

완결과제 최종보고서

일반과제(○), 보안과제()

(과제번호 : PJ010077)

사과 바이러스 무독화 기술 향상 및 진단용 DNA칩 개발

Development of technique for virus elimination in apple trees and DNA chip for fruit tree
viruses

국립원예특작과학원

연구수행기간

2014.02.01 ~ 2016.12.31.

농촌진흥청

제 출 문

농촌진흥청장 귀하

본 보고서를 “사과 바이러스 무독화 기술 향상 및 진단용 DNA칩 개발에 관한 연구”
(개발기간 : 2014.02. ~ 2016.12.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

제1세부연구과제 : 사과 바이러스 무독화 효율 증진기술 개발

제2세부연구과제 : 사과 바이러스, 바이로이드 현장 진단용 키트 개발

제1협동연구과제 : 과수 바이러스 진단용 DNA chip 개발

2017. 02. 28.

제1세부연구기관명 : 국립원예특작과학원

제1세부연구책임자 : 조인숙

참여연구원 : 최국선

제2세부연구기관명 : 국립원예특작과학원

제2세부연구책임자 : 조인숙

참여연구원 : 최승국

제1협동연구기관명 : 한국생명공학연구원

제1협동연구책임자 : 문재선

참여연구원 : 임승모, 자오푸메이, 이고리다바잘갈, 백다솜

주관연구책임자 : 조인숙

주관연구기관장 : 국립원예특작과학원장



농촌진흥청 농업과학기술 연구개발사업 운영규정 제51조에 따라 보고서
열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제번호	PJ010077		연구기간	2014.02.01 ~ 2016.12.31.
연구사업명	단위사업명	공동연구사업		
	세부사업명	FTA대응경쟁력향상기술개발		
	내역사업명	원예특용작물경쟁력제고		
연구과제명	주관과제명	사과 바이러스 무독화 기술 향상 및 진단용 DNA칩 개발		
	세부(협동) 과제명	(1세부) 사과 바이러스 무독화 효율 증진기술 개발 (2세부) 사과 바이러스, 바이로이드 현장 진단용 키트 개발 (1협동) 과수 바이러스 진단용 DNA chip 개발		
연구책임자	구분	연구기관	소속	성명
	1세부	국립원예특작과학원	원예특작환경과	조인숙
	2세부	국립원예특작과학원	원예특작환경과	조인숙
	1협동	한국생명공학연구원	식물시스템공학연구센터	문제선
총 연구기간 참여 연구원 수	총: 8 명 내부: 3 명 외부: 5 명	총 연구개발비	정부: 900,000천원 민간: 천원 계: 900,000천원	
위탁연구기관명 및 연구책임자	충남대학교, 임현섭	참여기업명		
요약	<p>(1세부) 사과 바이러스 무독화 효율 증진기술 개발 <input type="radio"/> 열처리 및 항바이러스제 처리에 의한 사과 바이러스(ACLSV, ASGV, ASPV) 무독화율 20% 이상 증진</p> <p>(2세부) 사과 바이러스, 바이로이드 현장 진단용 키트 개발 <input type="radio"/> 사과 바이러스(ACLSV, ASGV, ASPV, ApMV) Immuno-strip 키트 개발 <input type="radio"/> 사과 바이로이드(ASSVd) LAMP 키트 개발</p> <p>(1협동) 과수 바이러스 진단용 DNA chip 개발 <input type="radio"/> 집단 전사체 분석을 이용한 과수 바이러스 동정 - 사과 바이러스 8종, 포도 바이러스·바이로이드 26종, 및 복숭아 바이러스·바이로이드 21종 <input type="radio"/> 과수 바이러스 진단용 DNA칩 개발</p>	보고서 면수 : 106페이지		

〈 국 문 요 약 문 〉

연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내 과수 무병묘 생산 기간을 단축할 수 있는 기술 개발과 과수 바이러스, 바이로이드병을 진단할 수 있는 새로운 기술을 개발하여 병 피해 및 확산을 미연에 방지하고 국내 고품질 과실의 안정생산에 기여하고자 함 				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 사과 바이러스 무독화 효율 증진기술 개발 ○ 사과 바이러스, 바이로이드 현장 진단용 키트 개발 ○ 과수 바이러스 진단용 DNA chip 개발 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 우량 과수 묘목의 생산에 활용 ○ 국내 발생 과수 바이러스 및 바이로이드 진단에 활용 ○ 국가관리 바이러스 모니터링 및 관리방안에 활용 				
중심어 (5개 이내)	사과	바이러스	무독화	진단키트	DNA 칩

〈 Summary 〉

Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ○ Development of new detection methods for viruses and the techniques for producing virus-free plant are carried out to prevent virus spread and help minimize disease impact on fruit trees resulting in improved yields and high quality of fruit crops. 				
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ Development of technique to enhance the efficiency of viral elimination for producing virus-free apple trees. ○ Development of diagnostic kit for apple viruses in the field ○ Development of DNA chip capable of detecting viruses and viroid infecting fruit trees 				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ○ Practical use in the production of virus-free plant of fruit trees ○ Practical use in the detection of the viruses and viroid infecting fruit trees in Korea ○ Practical use in monitoring and management of fruit tree viruses 				
Keywords	Apple	Virus	Elimination	Detection kit	DNA chip

〈 목 차 〉

제 1 장 연구개발과제의개요	6
제 2 장 국내외 기술개발 현황	7
제 3 장 연구수행 내용 및 결과	8
제 4 장 목표달성을 및 관련분야에의 기여도	97
제 5 장 연구결과의 활용계획 등	98
제 6 장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	99
제 7 장 연구개발성과의 보안등급	100
제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설 · 장비현황 ..	101
제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 ..	102
제 10장 연구개발과제의 대표적 연구실적	103
제 11장 기타사항	104
제 12장 참고문헌	105

제 1 장 연구 개발 과제의 개요

제1절 연구 개발 목적

국내 과수 무병묘 생산 기간을 단축할 수 있는 기술 개발과 과수 바이러스, 바이로이드병을 진단할 수 있는 새로운 기술을 개발하여 병 피해 및 확산을 미연에 방지하고 국내 고품질 과실의 안정생산에 기여하고자 하였다.

제2절 연구 개발의 필요성

사과 바이러스, 바이로이드병은 모자이크, 착색불량, 소과, 접목불친화에 의한 고접병 등의 이상 증상을 일으켜 나무의 생장을 약화시키고 과실의 품질과 수량에 영향을 미친다. 사과모자이크 바이러스(ApMV)는 사과잎의 모자이크 증상과 과실 수량을 30~50% 감소시키고 생육을 50% 저하시킨다. 사과 바이로이드(ASSVd)는 과실의 착색불량, 동녹, 소과 등 이상증상과 과중을 30~50% 감소시키며 상품성을 현저히 떨어뜨린다. 농림축산식품부는 국내 과수산업의 경쟁력을 높이고 우량 무병묘목 생산·공급체계를 구축하기 위해 ‘과수우량묘목 생산지원사업’을 추진하고 있으며 2025년까지 과원갱신 수요량의 80%를 우량묘목 공급계획 할 계획이며 무병 묘목 갱신에 의한 연간 경제적 효과를 사과 1,070억원, 배 236억원, 포도 318억원, 복숭아 313억원(‘16, 농림축산식품부)을 기대하고 있다. 사과 무병묘 생산을 위한 기준 열처리, 생장점 배양 기술은 바이로스 무독화 효율이 낮고 시간과 비용이 많이 소요되므로 바이러스 무독화 효율을 높이는 기술 개선이 필요하고 또한 진단기술의 개선으로 사과 바이러스, 바이로이드병을 현장에서 신속하게 진단함으로써 병 피해 및 확산을 미연에 방지하고자 하였다. 최근 기후온난화에 따른 생태계의 변화와 농산물 교역 확대로 새로운 바이러스병 출현 및 위험도는 점차 높아지고 있으나 기존의 ELISA와 PCR 진단방법은 과수 작물에 있어 진단 대상으로 하는 몇 종의 바이러스에 대해서만 진단이 가능하고 새로운 또는 예상하지 못한 바이러스에 대한 입체적인 진단은 어려운 실정이었다. 하지만 DNA 칩은 진단대상을 유전정보를 알고 있는 모든 바이러스로 확대할 수 있고, 변이종의 출현 및 새로운 병원체의 발견에 결정적 단서를 제공할 수 있는 최신 기술로 과수작물의 바이러스 진단에 적용이 시급하였다. 과수 바이러스의 정확하고 신속한 검정을 위한 DNA 칩 기술개발과 동시에 바이러스 억제 기술의 가능성을 제시한다면 기후변화 및 환경변화로 인해 늘고 있는 과수 바이러스에 의한 피해를 최소화 할 수 있을 것으로 기대할 수 있다. 현재까지 식물 바이러스병은 직접적인 치료방법이 없지만 RNAi 기술에 의한 사과 바이러스 유전자의 발현을 억제하여 바이러스 방제 기술의 가능성을 제시하고자 하였다.

제3절 연구 개발 범위

본 연구는 사과 바이러스 무독화 효율 증진기술 개발, 사과 바이러스, 바이로이드 현장 진단용 키트 개발 및 과수 바이러스 진단용 DNA chip 개발의 연구개발 범위를 갖는다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

국내에서 발생하는 사과, 포도 바이러스(ACLSV, GLRaV-3)의 항바이러스제 처리에 의한 무독화 연구를 수행하였고(원예원, '97, '03), 사과 등 5과종의 열처리 및 생장점 배양을 통한 무병묘목 생산 기술을 개발하였다('원예원, 09~13). 채소작물은 현장에서 신속하게 바이러스를 진단할 수 있는 Immuno strip 진단키트가 총 12종 개발 되었으며 과수작물의 경우 현장 진단 기술이 전무한 실정이다. 세계적으로 사과 우량 무병묘목을 생산하기 위한 바이러스무독화(Virus-free) 기술은 열처리 연구 73.3%, 항바이러스제 등에 의한 화학요법 연구 26.7%가 보고되고 있으며 과수 무병묘 생산을 위한 일본의 감귤 간이경접접목법, 이집트의 배 기내 미세접목기술 등이 개발되었다. 과수 바이러스 현장 진단기술로 감귤바이러스(ASGV), 핵과류 바이러스(PPV)의 면역 크로마토그래피 카세트와 복숭아 바이로이드(PLMVd) LAMP 진단 기술이 일본과 그리스에서 보고되었다.

DNA 칩은 유전자 발현양상 연구와 SNP (Single-nucleotide polymorphism) 분석을 위해 처음 고안되었으며(Schena, 1995; Lockhart, 1996; Desprez, 1998), 현재는 분자생물학 현상구명과 유전자 진단에 일반적인 도구로 사용되고 있다. 의학 분야에서 DNA 칩은 암의 진단과 예측(Cole, 1999)과 각종 바이러스의 진단과 유전자형 분석에 사용되고 있다(Anderson, 2000; Proudhikov, 2000; Park, 2001). 식물바이러스 진단분야에 있어서 cDNA 칩을 이용하여 감자바이러스 진단(Boonham, 2003; Bystricka, 2003)과 박과 식물 감염 토바모바이러스 진단(Lee, 2003)이 보고되었다. 국내 DNA 칩 연구는 인간 유전체, 자생식물 및 작물분자육종 프론티어 사업 등 대형 국책과제 등에서 유용 유전자의 발굴 및 유전자 발현 분석 등에 널리 활용되고 있으며 최근 일부 기업을 중심으로 인간의 질병을 진단할 수 있는 DNA 칩의 기술개발이 본격화되고 있으며 바이러스성 질환 및 유전병의 조기진단 등을 목적으로 한 DNA 칩의 개발이 이루어지고 있다. 농촌진흥청과 한국생명공학연구원의 공동연구로 식물바이러스 430종을 하나의 칩으로 동시 진단할 수 있는 바이러스 진단용 대용량·다목적 올리고 칩을 개발하여 진단기술을 확보하고 있으며 이 진단기술을 다른 분야에 확대 적용할 수 있는 단계에 있다. 사과 바이러스(ACLSV, ASGV, ASPV, ApMV)에 관한 유전자 정보 및 병원성, 바이러스 이동에 대한 연구가 국외 연구진들에 의해 진행되고 있으며 일본 이와테 대학 연구진은 *Apple latent spherical virus*를 이용한 바이러스 벡터를 개발하고 애기장대, 담배, 콩, 사과에 접종하여 유전자 발현 억제에 대한 RNAi 연구를 하고 있다.

국내 과수 무병묘 생산 기간을 단축하기 위해서 무독화 효율을 기준 보다 높이고 생장점 배양을 대체할 수 있는 기술 개발과 과수 바이러스, 바이로이드를 현장에서 진단 할 수 있고 기존에 알려진 바이러스 뿐 아니라 새로운 바이러스 출현을 진단할 수 있는 기술 개발이 필요하다. 또한 바이러스 벡터를 이용해 바이러스 유전자 발현을 억제시키는 RNAi 기술을 과수작물에 적용할 수 있는 기술 연구의 가능성을 제시하고자 하였다.

제 3 장 연구 수행 내용 및 결과

<제1세부과제 : 사과 바이러스 무독화 효율 증진기술 개발>

1. 사과 바이러스 무독화 증진기술 개발

재료 및 방법. 사과 바이러스 ACLSV(*Apple chlorotic leafspot virus*, 사과황화잎반점바이러스), ASGV(*Apple stem grooving virus*, 사과줄기그루빙바이러스), ASPV(*Apple stem pitting virus*, 사과줄기홈바이러스) 3종에 대한 이병주를 RT-PCR 검정에 의해 수집하였고 삽수의 이병신초를 채취하고 배양한 기내 이병묘를 37°C 온도조건으로 열처리와 항바이러스제를 처리하였다. 2, 3주 간 바이러스별 처리구별로 약 1cm의 신초를 채취하여 바이러스 유무를 RT-PCR로 확인하였다. 배양용 배지로는 MS+BA(1ppm)+IBA(0.1ppm)+Sucrose(3%), Agar(0.8%), pH 5.8로 조정하여 사용하였다. 항바이러스제는 Ribavirin, Quacertin, DHT, BIG, 2-Thiouracil 5종을 부유법에 의해 바이러스 무독화에 효과가 있는 조건을 선발하였고 선발된 항바이러스제로 사과 바이러스 무독화 증진 처리 조건을 검정하고 최적 조건을 설정하였다.

내용 및 결과. 사과 바이러스(ACLSV, ASGV, ASPV) 감염주는 후지 93주, 홍로 88주를 선발하였다. 사과 ‘후지’ 바이러스 무독화 증진 처리를 위해 열처리(37°C)에 의한 바이러스 무독화 검정을 기내 배양묘를 이용하여 조사한 결과 2주 0~40%, 4주 40~60%, 6주 50~80%, 8주 100% 무독화율을 보였다. 바이러스별 무독화율은 ACLSV는 2주 40%, 4주 60%, 6주 80%, 8주 100%, ASGV는 0%, 4주 40%, 6주 60%, 8주 100%, ASPV는 20%, 4주 40%, 6주 60%, 8주 100%였다. 부유법 검정에 의한 사과 바이러스 무독화 증진 항바이러스제 처리 조건 선발한 결과 항바이러스제 Ribavirin, Quacertin, DHT, BIG, 2-Thiouracil 5종 중 Ribavirin, Quacertin, BIG(10ug/ml) 3종을 선발하였다.

표 1. 사과 바이러스 이병주 수집을 위한 바이러스 유전자 검정

품 종	RT-PCR 양성반응 수								계	
	단독감염			복합감염						
	ACLSV	ASGV	ASPV	ACLSV + ASGV	ACLSV + ASPV	ASGV + ASPV	ASLV+ ASGV+ ASPV			
후 지	4	5	10	1	5	33	35	93		
홍 로	0	3	1	0	9	8	67	88		

표 2. 열처리에 의한 바이러스 무독화 검정

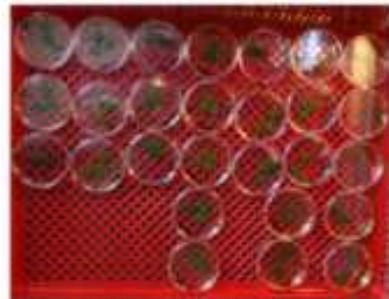
바이러스	무 독 화 율 (%)			
	2 주	4 주	6 주	8 주
ACLSV	40 (2/5)	60 (3/5)	80 (4/5)	100 (5/5)
ASGV	0 (0/5)	40 (2/5)	60 (3/5)	100 (5/5)
ASPV	20 (1/5)	40 (2/5)	60 (3/5)	100 (5/5)

표 3. 항바이러스제 처리에 의한 바이러스 무독화 검정

항바이러스제 (10ug/ml)	바이러스	무 독 화 율 (%)		
		2 일	4 일	6 일
Ribavirin	ACLSV	100 (6/6)	100 (6/6)	100 (6/6)
	ASGV	67 (4/6)	100 (6/6)	100 (6/6)
	ASPV	0 (0/6)	67 (4/6)	100 (6/6)
Quacertin	ACLSV	100 (6/6)	83 (5/6)	100 (6/6)
	ASGV	50 (3/6)	100 (6/6)	100 (6/6)
	ASPV	0 (0/6)	67 (4/6)	100 (6/6)
DHT	ACLSV	100 (6/6)	100 (6/6)	100 (6/6)
	ASGV	50 (3/6)	100 (6/6)	100 (6/6)
	ASPV	0 (0/6)	33 (2/6)	100 (6/6)
BIG	ACLSV	100 (6/6)	100 (6/6)	100 (6/6)
	ASGV	50 (3/6)	100 (6/6)	100 (6/6)
	ASPV	0 (0/6)	67 (4/6)	100 (6/6)
2-Thiouracil	ACLSV	100 (6/6)	67 (4/6)	100 (6/6)
	ASGV	100 (6/6)	100 (6/6)	100 (6/6)
	ASPV	0 (0/6)	33 (2/6)	100 (6/6)
Con	ACLSV	17 (1/6)	17 (1/6)	33 (2/6)
	ASGV	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)
	ASPV	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)



열처리에 의한
바이러스 무독화 검정



부유법에 의한 항바이러스제 선발

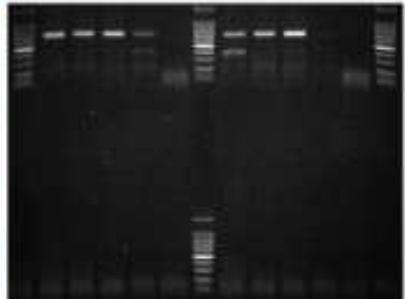


그림 1. 열처리 및 항바이러스제 처리에 의한 무독화 검정

사과 바이러스 감염주의 바이러스 검정은 RT-PCR 단독 또는 복합진단 기술을 이용하여 조사하였다. 복합진단용 프라이머는 표 4와 같고 사과 바이러스 이병주를 주형으로 프라이머는 농도가 각각 ACLSV 30pmol, ApMV 10pmol, ASPV 15pmol, ASGV 20pmol, nad5 10pmol로 하고 유전자 증폭조건이 1'st cDNA를 합성한 후 94°C, 4m <94°C, 30s; 55°C, 1m; 72°C, 1m20s>40cycles; 7 2°C, 10m으로 하여 바이러스 검정을 수행하였다.

표 4. 사과 바이러스 복합진단용 프라이머

바이러스		염기서열(5'→3')	산물크기
ACLSV	F	TTCATGGAAAGACAGGGGCAA	677
	R	AAGTCTACAGGCTATTATTATAAGTCTAA	
ApMV	F	AGGGTCCTGAGCAGTCGAGA	264
	R	GTTTGGAGGGCTTCCCACT	
ASPV	F	ATGTCTGGAACCTCATGCTGCAA	370
	R	TTGGGATCAACTTACTAAAAAGCATAA	
ASGV	F	GAAGACGTGCTCAACTAGC	579
	R	TTTTAGACCAGTGGCAAAGT	
nad5	F	GATGCTTCTGGGGCTTCTGTT	181
	R	CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA	

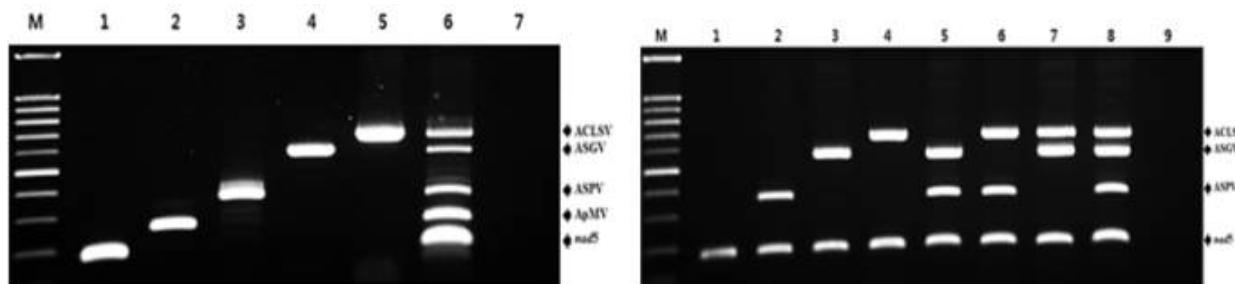


그림 2. 사과 바이러스 무독화 검정에 이용한 복합진단 RT-PCR

사과 바이러스 감염주를 RT-PCR 재검정한 후지 11주, 홍로 11주 중 후지 4주, 홍로 4주를 기내 배양하였다. 사과 ‘후지’ 가지를 Ribavirin, Quacertin, BIG 항바이러스제에 침지한 결과 1, 2일 처리는 사과 바이러스 무독화가 되지 않았으며 배양묘에 의한 실험은 지방이 전과 조직배양실의 부재에 의한 곰팡이 오염으로 항바이러스제에 의한 사과 바이러스 무독화 검정 시험에 실패하였다. 따라서 다음해 조직배양실 완공 후 바이러스 저해물질 효과검정 및 기내 생육 배양체를 이용한 미세접목 조건을 설정하고자 하였다.

