바이러스 감염정도 조사</li> <li>조사내용 : 대목, 접수 및 지역별, 바이러스 감염률 차이 등</li> </ul>
		사과 바이러스 무병 묘목 식재 및 주요 바이러스 접종	<ul style="list-style-type: none"> <li>무병 대목 : M.9, M.26</li> <li>무병 접수 : ‘홍로’, ‘후지’</li> <li>주요 사과바이러스 종류별 접종</li> </ul>
2, 3차년도	2016, 2017	사과나무 수관 부위별(눈, 결과지, 잎 등) 잠복 바이러스 발현 여부 조사	<ul style="list-style-type: none"> <li>사과나무 무병 대목에 접목한 묘목의 유목기 수관 부위별 잠복 감염 바이러스 발현 여부 조사</li> </ul>

			<ul style="list-style-type: none"> <li>• 조사내용 : 수관 부위별(눈, 잎 등) 바이러스 검정</li> </ul>
		바이러스 접종 묘목과의 수체 생육량 비교	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 무병 대목에 접목한 묘목과 바이러스 접종한 묘목과의 수체 생육량 비교</li> <li>• 조사내용 : 수관 생육량(잎 크기, 신초 길이 등) 차이 검정</li> </ul>
4, 5차 년도	2018, 2019	사과나무 수관 부위별(과일, 눈, 결과지, 잎 등) 잠복 바이러스 발현 여부 조사	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 사과나무 무병 대목에 접목한 묘목의 성과기 수관 부위별 잠복 감염 바이러스 발현 여부 조사</li> <li>• 조사내용 : 수관 부위별(과일, 눈, 잎, 결과지 등) 바이러스 검정</li> </ul>
		바이러스 접종 묘목과의 상품성 및 수량성 비교	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 무병 대목에 접목한 묘목과 바이러스 접종한 묘목과의 수체 생육량 비교</li> <li>• 조사내용 : 수관 생육량 및 과일 생산량과 상품성 차이를 검정</li> </ul>

라. 평가의 착안점 및 기준

(1) 총괄 목표

구 분	목 표	평가지표
1년차 (2015)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 사과 대목 생장점배양 통한 무병종묘 유도체계 확립</li> <li>○ 대목용 소식물체 재배조건 확립 및 재배시스템 선정</li> <li>○ 우리나라 사과 바이러스 유전자원 조사</li> <li>○ 사과 유래 분자마커 선발 및 시설재배용 포트규격 최적화</li> <li>○ 산업현장의 문제점 도출과 개발 기술의 적용</li> <li>○ 사과 바이러스 감염 실태 및 바이러스 접종</li> </ul>	<p>품종별 우량 무병대목 확보</p> <p>재배조건 및 시스템 선정</p> <p>바이러스 분리 및 감염률 조사</p> <p>마커 선발 및 포트규격 최적화</p> <p>현장애로사항 발굴</p> <p>바이러스 감염 실태 조사 및 접종</p>
2년차 (2016)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 무병종묘 획득률 증진 기술 개발</li> <li>○ 순화 및 발근 촉진 지하부 환경 제어 기술 개발</li> <li>○ 품종동정 위한 분자마커 개발 및 지하부 최적 배지 환경 개발</li> <li>○ 바이러스 검출법 평가</li> </ul>	<p>기내 발근 유도 및 과수화 억제 기술 개발</p> <p>물리적, 화학적 지하부 순화 및 발근 촉진 기술 개발</p> <p>품종 동정 마커 개발 및 지하부 환경 조건 개발</p> <p>검출법 및 검출감도 조사</p>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 사과무병종묘 최적 번식 방법 개발</li> <li>○ 사과 바이러스 무병묘의 유목기 수체 생육 특성 검정</li> </ul>	접목 방법 비교 분석 유목기 바이러스 검정 및 생육 특성 비교
3년차 (2017)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 배양단계 및 품종별 배양조건 최적화 및 시스템화</li> <li>○ 순화 및 생장 촉진 지상부 환경 제어 기술 개발</li> <li>○ 품종 특이적 분자마커 개발 및 지하부 최적 배지 환경 개발</li> <li>○ 주요 사과 바이러스 및 묘목생산단계별 최적 검출법 선정</li> <li>○ 사과무병종묘 저장조건 개발</li> <li>○ 사과 바이러스 무병묘의 유목기 수체 생육 특성 검정</li> </ul>	대용량 생육반응기 배양 조건 개발 지상부 환경 조건 개발 품종 특이적 마커 개발 및 지하부 환경 조건 개발 묘목 생산 단계별 검출법 비교 수확시기 및 저장조건 도출 유목기 바이러스 검정 및 생육 특성 비교
4년차 (2018)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 생육반응기 시스템 이용한 무병종묘 대량생산 시스템 개발</li> <li>○ 기내배양 사과 접목묘 생산을 위한 환경제어 기술 개발</li> <li>○ 변이검정용 고효율 마커 개발 및 지상부 온도, 광환경 구명</li> <li>○ 주요 사과 바이러스 최적 검출법 효율화 연구</li> <li>○ 사과무병종묘 유통체계 개발</li> <li>○ 사과 바이러스 무병묘의 성과기 수체 생육 특성 검정</li> </ul>	배양묘 독립영양화 및 변이 최소화 환경제어 조건 개발 마커셋 구성 및 지상부 환경 조건 개발 바이러스 검출 속도 개선 사과포트묘 포장 및 운송 방법 개발 성과기 바이러스 검정 및 생육 특성 비교
5년차 (2019)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 사과무병 기본식물 생산</li> <li>○ 안정적 묘 생산 대규모 하드웨어 구축 및 패키지 기술 개발</li> <li>○ 품종동정 시스템 구축 및 지상부 온도, 광환경 구명</li> <li>○ 주요 사과 바이러스에 대한 고감도 검출법 확립</li> <li>○ 고효율 사과무병종묘 생산 모델화</li> <li>○ 사과 바이러스 무병묘의 성과기 수체 생육 특성 검정</li> </ul>	무병묘 보급 및 기술이전 대규모 생산 시스템 구축 품종동정시스템 및 포트재배기술 확립 주요 바이러스 검정법 확립 사과무병종묘 생산 모델화 바이러스 무독묘 우수성 입증
최 종	시설원예를 이용한 사과무병종묘 대량생산체계 및 산업화 구축	대량생산 체계 및 산업화 구축 여부

(2) 세부과제별 평가의 착안점 및 기준

(가) 제1세부과제 : 사과무병종묘 변이검정용 마커 개발 및 시설내 안정증식 육묘법

연차별 목표	연구목표		평가지표	검증방법	가중치
1차년도	1-1	사과 다형성 마커 탐색	사과 마커 탐색 및 선발 50개 이상	다형성 평가 수행	40
	1-2	조직배양하여 순화/발근 된 사과무병대목 재배 를 위한 포트 종류/용적 선정	대목용 포트 종류 및 용적 개발 1건	재배에 의한 생육 결과	60
2차년도	2-1	국내 사과 품종 동정을 위한 분자마커 탐색 및 선발	사과 품종 동정용 마커 탐색 및 선발 50개 이상	다형성 평가 수행	40
	2-2	접목을 실시하여 사과 묘목을 재배하기 위한 포트의 용적 선정	무병종묘 포트 종류 및 용적 개발 1건	재배에 의한 생육 결과	60
3차년도	3-1	국내 사과 품종 특이적 분자마커 선발/적용 및 genotyping 데이터 구축	품종 특이적 마커의 genotyping 데이터 구축 1건	분자마커 재현성 확인	40
	3-2	포트 배지환경 조성에 따른 사과무병종묘의 최적생육환경 개발	지하부 최적 환경 조건 개발 1건	재배에 의한 생육 결과	60
4차년도	4-1	분자마커를 사용한 육 묘 변이 검정	품종 판별용 마커셋 구성 1건	분자마커 재현성 확인	40
	4-2	지상부 환경 조성에 따 른 사과무병종묘의 최 적생육환경 개발	지상부 최적 환경 조건 개발 1건	재배에 의한 생육 결과	60
5차년도	5-1	육묘 단계별 변이 확인 을 위한 품종 동정 시 스템 구축	품종 동정 시스템 구축 1건	품종 동정 수행	40
	5-2	사과무병종묘의 타당성 확립 및 시설 사과무병종 묘 포트재배 기술 개발	과실 특성 차이 분석 1건	재배에 의한 생육 결과	60

(나) 제2세부과제 : 사과 왜성대목 및 상업적품종 무병종묘 대량생산 기술 개발

연차별 목표	연구목표	평가지표	검증방법	가중치	
1차년도	1-1	지역산업체로부터 우량 왜성대목 및 우수형질의 품종 확보	우량 왜성대목 2 품종 확보	확보한 품종수	40
	1-2	물리, 화학적 조절을 통한 사과 왜성대목 무병종묘 생산 기술 개발	왜성대목 무병묘 품종별 100주 이상 확보	확보주수 바이러스 진단	60
2차년도	2-1	배양단계별 품종별 배양조건 최적화	Multiple-shoots 유도 조건 3건	배양조건	50
	2-2	과수화 발생 억제 조건 구명	기내발근 유도 및 과수화 억제 조건 2건		50
3차년도	3-1	사과 무병종묘 생산용 생물반응기 시스템 개발	종묘 생산용 생물반응기 시스템 개발		40
	3-2	Scale-up 대용량 생물반응기 시스템을 이용한 무병종묘 대량생산	대용량 생물반응기 배양 조건 : 3건		40
	3-3	접수용 무병종묘 생산 기술개발	접수용 무병주 3품종 확보		20
4차년도	4-1	광독립영양배양을 통한 순화용 무병종묘 육성 기술개발	배양묘 독립 영양화율 80% 이상	기내배양묘 광합성 증가치	50
	4-2	DNA 함량 분석을 통한 건전묘 조기 스크리닝	변이율 5% 이하 유지	Flow cytometric based nucleic DNA 분석	30
	4-3	무병 왜성대목과 접수를 이용한 micro-grafting 기술개발	기내접목활착율 80% 이상	접목활착율	20
5차년도	5-1	첨단환경조절실 구축	첨단환경조절실 구축 유무		20
	5-2	사과 무병주묘 생산을 위한 기내배양 시스템 및 기내 접목기술 프로토콜 확립	기개발 기술의 프로토콜화 5건		40
	5-3	우량 무병종묘의 농가 보급 및 관련 지역 산업체에 기술보급	사과 무병주묘 보급 및 기술이전 2건	기술이전 실적	40

(다) 제3세부과제 : 기내 배양 사과 무병종묘 대량 생산을 위한 환경조절 기술 개발

연차별 목표	연구목표		평가지표	검증방법	가중치
1차년도	1-1	기내 배양 사과 대목의 기본 환경 조건 확립	재배 배양액 처방 개발 및 농도 제시	재배에 의한 생육 결과	60
	1-2	기내 배양 사과 대목의 안정적인 순화 및 발근을 위한 재배 시스템 선정	재배 시스템 1건 선정	재배에 의한 생육 결과	40
2차년도	2-1	순화 및 발근 촉진을 위한 지하부 물리적 환경조건 구명	물리적 재배 환경 조건: 2건 발근향상율: 30%	발근율 및 재배생육 결과	60
	2-2	순화 및 발근 촉진을 위한 지하부 화학적 처리조건 구명	화학적 처리 조건: 2건 발근향상율: 30%	발근율 및 재배생육 결과	40
3차년도	3-1	순화 촉진을 위한 지상부 환경조건 구명(온도, 습도)	지상부 환경 조건: 2건	스트레스 지표 결과	50
	3-2	생장 촉진을 위한 지상부 환경 조건 구명(광, 이산화탄소)	지상부 환경 조건: 2건	광합성을 및 생육 결과	50
4차년도	4-1	기내 배양 사과 접수의 기외 삼목률 향상을 위한 환경조건 구명	환경 제어 조건: 2건 삼목향상율 30%	삼목률 및 재배생육 결과	60
	4-2	유경 접목을 위한 환경 조건 구명	환경 제어 조건: 2건 접합향상율 30%	접합율 및 재배생육 결과	40
5차년도	5-1	기내배양 사과 소식물체의 순화 및 발근 촉진을 위한 특화된 대규모 시스템 구축	대규모 생산 시스템 구축 유무	대규모 재배 결과	40
	5-2	전·후방 기술과의 유기적 연결을 위한 패키지 기술 개발	패키지화된 기술: 1건	패키지 기술 검증	60

(라) 제4세부과제 : 사과무병종묘 바이러스 검정법 확립

연차별 목표	연구목표		평가지표	검증방법	가중치
1차년도	1-1	채집 및 유전자은행 등을 통해 사과 바이러스 분리주 확보	확보한 사과 바이러스 분리주 20개	바이러스 분리 및 입수	30
	1-2	국내 유통 사과 묘목의 바이러스 감염 현황 조사	감염률 조사 100주 이상	묘목 수집 및 검정	70
2차년도	2-1	주요 사과 바이러스에 대한 각 검출법 효율 탐색	검출법 3종 비교	검출법 비교 결과	40
	2-2	사과 품종에 따른 바이러스 검출감도 변화 연구	3품종 이상 검출감도 조사	품종별 검출 결과	40
	2-3	사과 무병종묘에 발생하는 주요 사과 바이러스 감염 현황 조사	바이러스 검정 무병종묘 100개 이상	바이러스 검정 결과	20
3차년도	3-1	검출법에 따른 주요 바이러스 검출 감도 및 속도 비교	바이러스 4종 검출 비교	바이러스 검출 시험 결과	50
	3-2	기내배양, 발근, 순화, 육묘 등 각 묘목생산 단계별 바이러스 검출법 탐색	묘목생산단계별 40주 이상 검출법 비교	바이러스 검출 시험 결과	50
4차년도	4-1	단기간에 많은 양을 처리할 수 있도록 시스템 개선	처리속도 개선 결과 1건	생력시험	50
	4-2	Multiplex PCR 가능성 검정	Multiplex PCR 결과 1건	Multiplex PCR	50
5차년도	5-1	최적 검출법 선발	최적 검출법 제시 1건	검출 및 생력 시험 결과	30
	5-2	시설원에 활용 사과무병종묘 생산시스템에서 주요 바이러스 고효율검정법 확립	주요 바이러스 검정법 확립 1건	검출 및 생력 시험 결과	70

(마) 제1협동과제 : 사과무병종묘 접목번식법 및 저장법 개발과 유통 체계 모델화

연차별 목표	연구목표	평가지표	검증방법	가중치
1차년도	산업현장의 문제점 도출과 개발 기술의 적용	현장애로사항 발굴 1건		100
2차년도	사과무병종묘 최적 번식방법 개발	접목 방법 2건 비교	재배에 의한 생육 결과	100
3차년도	사과무병종묘 저장조건 개발	수확 시기 및 저장 조건 도출 1건	재배에 의한 생육 결과	100
4차년도	사과무병종묘 유통체계 개발	사과포트묘 포장 및 운송 방법 개발 1건	유통을 통한 검증	100
5차년도	고효율 사과무병종묘 생산 모델화	모델화 된 기술 확립 1건	모델화 기술 검증	100

(바) 제2협동과제 : 사과 바이러스 무병묘의 생육 단계별 특성검정

연차별 목표	연구목표	평가지표	검증방법	가중치
1차년도	1-1 사과 왜성 대목(M.9 및 M.26) 및 접수별 생산 및 유통 현황 조사	대목 및 접수 유통 현황 10개 업체 파악	10개 이상 생산업체	50
	1-2 사과 왜성 대목 및 접수의 바이러스 감염률 조사	10개 업체에 대한 바이러스 검정	바이러스 감염률 조사	30
	1-3 사과 바이러스 무병 묘목 식재 및 주요 바이러스 접종	식재한 사과 무병 종묘의 바이러스 10조합 접종	바이러스 접종 여부	20
2차년도	2-1 사과나무 수관 부위별 (눈, 결과지, 잎 등) 잠복 바이러스 발현 여부 조사	10조합 유목기 수관 부위별 바이러스 검정	부위별 바이러스 감염률 결과	50
	2-2 바이러스 접종 묘목과의 수체 생육량 비교	10조합 수체 생육량 비교	수체 생육량 결과	50
3차년도	3-1 사과나무 수관 부위별 (눈, 결과지, 잎 등) 잠복 감염 바이러스 발현 여부 조사	10조합 유목기 수관 부위별 바이러스 검정	부위별 바이러스 감염률 결과	50



	3-2	바이러스 접종 묘목과 의 수체 생육량 비교	10조합 수체 생육량 비교	수체 생육량 결과	50
4차년도	4-1	사과나무 수관 부위별 (과일, 눈, 결과지, 잎 등) 잠복 감염 바이러스 발현 여부 조사	10조합 성과기 수관 부위별 바이러스 검정	재배 생육 결과 및 광합성량 측정	50
	4-2	바이러스 접종 묘목과 의 상품성 및 수량성 비교	10조합 과일 생산성 및 상품성 차이	과일 생산성 및 상품성 비교 결과	50
5차년도	5-1	사과나무 수관 부위별 (과일, 눈, 결과지, 잎 등) 잠복 감염 바이러스 발현 여부 조사	10조합 성과기 수관 부위별 바이러스 검정	재배 생육 결과 및 광합성량 측정	50
	5-2	바이러스 접종 묘목과 의 상품성 및 수량성 비교	10조합 과일 생산성 및 상품성 차이	과일 생산성 및 상품성 비교 결과	50

## 2. 연구수행 내용 및 결과

### 가. 연구개발의 추진전략 · 방법 및 추진체계

#### ◎ 총괄 추진 전략



제2세부는 사과 왜성대목 및 상업적품종 무병종묘를 조직배양 및 대용량 생물반응기를 이용하는 대량생산 기술을 개발하며, 제3세부는 제2세부에서 생산된 조직배양묘의 순화를 위한 지하부 및 지상부 환경제어 기술을 개발하고 안정적인 묘 생산을 위한 대규모 하드웨어 구축 및 패키지 기술을 개발하며, 제1세부는 시설재배용 사과무병종묘의 포트 규격, 지하부 최적 배지 환경 개발 및 지상부 온도 및 광환경 구멍을 통한 안정증식육묘법을 개발하며, 제1, 4세부는 무병종묘 생산의 전반적인 과정에서 정확한 품종의 무병종묘 생산을 위한 품종변이 및 바이러스 검정 체계 확립을 통한 인증체계를 수립하며, 지역산업체인 제1협동은 제1~4세부에서 개발한 무병종묘의 번식, 저장 및 유통 체계를 모델화하며, 제2협동은 사과 무병묘의 시범포를 운영하여 유목기 및 성과기 수체 생육 특성 검정을 통해 사과무병종묘의 우수성을 구명하며 지역과수묘목 관련 산업체 및 과수재배 농가의 교육 및 홍보를 지원한다. 또한 3년차부터 위탁업체를 선정하여 우량 무병종묘의 신속한 대량생산을 통해 농가보급을 앞당겨 산업화 과정에서 발생하는 문제점을 개선한다. 본 연구를 통해 시설원에 사과무병종묘 산업화의 전단계를 패키지화하여 충북 시설 관련 농산업 발전에 기여하고 과수묘목 해외수출 기반을 조성한다.

또한 충청북도는 본 연구과제가 원활히 수행될 수 있도록 150백만원 상당의 매칭펀드를 지원하여 시범 전시포 시설 및 운영, 현장 확산에 필요한 사업비, 과수묘목 산업 현장 교육을 지원한다.

가. 제1세부과제 : 사과무병종묘 변이검정용 마커 개발 및 시설내 안정증식 육묘법 개발  
 (1) 사과무병종묘 변이검정용 마커 개발



## 육묘단계별 변이 시스템 구축

- 1차년도
  - 기존 문헌을 통해 사과 품종 판별에 사용된 마커 탐색함
  - 사과 유전자 지도를 기반으로 17개 염색체에 고르게 위치할 수 있는 마커 선발함
  - 주요 사과 품종의 DNA 추출 후 탐색한 마커를 이용하여 PCR을 수행함
  - 아가로스겔 전기영동을 통해 다형성을 보이는 1차 마커를 선발함
  - 캐필러리 전기영동을 통해 2차 선발을 수행함
- 2차년도
  - 사과 분자마커의 탐색을 계속 진행함
  - 대목(M.9, M.26), 접수(‘자홍’, ‘홍로’, ‘후지’, ‘감홍’ 등)의 DNA 추출 후 PCR을 수행함
  - 아가로스겔 전기영동과 캐필러리 전기영동을 통해 분자마커를 탐색함
  - 대목(M.9, M.26), 접수(‘자홍’, ‘홍로’, ‘후지’, ‘감홍’ 등) 등 주요 사과품종의 동정을 위한 분자마커를 선발함
- 3차년도
  - 사과 품종 특이적 분자마커를 선발/적용을 계속해서 수행함
  - 2차년도에 선발된 마커들을 이용하여 주요 사과 품종에 대해 PCR을 수행함
  - 아가로스겔 전기영동과 캐필러리 전기영동을 수행함
  - 각 품종별 다형성을 가지는 마커들에 대한 genotyping 데이터를 구축함
- 4차년도
  - 분자마커를 사용한 조직배양묘의 변이의 검정을 위해 3차년도까지 개발된 품종 특이적인 마커들을 이용하여 육묘에 대한 genotyping을 수행함
  - 구축된 genotyping 데이터와 비교하여 변이를 판별함
  - 품종판별을 위한 최소의 마커셋을 구성하여 변이검정의 효율성을 높임

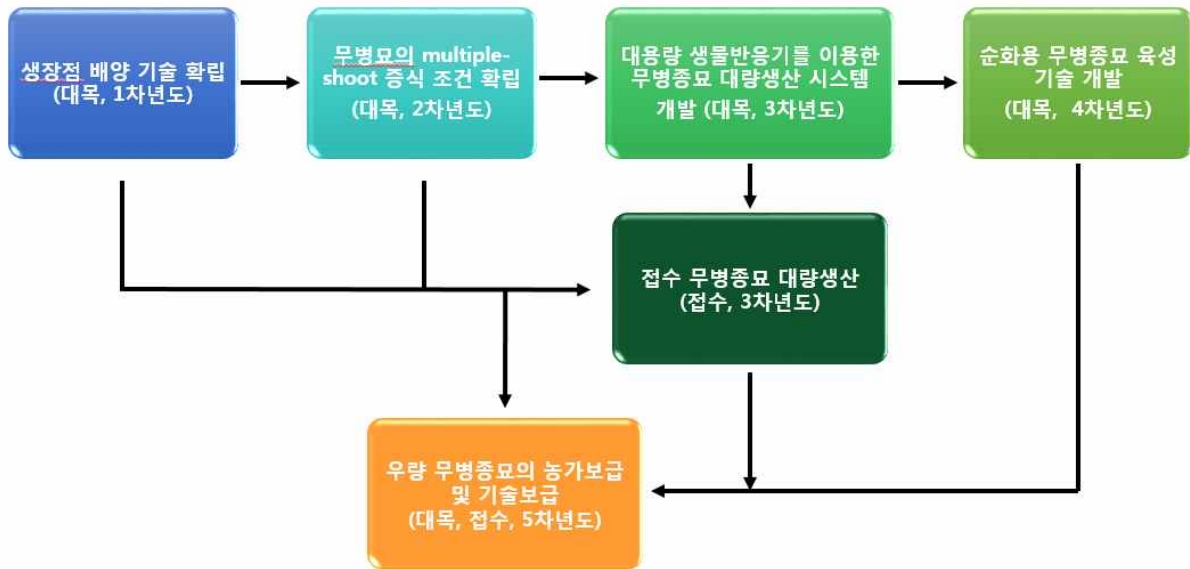
- 5차년도
  - 4년차도까지 개발된 분자마커와 genotyping 데이터를 이용하여 품종 동정 시스템을 구축함
  - 육묘의 각 단계별로 변이 확인을 위해 분자마커를 이용한 품종 동정을 수행함
  - 품종 동정 시스템의 문제점을 확인 후 보완하여 실질적인 품종 동정 시스템의 구축을 확립함

(2) 환경조절시설을 이용한 안정증식육묘법 개발



- 1차년도
  - 기내에서 조직배양을 통해 증식함
  - 순화 및 발근 처리된 사과무병대목(M.9 또는 M.26)의 시설내 포트 재배를 위한 포트의 종류와 용적을 개발함
- 2차년도
  - 1차년도에서 생산된 사과무병대목에 접목을 실시함
  - 사과무병종묘의 시설내 포트 재배를 위한 포트의 종류와 용적을 개발함
- 3차년도
  - 1, 2차년도에서 선정한 포트를 이용하여 사과무병대목과 종묘를 재배하기 위한 포트 내 최적의 배지환경을 개발함
- 4차년도
  - 사과무병대목과 종묘를 재배하기 위한 최적의 지상부 환경을 개발함
  - 사과무병대목 및 종묘의 포트재배법을 확립함
- 5차년도
  - 기존사과종묘와 포트종묘의 과실특성을 비교/분석함
  - 사과 무병 포트종묘의 타당성 확립 및 시설사과무병종묘 포트 재배기술을 개발함

나. 제2세부과제 : 사과 왜성대목 및 상업적품종 무병종묘 대량생산 기술 개발



• 1차년도

- 지역산업체로부터 우량 왜성대목 및 우수형질의 품종 M.9과 M.26을 확보함
- 물리적, 화학적 조절을 통해 사과 왜성대목 무병종묘 생산 기술을 개발함
- 무병종묘는 성장점 배양을 통해 생산함
- 무병화율을 증진시키기 위하여 고온처리, ribavirin 및 항생제 처리 등 물리화학적 처리시 최적의 농도와 처리시기 등을 구명함
- 대량증식을 위한 사과 대목용 품종별 무병묘를 확보함

• 2차년도

- 사과 대목용 신초의 배양단계별 최적화 배양조건을 구명함
- Multiple-shoot 유도 단계에서 배지 종류 및 무기염류 농도, 성장조절제 종류 및 농도, 광질 등을 달리 처리함
- 최대로 multiple-shoot를 유도할 수 있는 조건을 확립함
- 기내생장 단계에서는 생장을 최대화하기 위한 배지 및 배양환경 조건을 구명함
- 기내발근 단계에서는 오옥신 종류 및 농도, 처리방법 등을 통해 기내발근 효율을 극대화함
- 무병종묘를 획득하기 위한 각 배양 단계별 배양시스템을 체계화함

• 3차년도

- 대용량 생물반응기를 이용한 무병종묘 대량생산 시스템 개발을 위해 1~5L 규모의 공기부양식 생물반응기를 이용함
- 사과 무병주 생산용 생물반응기 시스템을 개발함
- 생물반응기 배양 중 vessel 내 공기공급량과 배양배지 공급을 조절하여 생장이 활발한 건전묘의 획득율을 증진시킴
- Scale-up 대용량 생물반응기 시스템을 이용하여 무병종묘의 대량생산 시스템을 개발함
- 과수화 발생을 억제하여 건전묘의 획득율을 증진시킴
- 4차년도에 수행할 기내접목(micro-grafting)을 위해 접수용 품종의 성장점 배양을 통해

품종별 무병주를 확보함

- 접수용 품종은 현재 과수농가에서 많이 이용하는 후지 등 3품종을 이용함
- 접수의 증식은 1, 2년차에 대목용 품종에서 기 개발된 조건을 이용함
- 품종에 따라 수정된 조건을 적용하여 품종별 배양조건을 최적화함

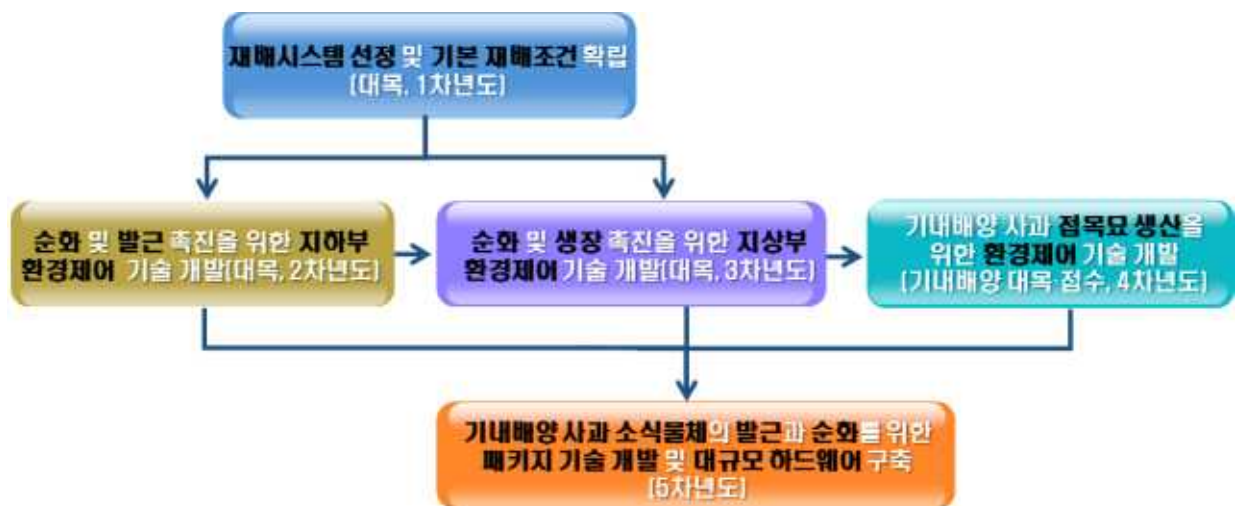
• 4차년도

- 순화시 생존율을 극대화하기 위해 광독립영양배양을 통한 순화용 무병종묘 육성 기술을 개발함
- 기내배양시 종속영양을 하던 기내배양묘를 독립영양이 가능한 상태로 변환시켜 순화시 묘 손실을 최소화함
- 배양시 접종밀도, 조건 등을 구명하여 균일묘 생산기술을 개발함
- 순화 전 대량증식묘는 flow cytometric-based nucleic DNA 분석을 수행함
- DNA 함량변이 발생 여부를 확인함으로써 변이주를 조기에 스크리닝함
- 1~3차년도에 확보한 대목용 및 접수용 무병주를 이용하여 micro-grafting 기술을 개발함
- 기내접목과 기외접목의 효율을 비교함
- 기내접목과 기외접목묘의 경제성을 비교 분석하여 효율이 높은 접목 기술을 선별함

• 5차년도

- 기내배양을 통한 사과 무병종묘의 대규모 생산과 보급을 위한 기반기술을 시스템화하고 프로토콜화함
- 기 개발된 기술로 생산 된 무병종묘의 경제성분석을 통해 생산단가를 낮추는 방향으로 개발기술을 보정하고 이를 프로토콜화함
- 우량 무병종묘를 관련 농가에 보급하고 개발된 기술은 각 관련 산업체에 기술이전을 통해 기술보급함
- 완성된 생산기술들을 적용 할 첨단환경조절을 준공을 위해 시설을 설계하고 구축함

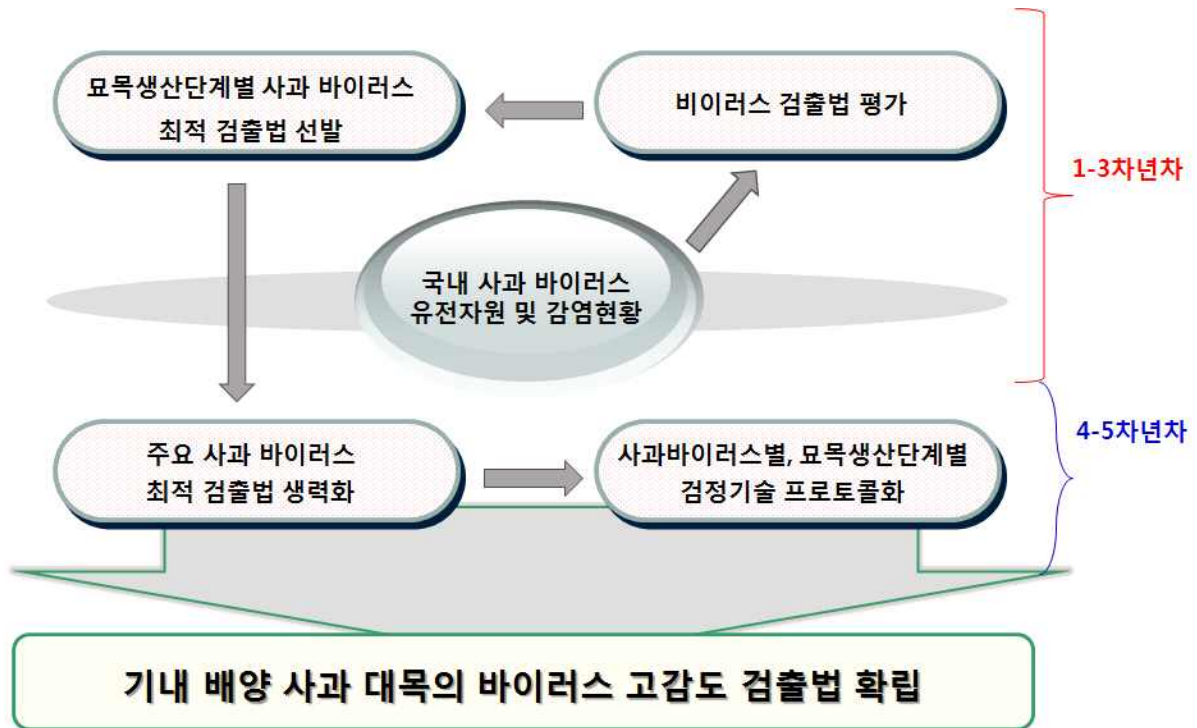
다. 제3세부과제 : 기내 배양 사과 무병종묘 대량 생산을 위한 환경조절 기술 개발





- 1차년도
  - 기내에서 배양된 대목용 사과 소식물체의 적정 재배 환경조건을 조성하기 위하여 기존에 밝혀진 순화에 사용되는 기본적인 환경 정보를 조사하고 이를 적용함
  - 적정 배양액 개발 및 배양액 농도 규명을 통해 기본 재배조건을 확립함
  - 기본적인 환경조건 조성 후 기존 수경재배 시스템을 수정 및 보완하여 기내 배양된 소식물체 적정 재배 시스템을 선정함
  
- 2차년도
  - 순화와 발근 촉진에 있어서 중요한 지하부 환경요인의 물리적 환경을 제어하거나 화학적인 처리를 함
  - 사과 소식물체의 발근을 촉진시키는 지하부 환경 조절 기술을 개발함
  
- 3차년도
  - 지상부 환경요인을 조절하여 대목용 사과 소식물체의 순화를 향상시킬 수 있는 환경을 구명함
  - 광과 이산화탄소를 처리하여 발근 이후 생장을 촉진시킬 수 있는 환경 조절 기술을 개발함
  
- 4차년도
  - 기내 배양된 사과 접목묘 생산을 위하여 기내 배양된 접수용 사과 소식물체의 접수를 기외 삼목하였을 때 삼목율을 향상시킬 수 있는 환경조건을 확립함
  - 1~3차년도의 결과를 통해 밝혀진 환경 조건을 토대로 기내 배양된 대목과 기내 배양된 접수용 사과 소식물체의 접수를 접목하는 유경 접목을 위한 환경조건을 구명함
  
- 5차년도
  - 대규모 하드웨어를 구축하고 4차년도까지 개발된 기술을 도입하여 나오는 문제점을 추가적으로 보완하여 경제적으로 가능한 실질적인 기술을 구축함
  - 실제로 전방과 후방기술과 연결되었을 때 문제가 될 수 있는 부분을 해결하여 패키지화된 기술을 최종 확립함

라. 제4세부과제 : 사과무병종묘 바이러스 검정법 확립



• 1차년도

- 충주, 예산, 안동 등 주요 사과 재배지에서 가지, 잎, 열매 등을 채집함
- 바이러스를 검정하고 분리주를 확보함
- 주요 바이러스 중 시료로부터 분리주를 확보할 수 없는 것은 유전자은행 등에 요청하여 유전자원을 확보함
- 국내에서 유통되고 있는 사과 묘목들을 무작위로 구입 또는 대목생산업체로부터 분양 받음
- 주요 바이러스의 감염현황을 조사함
- 1차년도의 연구와는 별도로, 확보한 분리주들을 증식기주에 증식시킴
- 미리 확보하여 재배 중인 여러 품종의 사과묘목들에 접종하여 다음연도의 연구에 대비함

• 2차년도

- 증식기주에 대하여 ELISA와 PCR 등 대표적인 바이러스 검정법들의 효용성을 조사함
- 1차년도에 접종해 놓은 사과 묘목들을 대상으로 바이러스를 검정함
- 품종별로 검출감도의 변화를 확인함
- 2세부와 3세부에서 생산된 묘목들 및 협동기관에서 생산하여 시중에 공급하고 있는 묘목들을 대상으로 주요 바이러스를 검정하여 무독묘 생산율을 높임
- 각 바이러스별로 가장 감염이 잘되며, 체내에서 바이러스의 증식도 활발한 사과 품종들을 선별함
- 각 바이러스 접종하여 계속 유지하면서 각 단계의 연구에 사용함
- 감염된 개체들은 다른 바이러스의 추가 감염을 피하기 위하여 온실 내에서 망실에 재배하며 주기적으로 살충제를 처리하며 관리함



- 3차년도
  - 묘목 생산단계별로 사과 바이러스의 최적 검출법을 선별하기 위하여 2, 3세부에서 생산하고 있는 묘목들을 각 단계별로 바이러스를 검정함
  - 검출에 가장 적합한 시기를 찾아냄
  - 동시에 바이러스 감염률이 가장 높은 생육단계도 찾아내어 대책을 마련하도록함
  - 바이러스의 밀도를 조절하여 각 검출법별로 검출해낼 수 있는 한계치를 확인하여 비교함
- 4차년도
  - 현장에서 바로 사용할 수 있도록 바이러스 검출법의 생력화 방안을 도출함
  - 여러 프라이머를 동시에 사용하여 몇 가지 바이러스를 동시에 검출해 낼 수 있는 multiplex PCR을 이용함
- 5차년도
  - 이전의 연구에서 밝혀진 결과들을 토대로 바이러스별로 최적의 검출법을 선별함
  - 각 검출 단계와 방법들을 프로토콜화함
  - 고효율 검정법을 확립함으로써 바이러스 무독묘 생산의 효율을 높이는데 기여함

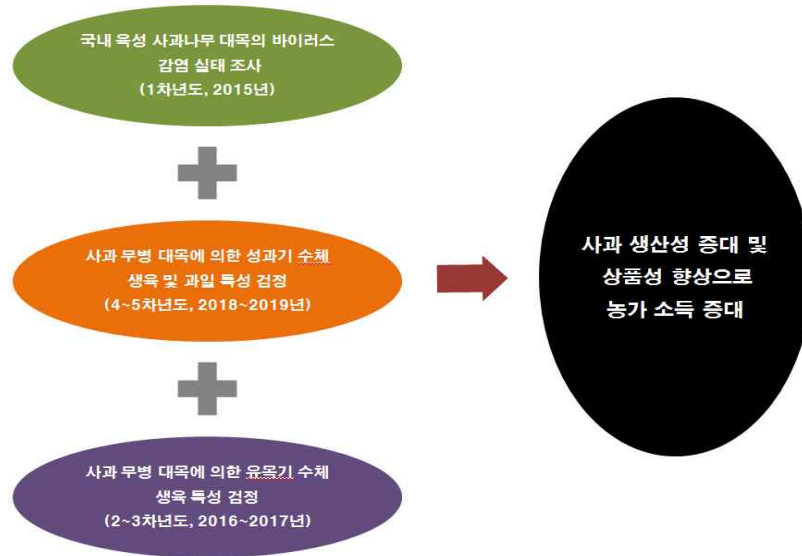
마. 제1협동과제 : 사과무병종묘 최적 번식 및 유통 체계 모델화



- 1차년도
  - 과수산업 현장의 애로사항 발굴
  - 문제점 해결을 위한 개발 기술의 적용
- 2차년도
  - 접사를 동원한 접목과 접목 가위 또는 기계를 이용한 접목방식과의 비교 실험을 통해 안정적인 활착률과 인력 문제 해결방안을 모색함
  - 접목장소(제자리접, 들접)와 시설원예를 이용한 접목시기 변화에 따른 묘목의 생육변화를 분석함
- 3차년도
  - 사과무병묘를 저온저장고에 장기 보관하기 위한 안정적인 묘목 수확 시기, 저장 조건 방안 모색 및 저장 가능 기간을 구명함

- 4차년도
  - 시설재배용 사과포트묘의 포장 방법 및 운송 방법을 모색함
- 5차년도
  - 1, 2, 3, 4차년도의 결과를 바탕으로 사과무병종묘의 생산, 저장 및 유통의 최적 조건을 도출하고 사과무병묘의 대량 생산 공정 및 유통 체계를 모델화함

**바. 제2협동과제 : 사과 바이러스 무병묘의 생육 단계별 특성검정**



- 1차년도
  - 국내에 유통되고 있는 사과나무 묘목의 대목(M.9 및 M.26)에 대한 원종 구입처, 보급종의 자가증식 여부, 연간 대목 생산량, 묘목 사업 시작년 등 국내 주요 사과 묘목 또는 대목 생산업체의 현황을 조사함
  - 국내 주요 사과 묘목 또는 대목 생산업체에서 구입한 대목에 대해 대목 종류별, 지역별, 바이러스 종류별 감염정도를 파악하여 국내 유통 사과나무 묘목 중 대목의 바이러스 감염 실태를 분석함
  - 국립농원에서 생산한 사과나무 무병 묘목(M.9 자홍, M.26 자홍, M.9 후지, M.26 후지)에 대해 관행재배를 하고 주요 사과바이러스를 카보랜덤 등으로 접종함
- 2, 3차년도
  - 개발한 무병 대목과 재배 주품종을 접목한 사과나무 묘목을 시험연구 포장에서 식재하고 관행적인 방법으로 재배함
  - 재배중인 사과 무병 묘목의 각 부위별(눈, 잎, 신초 등) 잠복 감염 바이러스의 발현 여부를 조사함
  - 국내 유통 사과나무 묘목과의 수관 생육량(나무 높이, 신초 길이, 잎 무게 등) 비교 및 각 부위별(눈, 잎, 신초 등) 잠복 감염 바이러스의 발현을 조사함

• 4, 5차년도

- 사과나무 무병 성목에 착과를 시켜 각 부위별(과일, 눈, 잎, 결과지 등) 잠복 감염 바이러스 발현 분석함
- 사과 바이러스를 접종한 성목에 착과를 시켜 수관 생육량 및 과일의 생산성과 상품성을 비교하여 무병 묘목의 유통 정착화를 도모함

## 나. 세부 및 협동 연구 연구 내용 및 결과

### <제1세부과제 : 사과무병종묘 변이검정용 마커 개발 및 시설내 안정증식 육묘법 개발>

#### 1. 사과무병묘 변이검정용 마커 개발

##### 가. 사과 SSR 마커 이용 다형성 평가

(1) 사과 분자마커와 관련된 기존 문헌을 통해 탐색된 SSR 마커를 이용한 유연관계 분석

##### (가) 실험 방법

- ① 식물재료 : 사과 원종 2종(*Malus asiatica*, *Malus sargentii*) 및 변이품종을 포함한 18개 품종(‘Mcintosh wijcik’, ‘Royal gala’, ‘Sekaiichi’, ‘감홍’, ‘Golden Delicious’, ‘KIKU 8 후지’, ‘나리타 후지’, ‘여홍’, ‘자홍’, ‘조나골드’, ‘진홍’, ‘피텍스’, ‘홍로’, ‘홍소’, ‘홍안’, ‘홍옥’, ‘화홍’, ‘후지’)을 이용함.
- ② 문헌을 통해 사과 품종 판별에 이용된 마커 탐색함.
- ③ PCR 수행 후 아가로스겔 전기영동, 캐필러리 전기영동 수행함.
- ④ 유연관계 분석: Power marker 3.0 소프트웨어를 이용함.

##### (나) 실험 결과

- ① 25개 SSR 마커를 탐색하였으며, 사과 품종에 적용하여 다형성 SSR 마커 8개 (CH01d08, CH01d09, CH01f07a, CH02b10, CH03d12, CH03g07, CH04e03, CH05c06)을 확인함.
- ② 유연관계 분석 결과 원종 2점을 out-group으로 설정할 때 총 4개 그룹으로 구분됨(그룹1).
- ③ 제1그룹은 ‘Mcintosh’와 ‘Gala’로 구성되었으며, 제2그룹은 ‘후지’와 ‘나리타 후지’, ‘KIKU 8 Fuji’, ‘피텍스’ 등 ‘후지’의 변이지와 ‘화홍’으로 구성되었음.
- ④ 제3그룹은 총 7개의 품종으로 구성되어있었으며, ‘Spur Early blaze’와 ‘Spur golden delicious’의 교배조합인 ‘홍로’, ‘감홍’과 ‘홍로’의 변이지인 ‘자홍’이 포함되었고, ‘홍옥’과 함께 ‘홍옥’을 교배친으로 사용하여 개발된 품종인 ‘진홍’, ‘여홍’, ‘조나골드’ 등이 포함되었음.
- ⑤ 제4그룹은 ‘홍안’, ‘Sekaiichi’, ‘홍소’, ‘Golden delicious’로 구성되었음.
- ⑥ 평균 PIC(polymorphism information content) 값이 0.8이었으며, 평균 대립유전자수는 11.8개였음.

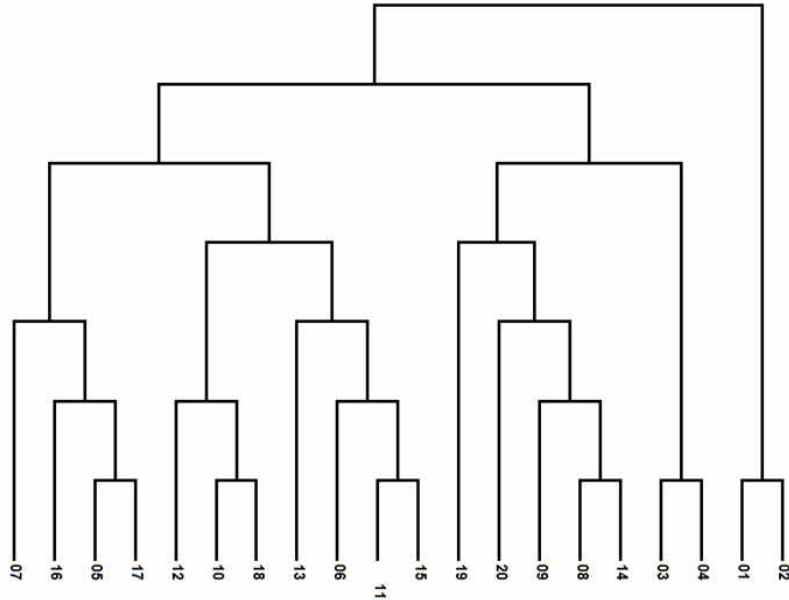


그림 1. 10개의 SSR 마커를 이용한 사과 2종의 원종과 18개 품종의 유연관계도. 1. *Malus asiatica*, 2. *M. sargentii*, 3. McIntosh, 4. Gala, 5. 홍안, 6. 홍로, 7. 홍소, 8. 후지, 9. 나리타 후지, 10. 진홍, 11. Spur Early blaze, 12. 여홍 13. 14. KIKU8 Fuji, 감홍, 15. Spur golden delicious, 16, Sekaiichi, 17. Golden Delicious. 18. 홍옥, 19. 피텍스, 20. 화홍.

나. 조직배양 변이검정 DNA profile 구축

(가) 실험 방법

- ① 식물재료: 사과연구소에 재식된 접수품종 2점(‘후지’, ‘홍로’), 대목품종 2점(M.9, M.26)에 이용함.
- ② DNeasy Plant Mini Kit(Qiagen)을 이용하여 genomic DNA를 추출함.
- ③ 사과 유래 SSR마커 56개를 이용하여 PCR 수행함(표 1).
- ④ 아가로스 전기영동 및 캐필러리 전기영동을 수행함.
- ⑤ DNA 변이검정을 위한 PCR 수행횟수를 최소화 하기 위한 2가지 마커를 1회에 수행 하기 위한 multiplex PCR이 가능한 마커 조합을 도출함.
- ⑥ M.9, M.2.6 조직배양 대목묘 각 100점에 대해 (1) 기내 순화 1주후, (2) 1년차 생육 종료 시점 유엽의 genomic DNA를 추출함.
- ⑦ 원종과 검정대상에 대하여 PCR 수행함.
- ⑧ PCR산물의 아가로스 전기영동 및 캐필러리 전기영동 결과를 비교함.

표 1. 조직배양 변이검정 DNA profile 구축에 이용된 사과 유래 SSR 마커의 정보.

No.	SSR	Primer sequence	Tm (°C)	Apple LG	Reference
1	CH01d08	CTC CGC CGC TAT AAC ACT TC TAC TCT GGA GGG TAT GTC AAA G	60	15	Liebhard et al. (2002)
2	CH01f12	CTC CTC CAA GCT TCA ACC AC GCA AAA ACC ACA GGC ATA AC	60	10	Liebhard et al. (2002)

3	CH01h01	GAA AGA CTT GCA GTG GGA GC GGA GTG GGT TTG AGA AGG TT	60	17	Liebhard et al. (2002)
4	CH02a04	GAA ACA GGC GCC ATT ATT TG AAA GGA GAC GTT GCA AGT GG	60	2,7	Liebhard et al. (2002)
5	CH02a08	GAG GAG CTG AAG CAG CAG AG ATG CCA ACA AAA GCA TAG CC	60	5, 10	Liebhard et al. (2002)
6	CH02b10	CAA GGA AAT CAT CAA AGA TTC AAG CAA GTG GCT TCG GAT AGT TG	60	2	Liebhard et al. (2002)
7	CH02b12	GGC AGG CTT TAC GAT TAT GC CCC ACT AAA AGT TCA CAG GC	60	5, 10	Liebhard et al. (2002)
8	CH02c02a	CTT CAA GTT CAG CAT CAA GAC AA TAG GGC ACA CTT GCT GGT C	62	2	Liebhard et al. (2002)
9	CH02c06	TGA CGA AAT CCA CTA CTA ATG CA GAT TGC GCG CTT TTT AAC AT	60	2, 9	Liebhard et al. (2002)
10	CH02c09	TTA TGT ACC AAC TTT GCT AAC CTC AGA AGC AGC AGA GGA GGA TG	62	15	Liebhard et al. (2002)
11	CH02d08	TCC AAA ATG GCG TAC CTC TC GCA GAC ACT CAC TCA CTA TCT CTC	62	11	Liebhard et al. (2002)
12	CH02d11	AGC GTC CAG AGC AAC AGC AAC AAA AGC AGA TCC GTT GC	62	15	Liebhard et al. (2002)
13	CH02e02	CTC ATC AGT CTC ACT GAC TGT GTG AGG GTC AGG GTC AGT CAG G	60	13	Liebhard et al. (2002)
14	CH02f06	CCC TCT TCA GAC CTG CAT ATG ACT GTT TCC AAG CGA TCA GG	60	2	Liebhard et al. (2002)
15	CH02g01	GAT GAC GTC GGC AGG TAA AG CAA CCA ACA GCT CTG CAA TC	62	13	Liebhard et al. (2002)
16	CH03a02	TTG TGG ACG TTC TGT GTT GG CAA GTT CAA CAG CTC AAG ATG A	60	14	Liebhard et al. (2002)
17	CH03c02	TCA CTA TTT ACG GGA TCA AGC A GTG CAG AGT CTT TGA CAA GGC	62	12	Liebhard et al. (2002)
18	CH03d10	CTC CCT TAC CAA AAA CAC CAA A GTG ATT AAG AGA GTG ATC GGG G	62	2	Liebhard et al. (2002)
19	CH03d12	GCC CAG AAG CAA TAA GTA AAC C ATT GCT CCA TGC ATA AAG GG	60	6	Liebhard et al. (2002)
20	CH03g06	ATC CCA CAG CTT CTG TTT TTG TCA CAG AGA ATC ACA AGG TGG A	58	14	Liebhard et al. (2002)
21	CH03g07	AAT AAG CAT TCA AAG CAA TCC G TTT TTC CAA ATC GAG TTT CGT T	60	3	Liebhard et al. (2002)
22	CH03h06	TTG TCC CTT TTT ACG TCT TTC C GTT ATT GAG CAA GGC GGA GA	60	15	Liebhard et al. (2002)
23	CH04c06	GCT GCT GCT GCT TCT AGG TT GCT TGG AAA AGG TCA CTT GC	58	10, 17	Liebhard et al. (2002)
24	CH04d02	CGT ACG CTG CTT CTT TTG CT CTA TCC ACC ACC CGT CAA CT	60	12	Liebhard et al. (2002)
25	CH04e03	TTG AAG ATG TTT GGC TGT GC TGC ATG TCT GTC TCC TCC AT	60	5	Liebhard et al. (2002)
26	CH04f03	CTT GCC CTA GCT TCA AAT GC TCG ATC CGG TTA GGT TTC TG	60	10	Liebhard et al. (2002)
27	CH05a02	GTT GCA AGA GTT GCA TGT TAG C TTT TGA CCC CAT AAA ACC CAC	62	8, 15	Liebhard et al. (2002)
28	CH05a04	GAA GCG AAT TTT GCA CGA AT GCT TTT GTT TCA TTG AAT CCC C	62	16	Liebhard et al. (2002)

29	CH05a05	TGT ATC AGT GGT TTG CAT GAA C GCA ACT CCC AAC TCT TCT TTC T	60	6	Liebhard et al. (2002)
30	CH05c06	ATT GGA ACT CTC CGT ATT GTG C ATC AAC AGT AGT GGT AGC CGG T	60	5, 16	Liebhard et al. (2002)
31	CH05c07	TGA TGC ATT AGG GCT TGT ACT T GGG ATG CAT TGC TAA ATA GGA T	60	9	Liebhard et al. (2002)
32	CH05d03	TAC CTG AAA GAG GAA GCC CT TCA TTC CTT CTC ACA TCC ACT	60	14	Liebhard et al. (2002)
33	CH05d04	ACT TGT GAG CCG TGA GAG GT TCC GAA GGT ATG CTT CGA TT	62	12	Liebhard et al. (2002)
34	CH05e03	CGA ATA TTT TCA CTC TGA CTG GG CAA GTT GTT GTA CTG CTC CGA C	60	2	Liebhard et al. (2002)
35	CH05g05	ATG GGT ATT TGC CAT TCT TGC CCT GAA GCA AGG GAA GTC ATA C	60	15	Liebhard et al. (2002)
36	MS02a01	CTC CTA CAT TGA CAT TGC AT TAG ACA TTT GAT GAG ACT G	55	10	Liebhard et al. (2002)
37	MS06g03	CGG AGG GTG TGC TGC CGA AG GCC CAG CCC ATA TCT GCT	62	10	Liebhard et al. (2002)
38	CH-Vf1	ATC ACC ACC AGC AGC AAA G CAT ACA AAT CAA AGC ACA ACC C	60	1	Montanari et al. (2016)
39	CH-Vf2	TTT GTT TTT CGA GCA GGA GC TTT CAC ATT CGG AGC ATG AG	60	--	Montanari et al. (2016)
40	NZ02b1	CCG TGA TGA CAA AGT GCA TGA ATG AGT TTG ATG CCC TTG GA	55	15	Guilford et al. (1997)
41	NZ05g8	CGG CCA TCG ATT ATC TTA CTC TT GGA TCA ATG CAC TGA AAT AAA CG	55	4	Guilford et al. (1997)
42	NZ28f4	TGC CTC CCT TAT ATA GCT AC TGA GGA CGG TGA GAT TTG	55	12	Guilford et al. (1997)
43	GD 96	CGG CGG AAA GCA ATC ACC T GCC AGC CCT CTA TGG TTC CAG A	55	17	Hokanson et al. (1998)
44	AJ001681-SSR	CCCT GAG GTT ATT GAC CCA AAA CAC TCA GTT GGA AAA CCC TAC A	60	17	HiDRAS consortium
45	AU223486-SSR	TGA CTC CAT GGT TTC AGA CG AGC AAT TCC TCC TCC TCC TC	62	13	HiDRAS consortium
46	AU223548-SSR	ACC ACC ACT GCA GAG ACT CA GAC GCA CCC ATT CAT CTT TT	58	10	HiDRAS consortium
47	Hi02c07	AGA GCT ACG GGG ATC CAA AT GTT TAA GCA TCC CGA TTG AAA GG	60	1	HiDRAS consortium
48	Hi12c02	GCA ATG GCG TTC TAG GAT TC GTT TCA CCA ACA GCT GGG ACA AG	60	1	HiDRAS consortium
49	Hi08e04	GCA TGG TGG CCT TTC TAA G GTT TAC CCT CTG ACT CAA CCC AAC	60	4	HiDRAS consortium
50	S0506078	AGA AAG GCC CTC AAA CAG CTG CAG AAG GTG GGT ATG	55	15	Liu Y et al. (2017)
51	Hi04c10	TGC GCA TTT GAT AGA GAG AGA A GTT TAA CAA AGA ACG ACC CAC CTG	60	3, 4, 7, 16	HiDRAS consortium
52	Hi07d12	GGA ATG AGG GAG AAG GAA GTG GTT TCC TCT TCA CGT GGG ATG TAC C	60	7	HiDRAS consortium
53	Hi03d06	TCA TGG ATC ATT TCG GCT AA GTT TGC CAA TTT TAT CCA GGT TGC	60	3	HiDRAS consortium
54	Hi04b12	CCC AAA CTC CCA ACA AAG C GTT TGA GCA GAG GTT GCT GTT GC	60	8	HiDRAS consortium

55	Hi02a09	ATC TCT AAG GGC AGG CAG AC CTG ACT CTT TGG GAA GGG C	60	11	HiDRAS consortium
56	Hi01d01	CTG AAA TGG AAG GCT TGG AG GTT TAC CAA TTA GGA CTT AAA GCT G	60	9	HiDRAS consortium

(가) 실험 결과

- ① SSR 마커를 이용한 접수 2점(‘후지’, ‘홍로’), 대목 2점(M.9, M.26)에 대한 DNA profile을 구축함(표 2).

표 2. 사과 유래 SSR 마커를 이용한 ‘후지’, ‘홍로’, M.9, M.26에 대한 PCR 증폭산물의 크기.

No.	SSR	Genotype (bp)			
		후지	홍로	M.9	M.26
1	CH01d08	252 / 267	267 / 274	259	248 / 263
2	CH01f12	158 / 166	155 / 166	147	—
3	CH01h01	124 / 132	120 / 129	126 / 134	120
4	CH02a04	106 / 114	98 / 108	69 / 91	—
5	CH02a08	146 / 137	147 / 159	149 / 163	136 / 150
6	CH02b10	133 / 146	123 / 134	133 / 146	123
7	CH02b12	—	—	133 / 146	—
8	CH02c02a	148	138 / 148	139 / 152	—
9	CH02c06	249	233 / 240	253	—
10	CH02c09	242 / 254	264 / 292	255	249
11	CH02d08	216	231 / 237	223 / 234	220 / 230
12	CH02d11	136 / 145	123 / 131	139	138
13	CH02e02	126 / 133	126 / 137	125 / 132	128 / 135
14	CH02f06	—	—	150	140
15	CH02g01	222 / 230	226 / 233	215 / 235	211 / 231
16	CH03a02	-	126	138 / 142	—
17	CH03c02	132	132 / 139	130	130
18	CH03d10	171 / 181	168 / 182	172 / 181	166 / 171
19	CH03d12	120 / 128	121 / 128	102 / 116	—
20	CH03g06	168 / 173	141 / 172	152 / 166	143
21	CH03g07	120 / 127	127 / 137	118 / 125	—
22	CH03h06	168 / 174	149 / 169	155 / 165	158 / 168
23	CH04c06	180 / 187	181 / 187	185	169 / 182
24	CH04d02	118 / 125	117	121 / 132	—
25	CH04e03	199 / 217	203 / 208	189 / 207	191 / 207
26	CH04f03	194 / 199	191	186 / 192	182 / 195
27	CH05a02	133 / 137	132 / 136	133	132
28	CH05a04	192 / 198	154 / 180	169 / 178	—
29	CH05a05	220 / 232	218 / 221	198	201
30	CH05c06	103 / 133	105 / 114	121	—
31	CH05c07	116 / 136	130 / 150	139 / 148	124 / 138
32	CH05d03	179	163 / 172	186	170 / 182
33	CH05d04	163 / 194	162 / 194	198	191 / 208
34	CH05e03	164	165	162 / 173	—
35	CH05g05	142	111 / 142	110	—
36	MS02a01	—	176 / 185	186	177 / 190
37	MS06g03	180 / 191	156 / 167	166 / 188	173 / 186
38	CH-Vf1	169 / 175	145	143 / 166	—
39	CH-Vf2	—	—	77 / 84	—

40	NZ02b1	222 / 242	217	237	218 / 232
41	NZ05g8	—	119 / 127	122	120
42	NZ28f4	115 / 435	98 / 103	114	—
43	GD 96	177 / 184	178 / 184	172	—
44	AJ001681-SSR	173	188 / 197	184 / 193	189 / 199
45	AU223486-SSR	212 / 409	221 / 416	183	—
46	AU223548-SSR	261 / 276	165 / 274	274 / 280	269 / 277
47	Hi02c07	109 / 119	113 / 147	111 / 120	111 / 122
48	Hi12c02	162	181	163	170 / 179
49	Hi08e04	163 / 384	185 / 447	214	—
50	S0506078	142 / 330	143 / 330	—	—
51	Hi04c10	—	—	178	—
52	Hi07d12	—	—	240	—
53	Hi03d06	119 / 133	—	113	—
54	Hi04b12	—	—	140 / 156	—
55	Hi02a09	205 / 227	197 / 228	143 / 155	—
56	Hi01d01	—	194 / 223	191 / 211	192 / 209

② 기내순화 1주 후, 1년차 생육종료 샘플링 개체에 변이검정을 위한 노력과 비용을 절감하기 위해서 multiplex PCR이 가능한 마커들의 조합을 확인하고 적용가능성을 검토하였음(그림 2).

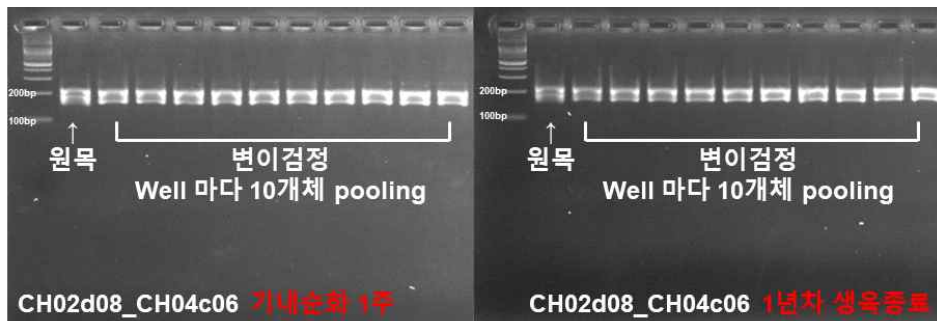


그림 2. M.26 조직배양 대목묘 multiplex PCR을 이용한 기내순화 1주 후, 1년차 생육종료 샘플링 개체에 대한 변이검정 결과.

- ③ M.26에 대하여 CH02d08+CH04c06를 적용하고, M.9에 대하여 CH02b10+CH02c06를 이용하여 변이검정을 위한 PCR을 수행한다면 비용과 노력을 반감시킬 수 있었음.
- ④ 변이검정을 위해 SSR마커를 적용한다면 multiplex PCR을 위한 SSR마커 조합을 확인할 필요성이 있을 것으로 판단됨.

라. 육묘 단계별 변이확인을 품종 동정시스템 구축

(가) 실험 방법

- ① 식물재료: 대목품종 모수 2점(M.9, M.26), M.9, M.26조직배양 대목묘 각 100점을 이용함.
- ② 샘플링 시기는 다음과 같음. (1) 기내 순화 1주후, (2) 1년차 생육 종료 시점
- ③ DNeasy Plant Mini Kit(Qiagen)을 이용하여 genomic DNA를 추출하고, 사과유래 SSR마커 56개를 이용하여 PCR 수행함.
- ④ 아가로스 전기영동 및 캐필러리 전기영동함.



⑤ 원종과 조직배양묘 전기영동 결과 비교를 통한 변이검정함.

마. 국내 사과 품종 특이적 CAPS마커 선발/적용 및 genotyping 데이터 구축

(가) 실험 방법

- ① 사과 연구소에서 보유 중인 유전자원 95점을 선발하여 DNeasy Plant Mini Kit(Qiagen)를 이용하여 genomic DNA를 추출함.
- ② 제한효소 *ApeKI*을 이용하여 GBS library 구축(그림 3).

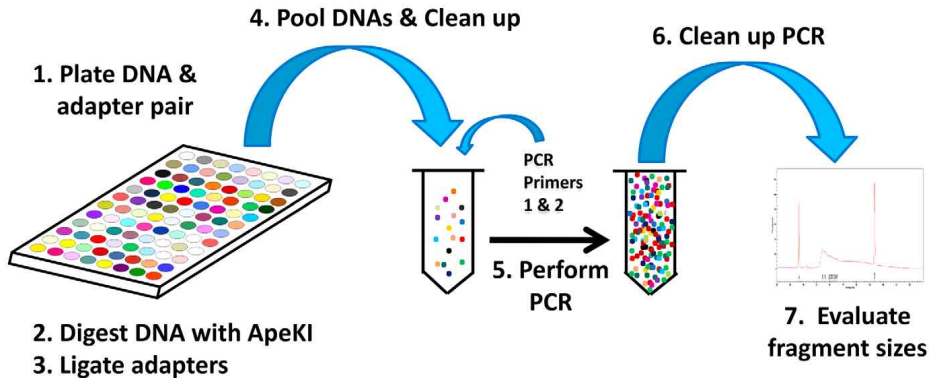


그림 3. 제한효소 *ApeKI*을 이용한 GBS library 구축.

- ③ Illumina Hiseq 2000을 사용하여 paired-end로 sequencing된 염기서열 정보를 Barcode 서열을 이용한 sequence demultiplexing 과정 후에 sequence quality에 따른 trimming 과정 수행함.
- ④ Clean reads를 reference genome과의 alignment를 수행하여 consensus sequence 작성함.
- ⑤ 프로그램을 이용하여 raw SNP를 detection함.
- ⑥ SEEDERS in-house script를 이용하여 샘플간의 SNP matrix 작성함.
- ⑦ 유의한 SNP 후보 선발을 위한 filtering 과정 수행함.
- ⑧ 다형성 후보 SNP에서 PIC값이 높은 SNP 50개를 CAPS 마커로 전환하기 위해 적합한 프라이머 및 제한효소 조합을 선발함.
- ⑨ 32개 국내 육성 품종의 genomic DNA를 DNeasy Plant Mini Kit(Qiagen)을 이용하여 추출함.
- ⑩ PCR 수행, PCR 산물의 제한효소를 처리함.
- ⑪ 아가로스 전기영동 및 캐필러리 전기영동을 수행함.
- ⑫ Genotyping 데이터를 구축함.
- ⑬ 사과 품종 판별을 위한 최소 마커셋 확인: MinimalMarker 이용함.

표 3. GBS 수행에 이용한 사과 유전자원 list.

No.	Cultivar	No.	Cultivar	No.	Cultivar	No.	Cultivar
1	후지	25	화홍	49	Mcintosh 2	73	태양5호
2	소백3호	26	Sekaiichi	50	메이플	74	홍무

3	나리타 후지	27	Early blaze	51	홍옥	75	홍월
4	라쿠라쿠 후지	28	Spur Early blaze	52	Aori No.2	76	능금
5	단홍	29	Golden delicious	53	조나골드	77	스캄골드
6	료카	30	Spur golden delicious	54	감홍	78	Granny smith
7	미얀마	31	Empress spur golden delicious	55	자홍	79	Ingrid Marire
8	아이카노카오리	32	Early Jonagold	56	진홍	80	Lady Williams
9	Highland Fuji	33	<i>M. mandshurica</i> 2330	57	Red Field	81	Moira
10	Maira Red	34	구미 홍로	58	Frey berg	82	Pilot
11	Jubilee Fuji	35	Cox orange pippin	59	소백2호	83	Prima
12	KIKU8 Fuji	36	썸머드립	60	아오리9호	84	Starking
13	피텍스	37	홍금	61	서홍	85	Charles Ross
14	야다카후지	38	홍소	62	<i>M. asiatica</i>	86	Charlotte
15	금왕자	39	Classic Red Delicious	63	홍로	87	팅커벨
16	만복	40	Mcintosh wijcik	64	Galaxy Gala	88	Columbia
17	시나노레드	41	<i>M. sargentii</i> Rosea	65	Gala	89	Pinova
18	시나노스위트	42	<i>M. prunifolia</i> Macrocarpa	66	아리수	90	Michaelmas Red
19	썸머킹	43	Modial Gala	67	양광	91	Alpinist
20	여홍	44	Royal Gala	68	히메카미	92	Aroma
21	홍안	45	대옥왕립	69	Scilate	93	Lodi
22	추광	46	로즈벨	70	왕령	94	Fantazia
23	화사	47	산사	71	중추	95	Kent
24	황옥	48	서왕	72	홍단		

(가) 실험 결과

- ① GBS분석 결과 95개의 품종에서 평균 5,952,000개의 trimmed read가 생성되었으며 평균 mapped reads는 3,970,000개로 약 66.65%였음.
- ② Mapped region은 평균 78,407이며, mapped region의 평균 depth는 22×였음.

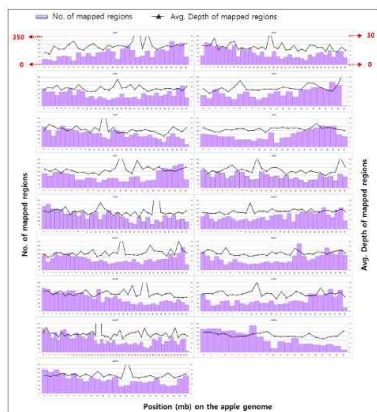


그림 4. ‘후지’의 mapped reads의 염색체별 분포

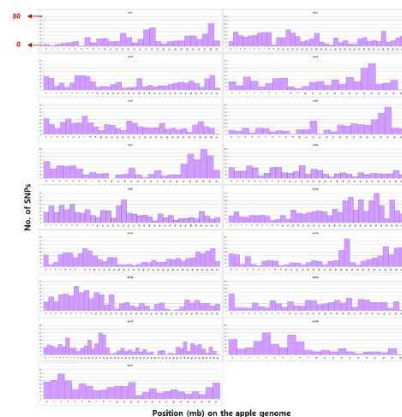


그림 5. 사과 유전체에서 12,014개 SNP의 분포

- ③ 사과 품종들 간 union SNP matrix를 작성하여 평균 52,379개의 SNP를 확인하였으며, 그 중 평균 31,458개의 homozygous SNP, 평균 10,650개의 heterozygous SNP를 탐색

하였음.

④ 16개 국내 육성 사과 품종 구분용 CAPS 마커를 개발하고 DNA profile 구축함(표4).

표 4. 국내 육성 사과 품종 구분을 위한 CAPS 마커의 정보.

Marker	Primer sequence (5' -3' )	Tm (°C)	Restriction enzyme	Fragment size after digestion (bp)
AE02	F: GGA TGC TTT CAC TAC CTC ACG R: CGC AAG AAG GTG ACA GAT AGC	60	<i>EcoRI</i>	198/267
AE04	F: GCC TGC TGC ACC TAC GTT TA R: TGG GAG CAT TTG AAT GAT GA	58	<i>EcoRV</i>	224/274
AE05	F: TTA AAG TGA CGA GGG GCA AG R: TGG TTC CAG AAC TAG GAG GAA	58	<i>EcoRI</i>	231/293
AE06	F: GAA GAT TCT TGC ACC CGA AA R: CAA AAC GCA CAT CAC CTC AC	60	<i>EcoRI</i>	197/266
AE07	F: CCT GAG CTG CCA AGG AAT AG R: TCA CAA GAT CGC AAG ATT GG	58	<i>EcoRI</i>	223/283
AE08	F: TGG TCA AAG TGA GGA GTC ACA R: TTG AAA CTG TTG GGG GTT TC	60.6	<i>EcoRI</i>	201/275
AE09	F: TGA TAG CCT GGT TTC TAT TTG TG R: TGG TTG GGC AAT AGA TTA GGA	60.6	<i>EcoRV</i>	205/274
AE10	F: AAA AAG TGG GCT CGG AGC TA R: TTA GGC TTC CGA AAC TTC ATTA	60.6	<i>EcoRV</i>	196/284
AE11	F: ATA GTT GCG AGA AGG CGA AG R: ACG GCG AAT CTA ACA ACT GC	60.6	<i>EcoRI</i>	232/303
AH12	F: CCT TCC GGC ACA AGA AGT TA R: ACT GCA AGG CTG GTG AGA TT	60.6	<i>HindIII</i>	239/289
AH14	F: GTA CGT GCA TGC AGT GTT CA R: GCA GAC TCT CTG TGA TTG AGC	58	<i>HindIII</i>	197/304
AN15	F: ACG TGG GCT GTC TGA GAA AT R: CGA TGT TGG AAC CAA TTT GA	58	<i>NdeI</i>	221/286
AN16	F: GTT CTT CTC CTC TGC GTT CG R: CAA ACA CTT TTC CGG TGC TT	60.6	<i>NdeI</i>	238/295
AP17	F: GCA GCT CCG CAA TAT CCT AC R: TGT CGA TTT GTC ATG CAA TTT T	60.6	<i>PvuII</i>	205/301
AP18	F: TGC TGC TAC ATT GGC ATT TC R: TCC AAT GGG TCA CCA AAT CT	62	<i>PvuII</i>	201/290
AX20	F: CAG AGC CAA GCA GTT TTT GA R: TGG ATC TTT TCG TGG AGA GG	60.6	<i>XbaI</i>	217/295

⑥ 16개 CAPS 마커를 이용한 주요 사과 품종 32점의 genotyping 데이터를 구축하고 (표 5), 일부 결과를 특허등록함(등록번호10-1905458-0000).

표 5. SNP-dCAPS 마커를 이용한 32점 국내 주요 사과 육성 품종에 대한 genotyping data.

No.	Cultivar	CAPS marker															
		AE02	AE04	AE05	AE06	AE07	AE08	AE09	AE10	AE11	AH12	AH14	AN15	AN16	AP17	AH18	AX20
1	아이카노카오리	ab	bb	ab	aa	ab	aa	ab	aa	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab
2	추광	ab	aa	bb	ab	aa	bb	ab	ab	bb	ab	ab	aa	bb	bb	ab	ab
3	Cox' s Orange Pippin	ab	ab	bb	aa	aa	bb	aa	ab	aa	bb	bb	bb	bb	bb	bb	bb
4	Earliblaze	ab	ab	bb	aa	aa	aa	aa	ab	bb	bb	ab	aa	ab	bb	bb	bb
5	후지	ab	ab	ab	ab	aa	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab
6	감홍	ab	aa	ab	aa	aa	ab	aa	bb	ab	ab	ab	aa	ab	bb	bb	bb
7	Golden Delicious	ab	bb	bb	aa	ab	bb	aa	ab	bb	bb	aa	aa	bb	bb	bb	bb
8	구미 홍로	ab	ab	bb	aa	ab	ab	aa	bb	bb	bb	ab	aa	bb	bb	bb	bb
9	히메카미	ab	ab	bb	aa	aa	aa	ab	ab	ab	bb	ab	ab	bb	ab	bb	bb
10	홍안	ab	ab	bb	aa	aa	ab	aa	bb	ab	bb	ab	aa	ab	ab	bb	bb
11	홍금	ab	ab	ab	aa	aa	bb	aa	bb	bb	bb	bb	ab	bb	ab	bb	bb
12	홍로	ab	ab	bb	aa	ab	ab	aa	bb	bb	bb	ab	aa	bb	bb	bb	bb
13	황옥	ab	bb	bb	ab	aa	ab	bb	ab	bb	ab	ab	aa	ab	aa	ab	ab
14	자홍	ab	ab	bb	aa	ab	ab	aa	bb	bb	bb	ab	aa	bb	bb	bb	bb
15	조나골드	ab	ab	bb	aa	ab	ab	ab	ab	bb	ab	ab	ab	bb	ab	bb	bb
16	홍옥	ab	ab	bb	aa	ab	aa	ab	ab	bb	ab	ab	ab	bb	ab	ab	ab
17	Kougetsu	ab	bb	bb	aa	aa	ab	ab	ab	bb	bb	ab	aa	bb	ab	ab	ab
18	만복	ab	ab	ab	ab	aa	aa	aa	aa	ab	ab	ab	aa	bb	ab	ab	ab
19	메이플	ab	aa	ab	aa	aa	ab	ab	bb	bb	ab	ab	aa	bb	bb	ab	ab
20	산사	ab	aa	bb	ab	ab	ab	ab	bb	bb	bb	ab	aa	bb	bb	ab	ab
21	서홍	ab	ab	bb	aa	ab	ab	aa	bb	bb	ab	bb	ab	bb	ab	bb	bb
22	시나노스위트	ab	ab	bb	aa	ab	ab	ab	bb	ab	ab	ab	bb	ab	ab	bb	bb
23	소백2호	ab	bb	bb	aa	aa	aa	aa	bb	bb	bb	ab	ab	bb	ab	ab	ab
24	소백3호	aa	bb	bb	aa	aa	ab	aa	bb	bb	ab	ab	ab	bb	bb	ab	ab
25	Spur Earliblaze	ab	ab	bb	aa	aa	aa	aa	ab	bb	bb	ab	aa	ab	bb	bb	bb
26	Spur Golden Delicious	ab	bb	bb	aa	ab	bb	aa	ab	bb	bb	aa	aa	bb	bb	bb	bb
27	썸머드림	ab	bb	bb	aa	bb	bb	aa	bb	bb	bb	ab	aa	bb	bb	bb	bb
28	썸머킹	ab	bb	bb	aa	ab	ab	aa	bb	bb	ab	aa	aa	bb	bb	bb	bb
29	쓰가루	ab	bb	bb	aa	bb	ab	aa	ab	bb	ab	ab	ab	bb	ab	bb	bb
30	야다카후지	ab	ab	ab	ab	aa	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab
31	여홍	ab	aa	bb	ab	ab	aa	ab	bb	bb	ab	bb	aa	ab	ab	ab	ab
32	Yoko	ab	ab	bb	aa	bb	ab	aa	ab	bb	ab	ab	ab	bb	ab	bb	bb

- ⑦ 16개 CAPS 마커 중에서 주요사과 품종 32점을 구분하기 위한 최소 마커셋 8가지를 도출함
- ⑧ 제한효소의 가지수가 적을수록 관별을 위한 노력과 비용이 절감되므로 3가지 제한효소만을 이용하여 구분이 가능한 Set1, Set3을 이용하는 것을 권장함.

- Set 1: AE04, AE07, AE08, AE09, AE10, AE11, AH12, AH14, AP18
- Set 2: AE04, AE07, AE08, AE09, AE10, AE11, AH12, AN15, AP18
- Set 3: AE04, AE07, AE08, AE09, AE10, AE11, AH12, AP17, AP18
- Set 4: AE04, AE07, AE08, AE09, AE10, AE11, AH12, AP18, AX20
- Set 5: AE04, AE07, AE08, AE09, AE10, AH12, AN15, AN16, AP18
- Set 6: AE04, AE07, AE08, AE09, AE10, AH12, AN15, AP18, AX20
- Set 7: AE04, AE07, AE08, AE09, AE10, AH12, AN16, AP17, AP18
- Set 8: AE04, AE07, AE08, AE09, AE10, AH12, AN16, AP18, AX20





## 2. 환경조절시설을 이용한 안정증식육묘법 개발

가. 조직배양하여 순화/발근된 사과무병대목(M.9/M.26) 재배를 위한 포트 종류/용적 선정

(1) 사과무병대목묘의 최적화된 포트 종류 확인

(가) 실험 방법

- ① 실험재료 : 조직배양을 순화/발근된 사과무병대목(M.9)
- ② 처리내용 : 포트용적 및 순화 대목묘 크기

구분	A	B	C	D
포트				
	φ 10cm × 15cm (≒1.2L)	φ 17cm × 20cm (≒4.5L)	φ 27cm × 35cm (≒20L)	재식간격 10cm × 20cm
구분	E	F	G	
묘 크기(cm)	5	10	15	

③ 양액 조성(mg·liter<sup>-1</sup>) : N 112, P 31, K 39, S 48.4, Mg 36.0, Fe 3.0, B 0.5, Mn 0.5, Zn 0.05, Cu 0.02, Mo 0.01, Na 0.004

④ 상토 : 원예용상토, 피트모스, 코코피트, 펄라이트를 각각 동일 비율로 조성함.