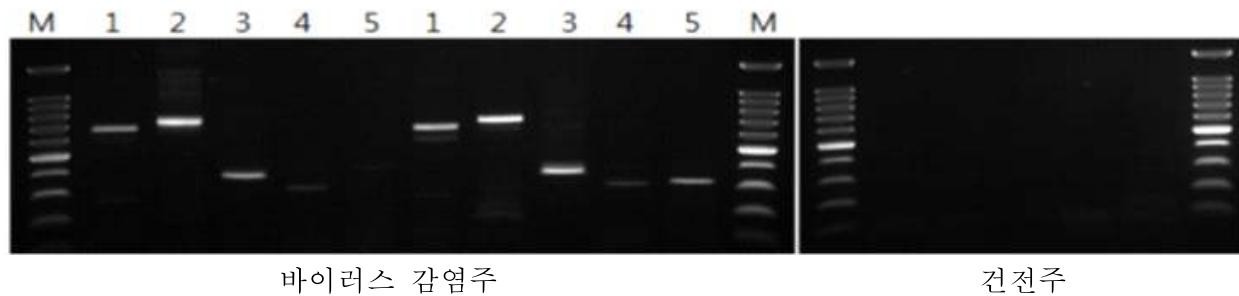


그림 3. RT-PCR을 이용한 사과 잎에서 바이러스 및 바이로이드 검정
(M: marker, 1; ACLSV(677bp), 2; ASGV(699bp), 3; ASPV(370bp), 4; ApMV, 5; ASSVd(330bp))

표 5. 사과 ‘후지’ 및 ‘홍로’ 품종의 각각 삽수 개체별 바이러스 및 바이로이드 검정

품종	삽수 번호	바이러스 및 바이로이드 검정 결과				
		ACLSV	ASGV	ASPV	ApMV	ASSVd
후지	#1	+	+	+	-	-
	#2	+	+	+	-	-
	#3	+	-	+	-	-
	#4	-	-	+	+	-
	#5	-	+	+	-	-
	#6	-	+	+	+	-
	#7	+	+	-	-	-
	#8	-	+	+	+	-
	#9	-	-	-	-	-
	#10	-	-	-	-	-
	#11	-	-	-	-	-
홍로	#1	+	+	+	-	+
	#2	+	+	+	-	+
	#3	+	+	+		-
	#4	+	+	+	+	-
	#5	+	+	+	+	-
	#6	+	+	+		-
	#7	+	+	+	-	-
	#8	-	-	-	-	-

	#9	+	+	+	+	-
	#10	+	+	+	+	-
	#11	-	-	-		-

표 6. 기내배양된 사과 ‘후지’ 및 ‘홍로’ 품종의 바이러스 및 바이로이드 검정

품종	삽수 번호	기내 배양 바이러스 및 바이로이드 검정 결과				
		ACLSV	ASGV	ASPV	ApMV	ASSVd
후지	#4	-	-	+	+	-
	#5	-	+	+	-	-
	#6	-	+	+	+	-
	#8	-	+	+	+	-
홍로	#4	+	+	+	+	-
	#5	+	+	+	+	-
	#9	+	+	+	+	-
	#10	+	+	+	+	-



그림 4. 기내에서 계대 배양한 시료에서 RT-PCR을 이용한 바이러스 재검출

표 7. 사과 ‘후지’ 가지를 침지 후 바이러스의 제거 효과에 대한 RT-PCR 검정

저해물질 (500ug/mL)	처리기간 (일)	바이러스 종류별 검정		
		ACLSV	ASGV	ASPV
Ribabilin	1	+	+	+
	2	+	+	+
Queccetion	1	+	+	+
	2	+	+	+
BIG	1	+	+	+
	2	+	+	+
D.W	1	+	+	+
	2	+	+	+



기내도입 배양



증식 배지로 계대배양



40일 후 배양체

그림 5. 바이러스 감염 사과 삽수의 기내 배양



기내도입 단계 오염



증식 단계 오염



배양체 생육 불량

그림 6. 바이러스 감염 사과 삽수의 기내 배양의 오염



입구의 비닐 문



중앙 통제식 항온



선풍기로 온도 조절

그림 7. 임시로 사용되고 있는 조직배양실 현황

항바이러스제 Ribavirin, Quercitin, BIG 3종을 1, 10, 100, 500 ug/ml 농도별로 1, 2주, 3주, 4주간 37°C 배양기에서 사과 바이러스 감염주 삽수를 이용해 사과 바이러스별 무독화 증진 항바이러스제 농도를 선정한 결과 2주, 3주 기준으로 ACLSV는 Ribavirin 500, Quercetin 1, 100, Big 1, 100, 500 ug/ml, ASGV는 BIG 10, 500 ug/ml, Ribavirin 10, 100, Quercetin 10, 100 ug/ml (추가), ASPV는 Ribavirin 10, 100, Quercetin 100, 500, Big 1, 500 ug/ml였다. 선정된 항바이러스제에 의한 사과 바이러스 무독화 증진 처리 최적조건은 다음과 같이 설정되었다. ACLSV의 경우 2주 처리한 Quercetin 1, 100 ug/ml에서 100% 무독화율을 보였고 ASGV는 2주 처리한 Quercetin 100, 500에서 100% 무독화율을 보였다. 즉 ACLSV, ASGV, ASPV 무독화는 Quercetin 100 ug/ml를 2주간 처리함으로써 대조구인 열처리에 비해 열처리와 항바이러스제를 같이 처리한 실험구에서 사과 바이러스 무독화율이 20% 이상 증진되었다.

표 8. 항바이러스제 농도별 사과 바이러스 무독화 검정

항바이러스제	농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	ACLSV				ASGV				ASPV			
		1주	2주	3주	4주	1주	2주	3주	4주	1주	2주	3주	4주
Ribavirin	1	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	10	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
	100	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
	500	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+
Quercetin	1	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+
	10	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
	100	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
	500	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Big	1	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+
	10	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+
	100	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+
	500	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
대조구		-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

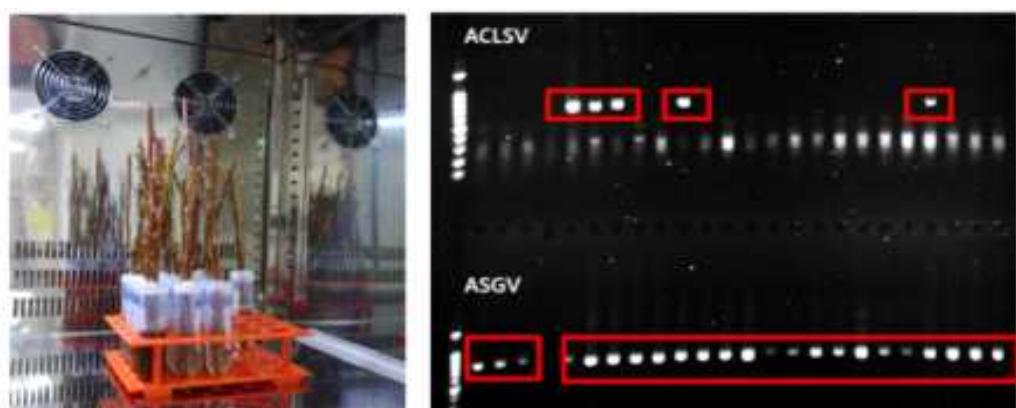


그림 8. 항바이러스제 처리에 의한 무독화 검정

표 9. 항바이러스제 처리에 의한 ACLSV 무독화 검정

항바이러스제	농도 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	ACLSV 무독화율 (%)	
		2주	3주
Ribavirin	500	60 (3/5)	80 (4/5)
Quercetin	1	100 (5/5)	80 (4/5)
	100	100 (5/5)	80 (4/5)
Big	1	100 (5/5)	60 (3/5)
	100	80 (4/5)	100 (5/5)
	500	60 (3/5)	40 (2/5)
대조구		80 (4/5)	100 (5/5)

표 10. 항바이러스제 처리에 의한 ASGV 무독화 검정

항바이러스제	농도 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	ASGV 무독화율 (%)	
		2주	3주
Ribavirin	10	20 (1/5)	40 (2/5)
	100	20 (1/5)	50 (2/4)
Quercetin	10	0 (0/5)	25 (1/4)
	100	60 (3/5)	25 (1/4)
Big	1	20 (1/5)	0 (0/3)
	500	20 (1/5)	0 (0/3)
대조구		20 (1/5)	0 (0/4)

표 11. 항바이러스제 처리에 의한 ASPV 무독화 검정

항바이러스제	농도 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	ASPV 무독화율 (%)	
		2주	3주
Ribavirin	10	80 (4/5)	80 (4/5)
	100	80 (4/5)	40 (2/5)
Quercetin	100	100 (5/5)	100 (5/5)
	500	100 (5/5)	100 (5/5)
Big	10	80 (4/5)	40 (2/5)
	500	100 (5/5)	80 (4/5)
대조구		60 (3/5)	80 (4/5)

국내 미보고 바이러스인 *Persimmon virus A*가 준인과류 77주 중 11주가 발생이 되었다. 바이러스 유전자 염기서열 분석결과 일본 분리주(AB735628)와 98% 상동성을 보였고 국내 분리주를 GenBank에 등록하였다(LC177111).

그림 8. 국내 미보고 바이러스 PVA 유전자 염기서열

복숭아잠재모자이크바이로이드(PLMVd)에 감염된 복숭아 ‘아까스끼’ 잎에 모자이크, 백화현상과 기형잎이 관찰되었다. 백화된 잎이 붙어있는 줄기도 백화증상이 나타나며, 과실은 정상과에 비해 숙기가 늦고 착색이 불량하여 상품성이 현저히 떨어진다.



그림 9. 복숭아잠재모자이크바이로이드(PLMVd) 감염 증상

2. 기외 미세접목 기술 개발

재료 및 방법. 기외 미세접목용 사과 바이러스 프리 M9 대목을 RT-PCR 검정에 의해 수집하였고 접수 후지품종의 정단부 조직 크기를 생장점 0.5, 1mm와 액아 2mm로 하고 접목 방법은 눈접, L접에 의한 접목 방법에 의해 기외 미세접목 조건을 설정하였다. 기외 미세접목묘에 대한 사과 바이러스 무독화 검정을 수행하고 바이러스 프리 접목묘를 생산하였다.

내용 및 결과. 기외 미세접목용 사과 대목(Virus-free)은 RT-PCR 검정에 의해 M9 92주를 최종 선발하였다. 기외 미세접목 조건은 5~6월에 절접, 눈접, L접 중 눈접과 L접으로 선정하였다. 눈접은 열처리한 접수 액아를 대목에 접을 붙여 접목묘를 만드는 방법이고 L접은 열처리한 접수 액아를 L자로 만든 대목에 접을 붙여 접목묘를 만드는 방법이다. 접수는 37°C에서 8주간 열처리한 생

장점 및 액아를 사용하였다. 기외 미세접목 조건 검정 결과 M9 대목에 눈접한 액아 접목묘를 3주 만들었고 L접한 액아 접목묘를 1개 만들었으나 바이러스 프리 접목묘는 눈접한 액아 접목묘 1주 만이 생산되었다. 눈접, L접 미세접목을 8~9월에 재검정한 결과 눈접에서 1주의 접목묘가 생산되었지만 바이러스 프리 접목묘를 생산하지 못했다.

표 12. 기외 미세접목용 사과 대목 선발을 위한 바이러스 유전자 검정

품 종	RT-PCR 양성반응 수						진단 주수
	ACLSV	ASGV	ASPV	복합감염	감염주수	무병주수	
M9	0	8	2	2	8	92	100



그림 9. 기외 미세접목용 사과 대목(Virus-free) 선발



그림 10. 눈접 및 L접에 의한 기외 미세접목

표 13. 기외 미세접목 조건 검정 및 무독묘 생산

접목방법	접수 조직크기			무독묘 생산
	생장점 0.5mm	생장점 1mm	액아 2mm	
절접	0/10	0/10	-/10	-
눈접	0/10	0/10	4/30	1/4
L접	0/10	0/10	1/30	0/1

표 14. 기외 미세접목 재검정 및 무독묘 생산

접수 조직 크기	접목방법			
	눈접	무독묘 생산	L접	무독묘 생산
액아 2mm	1/20	0	0/20	0

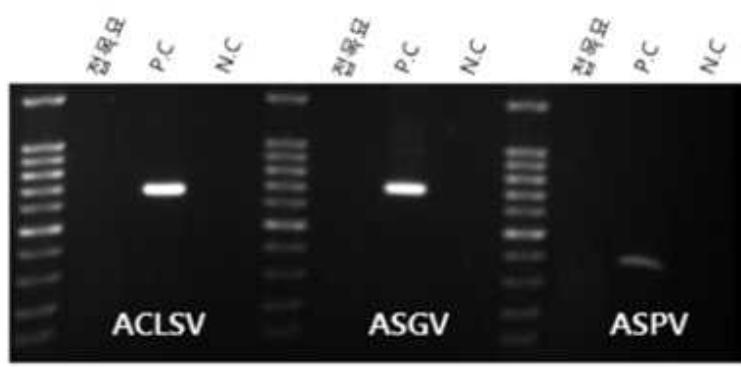


그림 11. 기외 미세접목묘 무독화 검정

<제2세부과제 : 사과 바이러스, 바이로이드 현장 진단용 키트 개발>

1. 사과 바이러스 Immuno-strip 키트 개발

재료 및 방법. 사과 바이러스 ACLSV, ASGV, ASPV, ApMV 4종에 대한 바이러스 단백질 웨타이드 합성 클론을 만들어 항체를 제작하여 IgG를 분리하였다. 생물검정이 가능한 바이러스는 접종 후 순화하고 단백질을 정제하여 항체를 제작하였다. 분리된 IgG는 금나노입자와의 pH, 농도를 설정하고 접합패드, 흡수패드, 샘플패드 및 진단선 막재질 등 키트 재료 조합으로 진단 특이성 키트 재료를 선정하여 Immuno-strip 키트를 제작하였으며 진단 즐액 추출완충액을 개발하여 최종 사과 바이러스 4종 Immuno-strip 키트를 개발하였다.

내용 및 결과. ACLSV, ASGV, ASPV, ApMV 바이러스가 감염된 이병주의 접목묘를 양성하여 이용하여 RT-PCR에 의한 각각의 유전자 검정을 수행하고 pGEM-T Easy vector에 클로닝하여 바이러

스별 염기서열 분석을 수행하였다. 바이러스별 항체를 제작하기 위해 ACLSV, ASGV, ASPV, ApMV 각 외피단백질의 항원성이 좋은 3곳의 prediction 부분을 선택하여 웨타이드 합성을 하였고 토끼에서 1, 2, 3차 폴리클로날 항체를 생산하고 ELISA 면역 테스트 결과 항체 희석농도 1:1000일 때 O.D 값 1~1.2 이상으로 각 항원에 대해 면역 효과가 있음을 확인 하였다. 각 항체의 특이성을 검정하기 위하여 바이러스 이병시료로 Western blot을 수행한 결과 ACLSV, ASGV, ASPV, ApMV에서 예상 단백질 크기를 확인하였다.

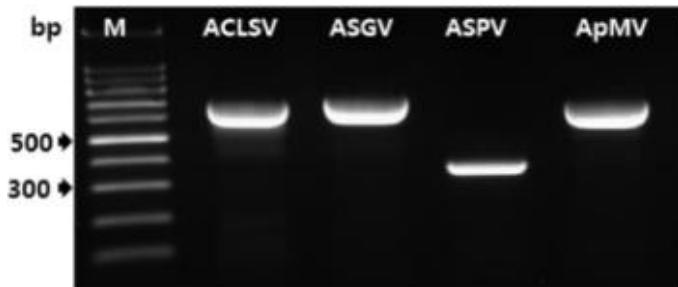


그림 1. 사과 바이러스(ACLSV, ASGV, ASPV, ApMV) 동정

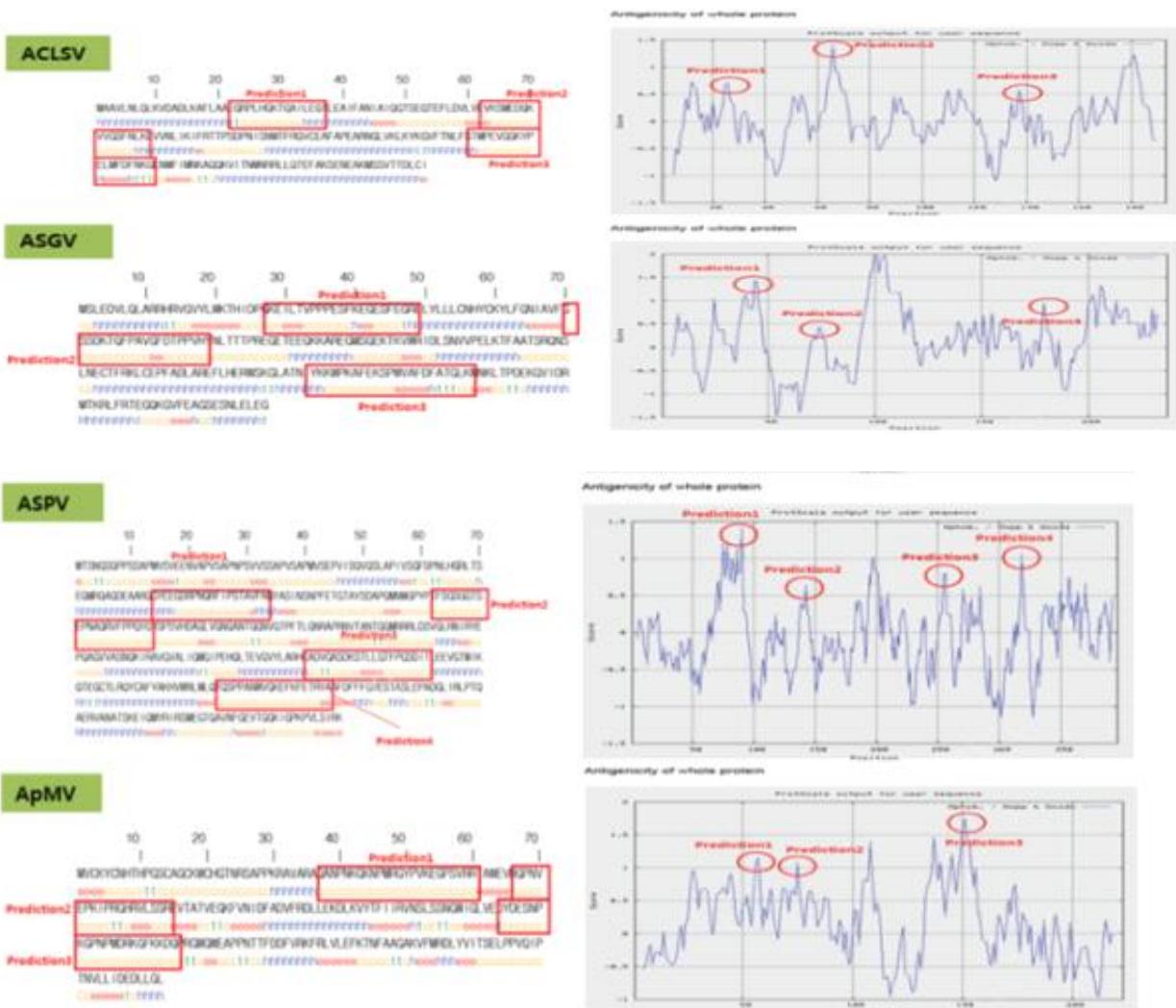
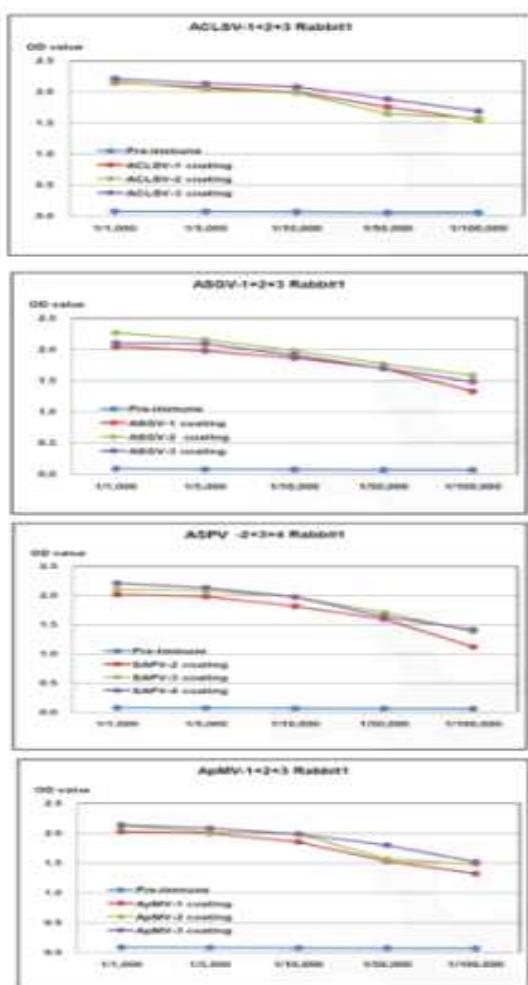


그림 2. 사과 바이러스(ACLSV, ASGV, ASPV, ApMV) 외피단백질의 웨타이드 합성



Dilution fold	Pre-immune	ACLSV-1 coating	ACLSV-2 coating	ACLSV-3 coating
1/1,000	0.073	2.148	2.171	2.215
1/5,000	0.072	2.074	2.039	2.134
1/10,000	0.066	1.998	1.983	2.062
1/50,000	0.055	1.756	1.645	1.884
1/100,000	0.056	1.551	1.576	1.691

Dilution fold	Pre-immune	ASGV-1 coating	ASGV-2 coating	ASGV-3 coating
1/1,000	0.068	2.046	2.268	2.105
1/5,000	0.077	1.981	2.159	2.089
1/10,000	0.073	1.865	1.981	1.910
1/50,000	0.067	1.699	1.766	1.696
1/100,000	0.066	1.326	1.586	1.484

Dilution fold	Pre-immune	SAPV-2 coating	SAPV-3 coating	SAPV-4 coating
1/1,000	0.076	2.015	2.108	2.212
1/5,000	0.073	1.981	2.085	2.134
1/10,000	0.067	1.815	1.973	1.976
1/50,000	0.064	1.596	1.709	1.636
1/100,000	0.061	1.120	1.381	1.415

Dilution fold	Pre-immune	ApMV-1 coating	ApMV-2 coating	ApMV-3 coating
1/1,000	0.073	2.148	2.171	2.215
1/5,000	0.072	2.074	2.039	2.134
1/10,000	0.066	1.998	1.983	2.062
1/50,000	0.055	1.756	1.645	1.884
1/100,000	0.056	1.551	1.576	1.691

그림 3. 사과 바이러스 폴리클로날 항체 ELISA 검정

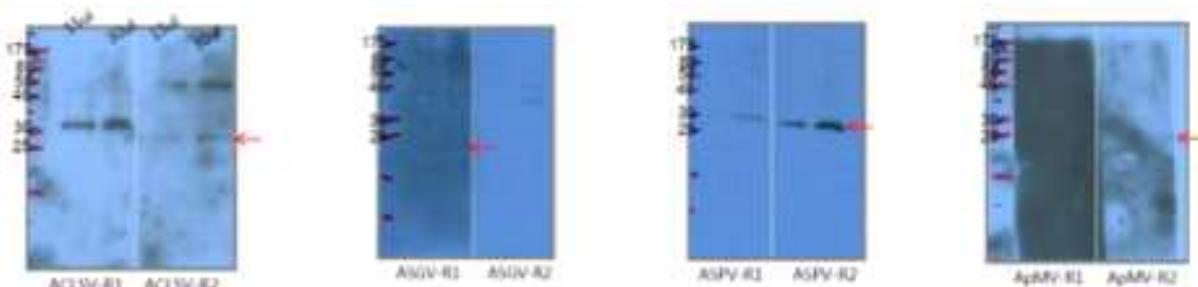


그림 4. 사과 바이러스 폴리클로날 항체 Western blot 검정

사과 바이러스 (ACLSV, ASGV, ASPV, ApMV) IgG 정제는 Protein A 컬럼을 이용하여 분리하였다. 면역 금나노입자를 제작하기 위해서 각 바이러스별 IgG와 금나노입자와의 결합산도 및 농도를 설정하였다. ApMV는 웨타이드로 합성된 제작 항체를 사용하였지만 ACLSV, ASGV, ASPV는 지표식물에 접종 하여 단백질을 정제한 항체를 사용하였다. 최적 결합산도는 ACLSV는 pH10.1, ASGV는 pH10.1, ASPV는 pH5.4, ApMV는 pH10.1이었고 최적 결합농도는 각각 60ug/ml 였다.

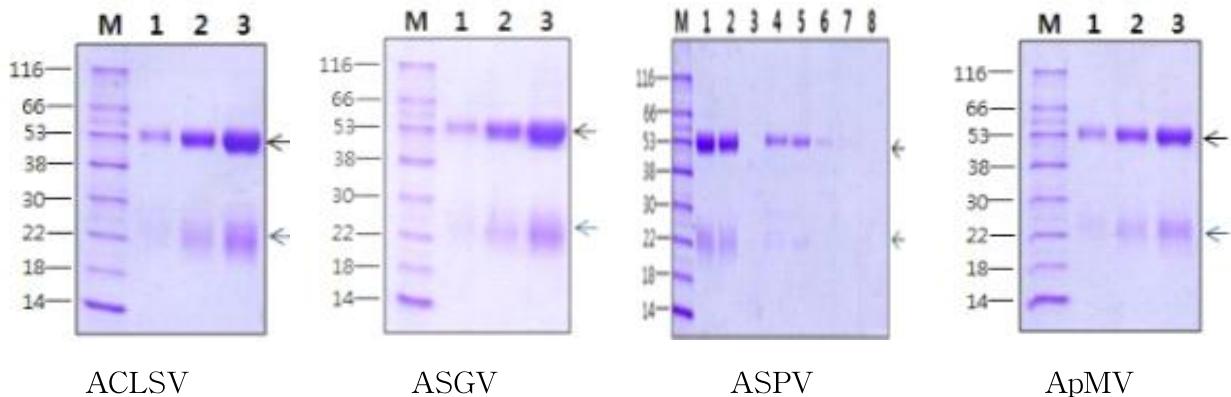


그림 5. 사과 바이러스(ACLSV, ASGV, ASPV, ApMV) IgG 정제

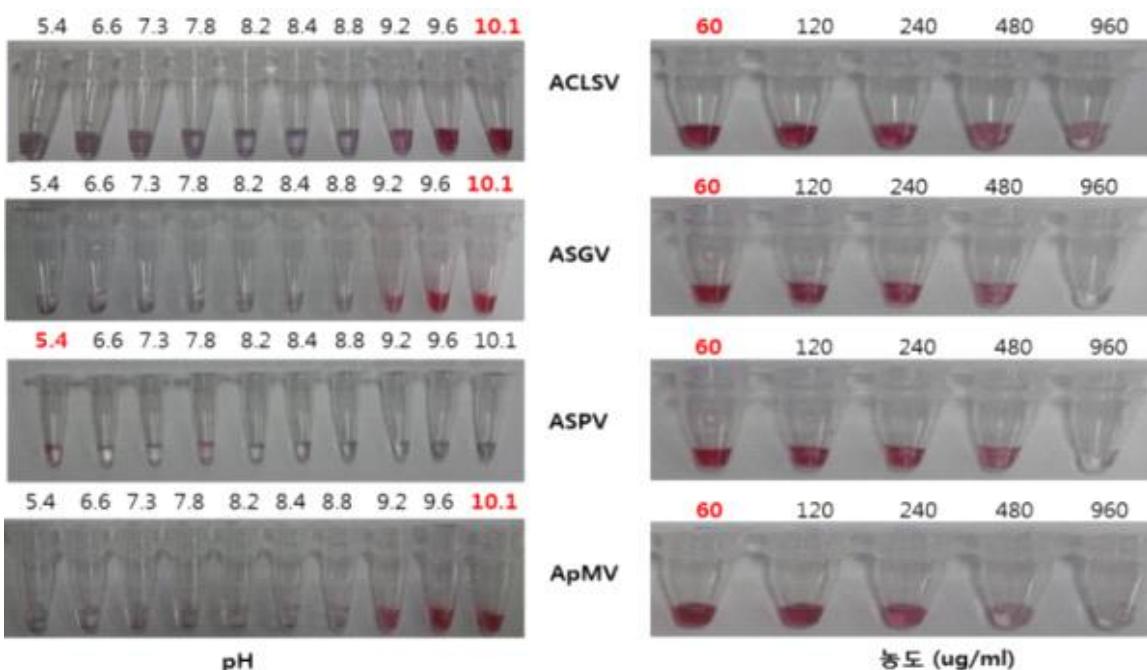


그림 6. 사과 바이러스 항체와 금나노입자의 최적 결합 산도 및 농도

진단 특이성 키트 재료 인 접합패드, 흡수패드, 샘플패드 및 진단선 막재질 등 키트 재료 조합은 채소 바이러스 진단키트 기준으로 선정하였다. 최적 진단키트 재료 조합은 진단선 막재질 2, 샘플패드 1, 접합패드 1로 이 조합에서 가장 진단선이 가장 뚜렷하고 균일하게 관찰되었다. 흡수패드는 샘플패드와 같은 재료를 사용하였다. 사과 바이러스별 진단 특이적 반응은 각 항체의 IgG농도가 ACLSV는 480ug/ml, ASGV는 240ug/ml, ASPV는 480ug/ml, ApMV는 480ug/ml에서 관찰되었으며, 비특이적 교차 반응은 나타나지 않았다. 제작된 사과 바이러스 Immuno-strip 키트는 PBS 버퍼(P), Citric acid 버퍼(C), GEB3 버퍼(E), Tris 버퍼(R) 중 R 즐액추출완충액에서 진단효율이 가장 좋았다. 바이러스별 Immuno-strip 키트의 민감도를 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 로 조사한 결과 모든 키트에서 10^{-6} 로 까지도 바이러스가 진단되는 것을 관찰할 수 있었다. 사과 바이러스 Immuno-strip 키트는 ACLSV, ASGV, ASPV, ApMV를 현장에서 쉽고 빠르게 즉, 5분 이내에 진단이 가능하다.

진단선 막재질 1				진단선 막재질 2			
샘플패드 1		샘플패드 2		샘플패드 1		샘플패드 2	
접합패드 1	접합패드 2	접합패드 1	접합패드 2	접합패드 1	접합패드 2	접합패드 1	접합패드 2
	-		-		-		-

그림 7. Immuno-strip 진단키트 재료 조합 선정

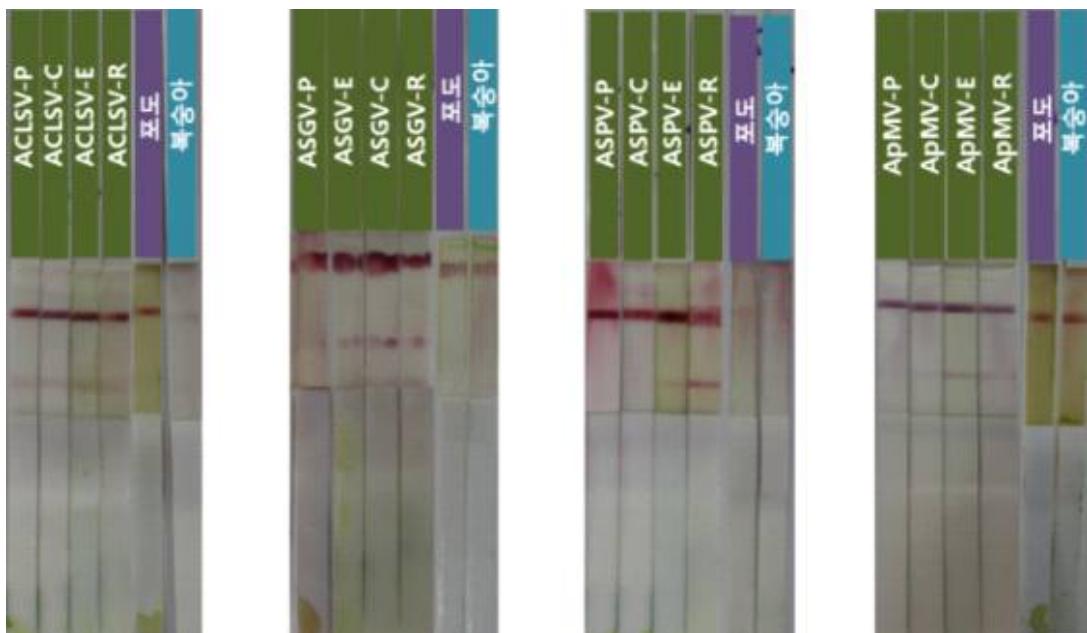


그림 8. 사과 바이러스 Immuno-strip 진단키트 검정

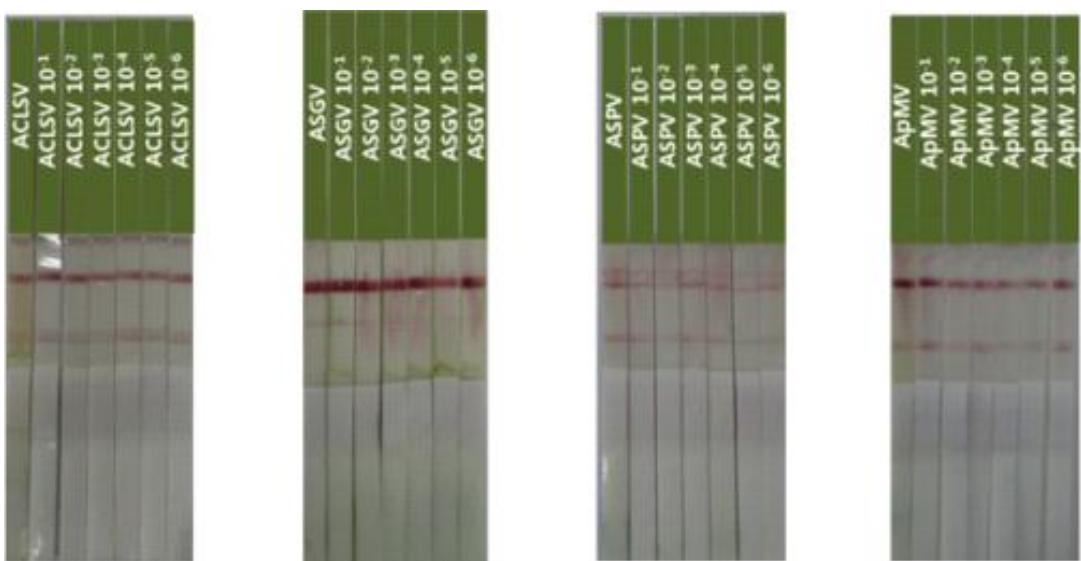


그림 9. 사과 바이러스 Immuno-strip 진단키트 민감도

2. 사과 바이로이드 LAMP 키트 개발

재료 및 방법. 사과 바이로이드 ASSVd에 대한 LAMP(등온핵산증폭) 키트용 프라이머 F3, B3, FIP(F2+F1c), BIP(B2+B1c), LoopF, LoopB를 제작한 후 사과 바이로이드 감염주의 total RNA를 주형으로 프라이머를 선별하였다. 프라이머 제작은 PrimerExplorer 프로그램을 사용하였다. LAMP 진단 반응 온도는 58, 60, 61, 63, 65, 67°C로 나눠서 조건을 선별하였고 진단 시간은 20, 30, 40, 50, 60분으로 나눠서 조사한 후 LAMP 최적반응 및 민감도 조건을 설정하였다. LAMP 형광 발색 조건은 SyberGreen을 이용하였고 육안 및 UV상에서 발광이 잘되어서 ASSVd 감염주와 건전주 구분이 가능한 최적을 설정하였다. LAMP 진단 반응액 및 조성은 Bst polymerase, Bst buffer, AMV reverse transcriptase, dNTP 등을 조합하여 최종 사과 바이로이드(ASSVd) LAMP 키트를 개발하였다.

내용 및 결과. 사과 바이로이드(ASSVd) LAMP 특이 프라이머 Set 1과 Set 2를 제작한 후 RT-PCR 및 LAMP 반응 후 Set 2 프라이머를 선별하였다. 그림 10.의 프라이머 모식도는 <http://loopamp.eiken.co.jp> 자료를 사용하였다. 이때 사용한 프라이머는 표 1과 같다. ASSVd LAMP 증폭 조건 설정은 LAMP 증폭 온도 58, 60, 61, 63, 65, 67°C 및 증폭 시간 30, 40, 50, 60, 70, 80분, 프라이머 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40p농도에 따라 진행하였으나 1년차에는 LAMP 반응의 실패로 실험 결과를 얻지 못했다.

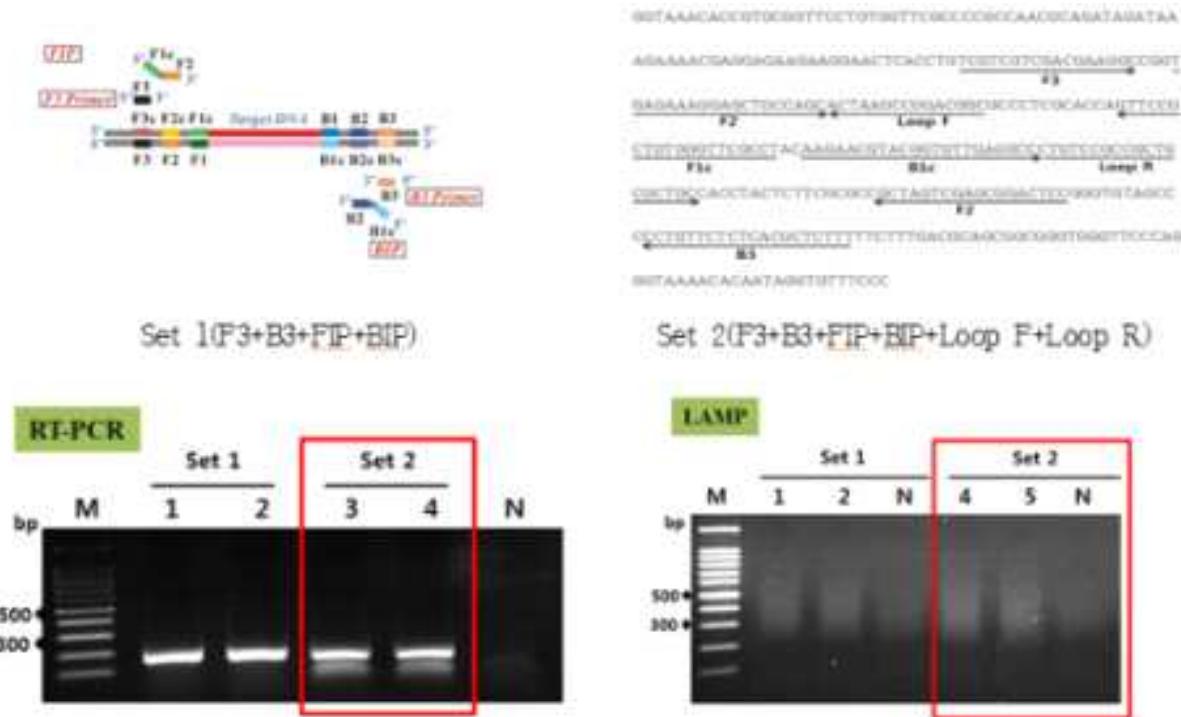


그림 10. 사과 바이로이드(ASSVd) LAMP 키트용 프라이머 제작 및 선별

표 1. 사과 바이로이드(ASSVd) LAMP 키트용 프라이머 염기서열

프라이머	염기서열(5'→3')
ASSVd-F3	TCGTCGTCGACGAAGGC
ASSVd-B3	AAAGAGCGTGAGAGAACAGG
ASSVd-FIP(F1C+F2)	AGGCGAACCCACAGCGAAC+TGAGAAAGGAGCTGCCAGC
ASSVd-BIP(B1C+B2)	AAGAACGTACGGTGTGAGGCC+GGAGTCCGCTCGACTAGC
ASSVd-Loop F	GCCGTCCGGCTTAGT
ASSVd-Loop R	CTGTCCGCCGCTGC

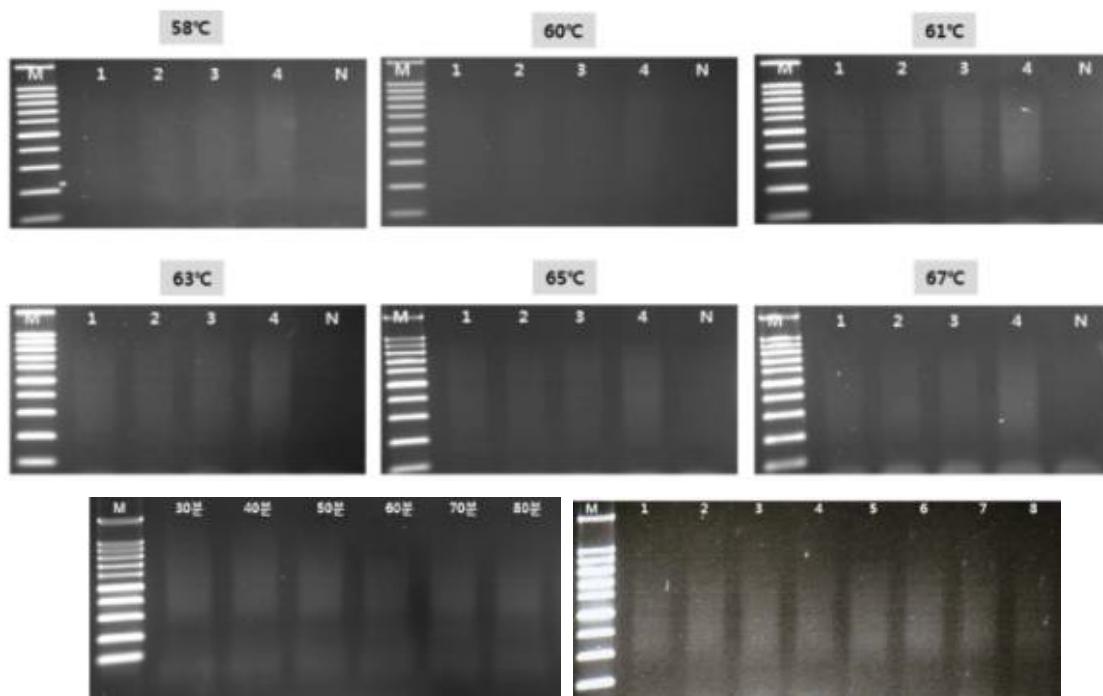


그림 11. 사과 바이로이드(ASSVd) LAMP 증폭을 위한 온도, 시간 및 프라이머 농도 조건

준인파류 바이러스·바이로이드는 복합진단기술 및 바이러스·바이로이드 진단용 유전자 마커를 표준 대조구로 사용하여 RT-PCR 검정을 사용하였다. 진단용 유전자 마커는 유전자 벡터, 바이러스·바이로이드(PeCV, PVd, CVd) 3종의 다중진단 프라이머와 18S rRNA (Internal control) 프라이머를 5pmol 넣고 94°C, 2분; <94°C, 30초; 60°C, 30초; 72°C, 45초> 25회; 72°C, 7분으로 PCR 증폭산물을 사용한다.

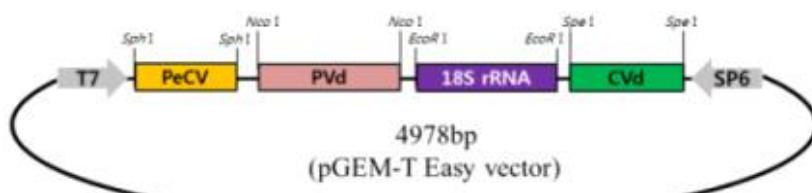


그림 12. 준인파류 바이러스·바이로이드 진단용 유전자 벡터

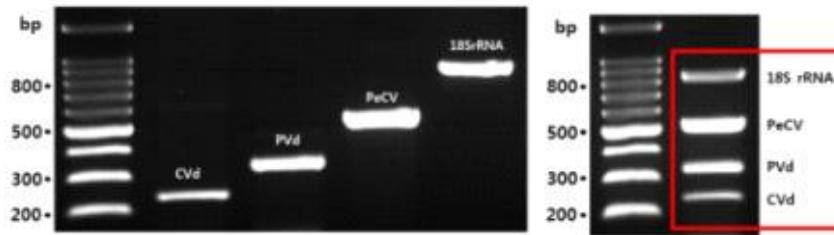


그림 13. 준인과류 바이러스 · 바이로이드 단일 또는 다중진단 유전자 마커

ASSVd LAMP 진단용 최적 반응 조건은 2년차에 LAMP 프라이머 추가 제작하여 RMA2(random primer)를 이용하여 RT 실시 후 cDNA를 이용하여 LAMP 진단 프라이머 농도를 설정하였다. F3, B3: FIP, BIP 농도를 1:1~1:4로 다르게 실험 한 결과 F3+B3 : FIP+BIP의 농도가 1:4 조건이 가장 좋은 것으로 나타났다. 반응 온도는 65°C, 반응 시간은 30분이 가장 적합한 것으로 나타났다.