⑤ 양액조제시 Ca과 P을 섞일시 침전되어 불용화되므로 양액A, B로 분리구성하여 주 2회 총 70회 시비함.

⑥ 조사항목 : 수고, 기부상단 40cm 직경

(나) 실험 결과

① 포트가 가장 작은 1.2L(A)는 생육불량이 확인됨. 우량 대목의 중요 지표인 기부직경은 처리구간 차이는 확인되지 않음. 특히, 포트용적 1.2L(A)는 수고, 엽수, SPAD에서 열등하였으며, 이는 적은 포트 용적으로인한 낮은 배수성, 보수성에 기인한 것으로 판단됨 (그림 7).

② 한정된 면적의 온실내 재식 밀도와 생육안정성을 고려할 때, 최소 포트용적 4.5L가 적

합할 것으로 도출됨.

- ③ 5cm 묘는 정식시 외부환경에 크게 영향을 받았으며, 10cm 이상 크기의 대목묘는 초기 정식 후 생존율이 안정적이었음. 따라서, 최소 10cm 이상 크기의 묘를 정식하는 것이 적합할 것으로 생각됨.

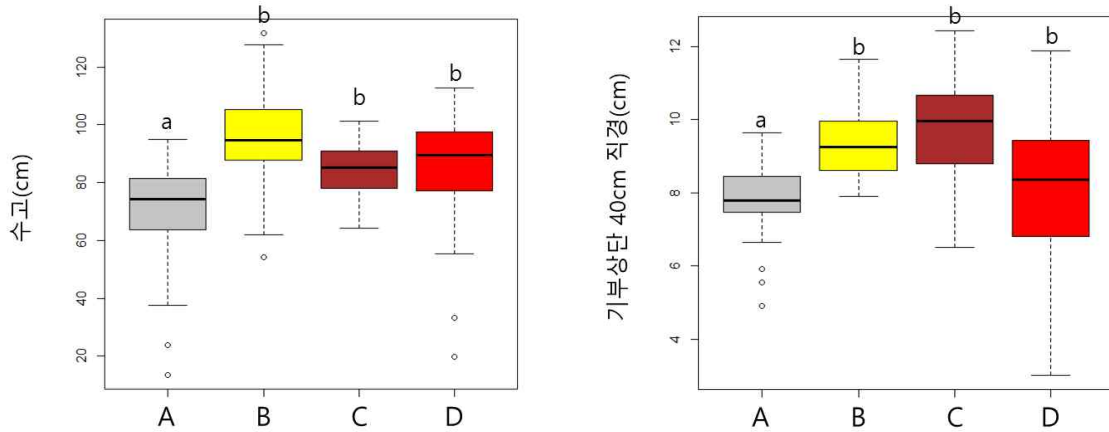


그림 6. M.9 대목묘 포트용적별 수고, 기부상단 40cm 직경 차이.

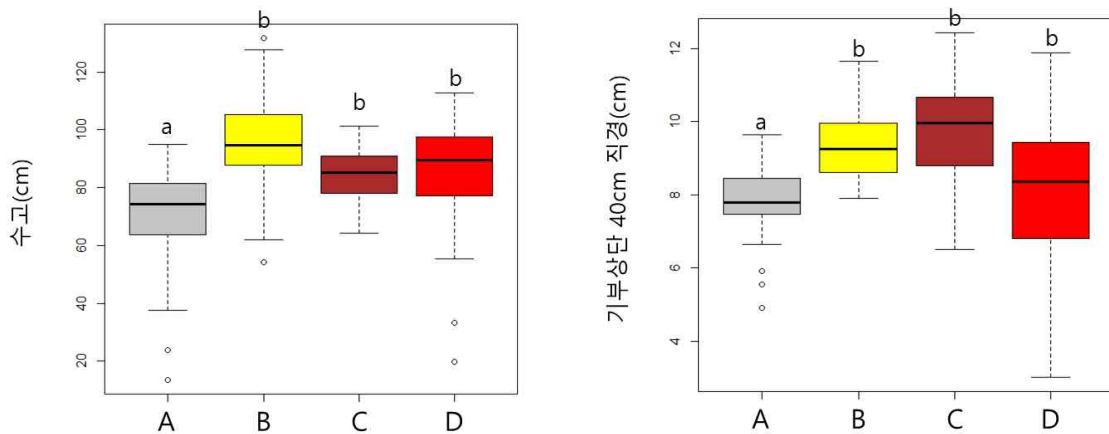


그림 7. M.9 대목묘의 재식시 크기별 수고, 기부직경 차이.

나. 접목을 실시하여 사과묘목을 재배하기 위한 적정 양액시비량 및 포트용적 선정

(1) 사과무병접목묘(‘후지’/M.9)의 포트 재배를 위한 양액조성 및 적정 시비량 확인

(가) 실험 방법

- ① 실험재료 : ‘후지’/M.9
- ② 처리내용 : 질소시비량

구분	A	B	C	D
질소시비량 (mg·liter <sup>-1</sup> )	56	112	224	448

③ 기타(mg·liter<sup>-1</sup>) : P 31, K 39, S 48.4, Mg 36.0, Fe 3.0, B 0.5, Mn 0.5, Zn 0.05, Cu 0.02, Mo 0.01, Na 0.004



- ④ 상토는 원예용상토, 피트모스, 코코피트, 펠라이트를 각각 동일 비율로 조성
- ⑤ 포트용적 :  $\phi 36\text{cm} \times 46\text{cm}$ ( $\approx 46.8\text{L}$ )
- ⑥ 양액조제시 Ca과 P을 섞일시 침전되어 불용화되므로 양액A, B로 분리구성하여 주 2회 총 70회 시비
- ⑦ 조사항목 : 수고, 신초장, 15cm 이상 측지수, 간주직경, SPAD, 수체 영양소 분석

(나) 실험 결과

- ① 기타 영양원소별 과부족 증상 유·무 확인 : 특이사항 없음(그림 8)
- ② 수고는 모든 처리구에서 유의적인 차이가 없었으며, 15cm 이상 측지수와 간주직경은 질소시비량에 정비례하는 것을 확인하였음. 4mM의 질소시비량(A)은 측지수가 1.3개로 우량묘의 기준을 만족하지 못하였음.
- ③ 수고, 신초장, 15cm 이상 측지수, 간주직경, SPAD값, 수체내 필수영양원소 함량 변화를 고려하였을 때, 필수영양원소 N 112, P 31, K 39, S 48.4, Mg 36.0, Fe 3.0, B 0.5, Mn 0.5, Zn 0.05, Cu 0.02, Mo 0.01, Na 0.004로 조성된 양액을 생육기중 70회 시비가 우량묘 생산에 적합한 것으로 결론 내리고, 추후 실험에 공통적으로 적용하였음.

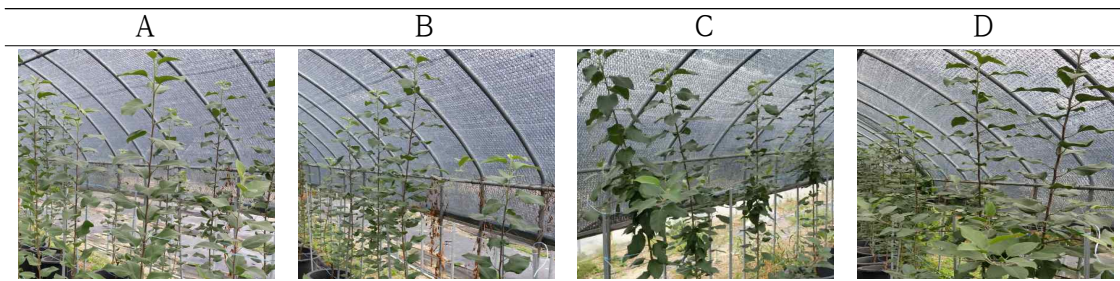


그림 8. 질소시비량별 ‘후지’ /M.9 접목묘의 생육결과.

(2) 사과무병접목묘( ‘후지’ /M.9)의 포트재배를 위한 적정 포트 용적 확인

(가) 실험 방법

- ① 실험재료: ‘후지’ /M.9
- ② 처리내용: 포트용적

구분	A	B	C	D	E
용량	$\phi 10\text{cm} \times 15\text{cm}$ ( $\approx 1.2\text{L}$ )	$\phi 17\text{cm} \times 20\text{cm}$ ( $\approx 4.5\text{L}$ )	$\phi 27\text{cm} \times 35\text{cm}$ ( $\approx 20\text{L}$ )	$\phi 36\text{cm} \times 46\text{cm}$ ( $\approx 46.8\text{L}$ )	$\phi 66\text{cm} \times 50\text{cm}$ ( $\approx 171\text{L}$ )

- ③ 양액 조성( $\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ ) : N 112, P 31, K 39, S 48.4, Mg 36.0, Fe 3.0, B 0.5, Mn 0.5, Zn 0.05, Cu 0.02, Mo 0.01, Na 0.004
- ④ 상토는 원예용상토, 피트모스, 코코피트, 펠라이트를 각각 동일 비율로 조성
- ⑤ 양액조제시 Ca과 P을 섞일시 침전되어 불용화되므로 양액A, B로 분리구성하여 주 2회 총 70회 시비함.
- ⑥ 조사항목 : 수고, 신초장, 15cm 이상 측지수, 간주직경





- ③ 양액 조성(mg·liter<sup>-1</sup>) : N 112, P 31, K 39, S 48.4, Mg 36.0, Fe 3.0, B 0.5, Mn 0.5, Zn 0.05, Cu 0.02, Mo 0.01, Na 0.004
- ④ 포트용적 :  $\phi$  27cm × 35cm (≒20L)
- ⑤ 양액조제시 Ca과 P을 섞일시 침전되어 불용화되므로 양액A, B로 분리구성하여 주 2회 총 70회 시비함.
- ⑥ 조사항목 : 수고, 신초장, 15cm 이상 측지수, 간주직경

(나) 실험 결과

- ① 간주 직경을 제외한 모든 처리구에서 유의차 없었으며, 모든 처리구는 간주직경이 우량묘의 기준(1.2cm)을 만족하였기 때문에 원예용 상토만으로도 1년생 접목묘의 재배에 충분한 것으로 판단 됨(그림 10).

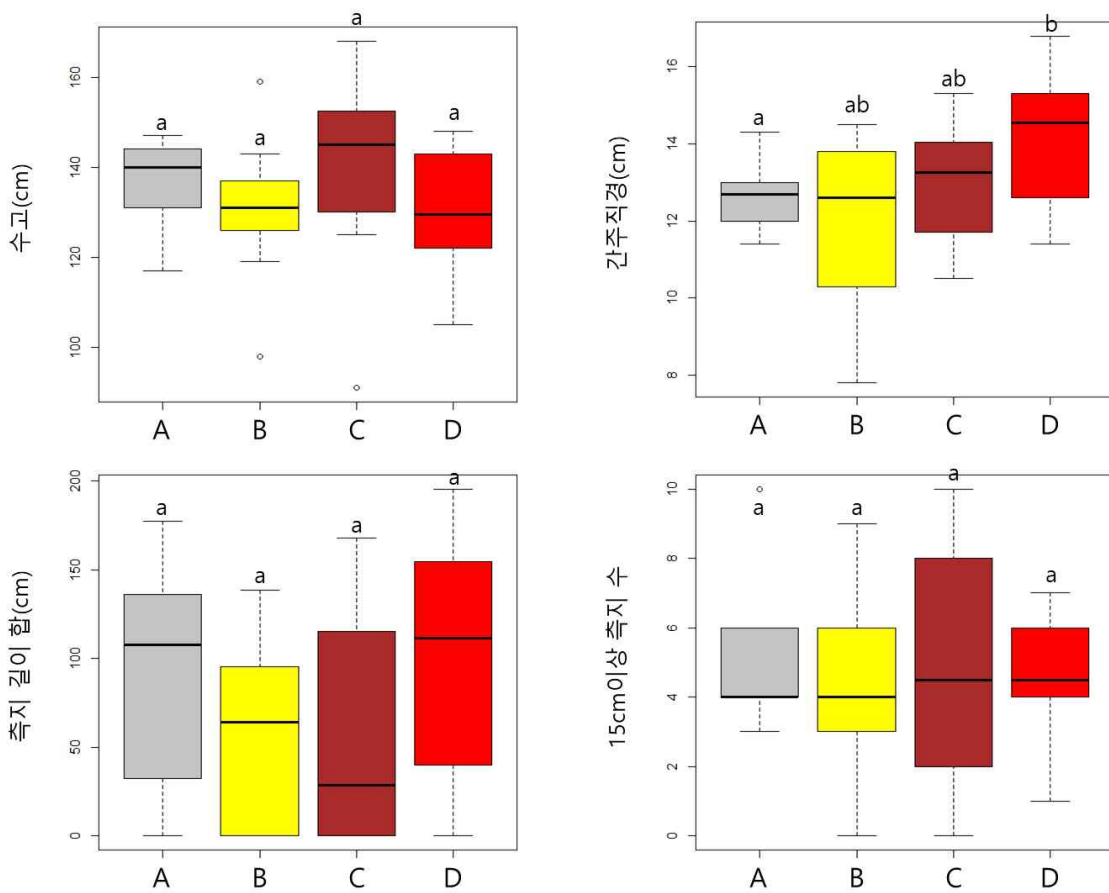


그림 10. 배지조성별 ‘후지’ /M.9 사과접목묘의 생육.

(2) 조직배양 무병대목묘(M.9)의 포트재배를 위한 적정 배지조성 확인

(가) 실험 방법

- ① 실험재료 : 조직배양을 순화/발근된 사과무병대목(M.9)
- ② 처리내용 :

구분	A	B	C	D
배지조성	1:1:1:1	1:0:2:1	2:0:1:1	1:0:0:0
(원예용상토:피트모스:코코피트:필라이트)				

- ③ 양액 조성(mg·liter<sup>-1</sup>) : N 112, P 31, K 39, S 48.4, Mg 36.0, Fe 3.0, B 0.5, Mn 0.5, Zn 0.05, Cu 0.02, Mo 0.01, Na 0.004
- ④ 포트용적 : ϕ 17cm × 20cm (≒4.5L)
- ⑤ 양액조제시 Ca과 P을 섞일시 침전되어 불용화되므로 양액A, B로 분리구성하여 주 2회 총 70회 시비함.
- ⑥ 조사항목 : 수고, SPAD, 기부직경, 기부상단 40cm 직경

(나) 실험 결과

- ① 수고, 기부 직경, 기부상단 40cm 직경, SPAD에서 처리구간 차이가 없었으며, 모든 처리구가 기부상단 40cm 직경이 우량대목묘의 판정기준인 1cm를 모두 만족하였음. 대목묘의 1년차 성장에는 원예용상토만을 이용하여 배지조성을 하여도 충분한 것으로 판단됨 (그림 11).

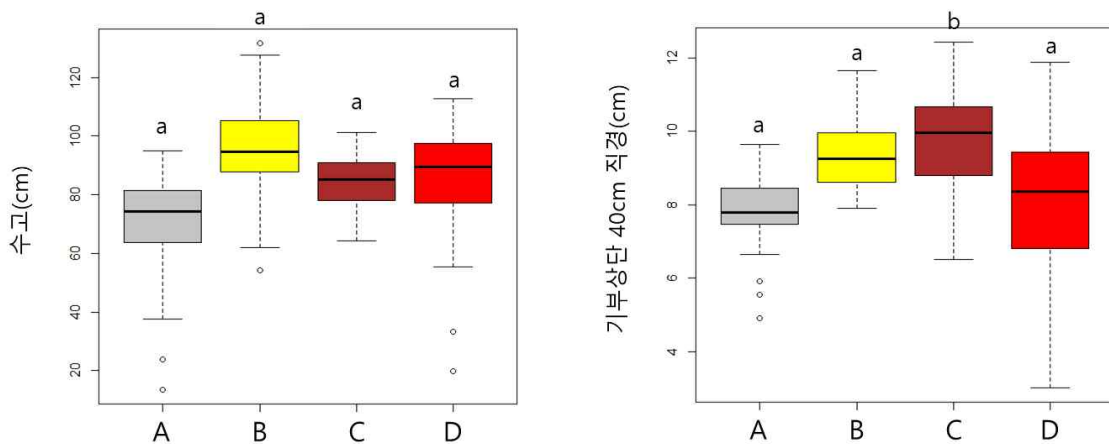


그림 11. 배지조성별 조직배양대목묘(M.9)의 수고와 기부 상단 40cm 직경.

라. 지상부 환경 조성에 따른 사과무병종묘의 최적생육환경 개발

- (1) 사과무병접목묘( '후지' /M.9)의 포트 재배시 생육에 대한 차광의 영향 확인

(가) 실험 방법

- ① 실험재료 : 조직배양을 순화/발근된 사과무병대목(M.9)
- ② 처리내용 :

구분	차광
A	무차광
B	70%차광
C	90%차광

- ③ 양액 조성(mg-liter<sup>-1</sup>) : N 112, P 31, K 39, S 48.4, Mg 36.0, Fe 3.0, B 0.5, Mn 0.5, Zn 0.05, Cu 0.02, Mo 0.01, Na 0.004
- ④ 상토 : 원예용상토
- ⑤ 포트용적 :  $\phi$  27cm × 35cm (≒20L)
- ⑥ 양액조제시 Ca과 P을 섞일시 침전되어 불용화되므로 양액A, B로 분리구성하여 주 2회 총 70회 시비함.
- ⑦ 조사항목: 수고, 측지길이 총합, 15cm 이상 측지수, 간주직경

(나) 실험 결과

- ① 수고, 간주 직경은 모든 처리구에서 유의차가 확인되지 않았음(그림 12).
- ② 대조구인 무차광이 차광 처리구에 비해 15cm 측지수와 측지길이 총합이 보다 나은 것을 확인함. 이를 통해 전 생육기 동안 온실 재배시 차광을 최소화하는 것이 우량묘 중요지표인 15cm 이상 측지 수 확보에 필수적인 것으로 판단됨.

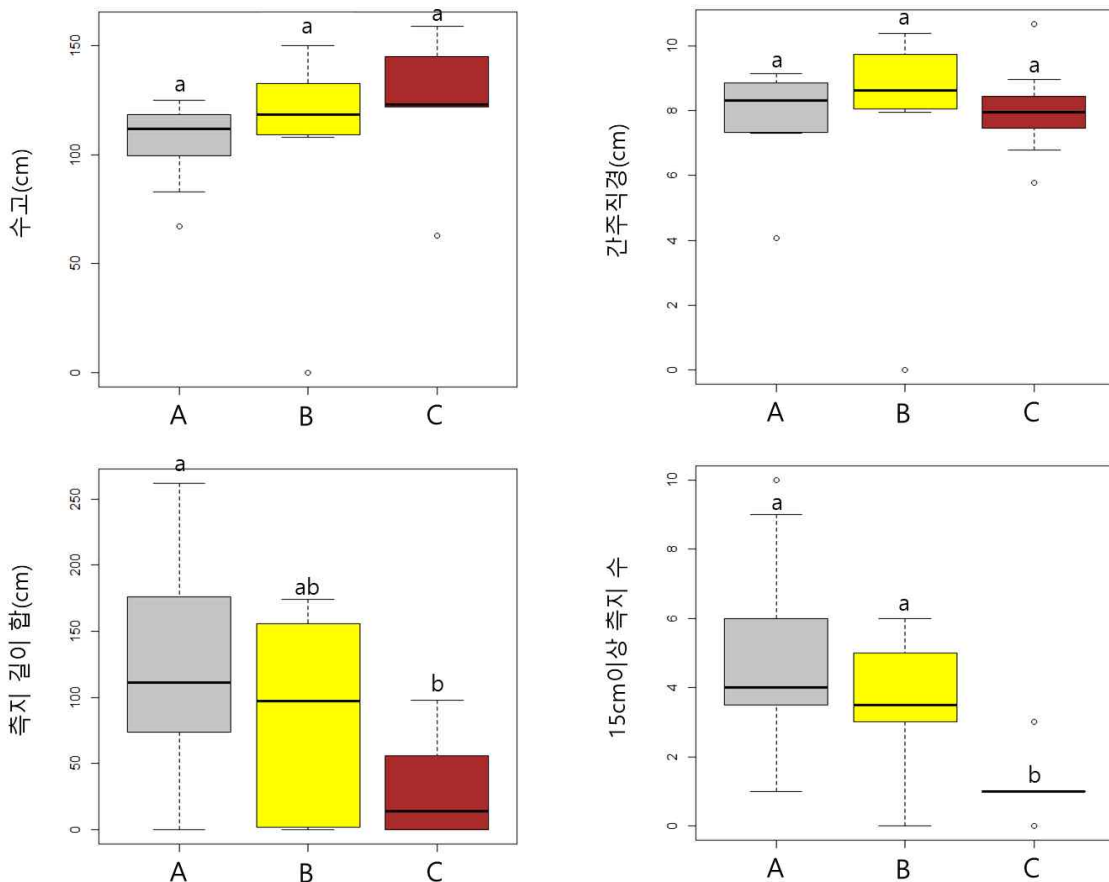


그림 12. 차광처리정도에 따른 ‘후지’ /M.9 접목묘의 생육.

(2) 차광처리와 질소시비 농도가 조직배양 대목묘(M.9) 생육에 미치는 영향을 확인.

(가) 실험 방법

- ① 실험재료 : 조직배양을 순화/발근된 사과무병대목(M.9)
- ② 처리내용 :

구분	A	B	C	D
차광	무차광	무차광	90%차광	90%차광
질소 시비 농도	8mM	16mM	8mM	16mM

- ③ 기타(mg·liter<sup>-1</sup>) : P 31, K 39, S 48.4, Mg 36.0, Fe 3.0, B 0.5, Mn 0.5, Zn 0.05, Cu 0.02, Mo 0.01, Na 0.004
- ④ 상토 : 원예용상토
- ⑤ 포트용적 : ϕ 17cm × 20cm (≒4.5L)
- ⑥ 양액조제시 Ca과 P을 섞일시 침전되어 불용화되므로 양액A, B로 분리구성하여 주 2회 총 70회 시비함.
- ⑦ 조사항목 : 수고, SPAD, 기부직경, 기부상단 40cm 직경

(나) 실험 결과

- ① 질소시비 농도에 따른 생육의 차이는 확인되지 않았으나, 차광 처리구에 비해 무차광 처리구가 수고가 높은 것으로 확인되었음. 기부상단 40cm 줄기 직경은 무차광 처리구(A, B)가 차광처리구(C, D)에 비해 큰 것으로 확인되었음. 따라서 차광처리구는 도장한 것으로 판단됨 (그림 13).
- ② 적정 대목의 줄기직경인 1cm를 만족하기 위해서는 온실 내 재배시 광 차단은 최소화 하며 8mM 이상 농도의 질소시비가 적합한 것으로 도출함.

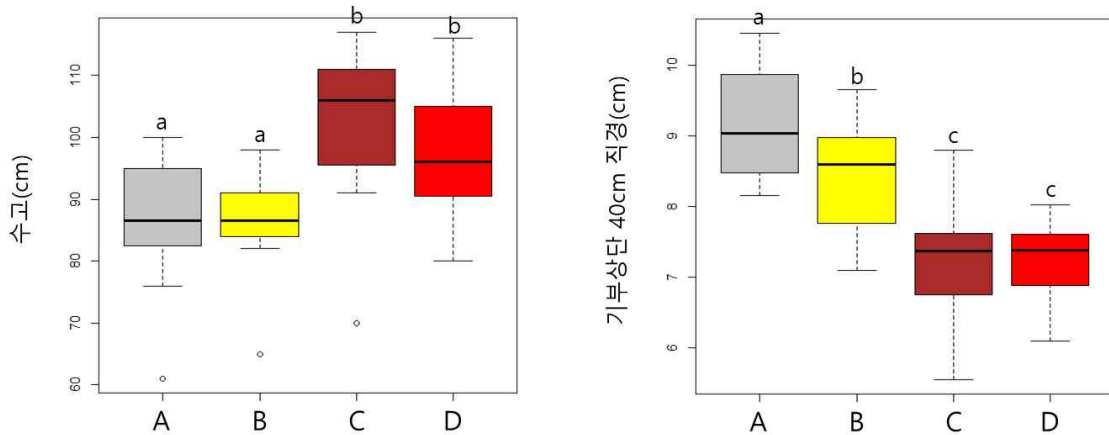










그림 13. 질소시비농도와 차광처리별 조직배양대목묘(M.9)의 생육.

마. 사과무병포트종묘의 타당성 확립 및 시설 사과무병종묘 포트재배 기술 개발

- (1) 사과무병접목묘(‘후지’/M.9)의 포트재배를 위한 적정 포트용적과 양액시비량 확인

(가) 실험 방법

- ① 실험재료 : ‘후지’/M.9
- ② 처리내용 :

구분	A	B	C	D
양액시비횟수	주2회	주2회	주2회	주2회
	4.5L	9.1L	13.8L	20L
포트용적				
구분	E	F	G	H
양액시비횟수	주3회	주3회	주3회	주3회
	4.5L	9.1L	13.8L	20L
포트용적				

- ③ 양액 조성(mg·liter<sup>-1</sup>) : N 112, P 31, K 39, S 48.4, Mg 36.0, Fe 3.0, B 0.5, Mn 0.5, Zn 0.05, Cu 0.02, Mo 0.01, Na 0.004
- ④ 상토 : 원예용상토
- ⑤ 양액조제시 Ca과 P을 섞일시 침전되어 불용화되므로 양액A, B로 분리구성하여 주 2회 총 70회 시비함.
- ⑥ 조사항목 : 수고, 신초장, 15cm 이상 측지수, 간주직경

#### (나) 실험 결과

- ① 수고, 간주 직경은 20L(D)가 기타 처리구에 비해 우수하였으나, 15cm 이상 측지수와 측지길이 총합은 모든 처리구에서 유의차가 확인되지 않았음.
- ② 포트용적 4.5L (A,E)는 하절기 외부환경의 영향에 따라 지하배지 환경의 유지가 어려워 대부분이 고사하였으며 최소 포트용적은 9L이상이 필요한 것으로 판단됨.
- ③ 주 2, 3회 양액시비횟수 처리구간 유의차가 확인되지 않았음.
- ④ 양액 시비를 위한 경제성을 고려할 때, 20L 포트용적(D)에 주2회 양액시비를 하는 것이 우량묘 생산을 위해 가장 적합할 것으로 판단됨
- ⑤ 접목묘의 포트재배를 위해서는 최소 20L의 포트 용적이 필요하다는 것을 재확인 하였음.

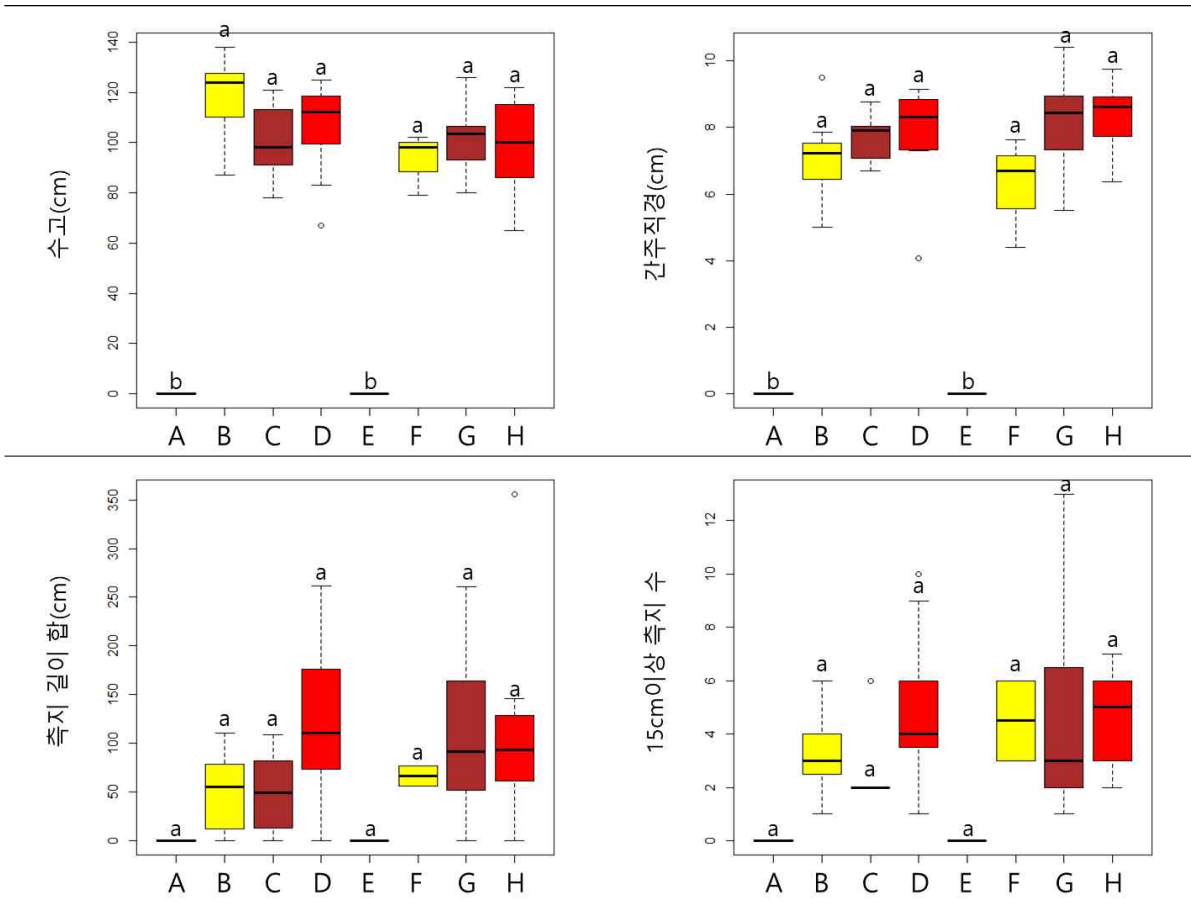


그림 14. 질소시비와 포트크기별 ‘후지’ /M.9 접목묘의 생육.

(2) 사과무병접목묘의 포트재배를 위한 포트 규격의 확인

(가) 실험 방법

- ① 실험재료 : ‘자홍’ /M.9(A), ‘시나노골드’ /M.9(B), ‘후지’ /M.9(C)
- ② 처리내용 :

구분	D	E	F
사진			
포트규격(cm)	가로 × 세로 × 높이 14 × 14 × 20	가로 × 세로 × 높이 (24 × 24 × 43)	직경 × 높이 27 × 35

- ③ 기타(mg·liter<sup>-1</sup>) : P 31, K 39, S 48.4, Mg 36.0, Fe 3.0, B 0.5, Mn 0.5, Zn 0.05, Cu 0.02, Mo 0.01, Na 0.004

- ④ 상토 : 원예용상토

- ⑤ 양액조제시 Ca과 P을 섞일시 침전되어 불용화되므로 양액A, B로 분리구성하여 주 2회 총 70회 시비
- ⑥ 조사항목 : 수고, 신초장, 15cm 이상 측지수, 간주직경

(나) 실험 결과

- ① ‘시나노폴드’ 는 수고, 간주직경, 측지길이 총합, 15cm 이상 측지수가 ‘후지’, ‘자홍’ 에 비해 낮았으며, 포트크기와 품종 간 상호작용은 확인되지 않았음 (그림 15).
- ② 세 가지 품종 모두에서 포트용적 4.5L(D)는 수고, 간주직경, 측지길이 총합, 15cm 이상 측지수가 20L(E, F)에 비해 열등한 것을 확인하였음.
- ③ 수고를 제외한 간주직경, 측지길이 총합, 15cm이상 측지수 모두는 포트의 20L (24×43 cm)이 가장 우수하였음.
- ④ 수체생육결과와 재식밀도를 고려하였을 때, 사과무병접목묘의 포트재배를 위해서는 포트용적 20L (24×43 cm)를 이용하는 것이 적합할 것으로 생각됨.
- ⑤ ‘시나노폴드’ 의 경우 우량묘의 비중을 만족시키기 위해서는 추가적인 양액시비 횟수 증가처리 등의 처리가 필요할 것으로 판단됨.

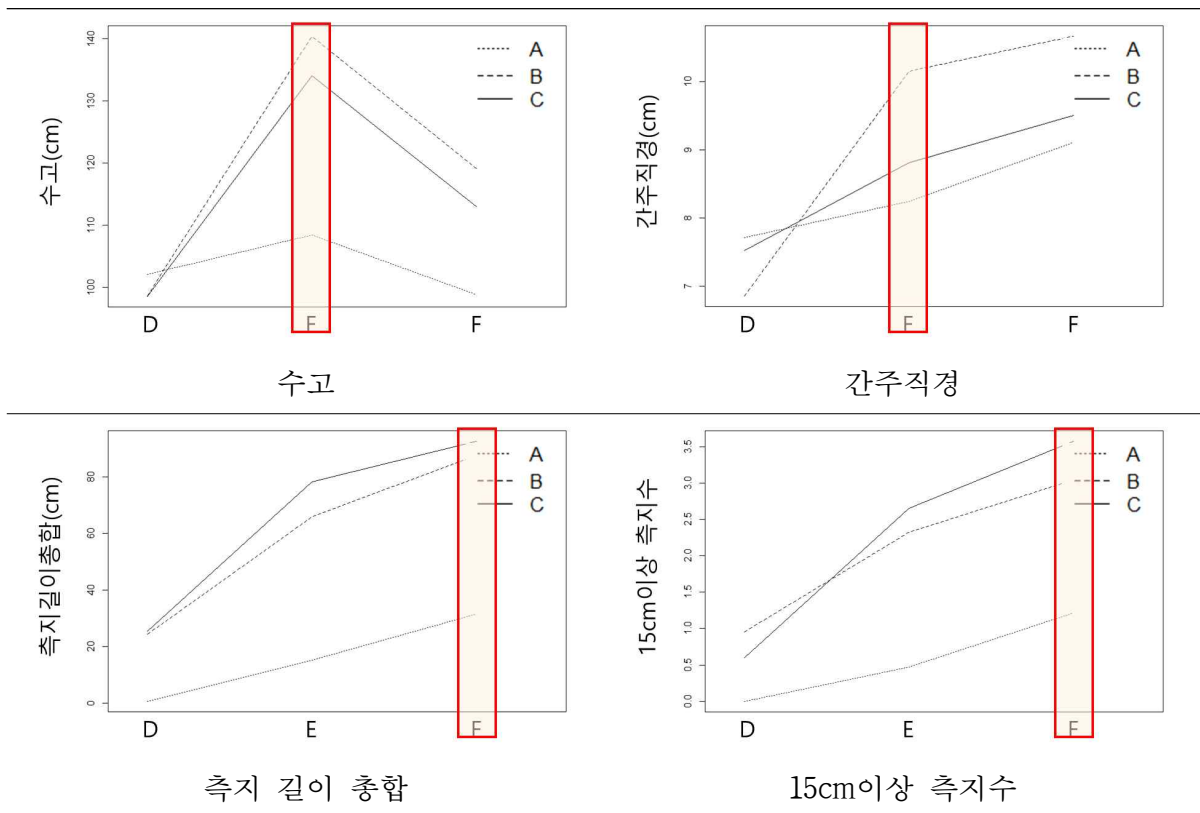


그림 15. 품종 및 포트 규격별 사과무병접목묘의 생육.





그림 16. 포트재배를 통한 ‘후지’ /M.9 접목묘 수확. 좌: 재식직후, 우: 수확직후.

### (3) 사과무병포트묘의 영양생장 및 과실 특성 확인

#### (가) 실험 방법

- ① 실험재료 : 2016년 포트재배 실험에서 확보한 ‘후지’ /M.9 접목묘(10주)
- ② 2018년 3월 ‘후지’ /M.9 일반묘(10주)를 충북대학교 과수원에 식재
- ③ 조사항목 : 측지발생, 측지길이, 수고, 간주직경, 과실 특성

#### (나) 실험 결과

- ① 2년차(2016년) 재배실험에서 확보한 ‘후지’ /M.9 포트묘(10주)를 2017년 3월 충북대학교 과수원에 재식하였으며, 2018년 3월 ‘후지’ /M.9 일반묘(10주)를 충북대학교 과수원에 재식하여 영양생장 특성을 비교하였으나, 포트묘와 일반묘 간 뚜렷한 영양생장시 특성 차이는 확인되지 않았음.
- ② 2017년(본토재식1년차)은 영양생장의 촉진을 위해서 모두 적과를 실시하였으며, 2018~2019년에 착과시킨 후에 각 시기별 과실의 발달 과정을 추적 관찰하였음. 기형과 혹은 생육부진의 현상은 관찰되지 않았음. 전체적인 과실비대 및 착색을 포함한 생육은 포트묘와 일반묘 간 차이를 확인할 수 없었음(그림 17).



<제2세부 : 사과 왜성대목 및 상업적품종 무병종묘 대량생산 기술 개발>

1. 지역산업체로부터 우량 왜성대목 2품종 확보

가. 우량 왜성대목 2품종 확보

- (1) 모본 바이러스 분석완료 : ASPV 등 4종
- (2) M.9, M.26에서는 4종 바이러스 무검출
  - (가) EMLA에서 ASGV 검출
  - (나) M.9, M.26 초대배양용 모본으로 선정

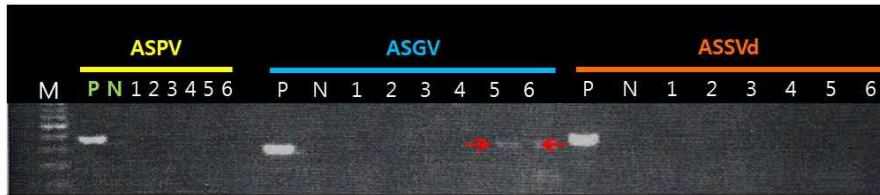


그림. 조직배양용 모본의 바이러스 PCR 분석결과.

나. 무병주 유도를 위한 초대배양

(1) 왜성대목용 모본의 초대배양 기술개발

(가) 우량 왜성대목 품종 확보완료: M.9, M.26

(나) 초대배양 조건 구명

① 표면살균 : 70% et-OH 30sec + 2% NaOCl 10min + SW로 수세(3회)

② 초대배양용 배지 조성 확립

㉠ MS 배지 + BA 0.1mg/L + activated charcoal (AC) 0.1g/L + sucrose 3% + agar 9.4g/L

(다) 초대배양을 통한 클린묘 확보

① 초대배양 5회 완료 : 총 484점

㉠ EMLA 164점, M.9 160점, M.26 160점

㉡ 경정배양 4회, 마디배양 1회

표. 초대배양 4주 후 품종별 생존율.

Individual	No. of cultured plants	No. of surviving plants (%)	No. of developing shoots	No. of contaminated plants	Necrosis (ea)
EMLA	164	38 (23.17)	4	105	21
M.26	159	11 (6.92)	4	140	8
M.9	160	14 (8.75)	2	90	56

② 우량 왜성대목 2품종의 기내 식물체 확보: M.9, M.26

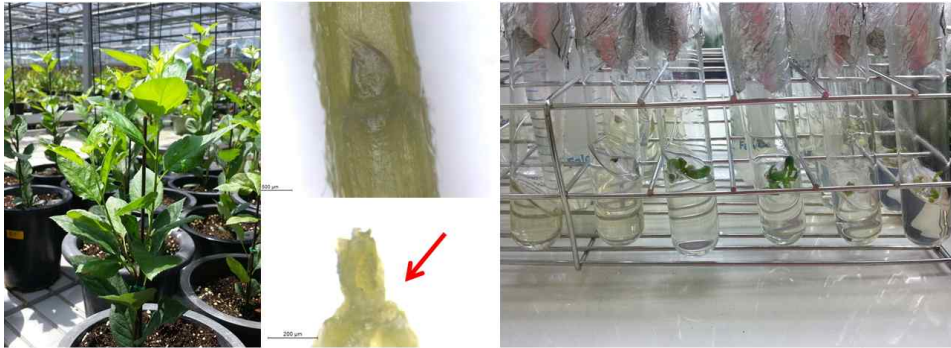


그림. 왜성대목 2품종(M.9, M.26)의 기내 초대배양.

2. 왜성대목 무병묘 품종별 100주 이상 확보

가. 무병화율 증진 기술 개발

(1) 경정배양

(가) 경정크기 구멍 시험

① 경정배양용 배지: MS 배지 + BA 0.1mg/L + AC 0.1g/L + sucrose 3% + agar 9.4g/L

② 처리내용 : 경정(shoot-tip) 크기 1 ~ 5mm

③ 결과

㉠ 신초크기 4mm 이상에서 생존율 100%

㉡ 3mm 이하에서는 생존율 80% 이하였음.

㉢ 고온 및 항바이러스제 처리시 경정크기는 4mm로 채취하여 접종하는 것이 적합.

㉣ 경정 5mm로 접종시 배양 2주 후 1cm 이상 발달하는 신초비율이 32%로 가장 높음.

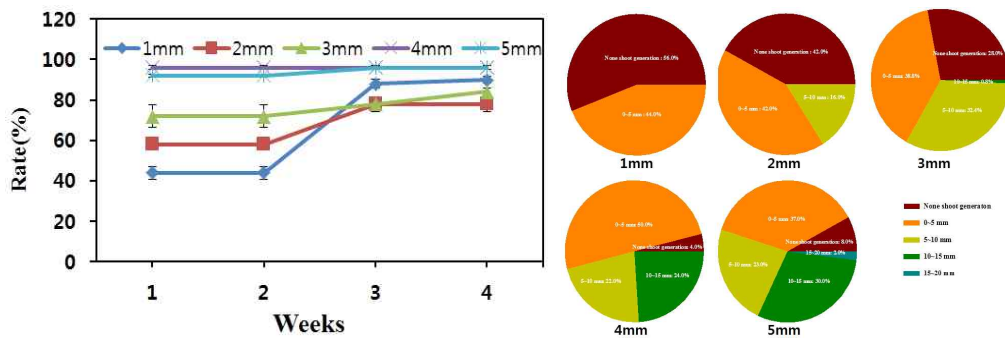


그림. 경정크기별 신초 생존율 및 발달율.

(나) 경정 발달을 위한 최적 광질조건 구멍 시험

① 경정배양용 배지 : MS 배지 + BA 0.1mg/L + AC 0.1g/L + sucrose 3% + agar 9.4g/L

② 처리내용 : Red, Blue, R:G:B = 2:1:1, R:B = 1:1, R:B = 2:1, 형광등(FL, 대조구)

㉠ 배양기간 : 총 5주

㉡ 광량 :  $30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  PPF

③ 결과

- ㉔ 신초 재생율은 R:B 1:1에서 85% 이상으로 대조구 대비 130% 이상 증가되었음.
- ㉔ 단일광인 적색광(R)과 청색광(B)는 각각 40, 48%로 복합광에 비해 신초 재생이 저조하였음.
- ㉔ 신초의 발달 역시 복합광 중 R=B 1:1에서 5mm 이상 발달한 신초의 비율이 60% 이상으로 높아서 가장 좋았음(대조구 FL 25%).

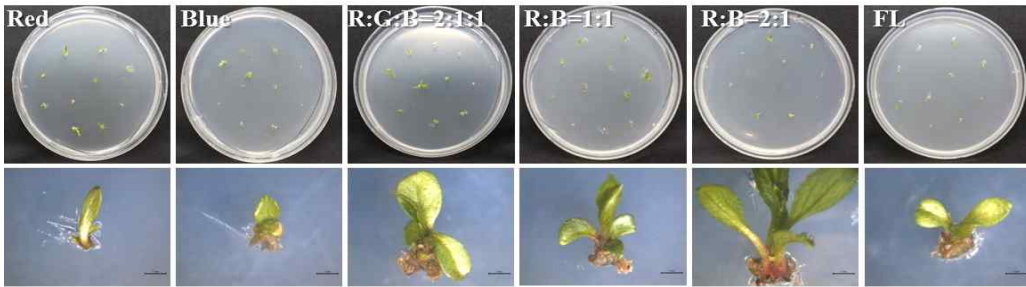


그림. 광질에 따른 경정배양시 신초 발달.

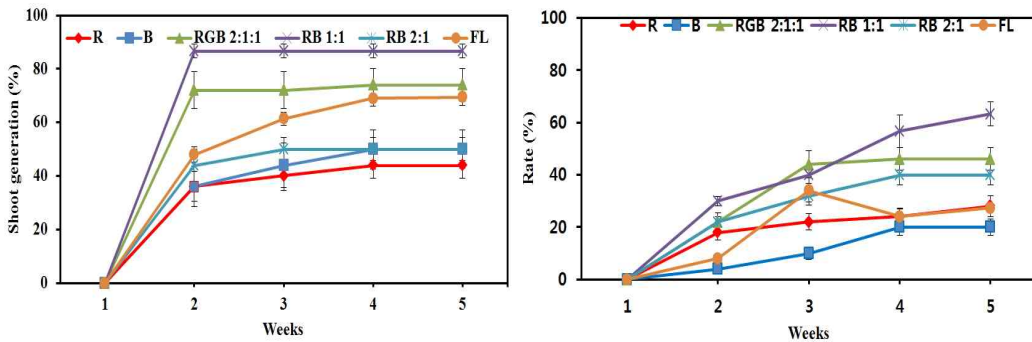


그림. 광질에 따른 신초 재생율 및 크기.

(2) 고온처리, ribavirin 등 처리농도 구명

(가) 물리, 화학적 무병화 처리

① 물리적 처리 : 경정의 고온처리

㉔ 경정 크기 : 위 실험에서 4mm로 결정.

㉔ 처리 온도 및 기간 : 38°C, 1-3일

② 화학적 처리 : 항바이러스제(ribavirin) 처리

㉔ 처리농도 : 0 - 30 μg/ml

㉔ 처리방법 : 경정배양 배지내 처리

㉔ 배양기간 : 5주

㉔ 분석 : 처리 5주 후 성장배지로 옮겨 4주간 성장유도 후 생육 조사

③ 대량증식을 위한 품종별 무병주 확보

(나) 증식용 기내배양묘 확보 완료

① M.9: 630주, M.26: 240주



그림. 증식용 기내배양묘.

② 품종별 성장 특성

- ㉠ M.9이 전반적으로 생체중, 신초장, 잎수 등 생장이 양호함.
- ㉡ 발근은 뿌리 길이, 뿌리 수 등에서 M.26이 양호한 경향이었음.

표. 왜성대목 2품종의 기내생장.

	Shoot length (cm)	Stem thickness (mm)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Root length (cm)	Root number (ea)	Leaf length (cm)	Leaf number (ea)
M.9	3.0±0.1	1.4±0.1	0.5±0.0	106.5±4.1	1.5±0.2	4.2±1.2	2.0±0.1	18.7±0.5
M.26	2.2±0.0	1.1±0.1	0.3±0.0	53.2±3.6	2.3±0.2	6.5± 0.4	1.9±0.1	16.7±0.7

③ 기내배양용 배지 조건 확립

- ㉠ 경정배양용 배지 : MS + BA 1.0 mg/L + charcoal 0.1 g/L + 3% sucrose + agar 9.4 g/L
  - ㉡ 증식 배지 : MS + BA 1.0 mg/L + IBA 0.3 mg/L + GA<sub>3</sub> 0.5 mg/L + 3% sucrose + agar 9.4 g/L
  - ㉢ 발근 배지 : MS + IBA 0.5 mg/L + 3% sucrose + agar 9.4 g/L
- (다) 제3세부로 순화 실험을 위한 기내배양묘(M.9) 총 4,000주 제공

3. 배양단계별 품종별 최적화 배양조건 구명 및 시스템화

가. 배양단계별 품종별 증식조건 최적화

(1) 성장조절제 종류와 농도에 따른 다신초 증식 조건 구명

(가) 실험 방법

- ① 기본 배지 : MS + sucrose 3% + agar 9.4mg/L
- ② 배양기간 : 총 4주
- ③ 배양환경 : 명배양(40 μmol · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup> PPF), 24±1℃

(나) 결과

- ① TDZ 사용 배지에서 신초 수가 적고 발생한 신초의 길이도 짧았으며, 캘러스 발생률이 높음
- ② BA가 첨가 된 배지에서 증식 된 신초의 개수도 11~12개로 많았고, 엽수도 많은 경향이 있었음.

- ③ 저농도 TDZ도 증식에 효과적이었으나 신초의 길이가 작아 연속적 배양이 어려웠음.  
 ④ 최종적으로 다신초 증식에는 BA 0.5mg/L 처리가 가장 적합한 것으로 판단 됨.

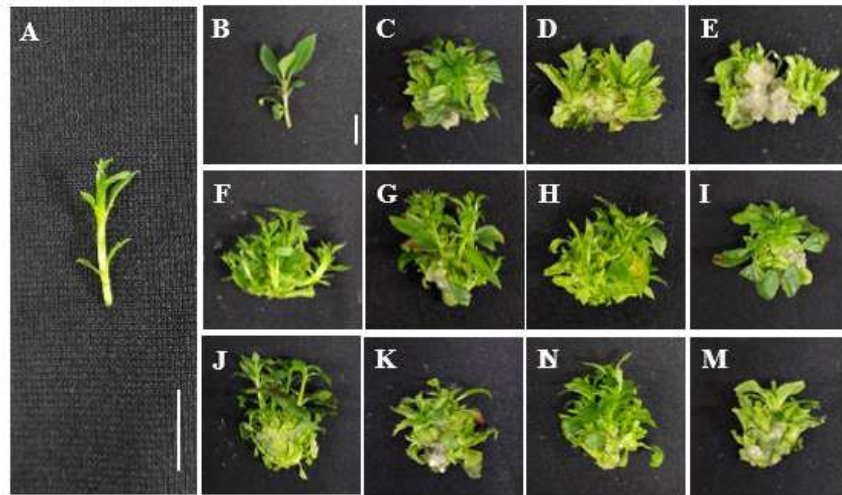


그림. 성장조절제 단용·혼용 처리에 따른 M.9 왜성대목의 다신초 증식.  
 (A: 무처리, B-C: BA & TDZ 처리)

표. 성장조절제 처리에 따른 M.9 왜성대목의 기내 증식.

Plant growth regulator				Shoot		Number of leaves (ea/plant)	Fresh weight (g)	Callus formation (%)	No. response (%)
TDZ (mg/L)	BA (mg/L)	IBA (mg/L)	GA3 (mg/L)	length (cm)	number (ea/plant)				
-	-	-	-	1.7±0.0	10.0±0.0	14.1±0.3	0.1±0.0	0.0±0.0	100.0±0.0
0.5	-	-	-	0.5±0.0	10.6±0.3	57.4±1.1	3.0±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0
1.0	-	-	-	0.5±0.0	6.2±0.1	50.7±1.0	3.7±0.21	100.0±0.0	0.0±0.0
2.0	-	-	-	0.9±0.0	6.6±0.2	36.3±0.5	2.7±0.1	87.5±3.3	0.0±0.0
-	0.5	-	-	2.2±0.0	11.8±0.5	73.3±2.6	1.3±0.1	87.5±3.3	0.0±0.0
-	1.0	-	-	1.3±0.0	14.2±0.5	93.0±2.2	1.5±0.0	87.5±3.3	0.0±0.0
-	2.0	-	-	0.4±0.0	12.3±0.2	77.0±1.6	1.6±0.0	75.0±8.2	0.0±0.0
1.0	-	0.3	-	0.4±0.0	9.8±0.2	64.5±0.9	2.6±0.1	100.0±0.0	0.0±0.0
-	1.0	0.3	-	1.8±0.0	16.7±0.4	77.8±2.2	1.5±0.1	100.0±0.0	0.0±0.0
1.0	-	-	0.5	0.3±0.0	7.2±0.2	43.8±0.7	2.2±0.1	100.0±0.0	0.0±0.0
-	1.0	-	0.5	1.2±0.0	11.1±0.2	67.3±1.3	1.2±0.0	100.0±0.0	0.0±0.0
1.0	-	0.3	0.5	0.3±0.0	6.9±0.1	35.9±1.2	2.0±0.1	100.0±0.0	0.0±0.0
-	-	0.3	0.5	1.9±0.0	12.4±2.2	54.6±0.9	1.2±0.0	100.0±0.0	0.0±0.0

(2) 광질에 따른 사과 기내배양묘의 다신초 증식조건 구명

(가) 실험 방법

- ① 증식용 배지 : MS + BA 1.0mg/L + IBA 0.3mg/L + GA<sub>3</sub> 0.5mg/L + suc 3% + agar 9.4mg/L
- ② 처리내용 : Red, Blue, R:G:B = 2:1:1, R:B = 1:1, R:B = 2:1, 형광등(FL, 대조구)
- ③ 배양기간 : 총 4주
- ④ 배양환경 : 명배양(40 μmol · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup> PPF), 24±1℃



(나) 결과

- ① Blue광의 비율이 높아질수록 신초의 생장이 더뎠음.
- ② FL광을 사용하였을 시 반응 없을 확률이 10.0로 높았음.
- ③ 다신초의 증식은 RGB(2:1:1)광에서 생육 및 다신초 증식률이 가장 좋았음.

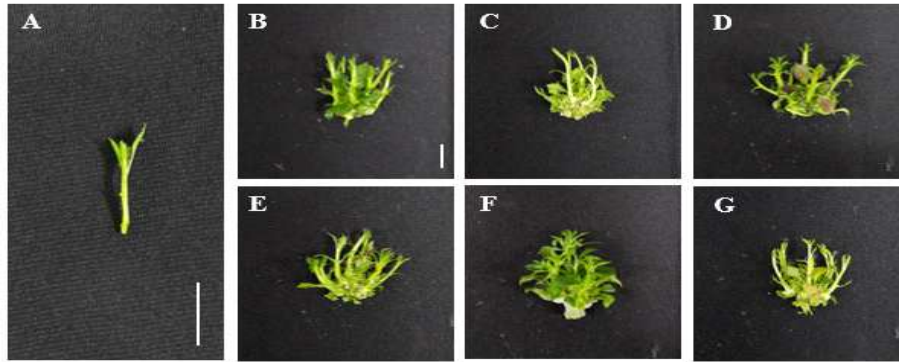


그림. 광질에 따른 다신초 증식.

표. 광질에 따른 다신초 증식.

Light quality	Shoot		Number of leaves (ea/plant)	Fresh weight (g)	Callus formation (%)	No. response (%)
	length (cm)	number (ea/plant)				
FL	2.1±0.0	10.7±0.2	53.9±0.7	0.7±0.0	60.0±3.2	10.0±3.2
Red	2.1±0.0	10.9±0.2	55.8±1.3	0.9±0.0	55.0±5.2	0.0±0.0
Blue	1.7±0.0	7.4±0.2	45.3±1.1	0.6±0.0	20.0±3.9	0.0±0.0
RGB(2:1:1)	1.9±0.0	8.2±0.2	49.9±1.4	0.8±0.0	50.0±3.3	5.0±2.1
RB11	2.3±0.0	8.0±0.2	50.8±1.3	0.7±0.0	25.0±3.3	5.0±2.1
RB21	20.±0.0	9.3±0.3	47.3±1.3	0.8±0.0	10.0±3.2	5.0±2.6

(3) 사과 왜성대목 M.9, M.26의 엽편배양을 통한 재분화

(가) 실험 방법

- ① 기본배지 : MS배지 + sucrose 3% + agar 9.4g/L
- ② 처리내용 : Thidiazuron(TDZ), BA, NAA 0.1~2.0mg/L
- ③ 배양기간 : 총 8주
  - 배양환경 : 명배양( $40 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  PPF),  $24 \pm 1^\circ\text{C}$

(나) 결과

- ① NAA는 BA 및 TDZ과 함께 0.1~0.2mg/L 저농도로 첨가 되었을 때 재분화에 효과적임.
- ② M.9은 TDZ 1.0mg/L+NAA 0.1mg/L 처리에서 재분화가 가장 우수하였고, M.26은 TDZ 2.0mg/L+NAA 0.1mg/L 처리 배지에서 재분화가 가장 우수함.
- ③ 재분화능은 M.9보다 M.26이 우수함.



그림. M.9 사과 왜성대목의 재분화 단계.

표. TDZ, BA, NAA에 따른 사과 왜성대목 M.9 기내배양묘의 재분화.

No	Plant growth regulator (mg/L)			Adventitious shoot regeneration			Callus formation (%)	Browning (%)
	TDZ	BA	NAA	Regeneration (%)	No of shoots			
					(ea/explant)	Shoot length (mm)		
1	-	-	-	0.0±0.0	-	-	0.0±0.0	42.5±4.0
2	0.5	-	-	0.0±0.0	-	-	0.0±0.0	33.3±1.3
3	1.0	-	-	0.0±0.0	-	-	80.0±1.9	12.5±1.2
4	2.0	-	-	2.5±1.2	1.0±0.0	5.0±0.3	100±0.0	25.0±4.4
5	-	0.5	-	0.0±0.0	-	-	100±0.0	10.0±2.7
6	-	1.0	-	0.0±0.0	-	-	92.5±2.2	32.5±1.2
7	-	2.0	-	2.5±1.2	1.0±0.0	7.0±0.0	100±0.0	7.5±3.5
8	0.5	-	0.1	0.0±0.0	-	-	96.7±1.3	16.7±1.3
9	1.0	-	0.1	6.1±1.7	1.0±0.0	4.0±0.0	100±0.0	25.7±2.7
10	2.0	-	0.1	6.7±1.3	2.0±0.0	3.0±0.3	100±0.0	16.7±3.4
11	-	0.5	0.1	0.0±0.0	-	-	97.5±1.2	20.0±1.9
12	-	1.0	0.1	0.0±0.0	-	-	100±0.0	35.0±1.4
13	-	2.0	0.1	0.0±0.0	-	-	100±0.0	27.5±2.2
14	0.5	-	0.2	0.0±0.0	-	-	100±0.0	20.0±2.2
15	1.0	-	0.2	10.0±2.2	2.0±0.2	3.2±0.2	100±0.0	13.3±1.3
16	2.0	-	0.2	6.7±1.3	1.0±0.0	6.5±0.0	100±0.0	0.0±0.0
17	-	0.5	0.2	0.0±0.0	-	-	100±0.0	42.5±3.5
18	-	1.0	0.2	0.0±0.0	-	-	100±0.0	23.3±1.3
19	-	2.0	0.2	6.7±1.3	1.0±0.0	9.5±0.7	100±0.0	33.3±3.4

표. TDZ, BA, NAA에 따른 사과 왜성대목 M.26 기내배양묘의 재분화.

No	Plant growth regulator (mg/L)			Adventitious shoot regeneration			Callus formation (%)	Browning (%)
	TDZ	BA	NAA	Shoot regeneration (%)	No of shoots per explant (ea/explant)	Shoot length (mm)		
1	-	-	-	0.0±0.0	-	-	0.0±0.0	5.0±2.3
2	0.5	-	-	0.0±0.0	-	-	92.5±2.2	0.0±0.0
3	1.0	-	-	10.0±2.7	1.0±0.0	3.3±0.1	100.0±0.0	12.5±1.2
4	2.0	-	-	7.5±2.2	1.75±0.1	2.8±0.1	100.0±0.0	0.0±0.0
5	-	0.5	-	0.0±0.0	-	-	89.6±2.9	4.2±1.9
6	-	1.0	-	0.0±0.0	-	-	92.5±3.5	5.0±2.3
7	-	2.0	-	7.5±2.2	1.3±0.1	3.5±0.1	95.0±2.3	10.0±2.7
8	0.5	-	0.1	15.0±5.5	3.1±0.2	4.3±0.1	100±0.0	2.5±1.2
9	1.0	-	0.1	25.0±3.0	1.4±0.1	3.0±0.2	100±0.0	0.0±0.0
10	2.0	-	0.1	47.5±4.8	1.9±0.0	4.2±0.2	100±0.0	0.0±0.0
11	-	0.5	0.1	0.0±0.0	-	-	100±0.0	50.0±6.6
12	-	1.0	0.1	0.0±0.0	-	-	100±0.0	10.0±1.9
13	-	2.0	0.1	12.5±2.2	2.5±0.2	6.7±0.2	100±0.0	3.5±1.1
14	0.5	-	0.2	30.0±5.0	1.8±0.1	4.8±0.4	100±0.0	0.0±0.0
15	1.0	-	0.2	12.5±2.2	1.3±0.1	4.2±0.5	100±0.0	0.0±0.0
16	2.0	-	0.2	42.5±3.47	1.7±0.1	4.2±0.1	100±0.0	0.0±0.0
17	-	0.5	0.2	0.0±0.0	-	-	100±0.0	0.0±0.0
18	-	1.0	0.2	0.0±0.0	-	-	100±0.0	0.0±0.0
19	-	2.0	0.2	7.5±2.2	1.0±0.0	7.0±0.3	100±0.0	0.0±0.0

(4) 사과 왜성대목 품종별 기내 발근 특성 비교

(가) 실험 방법

- ① 발근용 배지 : MS배지 + IBA 0.5 mg/L + suc 3% + agar 9.4g/L
- ② 배양기간 : 총 8주(매 4주마다 계대배양)
- ③ 배양환경 : 명배양(40  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  PPF), 24±1°C

(나) 결과

- ① 배양 3주차부터 발근이 되기 시작하여 8주쯤 발근이 완전히 끝나는데, 발근률은 M.9(42%)보다 M.26(73%)이 더 우수한 경향을 보임.
- ② 동일한 발근배지에서 지하부 생장은 M.26이 우수하나, 지상부 생장은 M.9이 더 우수함.
- ③ 이 결과는 품종별 내생호르몬이 다르며 각 품종별 최적화 된 배지를 구명할 필요가 있음을 시사함.



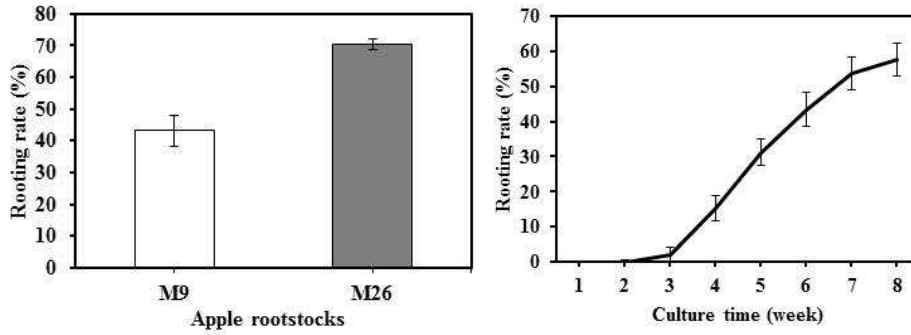


그림. M.9과 M.26 사과 왜성대목의 발근을 비교.

표. 발근배지에서 사과 M.9과 M.26의 성장 특성 비교.

	Leaf		Shoot		Root		Fresh Weight (g)
	Length (cm)	Number (ea/plant)	Length (cm)	Thickness (mm)	Length (cm)	Number (ea/plant)	
M.9	2.05±0.19	18.75±0.51	3.03±0.10	1.43±0.12	1.53±0.23	18.75±0.51	0.54±0.02
M.26	1.93±0.10	1.93±0.10	2.23±0.05	1.11±0.10	2.30±0.29	16.75±0.74	0.34±0.02

(5) 왜성대목 품종별 기내 발근 조건 구명

(가) 실험 방법

- ① 기본 배지 : MS배지 + suc 3% + agar 9.4g/L
- ② 처리 방법 : IBA 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0mg/L 단용 처리
- ③ 배양기간 : 총 8주(매 4주마다 계대배양)
- ④ 배양환경 : 명배양( $40 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  PPF),  $24 \pm 1^\circ\text{C}$

(나) 결과요약

- ① M.9은 IBA 1.0mg/L에서 총 생체중이 가장 높았으나, 지상지하부 성장 전반적으로는 IBA 0.1mg/L 처리에서 모두 우수하였음.
- ② M.26은 IBA 0.5-1.0mg/L에서 총 생체중이 높았으나, 지상지하부 성장 전반적으로는 IBA 0.5mg/L 처리에서 가장 우수하였음.
- ③ IBA의 농도가 높아질수록 켈러스 발생률이 높아져 낮은 IBA를 적용하는 것이 실질적 발근에 효과적임.

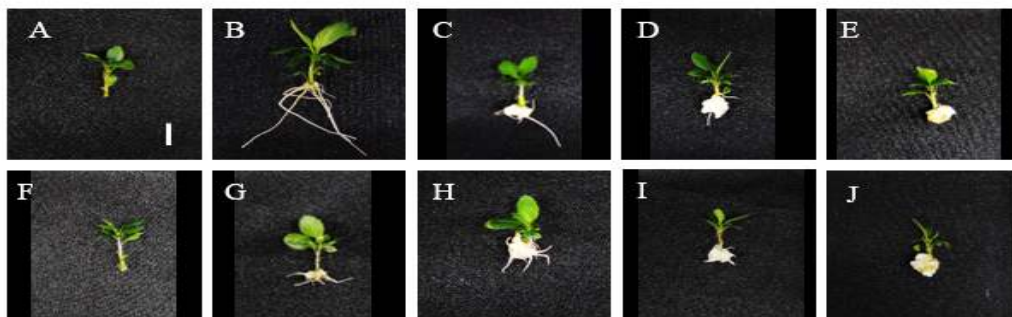


그림. 발근배지에서 M.9(A-E)과 M.26(F-J)의 성장과 발근.

표. IBA 농도별 M.9 사과 왜성대목의 기내 생장.

IBA conc. (mg/L)	Fresh weight (mg)	Shoot length (cm)	Leaf		Root	
			Length (cm)	Number (ea/plant)	Length (cm)	No. of lateral (ea/plantlet)
0	48.7±1.3	2.0±0.0	1.2±0.0	7.0±0.2	0.0±0.0	0.0±0.0
0.1	158.5±4.4	2.9±0.1	1.7±0.0	10.1±0.2	3.2±0.1	3.2±0.6
0.5	344.8±13.2	2.5±0.0	1.3±0.0	9.4±0.2	0.9±0.1	2.6±0.2
1.0	364.4±18.0	2.3±0.0	1.3±0.0	7.5±0.1	0.7±0.0	0.1±0.0
2.0	237.2±11.7	1.6±0.1	0.8±0.0	6.6±0.1	0.3±0.0	0.6±.1

표. IBA 농도별 M.26 사과 왜성대목의 기내 생장.

IBA conc. (mg/L)	Fresh weight (mg)	Shoot length (cm)	Leaf		Root	
			Length (cm)	Number (ea/plant)	Length (cm)	No. of lateral (ea/plantlet)
0	54.8±1.4	2.5±0.0	1.1±0.0	8.2±0.2	0.7±0.2	0.1±0.0
0.1	168.4±1.9	2.5±0.0	1.5±0.0	8.1±0.1	2.2±0.1	2.4±.1
0.5	367.7±9.7	2.4±0.1	1.3±0.0	8.1±0.2	1.5±0.1	3.5±0.2
1.0	364.4±18.0	2.2±0.0	1.3±0.0	6.6±0.1	0.8±0.0	2.3±0.1
2.0	248.3±13.7	1.5±0.0	0.8±0.0	5.6±0.2	0.3±0.0	.4±0.1

(6) Phloroglucinol 농도에 따른 기내 발근효율 향상 구명

(가) 실험 방법

- ① 기본배지 : MS배지 +IBA 0.5mg/L +suc 3% +agar 9.4g/L
- ② 처리방법 : PG 0, 0.5, 1, 2mM
- ③ 배양환경 : 명배양(40  $\mu$  mol  $\cdot$  m<sup>-2</sup>  $\cdot$  s<sup>-1</sup> PPF), 24±1°C

(나) 결과요약

- ① Phloroglucinol 0.5mM 농도 이상 첨가구부터 캘러스 형성이 확연히 줄어들면서 발근은 100%를 보여 직접적인 발근에 Phloroglucinoldl 효과적임을 확인함.
- ② 직접적인 발근에는 Phloroglucinol 1.0mM 첨가가 가장 효과임.
- ③ Phloroglucinol 첨가에 의한 기내배양묘의 생장 억제에는 나타나지 않았으며, 캘러스만 억제되는 경향이 있음.

표. 사과 왜성대목 M.9 기내배양묘에서 직접적인 발근(true-to-type)에 미치는 phloroglucinol 농도의 영향.

Phloroglucinol (mM)	Rooting (%)	Callus formation (%)	Fresh weight (mg/plantlet)	Shoot length (cm)	Leaf length (cm)	No of leaves (ea/plantlet)	No. of roots (ea/plantlet)	Root length (cm)
0.0	93.33 a <sup>z</sup>	30.00 a	226.60 a	2.88 a	1.54 a	10.2 a	5.30 a	1.94 a
0.5	91.18 a	8.44 b	126.58 ab	2.17 a	1.63 a	7.25 b	4.06 b	1.19 ab
1.0	100.00 a	0.00 b	168.50 b	2.82 a	1.56 a	11.10 a	5.00 a	1.87 a
2.0	93.33 a	0.00 b	107.30 c	2.59 a	1.17 b	10.10 a	3.70 c	1.32 b

<sup>z</sup> Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

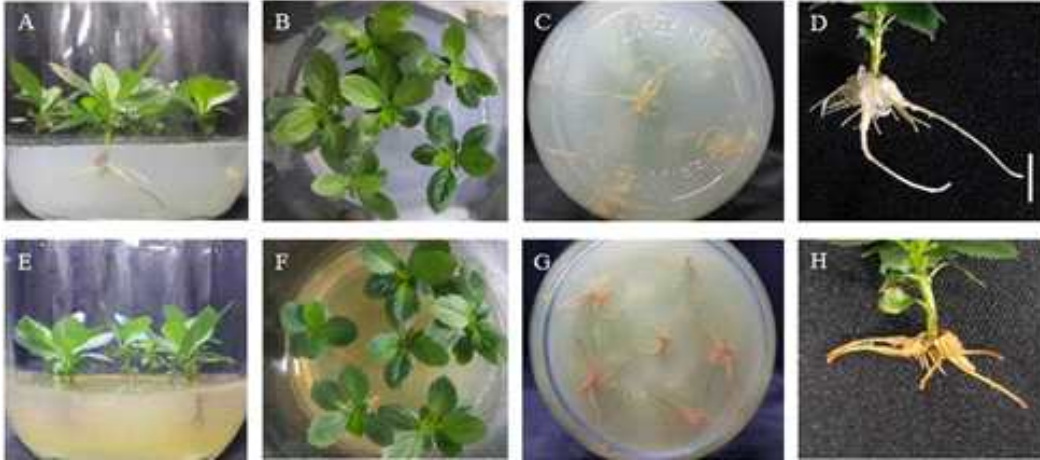


그림. 사과 왜성대목 M.9 발근시 phloroglucinol 첨가에 의한 직접발근.  
A-D. 대조구, E-H. 1mM phloroglucinol 첨가구.

(7) 광질에 따른 기내발근 조건 구명

(가) 실험 방법

- ① 기본배지 : MS배지 +IBA 0.5mg/L +suc 3% +agar 9.4g/L
- ② 처리내용 : Red, Blue, R:G:B = 2:1:1, R:B = 1:1, R:B = 2:1, 형광등(FL, 대조구)
- ③ 배양기간 : 총 8주(4주 간격으로 계대배양)
- ④ 배양환경 : 명배양( $40 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  PPF),  $24 \pm 1^\circ\text{C}$

(8) 발근기간 및 발근에 따른 스트레스 효소의 영향 분석

(가) 실험 방법

- ① 기본배지 : MS배지 +IBA 0.5mg/L +suc 3% +agar 9.4g/L
- ② 배양기간 : 총 8주(4주 간격으로 계대배양)
- ③ 배양환경 : 명배양( $40 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  PPF),  $24 \pm 1^\circ\text{C}$

(나) 결과

- ① 배양기간에 따른 CAT와 MDA 분석결과 배양 3주 후 부터 켈러스 발생 시작하여 4주 부터 발근 시작.
- ② 발근이 시작될 시점에 CAT와 MDA 함량이 증가함.
- ③ Catalase(CAT) 활성은 발근이 안된 개체에서 가장 높았고, 잘된 개체와 정반대 양상을 보임.
- ④ Malondialdehyde(MDA) 함량 역시 발근 안 된 개체에서 높았고, 특히 지상부에서 높아 지상부에서 발생한 스트레스로 인해 발근이 안되는 것을 확인함.

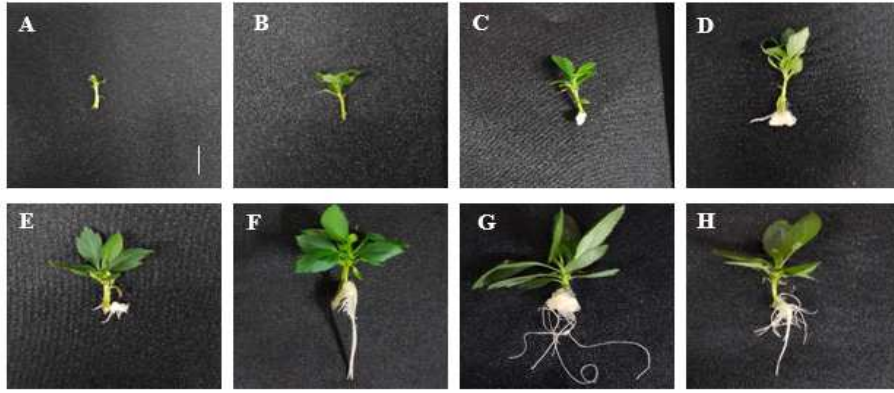


그림. 시간에 따른 M.9 사과 왜성대목의 발근. A-H. 발근배지에서 배양 0-8주 후.

표. 기내발근 기간 동안 M.9 사과 왜성대목의 성장.

Week	Shoot length (cm)	Leaf Length (cm)	Number of leaves (ea/plant)	Fresh weight (g)	Root length (cm)	No. of root (ea/plant)
1	2.23±0.12c <sup>z</sup>	0.58±0.03d	12.00±0.05d	0.07±0.00d	-	-
2	2.35±0.07c	1.80±0.07c	17.75±0.40c	0.18±0.00d	-	-
3	2.63±0.05bc	1.93±0.06c	17.75±0.40c	0.18±0.01d	-	-
4	2.98±0.06ab	1.93±0.05c	18.50±0.30c	0.27±0.02d	-	-
5	2.95±0.10ab	2.08±0.07bc	19.50±0.48c	0.42±0.02bc	0.08±0.02c	0.75±0.22c
6	0.95±0.09ab	2.18±0.02bc	22.50±1.66bc	0.42±0.03b	2.08±0.34b	3.00±0.33b
7	3.10±0.06ab	2.48±0.04ab	26.25±0.51ab	0.42±0.04b	2.53±0.08b	4.50±0.40b
8	3.10±0.06ab	2.75±0.13a	27.5±0.77a	0.42±0.05a	5.15±0.19a	6.50±0.55a

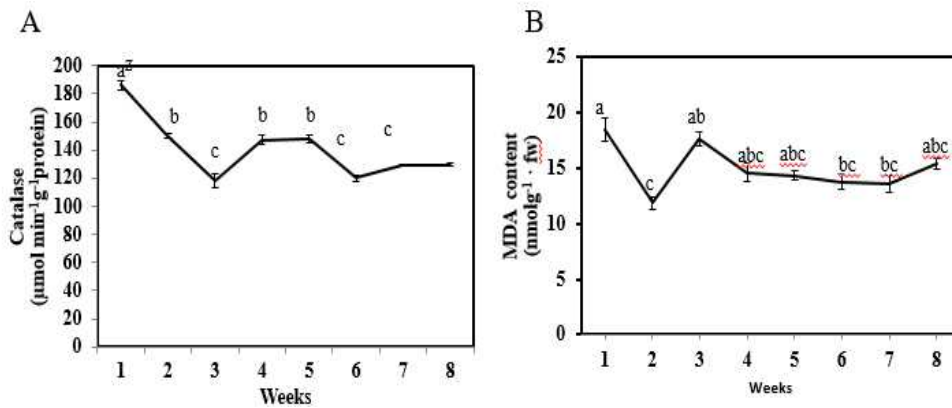


그림. 발근 기간에 따른 CAT 활성과 MDA 변화.

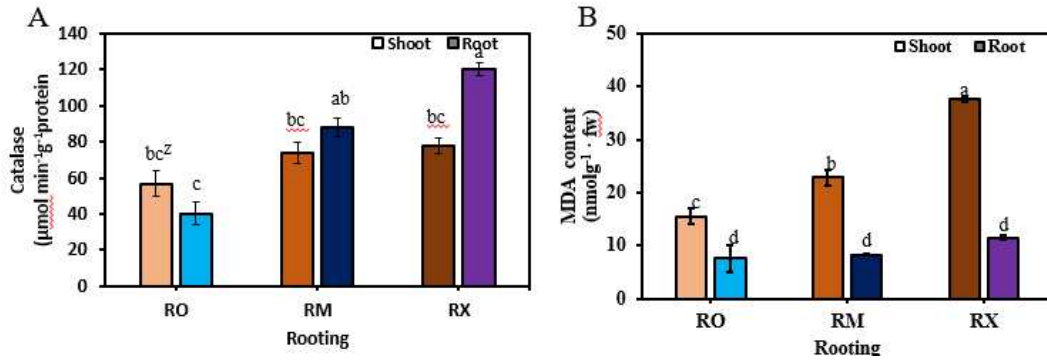


그림. 발근정도에 따른 지상부와 지하부에서 CAT와 MDA의 함량.

#### 4. 기내배양환경 조절을 통한 과수화 발생 억제 조건 구명

##### 가. 과수화 발생 억제조건 구명

##### (1) 사과 왜성대목 기내배양시 과수화 발생

##### (가) 실험 방법

- ① 증식배지 : MS배지 +BA 0.5mg/L +suc 3% +agar 9.4g/L
- ② 배양기간 : 총 4주
- ③ 배양환경 : 명배양( $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  PPF),  $24 \pm 1^\circ\text{C}$

##### (나) 결과

- ① M.9과 비교해 M.26에서 과수화 발생률이 약 20%로 다소 높게 나타남.
- ② 과수화 식물체에서는 다신초 발생이 매우 저조하였음.
- ③ CAT 활성은 정상체에 비해 과수화 식물체(H형)와 말린 잎 식물체(R형)에서 높게 나타났고, MDA는 R형 비정상체에서 높게 나타남.
- ④ 과수화 현상이 발생한 개체는 세포간 간극이 넓어지고, 엽육세포의 배열도 비정상적으로 발달하여 순화시 정상적 토양적응이 어려움을 보여줌.
- ⑤ 환기가 이루어지는 배양병에서 배양한 결과 일반병에 비해 과수화와 잎말림 현상이 억제됨.

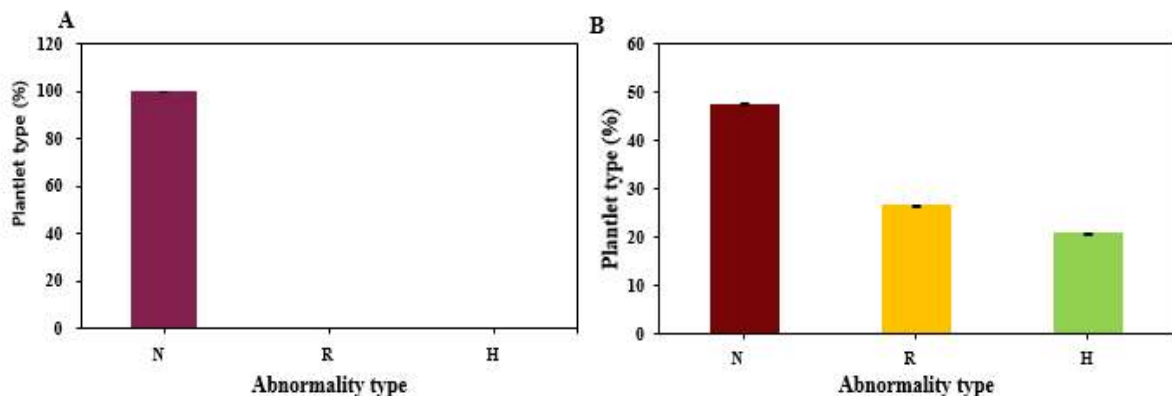


그림. M.26(A)와 M.9(B) 사과 왜성대목의 과수화 발생률.