표2. 사과 바이로이드(ASSVd) LAMP 진단 프라이머 염기서열

프라이머	염기서열 (5' → 3')
ASSVd-F3	TCGTCGTCGACGAAGGC
ASSVd-B3	AAAGAGCGTGAGAGAACAGG
ASSVd-FIP(FIC+F2)	AGGCGAACCCACAGCGGAACTTTGAGAAAGGAGCTGCCAGC
ASSVd-BIP(BIC+B2)	AAGAACGTACGGTGTGAGGCCTTTGGAGTCCGCTCGACTAGC

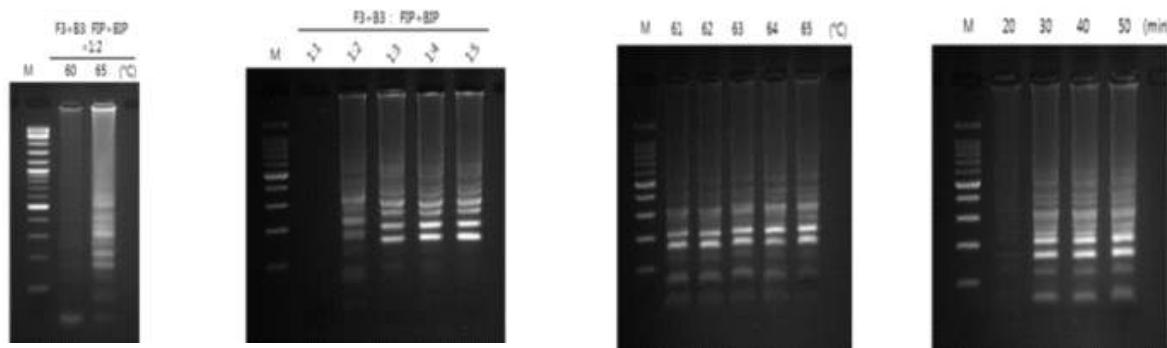


그림 14. LAMP 진단 프라이머 농도, 반응 온도 및 시간 조건 설정

2년차에 제작 선발한 LAMP 프라이머는 ASSVd 감염주와 건전주에서 바이로이드가 모두 증폭되어 3년차에 진단 특이 프라이머 F3, B3, FIP, BIP, LoopF, LoopB의 총 40종을 다시 제작하고 ASSVd 감염주 RNA를 이용해서 LAMP 50조합 중 4조합을 선발하였다. 또한 LAMP 진단 최적 반응 및 민감도 조건은 온도 65°C, 시간 60분으로 ASSVd LAMP 진단용 최적 반응 조건을 재설정하였다.

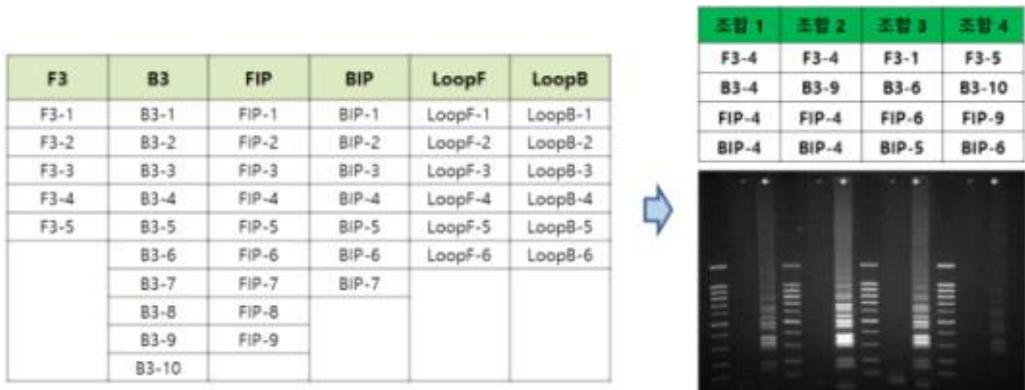


그림 15. 사과 바이로이드(ASSVd) LAMP 프라이머 제작 및 선발

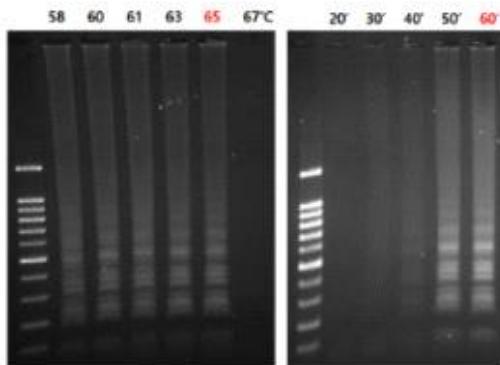


그림 16. LAMP 진단 최적 반응 조건(오른쪽:온도, 왼쪽: 시간) 및 민감도

LAMP 반응의 형광발색은 시약 SyberGreen($\times 10,000$)을 10분의 1로 희석한 1000배 농도에서 육안 관찰이 가장 용이하였다. 이병시료는 녹색으로 건전시료는 붉은색으로 관찰 되었다. SyberGreen($\times 1,000$)을 첨가한 이병시료 LAMP 반응액은 UV상에서도 발광이 되어 ASSVd 감염주와 건전주 구분이 가능하였다. LAMP 반응액은 Bst polymerase, Bst buffer, AMV reverse transcriptase, dNTP 등 6가지로 조성한 후 프라이머와 반응액 3가지 조성을 선별하였다(조합1/반응액5, 조합2/반응액2, 조합3/반응액3). 최종 프라이머 조합3과 반응액3을 선별하여 ASSVd LAMP 키트를 개발하였다. ASSVd LAMP 키트의 검출한계를 조사한 결과 ASSVd 감염주 핵산 농도가 100ng로 했을 경우 10^{-7} (0.01pg) 까지도 진단이 가능하였다. 개발된 사과 바이로이드 LAMP 진단키트는 ASSVd에 감염된 과실을 핵산추출 없이 바로 현장에서 사용하여 진단할 수 있다.

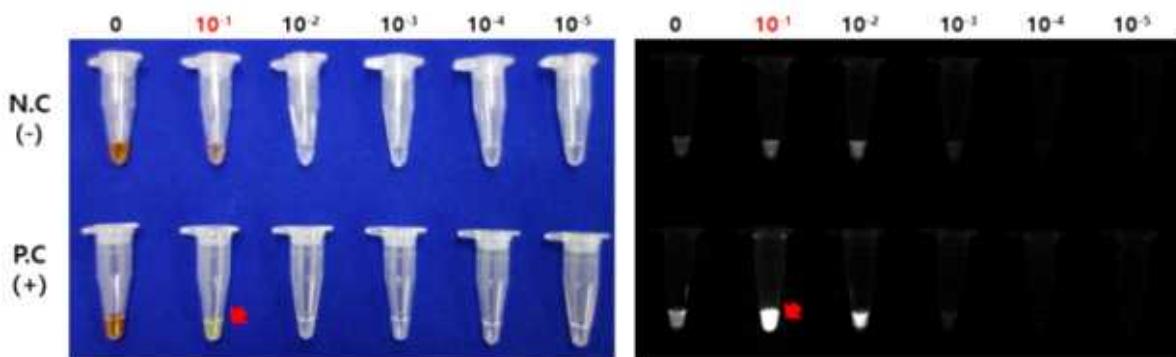


그림 17. 사과 바이로이드(ASSVd) LAMP 형광 발색 최적 조건

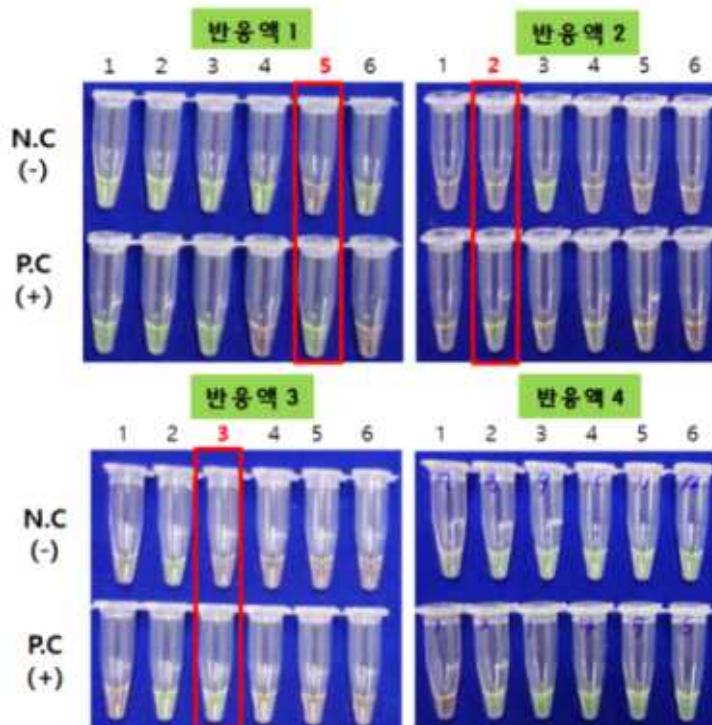


그림 18. 사과 바이로이드(ASSVd) LAMP 반응액 선별



그림 19. 사과 바이로이드(ASSVd) 혼장진단용 LAMP 키트 개발

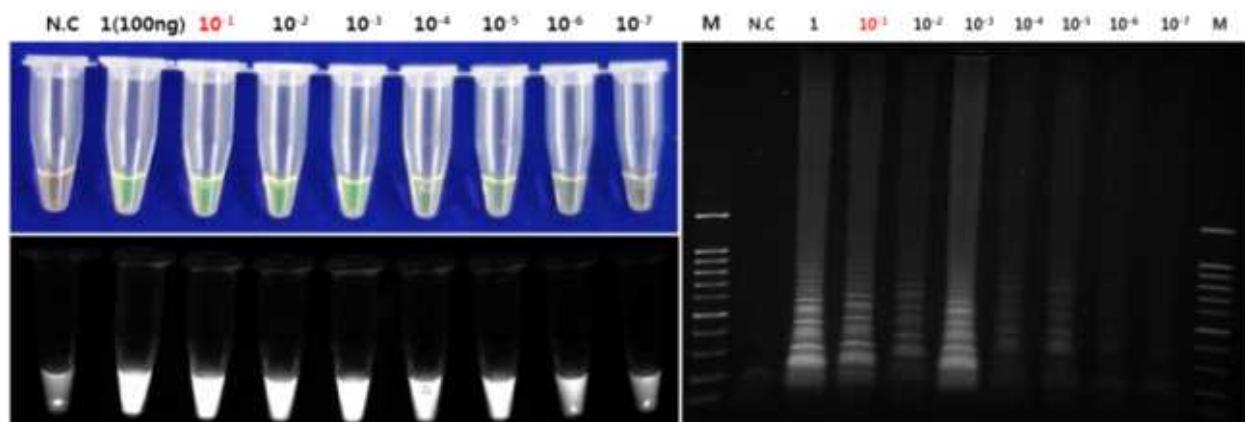


그림 20. 사과 바이로이드(ASSVd) 혼장진단용 LAMP 키트의 검출한계

<제1협동과제 : 과수 바이러스 진단용 DNA chip 개발>

【1년차】 1. 국내에 분포하는 과수 바이러스의 분석을 위한 시료의 수집

과수 가운데 경제적으로 중요하며 바이러스 free 무병주의 생산 및 보급을 위하여 필수적인 사과 감염 바이러스 (장미과의 배 및 복숭아에도 교차 감염 바이러스)의 분석을 위하여 98개체의 시료가 수집 되었다. 수집된 시료는 바이러스 이병 의심 개체는 물론 바이러스 감염이 되지 않은 건전 개체로 판단되는 시료도 수집되었다. 사과 바이러스의 경우 대목을 통하여 확산될 가능성이 매우 높기 때문에 약 50여개의 대목 시료도 포함되어 있다 (그림 1).



그림 1. 수집된 98점의 사과 시료의 일부 사진. 목본류에서 전형적인 바이러스 증상은 뚜렷하게 나타나지 않아 성장 저해 등의 증상을 중심으로 시료가 수집되었다.

경제적으로 중요한 과수 가운데 포도과에 속하는 포도에는 전 세계적으로 수십종의 바이러스가 보고되어져 있으며 국내에 분포하는 포도 감염 바이러스를 분석하기 위하여 사과의 경우와 마찬가지로 바이러스 이병 의심 시료와 함께 건전 포도로 판단되는 시료를 포함하였고 총 30 개체가 수집되었다 (그림 2).



그림 2. 수집된 30점의 포도 시료의 일부 사진. 포도에서는 모자이크, 엽맥의 색깔 변화, 생육 저해, 잎 말림 현상을 나타내는 개체를 중심으로 시료가 수집되었다.

사과 및 포도를 중심으로 수집된 시료는 당해 연도에 집단 전사체 분석 (meta- transcriptom analysis)을 실시하였으며 결과 분석이 완료되는 2015년 상반기에 칩 제작을 위한 프로브 설계에 활용할 예정이다. 바이러스 의심 증상이 보이지 않는 건전 개체를 분석에 포함한 것은 추후 바이러스 free 무병주의 생산 체계를 확립하는 과정에서 실제 기주의 성장 또는 품질에 큰 피해를 끼치는 의심 바이러스를 사전에 동정하여 조사 사업에 활용하기 위하여 시험 설계가 이루어졌다.

2. 수집된 시료의 PCR 분석

수집된 수 백점의 시료를 집단 전사체 분석에 투입하기 위한 사전 조사 작업으로 수집된 시료 가운데 사과 8개체, 복숭아 1개체를 대상으로 집단 전사체 분석의 효율성 및 칩 제작에 활용 가능한 결과 도출이 이루어지는지 여부를 확인하였다. 봉화, 보은, 예산, 무주 등지에서 수집된 시료들은 바이러스 의심 증상 보유 여부와 상관없이 본 과제 책임자의 주관적인 판단에 의하여 수집되었으며 수집된 시료에는 공통된 특징적인 증상은 없으나 개체 전체의 성장 지연, 잎의 크기 및 형태에서 상대적으로 주변 개체 대비 왜소한 개체들이었다.

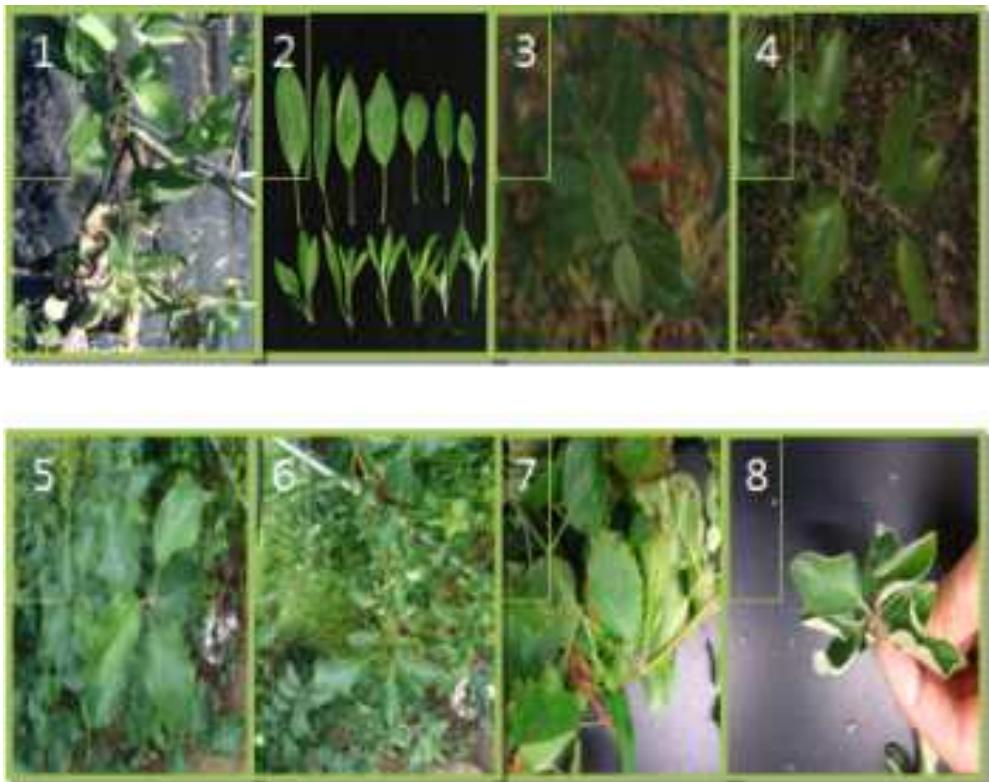


그림 3. 수집된 8점의 사과 시료의 사진. (1) 무주. (2), (3), (4), (8) 봉화. (5), (6) 예산. (7)보은에서 수집된 사과 시료

집단 전사체 분석에서 획득된 바이러스 관련 컨티그는 약 200여개임. 이들 가운데 컨티그의 크기가 0.4kb이하인 경우에 분석의 효율성이 떨어지기 때문에 추가 분석 대상에서 제외하였고 0.4kb이상인 52개의 컨티그가 집중적으로 분석되었으며 이들의 목록은 표 1에 기재되어 있다. 이들 가운데 67%는 기존에 알려진 바이러스 서열과 90% 이하의 상동성을 나타내어 알려지지 않는 바이러스가 다수 존재할 가능성이 높은 것으로 판단된다.

표 1. 0.4kb이상인 52개의 컨티그의 정보

No.	Contig ID	Annotation (Blastn)	Query coverage	Identity
1	555989	ACLSV	99%	89%
2	726702	ACLSV	96%	83%
3	1012480	AGCaV	99%	82%
4	93549	AGCaV	99%	78%
5	107125	ASGV	98%	94%
6	281674	ASGV	99%	83%
7	322376	ASGV	100%	93%
8	333749	ASGV	100%	96%
9	3480	ASGV	99%	91%
10	540265	ASGV	100%	84%
11	734572	ASGV	100%	92%

12	746453	ASGV	99%	95%
13	936228	ASGV	100%	99%
14	276880	ASGV	100%	91%
15	292546	ASGV	100%	96%
16	438226	ASGV	99%	98%
17	624080	ASGV	88%	99%
18	728500	ASGV	100%	97%
19	790540	ASGV	100%	93%
20	846750	ASGV	95%	82%
21	34776	CTLV	91%	84%
22	360256	CTLV	98%	79%
23	114111	ASPV	99%	87%
24	1204668	ASPV	85%	90%
25	121616	ASPV	99%	82%
26	271566	ASPV	100%	78%
27	273023	ASPV	99%	75%
28	274366	ASPV	99%	87%
29	307196	ASPV	98%	84%
30	320605	ASPV	98%	84%
31	343250	ASPV	100%	84%
32	417032	ASPV	92%	83%
33	188422	ASPV	99%	81%
34	450691	ASPV	100%	88%
35	486206	ASPV	100%	94%
36	517940	ASPV	99%	90%
37	680138	ASPV	100%	88%
38	89192	ASPV	99%	81%
39	92742	ASPV	98%	92%
40	935900	ASPV	99%	79%
41	136415	ASPV	100%	83%
42	141873	ASPV	99%	79%
43	204809	ASPV	99%	83%
44	302849	ASPV	99%	81%
45	355646	ASPV	99%	87%
46	768443	ASPV	98%	85%
47	305081	ASPV	99%	81%
48	86056	ASPV	98%	68%
49	281854	ASPV	99%	82%
50	65587	ApLV	88%	77%
51	1802365	ApLV	99%	78%
52	116777	ApLV	100%	76%

이들을 Blast한 결과 83%는 국내에 널리 분포된 두 종류의 바이러스, ASPV, ASGV, 유래인 것으로 나타났고 나머지 17%는 ACLSV, AGCaV, CTLV, 및 ApLV로 구성되어 있다. 이번 분석에서 국내 미보고

종인 AGCaV와 ApLV가 확인되었다(그림 4).

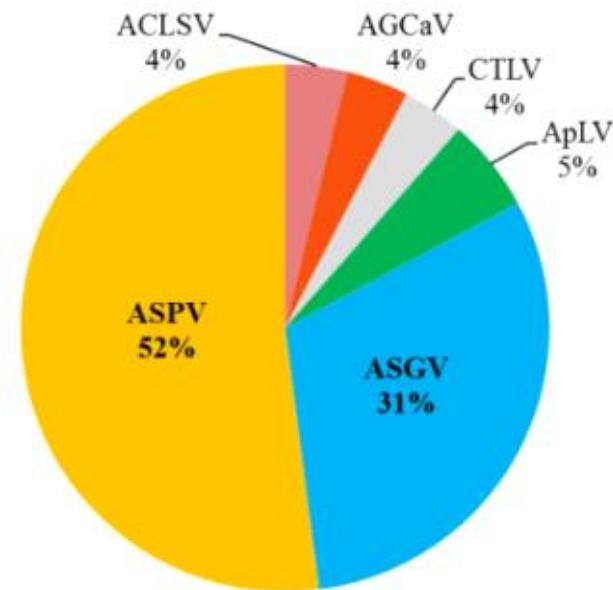
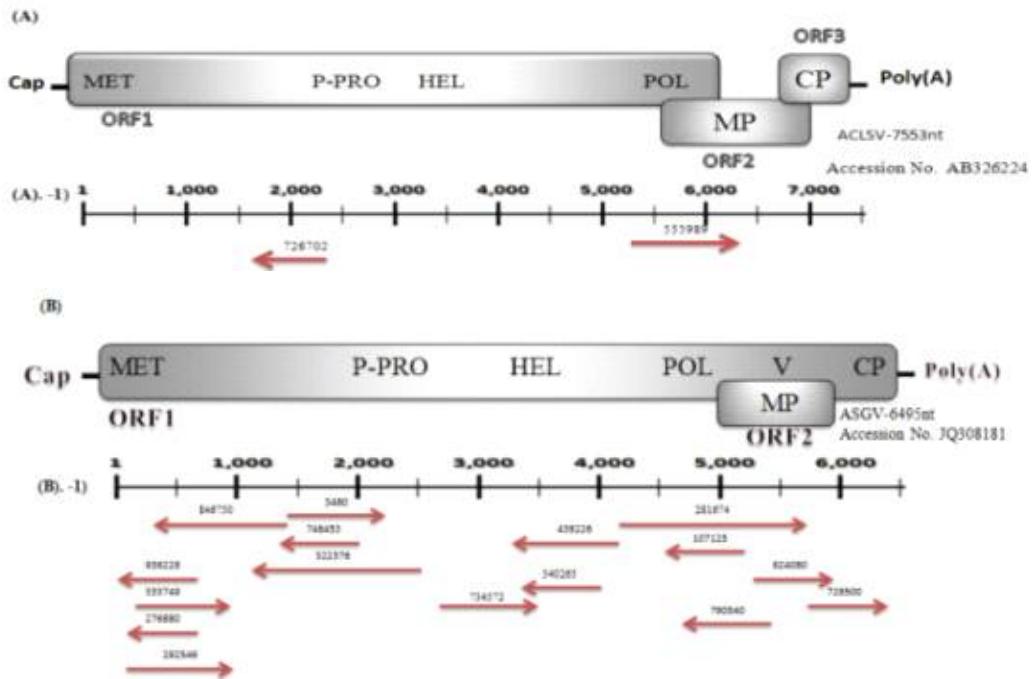


그림 4. 52개 컨티그의 분석 결과 나타난 사과에 발생하는 바이러스의 분포. 83%의 컨티그는 ASGV 및 ASPV에 해당되며 나머지 4종의 바이러스가 17%를 점유하고 있다.

각각의 컨티그들을 알려진 바이러스 게놈에 상대적인 위치를 표시한 결과 ASPV와 ASGV는 게놈 전체에 고루 분포되어 있음을 확인하였다(그림 5).