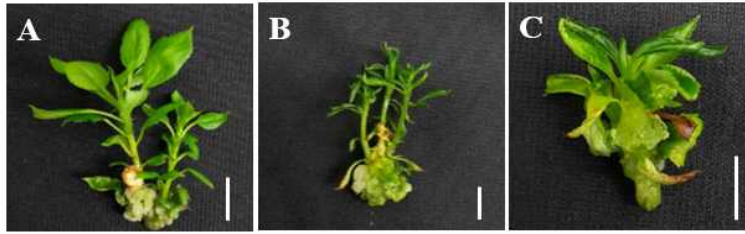


그림. 과수화 정도에 따른 M.26 왜성대목.

표. 과수화 정도에 따른 M.26 사과 대목의 성장.

Plant type	Shoot length (cm)	No. of leaves (ea/plant)	Fresh weight (mg)	Dry weight (mg)	No. of shoot (ea/plant)
Normal	2.03a <sup>z</sup>	3533b	455.50b	83.67c	3.33b
Rolled leaf	2.40a	28.33bc	652.33b	114.67b	3.00b
Hyperhidric	0.73b	14.67bc	418.33b	68.33c	1.00b

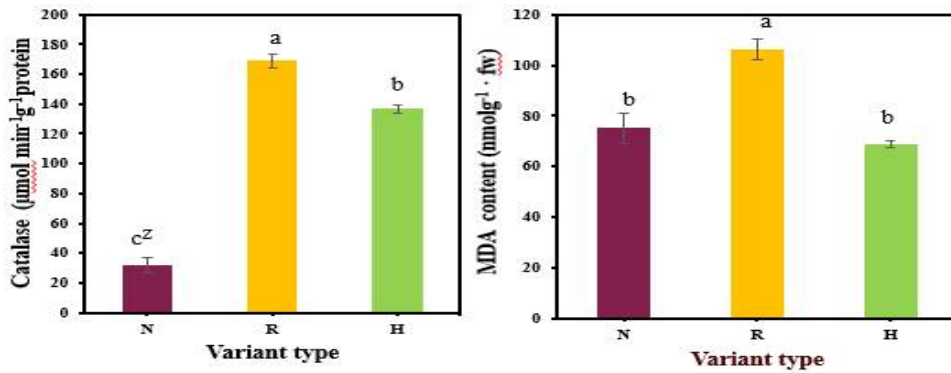


그림. 정상 식물체와 과수화 식물체의 CAT와 MDA 분석.

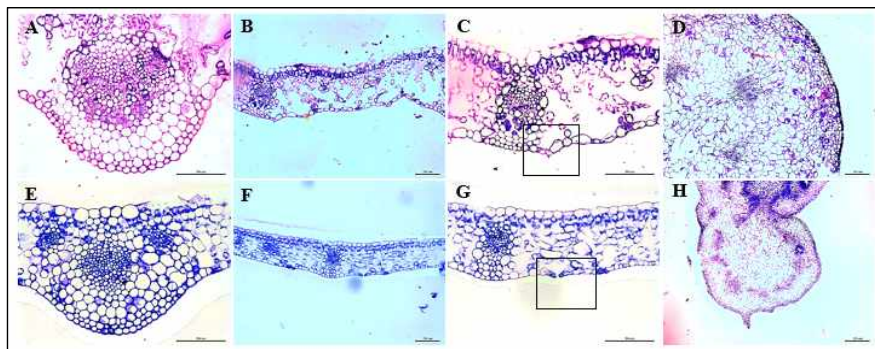


그림. 과수화 식물체(A-D)와 정상식물체(E-H)의 조직학적 특성.



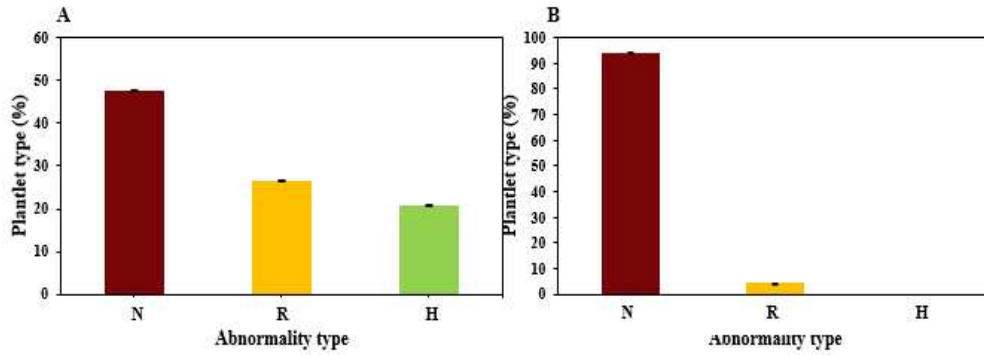


그림. 일반 배양병(A)과 환기 배양병(B)의 과수화 발생률.

나. 모본 확보를 위한 망실재배 시설 구축

(1) 망실재배시설 구축

(가) 조직배양용 모본과 생산 된 무병종묘의 관리용

(나) 위치 및 규모 : 충북대 무가온 온실내, 160m<sup>2</sup>

(다) 설치 현황 : 부지선정 완료, 자재 구매 완료 현재 제작 완료(2017년도)



그림. 조직배양용 모본을 위한 망실재배시설 구축.

5. 대용량 생물반응기를 이용한 무병종묘 대량생산 시스템 개발

가. 사과무병종묘 생산용 생물반응기 시스템 개발

(1) 생물반응기를 이용 생력화 대량 생산 시스템 구축

(가) 생물반응기(Bioreactor) : 국내에서 가장 많이 이용되는 기본 생물반응기는 외부 공기가 유리 스파자(glass sparger)를 통해 배지내로 공급되면서 액체 배지내 용존산소량(DO)를 높이고 배양용기내 공기의 강제순환이 이루어지게 되는 ‘air lift’ 방식임.

(나) 기존 방식의 문제점 : 그러나 이러한 방식은 배양체가 액체배지에 잠기면서 공기에 의해 배지내 부양이 이루어지는 형태로 사과묘목과 같이 줄기와 잎이 액체배지에 잠기게 되는 경우 과수화(hyperhydricity) 현상이 발생할 가능성이 매우 높아 적합하지 않은 시스템임.

(다) 해결방안 : 따라서 사과 기내묘와 같이 건전한 종묘 생산을 목적으로 하는 경우 균일 가과 과수화가 적은 별도의 시스템과 디자인이 필요함.

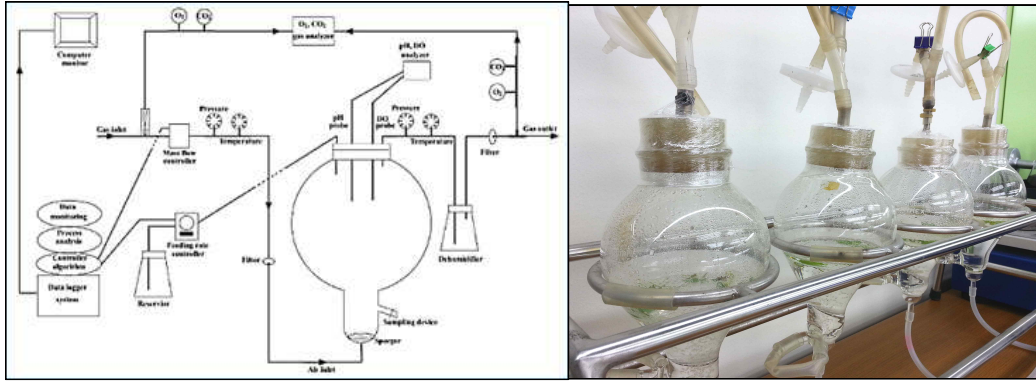


그림. Balloon-type bubble bioreactor (BTBB 생물반응기) 기본 모식도(위)와 실제 배양전경(아래).

(2) 대용량 생물반응기 디자인 및 제작

(가) 사과 기내배양묘 생산용 생물반응기 제작

① 고려사항

㉔ 본 연구에서는 생물반응기 제작시 배양기의 가격을 상승시키는 가장 큰 원인 조절.

㉕ 식물체 성장에 가장 큰 영향을 줄 수 있는 스파자의 크기일 것.

㉖ 식물체의 줄기와 잎 성장에 필요한 공간을 최대한 확보할 것.

⇒ 둥근 모양의 배양기를 직선형태로 수정하고 배양기 하단의 공기공급 스파자 부분은 크기를 넓히지 않고 그대로 두어 사과 기내배양묘 배양에 최적으로 제작함.

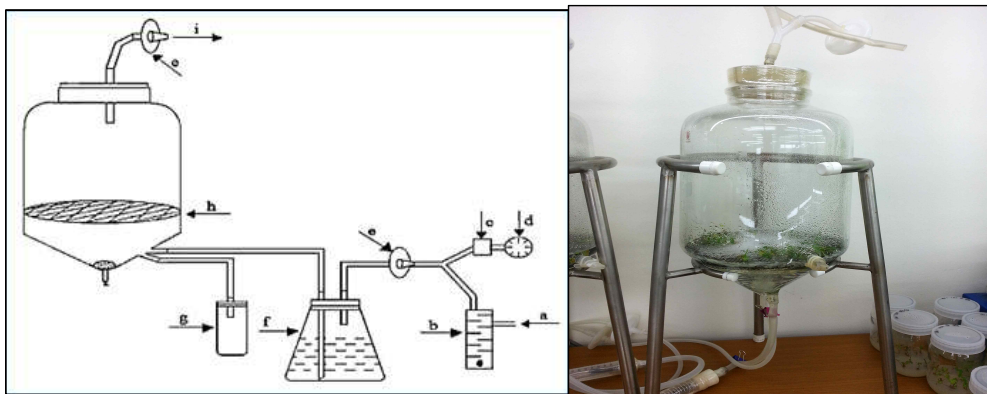


그림. 사과 기내배양용 수정생물반응기 모식도 및 실제 배양모습.

(a) Air inlet; (b) Air flow meter; (c) Timer; (d) Solenoid valve; (e) Membrane filter;

(f) Medium reservoir; (g) Sampling port; (h) Supporter (net); (i) Air outlet.

(3) 과수화(Hyperhydricity)를 줄이기 위한 배양 시스템 개발

(가) 배지공급 시스템 조절

① TIB 시스템 : 사과 배양묘를 위해 제작 된 생물반응기는 솔레노이드와 타이머 등을 연결하여 자동으로 일정시간 동안 배지가 공급되고 빠지는 Temporary



immersion system(TIB)

② CIB 시스템 : 및 연속적인 배지공급 시스템인 CIB(Raft culture)

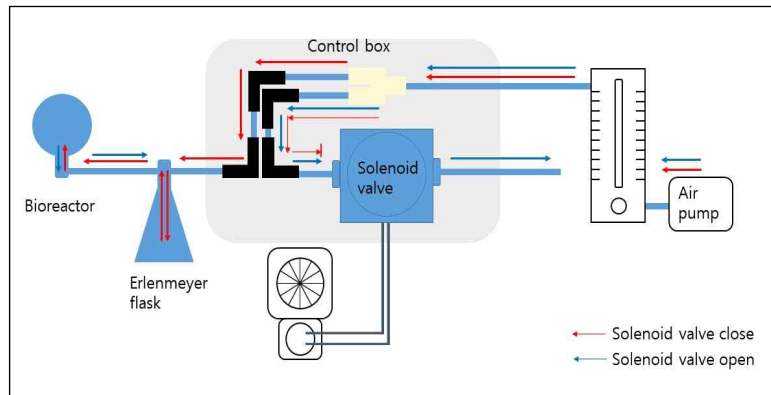


그림. 사과 기내배양용 TIB 시스템에 이용된 타이머와 솔레노이드 밸브.

(나) 광량 증가를 위한 생물반응기용 LED 시스템 제작

- ① 일반적인 배양실 광조건은  $40\sim70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  PPFd임.
- ② 생물반응기의 경우 배양시스템의 특성상 광도는 일반조건 60% 이하임.
- ③ 액체배양시 과수화가 잘 발생하는 사과 기내배양묘의 특성에 따라 광도를  $80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  PPFd 이상으로 조절할 필요가 있음.
- ④ 줄LED를 이용해 생물반응기용 광시스템을 별도 제작함.
- ⑤ 과수화 발생율을 현격히 감소시킴 ( $40\% \rightarrow 10\%$  이하)



그림. 줄 LED를 이용한 생물반응기용 광조사 시스템[증식용(좌), 발근용(우)].

나. Scale-up 대용량 생물반응기 시스템을 이용한 무병종묘 대량생산

(1) 생물반응기 배양시스템에 따른 사과 왜성대목 무병종묘 대량 생산 시스템 확립

(가) 실험재료 및 방법

- ① 배양단계 : 발근 단계
- ② 배지조성 : MS배지+IBA2.17  $\mu$ M+sucrose 3% + agar 9 g/L
- ③ 처리내용
  - ㉠ 고체배지(conventional culture; solid medium)
  - ㉡ 액체배지(control; Liquid medium)
  - ㉢ 생물반응기 시스템 1(CIB): 네트위에서 식물체 배양, 배지 연속공급
  - ㉣ 물반응기 시스템 2(TIB-3): 네트위에서 식물체 배양, 배지 1회/3h 공급
  - ㉤ 생물반응기 시스템 1(TIB-6): 네트위에서 식물체 배양, 배지 1회/6h 공급
- ④ 배양기간 : 총 6주
- ⑤ 배양환경 : 명배양( $88 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  PPF, 16h 명/8h 암),  $24 \pm 1^\circ\text{C}$

(나) 결과요약

- ① 줄기 직경은 액체배지에서 자란 식물체에서 가장 굵었으나 절간 길이와 초장, 엽수 등 다른 성장에서는 생물반응기에서 자란 식물체가 가장 양호하였음.
- ② TIB-3에서 식물의 생체중이 가장 좋았고, 지상부와 지하부의 길이가 가장 길었음.
- ③ 개체별 생장은 TIB-3에서 좋았으나, 생장의 균일도 면에서 편차가 커서 균일한 식물체 생산에 적합하지 못하였고, CIB 처리가 균일한 식물체 생산에는 가장 적합하였음.

표. 생물반응기 시스템에 따른 M.9 왜성대목의 지상부 생육에 미치는 영향.

Treatment	Fresh weigh (mg/e xplant)	Shoot length (m)	Root length (m)	Stem diameter (mm)	No. of leaves (e a/explant)	No. of node (ea/ explant)	No. of root (ea/ explant)
S	166.04 $\pm$ 16.17 <sup>z</sup>	51.93 $\pm$ 2.01	51.97 $\pm$ 3.79	1.47 $\pm$ 0.12	14.90 $\pm$ 0.35	11.30 $\pm$ 0.72	8.10 $\pm$ 0.46
L	88.47 $\pm$ 10.20	40.75 $\pm$ 2.30	50.78 $\pm$ 7.91	1.62 $\pm$ 0.07	13.70 $\pm$ 1.01	6.90 $\pm$ 0.74	4.80 $\pm$ 0.51
CIB	122.39 $\pm$ 8.86	90.97 $\pm$ 4.30	72.5 $\pm$ 5.46	1.19 $\pm$ 0.06	12.40 $\pm$ 0.83	9.40 $\pm$ 0.79	10.60 $\pm$ 1.48
TIB-3	182.63 $\pm$ 17.40	105.62 $\pm$ 5.10	81.40 $\pm$ 6.48	1.40 $\pm$ 0.05	12.40 $\pm$ 0.69	9.70 $\pm$ 0.47	11.60 $\pm$ 1.06
TIB-6	112.45 $\pm$ 8.43	80.85 $\pm$ 3.60	76.43 $\pm$ 5.79	1.18 $\pm$ 0.07	9.50 $\pm$ 0.48	9.00 $\pm$ 0.71	12.40 $\pm$ 1.55

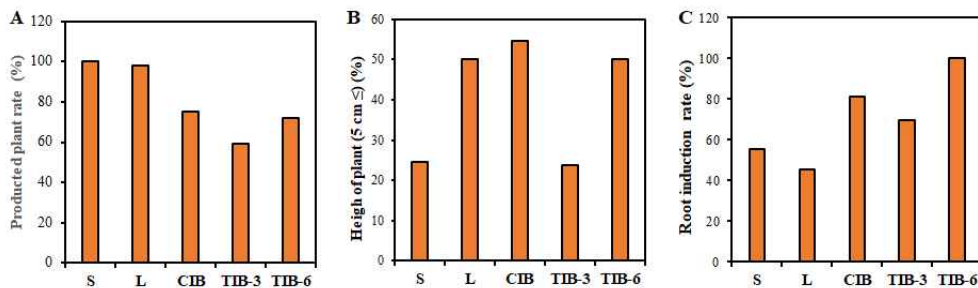


그림. 생물반응기 타입에 따른 M.9 왜성대목의 생육에 미치는 영향.

(A: 식물 생산량, B: 5cm 이상 식물체 수, C: 발근된 식물체 수)

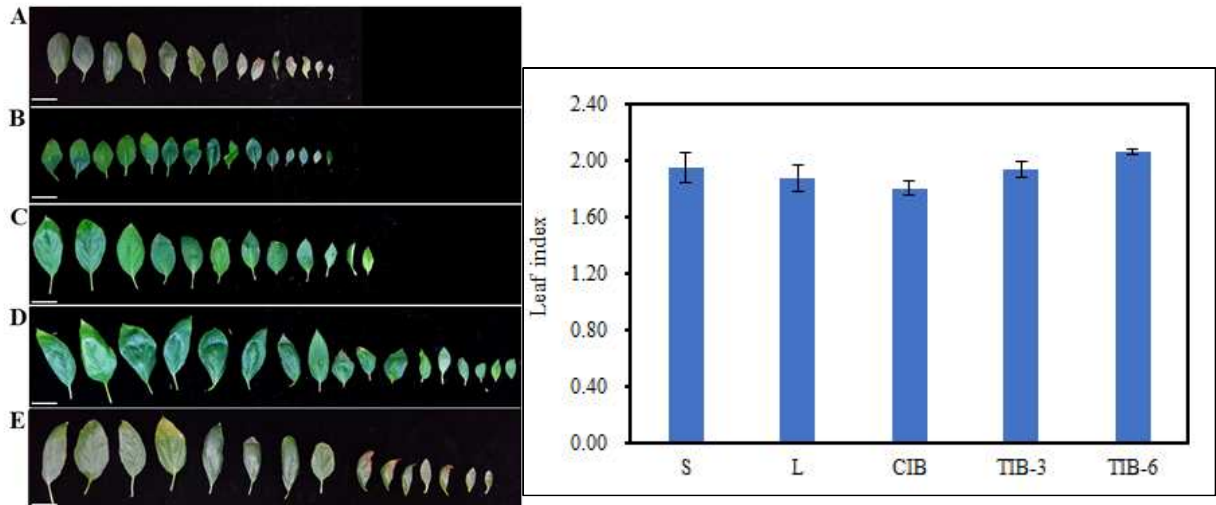


그림. 생물반응기 타입에 따른 사과 M.9의 잎꼴 지수(A)와 잎의 형태. (A: 고체배양, B: 액체배양, C: 지속적 침지 생물반응기 배양, D: 일시적인 침지 생물반응기 배양 - 3시간 마다 침지, E: 일시적인 침지 생물반응기 배양 - 6시간 마다 침지)

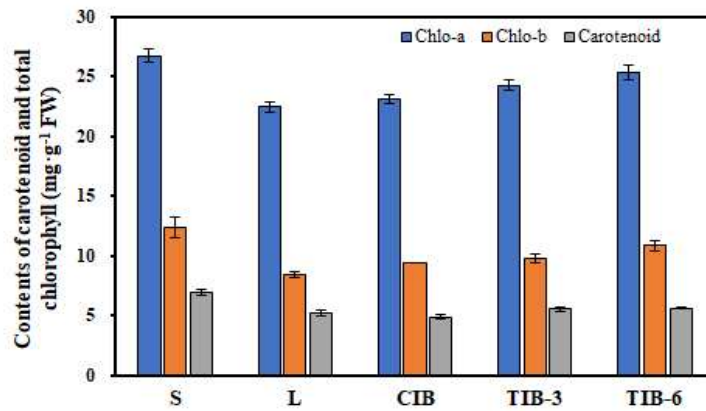


그림. 생물반응기 시스템에 따른 M.9 왜성대목 식물체의 엽록소 a, b와 카르노이드 함량.

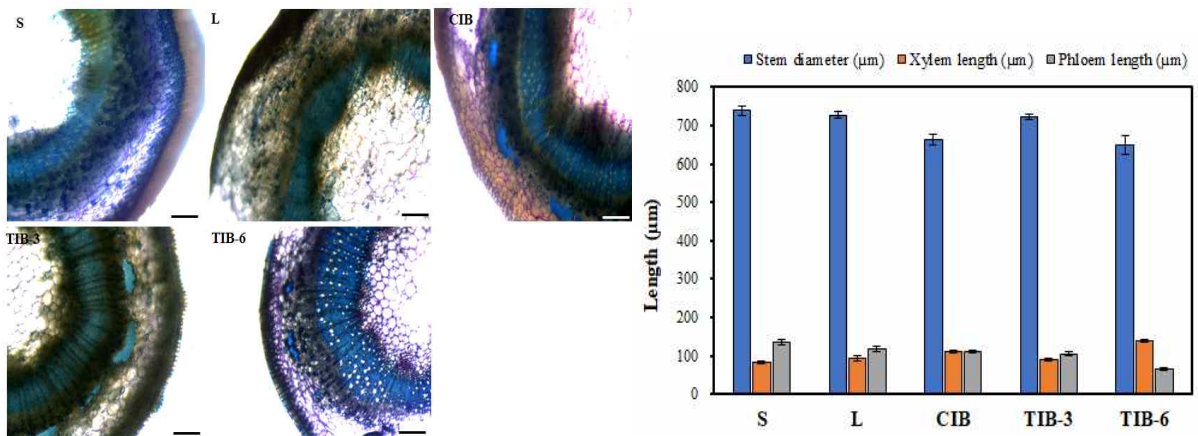


그림. 다양한 종류의 생물반응기에서 성장한 M.9 왜성대목 줄기의 성장과 목부 형성.

(A: 지속적 침지 생물반응기, B: 3시간 마다 침지한 일시적 침지 생물반응기, C: 6시간 마다 침지한 일시적 침지 생물반응기)

다. 접수용 무병종묘 생산 기술개발

(1) 접수용 모본의 초대배양 방법 확립

(가) 모본 채취 : 30cm 내외 동아가 많은 가지 채취

- 월동 이후 1~2월

(나) 배양 전 물올림 처리

- 세포분열 촉진액 분무 처리 : GA + Cytokinin + 살균제 1000배액



사과 접수 모본(고번계)

초대배양 전 물올림 처리

초대배양

그림. 접수용 모본의 초대배양 과정.

(2) 접수품종 모본 확보

(가) 접수 품종 확보 : ‘홍로’ 10개체, ‘후지’ 10개체

(나) 조직배양용 모본의 바이러스 이병 분석

① 분석방법 : RT-PCR

② ASPV 등 5종의 바이러스 분석결과, 2품종 모두 100% 3종의 바이러스에 감염되어 있음을 확인 (ASPV, ASGV, ASLSV).

(3) 모본의 엽편배양을 통한 바이러스 제거 효과 구명

(가) 실험 방법

① 실험 재료 : ‘홍로’, ‘후지’ 각 10개체

② 기본 배지 : MS배지 + sucrose 3% + agar 9.4g/L

③ 배양기간 : 총 8주(4주 간격 계대배양)

④ 배양환경 : 명배양( $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  PPF),  $24 \pm 1^\circ\text{C}$

(나) 결과

① 모본에서 3종의 바이러스가 감염되어 있었고 기내삽목으로 배양한 배양묘 역시 이병되어 있었음.

② 캘러스를 경유해 앞에서 재분화 개체에서는 ACLSV 감염이 확인 되지 않아 엽편배양으로 부분적인 바이러스 제거가 가능함을 밝힘.

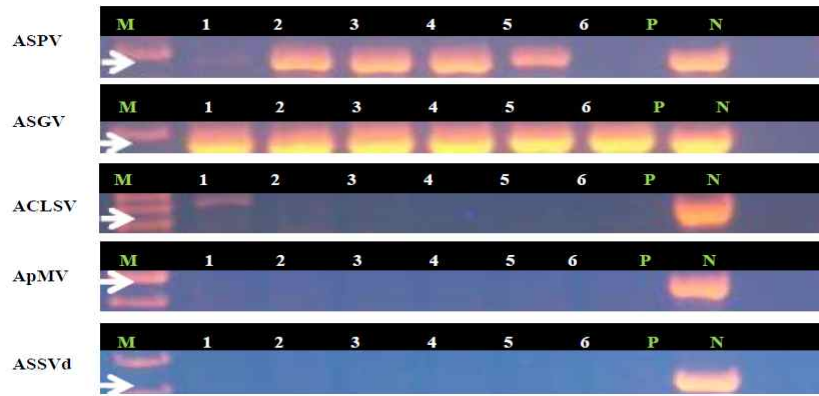


그림. RT-PCR을 통한 바이러스 확인.

(Lane M, 1kb ladder; P, positive control; Lane 1, 모본; 2-4, 기내삼목표; 5-켈러스 재분화체; 6-켈러스; N, negative control)

라. 무병종묘 확보 및 생산

(1) 열처리와 화학적 처리를 통한 Virus 제거 및 virus-tested 식물체 생산

(가) 재료 및 방법

① 식물체 : 바이러스 감염이 확인 된 홍로

② 처리내용

가. 온도 처리 : 25도, 32도

나. 화학적 처리 : Ribavirin 0, 25  $\mu\text{g/ml}$

① 실험방법 : 각 처리에 각 30개의 경정(shoot-tip)을 배양하여 각 처리에서 4주간 배양 후 25도로 옮겨 4주간 더 배양하여 식물체 발달을 유도한 다음 생육조사 및 바이러스 분석용 샘플링 실시.

(나) 결과

표. ‘홍로’ 에서 virus-free 발생에 대한 thermoraphy와 ribavirin의 효과.

Temp	Treatment		Shoot elongation Rate (%)	Hyperhydric shoot rate (%)	Non-response shoot (%)
	Ribavirin ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )				
25°C	0		62.4±9.8 <sup>z</sup>	26.3±8.7	37.6±9.8
	25		64.3±5.7	26.9±7.1	46.1±9.2
32°C	0		53.9±9.2	51±12.6	35.7±5.7
	25		45.3±7.4	31.3±10.5	54.7±7.4

<sup>z</sup>Data are mean ± SE.



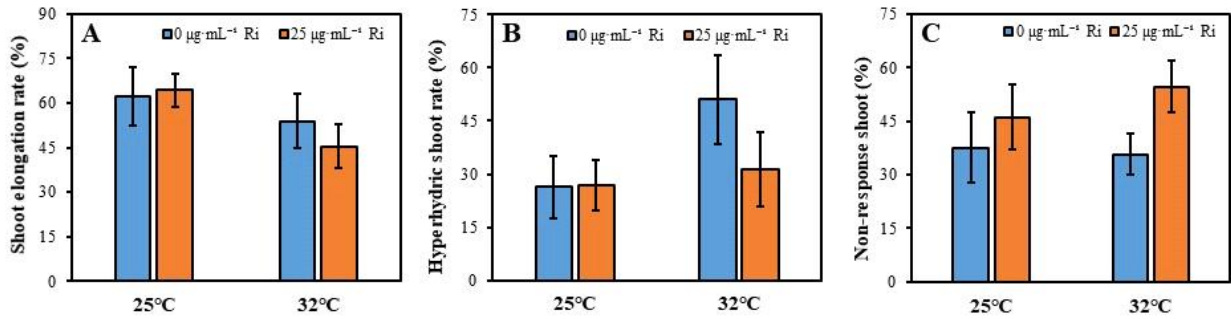


그림. ‘홍로’ 에서 virus-free 발생에 대한 thermoraphy와 ribavirin의 효과.  
(A: 줄기의 신장률, B: 줄기의 과수화율, C: 줄기의 무발생률)

(2) 3차 분석을 통한 최종 Virus-tested 식물체 선발

- (가) 대상 virus : 4종 바이러스, 1종 바이로이드 (ACLSV, ApMP, ASPV, ASGV, ASSVd)
- (나) 대목 : M.9 6개체, M.26 7개체
- (다) 접수 : ‘홍로’ 19개체 확보

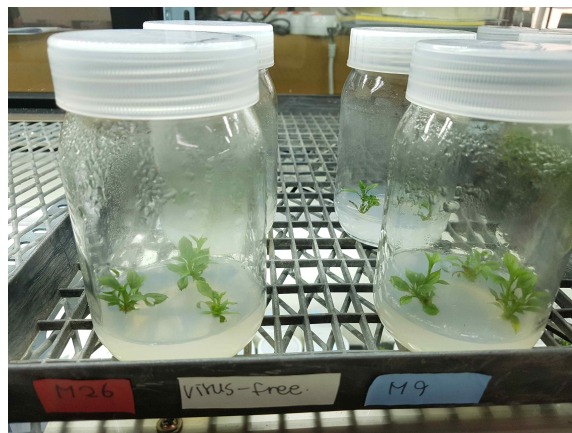


그림. Virus-tested 식물체

6. 광독립영양배양을 통한 순화용 무병종묘 및 균일묘 육성기술 개발

가. 기외순화시 순화율과 생장을 증가시키기 위한 배양 시스템 개발을 위해 종속영양, 혼합영양, 독립영양 배지 방법 간 순화율 비교

(1) 광독립영양배양

(가) 목적 : 기외순화시 순화율과 생장을 증가시키기 위한 배양 시스템 개발

(나) 실험재료 및 방법

- ① 식물재료 : M.9, M.26
- ② 배양단계 : 발근 단계
- ③ 배지조성 : MS배지 + IBA 2.17 µM + agar 9g/L
- ④ 접종 밀도 : 10ea/100ml
- ⑤ 고현배지 : 오아시스
- ⑥ 처리내용
  - ㉠ 종속영양배양(control) : 공기순환 없음, 3% 당 공급

- ㉔ 혼합영양배양 : 공기순환, 3 %당 공급
- ㉕ 독립영양배양 : 공기순환, 당 공급 없음.
- ㉖ 배양기간 : 총 6주
- ㉗ 배양환경 : 명배양( $88 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  PPF, 16h 명/8h 암),  $24 \pm 1^\circ\text{C}$



그림. 환기와 당 공급 유무에 따른 배양환경 조절.

(다) 결과

- ① 광독립영양과 종속영양을 혼합한 혼합영양배양(Mixotrophic)에서 자란 식물은 혼합영양배양에서 자란 식물보다 생체중이 약 1.7배 높고, 잎 수도 약 1.2배 많아 가장 생장이 왕성하였음.
- ② 순수한 광독립영양배양은 오히려 식물체 생장이 저조하고, 생존율도 낮았음.
- ③ 종속영양배양(기존배양 방식)에서 자란 식물은 생존율과 발근율은 높았으나 배지내 당으로 인해 순화과정 오염 및 순화 스트레스가 예상됨.
- ④ 따라서 식물이 순화과정시 종속영양에서 독립영양으로 변환되는 광합성 변화의 스트레스를 줄이기 위해서는 혼합영양이 가장 적합하였음.



그림. 배양 8주후 배양방식별(광합성타입) 사과 왜성대목 M.9의 성장.

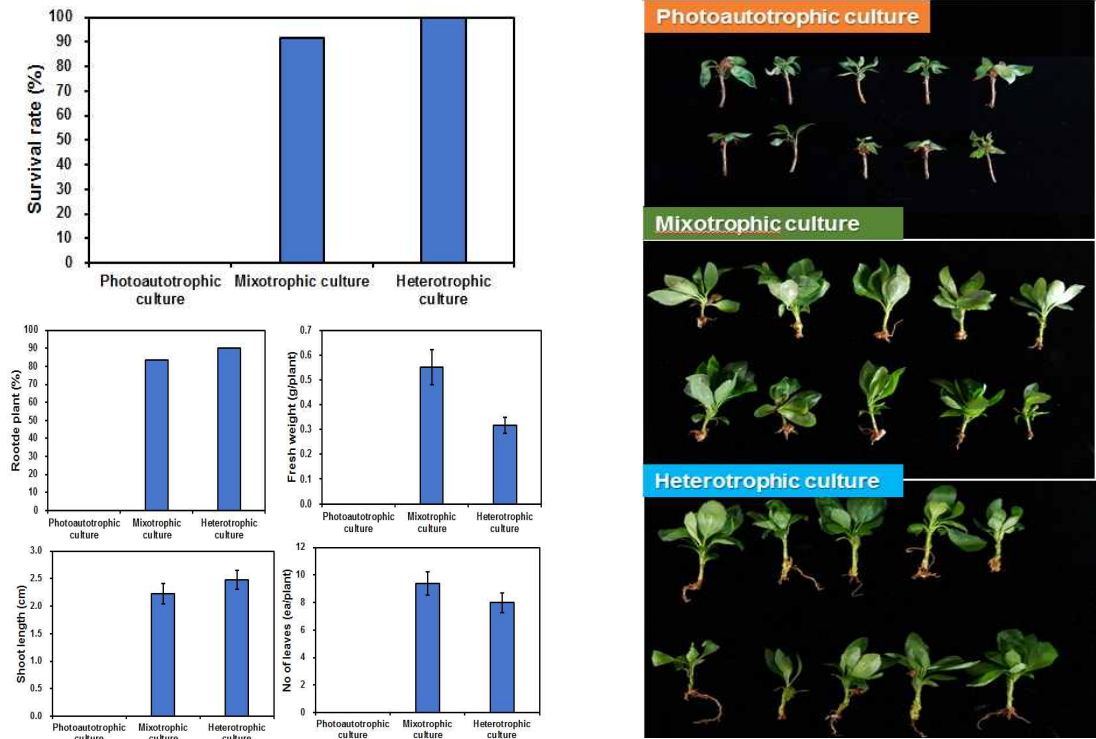


그림. 당과 환기 처리에 따라 배양된 사과 왜성대목 M.9의 성장 결과.

## 7. DNA 함량 분석을 통한 건전묘 조기 스크리닝

### 가. 사과 대량증식묘의 DNA 함량 분석

#### (1) 유세포분석법을 이용한 사과 대량증식묘의 DNA 함량 분석

##### (가) 실험재료 및 방법

- ① 식물재료 : M.9, M.26, ‘홍로’ (2년간 증식된 기내묘 각 20개체)
- ② 배양단계 : 발근 단계
- ③ 분석방법
  - ㉠ 기기 : CytoFLEX(Beckman coulter)
  - ㉡ 분석법 : CyStain PI absolute P(Partec GmbH, 독일)
  - ㉢ 분석방법 : 실험재료의 어린잎을 0.5cm<sup>2</sup> 크기로 절단한 뒤 핵을 나출시켜 DNA의 형광 값 측정
  - ㉣ Internal standard : 벼(*Oryza sativa*)

##### (나) 결과요약

- ① 2년 이상 성장조절물질이 포함된 배지에서 증식한 사과 기내배양묘의 DNA 함량을 분석하여 기내 배양묘의 염색체적 변이를 조기에 검출하고자 하였음.
- ② 이를 위해 각 품종간 20개체 이상을 무작위 선발하여 발근배지에서 기른 후
- ③ 안정적으로 성장 중인 묘의 어린 잎을 채취하여 세포내 DNA 함량을 분석함 .
- ④ 분석결과 품종간에는 다소 DNA 함량에 차이가 있었으나, 개체간 차이는 거의 없었음.
- ⑤ 본 분석 결과는 2년 이상 성장조절물질이 포함된 배지에서 증식한 사과 기내배양묘의 염색체 수에 이상이 없음을 보여주는 결과임.



표. 유세포분석을 통한 사과배양묘의 세포 DNA 분석결과.

품종	Mean	DNA index	CV
M.9	1936203.425	1.25±0.04	17.04%
M.26	2099787.98	1.35±0.04	11.41%
홍로	2172990.515	1.40±0.02	12.40%
벼	1672296.567	1.08±0.01	11.27%

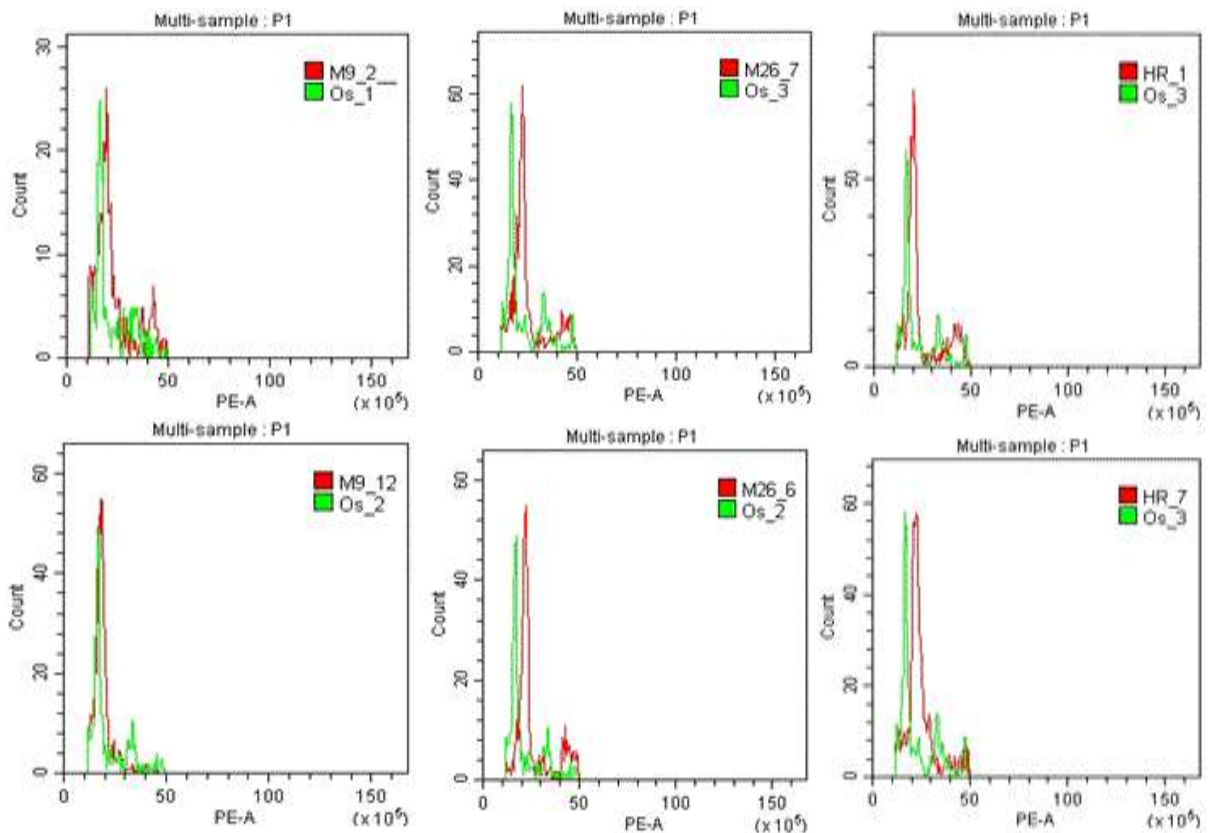


그림. 유세포분석법을 이용한 M.9(좌)과 M.26(중), ‘홍로’ (우)의 세포내 DNA 함량 분석 결과.

## 8. 무병 왜성대목과 접수를 이용한 micro-grafting 기술개발

가. 대목과 접수품종에 대하여 미세접목 방법의 접목 활착율 향상을 위한 배지 조성 및 배양 밀도 정리

(1) 미세접목(micrografting) 방법에 따른 접목을 향상 기술 개발

(가) 실험재료 및 방법

- ① 식물재료 : 대목-M.9, 접수-‘홍로’
- ② 배양단계 : 발근단계
- ③ 배지조성 : MS 배지 + IBA 2.17 μM + sucrose 3% + agar 9g/L
- ④ 배양밀도 : 6ea/50ml
- ⑤ 처리내용 : 접수 단면절단, 접수 양면절단, 대목은 M.9으로 동일

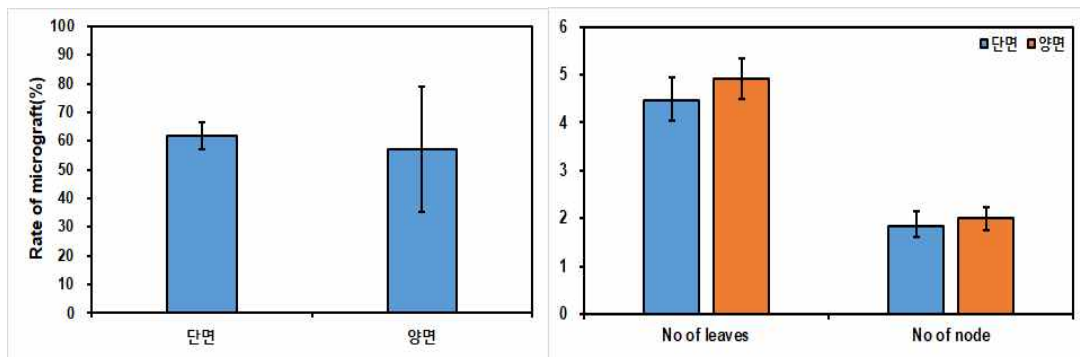
- ⑥ 배양기간 : 총 8주
- ⑦ 명배양( $88 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  PPF, 16h 명/8h 암)
- ⑧ 배양온도 :  $24 \pm 1^\circ\text{C}$



그림. 미세접목 후 접목활착 및 접목불활착.

(나) 결과요약

- ① 기내 발근배지에서 4주간 정상적으로 생육한 기내대목 (2cm 이상)을 채취하여 1cm 이하 크기의 접수를 절단 방법에 따라 조제 한 후 접목 실시함.
- ② 접목(삽수 삽입) 후 무균상태 유지 및 오염 방지를 위해 별도의 처리는 하지 않았음.
- ③ 배양 4주 후 대목에서 올라오는 신초는 제거 해주고 계대배양 유지됨.
- ④ 배양 8주 후 접목물은 접수를 단면으로 절단 한 것과 양면으로 절단한 것에 차이가 나지 않았음.
- ⑤ 잎의 수나 마디의 수는 접수를 단면절단한 접목방법에 비해 양면으로 절단 한 것에서 활착 후 더 양호하고 왕성한 생육을 보였음.



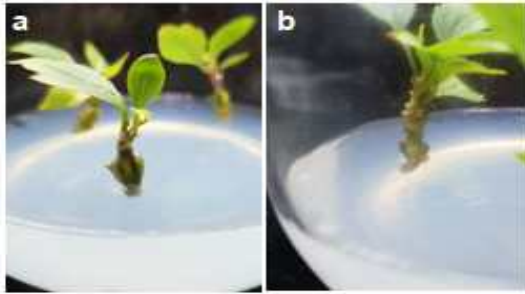


그림. 배양 8주 후 접수 절단방법에 따른 M.9(대목)과 ‘홍로’ (접수)의 접목률(좌) 및 활착 후 성장(우) (a: 단면절단, b: 양면절단).

(2) 대목 종류에 따른 기내접목 활착율의 차이 구명

(가) 실험재료 및 방법

- ① 식물재료 : 대목-M.9, M2.6, 접수- ‘홍로’
- ② 배양단계 : 발근단계
- ③ 배지조성 : MS 배지 + IBA2.17  $\mu$ M + sucrose 3% + agar 9g/L
- ④ 배양밀도 : 6ea/50ml
- ⑤ 처리내용 : 대목 종류(M.9, M.9), 미세접목시 접수의 절단방법은 단면절단으로 동일
- ⑥ 배양기간 : 총 8주
- ⑦ 배양환경 : 명배양 (88  $\mu$ mol  $\cdot$  m<sup>-2</sup>  $\cdot$  s<sup>-1</sup> PPF, 16h 명/8h 암), 24 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C

(나) 결과요약

- ① 미세접목시 접목방법이 용이하였던 단면절단으로 절단방법을 동일하게 하고 대목의 종류를 달리하여 미세접목을 실시함.
- ② 미세접목 8주 후 대목종류에 따른 접목률은 M.9이 M.26보다 양호하였음.
- ③ 접목활착 후 대목 종류에 따른 잎의 수와 마디의 수는 유의적인 차이가 없었음.

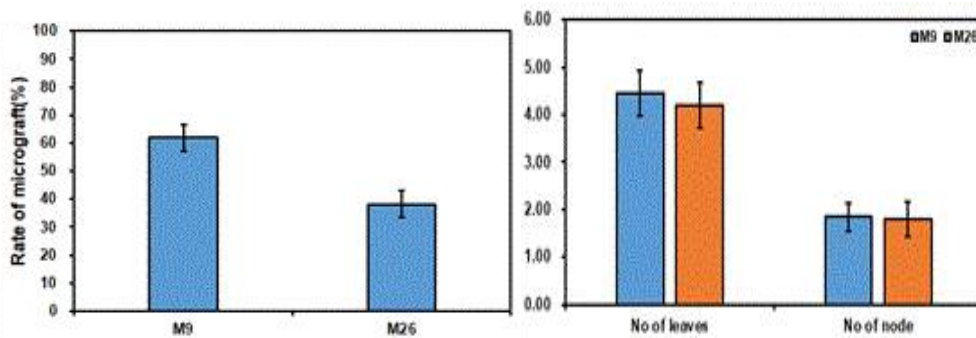


그림. 배양 8주 후 대목 종류에 따른 접목률(좌) 및 접목묘 성장(우). (대목: M.9, M.26, 접수: ‘홍로’)

9. 사과 왜성대목의 무병묘 인증을 위한 바이러스 분석

가. 분석기관 : 국립종자원 무병묘 분석팀

- 분석개체 및 주 수 : M.9 5주, M.26 15주, ‘홍로’ 7주, ‘후지’ 5주
- 분석 대상 바이러스 및 바이로이드 : 4종 바이러스, 1종 바이로이드

- ① 4종 바이러스 : 사과황화잎반점바이러스병(ACLSV), 사과줄기그루빙바이러스병(ASGV),

사과줄기흡바이러스병(ASPV), 사과모자이크바이러스병(ApMV)

② 1종 바이로이드 : 사과바이로이드병(AAVd)

- 결과 요약

- ① M.9은 분석의뢰 5개체 모두 무병요로 인증 받아서 증식 및 보급을 위한 무병묘 기본식물로 이용.
- ② M.26은 15개체 분석의뢰 한 양단계 : 발근단계
- ③ ‘홍로’ 7개체와 ‘후지’ 5개체는 무병묘로 인증 받아 현재 개체 수 증가를 위해 증식 배지에 배양.

[M.9 무병묘 검정 증명서]

[M.26 무병묘 검정 증명서]

20-00003호 (Serial Number : 20-00003)

### 종자 검정 증명서 (Certificate of Seed Sample Analysis)

신청인 (Applicant): 상원(법인명) (Name/Organization) 충북대학교 산학협력단, 생년월일(발행번호) (Date of birth) [Blank], 주소(Address) [Blank], 전화번호(Tel) [Blank]

작물명 및 학명 (Species): 사과(Malus domestica Borkh.), 품종명 (Name of variety) M9, 시료량(발행번호) (Lot number) 001-005, 시료량 및 용량 (Quantity of Samples) 5

검정항목 (Testing Items): 과수모자이크바이러스(Virus), 과수모자이크바이러스(Virus)

모수(소입당번호) (Lot number)	작물명(품종명) (Name of variety)	검정결과 (Testing Results)		비고 (Note)
		신장무수 (Number of application)	감염무수 (Number of infection)	
1	사과(M9)	1	0	미감염
2	사과(M9)	1	0	미감염
3	사과(M9)	1	0	미감염
4	사과(M9)	1	0	미감염
5	사과(M9)	1	0	미감염
합계	사과(M9)	5	0	0%

2020년 04월 02일 (Date of issue : month.day.year)

국립종자원장 (Director General of Korea Seed & Variety Service)

20-00008호 (Serial Number : 20-00008)

### 종자 검정 증명서 (Certificate of Seed Sample Analysis)

신청인 (Applicant): 상원(법인명) (Name/Organization) 충북대학교 산학협력단, 생년월일(발행번호) (Date of birth) [Blank], 주소(Address) [Blank], 전화번호(Tel) [Blank]

작물명 및 학명 (Species): 사과(Malus domestica Borkh.), 품종명 (Name of variety) M26, 시료량(발행번호) (Lot number) 001-015, 시료량 및 용량 (Quantity of Samples) 15

검정항목 (Testing Items): 과수모자이크바이러스(Virus), 과수모자이크바이러스(Virus)

모수(소입당번호) (Lot number)	작물명(품종명) (Name of variety)	검정결과 (Testing Results)		비고 (Note)
		신장무수 (Number of application)	감염무수 (Number of infection)	
01	사과(M26)	1	1	ASPV
02	사과(M26)	1	0	미감염
03	사과(M26)	1	0	미감염
04	사과(M26)	1	0	미감염
05	사과(M26)	1	0	미감염
06	사과(M26)	1	0	미감염
07	사과(M26)	1	0	미감염
08	사과(M26)	1	0	미감염
09	사과(M26)	1	0	미감염
10	사과(M26)	1	0	미감염
11	사과(M26)	1	0	미감염
12	사과(M26)	1	0	미감염
13	사과(M26)	1	0	미감염
14	사과(M26)	1	0	미감염
15	사과(M26)	1	0	미감염
합계	사과(M26)	15	1	7%

2020년 04월 02일 (Date of issue : month.day.year)

국립종자원장 (Director General of Korea Seed & Variety Service)

[‘홍로’ 무병묘 검정 증명서]

[‘후지’ 무병묘 검정 증명서]

20-00014호 (Serial Number : 20-00014)

### 종자 검정 증명서 (Certificate of Seed Sample Analysis)

신청인 (Applicant): 상원(법인명) (Name/Organization) 충북대학교 산학협력단, 생년월일(발행번호) (Date of birth) [Blank], 주소(Address) [Blank], 전화번호(Tel) [Blank]

작물명 및 학명 (Species): 사과(Malus domestica Borkh.), 품종명 (Name of variety) Hongro, 시료량(발행번호) (Lot number) H8-1, 시료량 및 용량 (Quantity of Samples) 1

검정항목 (Testing Items): 과수모자이크바이러스(Virus), 과수모자이크바이러스(Virus)

모수(소입당번호) (Lot number)	작물명(품종명) (Name of variety)	검정결과 (Testing Results)		비고 (Note)
		신장무수 (Number of application)	감염무수 (Number of infection)	
H8-1	사과(Hongro)	1	0	미감염
합계	사과(Hongro)	1	0	0%

2020년 07월 19일 (Date of issue : month.day.year)

국립종자원장 (Director General of Korea Seed & Variety Service)

20-00023호 (Serial Number : 20-00023)

### 종자 검정 증명서 (Certificate of Seed Sample Analysis)

신청인 (Applicant): 상원(법인명) (Name/Organization) 충북대학교 산학협력단, 생년월일(발행번호) (Date of birth) [Blank], 주소(Address) [Blank], 전화번호(Tel) [Blank]

작물명 및 학명 (Species): 사과(Malus domestica Borkh.), 품종명 (Name of variety) Fuji, 시료량(발행번호) (Lot number) FJ-1, 시료량 및 용량 (Quantity of Samples) 1

검정항목 (Testing Items): 과수모자이크바이러스(Virus), 과수모자이크바이러스(Virus)

모수(소입당번호) (Lot number)	작물명(품종명) (Name of variety)	검정결과 (Testing Results)		비고 (Note)
		신장무수 (Number of application)	감염무수 (Number of infection)	
FJ-1	사과(Fuji)	1	0	미감염
합계	사과(Fuji)	1	0	0%

2020년 07월 19일 (Date of issue : month.day.year)

국립종자원장 (Director General of Korea Seed & Variety Service)

그림. 국립종자원의 사과 왜성대목 무병묘 검정 증명서.

10. 식물세포주 은행 시스템을 이용한 사과 기내배양묘 라인 관리 시스템 운영

가. 기내에서 유도한 무병묘의 배양이력을 시스템에 등록하여 연구과제 종료 후에도 효율적인 관리가 체계적으로 이루어지도록 함.

- 등록품종 : M.9, M.26, ‘홍로’, ‘후지’

그림. 세포주은행 시스템을 이용하여 관리하고 있는 사과 기내배양묘.

<제3세부: 기내 배양 사과 무병종묘 대량 생산을 위한 환경조절 기술 개발>

1. 기내 배양 사과 무병종묘 대량 생산을 위한 환경조절 기술 개발

가. 대목용 기내배양 사과 소식물체를 위한 기본 재배조건 확립 및 재배시스템 선정

(1) 기내 배양 사과 대목의 기본 환경 조건 확립

(가) 실험 방법

- ① 순화에 사용되는 기본 환경 정보 조사: 온도, 습도, 광조건 문헌조사를 통하여 대목 소식물체의 기본적인 재배 환경조건에 적합한 온도와 광 조건을 확인함.
- ② 하지만, 습도 환경에 대한 정보는 부족하였기 때문에 순화에 적합한 습도 환경을 구명하기 위한 실험을 진행함.
- ③ 기내배양 사과 대목 소식물체 순화를 위한 상대습도 제어 범위 순화 환경은 온도



25°C, 광도  $60\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  PPF(형광등), 광주기 16시간으로 배양 조건과 동일하게 설정하고, 피트모스와 펄라이트를 6:4로 혼합한 배지에 정식함.

- ④ 기외 환경에 정식하기 전 1주일 동안 상대습도 90% 조건에서 배양병 마개를 열어주는 예비순화 과정을 거치지 않은 N 그룹과 예비순화 과정을 거친 T 그룹으로 나눔.
- ⑤ 각 그룹에서 3가지 제어 방식으로 상대습도를 90%에서 60%까지 점진적으로 습도를 감소시켰음.

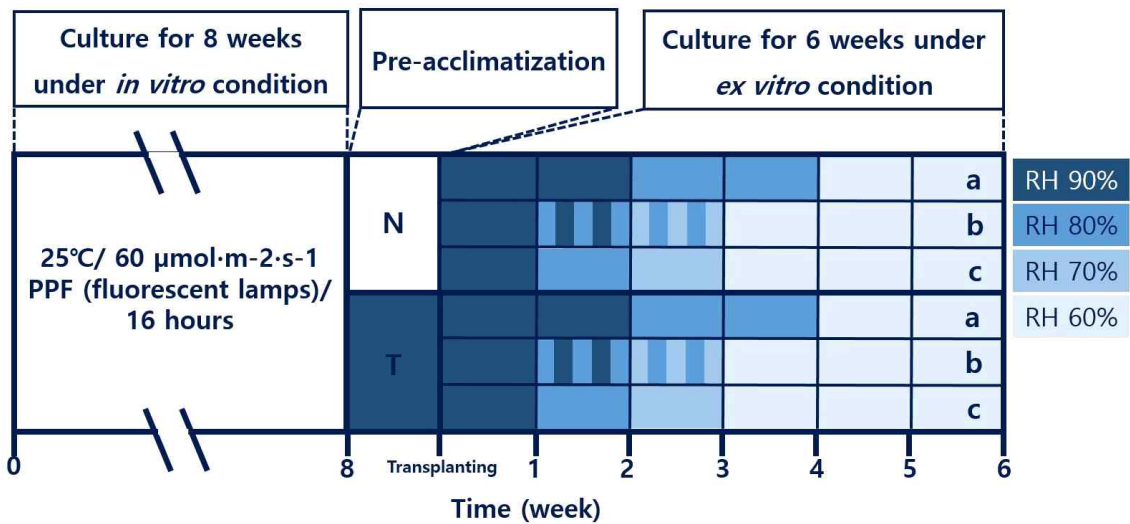


그림. 기본적인 순화 환경과 6가지 상대습도 처리.



그림. 사과 소식물체 정식 전 예비순화 처리.

#### (나) 실험 결과

- ① 예비순화를 거치지 않은 N 그룹의 생존율이 70% 이하로 낮은 반면, 예비순화를 거친 T 그룹의 생존율은 90% 이상으로 높게 나타남.

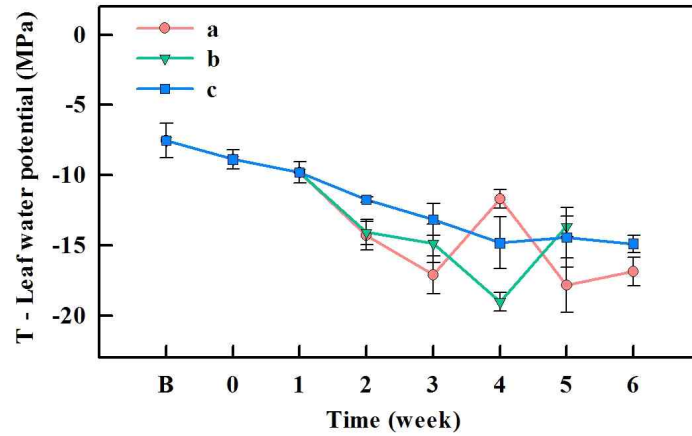


그림. 예비순화 여부 및 상대습도 제어에 따른 생존률.

- ② T 그룹의 잎 수분 퍼텐셜을 6주 동안 측정된 결과, 점차 감소하는 것을 확인할 수 있었고, 이에 따라 식물이 수분 스트레스를 받아 생육에 피해를 입은 것이라 판단됨.

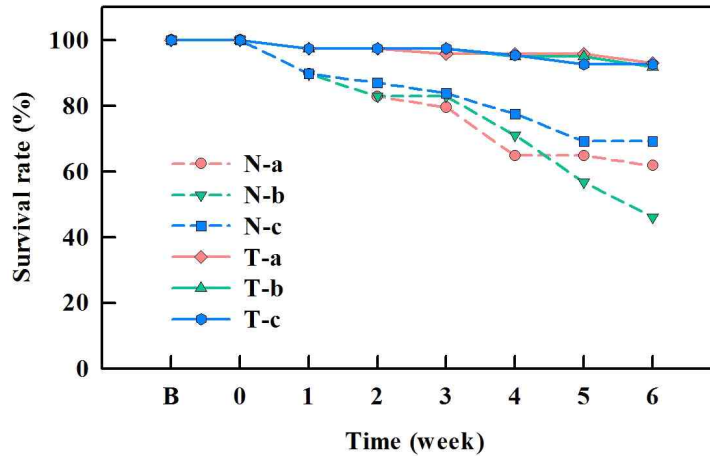


그림. 상대습도 제어에 따른 잎 수분 퍼텐셜.

- ③ 수분 스트레스의 원인을 찾기 위해 기외환경에 정식한 사과 대목 소식물체 잎의 기공을 현미경으로 관찰한 결과, 정식 1주일 후에 기공이 닫히는 것을 확인하였는데, 이것은 낮은 습도 환경에 노출됨에 따른 식물체 내 방어 기작이라 판단됨.

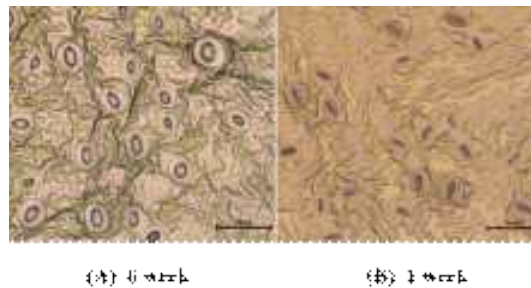


그림. 상대습도 제어에 따른 기내배양 사과 대목 소식물체 잎의 정식 전(A)과 정식 1주 후(B) 기공 개폐도.

- ④ 기외 환경에 정식 후 수분 스트레스를 받는 시점을 확인하기 위해 총 페놀화합물과 항산화도를 측정된 결과, 정식 후 2주 동안 빠른 증가를 보였으며 그 이후 상대습도 감소에 관계없이 그 수준을 유지함.
- ⑤ 이는 2주 이후, 설정된 환경조건에서 상대습도의 감소는 안정적인 범위 내에서 제어되고 있음을 의미하기 때문에, 따라서 초반의 기능성 물질 감소는 정식 시 지하부 환경 변화에 따른 수분흡수 제한에 의한 스트레스로 인한 것이라 생각됨.

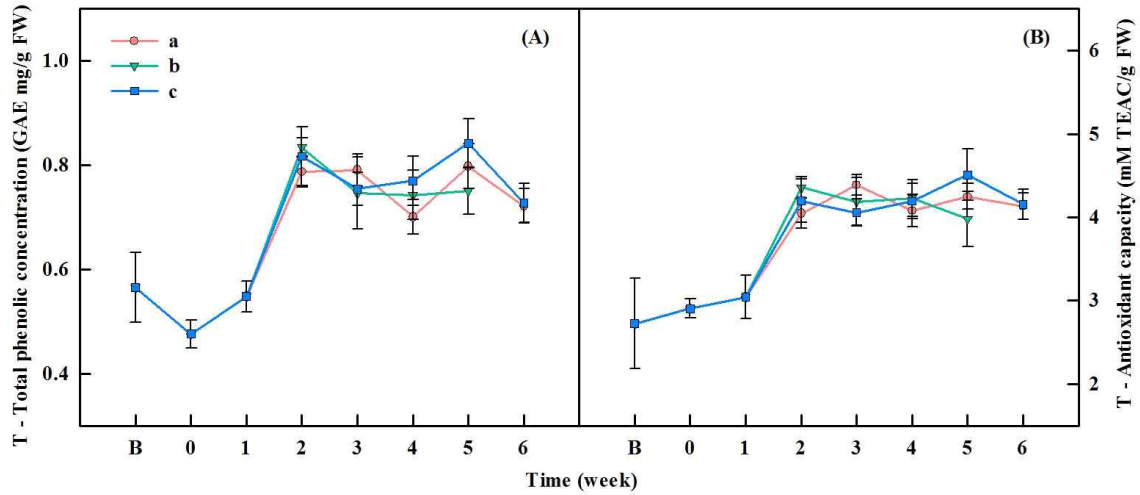


그림. 상대습도 제어에 따른 사과 대목 소식물체 지상부의 총 페놀화합물(A)과 항산화도(B).

- ⑥ 생육 측면에서 지상부와 지하부의 길이를 비교한 결과, 정식 후 2주차부터 증가하는 것을 확인할 수 있음.
- ⑦ 이는 2주차 이후에 증가한 총 페놀 함량과 항산화 물질 즉, 2차 대사산물에 의해 스트레스 내성이 생기고, 결과적으로 광합성에 의한 대사산물이 1차 대사로 분배되면서 지상부와 지하부가 신장했을 것이라고 판단됨.
- ⑧ 생육 측면에서 비교했을 때, 수치적으로 a처리구의 상대습도 제어 방법이 적합할 것으로 판단됨.

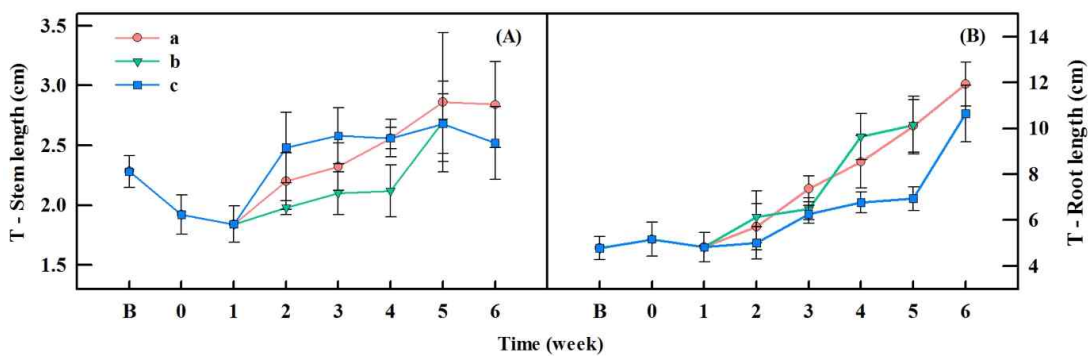


그림. 상대습도 제어에 따른 사과 대목 소식물체의 지상부(A) 및 지하부(B) 길이.

- ⑨ 사과 대목 소식물체의 순화 전용 양액 개발을 위해 암면, DFT에서 4주간 재배 후 피트모스 펄라이트 6:4 혼합배지로 옮겨준 처리구, 그리고 잎과 줄기를 나누어 ICP 분석으로 9가지 미네랄(P, K, S, Ca, Mg, Cu, Fe, Zn, Mn)의 비율을 측정함.



- ⑩ 질소의 분석은 현재 진행중에 있으며, 완료된 후 10가지 이온들의 비율을 계산을 통해 전용 양액 개발 계획 중.
- ⑪ 개발된 양액을 기존 호글랜드 양액과의 비교실험과, 양액의 EC 수준에 따른 실험을 진행할 예정.
- ⑫ 이러한 실험 결과들을 종합해 봤을 때, 사과 대목 소식물체의 성공적인 순화를 위해서 기외 환경에 정식하기 전에 예비순화 처리가 필요하다고 판단됨.
- ⑬ 주어진 환경조건과 상대습도 제어 조건 아래에서 보다 안정적인 순화를 위해서 정식할 수경재배 시스템 및 배지의 선정이 필요하다고 판단됨.

(2) 기내 배양 사과 대목의 안정적인 순화 및 발근을 위한 재배 시스템 선정

(가) 실험 방법

- ① 기내배양 사과 대목 소식물체 순화를 위한 수경재배시스템 선정
- ② 순화 환경은 온도 25℃, 광도 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  PPF(형광등), 광주기 16시간으로 배양 조건과 동일하게 설정함.
- ③ 상대습도는 이전 실험을 바탕으로, 기외 환경에 정식하기 전 1주일 동안 상대습도 90% 조건에서 배양병 마개를 열어주는 예비순화 과정을 거친 후, 상대습도 90%, 80%, 60%에서 각각 2주씩 총 7주간 순화시킴.
- ④ 실험은 동일한 지상부 환경조건에서 지하부 환경만을 달리하여, 피트모스와 펠라이트를 6:4로 혼합한 배지(A), 암면(B), 우레탄 스펀지(C), 담액경인 DFT(D)에 각각 정식하고, D처리구의 일부를 정식 4주 후에 A처리구로 옮겨준 E처리구로 나누어 진행함.

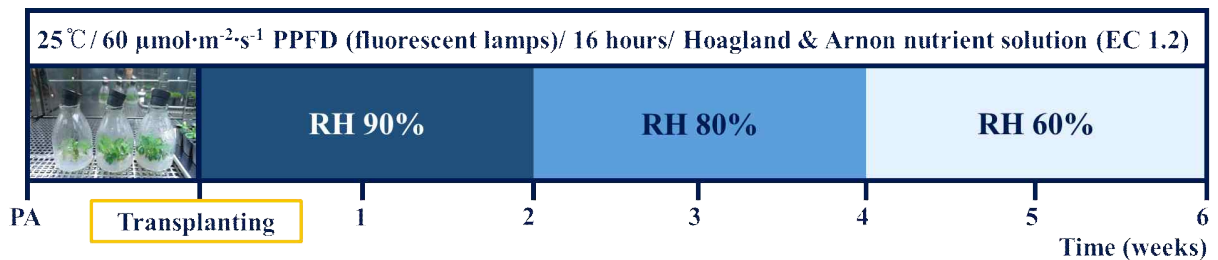


그림. 기본적인 순화 환경과 단계별 상대습도 제어.

(가) 실험 결과

- ① 피트모스와 펠라이트를 6:4로 혼합한 배지에 정식한 A처리구가 60%정도의 생존률을 보인 반면 나머지 처리구는 90% 이상의 높은 생존률을 보임.
- ② 이는 다른 처리구에 비해 상대적으로 A처리구가 수분흡수에 불리하기 때문으로 판단됨.

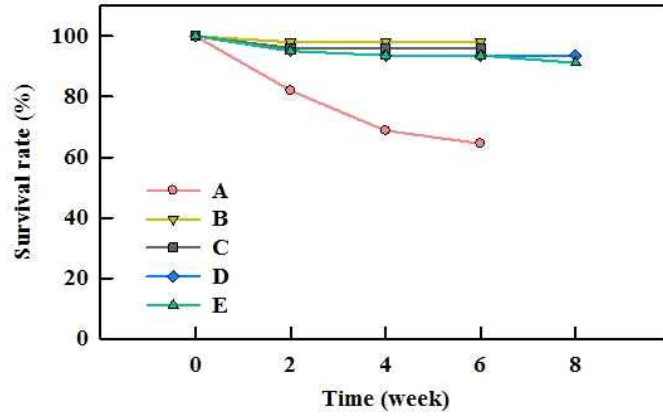


그림. 수경재배 시스템에 따른 사과 대목 소식물체의 생존률.

- ③ 사과 대목 소식물체의 6주차 생육(지상부와 지하부의 길이, 생체중 및 건물중, 엽수, 그리고 엽면적)을 비교한 결과, 대부분 D가 제일 높은 값을 보였으며 다음으로 B, C, E, 그리고 A 순으로 나타남.
- ④ 이는 수분흡수가 유리한 환경에서 보다 높은 성장률을 보였다고 판단됨.
- ⑤ 추가적으로 사과묘의 초장 조절하는데 있어 수경재배 시스템에 따라 조절이 가능할 것으로 판단됨(초장 축진을 위해서는 DFT, 초장 억제를 위해서는 배지경 사용).

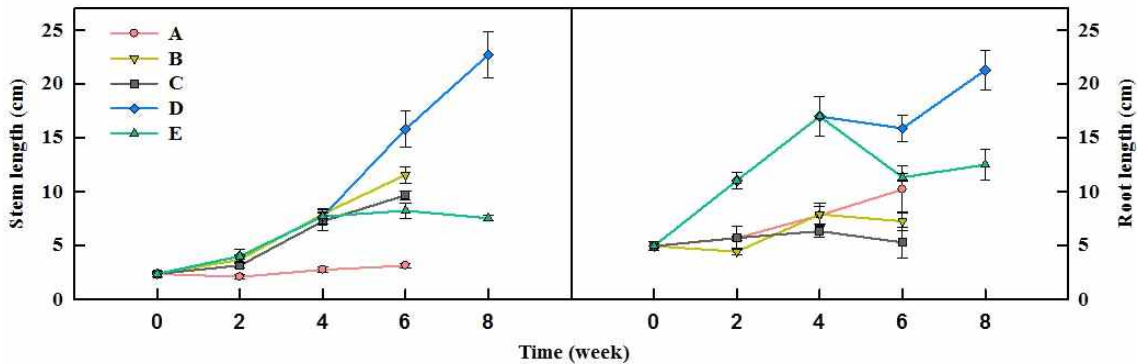


그림. 수경재배 시스템에 따른 사과 대목 소식물체의 지상부 및 지하부 길이.

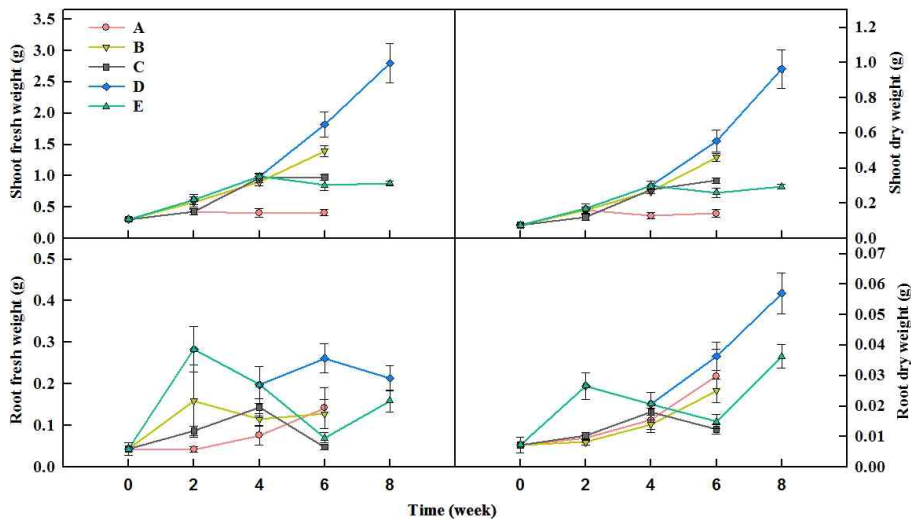


그림. 수경재배 시스템에 따른 사과 대목 소식물체 지상부 및 지하부의 생체중과 건물중.

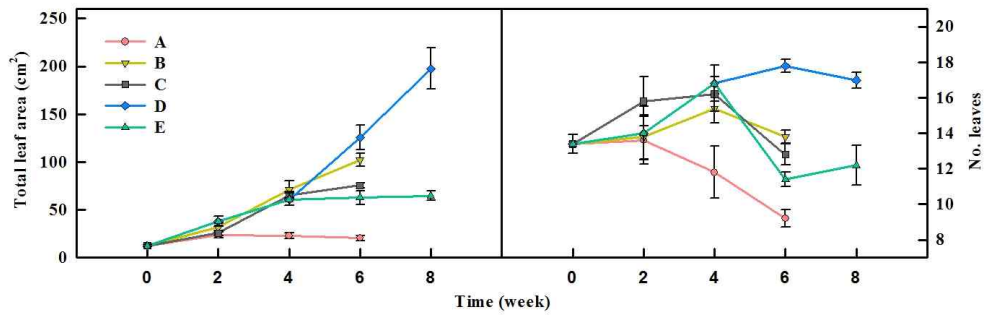


그림. 수경재배 시스템에 따른 사과 대목 소식물체의 엽면적 및 엽수.

- ⑥ 수경재배 성장 배지에 따라 이식된 사과 대목 소식물체의 스트레스 정도를 확인하기 위해 측정된 총 페놀화합물과 항산화도를 비교한 결과, A가 가장 빠르게 증가하는 경향을 보였음.
- ⑦ 4주 동안 DFT 시스템에서 성장한 D와 E의 총 페놀화합물과 항산화도는 상대습도를 60%로 감소시킨 4주차 이후에 급격하게 증가했고, 특히 D가 더 크게 증가함.
- ⑧ 이러한 결과들은 상대적으로 수분흡수가 불리한 A가 순화 초기에 높은 상대습도 조건임에도 큰 수분 스트레스를 받는다는 것을 의미하며, 양수분의 흡수가 원활하게 이루어진 D가 상대습도 감소에 보다 효율적으로 반응한다고 판단됨.

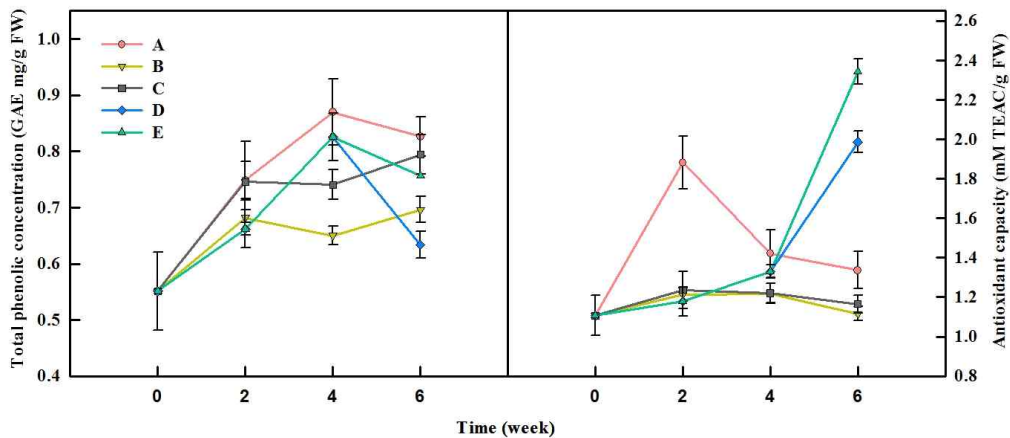


그림. 수경재배 성장 배지에 따른 사과 대목 소식물체의 총 페놀화합물과 항산화도.

- ⑨ 기내배양 사과 대목 소식물체의 성공적인 순화를 위해서는 수경재배 시스템 및 배지의 선정이 필요함.
- ⑩ 기내배양 사과 대목 소식물체의 순화와 생육에 있어서 양분과 수분흡수가 원활한 지하부 환경의 조성이 핵심요인으로 판단됨.

나. 대목용 기내배양 사과 소식물체의 순화 및 발근 촉진을 위한 지하부 환경제어 기술 개발

(1) 순화 및 발근 촉진을 위한 지하부 물리적 환경조건 구명

(1-1) 사과무병대목의 순화 초기 담액수경 시스템의 적용

(가) 실험 방법

- ① 순화 환경은 온도 25°C, 광도 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  PPF(형광등), 광주기 16시간으로 배양 조건과 동일하게 설정함.
- ② 양액은 호글랜드 양액(EC: 1.2 /pH: 6.02) 사용함.
- ③ 기외 환경에 정식하기 전 1주일 동안 상대습도 90% 조건에서 배양병 마개를 열어주는 예비순화 과정을 거친 후, 담액수경(DFT) 시스템에 정식함.
- ④ 상대습도는 90%-80%-60%로 2주 간격으로 총 6주 동안 점진적으로 감소함.
- ⑤ DFT에 정식된 일부 사과묘를 피트모스와 펄라이트를 6:4로 혼합한 배지로 정식 2주차에 이식한 A 처리구, 4주차 이식한 B 처리구, 그리고 6주의 순화기간 동안 계속 DFT에서 성장한 C처리구의 성장특성(생존율, 초장, 근장, 줄기 직경, 총 엽면적, 생체중 및 건물중, 항산화도)의 변화를 확인함.


Growth chamber 25°C/ 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PPF (fluorescent lamps)/ 16 hours Hoagland's nutrient solution (EC: 1.2/pH: 6.02)								
RH	90%	90%	80%	60%				
A	 Pre-acclimatization	DFT	Peat moss & Perlite (6:4)	Peat moss & Perlite (6:4)				
B		DFT	DFT	Peat moss & Perlite (6:4)				
C		DFT	DFT	DFT				
	B	0	1	2	3	4	5	6
		Time (weeks)						

그림. 기본적인 순화 환경과 순화 단계 별 재배시스템의 변화 처리.

(나) 실험 결과

- ① A 처리구의 생존율이 91.9%였고, B와 C 처리구의 생존율은 모두 89%였음.
- ② 이전 재배시스템 선정을 위한 실험에서와 마찬가지로 순화 초기에 DFT 시스템의 적용은 기내배양 사과묘의 생존율을 높게 유지하는데 기여하는 것으로 보임.
- ③ 정식 2주차 이후 어느 정도 기외 환경에 적응한 기내배양 사과묘는 지하부 물리적 환경 변화에 의해서 생존율 저하를 유도할 정도의 손상은 받지 않는 것으로 판단됨.

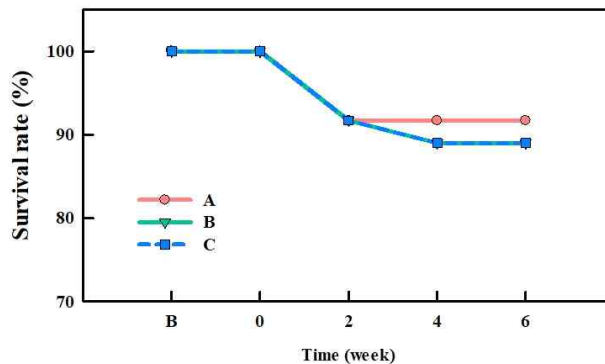


그림. 순화 단계별 재배시스템의 변화에 따른 사과무병대목의 생존율.