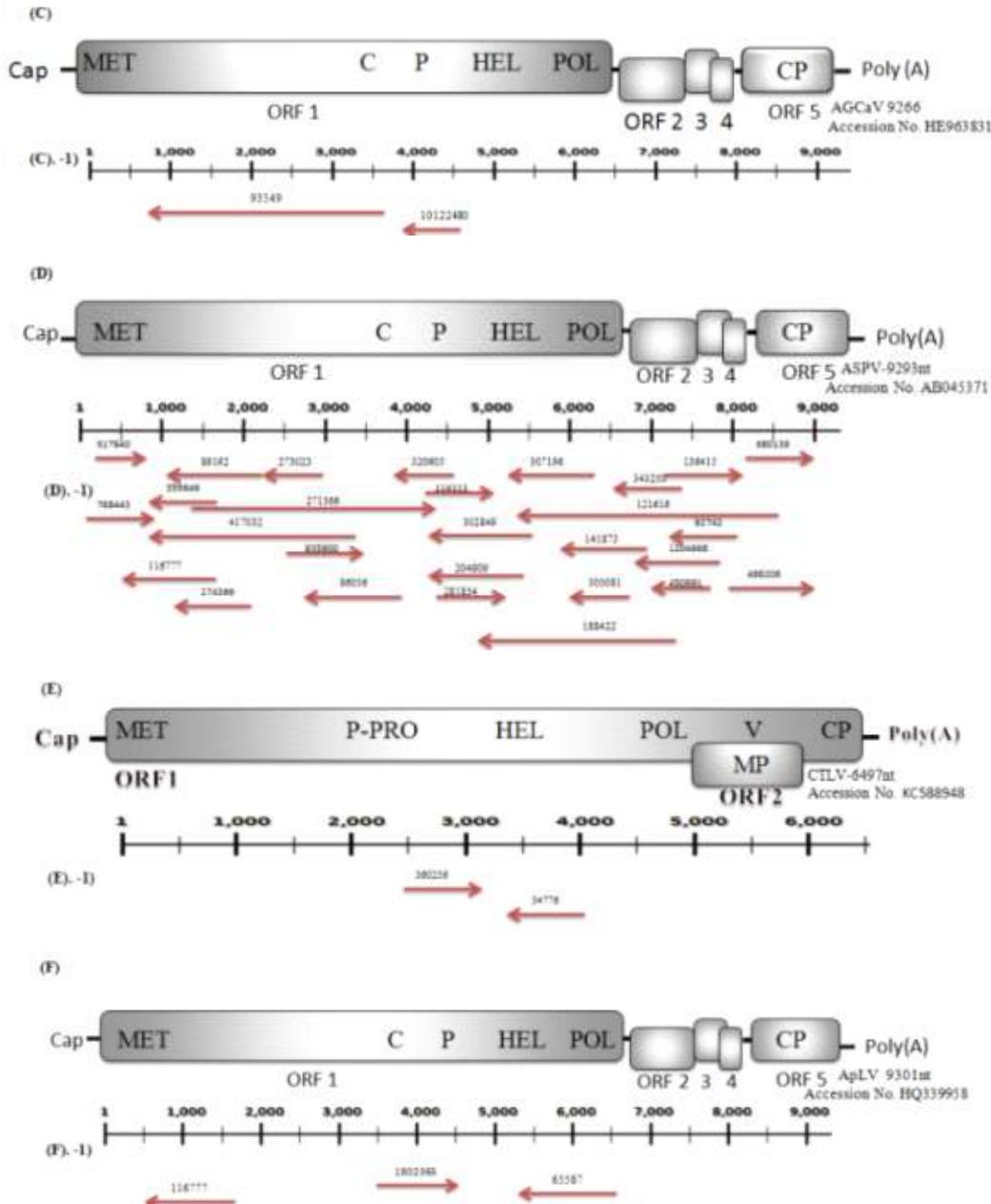


그림 5. 여섯 종의 사과 바이러스의 기준 서열에 대한 컨티그들의 상태 위치. 각각의 화살표는 컨티그를 나타내며 화살표 위의 숫자는 각 컨티그의 고유 번호이다.

8개의 시료를 대상으로 RT-PCR 분석을 실시하기 위하여 31개 컨티그 정보로부터 31개 세트의 프라이머를 설계 제작하였다(표 2). RT-PCR 분석을 실시한 결과 8개 시료 모두 바이러스에 감염되어 있었으며 최소 2종의 바이러스에 의하여 복합 감염되어 있었으며 최대 6종의 바이러스에 복합 감염되어 있는 것으로 확인되었다(표 3).

표 2. 당해 연도에 사용된 프라이머의 정보

Virus	Node no.	Description	Primer	Sequence(5' - 3')	(bp)
ACLSV	726702	ACLSV	ACLSV-For	GTCCTTACCCAACCTTTGA	410
			ACLSV-Rev	ATGCTGACGAAACAAGCAGTC	
ASGV	540265	ASGV	540265_For	TCTTGACATGGAAAAGAATG	430
			540265_Rev	ACATGCTAGAGTTGGCCAG	
ASGV	846750	ASGV	846750_For	AATCTCTGGCATGTACAAT	760
			846750_Rev	GACACGTCAAAGTCGTCCCT	
ASGV	127570	ASGV	127570_For	AAATCATCTCTGTACATAT	480
			127570_Rev	CACTCTGAAGCAACACCATC	
ASGV	34776	ASGV	34776_For	CACCATCAAGCTTCAGATGACGT	403
			34776_Rev	TCAACATGGGACCAAATCTGAAC	
ASGV	360256	ASGV	360256_For	CGAGCTGTCCAAGACTTGTGG	532
			360256_Rev	GCCTTCTAGAATGAATTGCCAT	
ASGV	281674	ASGV	281674_For	AGACTTGGGTCAATTGGCAATAAT	630
			281674_Rev	TGGCGTCCTTGTAAGCTCCGAT	
ASGV	66522	CTLV	66522_For	CAATTGAATCTGACTACACA	400
			66522_Rev	TACCACCCACAGAACATTGG	
ASGV	72445	CTLV	72445_For	CATAAAGTGCCTCAATGGAT	430
			72445_Rev	CCTGAAGAAGGTACTTATGT	
ASGV	147880	CTLV	147880_For	GTCTGTCGCATGAGATGATT	500
			147880_Rev	CAGCTAGCATTCTCTAGGG	
ASGV	240253	CTLV	240253_For	ACGGATCCAATGCTTGCAGA	570
			240253_Rev	CTCAATTGCCCTCAGCATAG	
AGCaV	93549	AGCaV	93549_For	AAGTGTAAAGTCAACTGCAG	720
			93549_Rev	CTGTATGAGACATTGATTGT	
AGCaV	1012480	AGCaV	1012480_Fo	GAAGTTCAGCCCGATTGT	510
			1012480_Re	GGTGGAAATAGCTGAATCTC	
AGCaV	65587	ASPV	65587_For	GGCTGAGAGGTATGAGTCCA	650
			65587_Rev	CGATCAAGTCTGGAGGGAGC	
AGCaV	188422	ASPV	188422_For	GATGATCACAGCAAGAATAG	710
			188422_Rev	TTGATGAAAGTGTAAATCGGC	
ASPV	89192	ASPV	89192_For	GGTTCTTCTTCATGATGAG	700
			89192_Rev	ACCACTTAAAGTTCTAGA	
ASPV	136415	ASPV	136415_For	TATAGCCTTCCCAGGGGATT	530
			136415_Rev	CAGTTCTAGGTAAACCAGCC	
ASPV	141873	ASPV	141873_For	TATTATGGGCTTGAGGCTGTGCG	580
			141873_Rev	ATACCTCATGTATGGAGCAAATC	
ASPV	204809	ASPV	204809_For	TGGATGTGTGATAAGAGCAATCGC	530
			204809_Rev	CGAATGTACCCAGAAATCATTATCA	
ASPV	271566	ASPV	271566_For	TCACTCAACTGGAAGGATGACTT	840
			271566_Rev	GTCAAGGAAGAATAGGTTACCATG	
ASPV	273023	ASPV	273023_For	GTATTGGCTCCACTTCGGCTCTT	490
			273023_Rev	TCATGTCCAGGCACACTTCAAC	
ASPV	302849	ASPV	302849_For	GAAGTCCTAAAGGCTGCAACATTG	634
			302849_Rev	CCGGGAGATTTCGATGAA	
ASPV	307196	ASPV	307196_For	AGTACACCCTTGGGACAGCATAAC	644
			307196_Rev	ACTGCTCTGTGGTGTATCACCA	
ASPV	320605	ASPV	320605_For	GAATGTGAATTGTCAGATTGAC	420
			320605_Rev	TATTACACATCCATTACGGGC	
ASPV	343250	ASPV	343250_For	GAGTCTGATTATGAGGCTTTGAT	456
			343250_Rev	CCAGATTCCCTAGTCTCTGGC	
ASPV	417032	ASPV	417032_For	CAATCCGTGGTGCTACCTTC	493

			417032_Rev	GTCTGGCAACATATTGTTCA	
ASPV	86056	ASPV	86056_For	TGGGATCGTCTCAAGATCTATC	580
			86056_Rev	ATGATCAGGGTCATAAATATCCT	
ASPV	281854	ASPV	281854_For	ACTTGGTCGTCGCGAAGTTGAC	372
			281854_Rev	TGGAAGCTCGATCAATTGATGGT	
ASPV	305081	ASPV	305081_For	GAAGCTGTGAGAGCTCAATGGGT	353
			305081_Rev	GCATGCACTGCATCACTCATCA	
ASPV	121616	ASPV	121616_For	GGAATCAGATTATGAGGCAT	680
			121616_Rev	CACATATCTGAAATTGAGAT	
ApLV	116777	ASPV	116777_For	AGATCATCCTCCAGTTGAG	
			116777_Rev	TCTTCAATGGATTGAGGCT	430

표 3. 8개의 사과 시료를 RT-PCR에 의하여 분석한 결과. 예산에서 수집된 시료 5번은 6개의 바이러스에 복합 감염된 것으로 나타났다.

No	Location	RT-PCR results					
		ACLSV	ASGV	ASPV	AGCaV	ApLV	CTLV
1	Muju	-	-	+	-	-	+
2	Bonghwa	+	-	+	+	+	+
3	Bongwa	-	-	-	+	-	+
4	Bongwa	-	-	+	+	+	-
5	Yesan	+	+	+	+	+	+
6	Yesan	+	-	+	+	+	+
7	Bonghwa	+	-	+	-	-	+
8	Boeun	-	-	+	+	+	-

+, positive; -, negative

1개의 복숭아 시료를 분석한 결과 9개의 컨티그가 *Little cherry closterovirus*와 약 70% 수준의 상동성을 보였다. 이들 컨티그 모두 RT-PCR을 통하여 복숭아 시료에서 확인되었음. 상동성이 70% 수준일 경우 새로운 신종일 가능성성이 높을 것으로 판단되어 전체 17kb 가량의 RNA genome을 모두 분석하였다(그림 6). 전체 게놈 서열을 확인한 결과 신종으로 판단되었으며 이 바이러스에 대한 추가적인 조사 연구가 필요할 것으로 판단된다.

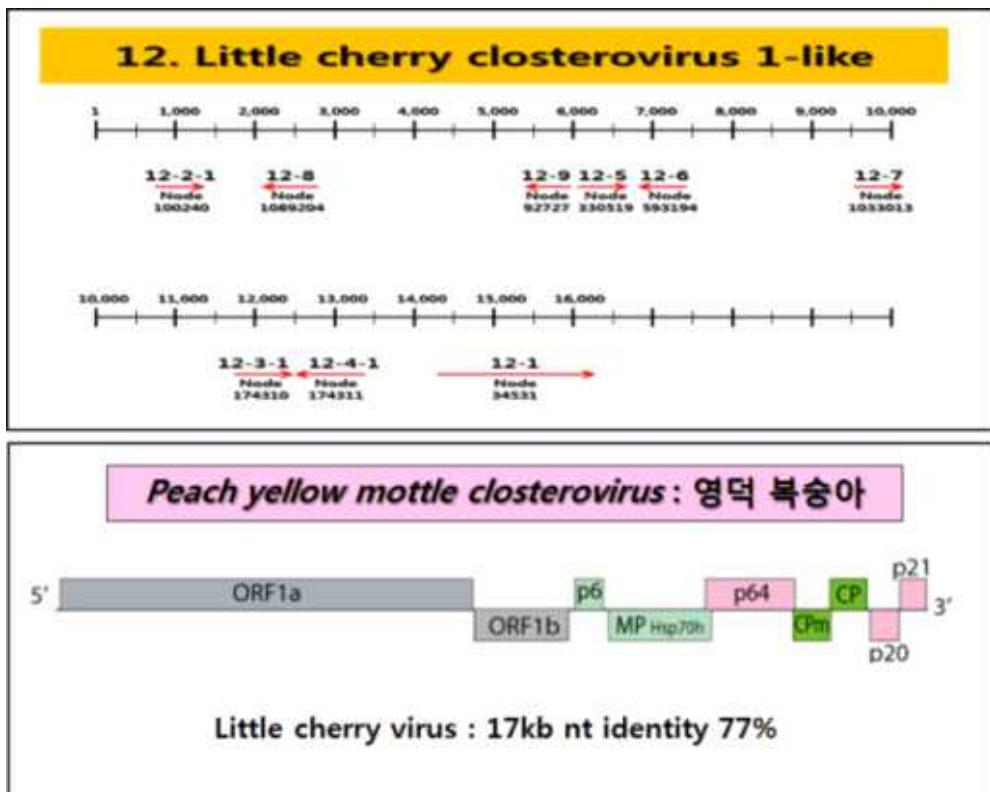


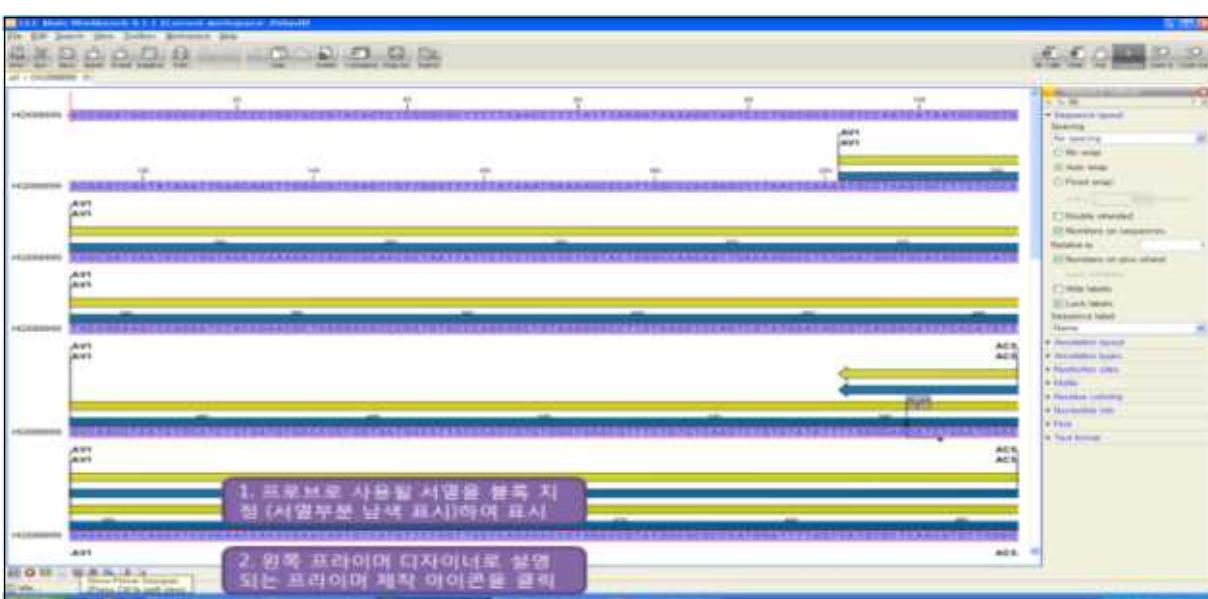
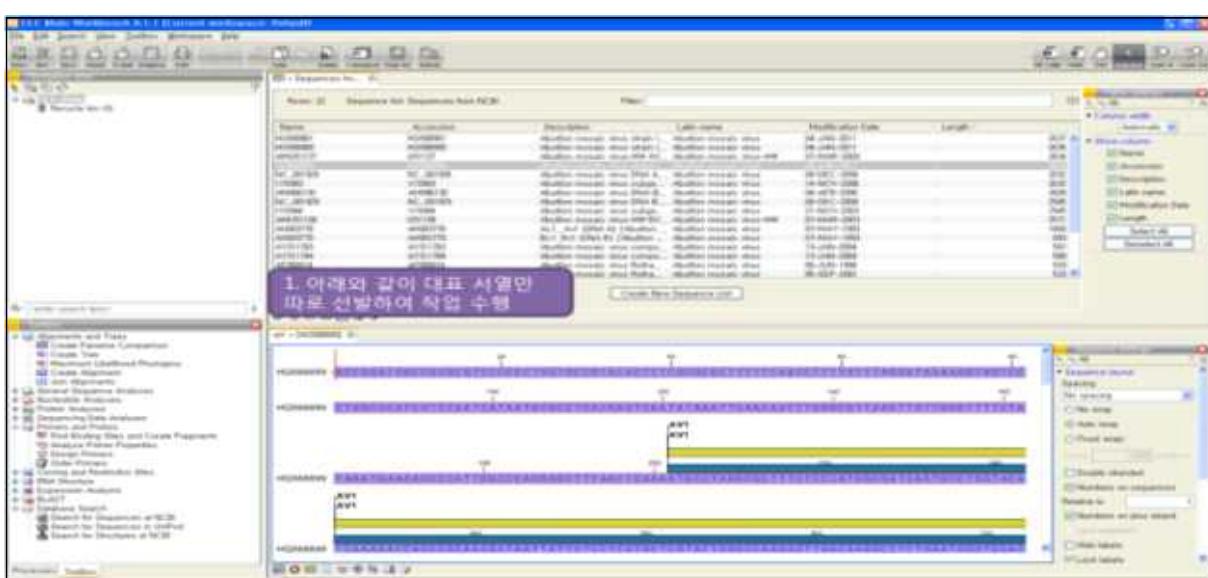
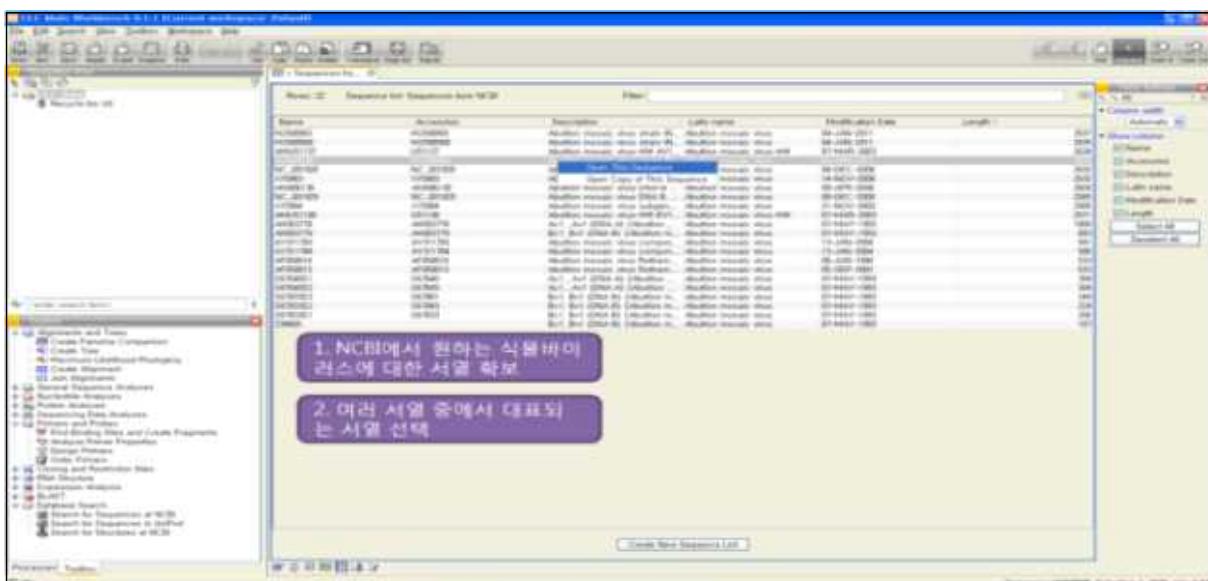
그림 6. 복숭아 시료에서 확인된 9개의 컨티그 정보를 활용하여 약 17kb 크기의 복숭아 신종 바이러스의 전체 RNA genome을 해독하였다.

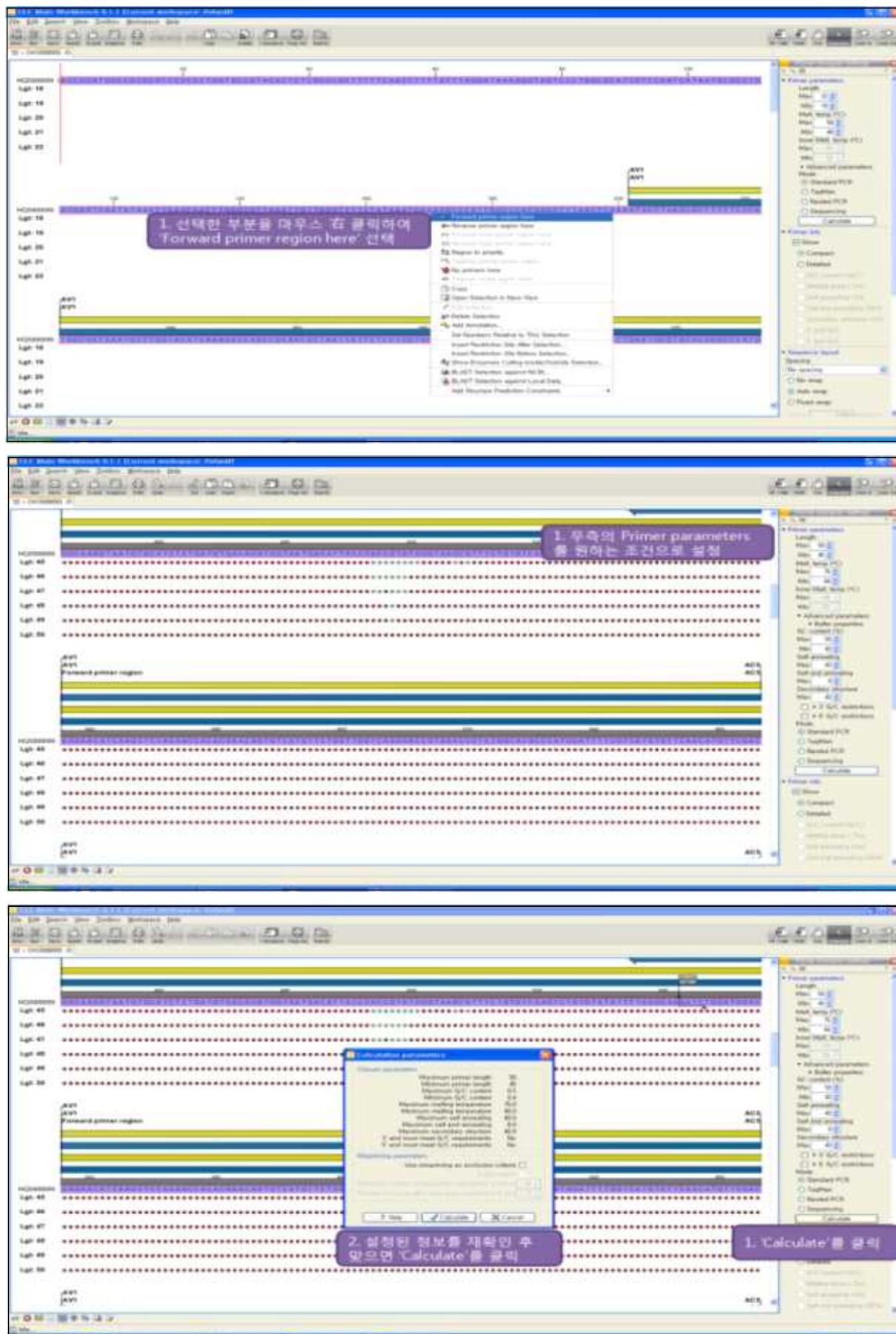
3. 식물 바이러스 유전 정보 수집 및 분석

바이러스 진단용 칩에 활용될 프로브의 설계를 위하여 알려진 식물 바이러스 서열을 수집하여 분석하였다. 그러나 8개의 사과 시료 및 1개의 복숭아 시료의 집단 전사체 분석 결과에 따르면 새로운 신종은 물론 무수히 많은 수의 변종 바이러스들의 존재가 입증되었음. 이들을 검출 할 수 있는 칩의 제작을 위하여 기준에 알려진 정보를 포함하여 현재 분석이 진행되고 있는 100점의 사과 시료 및 30점의 포도 시료의 분석 결과 나타나는 국내 분포 신·변종 과수 바이러스의 정보를 포함시켜 칩의 제작에 활용할 예정이다.

4. 분석된 유전 정보로부터 프로브의 설계

바이러스 진단용 칩에 활용되어질 프로브 약 20,000 여개가 설계되었다(그림 7). 추가적으로 10,000개 이상의 프로브를 설계하여 국내에 발생하는 거의 모든 과수 바이러스를 검출 가능한 수준의 칩 성능을 가질 수 있도록 칩을 설계할 예정이다.





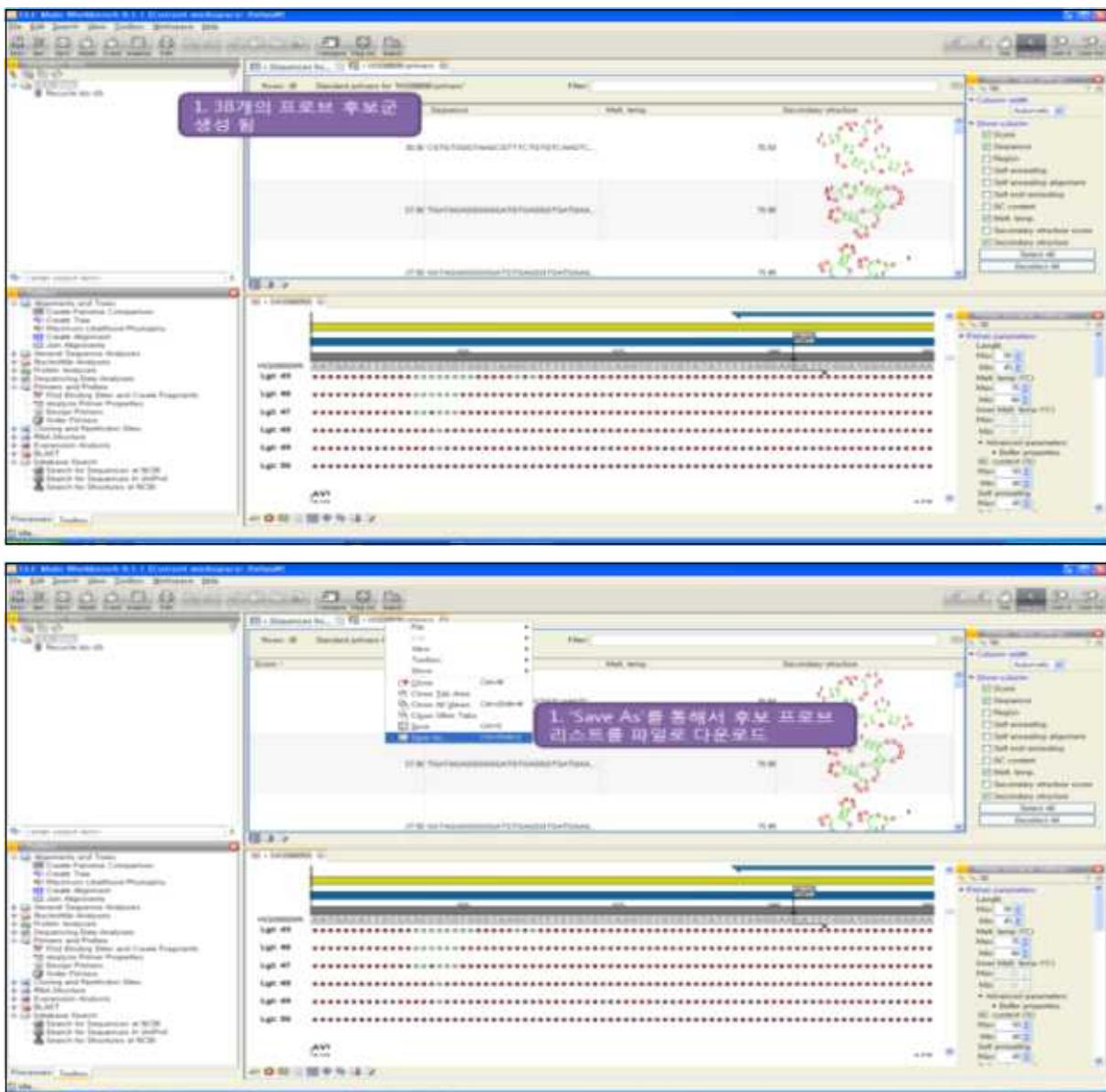


그림 7. 수집된 바이러스 서열 정보를 활용하여 CLC workbench에서 프로토 설계 과정

【2년차】 1. 과수 시료의 수집

과수 시료를 수집하기 위하여 주관 기관인 국립원예특작원과 경상북도 농업기술원의 협조를 통하여 사과시험장, 복숭아 시험장, 및 국립원예특작원 포도 유전자원 포장에서 과수 시료를 수집하였다. 육안으로 바이러스 감염 의심 시료를 선발하여 수집하였으며 유사한 감염 의심 증상을 나타내는 경우 최대한 중복을 회피하기 위하여 동일한 증상으로 판단되는 개체는 수집 대상에서 제외하였다. 대부분 나무를 감염하는 바이러스의 경우 잠복 증상을 나타내는 경우가 매우 흔하게 나타나기 때문에 추후 바이러스 감염 의심 시료와 육안으로 건전하다고 판단되는 개체를 확인하기 위하여 예산 능금 농협 육묘장에서 사과 건전주를 수집하였다. 포도의 경우 경산에 위치한 포도 육묘 업체의 협조를 받아 건전주로 판단되는 개체를 수집하였다. 복숭아 및 핵과류의 경우 육안으로 이병주와 건전주의 차이를 확인하기 어려워 당해 연도에는 복숭아

건전주는 수집하지 않았다. 수집된 시료는 즉시 액체 질소에 처리하여 파우더 형태로 미세한 가루를 만든 다음 -70°C 냉동고에 보관하여 paired-end RNA sequencing, RT-PCR, DNA chip 실험에 활용하였다.





그림 1. 수집된 사과 시료 사진. 포장에 존재하는 다양한 신·변종 사과 바이러스를 확인하기 위하여 서로 다른 바이러스 이병 증상을 나타내는 16 품종을 수집하여 paired-end RNA sequencing, pilot 칩 실험, 및 바이러스 진단용 시료로 활용하였다.





그림 2. 수집된 복숭아 및 기타 핵과류 시료 사진. 포장에 존재하는 다양한 신·변종 핵과류 감염 바이러스를 확인하기 위하여 서로 다른 바이러스 이병 증상을 나타내는 36 품종을 수집하여 paired-end RNA sequencing, pilot 칩 실험, 및 바이러스 진단용 시료로 활용하였다.



그림 3. 수집된 포도 시료 사진. 포장에 존재하는 다양한 신·변종 포도 감염 바이러스를 확인하기 위하여 서로 다른 바이러스 이병 증상을 나타내는 36 품종과 바이러스 이병 증상을 나타내지 않은 시료들을 수집하여 paired-end RNA sequencing, pilot 칩 실험, 및 바이러스 진단용 시료로 활용하였다.

2. 과수 시료를 활용하여 pilot DNA chip 제작용 probe 설계를 위한 paired-end RNA sequencing 확보된 사과, 포도, 및 복숭아를 포함한 핵과류 과수 시료를 활용하여 수집된 시료에 존재하는 바이러스를 확인하기 위하여 paired-end RNA sequencing을 수행하였다. 기존에 널리 활용되는 바이러스 진단법인 PCR 또는 ELIZA 방식과 달리 paired-end RNA sequencing 방법은 일종의 meta-transcriptome 분석으로 기 알려진 바이러스 서열에 대한 정보가 없어도 알려진 바이러스, 변종 바이러스 및 신종 바이러스를 동정하는 도구로써 매우 유용하다. 사과, 복숭아, 및 포도 각각으로부터 20Gb의 data를 생산하였다. 생산된 data는 contig의 형태로 assemble하여 seqgenesis에서 개발한 SG-VIPdb 및 blastn에 의하여 바이러스 서열로 annotation된 것들을 확보하였다. 각각의 과수 시료에서 확보된 약 500-1,000여개의 바이러스 유래로 추정되는 contig들은 manual curation을 거쳐 최종적으로 과수 바이러스 유래 서열로 확정하여 추가적인 분석을 실시하고 있으며 차년도 상반기까지 수행할 예정이다. 사과 data에서 확보된 결과를 요약하면 4속 8종의 사과 감염 바이러스의 서열이 확인되었다. 이들 가운데 5종 바이러스는 국내 미 보고종인 것으로 추정된다. 복숭아 data에서 확보된 결과를 요약하면 8속 18종의 사과 감염 바이러스의 서열 및 3종의 바이로이드가 확인되었다. 이들 가운데 15종 바이러스는 국내 미 보고종인 것으로 추정된다. 또한 4종의 바이러스는 전 세계적으로 알려지지 않은 신종 바이러스로 추정된다. 포도 data에서 확보된 결과를 요약하면 10속 22종의 사과 감염 바이러스의 서열 및 4종의 바이로이드가 확인되었다. 이들 가운데 17종 바이러스는 국내 미 보고종인 것으로 추정되었다. 또한 5종의 바이러스는 전 세계적으로 알려지지 않은 신종 바이러스로 추정된다. 수집된 data는 과수 바이러스 진단용 DNA chip 제작에 활용되었다.

표 1. Paired-end RNA sequencing 결과 확보된 contig들의 annotation 기준으로 사과 시료에 감염된 것으로 추측되는 사과 바이러스. 푸른색으로 표시된 바이러스 종은 국내 미보고 종으로 추측되는 바이러스

Apple infecting viruses	Number of contigs	%
Apple stem pitting foveavirus (ASPV)	174	64.68
Apple chlorotic leaf spot tricovirus (ACLSV)	45	16.73
Apple stem grooving capillovirus (ASGV)	22	8.18
Apple green crinkle associated foveavirus (AGCaV)	20	7.43
Citrus tatter leaf capillovirus (CTLV)	4	1.49
Pear black necrotic leaf spot capillovirus (PBNLSV)	2	0.74
Tobacco streak Ilavirus (TSV)	1	0.37
Cucumber mosaic cucumovirus (CMV)	1	3.37
4 genus 8 species	269	100

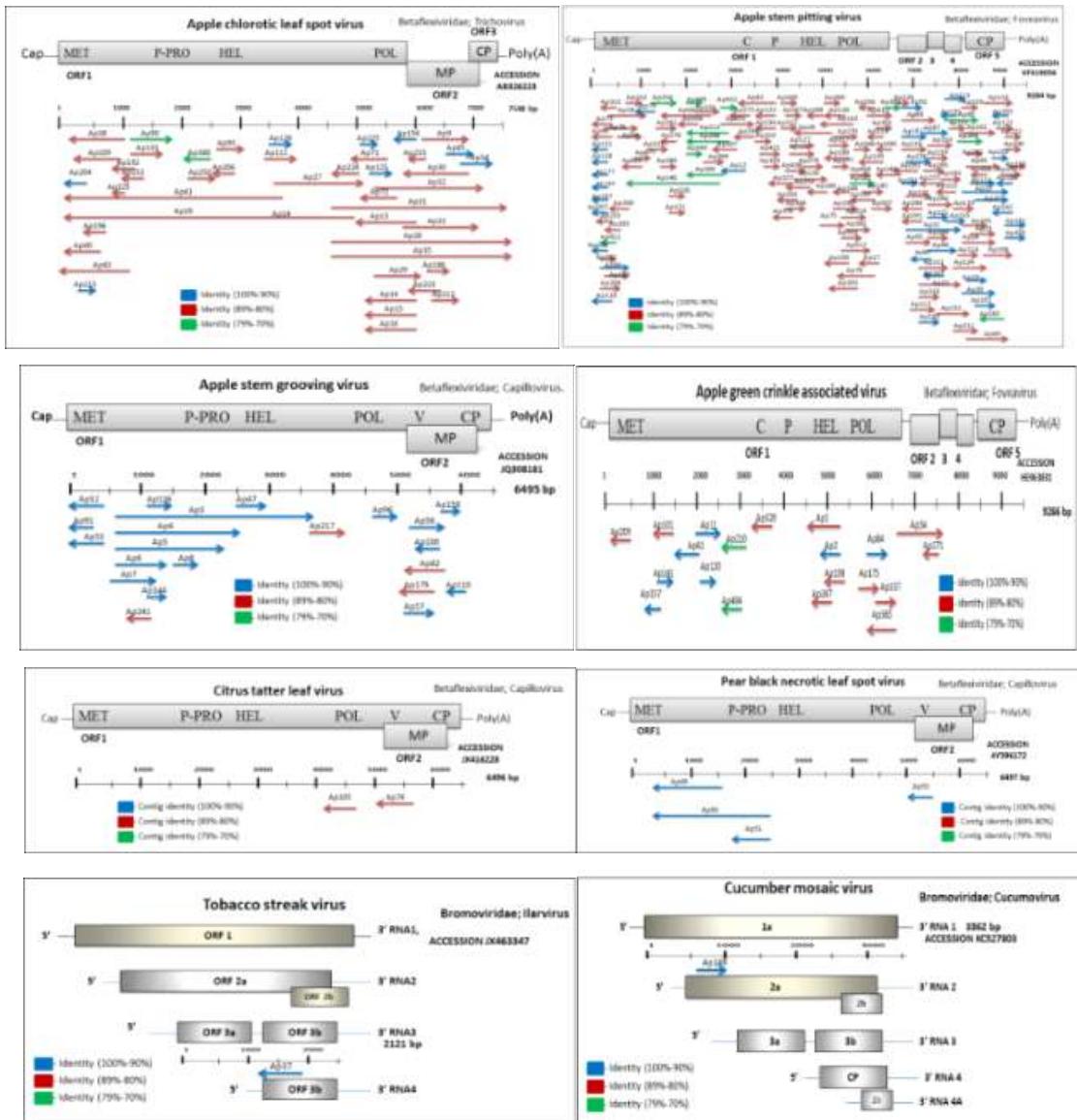


그림 4. Paired-end RNA sequencing 결과 확보된 269개 contig들의 annotation 기준으로 사과 감염 바이러스들의 reference 서열에 대한 상대적 위치. 269개 contig들의 분포는 약 90% 수준에서 국내에 이미 보고된 바이러스들인 ASPV, ASGV, ACLSV 유래인 것으로 나타났다. 나머지 5종은 국내에서 보고되지 않은 미보고 종으로 사료됨. 이들 269개 contig 가운데 기존에 알려진 바이러스 서열과 비교하여 70% 수준의 상동성, 즉 신종에 근접한 수준의 contig의 수는 17개로 나타났으며 80% 수준의 상동성, 즉 기존의 방식으로 동정이 불가능한 변종 수준의 contig의 수는 약 200 여개로 나타나 사과 감염 바이러스에 대한 추가연구가 필요하다.

표 1. ASPV로 추정되나 상동성 70% 수준의 contig으로부터 설계된 primer 리스트 및 각각의 contig에 대한 감염주로 확인된 시료

Lane	Contig No	length	Query cover	Identity	Primer name	Size	Positive sample No
1	Ap148	1847	99%	76%	Ap148-ASPV76%-For Ap148-ASPV76%-Rev	506	1
2	Ap411	237	98%	78%	Ap411-ASPV78%-For Ap411-ASPV78%-Rev	167	9
3	Ap522	284	83%	74%	Ap522-ASPV74%-For Ap522-ASPV74%-Rev	171	1, 16
4	Ap265	398	94%	79%	Ap265-ASPV79%-For Ap265-ASPV79%-Rev	191	1, 9, 14, 16
5	Ap345	390	99%	75%	Ap345-ASPV75%-For Ap345-ASPV75%-Rev	247	1
6	Ap422	285	99%	77%	Ap422-ASPV77%-For Ap422-ASPV77%-Rev	184	9, 14, 15, 16
7	Ap549	269	76%	76%	Ap549-ASPV76%-For Ap549-ASPV76%-Rev	172	1
8	Ap213	914	99%	79%	Ap213-ASPV79%-For Ap213-ASPV79%-Rev	548	1, 14
9	Ap246	993	99%	79%	Ap246-ASPV79%-For Ap246-ASPV79%-Rev	576	1, 16
10	Ap385	773	98%	77%	Ap385-ASPV77%-For Ap385-ASPV77%-Rev	773	15
11	Ap341	326	100%	77%	Ap326-ASPV77%-For Ap326-ASPV77%-Rev	172	1, 16

ASPV –like contig having identity ranging from 70% to 79%

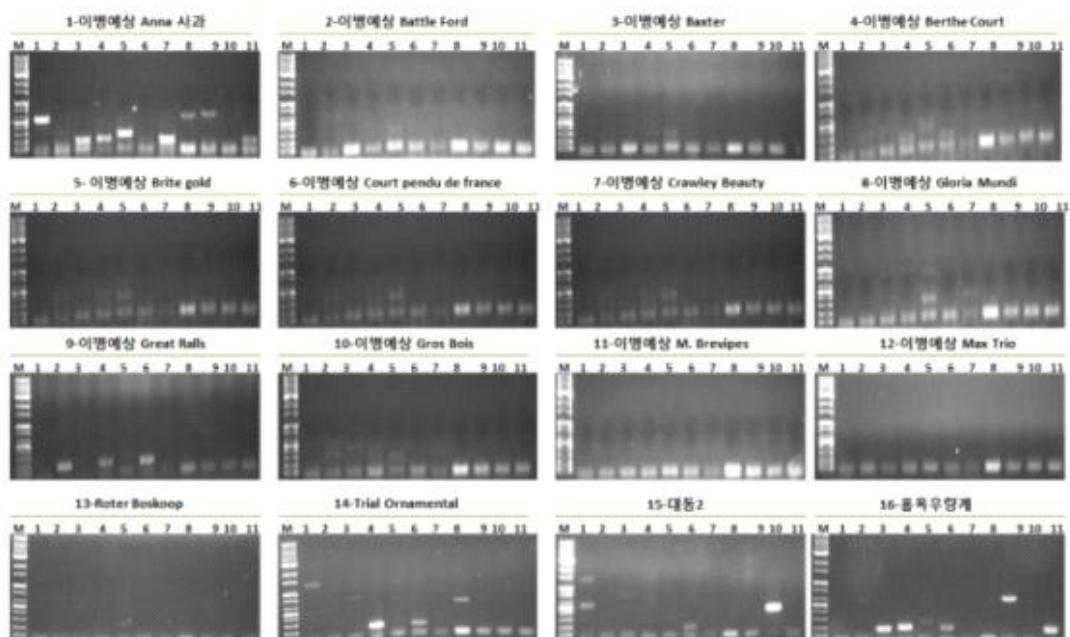


그림 5. 표 1에서 설계 및 제작된 primer에 의하여 실시된 RT-PCR 결과

수집된 사과 시료 가운데 예산 능금 조합에서 수집된 건전 예상 시료를 대상으로 paired-end RNA sequencing 결과 확보된 바이러스 유래 서열이 존재하는지 여부를 확인하였다. 확보된 contig 가운데 일부를 선발하여 건전주의 바이러스 감염 유무를 확인한 결과 이병주와 구분이 불가능한 높은 수준으로 다양한 바이러스에 감염되어 있는 것으로 확인되었다. 따라서 이들 바이러스가 잠복일 경우 무

병주 생산에 어떻게 반영되어야 되는지 주관 기관과 협의하여 차년도 과제를 수행할 예정이다.