- ④ 처리구 C의 경우 초장, 근장, 총 엽면적, 줄기 직경 모두 정식 4주 이후에 급격하게 증가하는 경향을 보임.
- ⑤ 반면, 처리구 B는 정식 4주차에 DFT에서 피트모스 펄라이트 혼합배지로 이식한 이후에 처리구 C와 달리 생장률이 급격히 감소함.
- ⑥ 정식 2주차에 먼저 이식한 처리구 A 또한 처리구 B와 유의적인 차이 없이 비슷한 경향을 보였으며, 이는 정식 4주차까지는 낮은 생장율로 인해 생장 차이가 발생하지 않음.

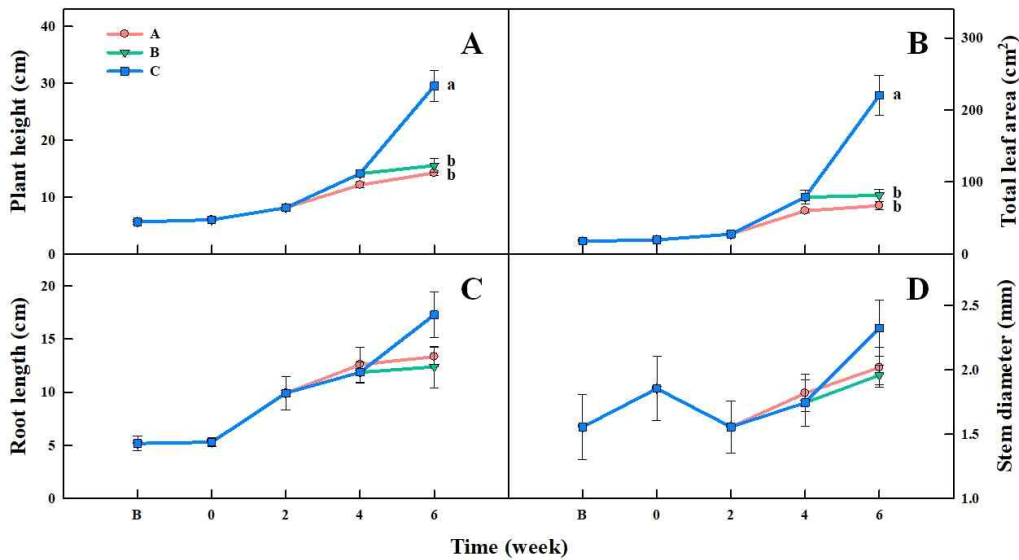


그림. 순화 단계별 재배시스템의 변화에 따른 사과무병대목의 초장(A), 총 엽면적(B), 근장(C), 줄기 직경(D).

- ⑦ 이러한 생장 특성의 변화는 생체중 및 건물중에서 더 확연하게 나타남.
- ⑧ 정식 4주차까지는 세 처리구 모두 유의적인 차이가 없었으며, 정식 6주차에 처리구 C의 생체중 및 건물중이 유의적으로 가장 높았음.

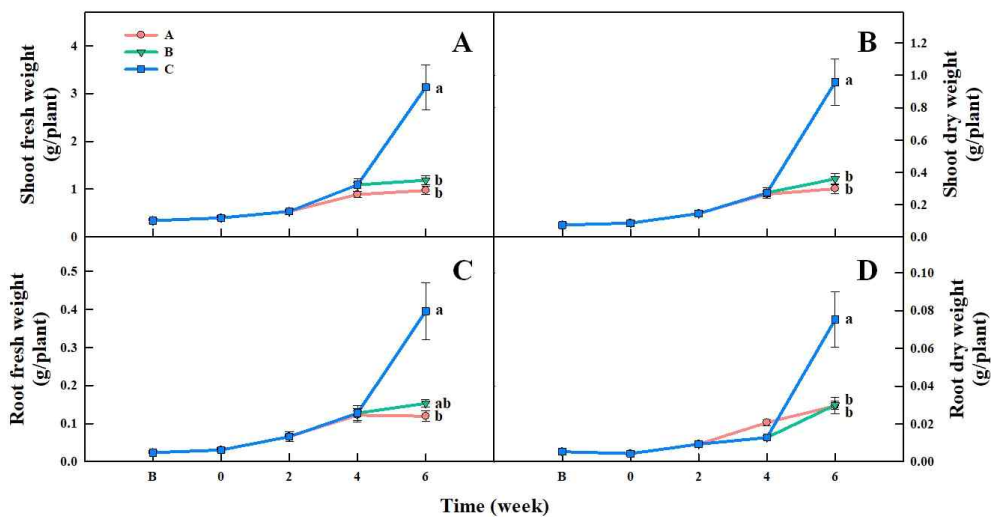


그림. 순화 단계 별 재배시스템의 변화에 따른 사과무병대목의 지상부(A, B)와 지하부(C, D)의 생체중(A, C) 및 건물중(B, D).

⑨ 정식 6주차에 세 처리구의 사진을 통해 생육 차이를 육안으로 확인할 수 있음.

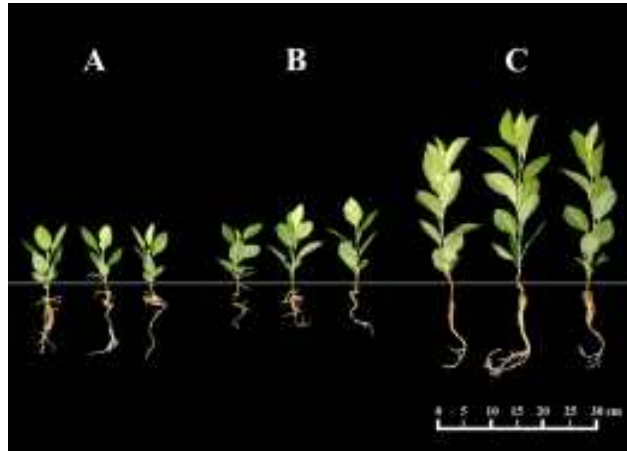


그림. 정식 6주차 사과무병대목의 순화 단계별 재배시스템의 변화에 따른 생육 차이.

- ⑩ 항산화도 측정 결과 세 처리구 모두 정식직후부터 2주차까지 급격하게 증가하는 경향을 보였음.
- ⑪ 처리구 A는 피트모스, 펄라이트 혼합배지로 이식한 이후에 다른 처리구들에 비해 항산화도가 미세하게 증가한 경향을 보였지만 유의적인 차이는 없었음.
- ⑫ 처리구 B도 피트모스, 펄라이트 혼합배지로 이식한 이후 항산화도가 증가했고, 처리구 C보다는 유의적으로 높게 나타났음.
- ⑬ 처리구 C는 항산화도가 정식 2주차에 증가한 이후에 점차 낮아지는 경향을 보였음.

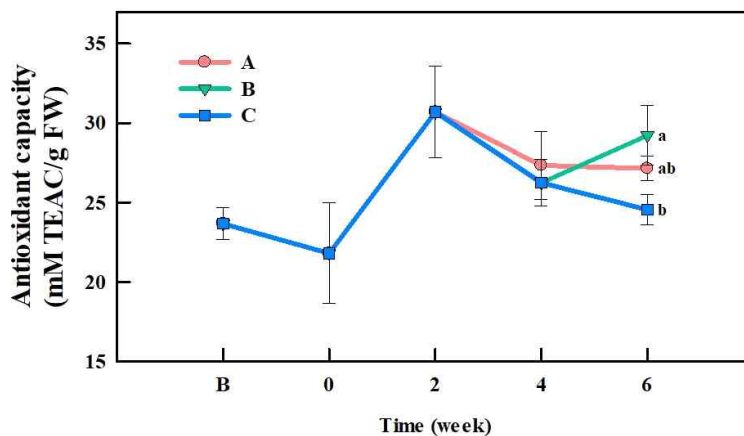


그림. 정식 6주차 사과무병대목의 순화 단계별 재배시스템의 변화에 따른 항산화도 변화.

- ⑭ 이러한 결과들은 정식 후 4주 동안의 초기 순화기간이 집중적인 순화기간임을 반증하며, 이 시기에 피트모스, 펄라이트의 지하부 환경은 생장을 저해하고 항산화도를 증가시키므로 스트레스 요인이 될 수 있다고 판단됨.
- ⑮ 따라서 이 집중적인 순화기간에 DFT 시스템의 적용은 사과 대목 소식물체의 성공적인 순화와 성장 촉진에 기여할 수 있을 것이라 예상함.
- ⑯ 또한 DFT에서 배지경으로 이식함으로써 기내배양 사과 소식물체의 생장률을 제어할 수 있다고 판단됨.



(1) 순화 및 발근 촉진을 위한 지하부 물리적 환경조건 구명

(1-2) 사과무병대목의 순화 및 발근 촉진을 위한 용존산소량(DO) 제어

(가) 실험 방법

- ① 순화 환경은 온도 25℃, 광도 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  PPF(형광등), 광주기 16시간으로 배양 조건과 동일하게 설정함.
- ② 양액은 호글랜드 양액(EC: 1.2/pH: 6.02)을 사용함.
- ③ 기외 환경에 정식하기 전 1주일 동안 상대습도 90% 조건에서 배양병 마개를 열어주는 예비순화 과정을 거친 후, 새로 개발된 DFT 시스템에 정식함.
- ④ 새로 개발된 DFT 시스템은 설치된 9개의 기포 발생 장치를 통해 균일한 산소 공급이 가능하며, 에어스톤 헤드의 공극률에 따라 기포 크기 조절이 가능함(특허출원).
- ⑤ 상대습도는 90% - 80% - 60%로 2주 간격으로 총 6주 동안 점진적으로 감소시킴
- ⑥ 대조구는 기존에 사용하는 방식으로 하나의 원형 에어스톤이 설치된 DFT 시스템(Control)으로 설정하고, 새로 개발된 DFT 시스템에 공극의 크기가 다른 에어스톤을 설치하여 small-size bubble(A)과 big-size bubble(B) 처리구로 나누어 소식물체를 순화시킴.

(나) 실험 결과

- ① 공극의 크기는 control이 가장 작고, A, B 순으로 작았음.
- ② 뿌리는 기포 크기가 작을수록 생육이 촉진되는 결과를 보였음.
- ③ 기포 크기가 가장 큰 B 처리구는 뿌리가 심하게 갈변하는 모습이 관찰됨.
- ④ 이는 기포의 크기가 작을수록 용액 내에 잔류하는 시간이 늘어나면서 용해되는 산소의 증가와 뿌리와 기포의 직접적인 접촉의 기회가 늘어나면서 뿌리 호흡에 기여했을 것이라 판단됨.

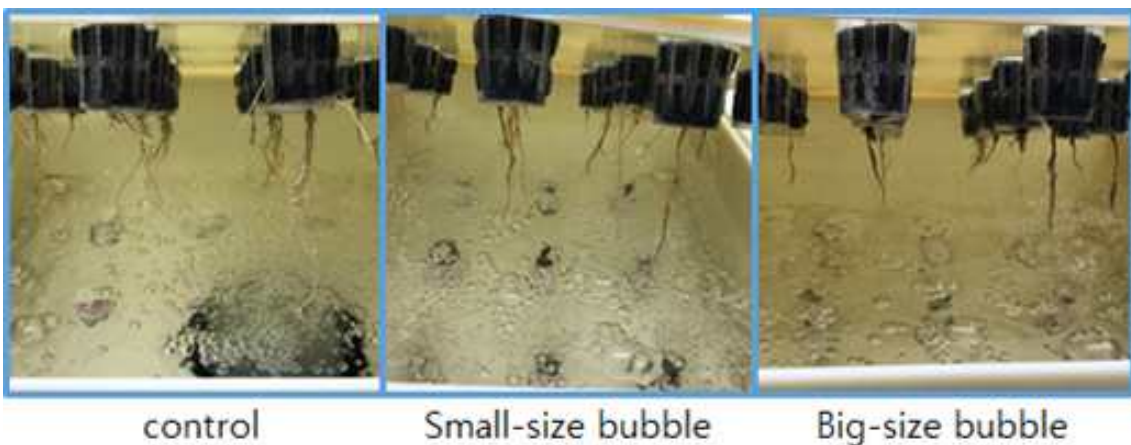


그림. 정식 2주차 사과 대목 소식물체의 기포발생 형태 따른 뿌리생육.

- ⑤ Control은 기포가 가장 작기 때문에 뿌리 생육에는 긍정적인 효과를 보였지만, 전체적인 면적에서 균일하게 발생되지 않았기 때문에 에어스톤에서 먼 위치에 정식된 사과묘의 지상부가 심하게 피해를 입어 결국 균일한 순화 및 생장을 기대하기 어려운 것으로 확인됨.

- ⑥ Small-size bubble 처리구는 전체적으로 큰 피해를 입은 개체는 관찰되지 않았지만, big-size bubble 처리구는 지하부의 갈변증상과 연관되어 대부분의 개체가 지상부의 피해를 입었음.



그림. 정식 2주차 사과 대목 소식물체의 기포발생 형태 따른 지상부 생육 및 피해정도.

- ⑦ DFT 시스템의 기포발생장치가 뿌리 생육에 영향을 미치며, 기포 크기가 작을수록 긍정적인 영향을 미친다고 판단됨.
- ⑧ 기존 방식과 달리 전체적인 면적에서 균일하게 발생하는 기포는 기내배양 사과묘의 안정적이며 균일한 순화에 기여할 수 있다고 판단됨.

(2) 순화 및 발근 촉진을 위한 지하부 화학적 환경조건 구명

(2-1) 사과무병대목의 순화와 성장을 위한 전용 배양액 개발

(가) 실험 방법

- ① 6주 동안 호글랜드 양액이 담긴 DFT 시스템에서 순화된 사과 소식물체의 미네랄을 분석하고, 이를 바탕으로 사과 소식물체 전용 배양액 개발함.

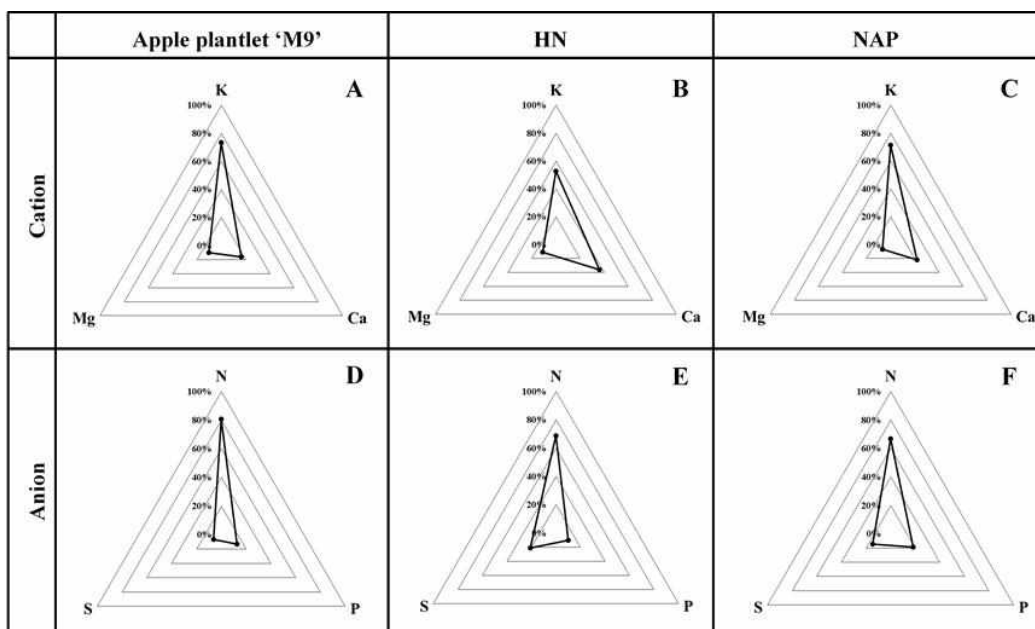


그림. 사과무병대목, 호글랜드 양액(HN), 새로 개발된 사과 전용 양액(NAP)의 양이온 및 음이온 비율.



- ② 배양액의 농도에 따른 기내배양 사과무병대목의 생존율을 확인하기 위해 호글랜드 양액(HN)과 사과 소식물체의 미네랄 흡수 비율을 기반으로 개발한 배양액(NAP)을 몇 가지 EC 수준에서 비교함.

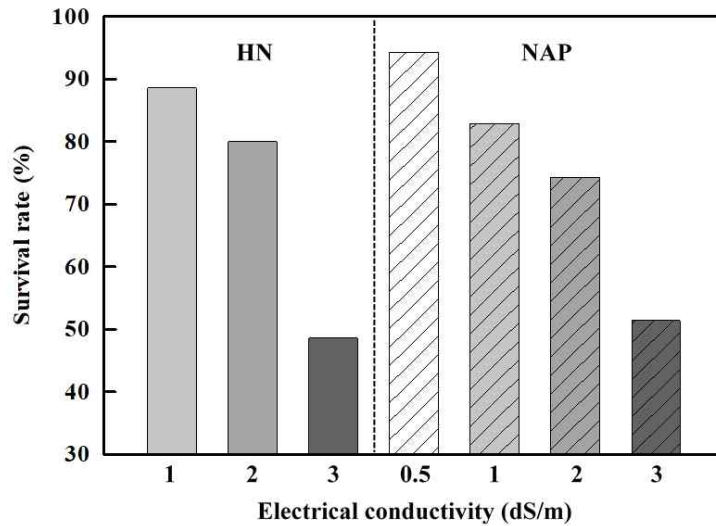


그림. 호글랜드 배양액(HN)과 새로 개발된 사과 전용 배양액(NAP)의 농도에 따른 기내배양 사과무병대목의 생존율.

- ③ 순화 환경은 온도 25°C, 광도  $60\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  PPF(형광등), 광주기 16시간으로 배양 조건과 동일하게 설정함.  
 ④ 기외 환경에 정식하기 전 1주일 동안 상대습도 90% 조건에서 배양병 마개를 열어주는 예비순화 과정을 거친 후, DFT 시스템에 정식함.  
 ⑤ 양액은 HN과 NAP을 세 가지 EC 수준(0.5, 1.0, 2.0)에서 비교함.  
 ⑥ EC 0.5의 NAP 처리구의 일부는 정식 2주차(NAPex2)와 4주차(NAPex4)에 각각 EC 수준을 2.0으로 증가시켜서 성장률의 변화를 비교함.

(나) 실험 결과

25°C/ 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PPF (fluorescent lamps)/ 16 hours/ Deep Flow Technique (DFT)							
Time (week)	PA <sup>z</sup>	1	2	3	4	5	6
Relative humidity (RH)		90%		80%		60%	
Hoagland / Arnon Solutions	HN <sub>0.5</sub>	EC 0.5 dS/m					
	HN <sub>1.0</sub>	EC 1.0 dS/m					
	HN <sub>2.0</sub>	EC 2.0 dS/m					
Newly Developed Solutions	NAP <sub>0.5</sub>	EC 0.5 dS/m					
	NAP <sub>1.0</sub>	EC 1.0 dS/m					
	NAP <sub>2.0</sub>	EC 2.0 dS/m					
	NAP <sub>ex2</sub>	EC 0.5 dS/m		EC 2.0 dS/m			
	NAP <sub>ex4</sub>	EC 0.5 dS/m				EC 2.0 dS/m	

그림. 사과무병대목의 기본적인 순화 환경과 배양액의 종류 및 농도별 처리.

- ① EC가 증가함에 따라 생존율이 감소하는 경향이 나타남.
- ② 이러한 결과는 순화 초기 고농도의 배양액은 근권부 수분퍼텐셜을 감소시킴으로써 수분흡수 억제로 인해 수분부족 스트레스를 심화시키는 것으로 판단됨.
- ③ 정식 2주차 지상부 생육은 유의적인 차이는 없었지만, 두 배양액처리 모두 EC 0.5의 낮은 농도 처리에서 수치적으로 높은 경향을 보였음.
- ④ 이와 반대로, 정식 6주차 지상부 생육은 EC 2.0의 높은 농도 처리에서 높은 경향을 보였고, 총 엽면적은 유의적인 차이를 보였음.

표. 호글랜드 배양액(HN)과 사과무병대목의 미네랄 흡수 비율을 기반으로 개발한 배양액(NAP)의 농도에 따른 지상부 생육.

Time (week)	Treatment <sup>2</sup>	EC (dS·m <sup>-1</sup> )	Stem length (cm)	Total leaf area (cm <sup>2</sup> )	Shoot		
					Fresh weight (g)	Dry weight (g)	
0	In vitro		2.6	13.5	0.3	0.08	
2	HN	0.5	3.6	21.5	0.4	0.11	
		1.0	2.8	18.2	0.4	0.10	
		2.0	3.2	16.7	0.3	0.07	
	NAP	0.5	3.4	22.2	0.4	0.11	
		1.0	3.1	15.9	0.3	0.08	
		2.0	2.9	12.5	0.3	0.07	
	Significance	Treatment		NS	NS	NS	NS
		EC		NS	NS	NS	NS
		Treatment × EC		NS	NS	NS	NS
4	HN	0.5	5.5	32.4	0.6	0.16	
		1.0	6.2	39.7	0.7	0.21	
		2.0	4.9	33.7	0.6	0.18	
	NAP	0.5	6.8	42.4	0.8	0.23	
		1.0	6.6	37.5	0.7	0.19	
		2.0	6.5	39.8	0.7	0.20	
	Significance	Treatment		NS	NS	NS	NS
		EC		NS	NS	NS	NS
		Treatment × EC		NS	NS	NS	NS
6	HN	0.5	10.4	58.0 b <sup>3</sup>	1.1	0.33	
		1.0	11.8	77.7 ab	1.2	0.36	
		2.0	12.1	90.6 a	1.4	0.45	
	NAP	0.5	12.3	77.6 ab	1.3	0.39	
		1.0	12.5	86.1 a	1.4	0.42	
		2.0	12.8	90.1 a	1.4	0.44	
	Significance	Treatment		NS	NS	NS	NS
		EC		NS	*	NS	NS
		Treatment × EC		NS	NS	NS	NS

<sup>2</sup>HN: Hoagland nutrient solution, NAP: nutrient solution for apple plantlet.

<sup>3</sup>Different letters within columns indicate significant differences according to Duncan's multiple range test.

NS,\* Non significant or significant at  $p < 0.05$ , respectively.

- ⑤ 정식 2주차 지하부 생육은 지상부 생육과 비슷하게 두 배양액 처리 모두에서 낮은 농도 처리에서 유의적으로 높게 나타남.
- ⑥ 정식 4주차부터 NAP의 뿌리의 표면적과 건물중이 HN보다 유의적으로 높게 나타났고, 정식 6주차에는 NAP의 모든 지하부 생육이 HN보다 유의적으로 높게 나타남.

표. 호글랜드 배양액(HN)과 사과무병대목의 미네랄 흡수 비율을 기반으로 개발한 배양액(NAP)의 농도에 따른 지하부 생육.

Time (week)	Treatment <sup>z</sup>	EC (dS·m <sup>-1</sup> )	Root			
			Total length (cm)	Surface area (cm <sup>2</sup> )	Fresh weight (mg)	Dry weight (mg)
4	HN	0.5	14.0	9.6 b	110.2	12.8 c
		1.0	15.0	10.6 b	160.0	19.8 ab
		2.0	17.7	12.8 ab	158.6	14.3 bc
	NAP	0.5	13.8	13.0 ab	151.3	20.8 a
		1.0	16.4	13.8 ab	172.5	18.0 abc
		2.0	15.2	16.0 a	198.4	20.9 a
	Significance	Treatment	NS	*	NS	*
EC		NS	NS	NS	NS	
Treatment × EC		NS	NS	NS	*	
6	HN	0.5	14.4 b	13.6 d	114.2 d	14.3 d
		1.0	15.0 ab	15.7 cd	151.6 cd	18.4 cd
		2.0	16.6 ab	20.0 abc	221.9 bc	27.4 bc
	NAP	0.5	18.0 a	24.6 a	307.5 a	38.3 a
		1.0	16.9 ab	23.1 ab	237.0 ab	33.1 ab
		2.0	17.8 a	17.9 bcd	210.4 bc	23.3 bcd
	Significance	Treatment	*	***	***	***
EC		NS	NS	NS	NS	
Treatment × EC		NS	**	**	***	

<sup>z</sup>HN: Hoagland nutrient solution, NAP: nutrient solution for apple plantlets.

<sup>y</sup>Different letters within columns indicate significant differences according to Duncan's multiple range test.

NS, \*, \*\*, \*\*\* Not significant or significant at  $p < 0.05$ , 0.01 or 0.001, respectively.

- ⑦ EC 농도가 0.5에서 2.0으로 증가하는 시기에 두 처리구 모두 사과 소식물체의 생장률이 높아지는 경향을 보였음.
- ⑧ 4주차에 EC를 증가시킨 NAPex4 처리구의 증가한 생장률은 2주차에 EC를 증가시킨 NAPex4 처리구의 생장률보다 2배 이상 높았음.

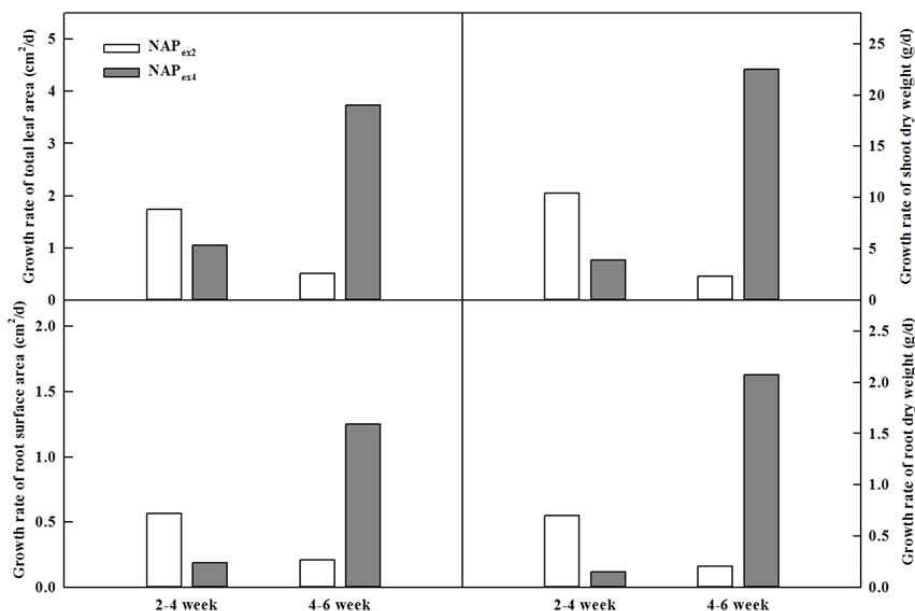


그림. 사과무병대목의 미네랄 흡수 비율을 기반으로 개발한 배양액(NAP)의 EC농도 변화에 따른 생장률 변화.

- ⑨ 두 배양액 처리 모두 EC 농도가 증가함에 따라 대부분의 미네랄 흡수량이 유의적으로 증가했음.
- ⑩ 칼슘과 마그네슘의 경우 상대적으로 비율이 높았던 HN 처리구의 함량이 유의적으로 높았고, 칼륨과 인은 해당 미네랄의 비율이 높았던 NAP 처리구에서 유의적으로 높았음.
- ⑪ 두 배양액 처리에 따라 미네랄 조성에 어느 정도 차이가 생겼지만, 사과 소식물체의 양이온 및 음이온 비율은 크게 변하지 않았음.

표. 6주 동안 순화를 거친 기내배양 사과무병대목의 미네랄 함량 분석.

Treatment <sup>2</sup>	EC (dS m <sup>-1</sup> )	Macronutrient (mg·g <sup>-1</sup> DW)					Micronutrient (μg·g <sup>-1</sup> DW)			
		P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe	Zn	Mn
HN	0.5	3.6 e <sup>x</sup>	25.3 b	5.6 b	3.6 b	2.1 cd	12.0 c	116.2 b	72.8 c	66.3 e
	1.0	3.8 d	23.8 c	5.6 b	3.9 a	2.2 bc	9.9 d	124.8 a	47.8 d	63.7 f
	2.0	4.3 b	25.0 b	5.8 a	3.8 a	2.2 bc	8.2 e	126.4 a	36.7 e	77.0 c
NAP	0.5	4.0 c	23.4 c	4.1 d	3.5 c	2.1 d	16.5 a	99.5 c	95.6 a	79.8 b
	1.0	4.3 b	25.2 b	4.0 d	3.2 d	2.3 ab	15.0 b	102.4 c	83.3 b	73.4 d
	2.0	5.1 a	27.8 a	4.4 c	3.2 d	2.4 a	14.0 b	115.0 b	71.5 c	90.8 a
Significance	Treatment	***	**	***	***	*	***	***	***	***
	EC	***	***	***	NS	***	***	***	***	***
	Treatment × EC	***	***	NS	***	**	NS	NS	***	***

<sup>2</sup>HN: Hoagland nutrient solution, NAP: nutrient solution for apple plantlets.

<sup>3</sup>Different letters within columns indicate significant differences according to Duncan's multiple range test.

NS, \*, \*\*, \*\*\* Not significant or significant at  $p < 0.05, 0.01$  or  $0.001$ , respectively.

- ⑫ 이러한 결과들은 사과 소식물체의 미네랄 흡수 비율에 맞게 조성된 NAP를 순화 단계에 따라 적당한 EC 농도로 양액을 공급한다면 기내배양 사과묘의 빈약한 뿌리 발달로 인해 발생하는 문제들을 개선함으로써 성공적인 순화에 기여할 수 있을 것으로 판단됨.

## (2) 순화 및 발근 촉진을 위한 지하부 화학적 환경조건 구명

### (2-2) 사과무병대목의 뿌리 성장 촉진을 위한 옥신 처리

#### (가) 실험 방법

- ① 발근촉진제로 사용되는 호르몬인 옥신을 처리했을 때 뿌리생장이 증가할 것이라는 가설을 세우고, 효과적인 처리 방법을 구명하기 위해 다음과 같은 실험을 진행함.
- ② 순화 환경은 온도 25°C, 광도 60 μmol · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup> PPF(형광등), 광주기 16시간으로 배양 조건과 동일하게 설정하고, 배양액은 새로 개발된 NAP를 EC 0.5로 공급함.
- ③ 1주일 동안 상대습도 90% 조건에서 배양병 마개를 열어주는 예비순화 과정을 거친 후, DFT 시스템에 정식함.
- ④ 정식 전 사과무병대목의 뿌리를 세 가지 농도(500, 1000, 1500ppm)의 IAA, IBA, NAA 세 가지 형태의 옥신에 각각 5초간 침지시킨 뒤 뿌리가 마르지 않도록 적신 종이타올로 감싼 상태로 1시간동안 반응시킨 뒤 정식함.
- ⑤ 실험은 완전임의배치법으로 설계됨.

(나) 실험 결과

- ① 옥신 종류에 따른 생육은 IBA의 총 엽면적과 지상부 생체중이 유의적으로 가장 높게 나타났으며, 농도는 1,500ppm에서 유의적으로 높은 초장, 총 엽면적, 지상부 생체중이 관찰됨.
- ② 기존 가설과는 달리 지하부 생육보다는 지상부 생육에서 유의적인 차이들이 관찰됐지만, 결과적으로 1,500ppm IBA 처리구의 지상부 생육뿐만 아니라 지하부 생육 또한 가장 높게 증가함.
- ③ 하지만 옥신 처리를 하지 않은 대조구와 유의적인 차이는 보이지 않음.

표. 세 가지 옥신의 농도에 따른 정식 6주차 기내배양 사과무병대목의 생육.

AUXIN	PPM	Shoot length (cm)	Root length (cm)	Total leaf area (cm <sup>2</sup> )	Shoot fresh weight (mg/plant)	Root fresh weight (mg/plant)
	control	13.8 ab	16.4	74.3 abc	1.27 abc	0.22 ab
IAA	500	9.6 ab	16.7	55.5 abc	0.88 abc	0.19 ab
	1000	11.5 ab	15.6	61.8 abc	1.03 abc	0.24 ab
	1500	12.4 ab	16.6	68.5 abc	1.1 abc	0.18 ab
	1500	17.4 a	15.9	119.3 a	1.88 a	0.35 a
IBA	500	5.9 b	15.4	23.2 c	0.45 c	0.15 b
	1000	14.7 ab	19.3	97.6 ab	1.55 ab	0.3 ab
	1500	17.4 a	15.9	119.3 a	1.88 a	0.35 a
NAA	500	8.9 ab	13.8	40.3 bc	0.69 bc	0.27 ab
	1000	7.3 b	13.8	37 bc	0.58 bc	0.24 ab
	1500	10.7 ab	16.4	57 abc	0.87 abc	0.17 b
Significance	trt	NS	NS	*	**	NS
	cnct	**	NS	**	**	NS
	trt * cnct	*	NS	*	*	**

- ④ 따라서 고농도 단시간 처리뿐만 아니라 저농도 장시간 처리 혹은 양액에 첨가하는 처리 등의 다양한 처리 방법을 고려할 필요성이 있다고 판단되며, 이를 통해서 더 큰 효과를 기대할 수 있을 것이라 예상됨.

다. 대목용 기내배양 사과 소식물체의 순화 및 성장 촉진을 위한 지상부 환경제어 기술 개발

(1) 순화 촉진을 위한 지상부 환경조건 구명

(1-1) 사과무병대목의 순화 촉진을 위한 온도 조건 구명

(가) 실험 방법

- ① 순화 환경은 PPF<sub>D</sub> 60 μmol · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>(형광등), 광주기 16시간으로 기내배양조건과 동일하게 설정함.
- ② 양액은 2차년도에 개발된 NAP 양액을 정식 후 4주까지는 pH 6.0, EC 0.5dS/m로 공급



해주다 마지막 2주 동안 pH 6.0, EC 2.0dS/m으로 공급함.

- ③ 기외 환경에 정식하기 전 1주일 동안 상대습도 90% 환경에서 배양병 마개를 열어주는 예비순화 단계를 거친 뒤, DFT시스템에 정식함.
- ④ 상대습도는 총 재배기간 6주동안 90%→ 80%→ 60%로 2주 간격으로 점진적으로 낮춰줌.
- ⑤ 순화기간 동안의 적합한 온도 조건을 규명하기 위해 다음과 같은 처리를 해 줌

	1W	2W	3W	4W	5W	6W
Trt1			20°C			
Trt2			25°C			
Trt3			30°C			
Trt4		25°C			25°C / 20°C	
Trt5		30°C			30°C / 20°C	
Trt6		30°C			30°C / 25°C	

주·야간 온도 변화

그림. 재배 기간에 따른 온도 변화 처리.

(나) 실험 결과

- ① 성장특성(초장, 엽수, 총 엽면적, 뿌리길이, 생체중)과 광합성률의 변화를 측정함.
- ② 정식 6주차에 성장 데이터로 초장은 25°C 항온처리인 Trt 2와 마지막 2주동안 25°C /20°C 변온처리한 Trt 4가 가장 높은 값을 보였음.
- ③ 엽수는 유의적인 차이를 보이지 않았지만 총 엽면적에서 Trt 2,3,4가 유의적으로 높았음.
- ④ 뿌리 길이는 처리구별 유의적인 차이를 보이지 않았음.

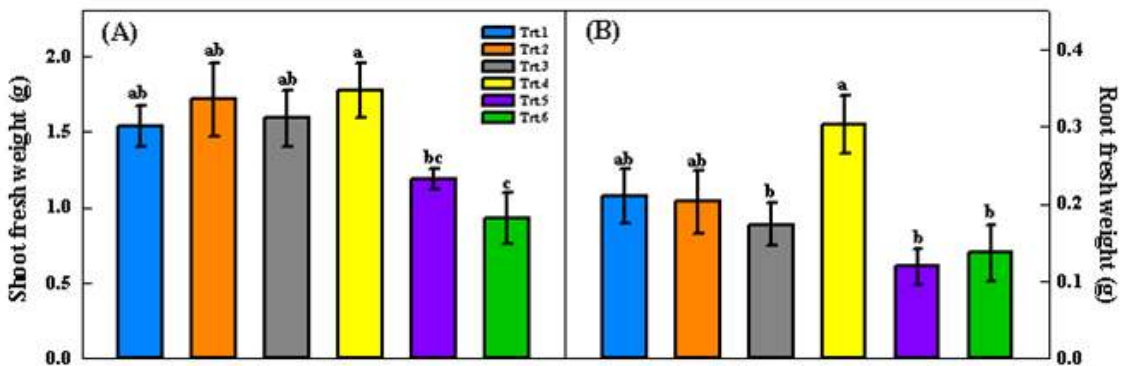


그림. 온도 처리에 따른 사과무병대목의 초장(A), 엽수(B), 총 엽면적(C), 근장(D).

- ⑤ 지상부 생체중은 Trt 5,6에서 상대적으로 다른 처리에 비해 낮았으며 이 두처리를 제외하고는 큰 차이를 보이지 않았음.
- ⑥ 지하부 생체중에서 Trt 4가 가장 높은 값을 보였음.

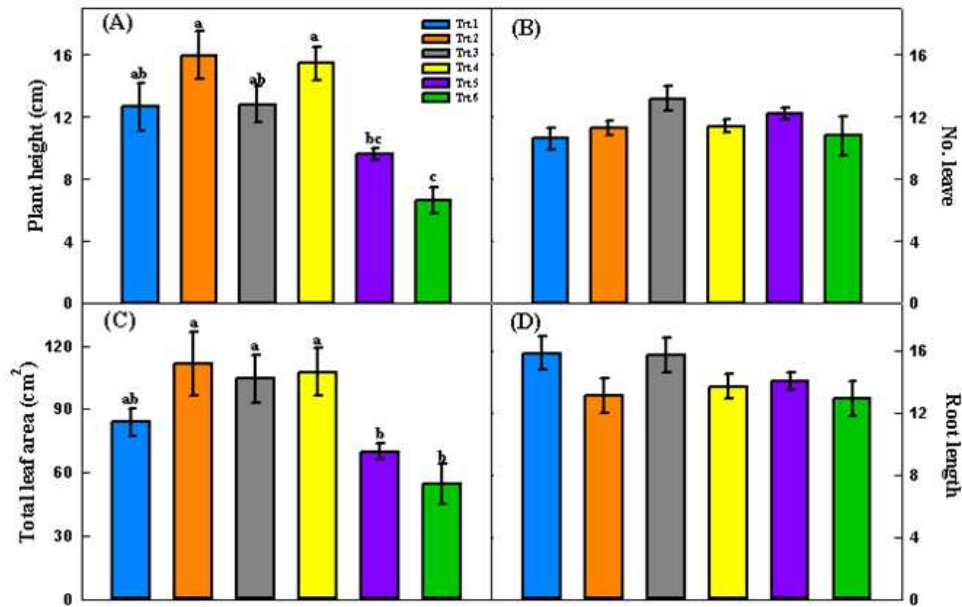


그림. 온도 처리에 따른 사과무병대목의 지상부 생체중(A), 지하부 생체중(B).

- ⑦ 정식 후 5주차의 사과무병대목의 광합성률은 온도가 가장 높은 30℃ 향온처리구에서 유의적으로 높았음.

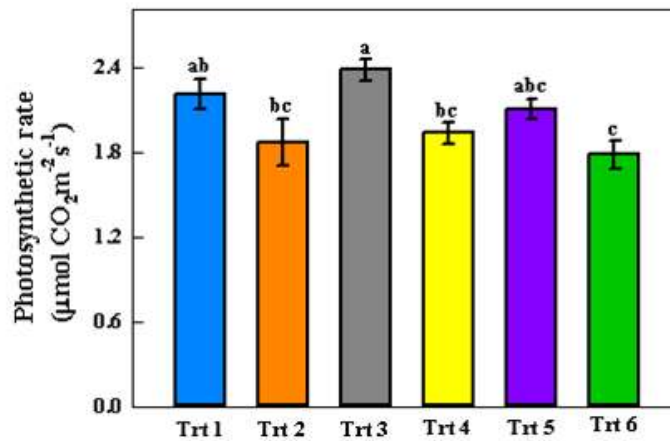


그림. 온도 처리에 따른 사과무병대목의 정식 후 5주차 광합성률.

- ⑧ 전체적인 지상부 생육과 비교하여 볼 때 Trt 2와 Trt 4가 사과무병대목의 순화 촉진을 위한 적합한 온도로 판단됨.
- ⑨ 앞선 연구에서 발견한 바와 같이 정식 후 4주간 집중적인 순화기간을 거치고 2주간의 생장기간에 25℃→20℃ 변온처리를 주거나 6주 동안 25℃ 향온 처리를 해주는 것이 기내배양 사과 소식물체의 순화 및 생장증진에 효과적인 온도 조건이라 판단됨.

(1) 순화 촉진을 위한 지상부 환경조건 구명

(1-2) 사과무병대목의 순화 촉진을 위한 광도 조건 구명

(나) 실험 방법

- ① 순화 환경은 온도 25℃, 광주기 16시간으로 설정함.
- ② 기내배양 사과 소식물체의 순화를 위한 환경제어를 밀폐형 식물생산시스템에서 실시함.
- ③ 새로 개발된 전용 배양액을 정식 후 4주까지는 pH 6.0, EC 0.5dS/m로 공급해주다 마지막 2주 동안 pH 6.0, EC 2.0dS/m으로 공급함.
- ④ 기외 환경에 정식하기 전 1주일 동안 상대습도 90% 환경에서 배양병 마개를 열어주는 예비순화 단계를 거친 뒤, 순환식 DFT시스템에 정식함.
- ⑤ 상대습도는 총 재배기간 6주 동안 90%→ 80%→ 60%로 2주 간격으로 점진적으로 감소함.
- ⑥ 사과무병대목의 순화 촉진에 적합한 광도 환경조건을 구명하기 위해 다음과 같이 처리함.

	1W	2W	3W	4W	5W	6W
Con	60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$					
Trt1	100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$					
Trt2	140 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$					
Trt3	180 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$					
Trt4	60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$				
Trt5	60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	140 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$			
Trt6	60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$				100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	
Trt7	60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$				140 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	

그림. 사과무병대목의 순화 촉진을 위한 광도 처리.

(나) 실험 결과

- ① 정식 후 6주차의 지상부의 생육에서 대조구와 다른 처리구에 비해 Trt 1의 초장의 생육이 유의적으로 높은 것으로 나타났고 엽록소함량 값과 총 엽면적 값에선 Trt 1,5에서 비교적 높은 값을 보였음.
- ② 뿌리 길이 역시 Trt 1,4,5에서 비교적 높은 값을 보였음.



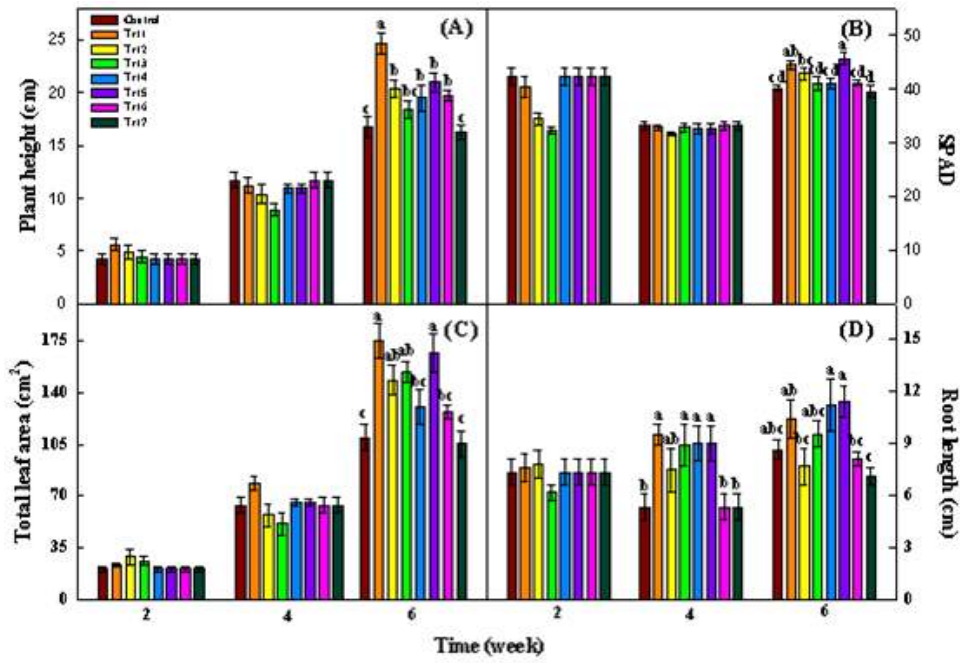


그림. 광도 처리에 따른 사과무병대목의 초장(A), 엽록소함량(B), 총 엽면적(C), 근장(D).

③ 이와 다르게 생체중에서는 Trt 3이 가장 높은 값을 보였으나 이는 줄기의 경화로 인한 차이로 판단되며 Trt 3에서는 순화 초반 지상부의 피해를 확인함.

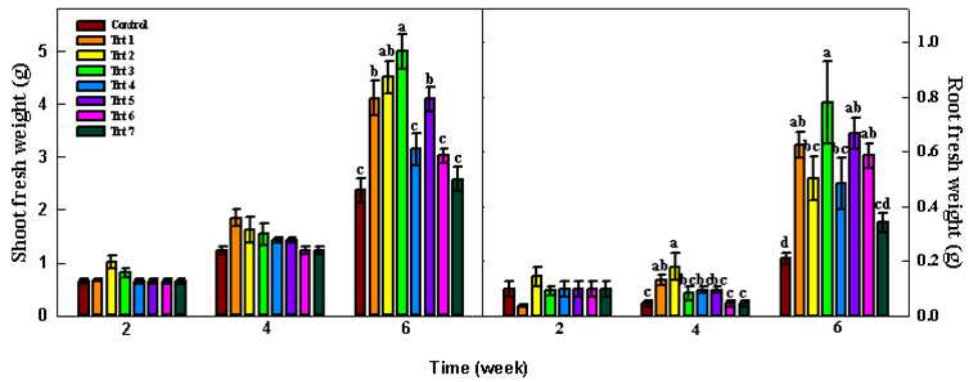


그림. 광도처리에 따른 사과무병대목의 지상부 생체중 및 건물중.



그림. 정식 2주차 사과무병대목의 광도 처리별 생육 차이.

- ④ 정식 후 5주차 광합성률에서는 광도가 높아짐에 따라 광합성률이 유의적으로 증가하는 변화를 확인함.

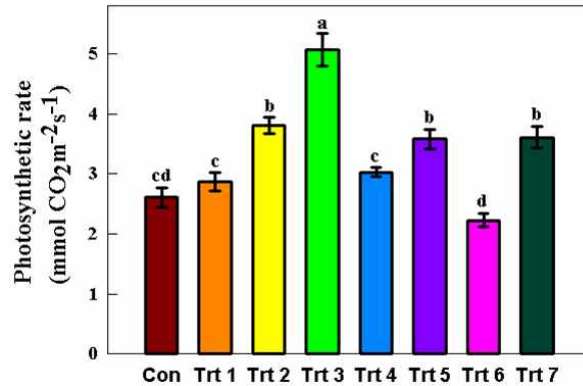


그림. 광도 처리에 따른 사과무병대목의 광합성률.

- ⑤ 정식 후 순화 초기에 140, 180  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 에서 지상부의 피해와 생존율의 저하로 인한 문제와 생육결과를 토대로 순화 초기에 기존 60  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  보다는 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 로 처리한 Trt 1이나 순화 후반부에 좀 더 높은 광도를 처리한 Trt 5가 순화촉진에 적합한 광도 조건이라고 판단됨.

(2) 성장 촉진을 위한 지상부 환경조건 구명

(2-1) 사과무병대목의 성장 촉진을 위한 광도×이산화탄소 농도 조건 구명

(가) 실험 방법

- ① 순화 환경과 사용한 배양액의 조건은 이전 실험과 동일하게 설정함.
- ② 기외 환경에 정식하기 전 1주일 동안 상대습도 90% 환경에서 배양병 마개를 열어주는 예비순화 단계를 거친 뒤, DFT시스템에 정식함.
- ③ 상대습도는 총 재배기간 6주동안 90%→ 80%→ 60%로 2주 간격으로 점진적으로 감소함.
- ④ 성장 촉진을 위한 광도와 이산화탄소농도 환경을 구명하기 위해 다음과 같이 처리함.

		1W	2W	3W	4W	5W	6W
500 ppm	Control	60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$					
	Trt 1	100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$					
	Trt 2	60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$		100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$		140 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	
	Trt 3	100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$					
1000ppm	Trt 4	60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$					
	Trt 5	100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$					
	Trt 6	60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$		100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$		140 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	
	Trt 7	100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$					

그림. 사과무병대목의 성장 촉진을 위한 광도×이산화탄소 처리.

- ⑤ 광도처리는 이전 실험에서 가장 효과가 좋았던 2가지 처리를 선정하였음.
- ⑥ 이산화탄소 농도 처리는 500과 1,000ppm으로 설정하였으며 실제로 각각 평균 505.5ppm, 998.7695ppm으로 유지됨.

(나) 실험 결과

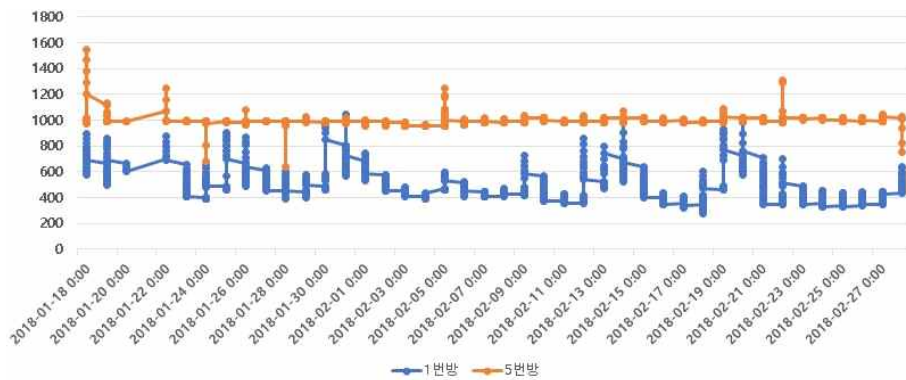


그림. 실험 기간 동안의 이산화탄소 농도변화.

- ① 이산화탄소 1,000ppm을 처리구는 500ppm 처리구 보다 정식 후 6주째 초장 및 엽면적이 낮은 경향을 보였음.
- ② 정식 후 6주 동안  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 에서 자란 사과 소식물체의 초장이 두 이산화탄소 처리구들 모두에서 높은 경향을 보였음.
- ③ 이산화탄소 500ppm에서 정식 후 5주 동안  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 에서 자라다 마지막 1주에  $140 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 으로 변경해준 처리구가 다른 처리구에 비해 전반적인 생육에서 증가가 관찰됨.

표. 광도×이산화탄소 처리에서 순화된 사과무병대목의 지상부 및 지하부 성장.

Time (week)	CO <sub>2</sub> concentration ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ )	Treatment	Shoot				Root	
			Plant height (cm)	Total leaf area ( $\text{cm}^2$ )	No. leave	Fresh weight (g)	Root length (cm)	Fresh weight (g)
2	500	Con	8.4	39.3	18.6	0.8	6.8	0.06
		Trt 1	10	38	23.2	1.1	8.3	0.15
		Trt 2	8.4	39.3	18.6	0.8	6.8	0.06
		Trt 3	10	38	23.2	1.1	8.3	0.15
		Trt 4	7.9	43.7	19.2	1	9.3	0.14
		Trt 5	8.9	42.9	18.6	0.9	10.3	0.12
		Trt 6	7.9	43.7	19.2	1	9.3	0.14
	1000	Trt 7	8.9	42.9	18.6	0.9	10.3	0.12
	Significance							
	CO <sub>2</sub> concentration (C)			NS	NS	NS	NS	NS
Treatment (T)			NS	NS	NS	NS	NS	
C × T			NS	NS	NS	NS	**	
4	500	Con	15 Ab	103.9 Ab	23.4	1.6 Ab	10.4	0.09 Ab
		Trt 1	20.4 Aa	159.1 Aa	21.4	2.9 Aa	10.4	0.28 Aa
		Trt 2	18.5 Aa	144 Aab	23.2	2.4 Aa	12.3	0.29 Aa
		Trt 3	20.4 Aa	159.1 Aa	21.4	2.9 Aa	10.4	0.28 Aa
		Trt 4	11.4 Bb	55.7 Bb	22.4	1.2 Bb	8.6	0.12 Bb
		Trt 5	15.2 Ba	87.2 Ba	23.6	1.8 Ba	10	0.19 Ba
		Trt 6	12.8 Ba	53.4 Bab	19.4	1.5 Ba	9.7	0.12 Ba
	1000	Trt 7	15.2 Ba	87.2 Ba	23.6	1.8 Ba	10	0.19 Ba
	Significance							
	CO <sub>2</sub> concentration (C)			***	***	NS	***	NS
Treatment (T)			**	**	NS	**	NS	*
C × T			NS	NS	**	NS	NS	NS

500	Con	20.9 Ab	152.5 Ab	174 B	2.6 Ab	159	0.35 Ac	
	Trt 1	26.3 Aa	201.9 Aa	156 B	4.2 Aa	159	0.55 Abc	
	Trt 2	24.1 Aa	198.5 Aa	162 B	4.2 Aa	146	0.76 Aa	
	Trt 3	28.6 Aa	242.2 Aa	186 B	5.1 Aa	15	0.77 Aab	
	Trt 4	16.7 Bb	103.5 Bb	18 A	2.4 Bb	131	0.28 Bc	
	Trt 5	22.2 Ba	138.5 Ba	20.6 A	3.4 Ba	112	0.37 Bbc	
	Trt 6	19.7 Ba	135.8 Ba	20.2 A	3.5 Ba	151	0.65 Ba	
1000	Trt 7	19.1 Ba	117.5 Ba	19.4 A	2.7 Ba	156	0.33 Bab	
	Significance							
	CO <sub>2</sub> concentration (C)	***	***	**	***	NS	**	
	Treatment (T)	***	**	NS	***	NS	***	
	C × T	NS	*	NS	*	NS	NS	



그림. 정식 6주차 사과무병대목의 광도×이산화탄소 농도에 의한 생육 차이.

- ④ 정식 후 4주차 사과무병대목의 광합성률은 1,000ppm을 처리해준 처리구들이 500ppm 보다 유의적으로 높았음.
- ⑤ 이에 반해, 지상부 생육에서는 1,000ppm 처리구들이 500ppm 처리구들 보다 유의적으로 낮은 값이 관찰됨.

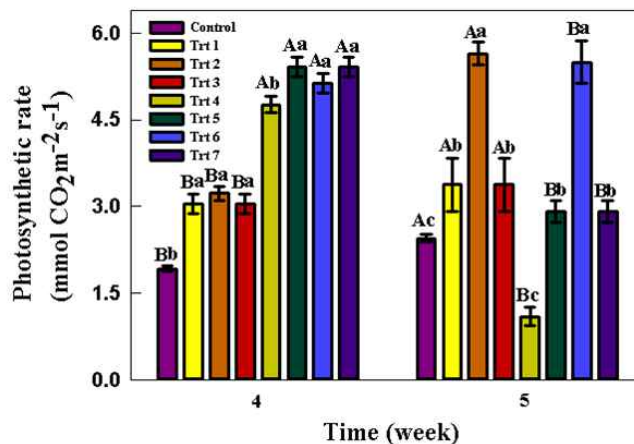


그림. 광도×이산화탄소 농도 처리에 의한 사과무병대목의 광합성률.

- ⑥ 기내배양 된 사과 소식물체의 순화단계에서 고농도의 이산화탄소 제공은 사과 소식물체의 성장에 긍정적인 영향을 주지 못하였음.
- ⑦ 따라서, 이산화탄소 500ppm에서 정식 후 5주 동안  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 에서 자라다 마지막 1주에  $140 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 으로 변경해주는 환경조건이 사과무병대목의 성장 촉진에 가장 효율적이라고 판단됨.

(3) 온실과 식물공장의 순화 효율 비교

(가) 실험 방법

- ① 식물공장의 순화 환경은 온도 25°C, 광도  $60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 광주기 16시간으로 배양조건과 동일하게 설정함.
- ② 기외 환경에 정식하기 전 1주일 동안 상대습도 90% 환경에서 배양병 마개를 열어주는 예비순화 단계를 거친 뒤, DFT시스템에 정식함.
- ③ 상대습도는 총 재배기간 6주동안 90%→ 80%→ 60%로 2주 간격으로 점진적으로 감소
- ④ 식물공장에서 구명된 순화 조건을 온실에 적용하여 사과 소식물체의 순화를 시험함
- ⑤ 온실의 순화환경은 평균 온도 23.83°C, 광도  $60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 광주기 16시간으로 재배함.

(나) 실험 결과

- ① 습도에 민감한 기내배양 사과 소식물체가 온실에서 순화하는 과정에서 습도유지가 식물공장에 비해 정밀하게 제어되지 못해 정식 후 3주차부터 생존율의 차이를 보였고 정식 후 6주차의 생존율은 온실은 55%, 식물공장은 66%로 차이를 보였음.

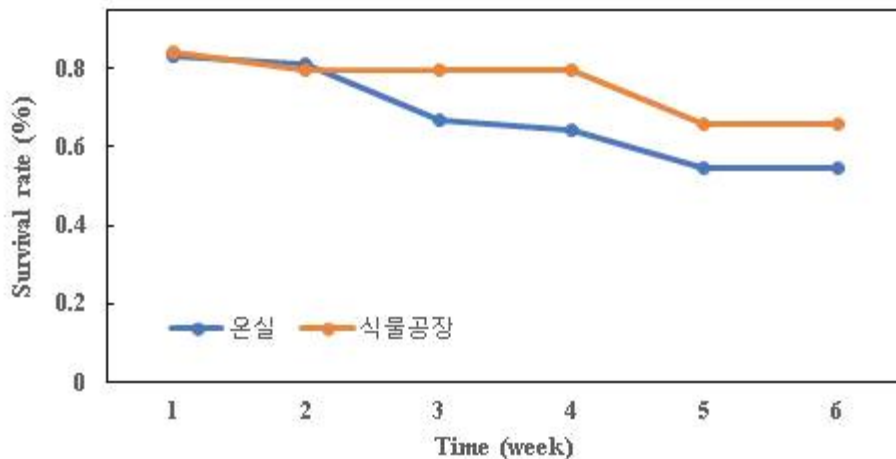


그림. 온실과 식물공장에서 사과무병대목의 생존율 비교.

- ② 정식 후 6주차의 지상부 생체중은 식물공장의 사과무병대목이 온실의 사과무병대목에 비해 유의적으로 높았음.
- ③ 이에 반해, 지하부의 생육에서는 온실의 사과무병대목과 식물공장 사과무병대목과 유의적 차이 없었음.



표. 온실과 식물공장에서 순화된 사과무병대목의 생장

Treatment	Shoot				Root	
	Plant height (cm)	Stem diameter (mm)	Total leaf area (cm <sup>2</sup> )	Fresh weight (g)	Root length (cm)	Fresh weight (g)
온실	15.9 b	2.0a	140.5	2.8	17.2	0.5
식물공장	23.4 a	1.7 b	172.5	3.1	16.8	0.4
Significance	**	**	NS	NS	NS	NS

④ 정식 후 6주차 온실과 식물공장의 사과무병대목의 생장의 차이는 크게 보이지 않았으나 전체적으로 식물공장의 대목이 훨씬 균일하고 품질이 좋았으며, 높은 생존율을 유지할 수 있어 식물공장에서 사과무병대목의 재배가 더 적합하다고 판단됨.

라. 기내배양 사과 접목묘 생산을 위한 환경제어 기술 개발

(1) 대목용 소식물체 M.9, M.26의 성장촉진을 위한 광질 조건 구명

(1-1) M.9 사과무병대목의 성장 촉진을 위한 광질 조건 구명

(가) 실험 방법

- ① 순화 환경은 PPFD 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 광주기 16시간, 온도 25°C으로 이전 실험을 통해 결정된 재배환경조건과 동일하게 설정함.
- ② 양액은 2차년도에 개발된 NAP 양액을 정식 후 4주까지는 pH 6.0, EC 0.5dS/m로 공급 해주다 마지막 2주 동안 pH 6.0, EC 2.0dS/m으로 공급함.
- ③ 기외 환경에 정식하기 전 1주일 동안 상대습도 90% 환경에서 배양병 마개를 열어주는 예비순화 단계를 거친 뒤, DFT시스템에 정식함.
- ④ 상대습도는 총 재배기간 6주동안 90% → 80% → 60%로 2주 간격으로 점진적으로 낮춰줌.
- ⑤ 대목용 사과 소식물체 M.9의 성장특성(초장, 엽수, 총 엽면적, SPAD값, 줄기직경, 지상부, 지하부 생체중과 건물중)과 광합성 관련특성의 변화, 전분함량을 측정함.

	1W	2W	3W	4W	5W	6W
Trt 1				R		
Trt 2				G		
Trt 3				B		
Trt 4				R9B1		
Trt 5				R8B2		
Trt 6				R7B3		
Trt 7				R8G1B1		
Trt 8				R7G1B2		
Trt 9				R6G1B3		

그림. 사과무병대목 M.9, M.26 의 성장촉진을 위한 광질 처리.

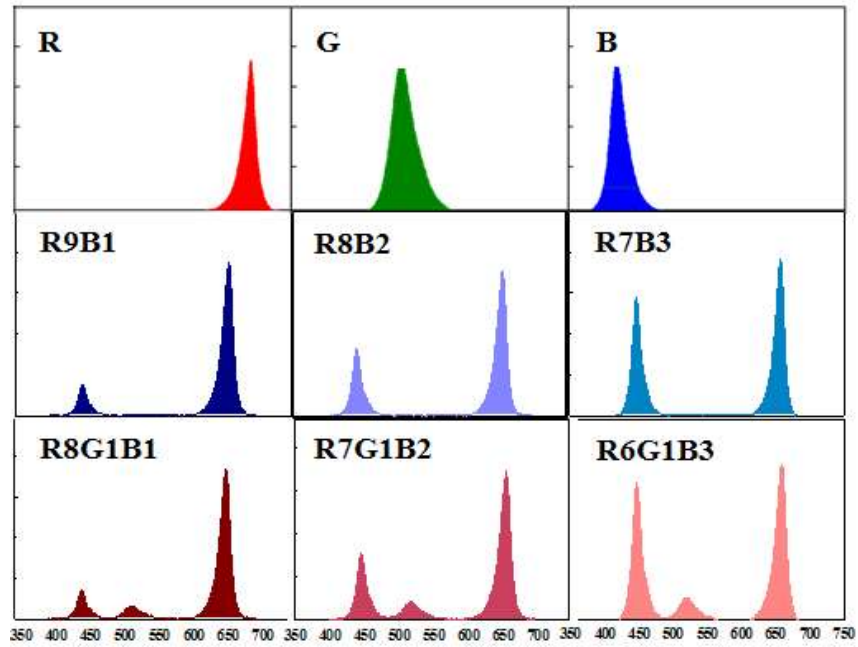


그림. 사과무병대목 광질 처리 파장.

(나) 실험 결과

- ① 정식 후 6주차의 지상부 초장은 Red 단일광과 Red 비율이 높은 R9B1, R8G1B1 혼합광 처리구에서 다른 처리구들에 비해 유의적으로 높은 값을 보였음.
- ② 정식 후 6주차의 top과 bottom의 줄기직경은 광질에 따라 유의적인 차이를 보이지는 않았지만 top의 줄기직경의 결과가 지상부 초장의 결과와 비슷한 경향을 보였음.
- ③ Red, R9B1, R8G1B1 처리구가 상대적으로 높은 값을 보임.

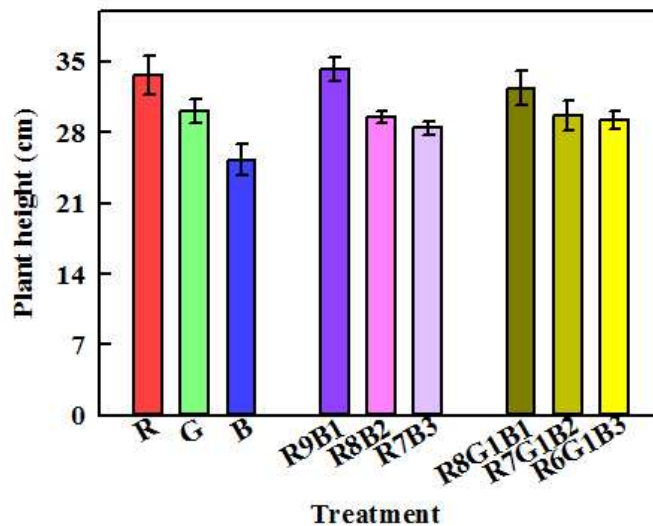


그림. 광질 처리에 따른 사과무병대목의 초장.





그림. 정식 후 6주차 광질처리에 따른 사과무병대목.

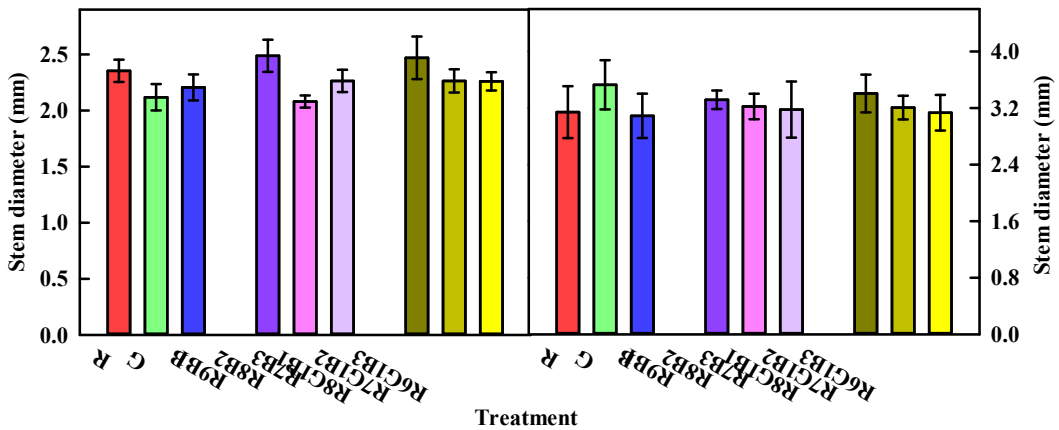


그림. 광질에 따른 사과무병대목의 top 부분 줄기직경 (A)와 bottom 부분 줄기직경 (B).



그림. 사과 무병대목의 줄기직경 Top과 Bottom 부분.

- ④ 정식 후 6주차의 엽수는 Blue 단색광 처리구에서 유의적으로 높았음.
- ⑤ 총 엽면적에서는 유의적인 차이는 보이지 않았지만 Red와 R9B1처리구가 증가하는 경향을 보였음.
- ⑥ SPAD값은 정식 후 6주차의 Blue 단색광 처리구에서 유의적으로 높아 잎의 엽록소가 많이 생성됨을 확인함.

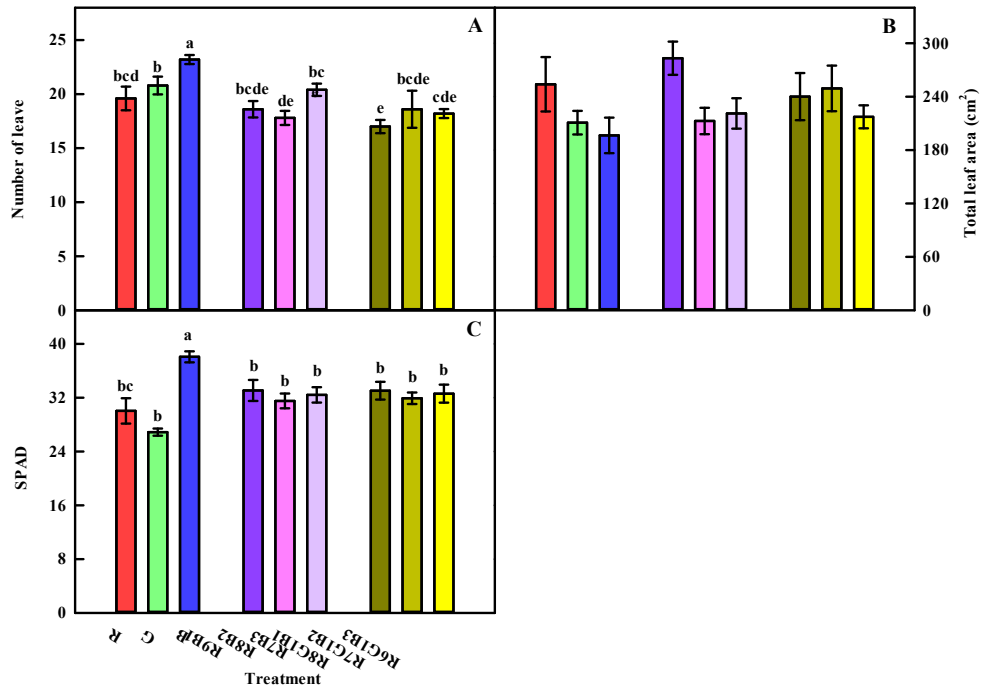


그림. 광질 처리에 따른 사과무병대목의 엽수(A), 총 엽면적(B), 정식 후 6주차 SPAD value(C).

- ⑦ 정식 후 6주차 지하부 생체중과 건물중은 R9B1, R7G1B2 혼합광 처리구에서 유의적으로 높았음.
- ⑧ 정식 후 6주차 지상부 건물중에서 R9B1, R8G1B1 혼합광 처리구가 다른 처리구들에 비해 상대적으로 높았음.

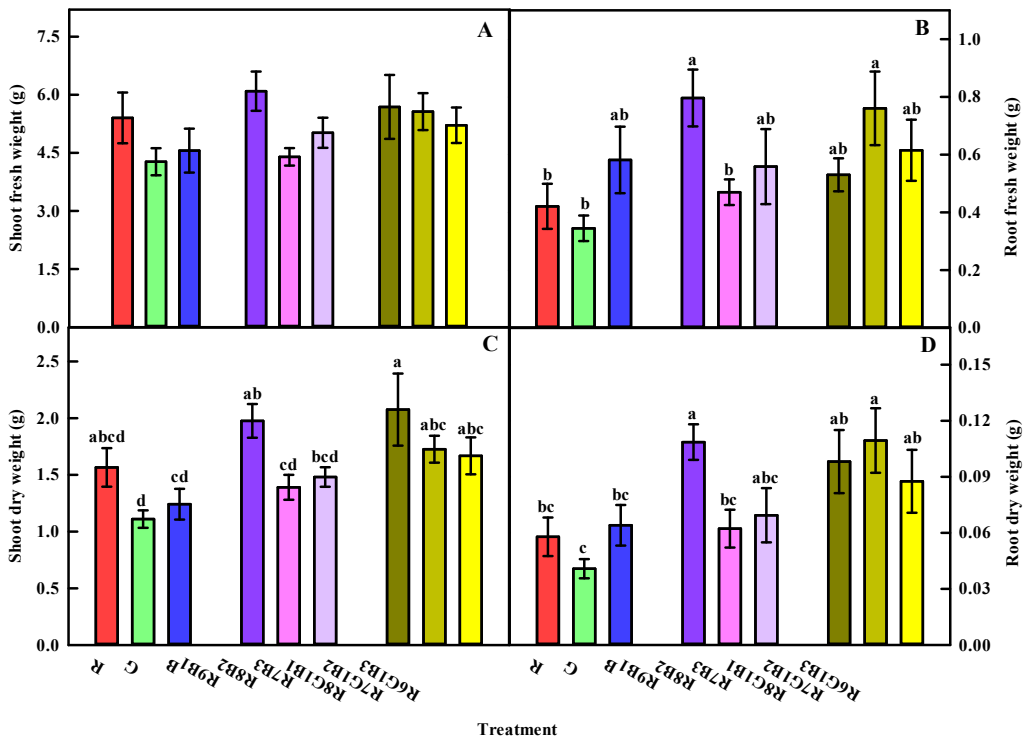


그림. 정식 후 6주차 사과무병대목 지상부 생체중(A), 지하부 생체중(B), 지상부 건물중(C), 지하부 건물중(D).

- ⑨ 정식 후 5주차 사과 소식물체의 광합성률은 다른 처리구에 비해 Green, Blue 단색광 처리구가 유의적으로 낮은 값을 보였음.
- ⑩ 기공전도도는 Blue의 비율이 높은 Blue, R7B3 처리구에서 상대적으로 높은 값을 보였음.

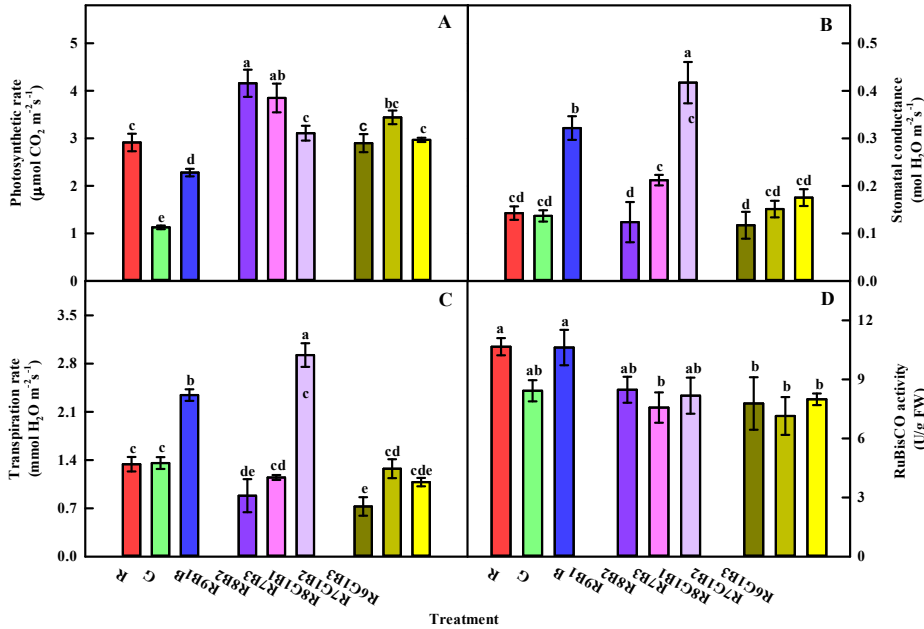


그림. 정식 후 5주차 사과무병대목의 광합성률(A), 기공전도도(B), 증산율(C), 전자전달율(D).

- ⑫ 정식 후 6주차 사과무병대목의 전분함량 분석결과 R8G1B1 처리구에서 유의적으로 높은 값을 보였음.

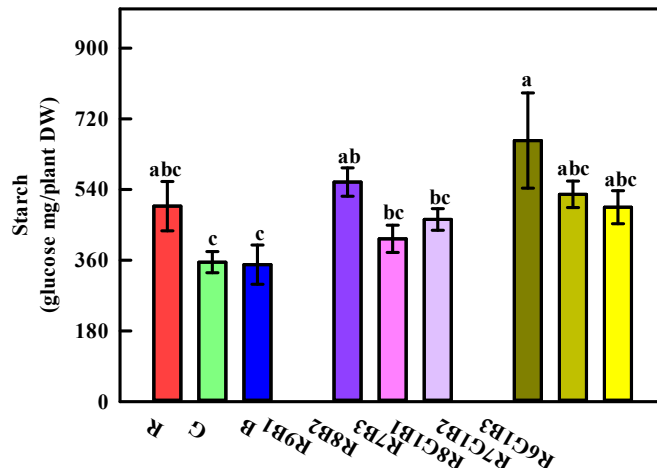


그림. 광질에 따른 정식 후 6주차 사과무병대목의 전분함량.

- ⑬ 높은 Red 광의 처리구에서는 식물의 바이오매스, 광합성률, 줄기직경이 증가하는 경향을 보였고 Blue 광 처리구에서는 엽수와 SPAD 값이 증가하였음.
- ⑭ 전체적인 성장과 광합성률의 결과를 종합해보자면 높은 비율의 Red광에 약간의 Blue광이 섞인 R9B1, R8G1B1 처리구가 M.9 사과무병대목의 성장촉진을 위한 적합한 광질조건으로 판단됨.

(1) 대목용 소식물체 M.9, M.26의 성장촉진을 위한 광질 조건 구명

(1-2) M.26 사과무병대목의 성장 촉진을 위한 광질 조건 구명

(가) 실험 방법

- ① 순화 환경은 PPF<sub>D</sub> 100 μmol · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>, 광주기 16시간, 온도 25℃으로 이전 실험을 통해 결정된 재배환경조건과 동일하게 설정함.
- ② 양액은 2차년도에 개발된 NAP 양액을 정식 후 4주까지는 pH 6.0, EC 0.5dS/m로 공급 해주다 마지막 2주 동안 pH 6.0, EC 2.0dS/m으로 공급함.
- ③ 기외 환경에 정식하기 전 1주일 동안 상대습도 90% 환경에서 배양병 마개를 열어주는 예비순화 단계를 거친 뒤, DFT시스템에 정식함.
- ④ 상대습도는 총 재배기간 6주동안 90%→ 80%→ 60%로 2주 간격으로 점진적으로 낮춰 줌.
- ⑤ 성장특성(초장, 총 엽면적, 줄기직경, SPAD값, 지상부, 지하부 생체중)과 변화, 광합성율과 전자전달율의 변화를 측정함.

(나) 실험 결과

- ① 정식 후 6주차의 지상부 초장은 R7B3 처리구가 다른 처리구에 비해 유의적으로 낮았음.

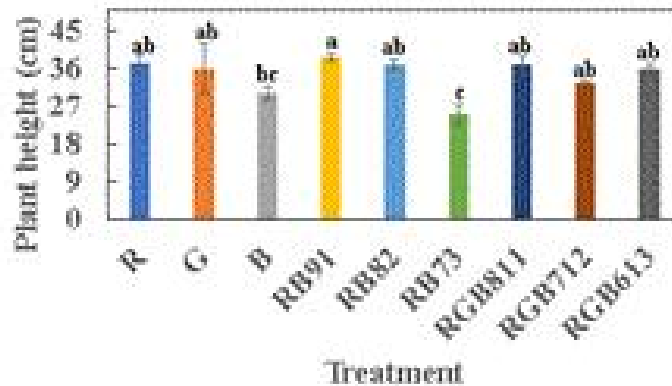


그림. 정식 후 6주차 M.9 사과무병대목의 초장

- ② 정식 후 6주차의 줄기 직경의 측정은 M.9 사과무병대목과 마찬가지로 top부분과 bottom 부분으로 나누어 측정하였음.
- ③ Top부분의 줄기직경은 R9B1 혼합광 처리구가 다른 처리구에 비해 높았음.
- ④ Bottom부분의 줄기직경은 top부분의 줄기직경과 비슷한 경향을 보였음.

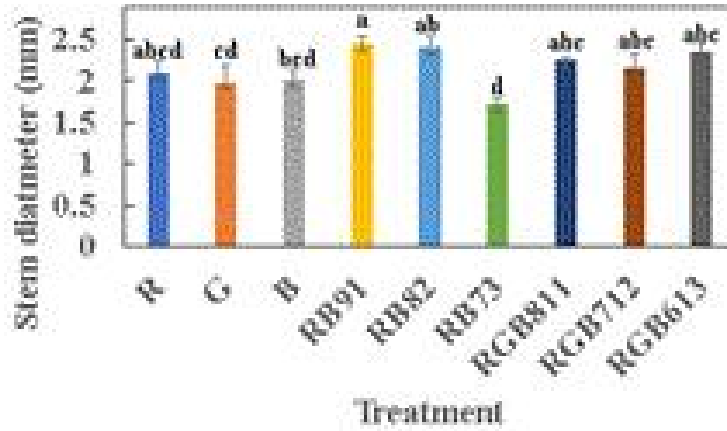


그림. 정식 후 6주차의 top부분 줄기직경.

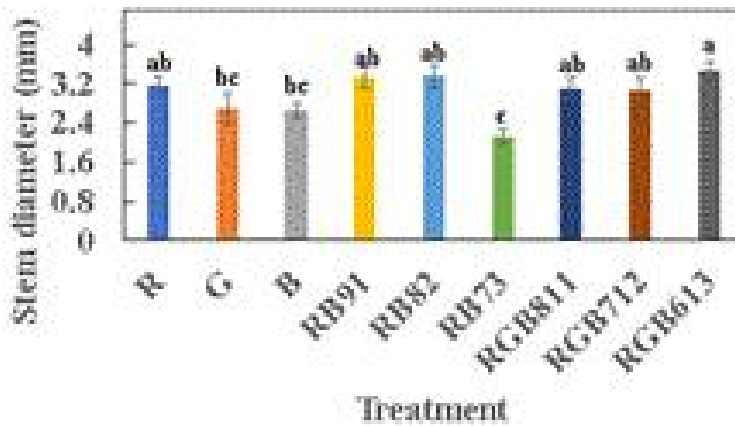


그림. 정식 후 6주차의 bottom부분 줄기직경.

- ⑤ 정식 후 6주차의 총 엽면적은 유의적인 차이를 보이지는 않았지만 B와 B7B3처리에서 낮은 경향을 보였음.
- ⑥ SPAD값은 Blue 단색광 처리구가 높은 값을 보였음.

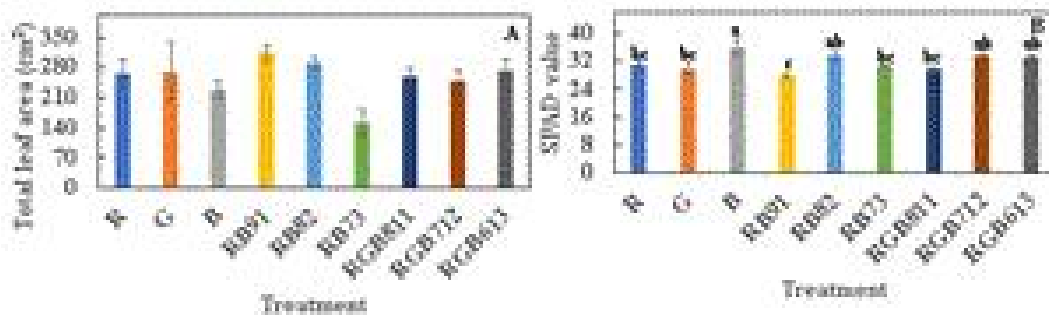


그림. 정식 후 6주차의 M.26 사과무병대목의 총엽면적(A)과 SPAD값(B)

- ⑦ M.9 사과무병대목의 지상부 생체중은 지상부 초장과 비슷한 경향을 보였고 R7B3 처리구가 유의적으로 낮은 값을 보였음.

⑧ 지하부 생체중은 R9B1, R8B2, R8G1B1 처리구가 높은 값을 기록함.

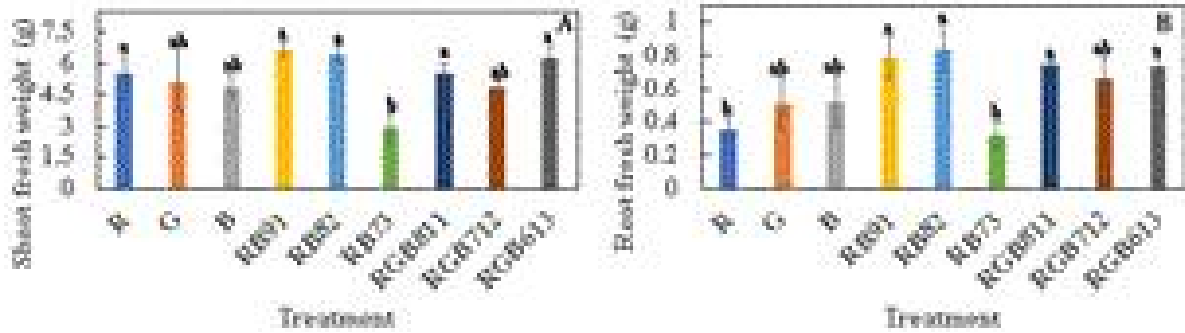


그림. M.9 사과무병대목의 지상부 생체중(A), 지하부 생체중(B).

- ⑨ 정식 후 3주차의 광합성률은 Green, Blue 단색광 처리구가 다른 처리구에 비해 유의적으로 낮은 값을 보였음.
- ⑩ 정식 후 3주차의 R9B1 처리구가 유의적으로 높은 광합성률을 보였음.
- ⑪ 정식 후 3주차의 전자전달을 또한 Green 단색광 처리구가 가장 낮은 값을 보였음

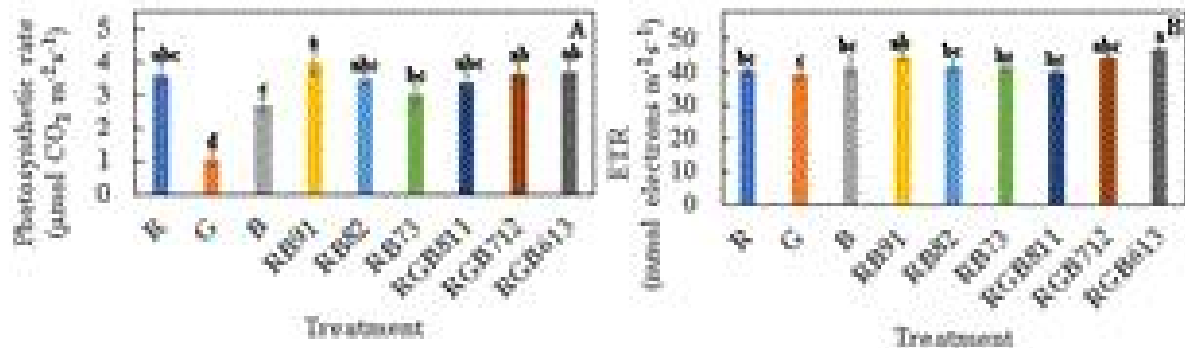


그림. 정식 후 3주차의 광합성율(A)와 전자전달율(B).

- ⑫ 전체적인 생육특성의 결과와 광합성률 결과를 종합해볼 때 M.9 사과무병대목의 성장 촉진을 위한 적절한 광질 조건은 R9B1이라고 판단됨.
- ⑬ M.9, M.26 사과무병대목의 광질처리를 통한 각각의 성장결과와 광합성률 결과를 종합해 볼 때 대목의 품종 따라 약간의 차이를 보이지만 대체적으로 Red 비율이 높고 약간의 Blue광이 섞인 R9B1 처리구가 사과묘의 성장촉진에 적절한 광질 조건이라는 결론을 내림.

(2) 접목용 사과 소식물체의 순화 및 성장 촉진을 위한 환경조건 구명

(2-1) ‘Hongro’의 순화 및 성장 촉진을 위한 환경조건 구명

(가) 실험 방법

- ① 환경조건을 구명하기 위해 이전 실험에서 개발한 NAP배양액을 사용함
- ② 기외 환경에 정식하기 전 1주일 동안 상대습도 90% 환경에서 배양병 마개를 열어주



는 예비순화 단계를 거친 뒤, DFT시스템에 정식함.

- ③ 상대습도는 총 재배기간 6주동안 90%→ 80%→ 60%로 2주 간격으로 점진적으로 감소함.
- ④ 온도는 25℃, 광주기 16/8시간, 광도  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (형광등)으로 설정함.
- ⑤ 처리구는 이전 연구를 통해 선정된 기준에 사용되던 에어스톤을 이용한 DFT시스템을 대조구로 두고 본 과제에서 개발한 배양액의 용존 산소를 균일하게 할 수 있는 시스템을 처리구(DO시스템)로 적용함.
- ⑥ 성장특성(초장, 줄기직경, 엽수, 총 엽면적, 지상부, 지하부의 생체중)과 용존산소량을 측정함.



그림. 접수용 기내배양 사과 소식물체( 'Hongro' ).

(나) 실험 결과

- ① 정식 후 6주차의 DO시스템 처리구는 대조구에 비해 지상부 초장에서 유의적으로 높았음.
- ② 정식 후 6주차의 처리구 간 줄기직경에서는 유의적인 차이가 없었지만 총 엽면적에서는 DO시스템 처리구가 대조구에 비해 유의적으로 높았음.
- ③ 엽수에서는 유의적인 차이는 없었지만 DO시스템 처리구가 대조구에 비해 증가하는 경향을 보였음.

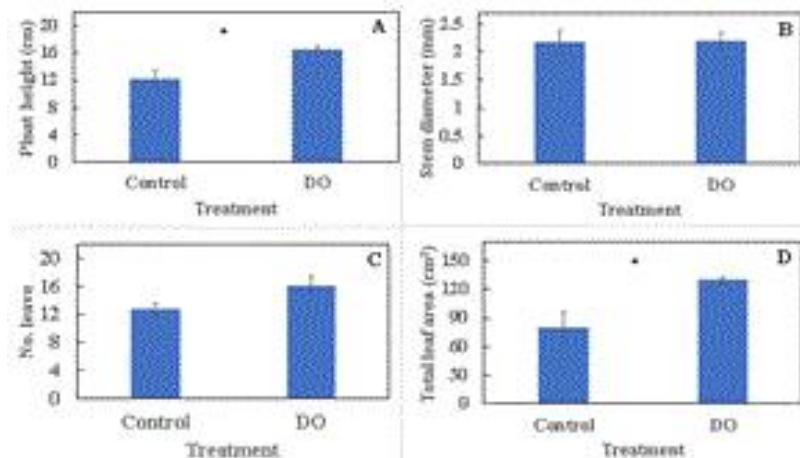


그림. 용존산소량에 따른 'Hongro'의 지상부 초장(A), 줄기직경(B), 엽수(C)와 총 엽면적(D).

- ④ 정식 후 6주차의 지상부 생체중은 대조구에 비해 DO시스템 처리구가 유의적으로 높은 값을 보였음.
- ⑤ 지하부 생체중에서는 유의적인 차이는 보이지 않았지만 DO시스템 처리구가 높은 경향을 보였음.

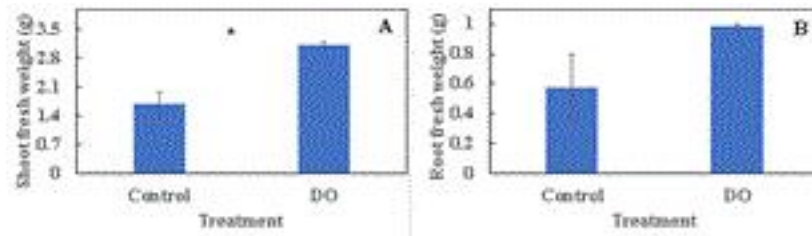


그림. 기내배양 접수 사과 소식물체의 지상부 생체중(A)와 지하부 생체중(B).

- ⑥ 정식 후 4주차와 6주차 대조구와 DO시스템 처리구 간의 용존산소량은 큰 차이는 없었지만 정식 후 6주차에 대조구의 용존산소량은  $10.62 \pm 0.038 \text{mg/L}$ 였고 DO시스템의 용존산소량은  $10.57 \pm 0.009 \text{mg/L}$ 로 DO시스템에서 위치별로 균일한 용존산소량을 보였음.

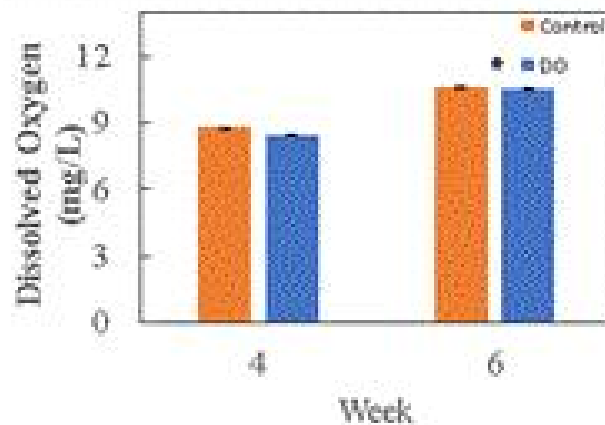


그림. 접수용 사과 소식물체의 처리에 따른 용존산소량.

- ⑦ 전체적으로 접수용 ‘Hongro’ 또한 M.9과 M.26 대목용 무병사과소식물체 순화조건에 잘 적응하였음.
- ⑧ 기존의 에어스톤을 이용한 대조구와 본 과제에서 이전연차에서 개발한 DO시스템을 비교하여 순화시킨 결과 처리구에서 긍정적인 성장 증진 결과를 확인함으로써 다시 한 번 균일한 용존산소의 공급이 사과묘의 DFT시스템 재배에서 중요함을 확인함.

(3) 유경 접목을 위한 환경조건 구명

(가) 실험 방법

- ① M.9 사과무병대목과 접수용 사과 소식물체 ‘Hongro’ 를 각각 유경접목을 하기에 앞서 성장챔버에서 이전 연구에서 구명된 환경조건 하에서 순화 및 성장을 진행함.



그림. 유경접목을 위한 M.9 사과무병대목.

- ② 유경접목을 위한 환경조건을 구명하기 위해 사용한 배양액의 조건은 이전 실험과 동일하게 설정함.
- ③ 유경접목을 실시한 뒤 접목된 사과 소식물체를 다시 DFT시스템에 정식함.
- ④ 온도는 25℃, 광주기 16/8시간, 광도  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (형광등), 상대습도 60%로 설정함.



그림. 유경접목을 위한 기내배양 ‘Hongro’ 사과 소식물체.

- ⑤ 접목기계를 사용하여 M.9 사과무병대목과 기내배양 사과 접수 ‘Hongro’ 를 접목을 실시함.
- (나) 실험 결과
- ① 조직배양 되어 재배된 묘목이기 때문에 아직 줄기 직경이 충분히 굵지 않고 경화가 완전하지 않았기 때문에 접목 시 줄기가 찢어지거나 으깨지는 문제가 발생함.



그림. 찢어진 사과무병대목 줄기와 일반적인 접목을 위한 대목과의 비교.



그림. 유경접목한 사과 소식물체.

- ② 접목 후 성장챔버 조건에서 DFT 시스템을 이용해 접목활착율과 적합한 환경조건을 확인하였으나 줄기 직경이 충분히 비대하지 못해 접목묘가 활착하지 못함

마. 기내배양 사과 소식물체의 안정적인 묘 생산을 위한 대규모 하드웨어 구축 및 패키지 기술 개발

(1) 기내배양 사과 소식물체의 대량생산을 위한 실증 검증 시스템 구축

- ① 기내배양 사과 소식물체의 대량생산을 위한 온실을 총 3개동 건설함(각각 폭 5.3m, 길이 13m)

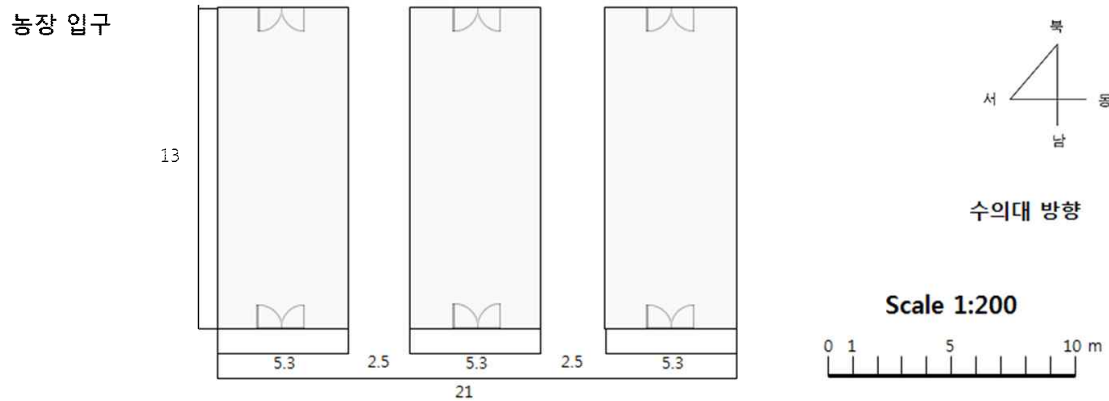


그림. 온실(스마트팜) 설계도

- ② 온실은 이중으로 설치했으며, 온실 내 기온 관리를 위해 측창이 설치됨.
- ③ 인터넷을 통해서 온실 주변의 기상 환경과 온실 내부의 기온과 습도를 실시간으로 확인, 측정 그리고 기록할 수 있는 시스템이 설치됨.
- ④ 온실 내 기온은 제어 시스템을 통해 자동 조절되며 또한, 인터넷을 통해서 원격으로 온실의 측창 개폐를 제어할 수 있음.
- ⑤ 자동 점적관수를 위한 펌프, 물탱크, 배관 및 작물을 재배할 수 있는 고설 배드를 설치함.



그림. 온실(스마트팜) 건설 사진.

(2) 전·후방 기술과의 유기적 연결을 위한 패키지 기술 개발

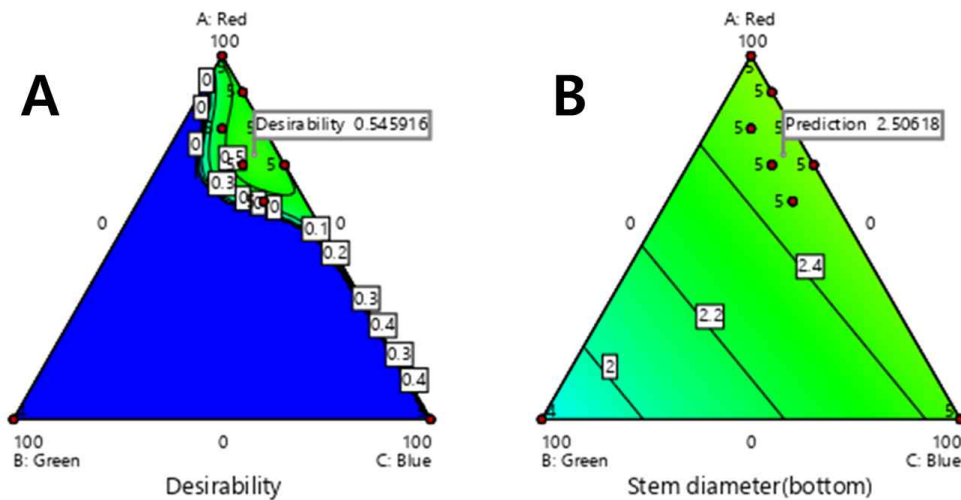
(2-1) 혼합물 설계를 이용한 광질 조건 분석

(가) 실험 방법

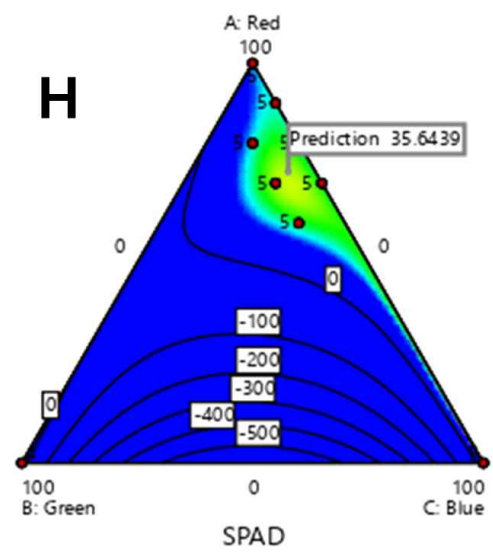
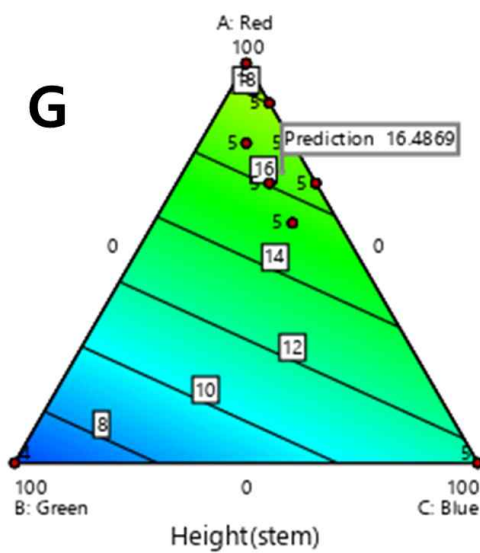
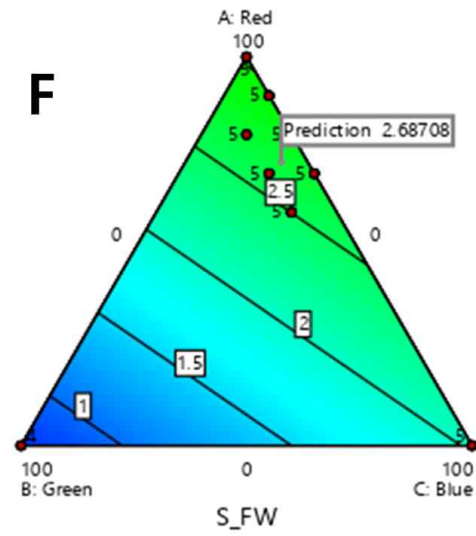
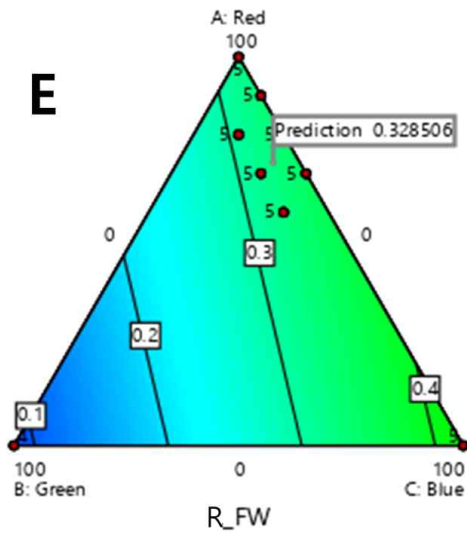
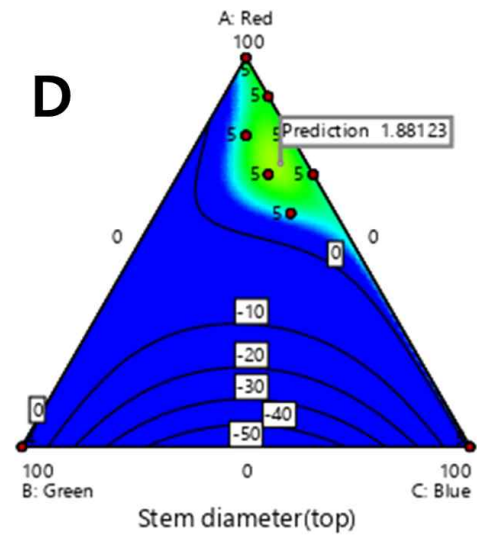
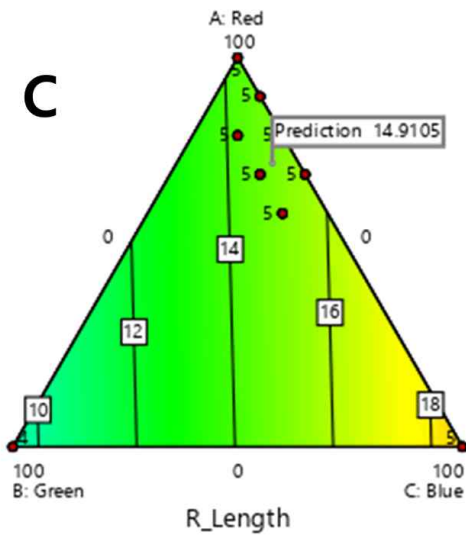
- ① 혼합물 설계 : 몇 개 성분의 혼합물에 관한 실험에서 어떠한 성분이 관심있는 반응량에 유의한 영향을 미치며, 반응을 최대(또는 최소)로 만드는 최적 혼합비율은 어떤 것인지 찾고자 하는 실험계획법으로 설정된 혼합물의 반응량 뿐만 아니라 직접 실험하지 않은 혼합물에서의 반응량까지 유추할 수 있는 실험계획법임.
- ② 현장에서 사과묘를 생산하는데 필요한 실질적인 광원 기술을 전달하기 위해 4차년도에 실시한 대목용 소식물체 M.9, M.26의 성장촉진을 위한 광질 조건 구명 실험의 결과 자료를 이용하여 혼합물설계를 실시했음.

(나) 실험 결과

- ① 줄기 직경(하단)과 뿌리 길이, 지하부 생체중, 지상부 생체중, 초장, 엽수, 엽면적은 linear 모델의 경향을 보임.
- ② 줄기 직경(상단)과 SPAD 값은 cubic 모델의 경향을 보임.







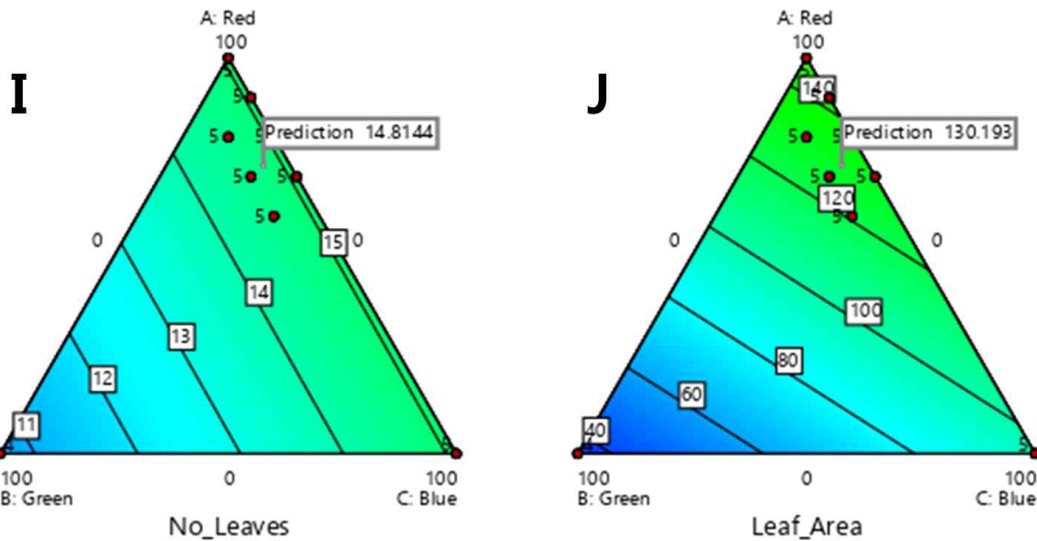


그림. 혼합물 설계 결과(1), Desirability(A), 줄기 직경\_bottom(B), 뿌리 길이(C), 줄기 직경\_top(D), 지하부 생체중(E), 지상부 생체중(F), 초장(G), SPAD Value(H), 엽수(I), 엽면적(J).

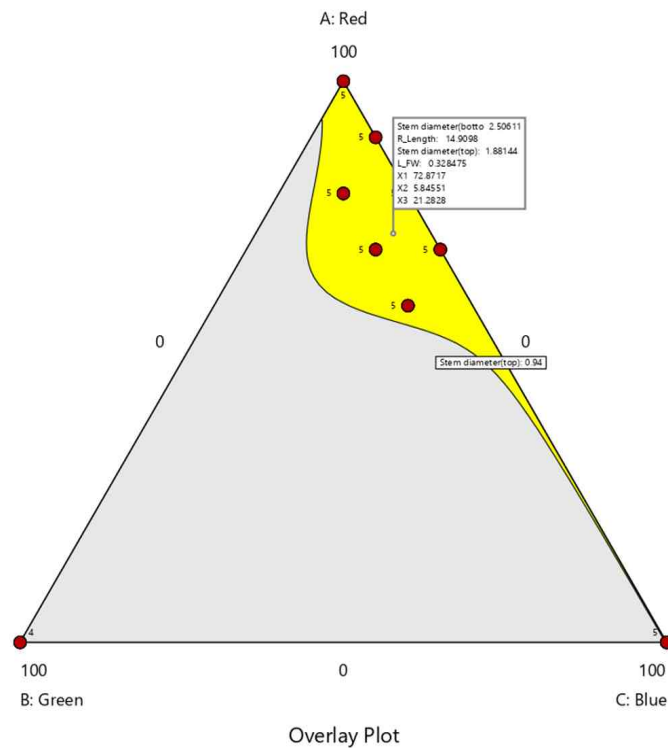


그림. 혼합물 설계 결과(2).

- ③ 줄기 직경\_top(D)과 SPAD Value(H)는 RGB비율 73:6:21 부근에서 높은 값을 보였고, 줄기 직경\_bottom(B), 엽수(I)는 Green 비율이 낮을 수록 높은 값을 보였음.
- ④ 뿌리 길이(C)와 지하부 생체중(E)은 Blue 비율이 높을수록 높은 값을 보였고, 지상부 생체중(F), 초장(G) 그리고 엽면적(J)은 Red 비율이 높을수록 높은 값을 보였음.
- ⑤ 4차년도에 실시한 9개의 처리구에 대해서 혼합물 설계를 실시했고, 그 결과 RGB비율



72.9:5.8:21.3에서 생육 결과가 좋을 것이라는 결과를 얻었음.

- ⑥ 이전 실험에서 성장 결과가 좋았던 광질 조건으로 판단된 R9B1, R8G1B1 비율과 다소 차이가 있었음.
- ⑦ 혼합물 G와 혼합물 B를 제외한 7개의 처리구를 이용하여 혼합물 설계를 실시한 결과 줄기직경(하단), 뿌리길이, 줄기 직경(상단), 지하부 생체중, 초장, SPAD, 엽수는 linear 모델의 경향을 보였음.
- ⑧ 지상부 생체중과 엽면적은 처리구 간 유의적 차이가 없었음.
- ⑨ 7개의 처리구에 대한 혼합물 설계 실시 결과 RGB비율 73.8:0:26.2에서 생육결과가 좋을 것이라는 결과를 얻음.
- ⑩ 이전 M.9 사과무병대목의 광질처리 실험에서 R9B1 처리구가 사과묘의 성장촉진에 가장 효과적이었는데, 이 실험의 분석 결과 최적의 조건이 70% 이상의 적색을 포함하고 있어 신뢰도가 높아 보임.

## (2) 전·후방 기술과의 유기적 연결을 위한 패키지 기술 개발

### (2-2) 식물공장과 스마트팜에서 M.9 사과무병대목의 생산 비교

#### (가) 실험 방법

- ① 기내배양된 M.9 사과무병대목을 기외환경에 정식하기 전 1주일간 성장챔버에서 예비순화를 진행했음.
- ② 예비 순화 환경은 이전 실험을 통해 결정된 재배환경조건과 동일하게 설정함(PPFD  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 광주기 16시간, 온도 25°C).
- ③ 예비 순화 기간 1주일 동안 상대습도 90% 환경에서 배양병 마개를 열어주는 예비순화 단계를 거친 뒤, DFT 시스템에 정식함.



그림. 기외 환경 정식 0주차 M.9 사과무병대목.

- ④ 0주차의 M.9 사과무병대목은 평균 초장 2.46cm, 뿌리길이 4.8cm, 생체중 0.3g이었음
- ⑤ 식물공장과 온실에 각각 정식 후 0~2주차 상대습도 90%, 2~4주차 상대습도 80%, 4~6주차 상대습도 60%으로 유지함.
- ⑥ 공급된 양액은 2차년도에 개발된 NAP 양액으로, 정식 후 4주까지는 pH 6.0, EC 0.5dS/m로 공급해주었고, 마지막 2주 동안 pH 6.0, EC 2.0dS/m으로 공급함.

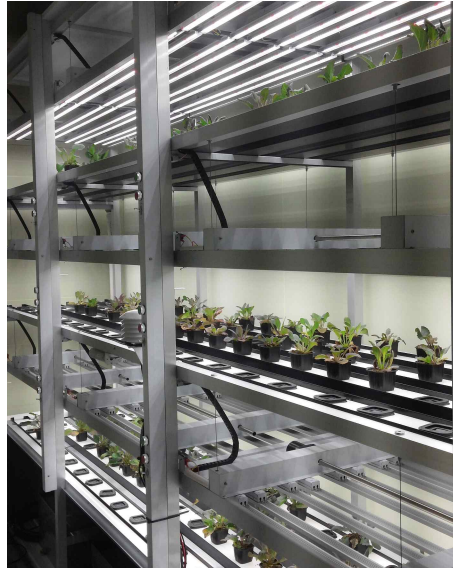


그림. 식물공장 내 M.9 사과무병대목 생산을 위한 환경 조성.



그림. 스마트팜 내 M.9 사과무병대목 생산을 위한 환경 조성.

(나) 실험 결과

① M.9 사과무병대목 생산을 위한 환경 조건은 센서를 통해 모니터링 되었음.

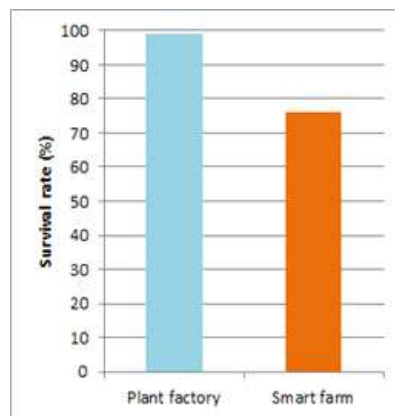


그림. 식물공장과 스마트팜 M.9 사과무병대목 생존율.

② 식물공장과 스마트팜에서 M.9 사과무병대목의 생존율 조사 결과 식물공장에서는 99%, 스마트팜에서는 76%로 스마트팜에서 생존률이 낮았음.

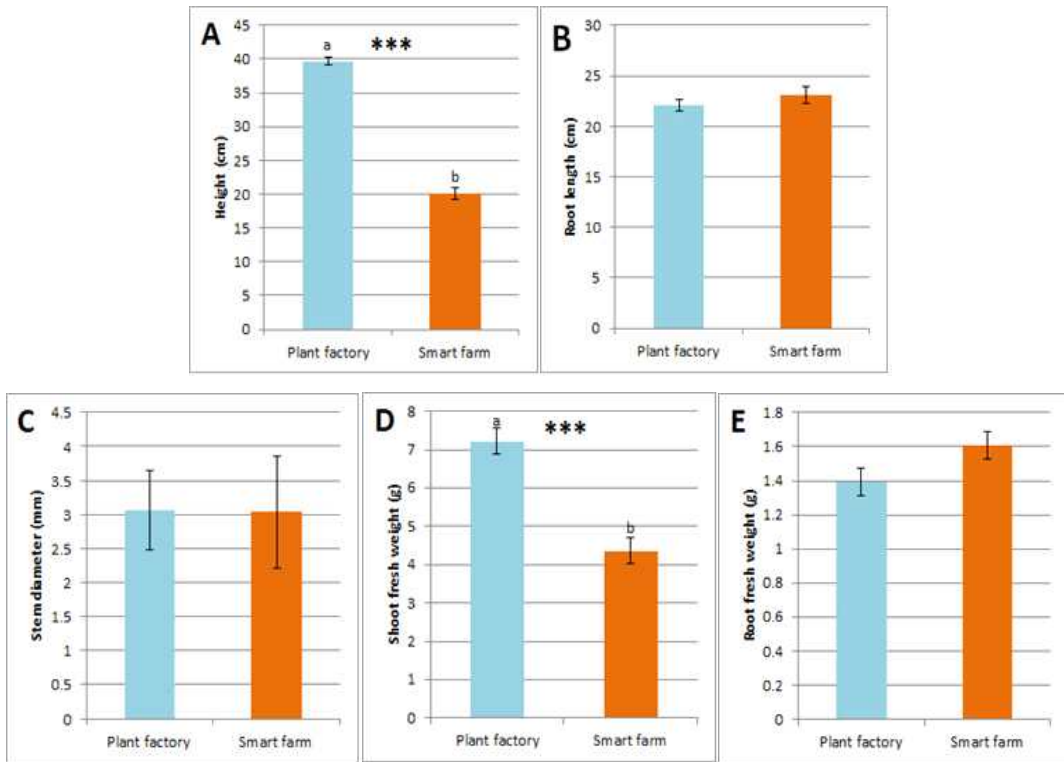


그림. 식물공장과 스마트팜 M.9 사과무병대목 성장비교.

- ③ 재배된 M.9 사과무병대목의 초장은 식물공장에서 39.6cm, 스마트팜에서 20cm으로 식물공장에서 생산된 M.9 사과무병대목이 유의적으로 높은 값을 보였지만, 뿌리 길이는 각각 22cm, 23cm으로 유의적인 차이가 없었음.
- ④ 직경은 식물공장과 스마트팜 모두 3mm로 유의적인 차이가 없었으며, 지하부 생체중의 경우 각각 1.4g, 1.6g으로 유의적인 차이가 없었고, 지상부 생체중은 식물공장에서 7.2g, 스마트팜에서 4.3g으로 유의적인 차이가 있었음.
- ⑤ 식물공장에서 재배된 M.9 사과무병대목은 스마트팜에서 생산된 사과무병대목보다 생존률이 높았고, 초장과 지상부 생체중에 있어서 유의적으로 높은 경향을 보였으나, 나머지 항목에 대해서는 유의적인 차이가 없었음.



그림. 식물공장(좌)과 스마트팜(우)에서 재배된 M.9 사과무병대목.

<제4세부: 사과무병종묘 바이러스 검정법 확립>

1. 사과무병종묘 바이러스 검정법 확립

가. 우리나라 사과 바이러스 유전자원 및 감염현황 조사

(1) 채집 및 유전자은행 등을 통해 사과 바이러스 분리주 확보

(1-1) 채집을 통해 사과 바이러스 분리주 확보

- ① 재배면적에 근거하여 충청도내 주요 사과 재배지를 선정하였으며, 과원 당 100주 내외에 대한 바이러스 검정 시료 채집.
- ② 조사 지역 및 과원: 충주, 제천, 보은, 괴산, 청주 등 5개 주요 사과 재배지, 지역별로 각 2과원씩 모두 20곳 선정함(표1).

표 1. 사과 바이러스 분리주 확보를 위한 바이러스 검정 시료 채집 장소

지 역	주 소
청주시	상당구 이정골, 상당구 이정골
충주시	산척면 명서리, 산척면 도덕리
제천시	신죽하로, 무지동
괴산군	연풍면 행촌리, 연풍면 원풍리
보은군	성주리 211, 장안면 서원리

- ③ 당년 자란 가지의 20cm 이상을 잘라 영하 70℃에 분리주를 보관하여 사용함.
- ④ 검정결과 양성으로 판명된 시료의 잎을 AMV증식 기주인 periwinkle에 접종함.
- ⑤ 잎 조직을 마쇄하여 얻은 즙액을 carborandum으로 상처 낸 periwinkle 엽에 기계적 접종함.
- ⑥ 일일초에 바이러스를 기계적 접종하여 증식시키고, 병반 증상을 확인하였음.
- ⑦ 감염 일일초의 검정시료에서 PCR수행을 통해 바이러스가 재검출한 것을 확인하였으므로, 증식기주로 사용할 수 있을 것으로 판단함.

(1) 채집 및 유전자은행 등을 통해 사과 바이러스 분리주 확보

(1-2) ACLSV 외피 유전자 변이체(다양체) 클로닝

(가) 실험 방법

- ① 바이러스 중복 감염주(BE 1, H14)에서 추출한 total RNA를 이용하여 ACLSV type 특이적 allele PCR을 수행한 결과 aA type, aC type의 ACLSV coat protein 유전자가 중복 감염된 사과나무로 확인함(그림1).

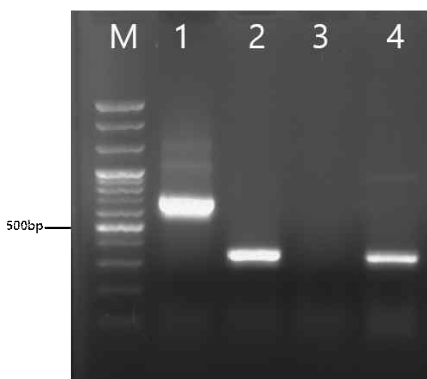


그림 1. One step RT-PCR result with total RNA extracted from the selected apple tree (BE H 14) using ACLSV specific primer (1), type aA specific primer (2), type aB specific primer (3), and type aC specific primer (4). M: 100bp ladder.

- ② ACLSV 전체 서열을 PCR 증폭하여 클로닝한 후 ACLSV 분리물의 염기서열을 분석한 결과 3개의 ORF (RdRp, MP, CP)로 구성되며 전체 길이가 약 7.5kb인 것을 확인함(그림2).

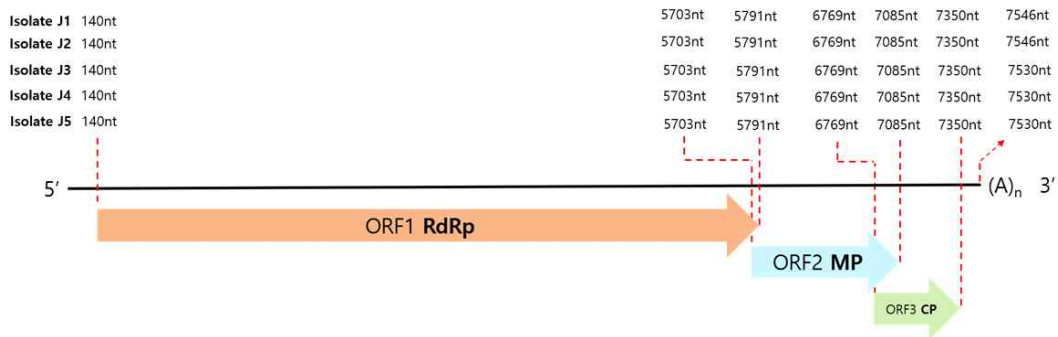


그림 2. Physical maps of 5 ACLSV isolates obtained by PCR cloning. All 5 isolates has 3 ORF; ORF1 encodes RNA dependent RNA polymerase, ORF2 encodes Movement protein, ORF3 encodes Coat protein. RdRp consists of 5652 nucleotides (216 kDa), MP consists of 1383 nucleotides (50.8 kDa), CP consists of 582 nucleotides (21.5 kDa).

- ③ ACLSV J1, ACLSV J2, ACLSV J3, ACLSV J4, ACLSV J5로 명명함.  
 ④ NCBI에 보고된 21개의 ACLSV isolate complete genome들의 서열과 계통 분석함.

(나) 실험 결과

- ① ACLSV isolate complete genome들의 서열과 계통 분석한 결과 높은 연관성 보였음(그림 3).

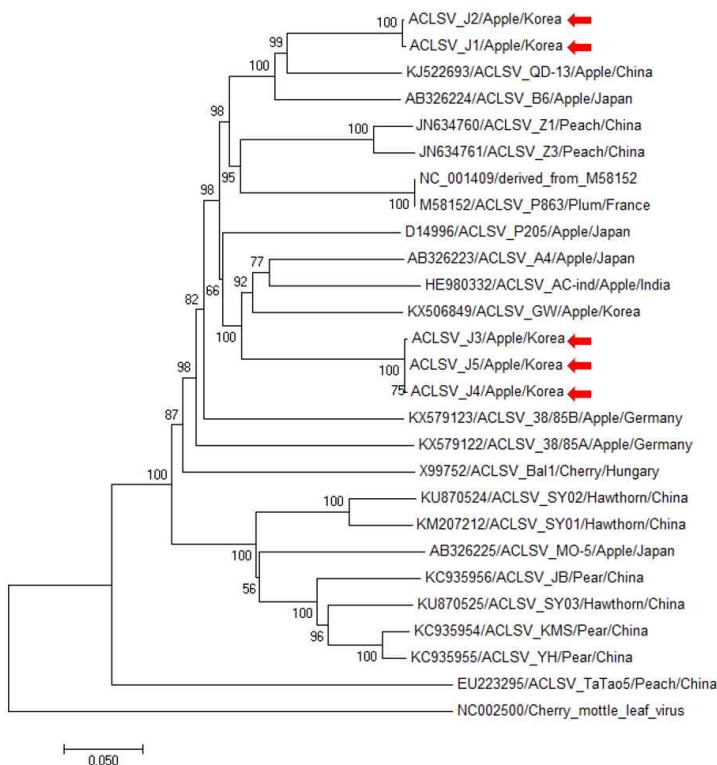


그림 3. Phylogenetic tree with complete genome nucleotide sequences. The tree was generated using neighbor-joining method with bootstrap value of 1000. The 21 ACLSV complete genome sequences and 1 Cherry mottle leaf virus complete genome sequence as out group were used. The red arrows indicate 5 ACLSV isolates obtained in this study.



- ② Chen(2014)과 우리의 선행연구(Choi, 2019)의 결과에 따라 ACLSV coat protein의 40번과 75번, 79번 위치의 아미노산 조합을 type aA(B6 type), type aB(SHZ type), 그리고 type aC(P205 type)로 구분함.
- ③ CBI 210개 ACLSV coat protein 아미노산 서열과 확보된 5개의 ACLSV isolate의 coat protein 아미노산 서열 계통 분석한 결과 3개의 clade (Type aA, aB, aC)로 구분됨 (그림 4).

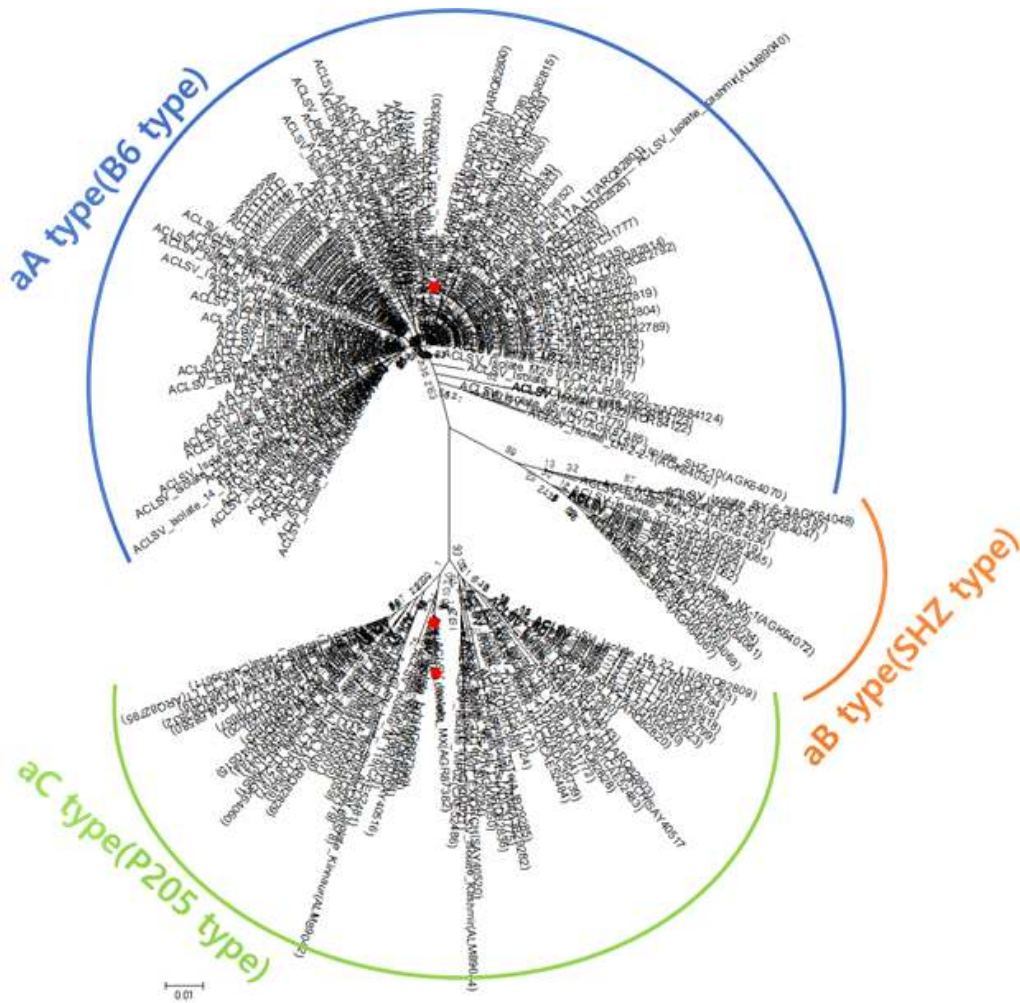


그림 4. Phylogenetic tree with amino acid sequences of ACLSV coat protein. The tree was constructed using the neighbor-joining method, Poisson model. Published 210 ACLSV isolates coat protein amino acid sequences on NCBI were used and the red dots indicate the 5 ACLSV isolates obtained in this study. 3 clades(aA type, aB type, aC type) were classified, isolate J1 and J2 belonging to aA type, isolate J3, J4, J5 belonging to aC type.

- ④ 5가지 ACLSV 분리물 타입 내(J1-J2, J3-J4-J5)은 99.7-99.9%의 높은 상동성을 보임.
- ⑤ J1-J2와 J3-J4-J5간 76.7-76.8%의 상동성을 보임(표2).



표 2. Identity percentage of nucleotide sequences between each Isolates over 90% percentage identity were highlighted.

Isolates	J1	J2	J3	J4	J5
J1	-	99.7%	76.7%	76.7%	76.8%
J2	-	-	76.7%	76.8%	76.8%
J3	-	-	-	99.7%	99.8%
J4	-	-	-	-	99.9%
J5	-	-	-	-	-

(1) 채집 및 유전자은행 등을 통해 사과 바이러스 분리주 확보

(1-3) ACLSV CP 유전자 Type별 감염성 클론 제작

(가) 연구 목적

- ① 확보된 ACLSV 분리물의 클론으로부터 기주식물에 대한 감염성, 병징에 대한 기여도 등과 이들 CP 변이체의 생물적 특성 파악을 위해 ACLSV 변이체 type별 감염성 클론을 제작함.

(나) 실험 방법

- ① 35S promoter 부위를 갖는 binary vector인 pGWB-505dp 확보된 각 ACLSV 분리물의 전체 서열을 클로닝하였음.
- ② pGWB-ACLSV J1, pGWB-ACLSV J2, pGWB-ACLSV J3, pGWB-ACLSV J4, pGWB-ACLSV J5로 명명함(그림 24).
- ③ 제작된 감염성 클론의 클로닝 확인을 위해 ACLSV specific primer을 이용한 PCR을 수행(그림 25).
- ④ PCR산물에 대한 제한 효소 처리 후 크기를 확인하였음(그림 26).
- ⑤ pGWB505-ACLSV J1과 pGWB505-ACLSV J3를 각각 aC type과 aA type의 대표로 접종하고 *Nicotiana occidentalis*를 지표 식물로 이용하였음.
- ⑥ 접종 3, 5주차에 상엽의 병징을 확인함.

(다) 실험 결과

- ① 3, 5주차에 접종된 감염성 클론 pGWB505-ACLSV J1, J3에서 대한 병징이 나타나지 않았으며, Negative control로써 이용된 pGWB505 gateway binary vector가 접종된 *N. occidentalis* 또한 병징이 나타나지 않았음 (그림 5).
- ② 상엽에서 추출한 total RNA로부터 ACLSV 특이적 프라이머를 이용하여 one step RT-PCR 수행결과, 3주차 접종엽에서 negative control을 제외한 모든 식물체에서 양성을 확인하였으나(그림 6), PCR 증폭에서는 모든 식물체에서 증폭 산물을 확인할 수 없으므로 RNA에 의한 증폭임을 알 수 있었다 (그림 7).
- ③ 5주차의 상엽에서 one step RT-PCR 증폭 결과, J3-4에서 677 bp의 증폭 산물을 확인

하여 접종엽에서 생산된 viral RNA가 식물체 내의 이동을 통해 상엽에 존재함을 확인하였다 (그림 6).

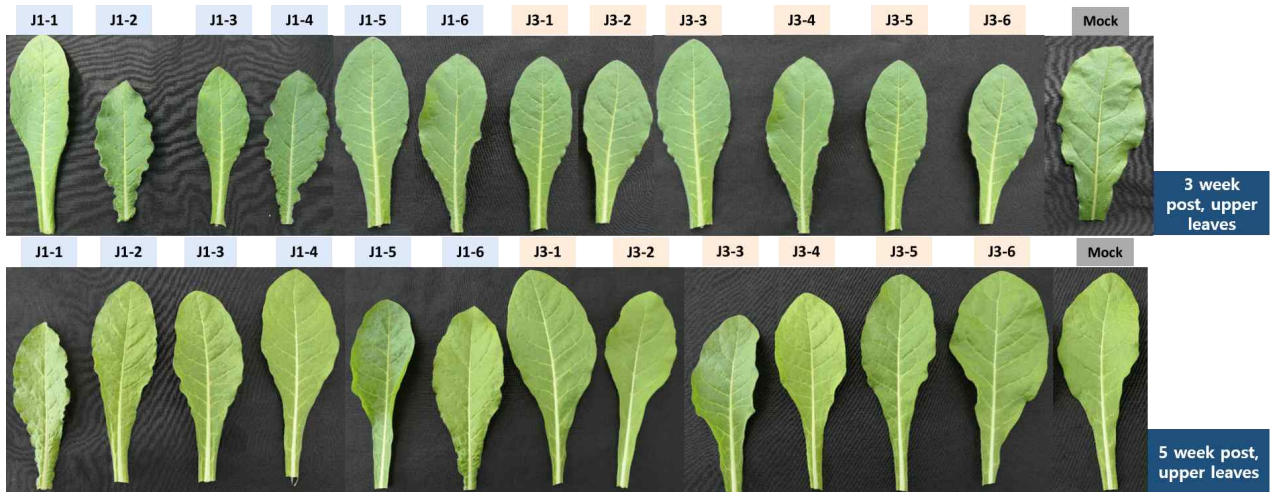


그림 5. No Symptoms on *N. occidentalis* 3 weeks and 5 weeks after agroinoculation with pGWB505-ACLSV J1 and pGWB505-ACLSV J3. The blue boxes indicate inoculated plants using pGWB505-ACLSV J1, the red boxes indicate inoculated plants using pGWB505-ACLSV J3. Mock is inoculated plant using pGWB505 used as negative control.

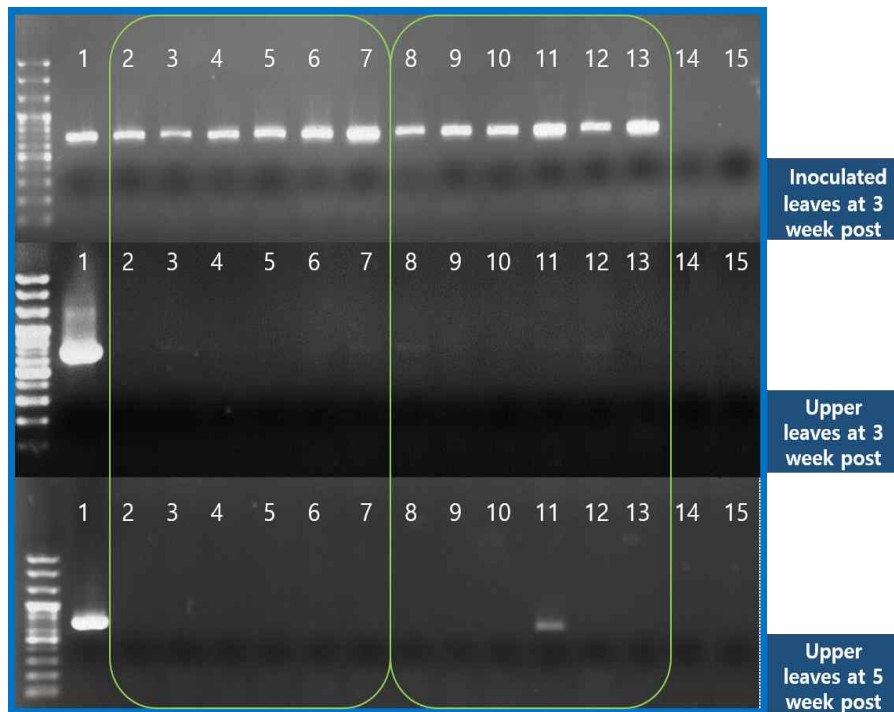


그림 6. RT-PCR result with inoculated leaves at 3 week post inoculation and upper leaves at 3 weeks and 5 weeks post inoculation using ACLSV specific primer. PCR positive (1), J1-1 (2), J1-2 (3), J1-3 (4), J1-4 (5), J1-5 (6), J1-6 (7), J3-1 (8), J3-2 (9), J3-3 (10), J3-4 (11), J3-5 (12), J3-6 (13), Mock (14), PCR negative (15). Mock is inoculated plant using pGWB505 used as negative control.

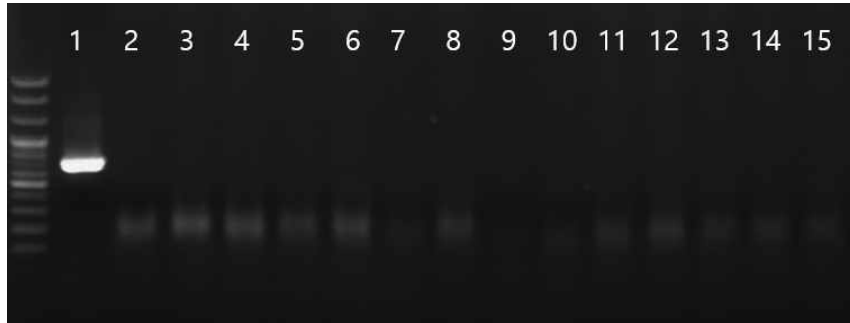


그림 7. PCR result using ACLSV specific primer with inoculated leaves at 3 week post inoculation. 1: PCR positive, 2: J1-1, 3: J1-2, 4: J1-3, 5: J1-4, 6: J1-5, 7: J1-6, 8: J3-1, 9: J3-2, 10: J3-3, 11: J3-4, 12: J3-5, 13: J3-6, 14: Mock, 15: PCR negative. Mock is inoculated plant using pGWB505 used as negative control.

(2) 국내 유통 사과 묘목의 바이러스 감염 현황 조사

(2-1) 주요 4가지 사과 바이러스의 감염현황 조사

(가) 실험 방법

① 실험재료: 충북(괴산, 단양, 보은, 청주, 충주, 단양), 충남(예산), 전북(장수, 무주), 강원(정선) 지역에서 주요 4가지 사과품종 ‘후지’, ‘후지후브락스’, ‘홍로’, ‘자홍’ 를 대상으로 각각 충북 999개체, 충남 120개체, 전북 358개체, 강원 195개체의 가지로부터 싹눈(Bud)을 채집함.

② Hotstart 기능이 포함된 One step RT-PCR 증폭, 이용된 프라이머는 표 3에 정리

표 3. 4가지 주요 바이러스 검출용 프라이머 정보.

Primer	Orient.	Sequence	Product size (bp)	References
ACLSV	F	TTC ATG GAA AGA CAG GGG CAA	677	Menzel et al. 2002
	R	AAG TCT ACA GGC TAT TTA TTA TAA GTC TAA		
ApMV	F	CGT AGA GGA GGA CAG CTT GG	450	Hassan et al. 2006
	R	CCG GTG GTA ACT CAC TCG TT		
ASPV	F	ATG TCT GGA ACC TCA TGC TGC AA	370	Menzel et al. 2002
	R	TTG GGA TCA ACT TTA CTA AAA AGC ATA A		
ASGV	F	GCC ACT TCT AGG CAG AAC TCT TTG AA	237	Menzel et al. 2002
	R	AAC CCC TTT TTG TCC TTC AGT ACG AA		
ASSVd	F	CCC GGT AAA CAC CGT GCG GT	331	LEE et al. 2001
	R	ACC GCG AAA CAC CTA TTG TG		

(나) 실험 결과

① 충북, 충남, 전북, 강원 지역의 사과나무에서 모두 ASGV의 감염률이 높게 나타났으며, 다음으로 ASPV와 ACLSV의 감염률이 높게 나타났음(그림 8).

- ② 병징이 주로 과실의 과피에 나타나는 ASSVd의 경우 감염률은 ASGV, ASPV, ACLSV에 비해 높지 않게 나타났으며, 강원, 충북, 충남에서 약 20% 내외의 감염률을 보였다.
- ③ 품종에 따른 5개 바이러스 감염률의 차이는 크게 나타나지 않았으나 후브락스의 경우 ACLSV, ASPV, ASGV의 감염률이 다른 품종에 비해 다소 낮은 추세를 보였다. ACLSV에 감수성이라고 보고된 홍로와 홍로 개량종 자홍에서는 후지와 후브락스에 비해 높은 ACLSV 감염률을 나타냄.

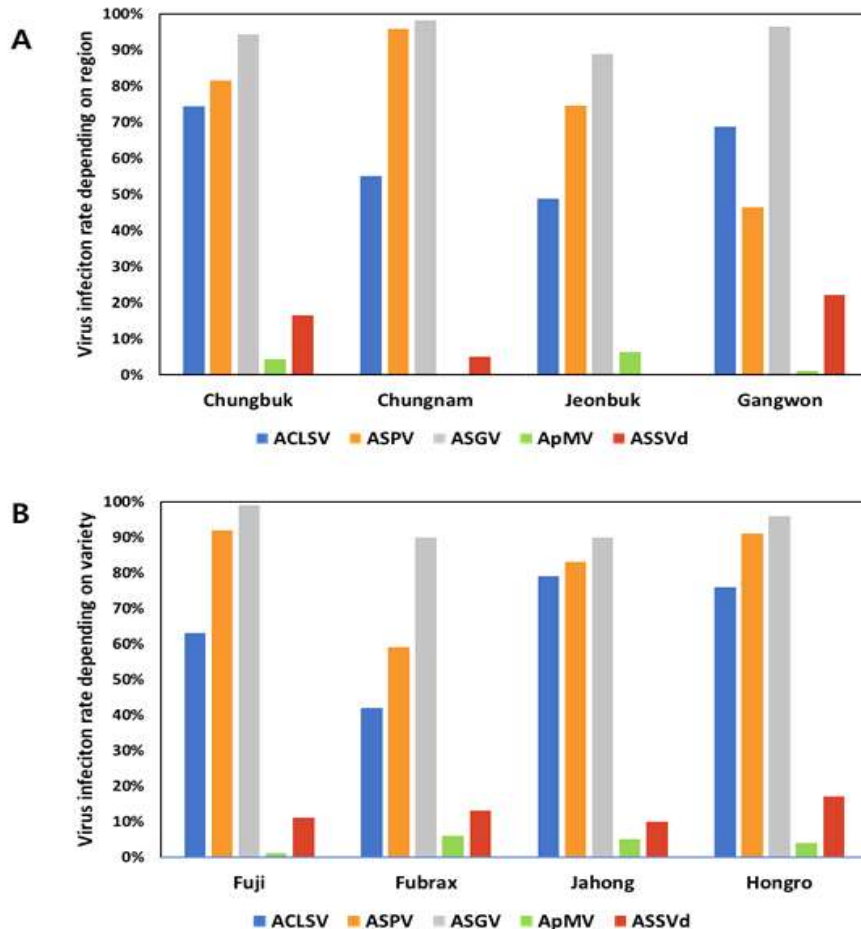


그림 8. Four major virus and 1 viroid density rate depending on regional(A) and variety(B).

## (2-2) 충북지역의 ACLSV type 분포 현황 조사

### (가) 실험 방법

- ① 실험재료: 충북(괴산, 단양, 보은, 청주, 충주, 단양), 충남(예산)에서 주요 4가지 사과품종 ‘후지’, ‘후지후브락스’, ‘홍로’, ‘자홍’를 대상.
- ② 999개체, 충남 120개체, 전북 358개체, 강원 195개체의 가지로부터 싹눈(Bud)을 채집함
- ③ Hotstart 기능이 포함된 One step RT-PCR 증폭, 이용된 프라이머는 표 3에 정리함.

### (나) 실험 결과

- ① Type aA 단독감염이 36.3%로 가장 많았으며, type aA와 type aC 중복감염이 28.6%로 두 번째로 높은 빈도를 보였다(그림9).

② 이외로는 type aB 단독감염 0.8%, type aC 단독감염 7.12%, type aA와 type aB 중복감염 0.5%, 3가지 변이체 중복감염 0.2%로 나타남(그림9).

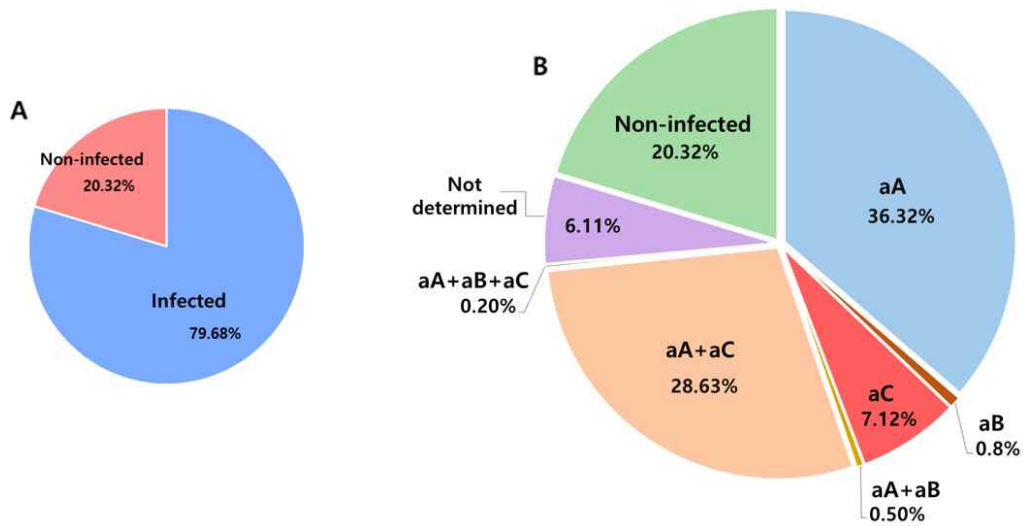


그림 9. Statistical result of ACLSV infection rate (A) and distribution of ACLSV variants (B) in the 999 apple trees collected in Chungbuk area.

#### 나. 바이러스 검출법 평가

##### (1) 주요 사과 바이러스에 대한 각 검출법 효율 탐색

- ① 채집 및 유전자은행 등을 통해 사과 바이러스 분리주를 확보함.
- ② 감염이 확인된 시료들을 PCR과 ELISA로 동시에 검출하여 검출 효율을 비교함.
- ③ ELISA는 PCR에 비해 매우 약한 반응을 보여 검출 감도가 상대적으로 낮으며, 바이러스의 조직내 증식 밀도가 낮은 경우 검출이 어려운 문제점이 있음.
- ④ ELISA는 PCR과 비교할 때 시료의 준비과정의 난이도는 비슷하였으나, 시간과 비용 면에서 열등하였으며 검출감도가 낮아서 사과 가지의 바이러스 검출용으로 사용하기에는 문제가 있는 것으로 판단됨.

##### (2) 사과 품종에 따른 바이러스 검출감도 변화연구

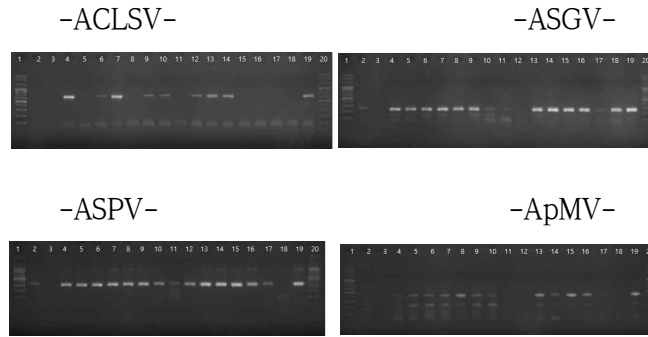
- ① 사과 묘목에 바이러스에 감염된 수체의 가지를 접목하여 전염후 바이러스를 검출할 수 있는지 여부를 확인하고자 연구를 수행하였음.
- ② 뚜렷한 바이러스 감염 증상을 보이지 않았음(그림10).
- ③ 시료를 이용하여 PCR 검정시에도 검출되지 않았음.



그림 10. 바이러스 감염목의 접수를 이용하여 전염을 유도한 접목묘

(3) 사과 무병종묘에 발생하는 주요 사과 바이러스 감염현황 조사

① 1년차 채집시료를 이용하여 확립한 PCR법으로 ACLSV, ASPV, ApMV, ASGV를 검정하였음.



② 지역별(4곳) 수집된 시료를 이용하여 바이러스 감염현황을 확인하였음.

구분	주소
A	상주시 함창읍 대조리 707-10
B	상주시 함창읍 대조리 731-1
C	안동시 임하면 오대리 1144-3
D	안동시 송천동 1319-54

③ B, C 지역의 바이러스는 다음과 같음(표 4, 표 5, 표 6)

표 4. B,C 지역의 바이러스에 대한 감염현황.

Area	No. of samples	No. of Infection samples	Infection rate(%)
B	54	49	91
C	72	61	85

표 5. B, C 지역의 개별 바이러스의 감염현황.

Area	No. of samples	ACLSV	ASPV	ASGV
B	54	4	14	3
C	72	5	2	3

표 6. B, C 지역의 복합 바이러스의 감염현황.

Area	No. of samples	ACLSV+			ASPV +ASGV
		ASPV+	ACLSV+ASPV	ACLSV+ASGV	
B	54	8	6	4	10
C	72	26	2	3	20

다. 주요 사과 바이러스 및 묘목생산단계별 최적 검출법 선정

(1) 검출법에 따른 주요 바이러스 검출 감도 및 속도 비교

(1-1) 바이러스 검정법 확립을 위한 RT-PCR 조건 비교



(가) 실험 방법

- ① RT-PCR 조건을 비교 Two step RT-PCR, One step RT-PCR, Hotstart One step RT-PCR 3가지 방법을 비교분석함.
- ② RT-PCR 증폭 효율을 전기영동상에서 증폭밴드를 비교함.
- ③ (GS1-H5, GS1-H6, GS2-F2, GS2-F3, GS6-J8, GS6-J15) 가지로부터 추출한 RNA를 template로 이용함.
- ④ 각 RNA에 대해 ACLSV, ASPV, ASGV specific primer를 이용하여 RT-PCR수행함.
- ⑤ Two step RT-PCR: Hyperscript™ RT Master mix kit(GeneAll Biotechnology Co., Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 6개의 total RNA와 oligo dT를 primer로 하여 cDNA를 합성하였고, 여기서 합성된 cDNA를 주형으로 하고 TaKaRa Ex Taq(TaKaRa, Kusatsu, Japan)을 이용하여 PCR 증폭함.
- ⑥ One step RT-PCR: cDNA합성 과정과 PCR과정을 나누지 않고 한번에 수행되는 방법으로 추출한 6개의 total RNA를 주형으로 하여 2X One-step RT-PCR Master mix(GeneAll Biotechnology Co., Ltd., Seoul, Korea)를 이용해 RT-PCR을 수행.
- ⑦ Hotstart 기능이 포함된 One step RT-PCR: 추출한 6개의 total RNA를 주형으로 하였으며 BioFact™ Onestep RT-PCR (BioFACT Co., Ltd, Daejeon, Korea)을 사용하여 PCR 수행.

(나) 실험 결과

- ① Two step RT-PCR의 경우 모든 시료에서 바이러스가 증폭되었지만, ACLSV 특이 primer로 증폭한 경우 시료별로 증폭되는 정도에 차이가 컸음(그림 11, A).

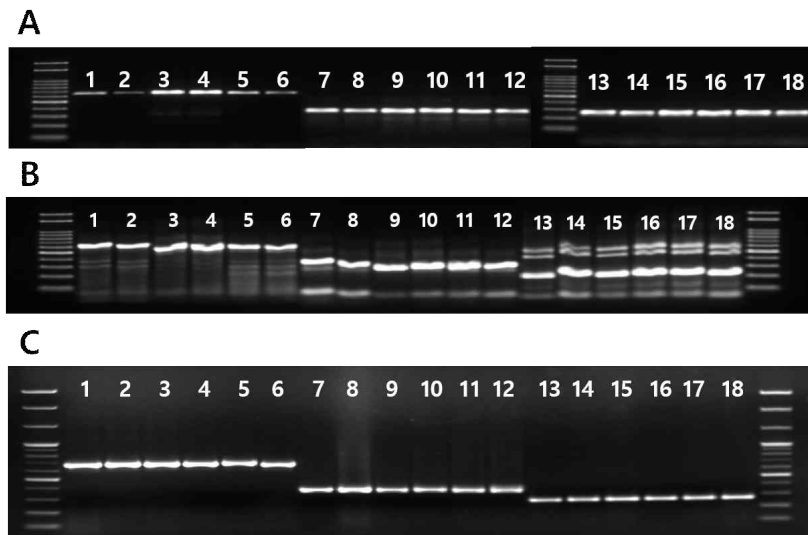


그림 11. Two step RT-PCR(A), One step RT-PCR(B) and One step RT-PCR with hotstart function(C) results using RNA extracted from apple tree with ACLSV, ASPV, ASGV specific primer. 1, 7, 13: GS1-H5, 2, 8, 14: GS1-H6, 3, 9, 15: GS2-F2, 4, 10, 16: GS2-F3, 5, 11, 17: GS6-J8, 6, 12, 18: GS6-J15. Lane 1~6 are amplified using ACLSV specific primer. Lane 7~12 are amplified using ASPV specific primer. Lane 13~18 are amplified using ASGV specific primer.

- ② One step RT-PCR의 경우 Two step RT-PCR에 비해 증폭된 밴드의 강도는 높아지지  
만 비특이적 증폭에 의한 밴드들이 많았음(그림 11, B).

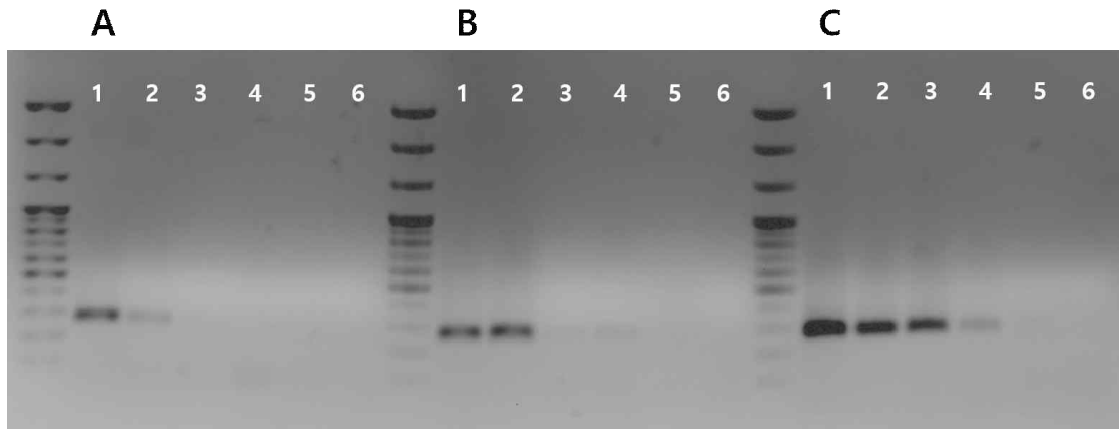


그림 12. Two step RT-PCR(A), One step RT-PCR(B) and One step RT-PCR with Hotstart function(C) results using RNA extracted from apple tree(CJ1-FB5) with ASGV specific primer. 1: undiluted RNA, 2: 10<sup>-1</sup> diluted RNA, 3: 10<sup>-2</sup> diluted RNA, 4: 10<sup>-3</sup> diluted RNA, 5: 10<sup>-4</sup> diluted RNA, 6: 10<sup>-5</sup> diluted RNA.

- ③ Hotstart의 기능이 있는 One step RT-PCR로 테스트한 경우 비특이적 증폭에 의한 밴드도 형성되지 않았으며 밴드의 강도 또한 높은 결과를 보였음(그림 11, C).
- ④ Hotstart 기능이 있는 One step RT-PCR 10<sup>-4</sup>까지 희석한 RNA 시료까지 바이러스를 증폭하여, 검출민감도가 다른 RT-PCR 조건보다 좋은 결과를 보였음(그림 12).
- ⑤ 따라서, Hotstart의 기능이 있는 One step RT-PCR 조건이 바이러스 검정에 최적 방법으로 판단됨.

## (2) 기내배양, 발근, 순화, 육묘 등 각 묘목생산단계별 바이러스 검출법 탐색

### (2-1) 사과나무 부위별 바이러스 검출 효율

#### (가) 실험 방법

- ① 충북 농업기술원 온실과 온실이 아닌 과수원에서 채집한 사과나무 가지를 일회용 단면도를 이용하여 썬, 관다발조직을 포함하는 가지 껍질 조각, 썬눈이 있는 윗토막, 절단면의 아랫토막으로 나뉘서 잘라(그림 13), 동결건조 후 total RNA를 추출함(동결건조와 total RNA 추출 과정은 항목 4에서 자세히 설명).



그림 13. Types of winter dormant branch Samples. The upper part of the red dotted line is used as a sample. 1. bud, 2. rind containing vascular tissue, 3. branch end, 4. branch middle. The samples shown in the picture is 100 mg.

- ② Hotstart 기능이 포함된 One step RT-PCR로 증폭.
- ③ 바이러스 검출효율은 RT-PCR 결과물을 젤 전기영동하여 증폭된 DNA밴드의 강도에 따라 숫자를 부여하고 그 숫자로 증폭효율을 비교함(그림 14).

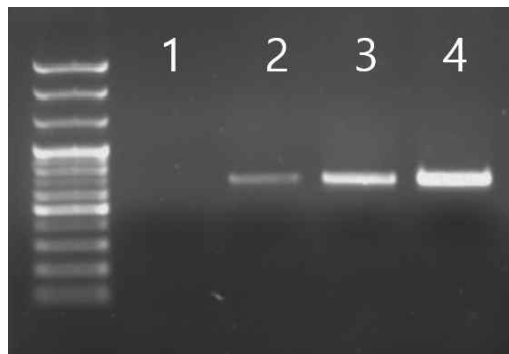


그림 14. One step RT-PCR with Hotstart function with ACLSV specific primer. Lane 1 assigned - result, with no amplification. Lane 2 assigned + result, 3 lane assigned ++ result and 4 lane assigned +++ result.

(나) 실험 결과

- ① 시료 부위별 검출 효율에는 큰 차이가 없음. 싹눈(Bud)는 검출효율 total score가 32점, 관다발조직을 포함하는 가지 껍질 조각(Rind) 32점, 싹눈이 있는 윗토막(Branch end) 32점으로 위 3개의 샘플 간에 눈에 띄는 검출 효율 차이는 나타나지 않았고, 바이러스별로 부위에 따라 검출 효율 또한 많이 다르지 않음.
- ② 절단면의 아랫토막(branch middle)은 28점으로 상대적으로 검출효율이 낮았음(표 1, 그림 15).
- ③ 노지 과수원에서 채집한 사과나무 가지 샘플의 부위별 검출효율의 경우 ACLSVd의 경우 윗토막(Branch end)과 아랫토막(branch middle)에서는 검출되지 않음(그림 6, 표 2).

- ④ 싹눈(Bud)에서는 ASSVd를 제외한 4 종류의 바이러스에서 모두 검출됨. 껍질 조각(Rind) 8점, 싹눈이 있는 윗토막(Branch end) 6점, 절단면의 아랫토막(Branch middle)이 6점 순으로 검출효율을 보였음 (그림 16, 표 4.)
- ⑤ 모두를 고려하면 큰 싹눈이 가장 적합한 검출조직으로 판단되며, ASSVd와 ApMV의 경우 추가적인 연구가 필요한 것으로 판단됨.

표 4. Detection efficiencies of viruses and viroid in each part of dormant branches in early spring.