표 2. ASPV 유래로 추정되는 contig로부터 설계 및 제작된 primer 리스트 및 각각의 contig에 감염된 건전주 시료

Line	Node Node ID	Query's contig	Identity (%)	Primer	Size	Diseased sample No.
1.	89192	99%	81%	89192_For 89192_Rev	700	6,7,8,9,13,15
2.	136415	100%	83%	136415_For 136415_Rev	530	11,15
3.	141873	99%	79%	141873_For 141873_Rev	580	
4.	204809	99%	83%	204809_For 204809_Rev	530	11,15
5.	271566	100%	79%	271566_For 271566_Rev	640	
6.	273023	99%	75%	273023_For 273023_Rev	490	7,8,9,10
7.	302849	99%	81%	302849_For 302849_Rev	634	7
8.	307196	96%	84%	307196_For 307196_Rev	644	6,7,8,9,10
9.	320605	96%	84%	320605_For 320605_Rev	420	6,7,8,9,10
10.	343250	100%	84%	343250_For 343250_Rev	456	6,7,8,9,10,13
11.	417032	92%	83%	417032_For 417032_Rev	493	6,7,8,10,13
12.	86056	96%	68%	86056_For 86056_Rev	580	-
13.	281854	99%	82%	281854_For 281854_Rev	372	8,9,10
14.	305081	99%	81%	305081_For 305081_Rev	353	6,7,8,9,10,13,15
15.	121616	99%	82%	121616_For 121616_Rev	680	

Primer list designed from ASPV -like contigs

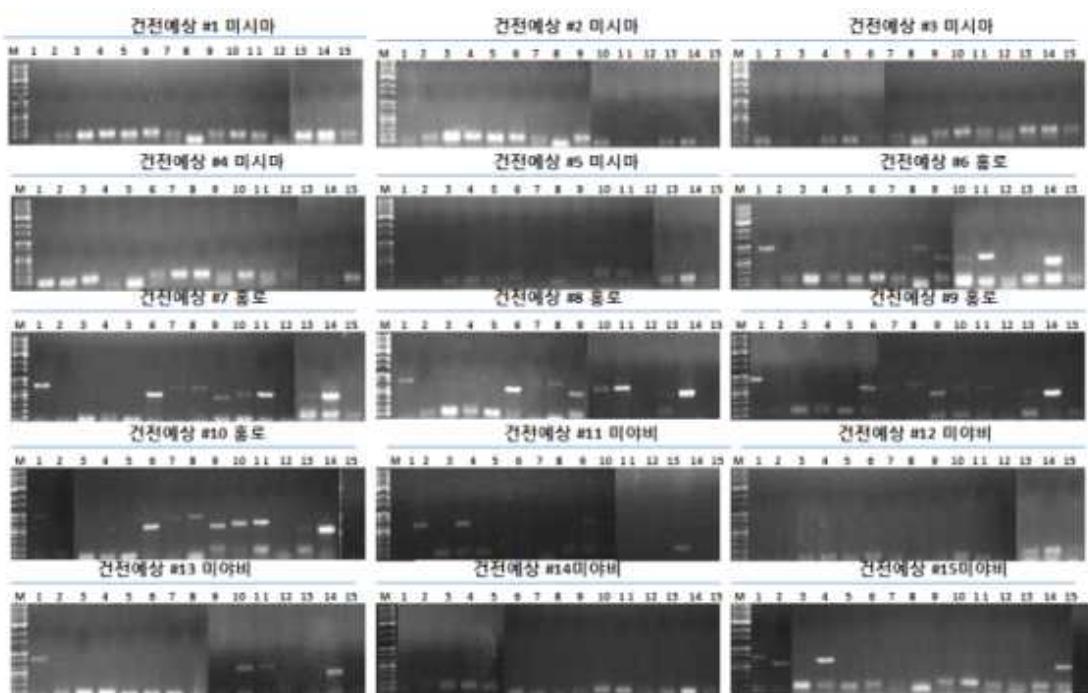


그림 6. 표 2에서 설계 및 제작된 primer에 의하여 실시된 RT-PCR 결과

표 3. ASGV 및 CTLV 유래로 추정되는 contig로부터 설계 및 제작된 primer 리스트 및 각각의 contig에 감염된 건전주 시료

Line	Node No. (or Contig no.) (in asm)	Query cover	Identity	Primer	(bp)	Diseased samples No.
1	540265	ASGV	100%	540265_For 540265_Rev	470	9,11,12,14,15
2	546750	ASGV	99%	546750_For 546750_Rev	760	1,6,7,8,9,11,13
3	127570	ASGV	100%	127570_For 127570_Rev	480	1,6,7,8,10,11,13,15
4	34776	ASGV	100%	34776_For 34776_Rev	400	11,15
5	360256	ASGV	100%	360256_For 360256_Rev	532	
6	281874	ASGV	99%	281874_For 281874_Rev	630	11,15
7	66522	CTLV	100%	66522_For 66522_Rev	400	1,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15
8	72445	CTLV	99%	72445_For 72445_Rev	430	1,6,8,9,10,11,12,13,14,15
9	147880	CTLV	99%	147880_For 147880_Rev	500	13
10	140253	CTLV	99%	140253_For 140253_Rev	570	1,7,9,11,13,15

Primer list designed from ASGV and CTLV -like contigs

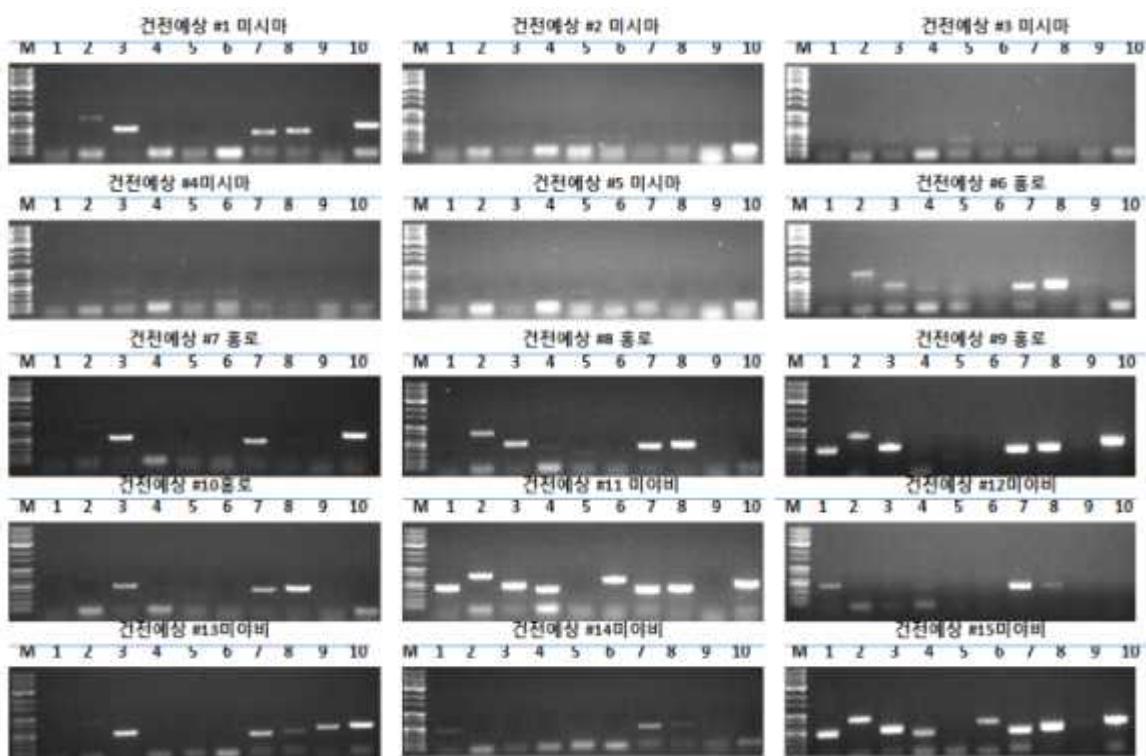


그림 7. 표 3에서 설계 및 제작된 primer에 의하여 실시된 RT-PCR 결과

표 4. ASPV, AGCaV, 및 ACSLV 유래로 추정되는 contig로부터 설계 및 제작된 primer 리스트 및 각각의 contig에 감염된 건전주 시료

Line	Note No.(Contig)	Description (strain)	Query cover	Identity	Primer	(bp)	Detected sample no.
1	93549	AGCaV	99%	78%	93549_For 93549_Rev	720	
2	1012480	AGCaV	99%	84%	1012480_For 1012480_Rev	510	2,3,4,6,7,8,9,10,11,15
3	65587	ASPV	92%	80%	65587_For 65587_Rev	650	13
4	188422	ASPV	99%	80%	188422_For 188422_Rev	710	7
5	726702	ACSLV	98%	87%	ACSLV-For ACSLV-Rev	410	7
6	116777	ASPV	100%	82%	116777_For 116777_Rev	490	

Primer list designed from ASPV, AGCaV, and ACSLV –like contigs

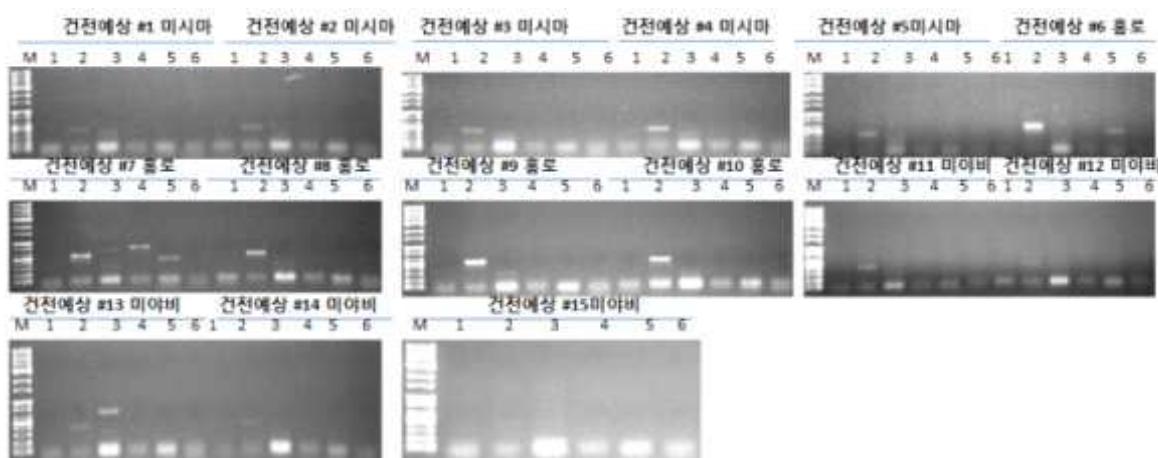


그림 8. 표 4에서 설계 및 제작된 primer에 의하여 실시된 RT-PCR 결과

표 5. ASPV, ASGV, AGCaV, CTLV, 및 ACSLV 유래로 추정되는 contig로부터 설계 및 제작된 primer 리스트 및 각각의 contig에 감염된 건전주 시료

Line	Node No	Virus	Query cover	Identity	Primer	(bp)	Detected sample No
1	936228	ASGV	100%	99%	ASGV-like-936228 For ASGV-like-936228 Rev	313	11,12,14
2	486206	ASPV	100%	94%	ASPV-like-486206 For ASPV-like-486206 Rev	466	15
3	Ap85	ACLSV	100%	93%	ACLSV-like-Ap85For ACLSV-like-Ap85Rev	181	
4	Ap61	AGCaV	100%	98%	AGCaV-like-Ap61 For AGCaV-like-Ap61 Rev	306	7,8,9,10,
5	Ap105	CTLV	100%	83%	CTLV-like-Ap105 For CTLV-like-Ap105 Rev	363	15

Primer list designed from ASPV, ASGV, AGCaV, ACLSV, and CTLV-like contigs

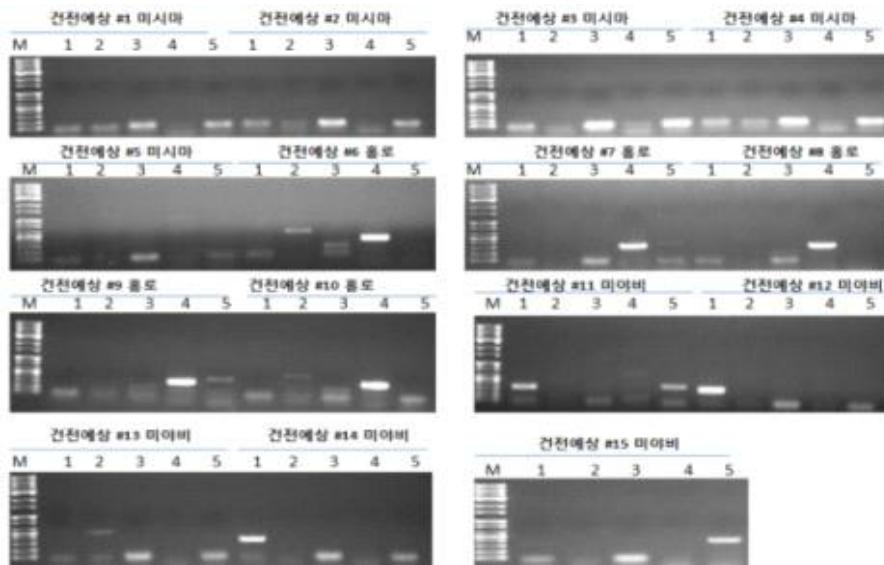
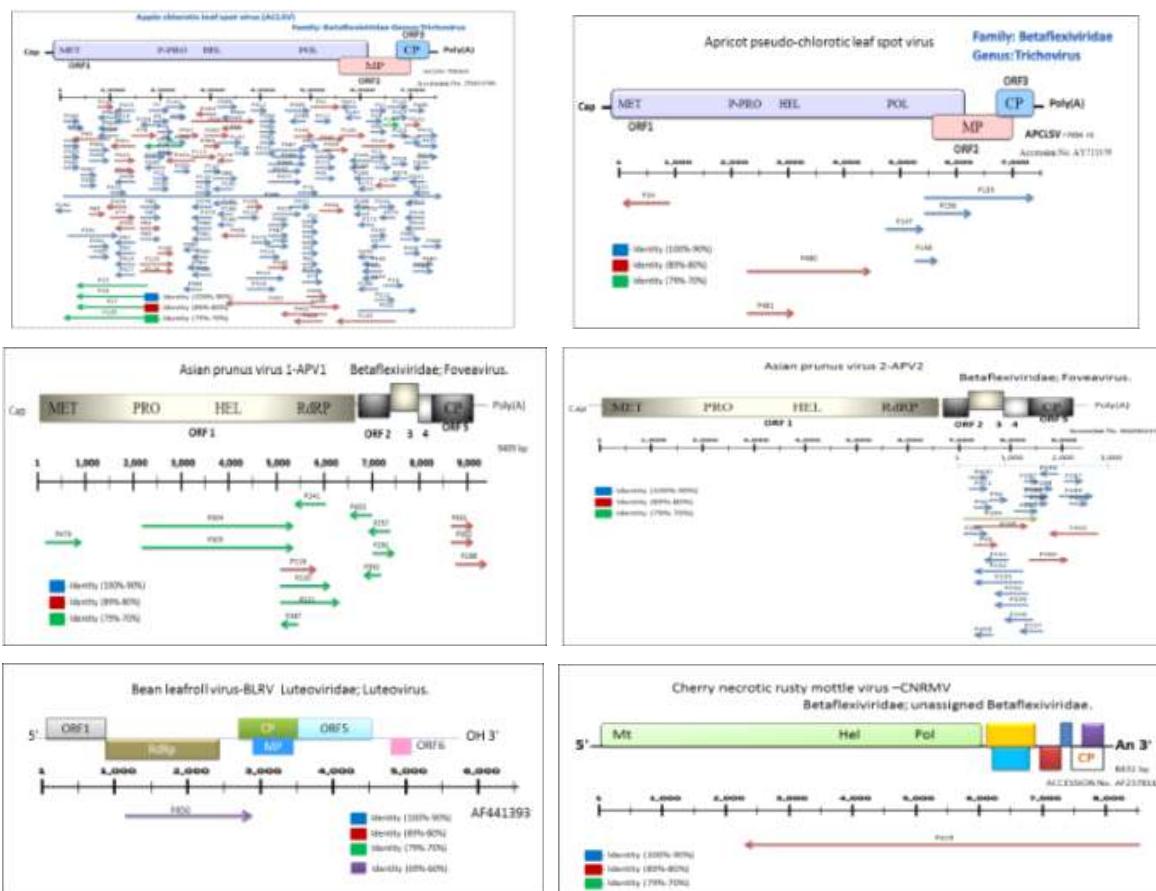


그림 9. 표 5에서 설계 및 제작된 primer에 의하여 실시된 RT-PCR 결과

수집된 복숭아 및 핵과류에서 확보된 contig를 전체적으로 분석해 보면 사과에 비하여 매우 다양한 바이러스가 확인되었으며 국내 미보고 종은 물론 전 세계적으로 보고되지 않은 신종 바이러스가 확인되었다. 또한 금지급 바이러스 및 관리급 바이러스와 바이로이드가 확인되어 법적 절차에 따라서 보고하였다.

표 6. Paired-end RNA sequencing 결과 확보된 contig들의 annotation 기준으로 복숭아 및 핵과류 시료에 감염된 것으로 추측되는 핵과류 감염 바이러스. 푸른색으로 표시된 바이러스 종은 국내 미보고 종, 붉은색으로 표시된 바이러스는 신종으로 추측되는 바이러스

Peach infecting viruses	Number of contigs	%
Apple chlorotic leaf spot tricovirus (ACLSV)	191	44.42
Plum bark necrosis and stem pitting associated ampelovirus (PBNSPaV)	84	19.53
Prunus necrotic ringspot Ilavirus (PNRSV)	48	11.16
Asian prunus foveavirus2 (APV2)	27	6.28
Nectarine stem pitting associated luteovirus (NSPaV)	24	5.58
Asian prunus foveavirus1 (APV1)	15	3.49
Peach latent mosaic viroid (PLMVd)	8	1.86
Little cherry ampelovirus2 (LChV2)	7	1.63
Apricot pseudo-chlorotic leaf spot tricovirus (ApCLSV)	7	1.63
Grapevine fleck maculavirus (GfkV)	3	0.70
Grapevine asteroid mosaic associated marafivirus (GAMaV)	2	0.47
Hop stunt viroid (HSVd)	2	0.47
Maize rayado fino marafivirus (MRFV)	2	0.47
Oat blue dwarf marafivirus (OBDV)	2	0.47
Peanut stunt cucumovirus (PSV)	2	0.47
Grapevine syrah marafivirus1 (GSyV1)	1	0.23
Bean leafroll luteovirus (BLRV)	1	0.23
Plum pox potyvirus (PPV)	1	0.23
Cherry necrotic rusty mottle betaflexivirus (CNRMV)	1	0.23
Citrus sudden death associated marafivirus (CSDaV)	1	0.23
Dapple plum and peach fruit disease viroid (DPPFDd)	1	0.23
9 genus 18 species 3 viroid	430	100



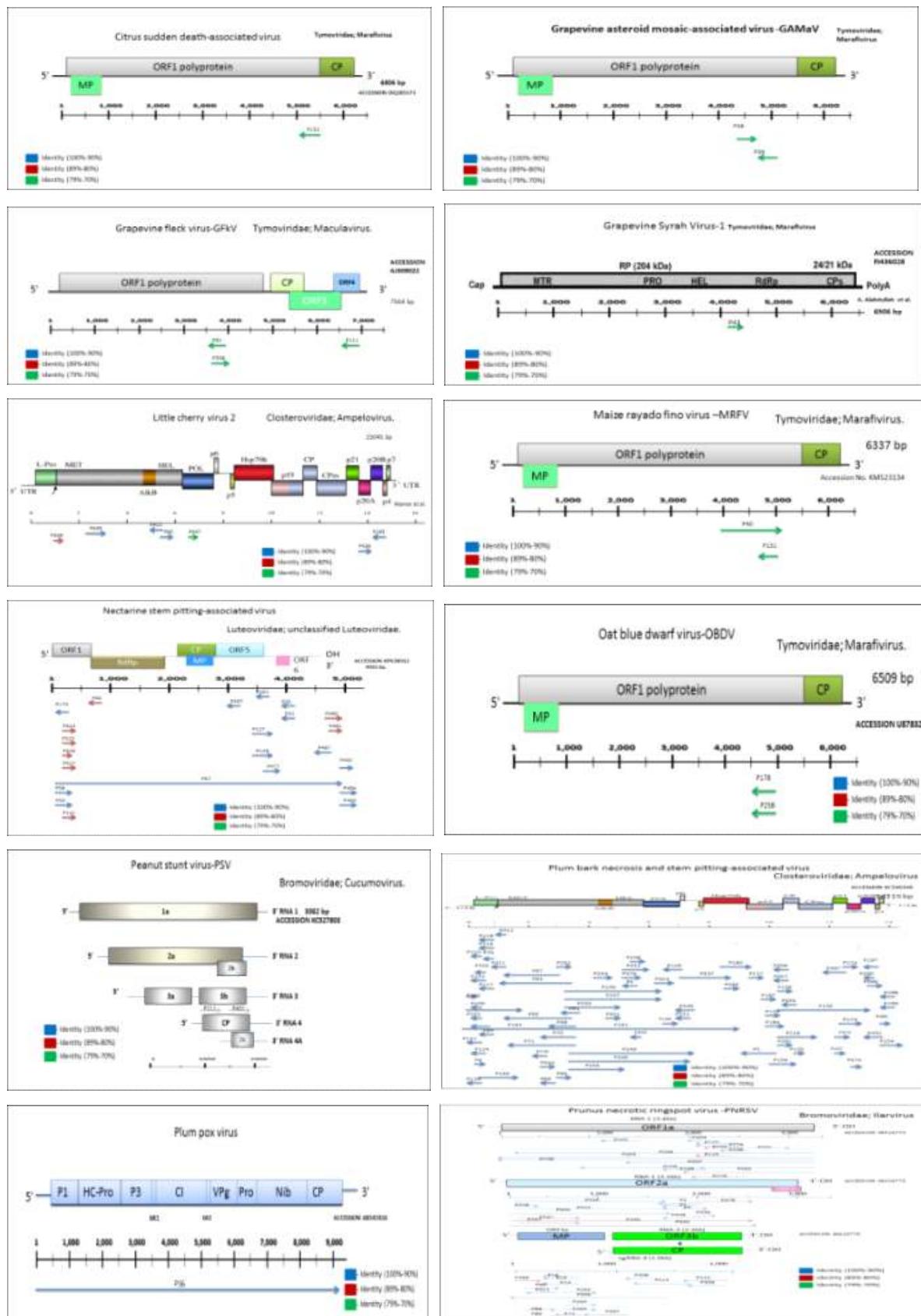


그림 10. Paired-end RNA sequencing 결과 확보된 430개 contig들의 annotation 기준으로 핵 과류 감염 바이러스들의 reference 서열에 대한 상대적 위치. 430 contig들의 분포를 보면 국내 보고 종의 서열과 매우 높은 상동성을 보이고 있으나 상대적으로 70% 수준

의 낮은 상동성을 보이는 contig들의 경우 신종 바이러스 유래일 가능성이 매우 높다.