Sample <sup>1</sup>	virus	Bud	Rind	branch middle	Branch end
후지후브락스 M9ASGV-5	ACLSV	+	++	++	++
	ASPV	-	-	-	-
	ASGV	++	++	+	++
	ApMV	-	-	-	-
	ASSVd	+	+	+	+
후지후브락스 M9ASGV-6	ACLSV	+	++	++	+
	ASPV	-	-	+	-
	ASGV	++	++	++	++
	ApMV	-	-	-	-
	ASSVd	+	+	+	+
RDA 후지 12M26-1	ACLSV	++	++	+	+
	ASPV	-	-	-	-
	ASGV	+	++	+	++
	ApMV	-	-	-	-
	ASSVd	+	+	+	+
RDA 후지 12M26-2	ACLSV	++	+	+	+
	ASPV	-	-	-	-
	ASGV	++	++	+	+++
	ApMV	-	-	-	-
	ASSVd	+	+	+	+
후지19M26-1	ACLSV	+++	+	+	++
	ASPV	+	++	+	+++
	ASGV	++	++	+	+
	ApMV	-	-	-	-
	ASSVd	+	+	+	+
후지 19M26-2	ACLSV	+++	+++	+++	++
	ASPV	++	++	++	++
	ASGV	++	+	++	++
	ApMV	-	-	-	-
	ASSVd	+	+	+	+

<sup>1</sup>These samples are obtained from green house Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services

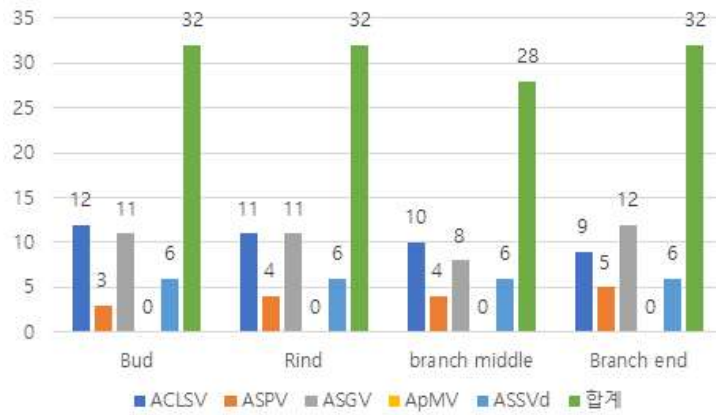


그림 15. Detection efficiency by sum of detection efficiency number obtained by gel electrophoresis of RT-PCR products.

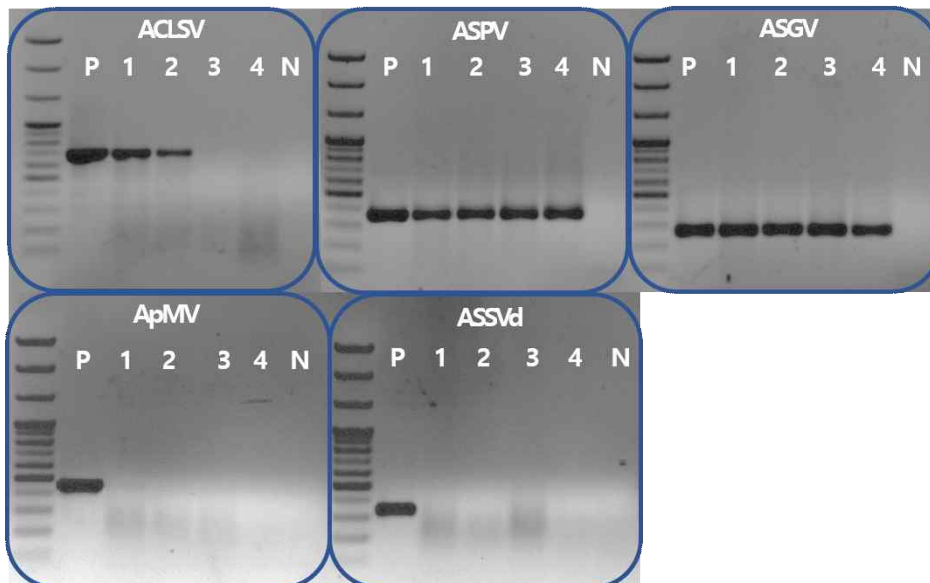


그림 16. One-step RT-PCR with Hotstart function using RNA extracted from apple tree branch at Chung-ju orchard(CJ1-FB5) with bud. P: positive control, 1: Bud, 2: Rind, 3: Branch end, 4: Branch middle, N: Negative control.

표 4. Detection efficiencies of viruses and viroid in each part of apple tree branch sampled at Chung-ju orchard

Sample <sub>1</sub>	virus	Bud	Rind	Branch end	Branch middle
CJ1-FB5	ACLSV	+++	++	-	-
	ASPV	+++	+++	+++	+++
	ASGV	+++	+++	+++	+++
	ApMV	+	-	-	-
	ASSVd	-	-	-	-

(2) 기내배양, 발근, 순화, 육묘 등 각 묘목생산단계별 바이러스 검출법 탐색

(2-2) 사과나무 생육단계별 바이러스 검출법 개발

(가) 실험 방법

- ① 충북 농업 기술원 재식 ACLSV 감염 사과나무 신초를 월동기, 개화기, 착과기, 수확기 4가지 시기별 채집함.
- ② ACLSV검출 PCR과 ACLSV type특이적 allele PCR을 수행하여 시기별 ACLSV 및 변이체 밀도를 조사함.
- ③ Gel Analyzer2010a를 사용하여 시료별 밴드의 intensity를 확인하여 검출된 밴드의 intensity 값을 모두 합하여 검출에 민감한 시기를 조사함.

(가) 실험 결과

- ① ACLSV 검출 PCR과 ACLSV type특이적 allele PCR 모두 월동기 대비 개화기 채집 시료에서 약 20-37%의 검출 증가를 보임. 밴드 intensity는 1.7-2배 증가를 보임.
- ② Type aB primer를 이용한 allele PCR에서 type aB 변이체에 감염된 샘플수가 적어 효율적인 검출시기를 정확하게 판단하는 것은 어려우나 월동기 대비 개화기 시료에서 미약한 밴드 intensity 증가를 확인하였음 (그림 17).
- ③ 개화기는 다른 시기보다 상대적으로 많은 생장이 이루어지는 시기로 보다 많은 바이러스 복제가 가능하여 검출 민감도 면에서 높은 효율이 나타난 것으로 추측됨.
- ④ ACLSV 및 변이체의 정확한 검출은 개화기 때 실시되는 것이 효율적일 것으로 예상됨.

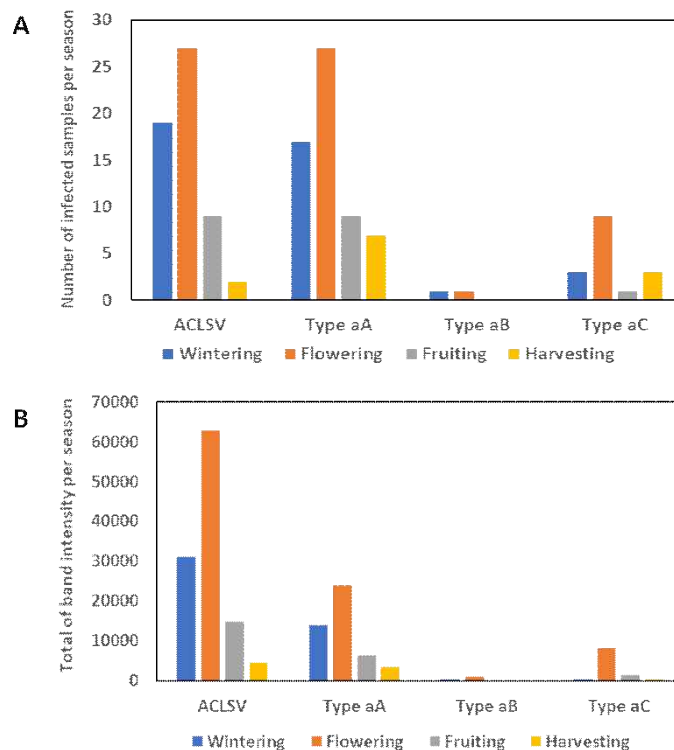


그림 17. Changes in the number of detected samples (A) and PCR product band intensity (B) by RT-PCR with RNA isolated at different stage of growth (wintering, flowering, fruiting, harvesting) of 27 collected apple tree branch samples.



라. 주요 사과 바이러스 최적 검출법 생력화 연구

(1) 바이러스 종류별 검출 한계밀도 확인

(가) 실험 방법

- ① Virus positive maker로 개발된 clone(그림 18)과 사과나무로부터 추출된 RNA를 template로 이용함.
- ② Nanodrop-2000(Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA)로 정량한 후 serial dilution하여 1 ng - 1 ag까지 희석하여 template로 사용함.
- ③ 채집한 사과나무(CJ1-FB5) 가지의 짝눈 부위에서 추출하였으며 추출한 RNA를 Nanodrop-2000(Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA)으로 정량한 후 100 ng ~ 100 fg까지 희석하여 template로 사용함.
- ④ Hotstart 기능이 포함된 One step RT-PCR로 증폭함.

(나) 실험 결과

- ① 바이러스 클론을 가진 plasmid를 시료로 이용할 경우, 바이러스별 검출한계밀도가 다름 (그림 18).
- ② ACLSV 10ag, ASPV 1fg, ASGV, 10 ag, APMV 100 ag, ASSVd 100fg까지 육안 검출이 가능 (그림 18).
- ③ ACLSV는 2개 입자, ASPV는 200개 입자, ASGV는 2개 입자, APMV는 20개 입자, ASSVd 20000개 입자까지 검출이 됨. ASSVd는 감도를 높이기 위해 PCR 프라이머의 재개발이 요구됨
- ④ RNA를 template로 하였을 때, 100ng에서 10배씩 100fg까지 희석할 때, ACLSV는 100 pg, ASPV는 100 pg, ASGV는 10 pg, ApMV는 10 ng, ASSVd는 100 pg까지 전기영동상 밴드 확인이 가능함 (그림 19).

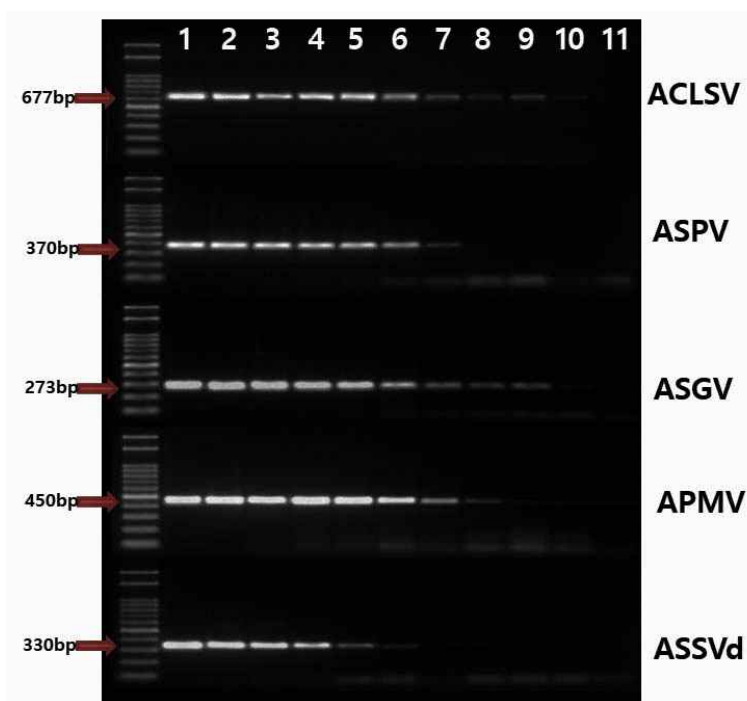


그림 18. Sensitivity of each detection RT-PCR method of viruses and a viroid.(Menzel et al., 2002/Hassan et al., 2006/LEE et al, 2001) PCR template used a vector which is cloned 4 viruses and 1 viroid as positive marker. 1. 1 ng, 2. 100 pg, 3. 10 pg, 4. 1pg, 5. 100 fg, 6. 10 fg, 7. 1 fg, 8. 100 ag, 9. 10 ag, 10. 1 ag, 11. distilled water as negative control.

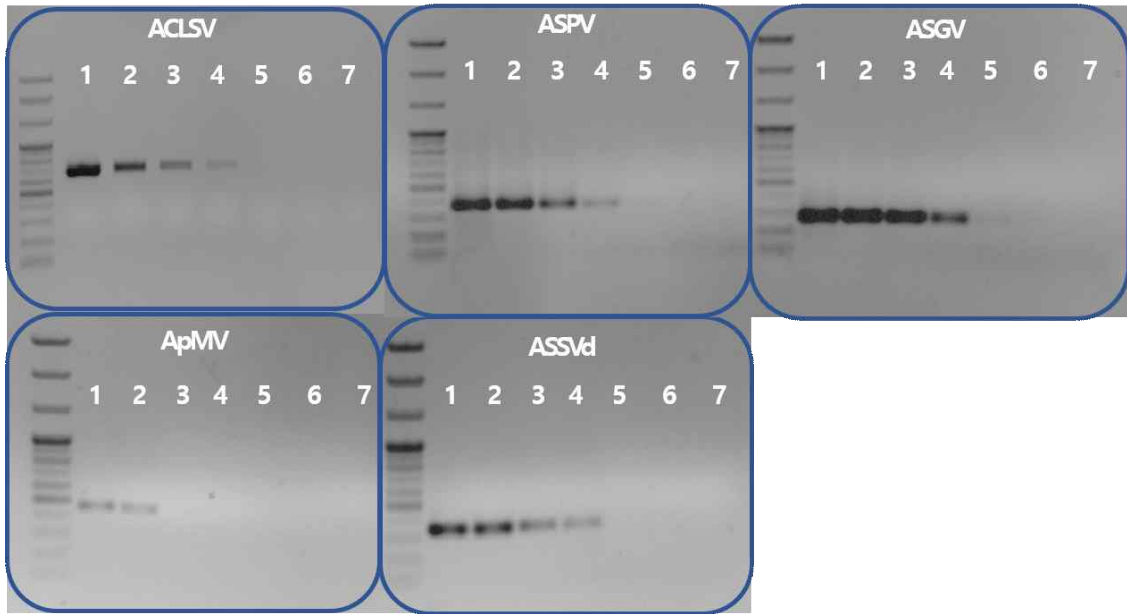


그림 19. Sensitivity of each detection RT-PCR method of viruses and a viroid.(Menzel et al., 2002/Hassan et al., 2006/LEE et al, 2001) Extracted RNA used as template. 1: 100 ng, 2: 10 ng, 3: 1 ng, 4: 100pg, 5: 10 pg, 6: 1 pg, 7: 100 fg.

## (2) 주요 사과 바이러스 최적 검출법 생력화 연구

### (2-1) 국내 분포 ACLSV의 Coat protein 유전자 변이 확인

#### (가) 연구 배경

- ① NCBI GenBank에서 사과로부터 분리된 ACLSV 210 isolates의 coat protein 영역의 아미노산 서열을 다운받아 계통분석하여 3가지 type의 변이체가 국내에 존재함을 확인(그림 20).
- ② Yaegashi(2007), Chen(2014)에서 보고된 3가지 타입(B6, SHZ, P205)와 동일함.
- ③ 2016-2018년에 채집된 사과나무 샘플 28개 대상으로 ACLSV coat protein 유전자 증폭 primer(Yagashi et al., 2007)로 coat protein 영역을 증폭 후, TA cloning하여 46개의 ACLSV isolates coat protein 아미노산 서열을 확보하였음.
- ④ 일부 사과나무 샘플에서 두 가지 type 변이체의 coat protein 서열이 cloning 되었으며, 이를 바탕으로 두 종류 이상의 type 변이체 CP 유전자가 한 개 사과나무 조직 내에 공존함을 확인함(표 5).
- ⑤ GenBank에 있는 210 ACLSV isolates와 국내 분리 46 isolates의 coat protein 영역의 아미노산 서열을 ACLSV 변이체 type별로 비교해본 결과 40, 75, 79, 86, 98, 130, 그리고 137번째 아미노산 위치에서 type별로 보존되어 있음을 확인함(표 6.).

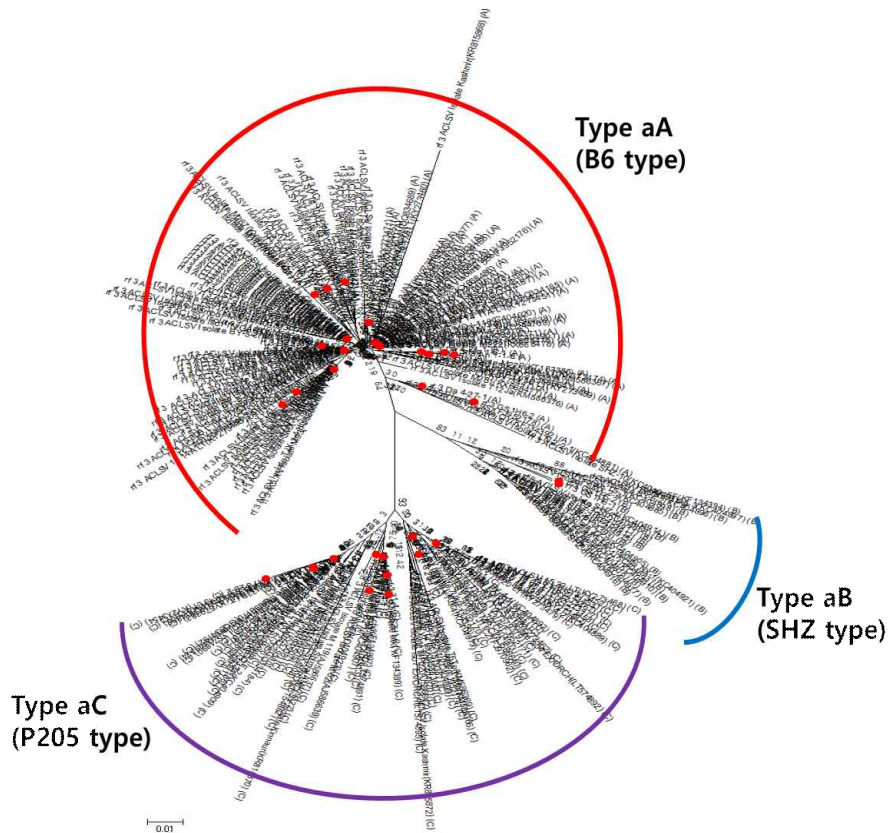


그림 20. Phylogenetic tree from amino acid sequence of 256 isolates of GenBank ACLSV coat protein and 46 isolates of ACLSV from domestic apple trees. The red dot shows domestic isolates. The tree was constructed using the neighbor-joining method, Poisson model. Branch lengths are proportional to the genetic distance between the taxon.

표 5. List of 46 domestic isolates cloned from 28 total RNA isolated from the 28 apple tree samples.

No.	Isolate	Location	Year	Type	Sample name
1	Ah 1-1-8	Wonpung-ri, Goesan-gun	2016	aA	Ah 1-1
2	Ah 1-7-1	Wonpung-ri, Goesan-gun	2016	aA	Ah 1-7
3	Ba 1-2-2	Muji-Dong, Jecheon-si	2016	aA	Ba 1-2
4	Ba 1-4-1	Muji-Dong, Jecheon-si	2016	aA	Ba 1-4
5	Ba 1-4-2	Muji-Dong, Jecheon-si	2016	aA	Ba 1-4
6	Ba 2-14-1	Muji-Dong, Jecheon-si	2016	aC	Ba 2-14
7	Cha 3-2-7	Sewon-ri, Boeun-gun	2016	aA	Cha 3-2
8	Cha 3-2-10	Sewon-ri, Boeun-gun	2016	aA	Cha 3-2
9	Da 2-13-4	Myeongseo-ri, Chungju	2016	aA	Da 2-13

10	Da 3-25-3	Myeongseo-ri, Chungju	2016	aA	Da 3-25
11	Da 4-21-1	Myeongseo-ri, Chungju	2016	aA	Da 4-21
12	Da 4-21-3	Myeongseo-ri, Chungju	2016	aA	Da 4-21
13	Da 4-21-4	Myeongseo-ri, Chungju	2016	aA	Da 4-21
14	Da 4-25-4	Myeongseo-ri, Chungju	2016	aA	Da 4-25
15	Da 4-27-1	Myeongseo-ri, Chungju	2016	aA	Da 4-27
16	Ga 1-19-1	Sangdang-gu, Cheongju	2016	aC	Ga 1-19
17	GS1 H5-1	Oga-ri, Goesan-gun	2018	aB	GS1 H5
18	GS1 H5-2	Oga-ri, Goesan-gun	2018	aB	GS1 H5
19	GS1 H6-1	Oga-ri, Goesan-gun	2018	aB	GS1 H6
20	GS1 H6-2	Oga-ri, Goesan-gun	2018	aA	GS1 H6
21	GS2 H1-1	Bangkok-ri, Goesan-gun	2018	aC	GS2 H1
22	GS2 H1-2	Bangkok-ri, Goesan-gun	2018	aC	GS2 H1
23	GS2 H4-1	Bangkok-ri, Goesan-gun	2018	aC	GS2 H4
24	GS2 H4-2	Bangkok-ri, Goesan-gun	2018	aC	GS2 H4
25	Ma 1-2-1	Goam-dong, Jecheon-si	2016	aA	Ma 1-2
26	Ma 1-3-3	Goam-dong, Jecheon-si	2016	aA	Ma 1-3
27	Ma 1-6-1	Goam-dong, Jecheon-si	2016	aA	Ma 1-6
28	Ma 1-6-5	Goam-dong, Jecheon-si	2016	aA	Ma 1-6
29	Ma 5-7-1	Goam-dong, Jecheon-si	2016	aA	Ma 5-7
30	tree 25-1	CARES*	2018	aA	tree 25
31	tree 25-3	CARES	2018	aA	tree 25
32	tree 25-4	CARES	2018	aA	tree 25
33	tree 25-7	CARES	2018	aC	tree 25
34	tree 26-1	CARES	2018	aA	tree 26
35	tree 26-5	CARES	2018	aC	tree 26
36	tree 27-1	CARES	2018	aC	tree 27
37	tree 28-1	CARES	2018	aA	tree 28
38	tree 28-2	CARES	2018	aC	tree 28
39	tree 29-1	CARES	2018	aA	tree 29
40	tree 29-7	CARES	2018	aC	tree 29
41	tree 29-9	CARES	2018	aC	tree 29
42	tree 31-1	CARES	2018	aA	tree 31
43	tree 31-2	CARES	2018	aA	tree 31

44	tree	31-4	CARES	2018	aC	tree 31
45	tree	32-1	CARES	2018	aC	tree 32
46	tree	75-2	CARES	2018	aA	tree 75

표 6. Conserved amino acids and position in each type of Apple chlorotic leaf spot virus.

Type/ Type position	40	75	79	86	98	130	137
aA type (B6 type)	S	Y	E	A	N/S	T	S
aB type (SHZ type)	S	Y	S	A/I	G	S/T	G/S
aC type (P205 type)	A	F	E	I	N/S	S	G

(2) 주요 사과 바이러스 최적 검출법 생력화 연구

(2-2) ACLSV type별 특이적 검출법 개발

(가) 연구 방법

- ① Allele PCR 원리 이용하여 type내 보존되지만 다른 type에서는 보존되어 있지 않은 염기 하나를 찾아 프라이머의 3' 말단으로 배치하여 특이성을 부여함.
- ② 프라이머 제작: Type aA 특이적 프라이머는 총 11 세트, type aB 특이적 프라이머는 총 30 세트, type aC 특이적 프라이머는 35세트를 이용함.
- ③ 실험재료 : 각 type별 coat protein이 cloning된 vector를 PCR 주형으로 하여 특이성 검사를 실시함.

(나) 연구 결과

- ① Type aA 특이적 프라이머는 9번, Type aB 특이적 프라이머는 24번, Type aC 특이적 프라이머는 18번이 가장 높은 특이성을 보임(그림 21).
- ② 최종 선발된 ACLSV type-specific primer의 서열은 표 7에 제시함.
- ③ type aA와 type aC 변이체에 대응하는 프라이머를 적용하여 PCR을 수행한 후 보존된 아미노산을 확인한 결과, type aA 프라이머 증폭부위에서 확인 가능한 아미노산 위치는 86, 130, 137번으로 각각 alanine, threonine, serine이 보됨을 확인함
- ④ type aC 프라이머 증폭부위에서 확인 가능한 아미노산 위치는 40, 75, 86번으로 각각 alanine, phenylalanine, isoleucine이 보존되어 있음을 확인하였음.
- ⑤ 위 두 프라이머를 이용한 증폭 부위는 각 변이체 type에서 보존된 염기서열과 일치하는 것을 확인함(그림 22).

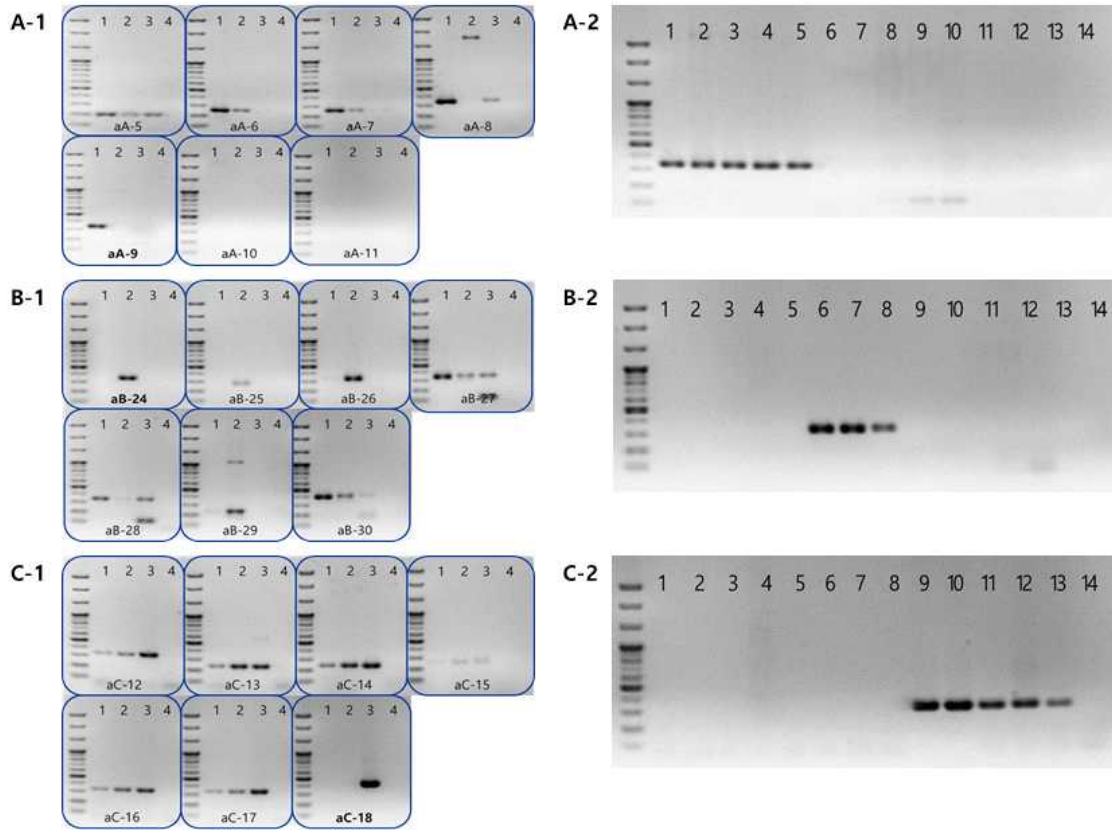


그림 21. PCR results (A-1, B-1, and C-1) with the designed primers specific to each aA, aB, aC type with plasmids in which CP gene were cloned. Lane 1; 25-3 (aA), 2; GS1H5-1 (aB), 3; 29-7 (aC) isolate. The 4th lane was water as negative control. PCR results (A-2, B-2, and C-2) with the selected each primer-9, primer-24, and primer-18 with plasmids in which CP gene were cloned. Lane 1; 25-3 (aA), 2; 25-4 (aA), 3; 29-1 (aA), 4; 31-2 (aA), 5; 75-2 (aA), 6; GS1H5-1 (aB), 7; GS1H5-2 (aB), 8; GS1H6-1 (aB), 9; 27-1 (aC), 10; 28-2 (aC), 11; 29-7 (aC), 12; 31-4 (aC), 13; 32-1 (aC), 14; Negative control.

표 7. Type-specific allele primers developed in this study.

Primers	Direction	Tm (° C)	Sequence(5' →3' )
Type aA specific primer	F	59.07	GTG GTC AAT ATG ATC AAR GC
(GA266' F-GA587R)	R	58.65	ATG CAA AGA TCA GTC GTA AC
Type aB specific primer	F	58.53	AGT TCC TAC AAC CTG AAR TC
(GB120F-GB552R)	R	58.23	GAG TTT TGC CTC ATT TTC AC
Type aC specific primer	F	64.34	MCT GGA ACA GAC ACT GGA GG
(GC99' F-GC428' R)	R	64.27	ATR AGC TCC GGG TAC TTG CC

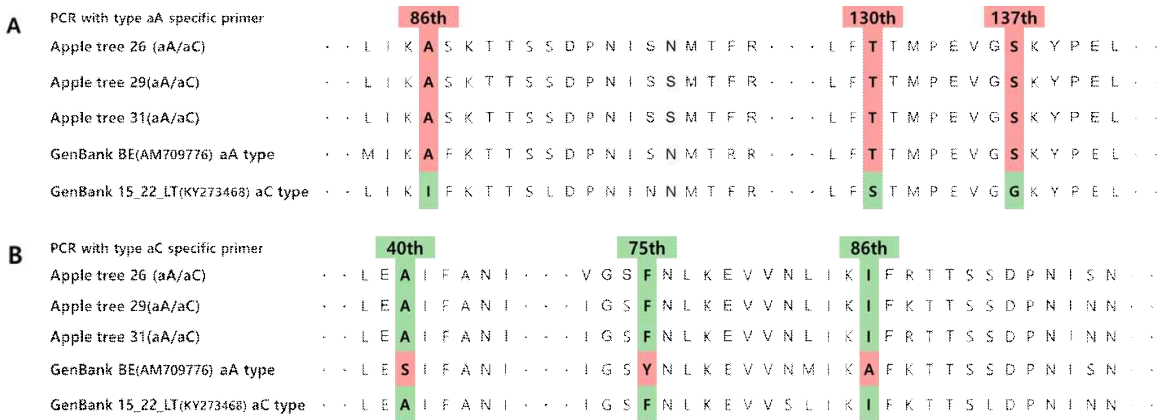


그림 22. Verification of type-specific PCR was performed using RNA isolated aA and aC double infected tree with each type-specific primer (aA specific primer (A) and type aC specific primer (B)) and amplicon were cloned and sequenced. The conserved amino acid sequences of each clone were compared.

마. 주요 사과 바이러스별, 묘목 생산단계별 검정기술 프로토콜화

(1) 주요 바이러스 고효율검정법 확립

(가) 실험 방법

① 시료 채집 및 보관:

- 개화기 사과나무의 싹눈, 싹눈 상단 30cm를 절단하여 conical tube에 저장 .
- 아이스박스에 저온상태로 운반 - 시료 절단시 일회용 단면도를 사용.
- 단면도에 의해 다음 나무가 오염 및 전염되는 일을 방지할 것.
- 시료는 동결건조 및 -70℃에 보관

② 동결건조 및 균질화:

- 채집한 시료를 일회용 단면도를 이용하여 싹눈부터 약 100 mg이 되도록 절단
- 절단 시료를 2 mL tube(Safe-Lock tubes, Eppendorf, Hamburg, Germany)에 넣고  $\phi$  5 mm stainless steel bead(Qiagen, Hilden, Germany) 한 개를 같이 넣고 -70 °C에서 6 mTorr로 7시간 이상 동결건조함.
- 건조된 시료는 TissueLyser2(Qiagen, Hilden, Germany)로 30 Hz, 1분 30초간 마쇄

③ Total RNA 추출:

- GeneAll Ribospin™ Seed/Fruit Kit(GeneAll Biotechnology Co., Ltd., Seoul, Korea)를 이용.
- 추출한 Total RNA는 Nanodrop-2000(Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA)로 정량하여 사용.

④ RT-PCR 및 전기영동:

- T-PCR은 BioFACT™ OneStep RT-PCR kit(BioFACT Co., Ltd, Daejeon, Korea)를 사용하여 5X OneStep RT-PCR reaction buffer(dNTP mixture 10mM each) 3  $\mu$ l, 5X Band Helper™ 3  $\mu$ l, OneStep RT-PCR enzyme mix(0.375 unit/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l, RNA template 500 ng 이하, primer (10 picomole/ $\mu$ l) 각각 1  $\mu$ l, RNase-free water를 추가하여 전체 양을



15 µ로 PCR 반응액을 만들어 one step RT-PCR수행함.

- 사용한 프라이머는 ACLSV, ASPV, ASGV(Menzel et al., 2002), ApMV(Hassan et al., 2006), ASSVd(Lee et al., 2001)(표 3)이었으며, 국립원예특작과학원에서 인과류 바이러스-바이로이드 진단용 유전자 마커개발 어젠다 과제로 제작한 4개 바이러스와 1개 바이로이드가 cloning된 pGEM-T Easy vector를 positive control로 사용함(김 등, 2015, 그림 23.)

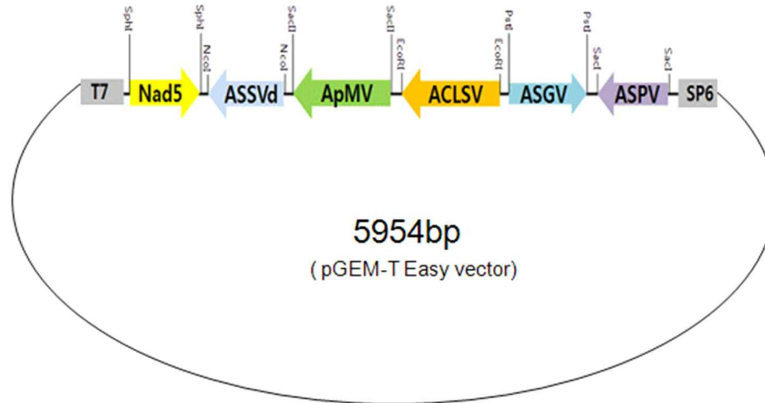


그림 23. Physical map of pGEM-T Easy vector cloned 4 viruses, 1 viroid and Nad5 as positive maker and internal control. This vector developed by NIHHS in 2014. We used this vector as positive control in every virus screening and for sensitivity determination.

- PCR 반응은 cDNA 합성(50°C, 30 min), pre-denaturation(95°C, 15 min) 후 denaturation(95°C, 20 sec), annealing(ACLSV, ASPV, ASGV는 60 °C, ASSVd는 63 °C, ApMV는 66 °C, 40 sec), extension(72°C, 1 min)으로 35 cycle 수행하였고, final-extension(72°C, 5 min)순으로 진행함.
- PCR 결과를 확인하기 위해 1X TAE buffer로 1.5% agarose gel을 만들고 EcoDye™ nucleic staining solution을 권장 사용량에 따라 첨가하였으며, 120V, 60분으로 BIO-RAD POWER PAC 200(BIO-RAD, Hercules, USA)를 이용하여 전기영동한 후, UV-transilluminator를 이용하여 증폭산물을 확인함.

## (2) 기존 검출법과 비교

### (가) 실험 방법

- ① 사과나무로부터 분리한 RNA (CARES-FB1, CARES-F10, CARES-F11, CARES-F12, 충북 농업기술원 내 격리 온실, 임의로 시료를 선정. FB는 ‘후지 후브락스’, F는 ‘후지’ 품종을 뜻함.
- ② ACLSV, ASPV, ASSVd, ApMV 특이 primer와 경북대에서 개발된 동일한 바이러스 및 바이로이드 프라이머(표 8)를 이용함.
- ③ BioFact™ Onestep RT-PCR (BioFACT Co., Ltd, Daejeon, Korea)를 이용하여 PCR수행
- ④ Multiplex RT-PCR 수행 결과와 비교함.

표 8. Three viruses and 1 viroid specific primers developed by Bae (2016).

Virus	Direction	Sequence (5' -3' )	Tm (°C)	Size (bp)	References
ACLSV	F	GCA GAC CCC TTC ATG GAA AGA	55	509	Bae, Y. S. (2016)
	R	CGC AAA GAT CAG TCG TAA CAG A			
ASPV	F	AAG CAT GTC TGG AAC CTC ATG	55	367	
	R	GAT CAA CTT TAC TAA AAA GCA TAA GT			
ASSVd	F	ACG AAG GCC GGT GAG AAA G	55	202	
	R	CCG CTG CGT CAA AGA AAA AG			
ApMV	F	CTC CAA ACA CAA CTT TTG ATG ACT T	55	123	
	R	GTA ACT CAC TCG TTA TCA CGT ACA A			

(나) 실험 결과

- ① Bae (2016)에 의해 개발된 프라이머보다 우수한 검출 효율을 보여줌 (그림 10).
- ② 본 연구 매뉴얼에 의한 바이러스 검정결과(그림 24, A)가 Bae 프라이머 보다 검출감도가 높았음.
- ③ ACLSV, ASPV의 경우에는 Bae 프라이머는 검출하지 못한 반면, 본연구의 매뉴얼에 의한 방법으로는 일부 시료에서 바이러스를 검출하였음(그림 24).
- ④ 본 연구의 매뉴얼은 Multiplex virus detection kit보다도 검출효율이 훨씬 우수하였음(그림 25).
- ⑤ Multiplex virus detection kit에 의해 바이러스 대부분이 검출되었으나 증폭된 DNA 밴드가 약하여 검출효율이 무병종묘를 검정하는데 사용하기에 적합하지 않은 것으로 판단됨.

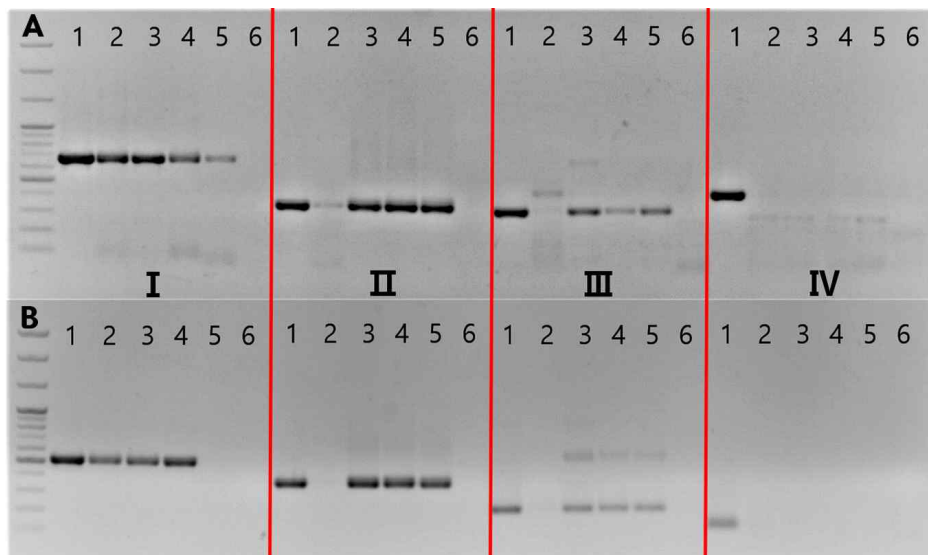


그림 24. Comparison of primer sensitivity using primers used in this report(A) and developed in university (Bae, 2016) (B). RT-PCR was performed using each virus detection primers: I. ACLSV primers, II, ASPV primers, III, ASSVd primers and IV, ApMV primers. Total RNA extracted from trees and virus clone as control were used as PCR template: 1. Positive control (virus vector), 2, CARES-FB1, 3, CARES-F10, 4, CARES-F11, 5, CARES-F12 and 6, Negative control.

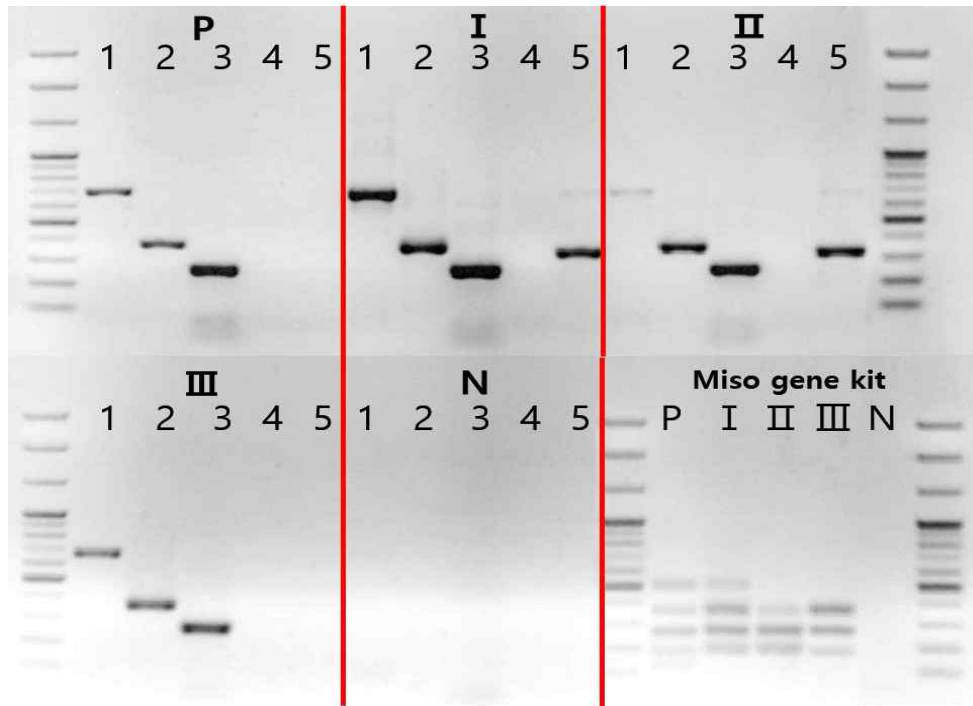


그림 25. Comparison of primer sensitivity using primers used in this report: 1, ACLSV primer (Menzel et al., 2002), 2, ASPV primer (Menzel et al., 2002), 3, ASGV primer (Menzel et al., 2002), 4, ApMV primer (Hassan et al., 2006), 5, ASSVd primer (LEE et al., 2001) and Multiplex virus detection kit (Misogene Inc., Daejeon, Korea). RT-PCR was performed using total RNA extracted from trees and virus vector control: P, Positive control (virus vector), I, CARES-F11, II, CARES-FB46, III, CARES-H55, N, Negative control.

## <제1협동: 사과무병종묘 최적 번식 및 유통 체계 모델화>

### 1. 사과무병종묘 최적 번식 및 유통 체계 모델화

가. 산업현장의 문제점 도출과 개발 기술의 적용

(1) 과수묘목산업의 현장 애로 발굴

① 번식 방법 및 시기

- 사과 묘목의 번식은 접목을 통해 이뤄지기 때문에 숙련된 접사가 필요하며, 대부분 묘목 업체에서 비슷한 시기에 접목을 수행하므로 접사 확보에 많은 어려움이 있음.

② 묘목의 저장

- 대부분의 사과묘목은 3월에 굴취하여 판매되지만, 최근 기후변화로 인해 2월경 판매전 사과묘목에 동해 및 냉해가 발생함.

③ 유통체계

- M.9, M.26 차근 묘목은 실생묘에 비해 뿌리가 매우 연하고 약하기 때문에 굴취, 저장, 공급시 뿌리손상 발생 빈도가 높음.

(2) 애로사항 해결을 위해 적용해야할 기술 선정

① 접목 방법 및 시기 : 겨울철 접사를 통한 접목(손접)을 가위 또는 접목기계를 이용한

접목(기계접)으로 변경하여 인력 및 경제적 비용 부담 문제를 해결하는 방법을 모색.

- ② 묘목의 저장 : 11월 낙엽 후 묘목을 굴취 후 저온 저장하여 묘목의 굴취시기, 저장 방법을 구명함으로써 이른 봄 냉해 및 동해피해 문제 해결방안을 모색.
- ③ 시설 재배용 사과무병종묘 포트재배 후 원활한 유통 체계 마련을 위한 포장 및 운송방법 등을 모색.

#### 나. 사과무병종묘 최적 번식 방법 개발

##### (1) 들접과 기계접의 접목 성공률의 비교

##### (가) 실험 방법

- ① 실험재료 : M.9(대목), ‘후지’ (접수)
- ② 손접 : 바닥에 식재된 대목에 접사가 깎기접으로 접목함.
- ③ 기계접 : 접수와 대목을 틀을 이용하여 잘라낸 후 테이핑함.
- ④ 4월 3일 본토 재식 후 관수함.
- ⑤ 활착률(본토에 재식하여 제대로 성장하는 개체수의 비율), 단위시간당 접목수량, 인건비 조사함.



그림. 손접(깎기접)을 통한 접목묘.





그림. 기계접을 통한 접목묘.

(나) 실험 결과

- ① 기계접은 1인 기준 시간당 112.5개를 접목할 수 있었으며, 손접은 1인 기준 시간당 62.5개를 접목할 수 있었음. 접목 수량면에서 기계접이 손접대비 80% 효율이 높았음.
- ② 인건비 측면에서 기계접은 접목1개당 약 77.7원(여자 인부 인건비 70,000원/900개)으로 손접의 접목 1건당 약300원(접사 인건비 150,000원/500개)과 비교하여 기계접은 손접대비 74%의 인건비를 절약할 수 있었음.
- ③ 접목 후 활장은 기계접의 성공률이 84%, 손접이 86%로 유사하였음.
- ④ 비용 및 인부 고용을 위한 노력들을 감안할 때 기계접을 수행하는 것이 적절한 것으로 판단됨.



접목 후 재식 사진, 좌:기계접, 우:손접      활착사진, 좌:기계접, 우:손접

(2) 접목묘 적정 재식 시기 확인

(가) 실험 방법

- ① 실험재료 : ‘후지’ /M.9 접목묘 처리구별 50개체
- ② 1차 재식시기 : 3월 하순(2017. 3. 31), 4월 상순(2017. 4. 7), 4월 중순(2017. 4. 14)
- ③ 2차 재식시기 : 4월 상순(2018. 4. 3, 2018. 4. 8), 4월 중순(2018. 4. 13, 2018. 4. 21)
- ④ 식재 후 활착을 위해 관수함.
- ⑤ 활착률(본토에 재식하여 제대로 성장하는 개체수의 비율) 조사함.

(나) 실험 결과

- ① 2017년의 활착률 조사결과, 2017년 3월 31일은 77.5%, 2017년 4월 7일은 92.5%, 2017년 4월 14일은 85%로 3월 하순은 야간 저온에 의한 냉해를 받은 것으로 확인됨.

- ② 3월 하순은 야간 저온에 의한 냉해 피해를 감안하여 첫 재식 시기를 4월 상순부터 시작하였음.
- ③ 2018년의 활착률 조사결과, 2018년 4월 3일은 53.3%, 2018년 4월, 13일은 활착율이 각각 96.7, 98.3%, 98.3%로 조사됨.
- ④ 2년간 활착률을 고려할 때, 3월 말~4월 상순은 냉해 피해의 우려가 있어 4월 8일 이후 재식하는 것이 적합한 것으로 판단됨.

다. 사과무병종묘 저장 조건 개발

(1) 사과무병종묘의 적정 굴취 시기

(가) 실험 방법

- ① 실험재료 : ‘후지’ /M.9 접목묘
- ② 굴취 시기 : 2017년 11월 중순, 2018년 3월 중순 (영월, 예천, 청주)
- ③ 11월 굴취된 묘는 저온저장고(4℃ 유지)에서 판매전까지 저장.
- ④ 뿌리는 물에 젖은 톱밥에 덮여있도록 주기적으로 관수. 톱밥은 마르지 않도록 관리.



그림. 좌: 11월 굴취 후 저온저장한 묘목, 우: 3월 중순 굴취예정 묘목.

(나) 실험 결과

- ① 2017년 가을 굴취(11월중순) 후 저온저장고 보관한 묘목은 냉해 피해발생 없음.
- ② 2018년 봄 굴취(3월 중순)한 묘목은 영월 포장 74.3%, 예천 포장 17.1%, 청주 포장 2.9%로 지역별로 냉해가 발생함.



그림. 3월 중순 굴취한 묘목의 냉해 피해 모습.

- ③ 저장 시설 확보 및 유지를 고려하더라도 저온저장고에 묘목을 보관하는 것이 안전하다고 판단됨.

라. 사과무병종묘 유통 체계 개발

(1) 사과무병종묘 저온 저장고 저장을 위한 최적 저장용 배지 확인

(가) 실험 방법

- ① 실험재료 : 2018년 11월 중순 굴취된 ‘후지후브락스’ /M.9 접목묘
- ② 저장용 배지 : 무처리, 톱밥, 원예용상토, 모래를 이용함
- ③ 저장종료 후 가지를 잘라 물에 담가놓은 후 눈이 트이는지 여부를 조사하여 건전묘의 비율을 조사함.
- ④ 각 저장배지는 마르지 않도록 관리함(무처리 제외).



그림. 저온저장고 저장 시 가식용 토양, 좌측부터 무처리, 톱밥, 원예용상토, 모래.



그림. 가식 토양별 묘목 저장 모습. 좌측부터 무처리, 톱밥, 원예용상토, 모래.

(나) 실험 결과

- ① 무처리 및 모래 처리구는 눈이 마르거나 건전하지 못함.



그림. 눈의 활력도 조사. 좌측부터 무처리, 톱밥, 원예용상토, 모래.

- ② 저온 저장시 톱밥 또는 원예용 상토에 가식하는 것이 가장 알맞은 것으로 판단됨.
- ③ 저온 저장시 저장 배지로서 톱밥과 원예용상토 구입 비용을 고려할 때 톱밥이 원예용 상토 대비 50% 저렴함(표).



표. 동일한 수량의 저장배지 구입단가와 단위면적당 구입단가 산출액.

	필요 수량(포)	단가(원)	금액(원)	금액(원)/m <sup>2</sup>
톱밥	25	4,000	100,000	11,111
원예용상토	40	5,000	200,000	22,222

\* 저온저장고 1칸의 넓이: 9m<sup>2</sup>(3m x 3m)

③ 저장용 배지로서 톱밥을 이용하는 것이 적합한 것으로 판단됨.

(2) 사과무병종묘 품종별 저온 저장고 저장을 위한 최적 저장용 배지 확인

(가) 실험 방법

- ① 실험재료 : 2018년 11월 중순 굴취된 ‘후지후브락스’ /M.9 접목묘, ‘자홍’ /M.9 접목묘
- ② 저장용 배지 : 무처리, 톱밥, 원예용상토, 모래
- ③ 저장종료 후 뿌리의 보존상태(마름)와 생존률을 조사함.



그림. 저온저장고 저장 시 가식용 토양, 좌측부터 무처리, 톱밥, 원예용상토, 바닥 톱밥.



그림. ‘후지후브락스’ /M.9 접목묘의 토양별 묘목 저장 모습. 좌측부터 무처리, 톱밥, 원예용상토, 바닥톱밥.





그림. ‘자홍’ /M.9 접목묘의 토양별 묘목 저장 모습. 좌측부터 무처리, 톱밥, 원예용상토, 바닥 톱밥.

(나) 실험 결과

- ① 2020년도 4월 초 묘목 재식 전 처리구별로 뿌리의 상태를 확인한 결과 톱밥 처리구 및 원예용상토 처리구는 뿌리에 수분이 있고, 잔뿌리도 올라오고 있는 상태였으며, 나머지 두 처리구는 뿌리가 말라 있고, 잔뿌리가 나오지 않았음.



그림. ‘후지후브라스’ /M.9 접목묘의 가식 토양별 재식 전 뿌리 모습, 좌측부터 무처리, 톱밥, 원예용상토, 바닥톱밥.



그림. ‘자홍’ /M.9 접목묘의 가식 토양별 재식 전 뿌리 모습, 좌측부터 무처리, 톱밥, 원예용상토, 바닥톱밥.



표. 가식 토양별 저장된 ‘후지후브락스’ /M.9 접목묘의 재식 2주 후 생존율.

처리구	재식 수량	고사 수량	생존율(%)
무처리구	60	60	0
툽밥	60	2	96.7
원예용상토	60	1	98.3
바닥툽밥	60	60	0

표. 가식 토양별 저장된 ‘자홍’ /M.9 접목묘의 재식 2주 후 생존율.

처리구	재식 수량	고사 수량	생존율(%)
무처리구	60	60	0
툽밥	60	1	98.3
원예용상토	60	0	100
바닥툽밥	60	60	0

- ② 두 품종 모두 툽밥 및 원예용상토 처리구가 95% 이상 생존율을 보였음.
- ③ 저온 저장시 저장 배지로서 툽밥과 원예용상토 구입 비용을 고려할 때 툽밥이 저장용 배지로서 적합한 것으로 판단됨.



그림. ‘후지후브락스’ /M.9 접목묘의 가식 토양별 재식 2주 후 사진. 좌측부터 무처리, 툽밥, 원예용상토, 바닥툽밥.



그림. ‘자홍’ /M.9 접목묘의 가식 토양별 재식 2주 후 사진, 좌측부터 무처리, 툽밥, 원예용상토, 바닥툽밥.

라. 사과무병종묘 유통 체계 개발

(1) 사과포트묘 포장 및 운송 방법 개발

(가) 실험 방법

① 순화된 조직배양 대목묘의 재배 (2017년 1세부 포트재배)

- 조직배양묘의 순화처리

- 포트재식 : 용적 1.2L이상
  - 원예용상토 이용
  - 양액재배(1세부 및 3세부의 연구결과 반영)
- ② 조직배양 대목묘를 이용하여 제작된 무병접목묘의 포트재배
- 포트용적 20L 높이 50cm
  - 원예용상토
  - 양액재배(1세부의 연구방법 반영)
- ③ 저온저장고 저장
- 생육종료 후 포트를 제거(단근되지 않도록 관리)
  - 포트를 제거한 후 원예용상토가 마르지 않도록 관리
- ④ 10주를 1묘음으로 유통하는 것이 관행
- 묘목에 따라 1년 성장량의 차이가 있음.
  - 결가지가 10가지 이상인 특묘 기준 다음과 같이 유통.

품종	1톤 화물차	2.5톤 화물차	5톤 화물차(탑)
후지 후브락스/M.9	500주 이하	500~1,500주	1,500주~2,500주
자홍/M.9	400주 이하	400~1,200주	1,200주~2,000주



그림. 1톤 화물차를 이용한 운송.



그림. 2.5톤 화물차를 이용한 운송.



수정전자계산서				송장번호		20200318-10000000-85302512		
공 급 자	품목 번호	종사업종 번호		공 급 처	품목 번호	종사업종 번호		
	상호 (법인명)	중립과수묘목영농조합법 인			상호 (법인명)	성행		
	사업종 류	농업			사업종 류	농업		
	업태	농업	종목		단목, 종묘	업태	종목	
	이메일				이메일			
작성일자	공급가액	수량사유		비고				
2020-03-18	2,850,000	가재사용착오정정		당초 송장번호 (20200318-10000000-84503480)				
월	일	품목	규격	수량	단가	공급가액	비고	
03	18	M9 자종		190	15,000	2,850,000		
합계금액		원금	수표	이음	외상미수금	이 금액을 (영수) 함		
2,850,000								

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

전자계산서				송장번호		20200319-10000000-64891463		
공 급 자	품목 번호	종사업종 번호		공 급 처	품목 번호	종사업종 번호		
	상호 (법인명)	중립과수묘목영농조합법 인			상호 (법인명)	성행		
	사업종 류	농업			사업종 류	농업		
	업태	농업	종목		단목, 종묘	업태	종목	
	이메일				이메일			
작성일자	공급가액	수량사유		비고				
2020-03-19	4,560,000	해당없음						
월	일	품목	규격	수량	단가	공급가액	비고	
03	19	M9 후지 후브라스		300	16,000	4,800,000		
03	19	할인				-240,000		
합계금액		원금	수표	이음	외상미수금	이 금액을 (영수) 함		
4,560,000								

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

‘자흥’ /M.9 접목묘 판매

‘후지후브라스’ /M.9 접목묘 판매

그림. 5톤 화물차를 이용한 운송.

마. 고효율 사과무병종묘 생산 모델화

(1) 시설원에 특화를 위한 사과무병종묘의 산업화 가능성 재확인

- 2019년 생산된 약 700주 M.9, M.26 조직배양 무병묘를 순화
- 4월말 분토 재식 및 관행 재배
- 11월 대목묘 굴취 후 저장



- 2020년 4월 접목묘 재식 완료



그림. 기외 순화중인 조직배양 대목묘.

## <제2협동: 사과 바이러스 무병묘의 생육 단계별 특성검정>

### 1. 사과 바이러스 무병묘의 생육 단계별 특성검정

가. 국내 유통 사과나무 대목의 바이러스 감염 실태 조사

(1) 사과원 바이러스 감염현황 조사

(가) 실험 방법

① 실험재료 : 농가별 품종당 30주(표1)

표 1. Location surveyed for apple viruses and viroids in Korea.

Area	Orchard	Variety	Performance in this study
Gangwon	Jeongseon	A 자홍	Virus status investigation
		B 자홍	
		C 후지, 홍로	
		D 후지, 홍로	
Chungbuk	Danyang	E 후지	
		F 후지, 홍로	
		G 후지	
Chungnam	Yesan	H 후지	
		I 후지, 홍로	
Jeonbuk	Jangsu	J 후지	
		K 자홍	
		L 후지, 홍로	
	Muju	M 후지후브락스, 홍로	
		N 후지후브락스, 자홍	
		O 후지후브락스, 홍로	
		P 후지후브락스, 후지, 자홍	

② 검정대상 : 바이러스 4종(ACLSV, ASPV, ASGV, ApMV), 바이로이드 1종(ASSVd)

③ RNA 추출 : GeneAll의 ribospin total RNA isolation 제품을 이용하여 추출. 제시된 프로토콜에 준하여 추출을 진행함.

④ cDNA합성 및 PCR 증폭 : (주)Intron의 ONE-STEP RT-PCR Premix kit 제품을 이용하여



cDNA 합성 및 PCR 증폭을 수행하였으며, 이용된 프라이머와 PCR 조건은 표를 참고하였음.

표 2. List of PCR primers used in this study.

Primers	Sequence (5' -3' )	Product size (bp)	References
ACLSV-F	TTC ATG GAA AGA CAG GGG CAA	677	Menzel et al., 2002
ACLSV-R	AAG TCT ACA GGC TAT TTA TTA TAA GTC TAA		
ApMV-F	CGT AGA GGA GGA CAG CTT GG	450	Hassan et al., 2006
ApMV-R	CCG GTG GTA ACT CAC TCG TT		
ASPV-F	ATG TGT GGA ACC TCA TGC TGC AA	370	Menzel et al., 2002
ASPV-R	TTG GGA TCA ACT TTA CTA AAA AGC ATA A		
ASGV-F	GCC ACT TCT AGG CAG AAC TCT TTG AA	273	Menzel et al., 2002
ASGV-R	AAC CCC TTT TTG TCC TTC AGT ACG AA		
ASSVd-F	CCC GGT AAA CAC CGT GCG GT	331	Lee et al., 2001
ASSVd-R	ACC GCG AAA CAC CTA TTG TG		

표 3. PCR condition for synthesis of cDNA and then PCR amplification.

Steps	ACLSV	ApMV	ASPV	ASGV	ASSVd	Cycle
cDNA synthesis			55°C for 30 min.			1
Initial denaturation			95°C for 10 min.			1
Denaturation			95°C for 40 sec.			
Annealing	60°C for 40 sec.	66°C for 40 sec.	60°C for 40 sec.	60°C for 40 sec.	63°C for 40 sec.	35
Extension			72°C for 40 sec.			
Final extension			72°C for 5 min.			1

(나) 실험 결과

① 사과원 바이러스 감염현황

- 강원, 충북, 충남, 전북의 16개 사과원을 대상으로 바이러스 및 바이로이드 5종의 감염 조사 결과, 전체 바이러스 및 바이로이드 감염율은 97.3%로 대부분의 사과나무가 감염되어 있었으며, 검출되지 않은 사과나무의 비율은 2.7% 인 것으로 나타났다(표4, 5).
- 바이러스 및 바이로이드 종류별 감염율은 ASGV 93.4%, ASPV 85.7%, ACLSV 59.0%, ASSVd 6.7%, ApMV 3.6% 순으로 ASGV가 가장 높았으며, ApMV가 가장 낮았음.
- 바이러스 및 바이로이드에 단독 또는 복합 감염 조사 결과, 바이러스 및 바이로이드 단 1종만 감염된 비율은 12.4%였으며, 2종 이상 복합 감염 된 비율은 84.8%로 복합 감염의 비율이 단독 감염에 비해 약 7배 높았음(표 6).

② Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV)

- ACLSV의 전국 감염율은 59.0%였으며, 지역별로 보면 충북 단양지역이 78.3%로 가장 높았고, 전북 무주지역이 44.5%로 가장 낮은 감염율을 보였음.
- 과원별로 보면 100% 감염 2곳 이었으며, 6.7%의 감염율을 보인 사과원이 가장 낮은 것으로 조사되어 사과원 별로 감염율의 편차가 심하였음.
- 동일 사과원 내에서 ‘홍로’ 감염율이 높았음(표 5).
- ACLSV는 1959년 미국의 사과나무에서 처음으로 보고되었으며(Burnt 등, 1996), 사과, 복숭아, 배, 자두, 체리, 살구 등을 감염시킨다(Lister, 1970; Németh, 1986).
- ACLSV에 감염되면 대부분의 사과 품종은 30~40% 손실이 발생하며 감염율은 80~100% 까지 보고됨 (Nemchinov 등, 1995; Wu 등, 1998; Cembali 등, 2003).
- 조사결과 ACLSV의 전국 감염율은 59.0%로 80~100%에 미치지 못하지만 일부 사과원의 감염율이 80% 이상으로 조사되어 향후 감염율이 더욱 더 높아질 가능성이 있는 것으로 판단됨.
- ACLSV에 의한 ‘홍로’ 과실 특성을 비교한 결과 뚜렷한 차이를 보이지 않았음
- 대부분의 사과 품종에서 증상이 잘 나타나지 않으며, 바이러스의 발현은 식물의 종 등에서 좌우된다(Németh, 1986)는 결과와 동일하였으며, 특히 ‘홍로’의 경우 ACLSV 증상이 나타나지 않는 품종 중에 하나인 것으로 판단됨.

### ③ Apple stem pitting virus (ASPV)

- ASPV의 감염 현황 조사 결과(표 5), 전체 감염율은 85.7% 였고, 충북 단양지역의 경우 99.7%로 감염율이 가장 높았으며, 전북 무주지역은 69.9%로 감염율이 가장 낮았음.
- 지역별로 보면 전체 16개 사과원 중 7개 사과원은 ASPV에 100% 감염이 되어 있는 것을 확인 할 수 있었으며, 나머지 과원들도 절반이 넘게 감염이 되어 ASPV의 감염율이 전국적으로 매우 심한 것으로 조사됨.
- 특히 ASPV는 ACLSV와 ASGV와 함께 복합 감염되는 경우가 많은데(Leone et al., 1998; Wang et al., 2010; Ji et al., 2013), 본 연구에서도 3종의 바이러스가 복합 감염된 경우는 56.2%로 조사 주수의 절반 이상이 ASPV, ACLSV, ASGV 3종에 복합 감염됨.
- ASPV에 의한 ‘홍로’ 품종의 과실 특성은 검출되지 않은 사과나무와 비교하여 차이가 없는 것으로 나타났는데, 이는 ASPV는 일반적인 사과 품종의 경우 감염이 되어도 증상이 잘 나타나지 않지만 감수성인 지표식물에서는 바이러스의 증상이 발현된다(Yanase et al., 1990)는 결과와 비교해 볼 때 ‘홍로’는 ASPV의 증상이 나타나지 않는 품종 중에 하나인 것으로 판단됨.

### ④ Apple stem grooving virus (ASGV)

- ASGV는 본 연구의 조사 대상인 바이러스 및 바이로드 5종 중에서 가장 높은 감염율을 보인 바이러스로 전체 감염율은 93.4%였음(표 5).
- 특히 조사 대상 16개 사과원 중 7개 사과원은 100% 감염율을 보였으며, 100%가 아닌 사과원도 최소 감염율이 50%가 넘어 전국적으로 이미 많은 사과나무가 감염되어 있는 것으로 판단됨.
- ASGV에 의한 ‘홍로’ 품종의 과실 특성은 검출되지 않은 사과나무와 큰 차이가 없

는 것으로 조사됨. ASGV는 많은 사과 품종에서 증상을 보이지 않으나, 종종 ACLSV, ASPV와 함께 발생하여 생산량 및 경제적 손실을 일으킨다(Campbell, 1963)는 결과와 비교하면 ‘홍로’ 품종은 ASGV의 증상이 나타나지 않는 품종 중 하나로 판단됨.

⑤ Apple mosaic virus (ApMV)

- ApMV는 전체 감염율은 3.6%로 본 연구의 대상 바이러스 및 바이로이드 중 감염율이 가장 낮았음 (표 5). 16개 사과원 중 10개 과원의 감염율은 0%인 것으로 나타났으며, 무주의 P 농가의 ‘자홍’ 품종을 제외하면 사과원 당 감염율이 10%를 넘지 않았음.
- Petzik and Lenz (2011)에 따르면 ApMV는 종종 ACLSV와 ASPV와 함께 발생을 하지만 감염 빈도는 훨씬 적었다고 보고하였는데 본 연구에서도 ApMV가 ACLSV와 ASPV와 복합 감염된 경우가 많았으며, 감염빈도는 ACLSV, ASPV와 보다 더 적었음.
- ApMV는 대부분의 사과 품종에서 증상을 보이지 않으며, 일부 감수성 품종에서 잎의 엽맥을 따라 열은 노란 반점이 불규칙적으로 반점이 생기고, 조기 낙엽 되기도 한다고 보고되어 있는데(Fulton, 1972; Svoboda and Polák, 2010; Dursunoglu and Ertunc, 2008), 전북 무주의 P 농가에서 ‘자홍’ 품종의 ApMV 감염주를 대상으로 달관조사한 결과 증상이 나타나지 않았음.

표 4. Apple virus and viroid infection in Gangwon, Chungbuk, Chungnam, Jeonbuk.

Area	Ochard	Variety	ACLSV	ASPV	ASGV	ApMV	ASSVd	No <sup>z</sup>
Gangwon Jeongseon	A	자홍	○	○	○	-	-	23
			○	○	-	-	-	1
			○	○	○	○	-	1
			-	○	-	-	-	1
			-	○	○	-	-	4
	B	자홍	○	○	○	-	-	29
			○	○	○	-	○	1
			○	○	○	-	-	9
			○	○	○	○	-	1
			-	○	○	-	-	19
	C	후지	-	○	○	-	○	1
			-	○	○	-	-	1
			○	○	○	-	-	29
			-	○	○	-	-	1
			○	○	○	-	○	11
	D	후지	○	○	-	-	-	1
			○	○	○	-	-	2
			-	○	○	-	-	7
			-	○	○	-	○	9
			-	-	○	○	○	1
홍로		○	-	○	-	-	1	
		○	○	-	-	-	1	
		○	○	○	-	-	7	
		○	○	○	-	○	8	
		-	-	○	-	-	7	
-	-	○	-	○	1			
-	○	○	-	-	2			
-	-	-	-	-	2			

			-	0	0	-	-	2		
	E	후지	0	0	0	-	-	26		
			0	0	0	0	-	2		
Chungbuk	Danyang	후지	0	0	0	-	-	25		
			-	0	0	-	-	5		
			0	0	0	-	-	11		
			0	0	0	-	0	6		
			-	0	0	-	-	10		
			F	홍로	-	0	0	-	0	2
		0			-	0	-	-	1	
		0			0	0	-	-	23	
		-			0	0	-	-	7	
		-			0	0	-	-	6	
	H	후지	0	0	-	-	1			
			0	0	0	-	-	23		
			0	0	0	-	-	9		
		후지	-	0	0	-	-	21		
Chungnam	Yesan	I	0	0	0	-	-	26		
			-	0	-	-	-	1		
			-	0	0	-	-	3		
			-	0	0	-	-	17		
			0	0	0	-	-	3		
			J	후지	0	0	0	0	-	4
		-			-	0	-	-	4	
		-			-	0	0	-	1	
		-			0	0	0	-	1	
		0			0	0	-	-	11	
			-	-	0	-	5			
	K	자흥	-	0	-	-	-	1		
-			0	0	-	-	5			
-			-	-	-	-	8			
0			0	0	-	-	27			
-			0	0	-	-	3			
	L	홍로	0	0	0	-	-	30		
-			-	0	-	-	7			
0			-	-	-	-	2			
0			0	0	-	-	2			
0			0	-	-	-	1			
	Jeonbuk	M	후지후브락스	0	0	-	-	1		
-				0	-	-	-	4		
-				0	0	-	-	7		
-				-	-	-	-	6		
0				0	-	-	-	1		
			Jangsu		0	0	0	-	-	7
-					0	-	-	-	1	
-					0	0	-	-	7	
-					0	-	-	-	1	
-					0	0	-	-	20	
	Muju	N	후지후브락스	-	-	-	-	1		
0				0	0	-	-	6		
-				-	0	-	-	10		
-				0	0	-	-	3		
-				0	0	-	-	11		
-			-	-	-	-	0			
			자흥		0	0	0	-	-	1
0					-	-	-	-	3	

		0	0	0	-	-	3
		0	-	0	-	-	1
		0	-	0	0	-	1
		0	0	-	-	-	1
		0	0	0	0	-	1
		-	-	-	0	-	1
		-	-	0	-	-	8
		-	0	-	-	-	4
		-	0	0	-	-	2
		-	-	-	-	-	4
		-	0	0	-	-	1
		0	-	0	-	-	2
	후지후브락스	-	-	0	-	-	16
		-	0	-	-	-	1
		-	0	0	-	-	10
		0	0	0	-	-	24
	홍로	0	0	0	0	-	1
		-	0	0	-	-	5
		-	0	0	-	-	1
		0	0	0	-	-	15
		0	0	0	0	-	1
		-	0	0	-	-	13
		-	0	0	-	-	1
		0	-	0	-	-	1
	후지후브락스	0	0	0	-	-	4
		-	-	0	-	-	17
		-	0	0	-	-	7
		0	0	0	-	-	8
	자홍	0	0	0	0	-	20
		-	0	0	-	-	1

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

<sup>a</sup>The number of infected tree.

표 5. Infection rate of virus and viroid infecting apple tree.

Area	Orchard	Variety	infection rate(%)						
			ACLSV	ASPV	ASGV	ApMV	ASSVd	ND	
GangwonJeongseon	A	자홍	83.3	100	93.3	0	3.3	0	
	B	자홍	100	100	96.7	0	3.3	0	
	C	후지	33.3	100	100	3.3	3.3	0	
		홍로	96.7	100	100	0	0	0	
	D	후지	46.7	100	96.7	0	66.7	0	
		홍로	60.0	60.0	90.0	3.3	40.0	6.7	
	Average			70.0	93.3	96.1	1.1	19.4	1.1
Chungbuk	Danyang	E	후지	93.3	100	100	6.7	0	0
		F	후지	83.3	100	100	0	0	0
	홍로		60.0	96.7	100	0	26.7	0	
	G	후지	76.7	100	100	0	0	0	
	Average			78.3	99.7	100	1.7	6.7	0
Chungnam	Yesan	H	후지	80.0	100	96.7	0	0	0
		I	후지	30.0	100	100	0	0	0
	홍로		86.7	100	96.7	0	0	0	
	J	후지	23.3	83.3	100	0	20.0	0	
	Average			55.0	95.8	98.3	0	5.0	0
Jeonbuk	Jangsu	K	자홍	36.7	56.7	70.0	0	0	23.3
		L	후지	90.0	100	100	0	0	0
			홍로	100	100	100	0	0	0
	M	후지후브락스	16.7	46.7	56.7	0	0	20.0	
		홍로	26.7	96.7	90.0	0	0	3.3	
	Average			53.7	79.9	83.2	0	0	10.1
Muju	N	후지후브락스	20.0	66.7	90.0	0	0	0	
		자홍	36.7	36.7	53.3	10.0	3.3	13.3	
	O	후지후브락스	6.7	40.0	96.7	0	0	0	
		홍로	83.3	100	100	3.3	3.3	0	
	P	후지	53.3	100	100	3.3	3.3	0	
		후지후브락스	16.7	43.3	100	0	0	0	
		자홍	96.6	100	100	69.0	0	0	
Average			44.5	69.9	91.9	12.0	1.4	1.9	
total average				59.0	85.7	93.4	3.6	6.7	2.7

ACLSV, Apple chlorotic leaf spot virus; ASPV, Apple stem pitting virus; ASGV, Apple stem grooving virus; ApMV, Apple mosaic virus; ASSVd, Apple scar skin viroid; ND, not detected.



⑥ 2-2-6 Apple scar skin viroid (ASSVd)

- ASSVd의 전국 감염율은 6.7%은 대부분의 사과원에서 감염율이 0%였으나, 정선의 D 농가의 경우 ‘후지’ 66.7%, ‘홍로’ 40.0%로 감염율이 매우 높았음(표 5). ASSVd에게 유리한 조건이 갖추어지면 언제든지 높은 전염력을 가질 수 있을 것으로 판단됨에 따라 ASSVd의 전염력에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 판단됨.
- ASSVd는 기주의 잎과 과실에 모자이크, 기형 등 병징을 유발 시켜 생산량 감소로 이어지는데(Hashimoto와 Koganezawa, 1987; Zhu, 1995), 본 연구에서도 증상이 나타나지 않았던 ACLSV, ASPV, ASGV와 달리 과실의 무게와 크기가 감소하고, 경도는 증가하였음(표 7).
- 과실 표면에 얼룩덜룩한 반점과 내부 과육에 코르크화 증상이 발생하였다(그림 1). 이는 결국 상품성 하락으로 경제적 손실을 끼치게 되어 매우 본 연구에서 수행된 바이러스 4종 및 바이로이드 1종 중 가장 치명적인 병이라 판단됨.



그림 1. Viroid-infect(left) and viroid-free(right) of apple ‘홍로’ .

표 6. Virus single and mixed infection rate.

	single	mixed	Not detected
Infection rate(%)	12.4	84.8	2.7

표 7. Changes of fruit characteristic of ‘Hongro’ by virus.

Virus	Weight (g)	Width (mm)	Length (mm)	Hardness (kg/Ø8mm)	Sugar content (° Brix)
ACLSV	220.2±27.6 a <sup>2</sup>	79.8±3.9 ab	72.8±2.9 ab	4.2±0.3 b	16.6±0.8 a
ASPV	224.4±20.6 a	82.5±4.5 a	72.1±3.7 ab	4.1±0.4 b	16.7±0.7 a
ASGV	213.3±27.3 a	79.2±4.5 b	70.6±5.1 bc	4.2±0.4 b	16.4±1.1 a
ACLSV, ASPV, ASGV	215.5±33.5 a	81.4±5.0 ab	71.2±3.9 abc	4.1±0.3 b	16.2±0.8 a

ASSVd	195.1±32.5	b	75.1±3.8	c	68.7±3.9	c	4.5±0.3	a	16.6±1.7	a
Not detected	231.3±31.1	a	81.9±5.0	ab	73.8±5.1	a	4.2±0.3	b	16.6±0.8	a

<sup>2</sup>Means within column with the same letter are not significantly different at p=0.05 according to Duncan' s multiple rage tests.

### ㉔ 8. Changes of leaf characteristic of 'Fuji Fubrax' by virus.

Virus	10 leaves weight (g)	leaf length (mm)	leaf width (mm)	petiole length (mm)	petiole diameter (mm)	leaf thickness (mm)	leaf area (cm <sup>2</sup> )
ACLSV	7.4 ab	82.9 ab	52.6 b	25.4 a	1.33 ab	0.169 de	33.1 a
ACLSV, ASGV	5.9 bc	69.8 e	43.7 ef	24.2 a	1.31 ab	0.236 a	22.5 d
ACLSV, ASPV, ASGV	6.7 b	79.3 abc	48.9 bc	31.6 a	1.32 ab	0.197 c	28.4 b
ACLSV, ASPV, ASGV, ASSVd	6.4 bc	76.2 bcd	48.4 bcd	25.9 a	1.28 ab	0.164 c	28.0 bc
ACLSV, ASPV, ASGV, ApMV	5.9 bc	77.3 abcd	46.9 cde	27.4 a	1.24 b	0.188 cd	25.3 cd
ASGV	6.8 b	75.7 d	48.6 bc	24.6 a	1.35 ab	0.216 b	27.5 bc
ASGV, ApMV	5.2 bc	71.9 de	44.3 def	24.6 a	1.03 c	0.164 de	23.9 cd
ApMV	4.1 c	68.1 e	42.0 f	21.7 a	0.81 d	0.154 e	20.8 d
ASPV, ASGV	9.4 a	80.1 ab	47.4 cd	29.0 a	1.26 b	0.200 c	27.9 bc
ASPV, ASGV, ApMV	6.4 bc	84.5 a	57.7 a	29.9 a	1.43 a	0.187 cd	36.7 a
ASPV, ASGV, ASSVd	5.9 bc	75.7 cd	48.1 cd	26.0 a	1.31 ab	0.187 cd	26.0 c

### ㉔ 9. Changes of leaf characteristic of 'Jahong' by virus.

Virus	10 leaves weight (g)	leaf length (mm)	leaf width (mm)	petiole length (mm)	petiole diameter (mm)	leaf thickness (mm)	leaf area (cm <sup>2</sup> )
ACLSV, ASGV	8.46 ab	83.8 ab	45.9 c	30.8 a	1.27 bc	0.235 b	26.6 bc
ACLSV, ASPV	7.01 b	75.7 c	46.8 c	28.3 abc	1.21 c	0.230 b	24.3 c
ACLSV, ASPV, ASGV	7.95 ab	83.8 ab	49.1 abc	28.6 abc	1.31 b	0.229 b	28.9 b
ACLSV, ASPV, ASGV, ASSVd	8.34 ab	88.6 a	52.7 a	26.7 c	1.29 bc	0.209 b	34.3 a
ACLSV, ASPV, ASSVd	8.35 ab	84.4 ab	52.1 ab	30.1 ab	1.46 a	0.230 b	28.9 b
ASGV	8.52 a	82.1 b	46.3 c	26.8 c	1.60 a	0.264 a	26.8 b
ASPV, ASGV	8.79 a	85.3 ab	48.3 bc	27.7 bc	1.47 a	0.275 a	28.5 b

표 10. Characteristics for the nursery trees of apple cultivars used.

Manufacturer identity (ID)	Location	Root stocks	Apple cultivars for scion	Purchase year	Purchase nation
A	Chungbuk Okcheon Dongi	M.26 double grafting	홍로, 후지	2000	Italia
B	Chungbuk Okcheon Iwon-1	M.9 own root	홍로, 후지	1995	Italia
C	Chungbuk Okcheon Iwon-2	M.9 own root	홍로, Mishima 후지	1995	Italia
D	Chungbuk Okcheon Iwon-3	M.26 double grafting	홍로, 후지	2000	Italia
E	Chungnam Cheonan Seonghwan	M.9 own root	홍로, 후지	2000	Italia
F	Jeonbuk Namwon Josan	M.9 own root	홍로, 후지	2000	Italia
G	Gyeongbuk Yeongju Bonghyeon-1	M.9 own root	홍로, Myanmar 후지	2000	Italia
H	Gyeongbuk Yeongju Bonghyeon-2	M.26 own root	홍로, Myanmar 후지	1995	Italia
I	Gyeongbuk Yeongju Bonghyeon-3	M.9 own root	홍로	1995	Italia
J	Gyeongbuk Yeongju Buseok	M.26 own root	홍로, 후지	2000	Italia
K	Gyeongbuk Mungyeong Mungyeong	M.9 own root	홍로, Miyabi 후지	1999	Italia
L	Gyeongbuk Mungyeong Yeongsun	M.9 own root	홍로, 후지	1995	Italia
M	Gyeongbuk Gyeongsan Hayang	M.9 own root	홍로, 후지	1995	Japan
N	Gyeongbuk Gyeongsan Jillyang	M.9 own root	홍로, 후지	2000	Japan
O	Gyeongbuk Uiseong Bian	M.9 own root	홍로, 후지	1999	Italia
P	Gyeongbuk Cheongsong Hyeondong	M.9 own root	홍로, 미얀마 후지	1995	Italia

가. 국내 유통 사과나무 대목의 바이러스 감염 실태 조사

(2) 국내 유통 사과나무 묘목 바이러스 감염률 조사

(가) 실험 방법

- ① 실험재료 : 사과 묘목 생산 농원 16개소 (충북 4, 충남 1, 전북 1, 경북 10)에서 구입한 묘목 소질을 문답식으로 조사함.

표 11. Characteristics for the nursery trees of apple cultivars used.

Manufacturer identity (ID)	Location	Root stocks	Apple cultivars for scion	Purchase year	Purchase nation
A	Chungbuk Okcheon Dongi	M.26 double grafting	홍로, 후지	2000	Italia
B	Chungbuk Okcheon Iwon-1	M.9 own root	홍로, 후지	1995	Italia
C	Chungbuk Okcheon Iwon-2	M.9 own root	홍로, Mishima 후지	1995	Italia
D	Chungbuk Okcheon Iwon-3	M.26 double grafting	홍로, 후지	2000	Italia
E	Chungnam Cheonan Seonghwan	M.9 own root	홍로, 후지	2000	Italia
F	Jeonbuk Namwon Josan	M.9 own root	홍로, 후지	2000	Italia
G	Gyeongbuk Yeongju Bonghyeon-1	M.9 own root	홍로, Myanmar 후지	2000	Italia
H	Gyeongbuk Yeongju Bonghyeon-2	M.26 own root	홍로, Myanmar 후지	1995	Italia
I	Gyeongbuk Yeongju Bonghyeon-3	M.9 own root	홍로	1995	Italia
J	Gyeongbuk Yeongju Buseok	M.26 own root	홍로, 후지	2000	Italia
K	Gyeongbuk Mungyeong Mungyeong	M.9 own root	홍로, Miyabi 후지	1999	Italia
L	Gyeongbuk Mungyeong Yeongsun	M.9 own root	홍로, 후지	1995	Italia
M	Gyeongbuk Gyeongsan Hayang	M.9 own root	홍로, 후지	1995	Japan
N	Gyeongbuk Gyeongsan Jillyang	M.9 own root	홍로, 후지	2000	Japan
O	Gyeongbuk Uiseong Bian	M.9 own root	홍로, 후지	1999	Italia
P	Gyeongbuk Cheongsong Hyeondong	M.9 own root	홍로, Myanmar 후지	1995	Italia

- ② ‘홍로’, ‘후지’ 등의 아조변이 품종을 포함하여 1년생 묘목을 각 5주 구입하여 감염 여부를 검정하였음.
- ③ RNA 추출 : GeneAll의 ribospin total RNA isolation 제품을 이용하여 추출. 제시된 프로토콜에 준하여 추출을 진행함.
- ④ cDNA합성 및 PCR 증폭: (주)Intron의 ONE-STEP RT-PCR Premix kit 제품을 이용하여 cDNA 합성 및 PCR 증폭을 수행하였으며, 이용된 프라이머와 PCR 조건은 표를 참고하였음.

(나) 실험 결과

① 사과 품종 ‘홍로’의 바이러스 감염도

- 전국 16개 농원에서 구입한 사과 품종 ‘홍로’에 대한 바이러스 검정 결과는 표 11에 정리하였음.
- 접수 부분에 대한 바이러스 감염 정도는 차이가 있었으나, A, D-F, H-P 13개 농원의 사과 묘목에는 ACLSV, ASPV 및 ASGV가, B, C 및 G 3개 농원의 묘목에는 ACLSV와 ASGV가 복합 감염됨.
- ACLSV와 ASGV는 모든 농원의 묘목에 100% 감염되어 있었고, ApMV와 ASSVd는 전혀 감염되어 있지 않았으며, ASPV의 감염률은 81.3%였음.
- 대목에 대해서는 A, D-F, H, J, K, M, O, P 10개 농원의 대목에 ACLSV, ASPV 및 ASGV에 의해 복합 감염되어 있었고, B와 C 및 G 3개 농원의 대목에는 ACLSV와 ASGV에, I 농원의 대목에는 ApMV, ASPV 및 ASGV에, L 농원의 대목에는 ACLSV, ApMV, ASPV 및 ASGV에, N 농원의 대목에는 ASPV, ASGV 및 ASSVd에 복합 감염된 상태임.
- 대목에서 ACLSV와 ApMV는 각각 87.5%와 12.5%가 감염되었고 ASPV와 ASGV는 각각 81.3%와 100%가 감염되었으며, 바이로이드인 ASSVd도 N 농원에서 약하게 감염됨.
- Kim et al. (2004)은 사과 ‘홍로’ 품종에서 소과 증상이 평균 12% 정도이고 주요 원인인 ACLSV가 100% 검출되었다고 한 것처럼 각 농원에서 생산한 접수에서 ACLSV 감염률이 100%인 것과 일치하여 ACLSV의 감염 경로가 대부분 구입한 묘목에서 유래한다고 판단됨.

② ‘후지’ 및 아조변이 품종에서 바이러스 감염

- 전국 15개 농원에서 구입한 사과 ‘후지’ 및 ‘후지’ 아조변이 품종에 대한 바이러스 감염 여부는 표 12에 정리함.

표 12. Infection degree of viruses on the nursery trees of both apple cultivars ‘후지’ and the bud mutation of ‘후지’ by RT-PCR.

Manufacturer ID	Classification	ACLSV	ApMV	ASPV	ASGV	ASSVd
A	Scion	- <sup>z</sup>	-	+	+	-
	Root	+	-	+	+	-
B	Scion	+	-	-	+	-
	Root	-	-	-	+	-
C	Scion	+	-	+	+	-
	Root	+	-	+	+	-

D	Scion	+	-	+	+	-
	Root	+	-	+	+	-
E	Scion	+	-	+	+	-
	Root	+	-	+	+	-
F	Scion	+	-	+	+	-
	Root	+	-	+	+	-
G	Scion	+	-	+	+	-
	Root	+	+	+	+	-
H	Scion	+	-	+	+	-
	Root	+	-	+	+	-
I	Scion	----- nt <sup>y</sup>				
	Root	----- nt				
J	Scion	+	-	+	+	-
	Root	-	-	+	-	-
K	Scion	+	-	+	+	-
	Root	+	-	+	+	-
L	Scion	+	-	+	+	-
	Root	+	-	+	+	-
M	Scion	+	-	+	+	-
	Root	+	-	+	+	-
N	Scion	-	-	-	+	-
	Root	+	-	+	+	-
O	Scion	+	-	+	+	-
	Root	+	-	+	+	-
P	Scion	+	-	+	+	-
	Root	+	-	+	+	-
Ratio of virus infection by scion (%)		86.7	0	86.7	100	0
Ratio of virus infection by root (%)		86.7	6.7	93.3	93.3	0

- 접수 부분에 대한 바이러스 감염은 감염 정도는 차이가 있었으나, A 농원은 ASPV와 ASGV에 복합 감염되었고 B 농원은 ACLSV와 ASGV에, C-H, J-M, O, P 12개 농원은 ACLSV, ASPV 및 ASGV에 복합 감염되었으며, N 농원은 ASGV에 단독 감염됨.
- 접수에 서 ACLSV, ASPV 및 ASGV에 의한 감염률은 각각 86.7%, 86.7% 및 100%를 보였고 ApMV와 ASSVd에 개별 감염된 농원은 없음.
- 대목에서 ACLSV 와 ApMV에 의한 감염률은 각각 86.7%와 6.7%이었고 ASPV와 ASGV에 의한 감염률은 모두 93.3%이었으며, ASSVd에 감염된 농원은 없음.
- Ho et al. (2010)은 배에서 ASPV와 ASGV 또는 ACLSV, SAPV, ASGV에 의한 복합 감염률이 22.7%이었다고 보고한 것처럼 ACLSV, SAPV, ASGV에 의한 3중 복합 감염률이 81.3-93.3%로 높은편임.
- Han et al. (2015)은 충북, 충남, 경북에 사과원에서 ACLSV와 ASGV에 의한 2중 복합 감염이 3.1%라 하였고 Park 등(2006)은 19.6%라고 하였는데, 조사한 묘목에서는 이들 복합 감염률은 100%이어서, 농가에 더 많은 감염 및 손실을 초래할 가능성이 높은 것으로 보임.
- Kwon et al. (2002)에 따르면, 사과원에서 가장 심각 한 피해를 야기하는 ASSVd가 경북과 전북에서 발견되었고 점 차적으로 확산될 것이라고 하였는데, N 농원에서

대목에 대한 ASSVd 감염은 전국적으로 판매되기 때문에 크게 문제가 될 가능성이 있음.

- 동일한 농원에서 구입한 사과 ‘홍로’와 ‘후지’ 및 ‘후지’ 아조변이 품종 묘목에 대해 검사한 결과, 사용된 대목 간, 감염된 바이러스 종류에 차이가 있었으며, 이는 대목에서 감염된 바이러스 종류 차이는 대목 포장 관리, 부족한 대목의 다른 농원에서의 구입, 잠복한 바이러스의 발현 등이 원인으로 판단됨.

#### 나. 바이러스 접종 묘목과 수체 생육량 비교

##### (1) 바이러스 감염에 의한 잎 특성 변화

- 바이러스 감염별 잎의 특성을 조사한 결과(표 8, 표9), ‘후브락스’의 경우 ApMV가 가장 낮았고, ASPV, ASGV가 엽의 무게가 가장 높았음. 엽면적은 ApMV가 가장 작았고, ASPV, ASGV, ApMV가 가장 큰 것으로 나타났다. 엽병의 경우 길이는 바이러스 감염별 차이가 없었으며, 직경은 ASPV, ASGV, ApMV가 가장 컸으며, ApMV가 가장 작은 것으로 조사됨.
- ‘자홍’ 품종의 경우 엽의 무게는 ACLSV, ASPV가 가장 낮았고, ASPV, ASGV가 가장 높은 것으로 조사되었으며, 엽면적은 ACLSV, ASPV가 가장 작았고, ACLSV, ASPV, ASGV, ASSVd가 가장 큰 것으로 조사되었다. 엽병의 길이는 ACLSV, ASPV, ASGV, ASSVd가 가장 짧았고 ACLSV, ASGV가 가장 길었으며, 직경은 ACLSV, ASPV가 가장 작고 ASGV가 가장 큰 것으로 조사됨.
- 이와 같은 결과를 통해 동일한 바이러스가 여러 사과나무에 복합 감염되어 있는 것을 알 수 있고, 동일한 바이러스가 여러 처리구에 감염되어 있을 경우 그 바이러스가 같은 영향을 끼치고 있다면 잎의 특성에서 바이러스 감염에 따른 처리구간 비슷한 양상을 보여야 하지만 그렇지 않았음.
- 따라서 사과 재배에 있어 실제 바이러스 증상이 외부에 발현되지 않는 한 단순히 표준하고 있는 것만으로는 사과 생육에 영향을 미치지 않는 것으로 판단 됨.

##### (2) 사과나무 부위별 바이러스 감염 분석

- 사과나무 부위별 바이러스 및 바이로이드 감염 여부를 조사 한 결과(Table 13), 과일 40.0%, 잎 53.3%, 결과지 53.3%가 감염 되었음.
- 이중 과일의 감염율이 가장 적은 이유는 사과나무 내에서 바이러스가 퍼져나가는데 있어 가장 늦게 생성된 조직인 과일의 경우 아직까지 바이러스가 이동을 하지 못한 것으로, 추후 기간이 더 경과 한다면 결국 과일까지 바이러스가 퍼져 나갈 것으로 판단됨.
- 과일의 경우 바이러스가 감염되어 있을 경우 동일한 바이러스가 결과지에서도 검출되는 경우 약 66.7%로 결과지를 따라 바이러스가 이동 할 수 있는 것으로 판단되나, 부위별 바이러스 감염의 특이 경향치는 볼 수 없었음.
- 바이러스별로는 ASPV 27.7% ASGV 73.3%, ACLSV 0%, ApMV 0%, ASSVd 20.0%로 ASGV의 감염율이 가장 높은 것으로 나타남.
- 사과원의 바이러스 감염율 조사에서 ASGV의 감염율이 93.4%로 가장 높은 것으로 나타난 것과 비슷하게 나타남. 또한 본 시험에서 사용된 사과나무는 식재 당시 바이러



스에 감염되지 않은 무병묘로서 방충망을 씌어 관리를 했음에도 불구하고, 3~5년 사이에 ACLSV, ApMV를 제외하고 바이러스에 감염되어 매우 높은 감염력이 나타남.

표 13. Virus infection by apple tree part.

Variety	Tree	부위	ASPV	ASGV	ACLSV	ApMV	ASSVd
Jahong	1	fruit	-	+	-	-	-
		leaf	+	+	-	-	+
		fruitng shoot	+	+	-	-	+
	2	fruit	-	-	-	-	-
		leaf	-	-	-	-	-
		fruitng shoot	-	-	-	-	-
	3	fruit	-	-	-	-	-
		leaf	-	-	-	-	-
		fruitng shoot	-	-	-	-	+
	4	fruit	-	-	-	-	-
		leaf	-	-	-	-	-
		fruitng shoot	-	-	-	-	-
	5	fruit	-	+	-	-	-
		leaf	-	-	-	-	-
		fruitng shoot	-	-	-	-	-
Hongro	1	fruit	-	+	-	-	-
		leaf	-	-	-	-	-
		fruitng shoot	-	-	-	-	-
	2	fruit	-	-	-	-	-
		leaf	+	+	-	-	-
		fruitng shoot	-	+	-	-	-
	3	fruit	-	+	-	-	-
		leaf	+	+	-	-	-
		fruitng shoot	-	-	-	-	-
	4	fruit	-	+	-	-	-
		leaf	+	+	-	-	-
		fruitng shoot	-	+	-	-	-
	5	fruit	-	+	-	-	-
		leaf	-	+	-	-	-
		fruitng shoot	-	+	-	-	-
Fuji Fubrax	1	fruit	-	-	-	-	-
		leaf	-	-	-	-	+
		fruitng shoot	-	+	-	-	-
	2	fruit	-	-	-	-	-
		leaf	-	-	-	-	-
		fruitng shoot	-	+	-	-	-
	3	fruit	-	+	-	-	-
		leaf	-	+	-	-	-
		fruitng shoot	-	+	-	-	-
	4	fruit	-	-	-	-	-
		leaf	-	-	-	-	-
		fruitng shoot	-	-	-	-	-
	5	fruit	-	-	-	-	-
		leaf	-	+	-	-	-
		fruitng shoot	-	-	-	-	-

## 다. 연구개발성과

### 1. 논문게재(SCI)

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	게재일	등록번호
1	Biological Control of Meloidogyne incognita by Aspergillus niger F22 Producing Oxalic Acid	Plos One	Ja Yeong Jang	11(6)	US	PUBLIC LIBRARY SCIENCE	2016.06.03	1932-6203
2	Proline Accumulates in Response to Higher Temperatures during Dehardening in Peach Shoot Tissues	The Horticulture Journal	신현석	85(1)	Japan	JSHS	2016.01.23	1882-3351
3	Proline accumulation in response to high temperature in winter-acclimated shoots of <i>Prunus persica</i> : a response associated with growth resumption or heat stress?	Canadian Journal of Plant Science	신현석, 오세원	96(4)	Canada	Canadian science	2016.08.04	0008-4220
4	Proline Accumulation and Related Gene Expression during Spring Regrowth in Three Rosaceae Species	Horticulture, Environment, and Biotechnology	오세원, 신현석	58(1)	Korea	KSHS	2017.02.10	2211-3452
5	Development of Nutrient Solution for in vitro Propagation of M9 Apple Rootstock Plantlets in Peach Shoot Tissues	Horticultural Science and Technology	고상민	36(2)	Korea	KSHS	2018.04.01	1226-8763
6	Control of relative humidity and root-zone water content for acclimation of in vitro-propagated M9 apple rootstock plantlets	Horticulture, Environment, and Biotechnology	고상민	59(3)	Korea	KSHS	2018.04.13	2211-3452

7	Defoliation and Fruit Coloration in '후지'/M9 Apple Affected by Cu-EDTA and Fe-EDTA Foliar Spray	Horticultural Science and Technology	임한규, 신현석	37(4)	Korea	KSHS	2019.08.01	1226-8763
8	Growth and acclimation of in vitro-propagated M9 apple rootstock plantlets according to light intensity	Horticulture, Environment, and Biotechnology	정금재	61	Korea	KSHS	2020.04.14	2211-3452
9	Growth and acclimation of in vitro-propagated M9 apple rootstock plantlets under Various Visible Light Spectrums	Agronomy	정금재	10(7)	Switzerland	MDPI	2020.07.15	2073-4395
10	Phloroglucinol Improves Direct Rooting of In Vitro Cultured Apple Rootstocks M9 and M26	Agronomy	김진호	10(8)	Switzerland	MDPI	2020.07.26	2073-4395
11	Efficient production of virus-free apple plantlets using the temporary immersion bioreactor system	Horticulture, Environment, and Biotechnology	정금재	61	Korea	KSHS	2020.06.29	2211-3452

## 2. 논문게재(비SCI)

1	수피상처치료를 위한 식물생장조절물질 기반 상처유합제 개발	농약과학회지	민호정	20(2)	Korea	한국농약과학회	2016.06.30	2287-2051
2	토양수분 조건에 따른 블랙초크베리 'Nero' 과실의 품질 및 세포 발달 비교	한국자원식물학회지	원정연, 신현석	30(1)	Korea	한국자원식물학회	2017.02.28	1226-3591
3	Correlation between the Dieback Ratio and Cultivation Environment for Apple Orchards Infected by Soil-Borne Diseases in Chungbuk Province	Research in Plant Disease	이성희	23(1)	Korea	한국식물병리학회	2017.03.31	1598-2262

4	국내 유통 주요 사과나무 묘목의 바이러스 감염 실태	Research in Plant Disease	이성희	23(4)	Korea	RPD	2017.12.01	1598-2262
5	질소시비농도에 따른 1년생 사과 '후지'/M9 포트묘목의 수체 생장	Korean Journal of Plant Resource	하응용, 신현석	32(5)	Korea	KJPR	2019.10.01	1226-3591
6	국내 주요지역의 사과 바이러스 및 바이로이드 5종의 발생 현황	Research of Plant Disease	이성균	26(2)	Korea	한국 식물 병리학회	2020.06.30	1598-2262

### 3. 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	한국생물환경조절학회 춘계학술발표회	고상민	2016-05-12	경기도농업기술원 연구관강당	대한민국
2	한국원예학회 춘계학술발표회	고상민	2016-05-26	창원컨벤션센터	대한민국
3	한국원예학회 춘계학술발표회	오영재	2016-05-26	창원컨벤션센터	대한민국
4	한국원예학회 춘계학술발표회	김진호	2016-05-26	창원컨벤션센터	대한민국
5	한국원예학회 춘계학술발표회	김진호	2016-05-26	창원컨벤션센터	대한민국
6	한국육종학회 학술발표회	오영재	2016-05-29	청주 라마다 플라자호텔	대한민국
7	American Society for Horticultural Science	이성희	2016-08-09	애틀랜타	미국
8	한국식물병리학회 학술발표회	이성희	2016-10-20	서울대학교 강원도 평창 캠퍼스	대한민국
9	한국원예학회 추계학술발표회	고상민	2016-10-27	광주 김대중 컨벤션센터	대한민국
10	한국원예학회 춘계학술발표회	이민기	2017-05-25	대전 컨벤션센터	대한민국
11	한국생물환경조절학회 춘계학술발표회	고상민	2017-05-11	전남대학교 농업생명과학 대학	대한민국
12	한국원예학회 춘계학술발표회	김진호	2017-05-25	대전 컨벤션센터	대한민국
13	Meeting of the society for in vitro biology 2016 Korea-Japan	김진호	2017-06-10	North Carolina	미국
14	Joint-Workshop on Plant Factory	고상민	2016-12-27	서울대학교	대한민국
15	한국원예학회 추계학술발표회	안수지	2017-10-12	송도컨벤시아	대한민국
16	한국원예학회 추계학술발표회	안수지	2017-10-12	송도컨벤시아	대한민국
17	ASHS ANNUAL CONFERENCE	황기동	2017-09-19	Waikoloa	미국

18	Plant and animal genome conference XXV	한현대	2018-01-13	Sandiego	미국
19	Plant and animal genome conference XXV	임현규	2018-01-13	Sandiego	미국
20	ASHS ANNUAL CONFERENCE	이성희	2017-09-21	Waikoloa	미국
21	Korea-Japan Joint-Workshop on Plant Factory	염문선	2017-12-27	서울 AT Center27	대한민국
22	한국생물환경조절학회	정금재	2018-08-19	무주 덕유산 리조트	대한민국
23	한국원예학회 춘계학술발표회	정금재	2018-05-24	대전 컨벤션 센터	대한민국
24	한국원예학회 춘계학술발표회	김나영	2018-05-23	대전 컨벤션 센터	대한민국
25	한국원예학회 추계학술발표회	김나영	2018-10-18	여수 엑스포컨벤션 센터	대한민국
26	한국원예학회 추계학술발표회	권의석	2018-10-18	여수 엑스포컨벤션 센터	대한민국
27	International Joint Conference on Plant Protection	최다희	2018-10-25	광주 김대중 컨벤션센터	대한민국
28	International rosaceae genome conference	김대일	2018-06-27	Hanyuan Mansion, Nanjing	중국
29	한국원예학회 춘계학술발표회	한현대	2018-05-24	대전 컨벤션 센터	대한민국
30	국제원예학회 학술대회(IHC)	김나영	2018-08-12	이스탄불	터키
31	International Joint Conference on Plant Protection	최다희	2018-10-25	광주 김대중 컨벤션센터	대한민국
32	Plant and animal genome conference XXV	김금선	2019-01-12	Sandiego	미국
33	한국원예학회 춘계학술발표회	엄진호	2019-05-23	경주 화백컨벤션센터	대한민국
34	Eucarpia fruit breeding and genetics symposium	오지현	2019-06-05	Prague	체코
35	International symposium on advanced technologies and management for innovative greenhouses	정금재	2019-06-18	Angers	프랑스
36	한국원예학회 추계학술발표회	김유미	2019-10-24	알펜시아컨벤션센터	대한민국
37	Eucarpia fruit breeding and genetics symposium	오지현	2019-06-05	Prague	체코
38	한국원예학회 춘계학술발표회	김나영	2019-05-23	경주 화백컨벤션센터	대한민국

39	Plant Biology 2019	김나영	2019-08-05	San Jose	미국
40	한국농업기계학회, 한국생물환경조절학회, 한국축산환경대회 춘계 공동학술대회	정금재	2019-05-09	경상대학교 GNU 컨벤션센터	대한민국
41	한국원예학회 추계학술발표회	오지현	2019-10-24	알펜시아컨벤 션센터	대한민국
42	한국원예학회 추계학술발표회	이동윤	2019-10-24	알펜시아컨벤 션센터	대한민국
43	KSPP Fall International conference & symposium for smart crop protection	김주현	2019-10-16	나주 정흥 골드스파 리조트	대한민국

4. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	사과 재분화 촉진 용 조성물 및 2단 계 엽병배양을 통 한 바이러스 무독 화 사과묘목의 대 량생산 방법	대한민국	충북대학 교산학협 력단	2017- 05-31	10-2017- 0067809	충북대학 교산학협 력단	2018-1 107	10-191824 4-0000	100%
2	사과 품종 판별용 CAPS 마커 및 이 의 용도	대한민국	충북대학 교산학협 력단	2017- 05-29	10-2017- 0065990	충북대학 교산학협 력단	2018-1 0-01	10-190545 8-0000	100%
3	용존산소량을 조 절할 수 있는 담 액수경 시스템	대한민국	충북대학 교산학협 력단	2017- 04-12	10-2017- 0047422	충북대학 교산학협 력단	2018-1 1-15	10-192069 6-0000	100%
4	기내배양 사과 왜 성대목묘의 순화 촉진용 배양액 및 이를 이용한 순화 방법	대한민국	충북대학 교산학협 력단	2018- 05-11	10-2018- 0054564	충북대학 교산학협 력단	2019-1 1-20	10-207445 5-0000	100%
5	사과황화잎반점바 이러스의 변이체 를 구별하기 위한 프라이머 세트 및 이의 용도	대한민국	충북대학 교산학협 력단	2019- 04-29	10-2019- 0049936	충북대학 교산학협 력단	2020-0 6-01	10-211974 9-0000	100%
6	후지 사과와 이의 아조변이 품종 판 별용 S-SAP 마커 및 이의 용도	대한민국	충북대학 교산학협 력단	2019- 08-23	10-2019- 0103927	충북대학 교산학협 력단	2020-0 7-31	10-214201 1-0000	100%
7	홍로 사과와 이의 아조변이 품종 판 별용 마커 및 이 의 용도	대한민국	충북대학 교산학협 력단	2019- 09-05	10-2019- 0110180	충북대학 교산학협 력단	2020-0 7-31	10-214201 0-0000	100%



5. 전문 연구 인력 양성

No	기준년도	현황											
		학위별					성별		지역별				
		박사	석사	학사	기타	합계	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	2016		4	2		6	3	3	1	5			
2	2017		2	4		6	2	4	2	4			
3	2018		6	3		9	6	3	1	8			
4	2019	5	9		1	15	3	12		14			1
총계		5	21	9	1	36	14	22	4	31			1

6. 기술거래(이전) 등

No	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수현황
1	Know-how	네트형 생물반응기를 이용한 사과 무병묘 생산방법	(주)웰그린	2018. 03. 21	500,000	5,000,000
2	Know-how	사과 무독묘 미세접목 방법 및 접목향상 기술	(주)웰그린	2019. 01. 28	2,000,000	2,000,000
3	Know-how	포트와 이용한 사과 조직배양 대목묘의 재배기술	충립과수묘목영농조합법인	2019.04.22	200,000	200,000
4	Know-how	포트와 이용한 사과 목묘의 재배기술	충립과수묘목영농조합법인	2019.04.22	200,000	200,000
5	Know-how	PCR반응 및 제한효소를 활용한 사과품종별법	충립과수묘목영농조합법인	2020.05.01	600,000	600,000
6	특허등록	용존산소량을 조절할 수 있는 담액수경 시스템	(주)보리누리	2020.05	12,000,000	12,000,000

7. 사업화 현황

M.9 후지 후브락스, M.9 자홍 접목묘의 제품화 2건 및 매출액 (7.41백만원)

8. 기타

-교육지도 11건

일시	장소	내용	참석자 수
2015. 07. 21.	충립과수묘목 영농조합법인	사과 우량 묘목 재배 생산 시스템과 사과 조직배양 대목의 생산 및 재배 방법에 대해 교육하고, 일반 사과 대목과의 차이점에 대해 교육함	40명
2015. 10. 16	경남 거창군 사과재배원	사과 우수 재배방법 설명회 및 품종별 평가를 실시함	40명

2016. 07. 08	충립과수묘목 영 농조합법인 포장	사과 대목의 효율적인 생산관리에 대하여 지도하였음	20명
2016. 07. 13	강원 철원군 사 과재배원	최신 사과 재배기술을 교육하고, 사과 품 종별 수체 및 과실 특징을 교육하였음	40명
2017. 07. 07	충립과수묘목 영 농조합법인 포장	충립과수묘목 영농조합법인 포장에서 사과 대목 및 묘목 생산관리 요령에 대해 교육 지도를 실시하였음	20명
2017. 07. 17	경북 영덕군 사 과재배원	사과 품종별, 여름철 병충해 관리를 위한 예찰, 방제 방법을 지도하였음.	40명
2017. 10. 18	전북 장수군 사 과재배원	수확전 착색도 향상을 위한 재배조치에 대 하여 교육지도하였음.	30명
2017. 12. 06	충립과수묘목 영 농조합법인 포장	품종별 사과 묘목 생산 요령 및 유의점을 교육지도하고, 묘목의 수확후 저장관리를 위한 시설 및 관리 요령을 교육지도하였음	10명
2018. 08. 06.	충립과수묘목 영농조합법인 포 장	사과 묘목 번식 방법 및 재배 생산관리	20명
2018. 10. 16.	경북 영덕군 사과재배원	사과 생육기 재배 관리를 통한 기상재해대 응방안 교육	40명
2020. 06. 01	충립과수묘목 영 농조합법인 포장	사과 포트묘 재배 방법 및 관리시 유의사 항에 대해 지도하였음	7명

## 라. 연구결과의 기술 및 경제적 성과

### ○ 제2세부과제

#### 가. 생산성 강점 요인 분석

##### (1) 기존 재배방식 대비 조직배양방식의 강점 요인 분석

- (가) 사과는 과수 중 전국 과실 생산소득의 23%를 차지하고 있는 주요 소득 작물로, 주로 접목에 의해 증식하는 영양체 번식작물로 바이러스에 감염되면 생산량이 감소되고, 당도가 떨어지며 기형 발생이 높은 이유로 대략 20~30% 정도 생산량이 감소된다고 보고됨.
- (나) 사과 묘목은 접목을 이용하여 번식시키므로 대목(바탕나무)과 접수(대목에 붙이는 가지\_순)가 필요하다. 왜성대목은 사과나무의 수고를 낮추기 위해 사용되고 있으며, 사과 대목은 삼목(꺾꽂이)이 어려우므로 증식을 위해 취목(휘묻이)를 이용하지만 바이러스가 없는 균일한 대목의 확보가 어려운 한계가 있음.
- (다) 이러한 한계를 극복하기 위해 사과에 식물조직배양을 도입하고, 이에 의해 대량으로 얻어진 배양체로부터 유용물질을 생산하는 방식은 환경요인에 제한을 받지 않고, 계획적인 생산이 가능하며, 제품의 질과 수율을 일정하게 유지하면서도 단위 면적당 생산량이 많고, 바이러스 감염이 없는 건전한 식물체를 생산할 수 있다는 장점이 있다는 것을 확인함.
- (라) 현재 사과 왜성대목의 무병화묘 생산을 위해 성장점 배양을 통한 M.9/M.26 등 왜성대목의 우량 건전묘를 생산할 수 있는 조직배양 기술을 도입할 시 바이러스 감염이 없는 건전한 식물체를 생산할 수 있다는 것을 확인함.

(마) 또한 조직배양기술을 도입할 시 배양 용기를 통한 우량 건전묘의 대량생산이 가능하여 높은 생산성을 기대할 수 있으며, 왜성 대목 등 사과 묘목 생산 기간을 단축하고 균일한 포트묘 생산이 가능한 장점이 있어 경제성이 우수할 것으로 분석됨.

표. 기존재배 방식과 조직배양 무병묘 생산 방식의 차이

구분	기존 재배방식	조직배양방식
생산방법	노지재배로 자연/인위적 등 여러 제한요인으로 우량 건전묘 생산 저하 가능성이 높음	배양용기를 설치해 배양해 노지재배 대비 우량 건전묘 생산이 쉬움
경제적 비용	노동력이 많이 필요해 비용 소요되나, 묘목 가격은 상대적으로 저렴	많은 노동력이 필요 없으나, 일반 묘목 가격에 비해 가격이 높음
바이러스 감염 정도	바이러스 감염정도가 높음(약 48%)	거의 없음
생산량	바이러스 감염 피해가 많으면 생산량 저하	무병묘이면서 대량생산 가능

출처: 충북대 자료, 농림축산식품부 기획보고서 자료 참고, 2017.

(바) 위의 표와 같이 기존 사과 재배방식과 조직배양을 통한 배양방식을 살펴보면, 기존 재배방식은 건전묘 생산 저하 가능성 높음, 바이러스 감염정도가 높음 등의 단점을 가지는 반면, 조직배양방식은 배양용기를 통한 우량 건전묘 생산 용이 및 바이러스 감염율을 현저히 낮출 수 있는 것으로 기대됨.

(사) 또한 경제적 비용의 경우 기존 재배방식이 조직배양방식 대비 표면적으로는 가격이 저렴한 것으로 나타나나, 최종 생산량으로 비교했을 때 기존 재배방식은 바이러스 감염 피해로 인한 생산성 저하 가능성으로 인해 조직배양방식이 생산 측면에서의 경제성도 우수한 것으로 기대됨.

(2) 지역별 과수 생산량, 재배면적 등의 요인 분석을 통한 생산성 분석

(가) 사과 생산량 현황 및 전망을 알아보기 위해 전국 및 충북지역의 사과 재배면적, 생산량 등을 조사하고, 통계청 및 한국농촌경제연구원 농업관측본부의 자료를 참고하여 향후 과수 재배면적 전망에 대해 조사함.

(나) 2019년 사과 재배면적은 2018년 대비 280ha로 감소했으나, 생산량은 2018년 대비 7% 증가한 50만 8,600톤인 것으로 추정됨.

표. 2016년, 2017년 사과 생산량 현황.

구분	재배면적(ha)	단수(kg/10a)	생산량(천 톤)
2017년	33,600	1,648	553.6
2016년	33,300	1,731	576.4
평년	31,019	1,633	514.9
증감률(%)	전년 대비	0.9	-3.9
	평년 대비	8.3	7.5

\*출처: 한국농촌경제연구원 농업관측본부, 과일관측월보 자료 재인용

표. 2016년, 2017년 사과 월별 도매가격(상품).

(단위: 원/10kg)

구분	7월	8월	9월	10월	11월
	쓰가루		홍로	영광	후지
2017년	28,059	30,613			
2016년	23,570	25,100	24,045	32,457	23,280
평년	33,060	26,620	32,228	33,929	26,350

\*출처: 서울시 농수산물공사 자료 재인용

● 주: 평년은 2012-2016년산 가격 중 최대, 최소를 제외한 평균 가격

- (다) 2020년 사과 재배면적은 3만 2,816ha로 2019년 대비 0.4% 감소할 것으로 전망되며, 성목면적은 유목이 성목화되면서 1.6% 증가하지만, 유목면적은 품종 갱신에도 불구하고 신규 과원 형성이 적어 5.6% 감소할 것으로 예상됨.
- (라) 또한 2019년 사과 생산량, 저장량이 전년대비 각각 7%, 8% 증가하였고, 지역별로 영남지역이 0.4%, 충청이 0.8%, 호남이 2.2% 감소하지만, 강원·경기 지역은 재배지 북상과 강원도의 사과 명품과원 조성사업 등으로 4.4%증가할 것으로 전망됨.
- (마) 전체적으로 사과 생산은 재배 면적은 감소하고 생산량은 높아지는 추세로 예상되며, 그에 따라 재배면적 대비 생산량이 높아야 하므로 대상기술의 무병묘 대량생산 기술은 재배면적이 따로 필요 없고, 바이러스 감염도가 거의 없는 건전한 묘목으로 대량생산 또한 가능해 향후 전망과도 부합한 기술일 것으로 기대됨.
- (바) 다음으로 과수 묘목과 관련해 농림축산식품부에서 2016년 5월에 발표한 ‘과수 무병묘 생산·유통 활성화방안’ 으로 4%에 불과한 무병묘 공급률을 2025년까지 80%로 확대함으로써 생산성을 24% 높여 과수산업 경쟁력을 한 단계 높인다는 목표를 세웠으며, 향후 무병묘 생산이 중요할 것으로 예상됨.

표. 2025년까지 무병묘 공급률 생산 계획.

구분	2015	2020	2025
무병묘 공급(%)	3.8	30	80
생산성 향상(%)	100	109	124
무병묘 생산능력(%)	60	-	80
모표장 면적(묘목 수,ha)	153ha(240만 주)	-	200ha(320만 주)

\*출처: 농림축산식품부, 과수바이러스 무병묘 생산/유통 활성화 사업, 2018.09.

(사) 경북사과산학협력단에서 발표<sup>1)</sup>한 자료에 따르면, 2020년 사과 생산량이 60만 톤으로 예상되며, 그 중 무병묘 공급은 30%로 2020년 무병묘 공급을 추정해보면 대략 18만 톤 정도가 무병묘 생산을 추진할 것으로 예상됨.

(아) 그 외 한국농촌경제연구원에서 2019년도에 발간한 ‘2018 식품소비행태조사 통계보고서’에 따르면, 한국인이 좋아하는 과일 1순위는 사과로 전체의 25.3%를 차지하는 것으로 분석되어 향후 사과 수요는 긍정적일 것으로 전망됨.

#### 나. 예상 매출액 산정을 통한 개발 대상 기술(제품)의 경제성 분석

##### (1) 예상 매출액 추산

##### (가) 매출액 추정을 위한 시장 분석

① 기술개발이 완료된 제품의 속한 시장이 명확하다면 산업분석 결과를 이용하여 매출추정 하는 것이 가능하다. 산업분석 결과, 국내의 거시경제요소에 대한 분석과 대상제품이 속한 산업에 대한 전반적인 평가가 이루어지면 시장규모 및 시장점유율 분석을 통해 매출추정이 가능하며, 시장점유율법에 의한 매출액 추정은 시장규모에 예상되는 시장점유율을 곱하여 다음 식을 이용하여 추정함.

$$\text{추정매출액} = \text{시장규모} \times \text{시장점유율}$$

② 시장규모의 성장 또는 감소는 시장 및 산업특성 분석을 통하여 얻어지며, 시장점유율은 산업에 관한 지식(경쟁상태, 과점, 추세 등)과 관련 지식(생산능력, 제품종류, 사업계획 등)을 기반으로 추정이 가능함.

③ 따라서 아래에서는 적용될 수 있는 시장을 조사 및 분석하여 시장 규모를 토대로 시장점유율을 추산하여 매출액을 산정함.

##### (나) 대상 기술의 목표시장 규모

##### ① 글로벌 종자시장

㉞ 세계 종자시장 규모는 2017년에 621억 달러에서 2019년에는 698억 달러를 기록했으며, 2021년에는 784억 달러에서 2023년에는 860억 달러에 이를 것으로 전망됨.

1) 경북사과산학협력단\_과수분야 2단계 산학연 협력사업 추진현황

㉔ 또한 농촌진흥청에 따르면, 최근 5년(2014~2018) 간 한국이 지급한 종자 로열티는 590억 원, 받아낸 로열티는 15억 원에 불과한 것으로 분석되고 사과와 배의 종자 자급률은 18%인 것으로 분석됨.

② 과수 종묘시장

㉕ 국내 과수 종묘(묘목)시장규모는 2015년에는 약 480억 원 규모에서 2017년에는 618억 원으로 증가하여 2015~2017년까지 계속 시장규모가 증가 중임.

표. 국내 과수종묘(묘목) 시장규모(2015~2017).

(단위: 억 원, %)

구분	2015	2016	2017
국내 시장	480	570	618

\*출처: 농림축산식품부, 과수바이러스 무병묘 생산/유통 활성화 사업, 2018.09.

표. 2025년까지 무병묘 공급률 생산 계획.

구분	2015	2020	2025
무병묘 공급(%)	3.8	30	80
생산성 향상(%)	100	109	124
무병묘 생산능력(%)	60	-	80
묘표장 면적(묘목 수,ha)	153ha(240만 주)	-	200ha(320만 주)

\*출처: 농림축산식품부, 과수바이러스 무병묘 생산/유통 활성화 사업, 2018.09.

㉕ 국내 과수묘목은 주로 사과와 포도 위주로 연간 500~700만 주가 생산되고 있으며, 그 중 약 200~400만 주가 유통되어 약 60%가 유통되고 40% 정도는 자가생산 등 비상업적인 유통이 되고 있는 것으로 추정됨.

㉕ 또한 과수묘목은 대부분 경북(경산)·충북(옥천)지역의 묘목생산업체에서 생산·유통을 주도하는 것으로 예측됨.

㉕ 국내에서 현재 농림축산 식품부 등 여러 기관에서는 과수 무병묘 공급을 2025년에 80%까지 생산할 계획을 수립하고 진행하고 있는 실정임.

㉕ 2015년 과종별 무병묘 공급 자료에서 사과는 93천 주, 포도와 배는 각각 10천 주가 공급되어 사과의 무병묘 공급 비율이 상대적으로 높은 것으로 분석되며, 2015년 기준으로 국립종자원의 종자업 등록업체 현황 자료에 따르면, 494개소로 2011년부터 꾸준히 증가한 것으로 분석됨.

③ 사과 무병묘 시장

㉕ 시장규모

- 세계시장의 사과 재배면적은 국내와 마찬가지로 줄어들고 있는 추세이며, 생산묘수 또한 줄어들고 있는 것으로 분석되나 반면에 무병묘 점유율은 2015년에 10%에서 2019



년에 18%로 늘어난 것으로 분석됨.

표. 해외시장 사과 무병묘 재배면적과 무병묘 점유율 현황.

구분	2015	2016	2017	2018	2019	CAGR ( '15~' 19)
재배면적(천 ha)	4,516	4,475	4,434	4,393	4,353	-0.91%
생산묘수(천 주)	651,461	635,595	659,783	624,025	618,319	-0.91%
무병묘 점유율(%)	10%	12%	14%	16%	18%	-

\*출처: 농림축산식품부 최종보고서 참고, 2017.

- 세계 사과 무병묘 시장은 2015년에 3,207억 원에서 연평균 성장률 15.77%를 기록하여 2019년에는 5,565억 원을 기록한 것으로 분석된다. 국내 시장 또한 2015년에 9억 원에서 2019년에는 44억 원으로 2018년도부터 크게 증가해 48.70% 성장한 것으로 분석됨.
- 또한 세계 사과 무병묘 시장에서 현재 북미와 유럽, 일본 등을 제외하면 무병묘에 대한 전 세계적인 수요는 8% 정도로 추정됨.
- 세계 시장은 네덜란드, 일본, 미국, 영국 등의 점유율이 높은 것으로 분석되며, UPOV(the international Union for the Protection of New Varieties of Plants: 국제신품종 보호동맹) 가입과 품종 보호제도 강화, 종묘기술의 발전 및 예측 불가능한 천재지변·병충해 등으로 자국 종자들에 대한 관심이 증대되므로, 무병묘의 점유율은 점차 증가될 것으로 분석됨.
- 국내시장의 무병묘 점유율은 2015년에는 약 3.8%에 불과했으나, 2018년에 10%에서 2019년에는 20%까지 증가하여 점유율 및 시장규모는 계속 증가할 것으로 전망된다. 또한 국내에서는 향후 2025년에는 해외 선진국(미국, 일본, 영국, 네덜란드)과 같이 법령에 의거해 무병묘 검사를 의무화하고 상업적 과수 묘목 중 무병묘가 80%이상 유통되는 구조와 같이 공급할 계획임.

표. 해외시장 및 국내시장 종묘 시장규모.

(단위: 억 원, %)

구분	2015	2016	2017	2018	2019	CAGR ( '15~' 19)
세계 시장	3,207	3,814	4,618	4,992	5,565	14.77%
국내 시장	9	9	9	22	44	48.70%

\*출처: 농림축산식품부 최종보고서 참고, 2017.

㉔ 사과묘목 수출 현황

- 사과 묘목은 2016년에 중앙아시아에 조금씩 수출되고 있으나, 카자흐스탄의 과수원과 아포트 사과 재활성화 계획을 통해 알마티 주는 2015년 기준으로 2020년까지 아포트 사과(아포트, Aport)를 카자흐스탄 전역에 공급하고 해외 수출 계획임.
- 2015년 기준으로 알마타 주의 과수원 면적은 2만 ha이며, 그 중 2천 ha는 아포트 나무가 있고, 향후 국가 보조금의 3억 5,300만 달러의 금액을 투자하고 3,100ha까지 넓힐 계획을 세워 국내의 선진화된 조직배양을 이용한 규격포트묘의 수출 가능성이 있을 것으로 분석됨.

(2) 예상매출액 산정

- (가) 앞서 언급한 바와 같이, 대상기업은 기술은 종자시장과 과수 종묘시장에 포함되고 그 중에서도 특히 사과 무병묘 시장에 적용하는 것을 목표로 하고 있다. 이처럼 대상기술이 속한 시장이 정해진 경우에는 시장점유율법에 의한 매출액 추정 방법을 적용하는 것이 가능하므로, 대상기술이 속한 시장규모에 평가대상기업이 차지할 시장점유율을 곱하여 매출액을 추정함.
- (나) 더블 파트너스에서 농업회사법인의 종목분석 자료를 살펴보면 2017년 기준으로, 세계 종자 시장규모는 621억 달러(약 73조 2,800억)를 기록했고 그 중 한국의 시장규모는 약 4억 정도로 세계 종자시장의 1% 미만인 것으로 분석되며, 특히 미국이 가장 많은 점유율을 차지하고, 중국, 프랑스, 일본, 네덜란드 순으로 대부분 선진국이 종자시장 점유율을 차지하는 것으로 사료됨.
- (다) 다음으로 국내 과수종묘시장은 나와 있는 자료가 많지 않아, 여러 자료를 조합한 결과 2015년에는 약 480억 원의 시장규모를 기록하는 것으로 조사되었고 2016년에는 570억에서 2017년에는 618억 원으로 시장규모가 계속 성장하는 것으로 분석됨.
- (라) 대상기술의 세부 목표시장인 사과 무병묘 세계 시장규모는 한화로 2015~2019년에 성장률 14.77%를 기록하며 2019년에 5,565억 원 규모에 달해 시장 규모가 성장 중인 것으로 분석된다. 국내 시장은 2018년도에 시장규모가 크게 성장하면서 2017년에 9억 원에서 22억 원에 달하고, 2019년에는 44억 원에 달해 성장률이 48.70%로 높게 기록된 것으로 분석되어 향후 국내시장이 크게 성장할 것으로 기대됨.
- (마) 사과 무병묘 국내 시장이 2018년도에 급격하게 성장한 이유는 관련 정부 부처가 계획한 정책과 긴밀한 것으로 사료되며, 한국은 해외 선진국(미국, 일본, 영국, 네덜란드 등)의 사례처럼 과수 묘목의 무병묘 공급을 2018년에 10%에서 2020년에는 30%로 올리고, 2025년에는 80%로 공급량을 올리겠다는 목표를 수립해 진행 중임.
- (바) 또한 국내 사과 묘목 수출입 동향을 보면, 현재는 중앙아시아에 조금씩 수출되고 있는 상황으로 아직 수출시장이 활발하지는 않지만 대상기술과 같은 조직배양을 통한 우량묘 생산 기술이 기존 사과 재배의 차별성 및 강점을 활용해 수출한다면, 긍정적인 효과를 기대할 수 있을 것으로 기대됨.
- (사) 따라서, 대상기술은 조직배양 개발을 통한 사과 무병묘 대량생산이 핵심적인 기술로 평가되고 그의 기술적 응용은 매우 높은 것으로 판단되는바, 첨단 산업으로 간주되며 국내 및 향후에는 수출을 통한 추정 매출액을 훨씬 상회하는 매출 신장도 기대할 수 있을 것으로 전망됨.

표. 개발종료 후 5년간 관련 시장에 대한 시장점유율 및 매출 추정액.

		2020년	2021년	2022년	2023년	2024년
		과수 종묘시장				
국내	시장규모(억원)	832	901	970	1039	1108
	전체묘목생산수 (사과, 개)	106,950	109,740	112,530	115,320	118,110
	전체시장대비 사과시장 점유율(%)	3.82	3.81	3.80	3.79	3.79
	매출추정액(백만원)	3,178	3,433	3,688	3,941	4,194
	사과 무병묘 시장					
국내	생산량(생산묘수)	106,950	109,740	112,530	115,320	118,110
	무병묘 점유율(%)	30	40	50	60	70
	판매단가(원)	15,000	15,000	15,000	15,000	15,000
	시장규모(억원)	52	60	68	77	85
	시장점유율(%)	1	2	4	7	10
	매출추정액(백만 원)	52	120	272	539	850
	글로벌 종자시장					
세계	시장규모(억달러)	741	784	822	860	898
	시장점유율(%)	0.0000009	0.0000027	0.0000045	0.0000063	0.000009
	매출추정액(만달 러)	6.66	21.17	37	54.18	80.82
	매출추정액(백만 원)	80	254	444	650	970
		사과 무병묘 시장				
세계	생산량(생산묘수)	606,695	598,910	591,124	583,339	575,553
	무병묘 점유율(%)	22	24	26	28	30
	시장규모(억원)	6,207	6,797	7,386	7,976	8,565

시장점유율(%)	0.003	0.005	0.0075	0.0105	0.013
매출추정액(백만원)	19	34	55	84	111
합계(백만원)	3,329	3,841	4,459	5,214	6,125

주) 각 시장별로 시장규모 및 시장점유율을 추산함  
 주) 환율은 1달러/1,200원을 기준으로 함

(3) 평가파라메타 추정

- 수익성 분석을 위해 매출원가 및 판관비, 투자금액, 할인율 등과 같은 아래와 같은 요소들을 적용 및 분석할 예정임.

(가) 매출원가 및 판관비

- 매출원가는 대상기술이 적용된 제품에 대한 제조비용으로서, 원재료 구입·조달 비용, 제조인원에 대한 인건비, 감가상각비 및 기타 경비 등으로 구성되며, 2017년 기업경영 분석(한국은행, 2018.11발간)자료를 따르면 본 기술이 해당하는 업종은 첨단기술업종<sup>2)</sup>(제조업)으로 볼 수 있으며, 해당 업종의 평균 매출원가율인 70.07%와 판관비 15.08%를 적용함.

(나) 법인세

- 영업활동으로 인한 여유현금흐름의 산출시, 영업이익에 대한 법인세는 현금유출항목으로 고려되어야 하며, 향후 기술제휴 등을 통해 민간기업과 영업활동을 하게 될 경우를 고려하여 현행 법인세법을 반영하여 2018년 1월 1일 이후 시행중인 법인세율(2억원 이하 10%, 2억원 초과 200억원 이하 2천만원+20%, 200억원 초과 39억 8천만원+22%, 주민세 포함)을 반영하여 산출함.

(다) 투자금액

① 운전자본 증감액

㉠ 운전자본이란 영업활동과정에서 매출채권, 재고자산 및 매입채무를 보유함으로써 소요되는 자금으로, 일반적으로 매출채권이나 재고자산에 투입된 자본에서 매입채무로 조달된 자본을 차감하여 산정된 운전자본의 변동은 여유현금흐름 계산 시 고려된다. 운전자본증감액은 다음과 같이 계산됨.

$$\text{운전자본증감액} = \text{매출증감액} \times \text{운전자본소요율}$$

$$\text{운전자본소요율} = 1/\text{매출채권소요율} + 1/\text{재고자산소요율} - 1/\text{매입채무소요율}$$

㉡ 본 사업에서는 한국은행의 2017년 기업경영분석 보고서에 제시된 동업종의 평균적인 재무자료를 고려하였으며, 동업종(첨단기술업종)의 평균 매출채권회전율, 재고자산회

2) 예상 제품군에 따라 첨단기술업종에는 의약품 및 의약 관련 소재가 포함되어 있어, 이를 관련 업종으로 선정함

전율, 매입채무회전율을 이용하여 산출된 운전자본회전율의 역수를 취하여 운전자본 소요율을 산정하였으며, 이에 따른 운전자본소요율은 18.27%로 계산됨.

② 자본적 지출액

- 자본적지출액은 기술사업과 관련된 향후 투자계획 및 설비교체 주기를 고려하여 산정할 수 있으며, 본 사업에서는 대상기술이 적용된 제품의 추정 매출액에 따른 자본적지출액 산정을 위하여 동업종의 평균적인 유·무형자산구성비율 및 감가상각비율 등의 재무자료를 이용한 결과, 유·무형자산구성비율은 34.74%이고 감가상각비율은 10.75%임.

표. 자본적 지출액 산출내역.

(단위: 백만 원)

	추정1차년도 (2020년)	추정2차년도 (2021년)	추정3차년도 (2022년)	추정4차년도 (2023년)	추정5차년도 (2024년)
I. 추정매출액	3,329	3,841	4,459	5,214	6,125
II. 매출증감액	3,329	512	618	755	911
III. 유무형자산구성비			34.74%		
IV. 유무형자산증가액 (II × III)	1,156	178	215	262	316
V. 감가상각비 등	302	348	404	473	555
VI. 자본적지출액 (IV + V)	1,458	526	619	735	872

당기 감가상각비 등=매출증감액×감가상각비율

(라) 투자액 회수

- ① 해당 항목에서 투자액은 제품 개발을 위해 투입된 정부출연금을 기반으로 한다. 매출 발생을 위하여 투하된 자본은 영업활동을 위한 경제적 효익을 제공하며, 경제성 분석 대상기간의 종료시점에 기존 투자액에 대한 잔존가치가 존재한다면 이를 경제성 분석 종료연도에 회수되는 것으로 가정하여 여유현금흐름에 반영함.
- ② 투자액 회수는 운전자본 회수액과 고정자산 회수액으로 구분할 수 있으며, 운전자본 회수액은 본 사업과 관련하여 경제성 분석 대상기간의 종료시점에 잔존하는 운전자본을 의미하며, 고정자산 회수액은 본 사업과 관련된 자본적지출액 누계액에서 감가상각비 등 누계액을 차감한 고정자산의 장부가액으로 가정함.

(마) 할인율

- ① 할인율은 대상기술에 의한 미래 현금흐름을 현재가치로 전환할 때 사용되는 환원율을 말하며, 기술사업화 과정에 내재된 다양한 위험이 포함된 할인율(Risk -adjusted Discount Rate)이다. 대상기술이 연관된 사업에서 발생 가능한 잠재적인 위험을 정량화한 것이므로 대상기술이 갖는 기술위험, 시장위험, 사업위험 등을 분석하여 그 결과

를 반영해야 함.

- ② 사업화 과정에서 발생하는 제반 위험을 평가자가 직접 측정하여 할인율을 산출하는 것이 원칙이나, 실무에서는 직접 측정하기가 매우 어렵기 때문에 기업가치평가에서 널리 사용되고 있는 가중평균자본비용(Weighted Average of Cost of Capital, WACC) 개념에 조정계수 또는 추가 위험프리미엄(Spread 또는 risk premium)을 적용중 임.

표. 할인율 모형.

구분	기존모형	개선모형
자기자본비용	상장기업 CAPM+사업화 위험프리미엄+안정성 위험프리미엄+규모 프리미엄	상장기업 CAPM+규모 위험프리미엄+기술사업화 위험프리미엄
타인자본비용	타인자본비용+추가위험 스프레드	좌동
할인율	WACC	좌동
문제점 및 개선	- 자기자본비용의 안정성 위험프리미엄 타당성 부족 - 경기나 금리변동에 따른 즉시성 부족	- 자기자본비용의 안정성 위험프리미엄 제외 - 매년 적용 할인율 갱신

- ③ 위 모형에 따라 자기자본비용과 타인자본비용을 가중평균하여 할인율인 WACC를 산출하며, 그 산식은 아래와 같음.

$$\text{할인율(WACC)} = \text{자기자본비용} \times \text{자기자본비율} + \text{타인자본비용} \times \text{타인자본비율} \times (1-\text{법인세율})$$

- ④ 본 사업에서는 이러한 개선된 할인율 모형을 기반으로 하여 할인율(WACC)를 산출하였으며, 산출된 할인율은 5.16%임.

(4) 수익성 지표 산출

- (가) 순현재가치(NPV; Net Present Value)는 개발기간 및 매출추정기간 동안의 여유현금흐름을 현재시점으로 환산한 금액으로 NPV가 0 이상일 경우 수익성이 있다고 판단한다. 본 사업에서는 NPV가 104백만 원으로 0보다 크므로 수익성이 있는 것으로 판단됨.
- (나) 내부수익률(IRR; Internal Rate of Return)은 개발기간 및 매출추정기간 동안 여유현금흐름의 현재가치를 0으로 만드는 이자율로 IRR이 NPV 산정시의 할인율인 5.16%보다 크면 수익성이 있는 것으로 판단한다. 본 사업에서 IRR은 5.84%로 5.16%보다 크므로 수익성이 있는 것으로 판단됨.
- (다) 투자수익률(ROI; Return on Investment)은 투자한 자본에 대한 수익의 비율을 나타내



는 지표로, 본 사업에서는 매출추정기간 동안의 여유현금흐름 현재가치 합계액을 개발기간 동안의 개발비지출액의 현재가치 합계액으로 나누어 산정한다. ROI가 100%보다 크면 수익성이 있는 것으로 판단되며, 본 사업에서 ROI는 119.11%로 100%보다 크므로 수익성이 있는 것으로 판단됨.

표. 경제성 분석.

(단위: 백만 원)

구 분	개발기간					매출추정기간					분석 결과
	1차	2차	3차	4차	5차	1차	2차	3차	4차	5차	
	년도	년도	년도	년도	년도	년도	년도	년도	년도	년도	
	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	
매출액						3,329	3,841	4,459	5,214	6,125	
매출원가						2,557	2,950	3,425	4,005	4,705	
판관비						556	642	745	871	1,023	
영업이익						216	249	289	338	397	
법인세 등						23	30	38	48	59	
감가상각비 등						302	348	404	473	555	
운전자본증감 액						608	94	113	138	166	
자본적지출액						1,458	526	619	735	872	
개발비지출액	130	130	105	105	105						
투자액회수											3,247
여유현금흐름	-130	-130	-105	-105	-105	-1,572	-52	-76	-110	3,101	
현가계수	0.9509	0.9509	0.9509	0.9509	0.9043	0.8599	0.8177	0.7776	0.7394	0.7031	
현재가치	-124	-124	-100	-100	-95	-1,352	-43	-59	-81	2,181	
NPV											104
IRR											5.84%
ROI											119.11%

(5) 경제적 파급효과

(가) 생산유발효과

- ① 대상기술의 개발 사업으로 인한 산업전반에 걸친 경제적 파급효과를 객관적으로 추정하기 위해 한국은행의 산업연관분석을 이용하여 평가하였으며, 대상기술이 속한 첨단 기술업종의 생산유발계수 및 사업화 이후 5년간 생산유발효과는 다음과 같음.

표. 생산유발효과.

(단위: 백만 원)

산업분야	첨단기술업종			생산유발계수		1.119
구 분	2020년	2021년	2022년	2023년	2024년	합계
매출 추정액	3,329	3,841	4,459	5,214	6,125	22,968
생산유발효과	3,725	4,298	4,990	5,834	6,854	25,701

② 생산유발계수는 어떤 산업부문의 최종수요가 한 단위 증가하였을 때 이를 충족시키기 위하여 각 산업부문에서 직/간접적으로 유발되는 생산액 수준을 나타내며, 추정되는 매출액에 대한 산업전반의 생산유발 효과는 5년간 총 25,701백만 원에 이르는 것으로 분석됨.

(나) 부가가치유발효과

① 부가가치유발계수는 어떤 산업부문의 최종수요가 한 단위 발생할 경우 각산업부문에서 직·간접으로 유발되는 부가가치 단위를 나타낸다. 연도별 부가가치유발효과는 부가가치유발계수에 해당연도 추정매출액을 곱하여 나타난 값으로, 대상기술이 속한 첨단기술업종 분야의 부가가치유발계수는 0.619이고, 사업화 이후 5년간 부가가치유발효과는 총 14,217백만 원에 이르는 것으로 분석됨.

표. 부가가치유발효과.

(단위: 백만 원)

산업분야	첨단기술업종			부가가치유발계수		0.619
구 분	2020년	2021년	2022년	2023년	2024년	합계
매출 추정액	3,329	3,841	4,459	5,214	6,125	22,968
부가가치유발효과	2,061	2,378	2,760	3,227	3,791	14,217

(다) 취업유발효과

표. 취업유발효과.

(단위: 백만 원)

산업분야	첨단기술업종			고용유발계수		8.96/10억원
구 분	2020년	2021년	2022년	2023년	2024년	합계
매출 추정액	3,329	3,841	4,459	5,214	6,125	22,968
고용유발효과	30	34	40	47	55	206

- ① 취업유발계수는 어떤 산업부문의 최종수요가 일정금액(10억 원) 증가할 경우 각 산업 부문에서 직·간접으로 유발되는 고용지수를 나타내며, 대상기술이 속한 전기변환·공급제어장치 분야의 취업유발계수는 매출 10억 원당 8.96명이고, 사업화 이후 5년간 약 206명의 취업유발효과가 예상된다.

다. 결론

(1) 생산성

(가) 기존 사과 재배방식과 조직배양을 통한 배양방식을 살펴보면, 기존 재배방식은 건전묘 생산 저하 가능성 높음, 바이러스 감염정도가 높음 등의 단점을 가지는 반면, 조직배양방식은 배양용기를 통한 우량 건전묘 생산 용이 및 바이러스 감염율을 현저히 낮출 수 있는 것으로 전망됨.

(나) 또한 경제적 비용의 경우 기존 재배방식이 조직배양방식 대비 표면적으로는 가격이 저렴한 것으로 나타나나, 최종 생산량으로 비교했을 때 기존 재배방식은 바이러스 감염 피해로 인한 생산성 저하 가능성으로 인해 조직배양방식이 생산 측면에서의 경제성도 우수한 것으로 판단됨.

(2) 경제성

(가) 시장규모를 기반으로 한 예상시장점유율 및 예상 매출액 추정을 통해 경제성을 분석한 결과, 기준으로 순현재가치(NPV)는 104백만 원이며, 내부수익률(IRR)은 5.84%, 투자수익률(ROD)는 119.11%로 수익성이 있었음.

(나) 또한 5년간 생산유발효과는 25,701백만 원, 부가가치유발효과는 14,217백만 원 취업유발효과는 206명으로 예상되어 경제적 파급효과 또한 클 것으로 전망됨.

○ 3세부 과제

1. 사과묘 경제성 분석

(가) 실험 방법

- ① 비용 편익 분석(B/C analysis)는 일반적으로 정부의 공공투자사업을 현명하게 선정하는데 이용되는 절차와 방법을 다룸.
- ② 비용편익 분석은 정책결정자에게 중요한 의사결정 수단으로서 역할을 제공하며, 공공투자사업의 타당성 분석(feasibility analysis)의 하나라고 할 수 있음.
- ③ 비용 편익 분석은 기업차원의 재무분석과는 달리 사회적 관점 또는 국민경제 전체의 관점에 비용과 편익을 파악함.
- ④ 일반적으로 경제성 분석은 순현재가치(net present value: NPV), 편익/비용 비율(benefit-cost ratio: B/C Ratio), 내부수익률(internal rate of return: IRR)의 기법을 사용하여 시행함.
- ⑤ 순현재가치(net present value: NPV)는 미래의 여러 시점에서 발생할 현금의 순유출입(net cash flow)을 분석시점의 현재가치로 할인하여 더한 값으로서, 특정 프로젝트의 순현재가치를 나타내며 일반적으로 다음과 같이 구할 수 있음.

$$(1) \dots NPV = \sum_{t=1}^n \frac{B_t - C_t}{(1+r)^t}$$

- ⑥ 편익/비용 비율(benefit-cost ratio: B/C Ratio) 기준을 사용하여 각 사업이나 정책을 평가할 경우에는 편익의 현재가치의 합을 비용의 현재가치의 합으로 나누어 그 비율이

1이상이면 일반적으로 경제성이 있는 것으로, 1보다 작으면 경제성이 없는 것으로 판단하게 됨.

$$(2) \dots B/C \text{비율} = \frac{B}{C} = \frac{\sum_{t=1}^n \frac{B_t}{(1+r)^t}}{\sum_{t=1}^n \frac{C_t}{(1+r)^t}}$$

⑦ 내부수익률기준(internal rate of return, IRR)은 어떤 공공사업이나 정책의 순편익의 현재가치의 합, 즉 NPV를 0으로 만들어주는 할인율로 다음의 관계를 충족하는 I의 값이 됨.

⑧ 내부 수익률이 사회적 할인율로 선택되는 이자율보다 더 클 경우에는 사회경제적 측면에서 해당사업이 효율적인 사업으로 판단 가능함.

$$(3) \dots 0 = \sum_{t=1}^n \frac{B_t - C_t}{(1+I)^t}$$

표. 경제성 분석기법의 비교.

구분	판단기준	장점	단점
순현재가치 (NPV)	NPV > 0	•대안선택시 명확한 기본제시 •타분석에 이용가능 •장래발생편익의 현재가치제시	•할인율 사전선정 필수 •대안 선순위결정시 규모의 차이로 인한 오류발생가능
편익/비용비율 (B/C Ratio)	B/C비율 > 1	•이해용이 •사업규모 고려가능	•할인율 사전선정 필수 •상호 배타적 대안 의 오류발상가능
내부투자수익률 (IRR)	IRR > r	•사업상 수익성 측정가능 •타 대안과 비교가 용이 •평가과정과 경과 이해가 용이	•사업의 절대적 규모 비고려 •몇 개의 내부수익률이 동시에 도출될 가능성

(나) 실험결과

■ 무병종묘 생산 측면에서 온실 순화방식과 식물공장 순화방식 수익성 비교

1) 온실 순화방식 수익성

▷ 시설 설치비 및 유지관리비 추정

① 온실 시설 설치비용은 100만원/m<sup>2</sup>으로 추정되며, 100m<sup>2</sup> 규모를 설정할 경우 관련 비용은 100,000,000원임.

표. 온실 시설 설치비용.

구분	단가 및 비용
면적당 단가	1,000,000(원/m <sup>2</sup> )
면적	100m <sup>2</sup>
총비용	100,000,000원

② 시설 내용연수는 10년으로 가정하며, 정액법으로 계산한 연간 감가상각비는 매년 10,000,000(= 100,000,000/10)임.

③ 기타 유지관리비용은 시설비용의 10%로 가정함.

④ 총 감가상각 및 유지관리비용은 연간 20,000,000원으로 설정함.

▷ 온실 순화의 조수입 및 비용

① 온실 순화의 경우 단위 면적당 44.3주 생산이 가능하며, 연간 생산 횟수는 1회 생산기간을 60일로 할 경우 약 5회임. 연간 총 생산량은 22,132개이며, 상품화율의 71%와 단가 11,000원/주를 적용할 경우 연간 조수입은 172,854,000원으로 추정됨.

표. 온실 순화 조수입.

구분	값
시설면적(m <sup>2</sup> )	100
단위면적당 생산량	44.3
연간생산횟수	5
총생산량	22,132
상품화율	71%
단가	11,000
조수입	172,854,000

② 온실 순화의 경우 중간재 비용의 추정은 국가통계포털(kosis.kr)에 농업 부가가치율 34.9%를 사용함. 따라서 중간재 비율은 전체 조수입의 65.1%이며, 중간재 비용은 112,527,954원으로 추정됨.

③ 온실 순화의 인건비는 일일 투입 인원 1명일 경우 1일 작업시간 3시간, 총작업일은 300일이 예상되며 총 인건비는 12,408,300원으로 추정됨.

표. 온실 순화 인건비.

구분	값
투입인원(A)	1인
1일 작업시간(B)	3시간
총작업일	300일
평균시급(F)	13,787원/시간
인건비	12,408,300원

주: 평균시급(13,787원/시간)= 농림어업 숙련 종사자 월 총근로시간(178.5시간)/월 임금총액(2,461,000원)

④ 시설 투자 이후 온실 순화의 연간 수익은 47,917,746(=172,854,400-112,527,654-12,408,300)으로 추정됨.

▷ 경제성 분석 결과

① 자산의 내용연수는 10년으로 가정, 사회적 할인율(4.5%), 분석기간 10년으로 함.

② 분석 결과 B/C=1.36, NPV=101(백만원) 임.

표. 온실 순화 비용-편익 연차별 흐름표.

연도	비용			편익		
	시설비용	감가상각비 및 유지관리비용	합계	현재가치	수익	현재가치
2020	100,000,000	20,000,000	120,000,000	120,000,000		
2021		20,000,000	20,000,000	19,138,756	47,917,746	45,854,302
2022		20,000,000	20,000,000	18,314,599	47,917,746	43,879,715
2023		20,000,000	20,000,000	17,525,932	47,917,746	41,990,158
2024		20,000,000	20,000,000	16,771,227	47,917,746	40,181,969
2025		20,000,000	20,000,000	16,049,021	47,917,746	38,451,645
2026		20,000,000	20,000,000	15,357,915	47,917,746	36,795,833
2027		20,000,000	20,000,000	14,696,569	47,917,746	35,211,323
2028		20,000,000	20,000,000	14,063,703	47,917,746	33,695,046
2029		20,000,000	20,000,000	13,458,089	47,917,746	32,244,063
2030		20,000,000	20,000,000	12,878,554	47,917,746	30,855,563
합계				278,254,364		379,159,620

2) 식물공장 순화방식 수익성

▷ 시설 설치비 및 유지관리비 추정

- ① 식물공장 시설 설치 비용은 500만원/m<sup>2</sup>으로 추정되며, 100m<sup>2</sup> 규모를 설정할 경우 관련 비용은 500,000,000원임.

표. 식물공장 시설 설치비용.

구분	단가 및 비용
면적당 단가	5,000,000(원/m <sup>2</sup> )
면적	100m <sup>2</sup>
총비용	500,000,000원

- ② 시설 내용연수는 10년으로 가정하며, 정액법으로 계산한 연간 감가상각비는 매년 50,000,000(= 500,000,000/10)임.
- ③ 기타 유지관리비용은 시설 비용의 10%로 가정함.
- ④ 총 감가상각 및 유지관리비용은 연간 100,000,000원으로 설정함.

▷ 식물공장 순화의 조수입 및 비용

- ① 식물공장 순화의 경우 단위 면적당 105.8주 생산이 가능하며, 연간 생산 횟수는 1회 생산기간을 42일로 할 경우 약 8회임. 연간 총 생산량은 84,655개이며, 상품화율의 90%와 단가 17,000원/주를 적용할 경우 연간 조수입은 1,295,214,545원으로 추정됨

표. 식물공장 순화 조수입.

구분	값
시설면적(m <sup>2</sup> )	100
단위면적당 생산량	105.8
연간생산횟수	8
총생산량	84,655
상품화율	90%
단가	17,000
조수입	1,295,214,545

- ② 식물공장 순화의 경우 중간재 비용의 추정은 한국제조업 부가가치율 25.5%(산업연구원, 2019)를 사용함. 따라서 중간재 비율은 전체 조수입의 74.5%이며, 중간재 비용은 964,934,836원으로 추정됨
- ③ 식물공장 순화의 인건비는 일일 투입 인원 1명일 경우 1일 작업시간 1시간, 총작업일은 360일이 예상되며 총 인건비는 4,963,320원으로 추정됨

표. 온실 순화 인건비.

구분	값
투입인원(A)	1인
1일 작업시간(B)	1시간
총작업일	360일
평균시급(F)	13,787원/시간
인건비	4,963,320원

주: 평균시급(13,787원/시간)= 농림어업 숙련 종사자 월 총근로시간 (178.5시간)/월 임금총액(2,461,000원)

- ④ 시설 투자 이후 식물공장 순화의 연간 수익은 325,316,389(=1,295,214,545-964,934,836-4,963,320)으로 추정됨

▷ 경제성 분석 결과

- ① 자산의 내용연수는 10년으로 가정, 사회적 할인율(4.5%), 분석기간 10년으로 함.
- ② 분석 결과 B/C=1.85, NPV=1,183(백만원) 임.

표. 식물공장 순화 비용-편익 연차별 흐름표.

연도	비용				편익	
	시설비용	감가상각비 및 유지관리비용	합계	현재가치	수익	현재가치
2020	500,000,000	100,000,000	600,000,000	600,000,000		
2021		100,000,000	100,000,000	95,693,780	325,316,389	311,307,549
2022		100,000,000	100,000,000	91,572,995	325,316,389	297,901,961
2023		100,000,000	100,000,000	87,629,660	325,316,389	285,073,647
2024		100,000,000	100,000,000	83,856,134	325,316,389	272,797,748
2025		100,000,000	100,000,000	80,245,105	325,316,389	261,050,477
2026		100,000,000	100,000,000	76,789,574	325,316,389	249,809,069
2027		100,000,000	100,000,000	73,482,846	325,316,389	239,051,740
2028		100,000,000	100,000,000	70,318,513	325,316,389	228,757,646
2029		100,000,000	100,000,000	67,290,443	325,316,389	218,906,839
2030		100,000,000	100,000,000	64,392,768	325,316,389	209,480,228
합계				1,391,271,818		2,574,136,905

■ 사과 생산 농가 측면에서 일반묘와 바이러스 검정묘 재배시 경제성 비교

1) 비용추정

▷ 사과 소득 및 생산비 비용

- ① 경제성 분석은 10a의 사과 농가를 대상으로 하며 관련 소득 및 생산비 자료는 다음 같음.



표. 사과(2018년 전국전체) 소득자료.

(기준: 년/10a)

구분		수량	단가(원)	금액(원)	
총 수 입	주산물가액		2,173kg	2,523	5,483,306
	부산물가액				90,789
	계				5,574,095
생 산 비	경 영 비	중 간 재 비	무기질비료비		55,158
			유기질비료비		96,751
			농약비		373,324
			수도광열비		90,845
			기타재료비		327,324
			소농구비		10,362
			대농구상각비		383,429
			영농시설상각비		193,676
			수리유지비		46,686
			과수원조성비		314,881
			기타비용		41,572
	중간재비 계		1,933,758		
	임차료		4,522		
	위탁영농비		9,407		
	고용노동비		529,563		
	경영비계		2,534,365		
	자가노동비		1,555,238		
유동자본용역비		48,932			
고정자본용역비		134,472			
토지자본용역비		303,004			
생산비계		4,576,010			
부가가치				3,640,337	
소득				3,039,730	
부가가치율				65.3	
소득율				54.5	

자료: 농축산물소득자료집(농촌진흥청, 2018)

▷ 사과 개원비 추정

- ① 과원의 개원비는 크게 기반조성비, 묘목 및 재식비, 지주설치비로 구성되며 관련 비용은 다음과 같음.
- ② 기반조성비는 평탄작업 및 관수시설이 포함되어 있으며 10a당 비용은 1,478,000원으로 추정됨.

표. 기반조성비.

(단위: 원/10a)

구분	단가 및 비용
평탄작업	220,000
퇴비살포	510,500
암거배수시설	502,500
목초중자파종	35,000
관수시설	210,000
계	1,478,000

자료: 농촌진흥청, 「농축산물 소득조사 분석」, 재구성

- ③ 묘목의 경우 밀식재배를 가정하여 10a에 136주가 재식되는 것을 가정하였으며 일반묘의 경우 후지 후브락스 1등급 16,000/주, 바이러스 검정묘의 경우 주당 20,000원을 적용함.
- ④ 따라서 일반묘의 경우 묘목 및 재식비는 2,211,100/10a이며, 바이러스 검정묘의 경우 2,755,100/10a로 추정됨.

표. 묘목 및 재식비.

(단위: 원/10a)

구분	수량	단가	묘목 금액	재식비	계
일반묘	136	16,000	2,176,000	35,100	2,211,100
바이러스 검정묘	136	20,000	2,720,000	35,100	2,755,100

- ⑤ 지주설치비는 자재비, 인건비 등이 포함되어 있으며 10a당 비용은 1,022,480원으로 추정됨.

표. 지주설치비.

(단위: 원/10a)

구분	단가 및 비용
자재비	652,480
인건비	320,000
임차료	50,000
계	1,022,480

- ⑥ 일반묘의 경우 총 개원비는 4,711,580/10a이며, 바이러스 검정묘의 경우 5,255,580/10a로 추정됨.

표. 일반묘와 바이러스 검정묘의 개원비.

(단위: 원/10a)

구분	기반조성비	묘목비 재식비	지주설치비	개원비계
일반묘	1,478,000	2,211,100	1,022,480	4,711,580
바이러스 검정묘	1,478,000	2,755,100	1,022,480	5,255,580

## 2) 바이러스 검정묘의 편익추정

### ▷ 생산량 증가 편익

- ① 국내 과원 대부분이 바이러스에 감염되는 것으로 추정되며, 바이러스는 나무의 성장, 과실의 상품성에 많은 영향을 미침. “과수 묘목 생산·유통의 과제와 개선방안(대구경북연구원)”에 따르면 바이러스 피해로 인해 수량이 20~40% 감소하는 것으로 추정됨. 따라서 본 경제성 분석에서는 바이러스 검정묘의 경우 일반묘의 수량보다 20% 증가하는 것으로 가정함.

### ▷ 당도 증가 편익

- ① “과수 묘목 생산·유통의 과제와 개선방안(대구경북연구원)”에 따르면 바이러스 피해로 인해 당도가 2~5 Bx 감소하는 것으로 추정되며, “농업전망 2020(한국농촌경제연구

원)에 따르면 당도 1Bx 증가시 가격은 2.9% 상승하는 것으로 나타남. 따라서 본 경제성  
 석에서는 바이러스 검정묘의 경우 일반묘의 당도보다 1Bx 증가하는 것으로 가정함.

3) 일반묘와 바이러스 검정묘의 수익성 비교 결과

① 10a 기준으로 일반묘의 경우 B/C=1.09, NPV=3,218,390원이며, 바이러스 검정묘의 경우  
 B/C=1.33, NPV=11,712,877로 추정됨.

표. 일반묘 비용-수익 연차별 흐름표

비목별	1년차	2년차	3년차	4년차	5년차	6년차	7년차	8년차	9년차	10년 차	11년 차	12년 차	13년 차	14년 차	15년 차	합계
수량			57	414	1,275	2,173	2,173	2,173	2,173	2,173	2,173	2,173	2,173	2,173	2,173	
단가			2,523	2,523	2,523	2,523	2,523	2,523	2,523	2,523	2,523	2,523	2,523	2,523	2,523	
수익계			143,811	1,044,522	3,216,825	5,482,479	5,482,479	5,482,479	5,482,479	5,482,479	5,482,479	5,482,479	5,482,479	5,482,479	5,482,479	
수익현재가치			126,021	875,886	2,581,345	4,209,972	4,028,682	3,855,198	3,689,184	3,530,320	3,378,297	3,232,820	3,089,607	2,960,300	2,832,909	33,394,640
과원조성비	4,711,580															
무기질비료비	70,500		5,057	16,119	20,955	55,158	55,158	55,158	55,158	55,158	55,158	55,158	55,158	55,158	55,158	
유기질비료비	435,000		54,992	109,984	164,976	96,751	96,751	96,751	96,751	96,751	96,751	96,751	96,751	96,751	96,751	
농약비		10,702	51,372	77,057	100,174	373,075	373,075	373,075	373,075	373,075	373,075	373,075	373,075	373,075	373,075	
광열 동력비		4,828	19,314	31,867	54,175	90,845	90,845	90,845	90,845	90,845	90,845	90,845	90,845	90,845	90,845	
계제료비		19,230	57,600	109,611	241,144	327,324	327,324	327,324	327,324	327,324	327,324	327,324	327,324	327,324	327,324	
소농구비		1,061	3,429	3,429	4,801	10,362	10,362	10,362	10,362	10,362	10,362	10,362	10,362	10,362	10,362	
대농구상각비		9,038	45,189	67,784	128,789	333,429	333,429	333,429	333,429	333,429	333,429	333,429	333,429	333,429	333,429	
영농시설상각 비	187,498	4,307	33,103	39,724	51,641	193,676	193,676	193,676	193,676	193,676	193,676	193,676	193,676	193,676	193,676	
위탁양농비	260,000					9,407	9,407	9,407	9,407	9,407	9,407	9,407	9,407	9,407	9,407	
고용노동비		35,100	42,822	64,233	89,926	529,563	529,563	529,563	529,563	529,563	529,563	529,563	529,563	529,563	529,563	
자갈노력비		27,029	107,035	128,442	218,351	1,555,238	1,555,238	1,555,238	1,555,238	1,555,238	1,555,238	1,555,238	1,555,238	1,555,238	1,555,238	
용역비	241,775	301,780	461,954	509,612	542,139	486,408	486,408	486,408	486,408	486,408	486,408	486,408	486,408	486,408	486,408	
비용계	5,906,353	413,055	881,957	1,157,862	1,617,071	4,111,236	4,111,236	4,111,236	4,111,236	4,111,236	4,111,236	4,111,236	4,111,236	4,111,236	4,111,236	
비용현재가치	5,652,012	378,247	772,856	970,938	1,297,620	3,157,001	3,021,053	2,880,960	2,766,469	2,647,339	2,533,338	2,424,247	2,319,854	2,219,956	2,124,360	35,176,250

표 . 바이러스 검정료 비용-수익 연차별 흐름표.

비목별	1년차	2년차	3년차	4년차	5년차	6년차	7년차	8년차	9년차	10년차	11년차	12년차	13년차	14년차	15년차	합계
수량			68	497	1,530	2,608	2,608	2,608	2,608	2,608	2,608	2,608	2,608	2,608	2,608	
단가			2,596	2,596	2,596	2,596	2,596	2,596	2,596	2,596	2,596	2,596	2,596	2,596	2,596	
수익계			177,578	1,289,776	3,972,136	6,769,765	6,769,765	6,769,765	6,769,765	6,769,765	6,769,765	6,769,765	6,769,765	6,769,765	6,769,765	
수익현재가치			155,611	1,081,556	3,187,444	5,198,474	4,974,616	4,760,398	4,555,405	4,359,239	4,171,521	3,991,886	3,819,986	3,655,489	3,498,076	47,409,702
과원조성비	5,255,580															
무기질비료비	70,500		5,057	16,119	20,955	55,158	55,158	55,158	55,158	55,158	55,158	55,158	55,158	55,158	55,158	
유기질비료비	435,000		54,992	109,984	164,976	96,751	96,751	96,751	96,751	96,751	96,751	96,751	96,751	96,751	96,751	
농약비		10,702	51,372	77,057	100,174	373,075	373,075	373,075	373,075	373,075	373,075	373,075	373,075	373,075	373,075	
광열 동력비		4,828	19,314	31,867	54,175	90,845	90,845	90,845	90,845	90,845	90,845	90,845	90,845	90,845	90,845	
제제료비		19,230	57,690	109,611	241,144	327,324	327,324	327,324	327,324	327,324	327,324	327,324	327,324	327,324	327,324	
소농구비		1,061	3,429	3,429	4,801	10,362	10,362	10,362	10,362	10,362	10,362	10,362	10,362	10,362	10,362	
대농구상각비		9,038	45,189	67,784	128,789	383,429	383,429	383,429	383,429	383,429	383,429	383,429	383,429	383,429	383,429	
영농시설상각비	187,498	4,307	33,103	39,724	51,641	193,676	193,676	193,676	193,676	193,676	193,676	193,676	193,676	193,676	193,676	
위탁영농비	260,000					9,407	9,407	9,407	9,407	9,407	9,407	9,407	9,407	9,407	9,407	
고용노동비		35,100	42,822	64,233	89,936	529,563	529,563	529,563	529,563	529,563	529,563	529,563	529,563	529,563	529,563	
자기노력비		27,029	107,065	128,442	218,351	1,555,238	1,555,238	1,555,238	1,555,238	1,555,238	1,555,238	1,555,238	1,555,238	1,555,238	1,555,238	
용역비	241,775	301,760	461,954	509,612	542,139	486,408	486,408	486,408	486,408	486,408	486,408	486,408	486,408	486,408	486,408	
비용계	6,450,353	413,055	881,957	1,157,862	1,617,071	4,111,236	4,111,236	4,111,236	4,111,236	4,111,236	4,111,236	4,111,236	4,111,236	4,111,236	4,111,236	
비용현재가치	6,172,587	378,247	772,856	970,938	1,297,620	3,157,001	3,021,053	2,980,960	2,786,469	2,647,339	2,533,338	2,424,247	2,319,854	2,219,956	2,124,360	35,606,825

### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 3-1. 목표

##### ◎ 총괄 목표

구분	목표	평가지표
1년차 (2015)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 사과 대목 생장점배양 통한 무병종묘 유도체계 확립</li> <li>○ 대목용 소식물체 재배조건 확립 및 재배시스템 선정</li> <li>○ 우리나라 사과 바이러스 유전자원 조사</li> <li>○ 사과 유래 분자마커 선발 및 시설재배용 포트규격 최적화</li> <li>○ 산업현장의 문제점 도출과 개발 기술의 적용</li> <li>○ 사과 바이러스 감염 실태 및 바이러스 집중</li> </ul>	<p>품종별 우량 무병대목 확보</p> <p>재배조건 및 시스템 선정</p> <p>바이러스 분리 및 감염률 조사</p> <p>마커 선발 및 포트규격 최적화</p> <p>현장에로사항 발굴</p> <p>바이러스 감염 실태 조사 및 집중</p>
2년차 (2016)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 무병종묘 획득률 증진 기술 개발</li> <li>○ 순화 및 발근 촉진 지하부 환경 제어 기술 개발</li> <li>○ 품종동정 위한 분자마커 개발 및 지하부 최적 배지 환경 개발</li> <li>○ 바이러스 검출법 평가</li> <li>○ 사과무병종묘 최적 번식 방법 개발</li> <li>○ 사과 바이러스 무병묘의 유목기 수체 생육 특성 검정</li> </ul>	<p>기내 발근 유도 및 과수화 억제 기술 개발</p> <p>물리적, 화학적 지하부 순화 및 발근 촉진 기술 개발</p> <p>품종 동정 마커 개발 및 지하부 환경 조건 개발</p> <p>검출법 및 검출감도 조사</p> <p>접목 방법 비교 분석</p> <p>유목기 바이러스 검정 및 생육 특성 비교</p>

3년차 (2017)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 배양단계 및 품종별 배양조건 최적화 및 시스템화</li> <li>○ 순화 및 생장 촉진 지상부 환경 제어 기술 개발</li> <li>○ 품종 특이적 분자마커 개발 및 지하부 최적 배지 환경 개발</li> <li>○ 주요 사과 바이러스 및 묘목생산단계별 최적 검출법 선정</li> <li>○ 사과무병종묘 저장조건 개발</li> <li>○ 사과 바이러스 무병묘의 유목기 수체 생육 특성 검정</li> </ul>	<p>대용량 생물반응기 배양 조건 개발</p> <p>지상부 환경 조건 개발</p> <p>품종 특이적 마커 개발 및 지하부 환경 조건 개발</p> <p>묘목 생산 단계별 검출법 비교</p> <p>수확시기 및 저장조건 도출</p> <p>유목기 바이러스 검정 및 생육 특성 비교</p>
4년차 (2018)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 생물반응기 시스템 이용한 무병종묘 대량생산 시스템 개발</li> <li>○ 기내배양 사과 접목묘 생산을 위한 환경제어 기술 개발</li> <li>○ 변이검정용 고효율 마커 개발 및 지상부 온도, 광환경 구명</li> <li>○ 주요 사과 바이러스 최적 검출법 효율화 연구</li> <li>○ 사과무병종묘 유통체계 개발</li> <li>○ 사과 바이러스 무병묘의 성과기 수체 생육 특성 검정</li> </ul>	<p>배양묘 독립영양화 및 변이 최소화</p> <p>환경제어 조건 개발</p> <p>마커셋 구성 및 지상부 환경 조건 개발</p> <p>바이러스 검출 속도 개선</p> <p>사과포트묘 포장 및 운송 방법 개발</p> <p>성과기 바이러스 검정 및 생육 특성 비교</p>
5년차 (2019)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 사과무병 기본식물 생산</li> <li>○ 안정적 묘 생산 대규모 하드웨어 구축 및 패키지 기술 개발</li> <li>○ 품종동정 시스템 구축 및 지상부 온도, 광환경 구명</li> <li>○ 주요 사과 바이러스에 대한 고감도 검출법 확립</li> <li>○ 고효율 사과무병종묘 생산 모델화</li> <li>○ 사과 바이러스 무병묘의 성과기 수체 생육 특성 검정</li> </ul>	<p>무병묘 보급 및 기술이전</p> <p>대규모 생산 시스템 구축</p> <p>품종동정시스템 및 포트재배기술 확립</p> <p>주요 바이러스 검정법 확립</p> <p>사과무병종묘 생산 모델화</p> <p>바이러스 무독묘 우수성 입증</p>
<b>최 종</b>	시설원예를 이용한 사과무병종묘 대량생산체계 및 산업화 구축	대량생산 체계 및 산업화 구축 여부

### 3-2. 목표 달성여부

가. 제1세부과제 : 사과무병종묘 변이검정용 마커 개발 및 시설내 안정증식 육묘법 개발

연차별 목표	연구목표	평가지표	가중치	달성도	자체평가	
1차년도	1-1	• 사과 다형성 마커 탐색	사과 마커 탐색 및 선발 50개 이상	40	100	• 다형성 평가를 위한 SSR 마커 50개 이상 최종선발 하였음.
	1-2	• 조직배양하여 순화/발 근된 사과무병대목 재 배를 위한 포트 종류/ 용적 선정	대목용 포트 종류 및 용적 개발 1건	60	100	• 대목의 포트 재배를 위한 적절한 용적을 구명하였 음.
2차년도	2-1	• 국내 사과 품종 동정 을 위한 분자마커 탐 색 및 선발	사과 품종 동정용 마커 탐색 및 선발 50개 이상	40	100	• 주요 사과 품종을 동정하 기 위하여 GBS분석으로 확인된 SNP를 CAPS 마커 로 전환하였음.
	2-2	• 접목을 실시하여 사과 묘목을 재배하기 위한 포트의 용적 선정	무병종묘 포트 종류 및 용적 개발 1건	60	100	• 접목묘의 포트재배를 위 한 최적 용적(20L)과 규격 (높이43cm)을 구명하였음.
3차년도	3-1	• 국내 사과 품종 특이 적 분자마커 선발/적 용 및 genotyping 데 이터 구축	품종 특이적 마커의 genotyping 데이터 구축 1건	40	100	• CAPS마커를 이용하여 주 요 사과 품종에 대한 genotyping 데이터를 구축 하였음.
	3-2	• 포트 배지환경 구성에 따른 사과무병종묘의 최적생육환경 개발	지하부 최적 환경 조건 개발 1건	60	100	• 대목묘와 접목묘의 포트 재배를 위한 적절한 배지 조성을 위한 실험을 통해 원예용상토가 적합함을 확인함.
4차년도	4-1	• 분자마커를 사용한 육 묘 변이 검정	품종 판별용 마커셋 구성 1건	40	100	• CAPS마커를 이용하여 품 종 판별을 위한 마커셋을 도출하였음.
	4-2	• 지상부 환경 구성에 따른 사과무병종묘의 최적생육환경 개발	지상부 최적 환경 조건 개발 1건	60	100	• 접목묘의 포트재배시 생 육기내 시설내 차광은 최 소화해야함을 실험결과를 통해 도출함.
5차년도	5-1	• 육묘 단계별 변이 확	품종 동정	40	100	• 사과유래 SSR과 CAPS마



		인을 위한 품종 동정 시스템 구축	시스템 구축 1건			커의 genotyping 데이터를 통해 육묘단계별 품종 동정이 가능한 시스템을 구축함.
	5-2	<ul style="list-style-type: none"> <li>사과무병종묘의 타당성 확립 및 시설 사과 무병종묘 포트재배 기술 개발</li> </ul>	과실 특성 차이 분석 1건	60	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>포트 재배를 위해 구명된 환경조건을 적용하여 우량 접목묘를 높은 비율로 확보할 수 있었으며, 포트 재배를 통해 확보한 접목묘의 과실 특성이 문제없음을 확인하여, 사과무병종묘의 타당성을 확인하였음.</li> </ul>

나. 제2세부과제 : 사과 왜성대목 및 상업적품종 무병종묘 대량생산 기술 개발

연 차 별 목표	연구목표	평가지표	가중치	달성도	자체평가	
1차년도	1-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>지역산업체로부터 우량 왜성대목 및 우수형질의 품종 확보</li> </ul>	우량 왜성대목 2 품종 확보	40	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>연구는 위한 왜성대목 M.9과 M.26 2년생 재배묘 확보 완료함.</li> </ul>
	1-2	<ul style="list-style-type: none"> <li>물리, 화학적 조절을 통한 사과 왜성대목 무병종묘 생산 기술 개발</li> </ul>	왜성대목 무병묘 품종별 100주 이상 확보	60	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ribavirin 20-25mg/L와 32℃ 고온처리 2회 반복을 통해 왜성대목 2계통에서 무병묘 100주 이상 확보 및 무병묘 생산기술 확립하였음.</li> </ul>
2차년도	2-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>배양단계별 품종별 배양조건 최적화</li> </ul>	Multiple-shoots 유도 조건 3건	50	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>생장점 배양, multiple shoots 유도 및 발근 조건 등 배양단계별 배양조건 최적화 완료함.</li> </ul>
	2-2	<ul style="list-style-type: none"> <li>과수화 발생 억제 조건 구명</li> </ul>	기내발근 유도 및 과수화 억제 조건 2건	50	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>품종별 과수화 발생율이 다름을 확인하고, 이를 억제하기 위한 조건을 구명하였음.</li> </ul>
3차년도	3-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>사과 무병종묘 생산용 생물반응기 시스템 개발</li> </ul>	종묘생산용 생물반응기 시스템 개발	40	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>Balloon type bioreactor에서 multiple shoot 증식과 발근 시스템 개발 완료.</li> </ul>
	3-2	<ul style="list-style-type: none"> <li>Scale-up 대용량 생물반응기 시스템을 이용</li> </ul>	대용량 생물반응기	40	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>대용량 scale-up culture를 위해 간헐적침지 방식의</li> </ul>

		한 무병종묘 대량생산	배양 조건 : 3건			생물반응기(TIS)의 배양조건 3건을 확립함.
	3-3	• 접수용 무병종묘 생산 기술개발	접수용 무병주 3품종 확보	20	100	• 접수용 2품종(‘홍로’, ‘후지’) 기외 개체를 확보하고, chemotherapy와 thermotherapy를 통해 2품종의 무병주 획득함.
4차년도	4-1	• 광독립영양배양을 통한 순화용 무병종묘 육성 기술개발	배양묘 독립영양화율 80% 이상	50	100	• 환기, 저당, 고광 조건으로 6주간 배양시 광독립 영양 완료 및 이를 통한 순화용 무병묘 육성기술 개발함.
	4-2	• DNA 함량 분석을 통한 건전묘 조기 스크리닝	변이율 5% 이하 유지	30	100	• Flow cytometry 분석법을 이용해 변이를 분석한 결과 2년 이상 증식되어 온 왜성대목 품종들에서 변이발생율이 0%였음.
	4-3	• 무병 왜성대목과 접수를 이용한 micro-grafting 기술개발	기내접목활착율 80% 이상	20	100	• 기내 왜성대목 M.9과 M.26에 접수로 기내배양된 ‘홍로’를 micrografting 하여 약 80% 이상 접목활착하여 미세접목활착기술 개발함.
5차년도	5-1	• 첨단환경조절실 구축	첨단환경조절실 구축 유무	20	100	• 무병배양묘 생산 후 무병 유지재배를 위한 망실재배 시설 구축함.
	5-2	• 사과 무병주묘 생산을 위한 기내배양 시스템 및 기내 접목기술 프로토콜 확립	기개발 기술의 프로토콜화 5건	40	100	• 무병주 배양 단계별 개발된 배양조건 5개를 프로토콜화하여 [식물세포주 은행시스템]에 등록함.
	5-3	• 우량 무병종묘의 농가 보급 및 관련 지역산업체에 기술보급	사과 무병주묘 보급 및 기술이전 2건	40	100	• 현재까지 과제를 통해 우량 무병묘를 생산하고 보급하였으며, 지역 산업체에 기술이전을 완료하였음.

다. 제3세부과제 : 기내 배양 사과 무병종묘 대량 생산을 위한 환경조절 기술 개발

연차별 목표	연구목표	평가지표	가중치	달성도	자체평가	
1차년도	1-1	• 기내 배양 사과 대목의 기본 환경 조건 확립	재배 배양액 처방 개발 및 농도 제시	60	100	• 사과묘 순화시 성장 증진을 위한 배양액을 개발하였음.
	1-2	• 기내 배양 사과 대목의 안정적인 순화 및 발근을 위한 재배 시스템 선정	재배 시스템 1건 선정	40	100	• 수경재배 시스템 중 DFT 시스템을 적정 재배 시스템으로 선정함.
2차년도	2-1	• 순화 및 발근 촉진을 위한 지하부 물리적 환경조건 구명	물리적 재배 환경 조건: 2건 발근향상율: 30%	60	100	• 배양액의 용존산소에 대한 영향을 구명하였으며, 관련 시스템을 특허 등록하였으며, 기술이전을 하였음.
	2-2	• 순화 및 발근 촉진을 위한 지하부 화학적 처리조건 구명	화학적 처리 조건: 2건 발근향상율: 30%	40	100	• 옥신처리에 따른 발근율의 향상을 구명하였음.
3차년도	3-1	• 순화 촉진을 위한 지상부 환경조건 구명 (온도, 습도)	지상부 환경 조건: 2건	50	100	• 순화를 통한 생존율향상을 위한 온도와 습도 조건을 구명하였음.
	3-2	• 성장 촉진을 위한 지상부 환경 조건 구명 (광, 이산화탄소)	지상부 환경 조건: 2건	50	100	• 성장 촉진을 위한 광도, 광질 및 이산화탄소 농도에 대한 조건을 확립함.
4차년도	4-1	• 기내 배양 사과 접수의 기외 삼목률 향상을 위한 환경조건 구명	환경 제어 조건: 2건 삼목향상율 30%	60	100	• 대목과 접수용 M.9, M.26, 홍로의 성장 증진을 위한 광환경(광질) 조건을 구명함
	4-2	• 유경 접목을 위한 환경조건 구명	환경 제어 조건: 2건 접합향상율 30%	40	100	• M.9(대목)과 ‘홍로’ (접수)를 사용하여 유경접목을 실시함.
5차년도	5-1	• 기내배양 사과 소식물체의 순화 및 발근 촉진을 위한 특화된 대규모 시스템 구축	대규모 생산 시스템 구축 유무	40	100	• 기내배양 사과 소식물체의 순화 및 발근 촉진을 위한 3동의 스마트팜을 구축함.
	5-2	• 전·후방 기술과의 유기적 연결을 위한 패	패키지화된 기술: 1건	60	100	• 사과묘 뿐 만 아니라 다른 조직배양묘의 최적 광

		키지 기술 개발				원 선정을 위한 기술을 개발하고 기내배양 사과 묘에 대한 경제성 분석을 실시함
--	--	----------	--	--	--	---

라. 제4세부과제 : 사과무병종묘 바이러스 검정법 확립

연 차 별 목표	연구목표	평가지표	가중치	달성도	자체평가	
1차년도	1-1	• 채집 및 유전자은행 등을 통해 사과 바이러스 분리주 확보	확보한 사과 바이러스 분리주 20개	30	100	• 일일초에 바이러스를 기계식 접종하여 증식시킴.
	1-2	• 국내 유통 사과 묘목의 바이러스 감염 현황 조사	감염률 조사 100주 이상	70	100	• 충북, 충남, 전북, 강원 지역에서 4가지 사과 품종 ‘후지’, ‘후지후브락스’, ‘홍로’, ‘자홍’ 을 대상으로 감염현황을 조사하였음.
2차년도	2-1	• 주요 사과 바이러스에 대한 각 검출법 효율 탐색	검출법 3종 비교	40	100	• RT-PCR 조건에서 Two step RT-PCR, One step RT-PCR, Hotstart one setp RT-PCR 3가지 방법을 비교분석하였음.
	2-2	• 사과 품종에 따른 바이러스 검출감도 변화 연구	3품종 이상 검출감도 조사	40	100	• 사과 묘목에 바이러스에 감염된 수체의 가치를 접목하여 바이러스 검출여부를 비교하였으나 차이가 없었음.
	2-3	• 사과 무병종묘에 발생하는 주요 사과 바이러스 감염 현황 조사	바이러스 검정 무병종묘 100개 이상	20	100	• 사과 무병종묘에는 주로 바이러스 2종(ACLSV, ASGV)과 바이로이드 1종(ASSVd)가 주로 복합감염되어있음을 확인.
3차년도	3-1	• 검출법에 따른 주요 바이러스 검출 감도 및 속도 비교	바이러스 4종 검출 비교	50	100	• Hotstart 기능이 포함된 One step RT-PCR로 증폭하는 것이 가장 검출 감도가 높으며 효율적인 것으로 확인함.
	3-2	• 기내배양, 발근, 순화, 육묘 등 각 묘목생산	묘목생산단계별 40주	50	100	• 시료의 부위별 검출 효율에는 큰 차이가 없는 것

		단계별 바이러스 검출 법 탐색	이상 검출법 비교			을 확인하였으며 바이러 스별 시료 부위에 따른 검출효율의 차이가 없으 므로 싹눈이 가장 적합한 검출조직으로 판단됨. 특 히, ACLSV 및 변이체의 정확한 검출은 개화기 때 실시되는 것이 효율적일 것으로 예상됨.
4차년도	4-1	• 단기간에 많은 양을 처리할 수 있도록 시 스템 개선	처리속도 개선 결과 1건	50	100	• 주요 바이러스를 검정하 기 위한 최적의 방법을 시료채집 및 보관, 동결건 조 및 균질화, Total RNA 추출, RT-PCR 및 전기영 동으로 특징지어진 가이 드라인을 제시하였음.
	4-2	• Multiplex PCR 가능성 검정	Multiplex PCR 결과 1건	50	100	• multiplex PCR을 이용한 바이러스 검출은 가능한 것을 확인하였지만, 검출 감도가 낮으므로 Hotstart 의 기능이 있는 One step RT-PCR로 검정하는 것이 가장 적합한 것으로 도출 함.
5차년도	5-1	• 최적 검출법 선발	최적 검출법 제시 1건	30	100	• 모든 검출법을 고려하였을 때, Hotstart one setp RT-PCR을 이용하는 것이 검출감도를 고려할 때 가 장 적합한 것으로 도출함. 특히, ACLSV type의 특이 적인 최적 검출법을 Allel PCR 원리를 이용하여 type 별로 구분할 수 있는 최적 검출법을 제시하였음.
	5-2	• 시설원예 활용 사과무 병종묘 생산시스템에 서 주요 바이러스 고 효율검정법 확립	주요 바이러스 검정법 확립 1건	70	100	• 주요 바이러스를 검정하 기 위한 최적의 방법을 시료채집 및 보관, 동결건 조 및 균질화, Total RNA

						추출, RT-PCR 및 전기영동으로 특징지어진 가이드라인을 제시하였음.
--	--	--	--	--	--	---

마. 제1협동과제 : 사과무병종묘 접목번식법 및 저장법 개발과 유통 체계 모델화

연 차 별 목표	연구목표	평가지표	가중치	달성도	자체평가
1차년도	<ul style="list-style-type: none"> <li>산업현장의 문제점 도출과 개발 기술의 적용</li> </ul>	현장애로서 향 발굴 1건	100	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>과수무병종묘 생산을 위한 번식방법, 저장 등을 포함한 문제점을 도출하고 해결 방안을 도출하였음.</li> </ul>
2차년도	<ul style="list-style-type: none"> <li>사과무병종묘 최적 번식 방법 개발</li> </ul>	접목 방법 2건 비교	100	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>관행적인 접사를 고용한 제자리 깎기접의 높은 인건비 문제를 기계접을 적용하여 개선하였으며, 봄철 이상저온에 의한 동해를 예방하고 활착율을 높이기 위한 적절한 접목묘 재식시기를 도출하였음.</li> </ul>
3차년도	<ul style="list-style-type: none"> <li>사과무병종묘 저장 조건 개발</li> </ul>	수확 시기 및 저장 조건 도출 1건	100	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>1년생 접목묘의 겨울철 이상저온에 의한 동해피해를 극복하기 위해서 가을 굴취 후 톱밥에 가식하여 저장하였음.</li> </ul>
4차년도	<ul style="list-style-type: none"> <li>사과무병종묘 유통 체계 개발</li> </ul>	사과포트묘 포장 및 운송 방법 개발 1건	100	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>사과포트묘를 10주 단위로 묶음 포장하였으며, 판매 수량에 따라 재배 농민에게 판매하기 위한 적절한 차량 운송수단을 정리 및 도출하였음.</li> </ul>
5차년도	<ul style="list-style-type: none"> <li>고효율 사과무병종묘 생산 모델화</li> </ul>	모델화 된 기술 확립 1건	100	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>기내배양을 통해 대량생산된 대목묘를 순화처리하고 1년간 포트재배하여 확보된 대목묘를 활용하여 사과무병 접목묘를 생산하고 제품화하였음.</li> </ul>

바. 제2협동과제 : 사과 바이러스 무병묘의 생육 단계별 특성검정

연 차 별 목표	연구목표		평가지표	가중치	달성도	자체평가
1차년도	1-1	사과 왜성 대목(M.9 및 M.26) 및 접수별 생산 및 유통 현황 조사	대목 및 접수 유통 현황 10개 업체 과약	50	100	대목 및 접수 생산 및 유통 업체 현황 조사 완료 함
	1-2	사과 왜성 대목 및 접수의 바이러스 감염률 조사	10개 업체에 대한 바이러스 검정	30	100	대목 및 접수의 바이러스 감염률 조사 완료 함
	1-3	사과 바이러스 무병 묘목 식재 및 주요 바이러스 접종	식재한 사과 무병 종묘의 바이러스 10조합 접종	20	100	무병묘 대목에 바이러스 감염주 접수를 접목하여 접종 실시 완료 함
2차년도	2-1	사과나무 수관 부위별(눈, 결과지, 잎 등) 잠복 바이러스 발현 여부 조사	10조합 유목기 수관 부위별 바이러스 검정	50	100	동일 나무 내 과일, 결과지, 잎의 바이러스 감염 여부 조사 완료 함
	2-2	바이러스 접종 묘목과의 수체 생육량 비교	10조합 수체 생육량 비교	50	100	바이러스 조합별 수체 생육 조사 완료
3차년도	3-1	사과나무 수관 부위별(눈, 결과지, 잎 등) 잠복 감염 바이러스 발현 여부 조사	10조합 유목기 수관 부위별 바이러스 검정	50	100	동일 나무 내 과일, 결과지, 잎의 바이러스 감염 여부 조사 완료 함
	3-2	바이러스 접종 묘목과의 수체 생육량 비교	10조합 수체 생육량 비교	50	100	바이러스 조합별 수체 생육 조사 완료
4차년도	4-1	사과나무 수관 부위별(과일, 눈, 결과지, 잎 등) 잠복 감염 바이러스 발현 여부 조사	10조합 성과기 수관 부위별 바이러스 검정	50	100	동일 나무 내 과일, 결과지, 잎의 바이러스 감염 여부 조사 완료 함
	4-2	바이러스 접종 묘목과의 상품성 및 수량성 비교	10조합 과일 생산성 및 상품성 차이	50	100	바이러스 조합별 수체 생육 조사 완료
5차년도	5-1	사과나무 수관 부위별(과일, 눈, 결과지, 잎 등) 잠복 감염 바이러스 발현 여부 조사	10조합 성과기 수관 부위별 바이러스 검정	50	100	동일 나무 내 과일, 결과지, 잎의 바이러스 감염 여부 조사 완료함



	5-2	바이러스 접종 요목과의 상품성 및 수량성 비교	10조합 과일 생산성 및 상품성 차이	50	100	바이러스 조합별 수채 생육 조사 완료
--	-----	------------------------------	----------------------------	----	-----	-------------------------

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

## 4. 연구결과의 활용 계획 등

<제1세부>

### 가. 추가 연구의 필요성

- (1) 조직배양 과정에서 발생하는 변이묘 검정을 위해서는 유전체 전체에 고르게 분포한 단일염기서열 수준의 변이를 탐색할 수 있는 SNP 마커를 이용하는 것이 가장 이상적인 것으로 판단됨.
- (2) 조직배양과 대량배양기술을 기반으로 생산되는 ‘후지’, ‘홍로’, M.9, M.26의 조직배양 사과무병종묘의 신뢰도를 높이기 위해, 조직배양묘의 변이를 SNP 수준으로 탐색하는 방안을 모색할 필요가 있음
- (3) 현재까지 개발 및 상용화된 SNP 탐색기술은 검정을 위한 조직배양묘에 적용하기에 경제성이 확보되지 못한 상태임, 이를 극복하기 위한 추가 연구가 필요할 것으로 생각됨.
- (4) 식물공장을 이용한 사과무병묘의 생산을 높은 생존율을 보였으나 스마트온실에서의 묘 순화는 계절에 따라 높은 습도와 일정온도 유지가 힘든 경우가 있어 이에 대한 추가적인 연구가 필요함.
- (5) 높은 생존율을 보인 식물공장에서 순화된 사과무병묘 중 대목의 경우 줄기의 지름이 클수록 접목이 유리하기 때문에 줄기 직경 향상을 위한 추가적인 환경조절 연구가 필요함.
- (6) 시중에 유통되고 있는 묘목과 사과원에서 식재되고 있는 많은 사과나무가 이미 바이러스에 대부분 감염되어 있음. 바이러스 감염별 수채 생육 및 과실 특성 조사 결과 대부분의 바이러스가 발현되지 않아 큰 영향을 끼치고 있지 않은 것으로 조사되었으나, 많은 문헌에서 바이러스에 따른 문제점들이 상당수 보고되어 있음. 따라서 국내 사과나무에서도 현재는 문제가 발생되지 않고 있지만 발현 조건이 갖추어지면 향후 문제가 발생할 수 있으므로 바이러스 별 정확한 발현 조건에 대한 규명을 통해 발현을 방지하기 위한 후속 연구가 필요함

### 나. 연구 성과의 활용분야 및 활용방안

- (1) 본 연구를 통해 수행된 사과 유전자원에 대한 GBS 분석을 통해 국내 육성 사과 품종을 구분할 수 있는 SNP를 탐색하고, 이를 CAPS 마커로 전환하였음.
- (2) GBS 분석 유래 SNP를 이용한 양친 분석과 가계분석에 대한 논문게재 예정임.
- (3) GBS 분석을 통해 ‘홍로’의 아조변이 품종 ‘자홍’을 구분할 수 있는 분자마커를 개발하여 특허 출원하고, 참여기업인 <충림과수묘목영농조합법인>에 기술이전하여 육종가의 권리를 보호할 수 있는 도구로 이용될 것으로 기대됨.
- (4) 본 연구를 통해 국내에서 가장 널리 재배 및 생산되는 ‘후지’와 그 아조변이 품종인 ‘Jubilee 후지’, ‘Kiku8 후지’, ‘피텍스 후지’, ‘야다카후지’를 판별할 수 있는 S-SAP마커를 개발하였으며, 이 결과물 또한 육종가의 권리 보호와 국내 유전 및 육종 연구에 이용될 수 있을 것으로 기대됨.
- (5) Sequenc-specific amplification polymorphism(S-SAP) 마커 분석을 통한 ‘후지’와 ‘홍로’와 아조변이 품종의 구분에 대한 논문이 게재예정임.
- (6) 재배 연구를 통해 구명된 대목 및 접목묘의 포트재배를 위한 적정 포트 용적 및 규격,

지하부, 지상부 환경조건 등을 포함한 재배기술 2건은 참여기업인 <충림과수묘목영농조합법인>에 기술이전하여 포트묘 생산을 위한 제반 기술을 확보하였음.

- (7) 본 연구를 통해 조직배양 사과묘의 순화를 위한 환경조건 조성으로 순화 및 생존률을 대폭 향상 시킬 수 있음을 확인하였으며 이를 기반으로 양질의 사과묘 생산을 이룰 수 있음.
- (8) 식물공장은 많은 에너지가 투입되는 식물생산시스템으로 경제성 확보가 시급한데, 조직배양과 연계한 무병과수묘목의 생산을 식물공장 산업의 새로운 비즈니스 모델로 자리잡을 수 있음.
- (9) 본 과제를 통해 개발된 사과묘 순화 기술은 패키지화하여 다른 과수묘목에 적용할 수 있기 때문에 과수묘목 산업의 전반에 활용될 수 있음.

## 붙임. 참고문헌

- Adams, A. N., Guise, C. M., Crossley, S.J. 1999. Plum pox virus detection in dormant plum trees by PCR and ELISA. *Plant. Pathol.* 48:240-244.
- Al Rwahnih, M., Turturo, C., Minafra, A., Saldarelli, P., Myrta, A., Palla ´s, V. and Savino, V. 2004. Molecular variability of Apple chlorotic leaf spot virus in different hosts and geographical regions. *Journal of Plant Pathology.* 86:117-122.
- Allen, W. R. 1969. Occurrence and seed transmission of tomato bushy stunt virus in apple. *Canadian Journal of Plant Science.* 49:797-799.
- Arai, S., Fukushima, C., Nakazawa, N., and Segawa, K.. 1990. Susceptibility of apple root stock infected with apple chlorotic leaf spot virus to white root rot and violet root rot. *Annu. Rep. Soc. Plant Protect. N. Jpn.* 41:92-93.
- Bae, Y. S. 2016. Development of multiplex RT-PCR for apple viruses and viroid and the incidence of apple viral disease in Gyeongsangbuk-do. Unpublished Master Thesis, Department of Applied BioSciences, Kyungpook National University.
- Bar-Joseph, M., Martelli, G. P. 1991. Capilloviruses. In: *Classification and Nomenclature of Viruses: 5th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* pp. 339-340.
- Burnt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L. 1996. *Viruses of plants-descriptions and lists from the VIDE database.*
- Callaway, A., Giesman-Cookmeyer, D., Gillock, E. T., Sit, T. L. and Lommel, S. A. 2001. The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. *Annual Review of Phytopathology.* 39:419-460.
- Cembali, T., Folwell, R. J., Wandschneider, P., Eastwell, K. C. and Howell, W. E. 2003. Economic implications of a virus prevention program in deciduous tree fruits in the US. *Crop Protection.* 22:1149-1156.
- Cambell, A., and Sparks, T. R. 1976. Experiments with dapple apple virus. *Acta Hortic.* 67:261-264.
- Chen, S., Zhou, Y., Ye, T., Hao, L., Guo, L., Fan, Z., Li, S. and Zhou. T. 2014. Genetic variation analysis of Apple chlorotic leaf spot virus coat protein reveals a new phylogenetic type and two recombinants in China. *Archives of Virology.* 159(6):1431-1438.

- Cho, I. S., Kim, D. H., Kim, J. R., Chung, B. N., Cho, J. D., and Choi, G. S.. 2010. Occurrence of pome fruit viruses on pear trees (*Pyrus pyrifolia*) in Korea. *Res. Plant Dis.* 16:326-330. (In Korean)
- Desvignes, J.C. 1999. *Virus diseases of fruit trees.* Ctifl, Paris. pp 86-122.
- Dhir, S., Zaidi, A. A. and Hallan, V. 2013. Molecular characterization and recombination analysis of the complete genome of Apple chlorotic leaf spot virus. *Journal of Phytopathology.* 161:704-712.
- Di Serio, F., Malfitano, M., Alioto, D., Ragozzino, A. and Flores, R. 2002. Apple dimple fruit viroid: sequence variability and its specific detection by multiplex fluorescent RT-PCR in the presence of Apple scar skin viroid. *Journal of Plant Pathology.* 27-34.
- Dursunoglu, S., Ertunc, F. 2008. Distribution of Apple mosaic ilarvirus (ApMV) in Turkey. *Acta Horticulturae* 781:131-134.
- Fuchs, E., Gruntzig, M. and Merker, D. 1985. Serologischer Vergleich verschiedener isolate des Stammfurchungs-Virus des Apfels (Apple stem grooving virus) und des Chlorotischen Blattfleckungs-Virus des Apfels (Apple chlorotic leaf spot virus). *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz.* 21:427-435.
- Fulton, R. W. 1972. Apple mosaic virus. *CMI/AAB Descriptions of plant viruses,* 83.
- German, S., Candresse, T., Lanneau, M., Huet, J. C., Pernollet, J. C. and Dunez, J. 1990. Nucleotide sequence and genomic organization of Apple chlorotic leaf spot closterovirus. *Virology.* 179:104-112.
- German-Retana, S., Bergey, B., Delbos, R. P., Candresse, T. and Dunez, J. 1997. Complete nucleotide sequence of the genome of a severe cherry isolate of apple chlorotic leaf spot trichovirus (ACLSV). *Archives of Virology.* 142:833-841.
- Griesbach, J. A. 1995. Detection of tomato ringspot virus by polymerase chain reaction. *Plant Disease.* 79(10):1054-1056.
- Hadidi, A., Barba, M. 2011. Economic impact of pome and stone fruit viruses and viroids. In: Hadidi, A., Barba, M., Candresse, W., Jelkman, W. (eds) *Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits.* APS Press, St Paul. pp. 1-7.

- Hadidi, A., Barba, M., Hong, N., Hallan, V. 2017. Apple Scar Skin Viroid. *Viroids and Satellites*. pp. 217–228.
- Han, J. Y., Kim, J. K., Cheong, J. S., Seo, E. Y., Park, C. H., Ju, H. K., Cho, I. S., Gotoh, T., Moon, J. S., Hammond, J. and Lim, H. S. 2015. Survey of Apple chlorotic leaf spot virus and Apple stem grooving virus occurrence in Korea and frequency of mixed infections in Apple. *Journal of the Faculty of Agriculture*. 60(2):323–329.
- Hassan, M., Myrta, A., and Polak, J. 2006. Simultaneous detection and identification of four pome fruit viruses by one-tube pentaplex RT-PCR. *J. Virol. Methods* 133: 124–129.
- Hirata, H., Lu, X., Yamaji, Y., Kagiwada, S., Ugaki, M., Namba, S. 2003 A single silent substitution in the genome of Apple stem grooving virus causes symptom attenuation. *J Gen Virol* 84:2579–2583.
- Hong, K. H., Kim, Y. S., Kim, W. C., Kim, J. B., Lee, U. J., Lee, E. J., Cho, W. D., and Cho, E. K. 1985. Studies on the abnormal spot disease in pear leaf. *Res. Rept. RDA (Hort.)* 27:46–55. (In Korean)
- James, D., Rao, G. P., Myrta, A. and Ling, K. S. 2008. Apple stem grooving virus. *Characterization, diagnosis and management of plant viruses. Volume 2: horticultural crops*. pp. 37–53.
- Jelkmann, W. 1996. The nucleotide sequence of a strain of Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) responsible for plum pseudopox and its relation to an apple and plum bark split strain. *Phytopathology*. 86:101.
- Ji, Z., Zhao, X., Duan, H., Hu, T., Wang, S., Wang, Y., Cao, K. 2013 Multiplex RT-PCR detection and distribution of four apple viruses in China. *Acta. Virol.* 57:435–441.
- Kim, D. H., Kim, H. R., Heo, S., Kim, S. H., Kim, M. A., Shin, I. S., Kim, J. H., Cho, K. H., and Hwang, J. H. 2010. Occurrence of apple scar skin viroid and relative quantity analysis using real-time RT-PCR. *Res. Plant Dis.* 16:247–253. (In Korean)
- Kim, H. R., Heo, S., Shin, I.-S., Kim, J. H., Cho, K.-H., and Kim, K. H. 2009. Effects on apple tree growth and fruit quality by virus-infection. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 27(SUPPL. II): 115. (In Korean)
- Kim, H. R., Lee, S. H., Lee, D. H., Kim, J. S., Yun, K. O., and Jang, H. I. 2005. Transmission of apple scar skin viroid through grafting, seed and pruning scissors. *Kor. J.*

Hort. Sci. Technol. 23(Suppl. 1): 42. (In Korean)

- Kim, J. S., Lee, S. H., Choi, H. S., Kim, M. K., Kwak, H. R., Nam, K., Kim, J. S., Choi, G. S., Cho, J. D., Cho, I. S., and Chung, B. N. 2011. Occurrence of virus diseases on major crops in 2010. Res. Plant Dis. 17:334-341. (In Korean)
- Kim, D. H., Kim, H. R., Heo, S., Kim, S. H., Shin, I. S., Kim, J. H., Cho, K. H. and Hwang, J. H. 2010. Detection and occurrence of Apple scar skin viroid using Real time RT-PCR based on SYBR-Green. Research in Plant Disease. 16:385. (Abstract)
- Kim, H. R., Kim, J. S., Hwang, J. H., Lee, S. H., Choi, G. S., and Choi, Y. M. 2004. Influence of ACLSV-infection on fruit quality of ‘Hongro’ apples. Research in Plant Disease. 10:145-149.
- Kim, J. S., Lee, S. H., Choi, H. S., Kim, M. K., Kwak, H. R., Nam, M., Kim, J. S., Choi, G. S., Cho, J. D., Cho, I. S. and Chung, B. N. 2011. Occurrence of virus diseases on major crops in 2010. Research in Plant Disease. 17:334-341.
- Kinard, G., Scott, S., and Barnett, O. 1996. Detection of apple chlorotic leaf spot and apple stem grooving viruses using RT-PCR. Plant Dis. 80:616-621.
- Koganezawa, H., Yang, X., Zhu, S. F., Hashimoto, J., Hadidi, A., 2003. Apple scar skin viroid in apple. In: Hadidi, A., Flores, R., Randles, J. W., Semancik, J. S.(Eds.), Viroids. CSIRO Publishing, Collingwood, VIC, Australia, pp. 137-141.
- [KSPP] The Korean Society of Plant Pathology. 2009. List of plant diseases in Korea (5<sup>th</sup> ed.). pp.184-195.
- KOSIS. 2019. Korean Statistical Information Service, www.kosis.kr.
- Kwak, H. R., Kim, M. K., Kim, J. D., Lee, S. H., Kim, J. S., Kim, K. H., and Choi, H. S. 2009. Virus disease incidences of apple in Korea. Res. Plant Dis. 24:218. (Abstract)
- Kwon, M. J., Hwang, S. L., Lee, S. J., Lee, D. H., and Lee, J. Y. 2002. Detection and distribution of apple scar skin viroid-Korean strain (ASSVd-K) from apples cultivated in Korea. Plant Pathol. J. 18:342-344.
- Lee, S. H., Kwon, Y. S., Shin, H. M., Nam, S. Y., Hong, E. Y., Kim, B. K., Kim, D. E., Cha, B. J. and Cha, J. S. 2017. Survey on Virus Infection for Commercial Nursery Trees of Major Apple Cultivars in Korea. Research in Plant Disease. 23(4):355-362.



- Lee, G., Kim, J. H., Kim, J. R., Shin, I. S., Cho, K. H., Kim, S. H., Shin J., and Kim, D. H. 2013. Production system of virus-free apple plants using heat treatment and shoot tip culture. *Res. Plant Dis.* 19:288-293. (In Korean)
- Lee, J. H., Park, J. K., Lee, D. H., Uhm, J. Y., Ghim, S. Y., and Lee, J. Y. 2001. Occurrence of apple scar skin viroid -Korean strain (ASSVd- K) in apples cultivated in Korea. *Plant Pathol. J* 17:300-304.
- Lei, Z. and Julius, K. I. 2017. Construction of Full-length Infectious cDNA Clones of Apple chlorotic leaf spot virus and Their Agroinoculation to Woody Plants by a Novel Method of Vacuum Infiltration. *Plant Disease.* 101:2110-2115.
- Leone, G., Lindner, J. L., van der Meer, F. A., Schoen, C. D., 1998. Symptoms on apple and pear indicators after back-transmission from *Nicotiana occidentalis* confirm the identity of Apple stem pitting virus with Pear vein yellows virus. *Acta Hort.* 472:61-65.
- LISTER, R.M. 1970. Apple chlorotic leaf spot virus. *Descriptions of Plant Viruses.* 30(6):2005.
- Lister, R. M.1970, Apple chlorotic leaf spot virus (CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses no. 30). Kew, UK : CMI/AAB.
- Liu, P., Zhang, L., Zhang, H., Jiao, H., and Wu, Y. 2013. Detection and molecular variability of Apple stem grooving virus in Shaanxi, China. *J. Phytopathol.* 161:445-449.
- Lu, R., Folimonov, A., Shintaku, M., Li, W. X., Falk, B. W., Dawson, W. O. and Ding, S. W. 2004. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 101:15742-15747.
- Martelli, G. P., Candresse, T. and Namba, S. 1994. Trichovirus, a new genus of plant viruses. *Archives of Virology.* 134:451-455.
- Martelli, G. P., Flores, R. and Schneider, B. 2011. Classification of pome and stone fruit viruses, viroids and phytoplasmas. *In: Hadidi, A., Barba, M., Candresse, T., Jelk-mann, W. (Eds.). Virus and virus-Like Disease of Pome and Stone Fruits.* APS Press (pp. 13-16).
- Marini, D. B., Gibson, P. G. and Scott, S. W. 2008. The complete nucleotide sequence of an isolate of apple chlorotic leaf spot virus from peach (*Prunus persica* (L.) Batch).

Archives of Virology. 153:1003–1005.

- Menzel, W., Jelkmann, W., and Maiss, E. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *J. Virol. Methods* 99:81–92.
- Millikan, d. F., and Martin, W. R. 1956. An unusual fruit dimple symptom in apple. *Plant Dis. Rep.* 40:229–230.
- Mink, G. I. 1989. Apple chlorotic leaf spot. In: *Virus and Viruslike Diseases of Pome Fruits and Simulating Noninfectious Disorders*. (Ed. P.R. Fridlund), Cooperative Extension College of Agriculture and Home Economics Washington State University. Pullman, W.A., pp. 34–39.
- Nam, K. W., and Kim, C. H. 1994. Studies on the pear abnormal leaf spot disease. I. Occurrence and damage. *Kor. J. Plant Pathol.* 10:169–174. (In Korean)
- Nemchinov, L., Hadidi, A., Verderevskaya, T. 1995. Detection and partial characterization of a Plum Pox Virus isolate from infected sour cherry *Acta Hort.* 386:226–236.
- Nemeth, M. V. 1986. *The Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees*. Boston, MA : Kluwer Academic Publishers Group, pp 840–850.
- Niu, F. Q., Pan, S., Wu, Z. J., Jiang, D. M. and Li, S. F. 2012. Complete nucleotide sequences of the genomes of two isolates of apple chlorotic leaf spot virus from peach (*Prunus persica*) in China. *Archives of Virology.* 157:783–786.
- Oh, S. D., Hong, S. B., and Kim, Y. H. 1973. Studies on virus disorder of top worked apple tree: II. On virus susceptibility of various apple rootstocks and on their symptoms. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 14:1–6. (In Korean)
- Ohtsuka, Y. 1938. On Manshu-sabika-byo of apple, graft transmission and symptom variation in cultivars. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sic.* 9:282–286.
- Park, H. L., Yoon, J. E., Kim, H. R., and Baek, K. H. 2006. Multiplex RT-PCR assay for the detection of Apple stem grooving virus and Apple chlorotic leaf spot virus in infected Korean apple cultivars. *Plant Pathol. J.* 22:168–173.
- Pasquini, G., Faggioli, F., Pilotti, M., Lumia, V., Barba, M., Hadidi, A. 1998. Characterization of Apple chlorotic leaf spot virus isolates from Italy. *Acta Hort.* 472:195–202.

- Petrzik, K. Lenz, O. 2011. Apple mosaic virus in pome fruits. In: Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits (Hadidi A., M. Barba, T. Candresse, W. Jelkmann, ed.), American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 25–28.
- Polak, J. and Svoboda, J. 2006. The reliability of detection and the distribution of Apple chlorotic leafspot virus in pears in the Czech Republic. *Horticulture Science*. 33:7–10.
- Rana, T., Chandel, V., Kumar, Y., Ram, R., Hallan, V. and Zaidi, A. A. 2010. Molecular variability analyses of Apple chlorotic leaf spot virus capsid protein. *Journal of Biosciences*. 35:605–615.
- Sato, K., Yoshikawa, N. and Takahashi, T. 1993. Complete nucleotide sequence of the genome of an apple isolate of Apple chlorotic leaf spot virus. *Journal of General Virology*. 74:1927–1931.
- Smith, P. R., and Challen, D. I. 1972. Aetiology of the rosette and decline diseases of peach and interactions between *Prunus* necrotic ringspot, Prune dwarf, and dark green sunken mottle viruses. *Austr. J. Agric. Res.* 23:1027–1034.
- Svoboda, J., Polák, J. 2010. Relative concentration of Apple mosaic virus coat protein in different parts of apple tree. *Horticulture Science*. 37:22–26.
- Song, Y. S., Hong, N., Wang, L. P., Hu, H. J., Tian, R., Xu, W. X., Ding, F. and Wang, G. P. 2011. Molecular and serological diversity in Apple chlorotic leaf spot virus from sand pear (*Pyrus pyrifolia*) in China. *European Journal of Plant Pathology*. 130:183–196.
- Thomas, C. L., Leh, V., Lederer, C. and Maule, A. J. 2003. Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Virology*. 306:33–41.
- Walkey, D.G. 1991. Applied plant virology. 2nd ed, London : William Heinemann Ltd; 1985.
- Wang, L. P., Hong, H., Wang, G. P., Xu, W. X., Michelutti, R., Wang, A. M. 2010. Distribution of apple stem grooving virus and apple chlorotic leaf spot virus in infected in vitro pear shoots. *Crop Prot* 29:1447–1451.
- Wood, G. A. 1979. Virus and virus-like diseases of pome fruits and stone fruits in New Zealand. *DSIR Bull. Wellington* 226:87.

- Wu, Y. Q., Zhang, D. M., Chen, S. Y., Wang, X. F. and Wang W. H. 1998. Comparison of three ELISA methods for the detection of Apple chlorotic leaf spot virus and Apple stem grooving virus. *Acta Horticulturae*. 472:55-60.
- Yaegashi, H., Isogai, M., Tajima, H., Sano, T. and Yoshikawa, N. 2007. Combinations of two amino acids (Ala40 and Phe75 or Ser40 and Tyr75) in the coat protein of apple chlorotic leaf spot virus are crucial for infectivity. *Journal of General Virology*. 88:2611-2618.
- Yanase, H., Mink, G. I., Sawamura, K., Yamaguchi, A. 1990. Apple topworking disease. pp. 74-75
- Yanase, H., Koganezawa, H., Fridlund, P. R. 1989. Correlation of pear necrotic spot with pear vein yellows and apple stem pitting, and a flexuous filamentous virus associated with them. *Acta Hortic*. 235:157-158.
- Yoshikawa, N., Matsuda, H., Oda, Y., Isogai, M., Takahashi, T., Ito, T. and Yoshida, Y. 2001. Genome heterogeneity of Apple stem pitting virus in apple trees. *Acta Horticulturae*. 550:285-290.
- Yoshikawa, N. and Takahashi, T. 1988. Properties of RNAs and proteins of Apple stem grooving and Apple chlorotic leaf spot viruses. *Journal of General Virology*. 88:2611-2618.
- 농촌진흥청. 2007. 『농축산물 소득조사 분석』
- 농촌진흥청. 2018. 『농축산물 소득자료집』
- 산업연구원. 2019. 『한국 산업의 발전 잠재력과 구조 전환 방향』
- 채종현. 2016. 『과수 묘목 생산·유통의 과제와 개선방안』. 대구경북연구원
- 한국농촌경제연구원. 2019. 『농업전망 2020』
- 국가통계포털(kosis.kr)

[별첨 1]

## 연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 시설원예 특화를 위한 사과무병종묘 산업화기반 구축				
	(영문) Protected Horticultural Industrialization of Apple Virus-Free Stocks				
주관연구기관	충북대학교		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 충북대학교 산학협력단	
참 여 기 업	충립과수묘목영농조합법인			(성명) 김 대 일	
총연구개발비  (3,125,000천원)	계	3,125,000,000	총 연 구 기 간	2015. 07. ~ 2020. 06.(5년)	
	정부출연 연구개발비	2,500,000,000	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	70
	기업부담금	625,000,000		내부인원	56
	연구기관부담금	-		외부인원	14
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <p>1세부는 사과무병대목/종묘의 포트재배를 통한 안정증식 육묘법을 개발하고 품종동정 및 변이검정을 위한 분자마커를 개발 및 적용한다. 2세부에서는 조직배양기술로 사과무병종묘 원종 및 보급종을 확보하고, 안정적인 무병종묘 생산을 위한 패키지 기술을 개발한다. 3세부는 조직배양 소식물체의 순화 및 발근을 위한 환경 제어 기술을 개발한다. 4세부는 생육단계별 고효율 품종동정 및 바이러스 검정시스템을 구축한다. 1협동은 포트재배를 통해 생산된 사과무병종묘의 유통체계를 개발하고, 2협동은 사과 바이러스 감염현황을 조사하고 무병종묘의 수체 생육특성을 검정한다.</p> <p>○ 연구내용 및 결과</p> <p>1세부는 기내순화 소식물체의 포트 재배를 위한 지상부 및 지하부 환경조건을 구명하고, 변이검정과 품종동정을 위한 분자마커를 개발하였다. 2세부는 사과 대목 및 접수 품종의 조직배양을 통한 무병종묘 대량생산 유도체계를 확립하고, 무병종묘 원종(‘후지’, ‘홍로’, M.9)을 확보하였다. 3세부는 조직배양 및 대용량 생물반응기를 통해 생산된 소식물체의 기내순화 및 발근 촉진을 위한 환경 제어 기술을 개발하고 패키지화하였다. 4세부는 주요 사과 바이러스에 대한 기존 검출법 대비 효율적인 고감도 검출법을 확립하였다. 1협동은 사과무병종묘의 유통을 위한 저장조건 등을 구명하고 조직배양 무병대목을 이용하여 접목묘를 생산하고 제품화에 성공하여 사과무병종묘의 유통체계를 모델화하였다. 2협동은 주요 사과 바이러스의 국내 분포 현황을 조사하고, 무병종묘의 수체 생육 특성을 검정하였다.</p> <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <p>1세부에서는 시설사과무병종묘의 시설 재배를 위한 포트재배 기술을 기술이전하고 품종 동정을 위한 분자마커 세트를 특허등록 및 기술이전 하였다. 2세부에서는 주요 접수 및 대목 품종인 ‘후지’, ‘홍로’, M9의 무병묘를 증식용 기본식물로서 활용할 예정이다. 3세부는 사과조직배양묘의 정밀한 환경 제어를 통해 발근 및 순화를 촉진하는 기술을 개발하여 특허등록 및 기술이전 하였다. 1협동에서는 본 연구를 통해 생산된 조직배양대목묘를 활용하여 접목묘를 제품화하여 농가에 판매함으로써 사과무병종묘의 산업화 가능성을 확인하였다.</p>					

[별첨 2]

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

		과제번호	315003-5		
사업구분	농생명산업기술개발사업				
연구분야	농산/원예작물과학/원예작물시설		과제구분	단위	
사업명	농생명산업기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	시설원예 특화를 위한 사과무병종묘 산업화기반 구축		과제유형	(기초,응용,개발)	
연구기관	충북대학교 산학협력단		연구책임자	김대일	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2015.07.01. - 2016.06.30	500,000	125,000	625,000
	2차연도	2016.07.01. - 2017.06.30	500,000	125,000	625,000
	3차연도	2017.07.01. - 2018.04.30	417,000	104,250	521,250
	4차연도	2018.07.01. - 2019.02.28	417,000	104,250	521,250
	5차연도	2019.03.01. - 2020.06.30	666,000	166,500	832,500
	계	2015.07.01. - 2020.06.30	2,500,000	625,000	3,125,000
	참여기업	충림과수묘목영농조합법인			
상대국			상대국연구기관		

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2020. 08. 14

3. 평가자(연구책임자) : 김 대 일

소속	직위	성명
충북대학교	교수	김 대 일

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	
----	---



## I. 연구개발실적

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

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 아주우수

조직배양 기술을 이용한 사과무병종묘 대량 생산 시스템을 구축하고 주요 접수 및 대목 품종인 ‘후지’, ‘홍로’, M.9 3종의 무독화하여 증식을 위한 기본식물로써 증식 보유하고 있음. 대량 증식된 조직배양묘는 식물공장에서 정밀한 환경 제어를 통해 발근 및 순화를 촉진하는 기술을 개발하였음. 또한, 시설사과무병종묘의 시설 재배를 위한 포트재배 기술과 품종 동정을 분자마커 세트를 개발 및 기술이전 하였음. 무병종묘의 생산과정에서 최적 바이러스 검정 시스템을 구축하였음. 본 연구를 통해 생산된 사과무병종묘를 농가에 판매함으로써 사과무병종묘의 산업화 가능성을 확인하였음.

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 아주우수

기존 사과 재배방식에 비해 조직배양방식은 우량 건전묘 생산이 용이하고 바이러스 감염을 현저히 낮출 수 있으며, 이를 통해 최종 과실 생산량으로 비교했을 때 경제성 또한 우수한 것으로 판단됨. 시장 규모 기반 예상시장점유율 및 예상 매출액 기반 경제성 분석 결과, 본 기술의 투자 가치가 높은 것으로 생각됨.

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 아주우수

GBS 기술을 이용한 DNA 염기서열분석을 토대로 개발된 분자마커를 활용하여 ‘후지’, ‘홍로’ 등의 아조변이 품종의 구분을 가능케하여 육종가의 권리 보호에 이용될 수 있을 것으로 생각됨. 무병묘로 인증된 ‘후지’, ‘홍로’, M.9은 무병종묘 기본식물로써 묘목생산 업체에 보급하여 국내 무병종묘 보급에 기여할 수 있을 것으로 생각됨.

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 아주우수

2세부에서 조직배양 기술을 통해 생산된 대목을 3세부에서 기내에서 순화 및 발근 촉진처리 하였음. 1세부는 순화처리된 대목묘에 대해서 DNA 변이를 검정하고 기외에서 포트재배 하였음. 포트재배를 통해 확보된 우량 대목묘를 활용하여 1협동에서 접목을 실시하고, 사과무병 접목묘를 생산 및 판매까지 이뤄졌음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수

SCI 논문 10건, 비SCI논문 7건이 발표되었으며, 특허출원 및 등록을 각 7건 달성하였음. 학술발표(+12), 기술이전(+4), 기술료(+12백만원), 교육지도(+4), 홍보 전시(+1), 인력양성(+2), 매출액(+2.41백만원)은 모두 초과달성하였음.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
<b>제 1세부 : 사과무병종묘 변이검정용 마커 개발 및 시설내 안정증식 육묘법 개발</b>			
<b>① 사과무병종묘 변이검정용 마커 개발</b>			
• 사과 다형성 마커 탐색	10	100	• 다형성 평가를 위한 SSR 마커 50개 이상 최종선발하였음
• 국내 사과 품종 동정을 위한 분자마커 탐색 및 선발	10	100	• 주요 사과 품종을 동정하기 위하여 GBS분석으로 확인된 SNP를 CAPS 마커로 전환하였음.
• 국내 사과 품종 특이적 분자마커 선발/적용 및 genotyping 데이터 구축	10	100	• CAPS마커를 이용하여 주요 사과 품종에 대한 genotyping 데이터를 구축하였음.
• 분자마커를 사용한 육묘 변이 검정	10	100	• CAPS마커를 이용하여 품종 판별을 위한 마커셋을 도출하였음.
• 육묘 단계별 변이 확인을 위한 품종 동정 시스템 구축	10	100	• 사과유래 SSR과 CAPS마커의 genotyping 데이터를 통해 육묘단계별 품종 동정이 가능한 시스템을 구축함.
<b>② 환경조절시설을 이용한 안정증식육묘법 개발</b>			
• 조직배양하여 순화/발근된 사과무병대목(M.9/M.26) 재배를 위한 포트 종류/용적 선정	10	100	• 대목의 포트 재배를 위한 적절한 용적을 구명하였음
• 접목을 실시하여 사과묘목을 재배하기 위한 포트의 용적 선정	10	100	• 접목묘의 포트재배를 위한 최적 용적과 규격을 구명하였음.
• 포트 배지환경 조성에 따른 사과 무병종묘의 최적생육환경 개발	10	100	• 대목묘와 접목묘의 포트재배를 위한 적절한 배지조성 조건을 도출하였음.

<ul style="list-style-type: none"> <li>지상부 환경 조성에 따른 사과 무병종묘의 최적 생육환경 개발</li> </ul>	10	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>접목묘의 포트재배시 생육기 내 시설내 차광의 영향을 실험결과를 통해 도출함.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>사과무병포트종묘의 타당성 확립 및 시설 사과무병종묘 포트 재배 기술 개발</li> </ul>	10	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>포트 재배를 위해 구명된 환경조건을 적용하여 우량 접목묘를 높은 비율로 확보할 수 있었으며, 포트재배를 통해 확보한 접목묘의 과실 특성이 문제 없음을 확인하여, 사과 무병종묘의 타당성을 확인하였음.</li> </ul>
합계	100	100	

**제 2세부 : 사과 왜성대목 및 상업적품종 무병종묘 대량생산 기술 개발**

<ul style="list-style-type: none"> <li>지역산업체로부터 우량 왜성대목 및 우수형질의 품종 확보</li> </ul>	8	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>연구는 위한 왜성대목 M9과 M26 2년생 재배묘 확보 완료함.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>물리, 화학적 조절을 통한 사과 왜성대목 무병종묘 생산 기술 개발</li> </ul>	12	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ribavirin 20-25mg/L와 32℃ 고온처리 2회 반복을 통해 왜성대목 2계통에서 무병묘 100주 이상 확보 및 무병묘 생산 기술 확립하였음.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>배양단계별 품종별 배양조건 최적화</li> </ul>	10	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>생장점 배양, multiple shoots 유도 및 발근 조건 등 배양단계별 배양조건 최적화 완료함.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>과수화 발생 억제 조건 구명</li> </ul>	10	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>품종별 과수화 발생율이 다름을 확인하고, 이를 억제하기 위한 조건을 구명하였음.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>사과 무병종묘 생산용 생물반응기 시스템 개발</li> </ul>	8	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>Balloon type bioreactor에서 multiple shoot 증식과 발근 시스템 개발 완료.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Scale-up 대용량 생물반응기 시스템을 이용한 무병종묘 대량생산</li> </ul>	8	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>대용량 scale-up culture를 위해 간헐적침지 방식의 생물반응기(TIS)의 배양조건 3건을 확립함.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>접수용 무병종묘 생산 기술개발</li> </ul>	4	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>접수용 2품종(홍로, 후지) 기외 개체를 확보하고, chemotherapy와 thermotherapy를 통해 2품종의 무병주 획득함.</li> </ul>

• 광독립영양배양을 통한 순화용 무병종묘 육성 기술개발	10	100	• 환기, 저당, 고광 조건으로 6주간 배양시 광독립영양 완료 및 이를 통한 순화용 무병묘 육성기술 개발함.
• DNA 함량 분석을 통한 건전묘 조기 스크리닝	6	100	• Flow cytometry 분석법을 이용해 변이를 분석한 결과 2년 이상 증식되어 온 왜성대목 품종들에서 변이발생율이 0%였음.
• 무병 왜성대목과 접수를 이용한 micro-grafting 기술개발	4	100	• 기내 왜성대목 M9과 M26에 접수로 기내배양 된 홍로를 micrografting하여 약 80% 이상 접목활착하여 미세접목활착기술 개발함.
• 첨단환경조절실 구축	4	100	• 무병배양묘 생산 후 무병 유지재배를 위한 망실재배 시설 구축함.
• 사과 무병주묘 생산을 위한 기내배양 시스템 및 기내 접목기술 프로토콜 확립	8	100	• 무병주 배양 단계별 개발된 배양조건 5개를 프로토콜화하여 [식물세포주 은행시스템]에 등록함.
• 우량 무병종묘의 농가보급 및 관련 지역산업체에 기술보급	8	100	• 현재까지 과제를 통해 우량 무병묘를 생산하고 보급하였으며, 지역 산업체에 기술이전을 완료하였음.
합계	100	100	

**제 3세부 : 기내 배양 사과 무병종묘 대량 생산을 위한 환경조절 기술 개발**

• 기내 배양 사과 대목의 기본 환경 조건 확립	12	100	• 사과묘 순화시 성장 증진을 위한 배양액을 개발하였음.
• 기내 배양 사과 대목의 안정적인 순화 및 발근을 위한 재배 시스템 선정	8	100	• 수정재배 시스템 중 DFT시스템을 적정 재배 시스템으로 선정함.
• 순화 및 발근 촉진을 위한 지하부 물리적 환경조건 구명	12	100	• 배양액의 용존산소에 대한 영향을 구명하였으며, 관련 시스템을 특허 등록 하였으며, 기술이전을 하였음.
• 순화 및 발근 촉진을 위한 지하부 화학적 처리조건 구명	8	100	• 옥신처리에 따른 발근율의 향상을 구명하였음.

• 순화 촉진을 위한 지상부 환경 조건 구명(온도, 습도)	10	100	• 순화를 통한 생존율향상을 위한 온도와 습도 조건을 구명하였음.
• 생장 촉진을 위한 지상부 환경 조건 구명(광, 이산화탄소)	10	100	• 생장 촉진을 위한 광도, 광질 및 이산화탄소 농도에 대한 조건을 확립함.
• 기내 배양 사과 접수의 기외 삼목물 향상을 위한 환경조건 구명	12	100	• 대목과 접수용 M9, M26, 홍로의 생장 증진을 위한 광환경(광질) 조건을 구명함
• 유경 접목을 위한 환경조건 구명	8	100	• M9(대목)과 홍로(접수)를 사용하여 유경접목을 실시함.
• 기내배양 사과 소식물체의 순화 및 발근 촉진을 위한 특화된 대규모 시스템 구축	8	100	• 기내배양 사과 소식물체의 순화 및 발근 촉진을 위한 3동의 스마트팜을 구축함.
• 전·후방 기술과의 유기적 연결을 위한 패키지 기술 개발	12	100	• 사과묘 뿐 만 아니라 다른 조직배양묘의 최적 광원 선정을 위한 기술을 개발하고 기내배양 사과묘에 대한 경제성 분석을 실시함.
합계	100	100	

#### 제 4세부 : 사과무병종묘 바이러스 검정법 확립

• 채집 및 유전자은행 등을 통해 사과 바이러스 분리주 확보	6	100	• 일일초에 바이러스를 기계식 접종하여 증식시킴.
• 국내 유통 사과 묘목의 바이러스 감염 현황 조사	14	100	• 충북, 충남, 전북, 강원 지역에서 4가지 사과 품종 ‘후지’, ‘후지후브락스’, ‘홍로’, ‘자홍’ 을 대상으로 감염현황을 조사하였음.
• 주요 사과 바이러스에 대한 각 검출법 효율 탐색	8	100	• RT-PCR 조건에서 Two step RT-PCR, One step RT-PCR, Hotstart one setp RT-PCR 3가지 방법을 비교분석하였음.
• 사과 품종에 따른 바이러스 검출감도 변화 연구	8	100	• 사과 묘목에 바이러스에 감염된 수체의 가지를 접목하여 바이러스 검출여부를 비교하였으나 차이가 없었음.
• 사과 무병종묘에 발생하는 주요 사과 바이러스 감염 현황	4	100	• 사과 무병종묘에는 주로 바이러스 2종(ACLSV, ASGV)과 바

조사			이로이드 1종(ASSVd)가 주로 복합감염되어있음을 확인.
<ul style="list-style-type: none"> <li>검출법에 따른 주요 바이러스 검출 감도 및 속도 비교</li> </ul>	10	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hotstart 기능이 포함된 One step RT-PCR로 증폭하는 것이 가장 검출 감도가 높으며 효율적인 것으로 확인함.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>기내배양, 발근, 순화, 육묘 등 각 묘목생산단계별 바이러스 검출법 탐색</li> </ul>	10	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>시료의 부위별 검출 효율에는 큰 차이가 없는 것을 확인하였으며 바이러스별 시료 부위에 따른 검출효율의 차이가 없으므로 싹눈이 가장 적합한 검출조직으로 판단됨. 특히, ACLSV 및 변이체의 정확한 검출은 개화기 때 실시되는 것이 효율적일 것으로 예상된다.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>단기간에 많은 양을 처리할 수 있도록 시스템 개선</li> </ul>	10	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>주요 바이러스를 검정하기 위한 최적의 방법을 시료채집 및 보관, 동결건조 및 균질화, Total RNA 추출, RT-PCR 및 전기영동으로 특징지어진 가이드라인을 제시하였음.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Multiplex PCR 가능성 검정</li> </ul>	10	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>multiplex PCR을 이용한 바이러스 검출은 가능한 것을 확인하였지만, 검출감도가 낮으므로 Hotstart의 기능이 있는 One step RT-PCR로 검정하는 것이 가장 적합한 것으로 도출함.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>최적 검출법 선발</li> </ul>	6	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>모든 검출법을 고려하였을 때, Hotstart one setp RT-PCR을 이용하는 것이 검출감도를 고려할 때 가장 적합한 것으로 도출함. 특히, ACLSV type의 특이적인 최적 검출법을 Allel PCR 원리를 이용하여 type별로 구분할 수 있는 최적 검출법을 제시하였음.</li> </ul>

<ul style="list-style-type: none"> <li>시설원에 활용 사과무병종묘 생산시스템에서 주요 바이러스 고효율검정법 확립</li> </ul>	14	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>주요 바이러스를 검정하기 위한 최적의 방법을 시료채집 및 보관, 동결건조 및 균질화, Total RNA 추출, RT-PCR 및 전기영동으로 특징지어진 가이드라인을 제시하였음.</li> </ul>
합계	100	100	

**제 1협동 : 사과무병종묘 최적 번식 및 유통 체계 모델화**

<ul style="list-style-type: none"> <li>산업현장의 문제점 도출과 개발 기술의 적용</li> </ul>	20	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>과수무병종묘 생산을 위한 번식방법, 저장 등을 포함한 문제점을 도출하고 해결 방안을 도출하였음.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>사과무병종묘 최적 번식 방법 개발</li> </ul>	20	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>관행적인 접사를 고용한 제자리 깎기점의 높은 인건비 문제를 기계접을 적용하여 개선하였으며, 봄철 이상저온에 의한 동해를 예방하고 활착율을 높이기 위한 적절한 접목묘 재식시기를 도출하였음.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>사과무병종묘 저장 조건 개발</li> </ul>	20	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>1년생 접목묘의 겨울철 이상저온에 의한 동해피해를 극복하기 위해서 가을 굴취 후 톱밥에 가식하여 저장하였음.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>사과무병종묘 유통 체계 개발</li> </ul>	20	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>사과포트묘를 10주 단위로 묶음 포장하였으며, 판매 수량에 따라 재배 농민에게 판매하기 위한 적절한 차량 운송수단을 정리 및 도출하였음.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>고효율 사과무병종묘 생산 모델화</li> </ul>	20	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>기내배양을 통해 대량생산된 대목묘를 순화처리하고 1년간 포트재배하여 확보된 대목묘를 활용하여 사과무병 접목묘를 생산하고 제품화하였음.</li> </ul>
합계	100	100	

**제 2협동 : 사과 바이러스 무병묘의 생육 단계별 특성검정**

<ul style="list-style-type: none"> <li>사과 왜성 대목(M9 및 M26)</li> </ul>	10	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>대목 및 접수 생산 및 유통</li> </ul>
--	----	-----	---



및 접수별 생산 및 유통 현황 조사			업체 현황 조사 완료 함
• 사과 왜성 대목 및 접수의 바이러스 감염률 조사	6	100	• 대목 및 접수의 바이러스 감염률 조사 완료 함
• 사과 바이러스 무병 묘목 식재 및 주요 바이러스 접종	4	100	• 무병묘 대목에 바이러스 감염주 접수를 접목하여 접종 실시 완료 함
• 사과나무 수관 부위별(눈, 결과지, 잎 등) 잠복 바이러스 발현 여부 조사	10	100	• 동일 나무 내 과일, 결과지, 잎의 바이러스 감염 여부 조사 완료 함
• 바이러스 접종 묘목과의 수체 생육량 비교	10	100	• 바이러스 조합별 수체 생육 조사 완료
• 사과나무 수관 부위별(눈, 결과지, 잎 등) 잠복 감염 바이러스 발현 여부 조사	10	100	• 동일 나무 내 과일, 결과지, 잎의 바이러스 감염 여부 조사 완료 함
• 바이러스 접종 묘목과의 수체 생육량 비교	10	100	• 바이러스 조합별 수체 생육 조사 완료
• 사과나무 수관 부위별(과일, 눈, 결과지, 잎 등) 잠복 감염 바이러스 발현 여부 조사	10	100	• 동일 나무 내 과일, 결과지, 잎의 바이러스 감염 여부 조사 완료 함
• 바이러스 접종 묘목과의 상품성 및 수량성 비교	10	100	• 바이러스 조합별 수체 생육 조사 완료
• 사과나무 수관 부위별(과일, 눈, 결과지, 잎 등) 잠복 감염 바이러스 발현 여부 조사	10	100	• 동일 나무 내 과일, 결과지, 잎의 바이러스 감염 여부 조사 완료 함
• 바이러스 접종 묘목과의 상품성 및 수량성 비교	10	100	• 바이러스 조합별 수체 생육 조사 완료
합계	100점		

### III. 종합의견

#### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

각 세부(협동)과 협업하여 연구목표에 맞게 연구가 진행되었으며, 사과무병종묘 대량생산을 위한 관련 기술들의 개발 및 기술이전 결과가 국내 사과우량무병종묘 생산에 기여할 것으로 생각되며, 정량적 성과 또한 초과달성으로 우수한 성과를 낸 것으로 판단됨.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

--

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

확보된 주요 사과 품종의 무병화 기본식물의 보급을 위한 증식이 필요하며, 이를 활용한 사과무병종묘의 보급으로 농가 및 기업 소득이 증대할 것으로 생각됨. 또한 국내 과수묘목산업의 국제 경쟁력이 향상될 것으로 기대됨.
--

#### IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

##### 1. 연구책임자의 의견

--

##### 2. 연구기관 자체의 검토결과

--

[별첨 3]

## 연구성과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	원예작물과학	
연구과제명	시설원에 특화를 위한 사과무병종묘 산업화기반 구축			
주관연구기관	충북대학교 산학협력단	주관연구책임자	김 대 일	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	2,500,000,000	625,000,000	(30,000,000)	3,125,000,000
연구개발기간	2015. 07. 01 - 2020. 06. 30 (60개월)			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타(      ) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:      )			

### 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 사과무병종묘 시설원에 생산시스템 구축	사과무병종묘 생산을 위한 제반기술인 안정육묘기술, 조직배양 기술 및 대용량 증식기술, 순화 및 발근 촉진 기술, 바이러스 검정, 유통 모델을 확립함으로써 본래 목표를 달성하였음.
② 각 분야 전문교수진과 지방자치단체 등 전문 연구기관 및 관련 산업체로 구성된 산, 학, 연 융합 체제 구축	산학연 융합 체계를 구축하여 연구목표를 달성하였음.
③ 사과무병종묘 기본식물 육성을 통한 대량생산 및 보급 기반확립	사과무병종묘 기본식물을 양성하였으며, 대량생산 기술을 확보하여 연구목표를 달성하였음.
④ 사과무병종묘 육성 기술 패키지화 및 실증적인 모델 개발	사과무병종묘 육성 기술을 패키지화 및 기술이전하고 제품화를 달성하여 연구목표를 달성하였음.
⑤ 지역 농가에 시설원에 이용 종묘 육성 패키지 기술 이전	종묘 육성 패키지 기술을 이전하여 목표를 달성하였음.
⑥ 사과무병종묘 대목 대량 생산 및 산업화를 위한 패키지 기술 개발	사과무병종묘 육성 기술을 패키지화 및 기술이전하고 제품화를 달성하여 연구목표를 달성하였음.
⑦ 상업적 원예용 시설하우스 및 식물공장 활성화 기반 마련	시설원예용 하우스를 6동 확보하여 식물공장 활성화 기반 마련 목표를 달성하였음.

⑧시설원에 활용 사과무병종묘 생산시스템에서 주요 바이러스 고효율검정법 확립	대용량 생물반응기에서 생산된 조직배양묘에 대한 고감도 주요 바이러스 검정법을 확립하여 목표를 달성하였음.
⑨사과무병종묘에 발생하는 주요 사과 바이러스 감염 현황 파악	충청도, 강원도 등에서 바이러스 검정 시료를 수집하여 감염현황을 파악하여 목표를 달성하였음.
⑩검출법에 따른 주요 바이러스 감출 감도 및 속도 비교	기존 알려진 사과 바이러스 검출법의 검출감도를 비교하여 당초 목표를 달성하였음.
⑪주요 바이러스별 최적 검출법 확립	기존 바이러스 검출법에서 개선된 주요 바이러스별 검출법을 포토토크콜화하여 목표를 달성하였음.
⑫분자표지를 이용한 사과무병종묘 변이 검정과 품종 동정 : 사과 품종 특이적 분자표지 이용 발생변이체 도태와 품종 동정체계 확립	사과 품종 특이적 분자마커를 활용하여 조직배양변이체 도태 및 품종동정 체계를 확립하여 당초목표를 달성하였음.
⑬시설재배용 사과무병종묘 포트재배법을 이용한 안정적 증식 및 육묘	사과무병종묘(대목묘,접목묘)의 포트재배법을 확립하여 당초목표를 달성하였음.
⑭사과무병종묘 접목번식 및 저장법 개발과 유통 체계 모델화	접목번식 및 저장법을 개발하여 사과무병종묘를 유통함으로써 당초목표를 달성하였음.
⑮사과무병종묘 특성조사 및 시범포 운영을 통한 현장실증	기본식물을 이용한 증식 후 보급종의 재배를 통한 현장실증이 필요함.
⑯사과무병종묘의 실증 재배를 통한 무병 원원종 전진기지 구축	바이러스가 제거된 기본식물을 확보 및 증식하여 당초목표를 달성하였음.

\* 결과에 대한 의견 첨부 가능

### 3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표											연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화						기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치	논문 SCI		비SCI	논문 평균 IF	학술 발표	정책 활용			홍보 전시		
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건	명	건	건			
가중치																					
최종목표	6	3		2	8	2	5					10	7		31	7	34	2	5		
연7기간내 달성실적	7	7		6	20	2	7.41					10	7		43	11	36	1	6		
달성율(%)	116	233		300	250	100	148					100	85.7		138	157	105	50	120		

#### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	사과 재분화 촉진용 조성물 및 2단계 엽평배양을 통한 바이러스 무독화 사과묘목의 대량 생산방법
②	네트형 생물반응기를 이용한 사과 무병묘 생산방법
③	기내배양 사과 왜성대목묘의 순화촉진용 배양액 및 이를 이용한 순화 방법
④	용존산소량을 조절할 수 있는 담액수경 시스템
⑤	포트와 양액을 이용한 사과 조직배양 대목묘의 재배기술
⑥	포트와 양액을 이용한 사과접목묘의 재배기술

#### 5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업제이전 (상품화)	현장애료 해결	정책 자료	기타
①의 기술						√				
②의 기술							√			
③의 기술		√				√				
④의 기술						√	√			
⑤의 기술		√					√			
⑥의 기술		√					√			

#### 6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	사과묘목의 바이러스 무독화를 통해 무병종묘 확보에 기여할 것으로 기대됨
②의 기술	사과무병종묘의 대량생산을 위한 원천 기술로서 무병종묘의 대량 생산 및 보급에 기여할 것으로 기대됨
③의 기술	조직배양 및 대용량 생물반응기를 통해 생산된 사과조직배양묘의 기내 순화를 촉진하여 무병종묘의 대량 생산 및 보급에 기여할 것으로 기대됨
④의 기술	조직배양 및 대용량 생물반응기를 통해 생산된 사과조직배양묘의 기내 순화를 촉진하여 무병종묘의 대량 생산 및 보급에 기여할 것으로 기대됨
⑤의 기술	사과 조직배양 대목묘의 포트재배 기술로서 사과의 시설원예 육묘를 가능케 하여 안정적이고 계획적인 대목생산에 기여할 것으로 기대됨
⑥의 기술	사과접목묘의 포트재배 기술로서 시설원예 육묘를 가능케하여 안정적이고 계획적인 우량접목묘에 기여할 것으로 기대됨

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자 유치		논문 SCI	논문 비SCI	논문 평균 IF			학술 발표	정책 활용	
	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치																			
최종목표	6	3		2	8	2	5				10	7		31	7	34	2	5	
연구기간내 달성실적	7	7		6	20	2	7.41				10	7		43	11	36	1	6	
연구종료 후 성과창출 계획																			

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 <sup>1)</sup>			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간		실용화예상시기 <sup>3)</sup>	
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>			

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



## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.