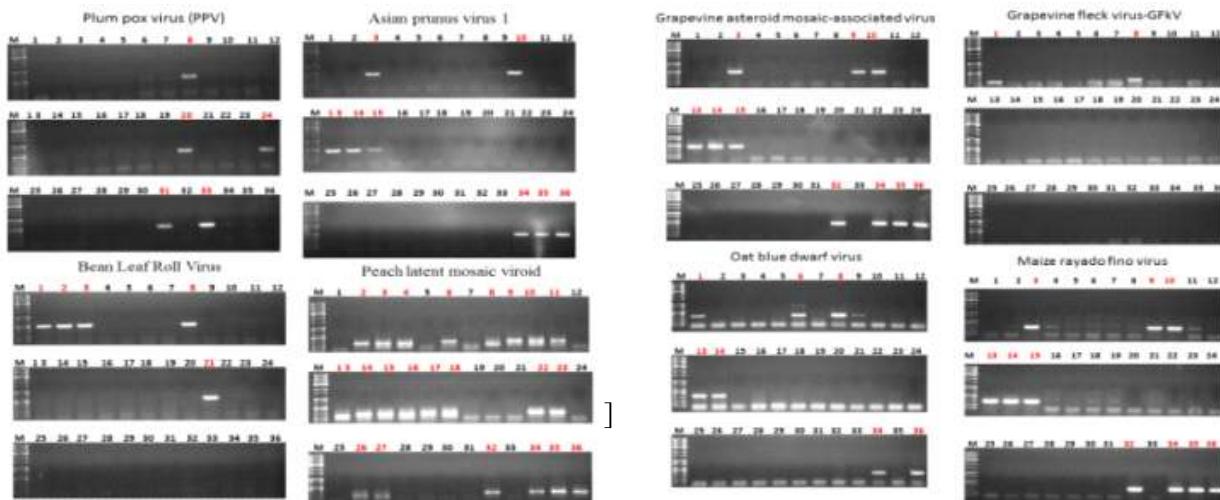
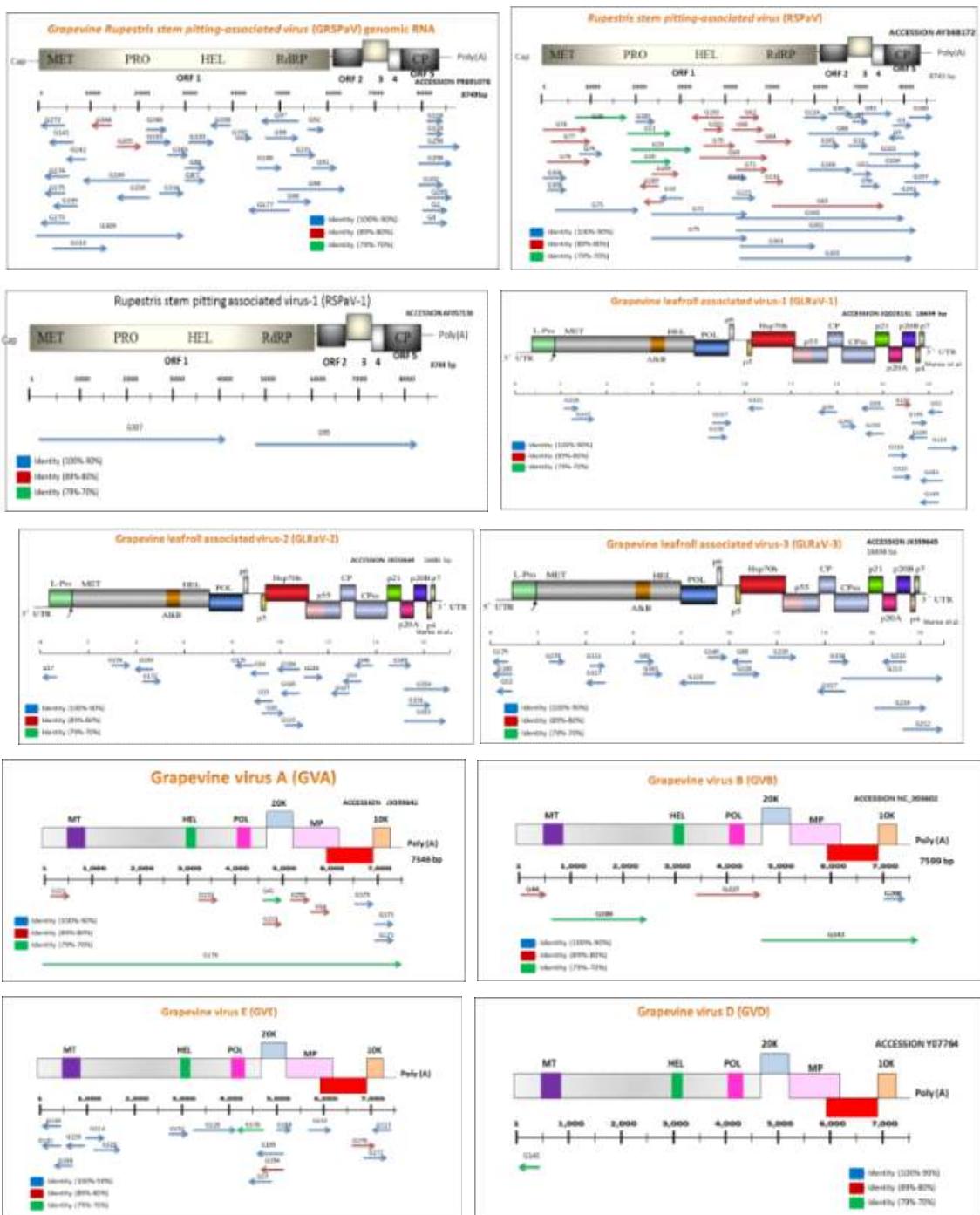


그림 11. Paired-end RNA sequencing 결과 확보된 18종 바이러스와 3종 바이로이드 가운데 7종 바이러스와 1종의 바이로이드를 확인한 결과 복승아를 포함 핵과류 시료에서 모두 검출되었다.

표 7. Paired-end RNA sequencing 결과 확보된 contig들의 annotation 기준으로 포도 시료에 감염된 것으로 추측되는 포도 감염 바이러스들. 푸른색으로 표시된 바이러스 종은 국내 미보고 종, 붉은색으로 표시된 바이러스 종은 신종으로 추측되는 바이러스

Grapevine infecting viruses	Number of contigs	%
Grapevine rupestris stem pitting associated foveavirus (GRSPaV)	39	17.81
Grapevine leafroll associated ampelovirus1 (GRLaV1)	18	8.22
Grapevine leafroll associated ampelovirus2 (GRLaV2)	19	8.68
Grapevine leafroll associated ampelovirus3 (GRLaV3)	19	8.68
Grapevine vitivirus A (GVA)	10	4.57
Grapevine vitivirus B (GVB)	5	2.28
Grapevine vitivirus E (GVE)	17	7.76
Grapevine vitivirus D (GVD)	1	0.46
Grapevine vitivirus F (GVF)	1	0.46
Grapevine vitivirus Q (GVQ)	2	0.91
Grapevine syrah marafivirus1 (GSyV1)	7	3.2
Grapevine fleck marafivirus (GFkV)	4	1.83
Grapevine yellow speckle viroid1 (GYSVd1)	5	2.28
Rupestris stem pitting associated foveavirus (RSPaV)	50	22.83
Clerodendron yellow mosaic geminivirus (CIYMV)	3	1.37
Grapevine red blotch associated geminivirus (GRBaV)	2	0.91
Grapevine rupestris vein feathering marafivirus (GRVFV)	1	0.46
Grapevine satellite virus (GSaV)	1	0.46
Pepper cryptic deltapartitivirus1 (PCV1)	1	0.46
Rupestris stem pitting associated foveavirus1 (RSPaV1)	2	0.91
Tobacco bushy top umbravirus (TBTV)	1	0.46
Tomato leaf curl ghana begomovirus (ToLCCGV)	4	1.83

Tobacco mosaic tobamovirus (TMV)	3	1.37
Australian grapevine viroid (AGVd)	2	0.91
Citrus viroid VI (CVd-VI)	1	0.46
Hop stunt viroid (HSVd)	1	0.46
10 genus 22 species 4 viroid	219	100



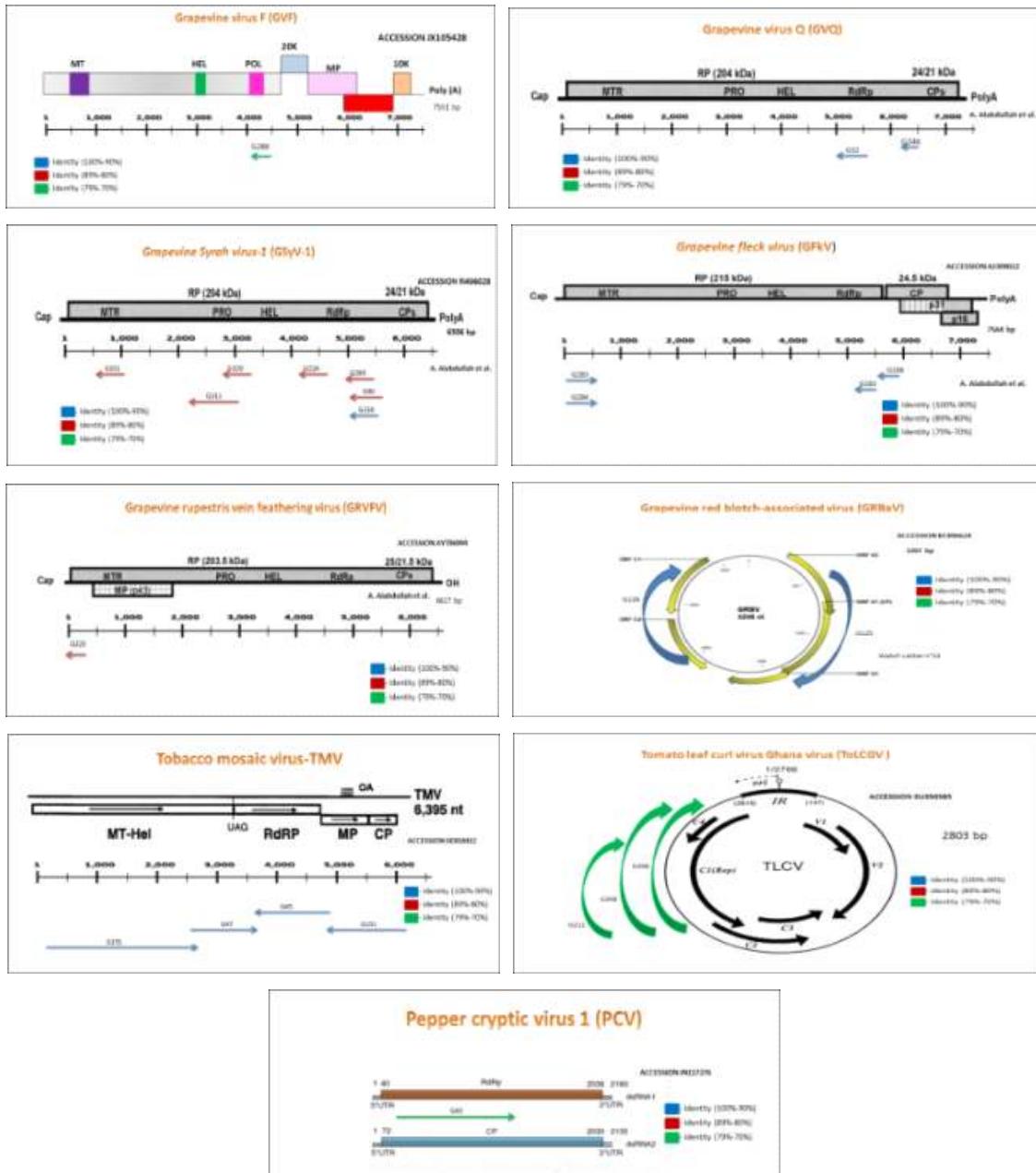


그림 12. Paired-end RNA sequencing 결과 확보된 219개 contig들의 annotation 기준으로 포도 감염 바이러스들의 reference 서열에 대한 상대적 위치. 219 contig들의 분포를 보면 핵과류의 국내 보고 종과 유사하게 국내 보고 종의 서열과 매우 높은 상동성을 보이고 있다. 포도에서 특이한 사항은 전 세계적으로 보고되지 않은 신종이 많이 검출되었으며 신종 DNA 바이러스의 분포가 높게 나타났다.

3. Pilot DNA chip 제작, probe의 설계, 및 pilot chip의 검증

수집된 사과, 복숭아를 중심으로 핵과류, 및 포도 시료를 활용하여 paired-end RNA sequencing을 실시하여 약 1,000개의 contig를 확보하였다. 이들은 과수 감염 바이러스 23속 48종 및 7종의 바이로이드를 포함하고 있다. 이러한 결과는 지난 수십년간 과수 바이러스 조사 사업 전체와 비교해도 손색이 없다. 이들 contig 서열로부터 약 25,000개의 프로브를 설계 제작

하였다. 이들 과수 바이러스 특이 프로브 이외에 식물유래 프로브를 추가하여 chip의 positive control로 활용하였다. 프로브의 크기는 60-mer로 설계되었다. 과수 바이러스 진단용 DNA chip은 agilent의 custom microarray 60K 형태로 제작하여 시험에 사용하였다. Chip 결과 분석 결과를 바탕으로 동일 시료에 실제 바이러스 감염 여부 실험이 완료되지 않은 상태이기 때문에 전체적으로 chip의 quality를 판단하기 어려다. 당해 연도 말까지 완료할 계획이다.

과수 잎 조직으로부터 추출되는 totalRNA는 RT-PCR 수준의 실험에 충분하게 활용 가능하지만 매우 민감한 반응의 일종인 chip에 처리하기에는 한계가 있을 것으로 판단된다. 따라서 주관 기관인 국립원예특작과학원의 주관과제 책임자인 최국선 박사의 협조를 얻어 해당 기관이 보유한 Nuclisens easyMAG system을 활용하였다.

과수시료는 사과 4점, 복숭아 및 포도 각각 2점 총 8점을 활용하여 pilot chip의 작동 여부와 probe의 건전성을 시험하였음. 8점으로부터 Nuclisens easyMAG system에 의하여 추출된 RNA 시료의 QC 결과가 매우 좋은 것으로 나타났으며 상기 system에 의하여 추출된 RNA 시료는 chip 처리용으로 적합한 것으로 나타났다. 현재까지 분석 결과 chip 자체의 결과는 매우 양호하여 chip data를 바탕으로 실제 실험이 진행되고 있다.

Microarray 실험 방법을 간단하게 요약하면 :

(1) 증폭 및 표지

: Total RNA 500ng을 이용하여 Cyanine 3가 표지된 cRNA를 키트(Agilent's Low RNA Input Linear Amplification kit)를 사용하여 합성. 표지 및 합성된 cRNA는 스펙트로포토메터를 이용하여 정량.

(2) 칩 혼성화 반응

: 표지된 cRNA를 혼성화 키트(Agilent's Gene Expression Hybridization Kit)를 활용하여 칩(Agilent technologies, 8x60K)에 처리

(3) 미반응 표지 cRNA 제거

: 혼성화 반응이 완료된 칩에 존재하는 프로브와 반응하지 않은 표지 cRNA를 버퍼(Agilent's Gene Expression Wash Buffer)를 이용하여 제거

(4) 칩 판독 및 이미지 분석

: 미반응 표지 cRNA가 제거된 칩은 판독기에서 판독하고 판독기에 탑재된 프로그램에 의해 생성되는 각각 프로브의 시그널을 확인

(5) 데이터 분석

: 프로그램(GeneSpring GX12 software)에 의하여 정규화된 프로브의 값을 확인

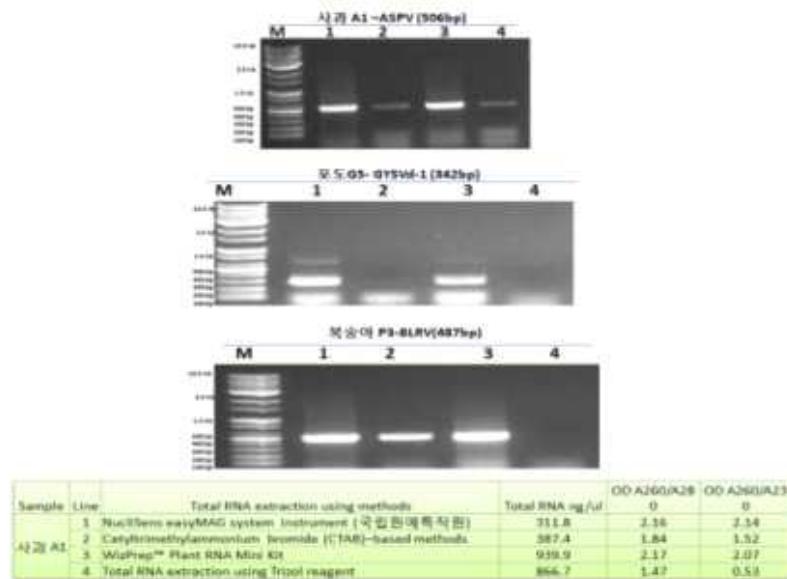


그림 13. 4종류의 서로 다른 리보핵산 추출 방법 실험 결과. 국립원예특작과학원이 보유한 Nuclisens easyMAG system, CTAB에 의한 추출법, 상업적으로 구입 가능한 RNA 추출 키트, 및 Trizol에 의한 추출법을 비교하였다. 사과, 복숭아, 및 포도 시료에서 추출된 RNA를 주형으로 one-step RT-PCR을 실시한 결과 Nuclisens easyMAG system에 의하여 추출한 RNA가 가장 효율적인 것으로 나타났다.



그림 14. 8종류의 과수 시료로부터 추출된 RNA의 QC 결과. 사과 (A-5, 14, 23, 26), 복숭아 (P-16, 29), 및 포도 (G-9, 26)시료 모두 QC를 통과하였음. 통과 기준은 (1) rRNA ratio (28S/18S)>1.8, (2) % of total area (18S+28S)>50%, (3) RIN>5, (4) No degradation pattern

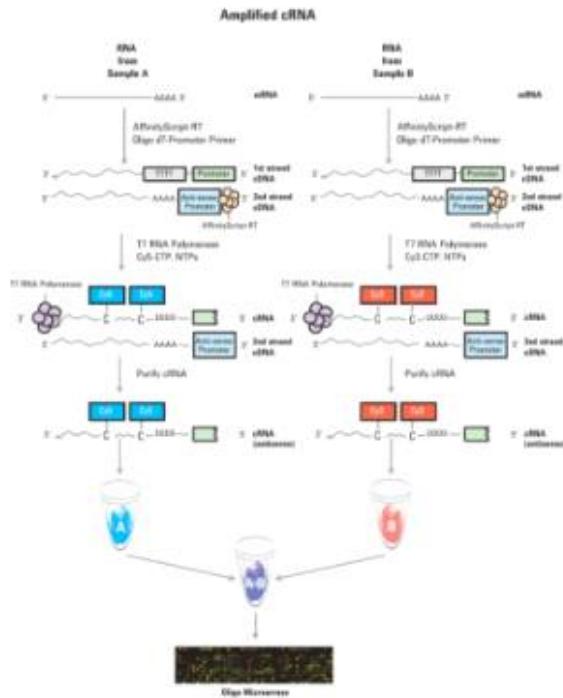


그림 15. Agilent microarray 실험 전체 과정 모식도

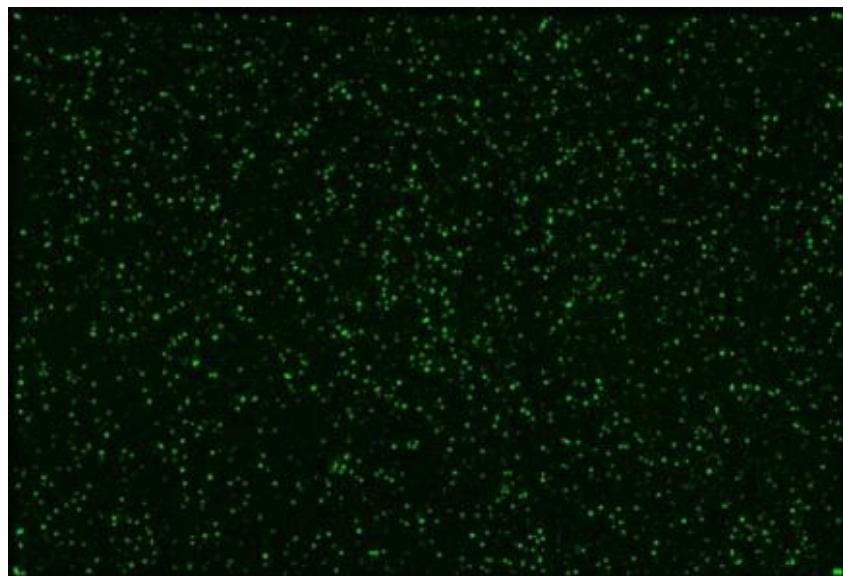


그림 16. 60,000개의 probe가 탑재된 Agilent microarray의 반응 실험 이후 실제 이미지 사진

G96(포도) 생물의 DNA chip 진단 결과		G96(포도) 생물의 DNA chip 진단 결과		P16(복숭아) 생물의 DNA chip 진단 결과		P29(복숭아) 생물의 DNA chip 진단 결과	
Primer Name	PR	Primer Name	PR	Primer Name	PR	Primer Name	PR
G96-32	4.7-40	G96-31	2.0-40	P16-14	1.0-100	P29-14	0.4-100
G96-30	3.0-40	G96-30	2.0-40	P16-15	1.0-100	P29-15	0.4-100
G96-29	3.0-40	G96-29	2.0-40	P16-16	1.0-100	P29-16	0.4-100
G96-28	2.1-30	G96-28	2.0-40	P16-17	1.0-100	P29-17	0.4-100
G96-27	0.5-10	G96-27	0.5-10	P16-18	1.0-100	P29-18	0.4-100
G96-26	0.5-10	G96-26	0.5-10	P16-19	1.0-100	P29-19	0.4-100
G96-25	0.5-10	G96-25	0.5-10	P16-20	1.0-100	P29-20	0.4-100
G96-24	0.5-10	G96-24	0.5-10	P16-21	1.0-100	P29-21	0.4-100
G96-23	0.5-10	G96-23	0.5-10	P16-22	1.0-100	P29-22	0.4-100
G96-22	0.5-10	G96-22	0.5-10	P16-23	1.0-100	P29-23	0.4-100
G96-21	0.5-10	G96-21	0.5-10	P16-24	1.0-100	P29-24	0.4-100
G96-20	0.5-10	G96-20	0.5-10	P16-25	1.0-100	P29-25	0.4-100
G96-19	0.5-10	G96-19	0.5-10	P16-26	1.0-100	P29-26	0.4-100
G96-18	0.5-10	G96-18	0.5-10	P16-27	1.0-100	P29-27	0.4-100
G96-17	0.5-10	G96-17	0.5-10	P16-28	1.0-100	P29-28	0.4-100
G96-16	0.5-10	G96-16	0.5-10	P16-29	1.0-100	P29-29	0.4-100
G96-15	0.5-10	G96-15	0.5-10	P16-30	1.0-100	P29-30	0.4-100
G96-14	0.5-10	G96-14	0.5-10	P16-31	1.0-100	P29-31	0.4-100
G96-13	0.5-10	G96-13	0.5-10	P16-32	1.0-100	P29-32	0.4-100
G96-12	0.5-10	G96-12	0.5-10	P16-33	1.0-100	P29-33	0.4-100
G96-11	0.5-10	G96-11	0.5-10	P16-34	1.0-100	P29-34	0.4-100
G96-10	0.5-10	G96-10	0.5-10	P16-35	1.0-100	P29-35	0.4-100
G96-9	0.5-10	G96-9	0.5-10	P16-36	1.0-100	P29-36	0.4-100
G96-8	0.5-10	G96-8	0.5-10	P16-37	1.0-100	P29-37	0.4-100
G96-7	0.5-10	G96-7	0.5-10	P16-38	1.0-100	P29-38	0.4-100
G96-6	0.5-10	G96-6	0.5-10	P16-39	1.0-100	P29-39	0.4-100
G96-5	0.5-10	G96-5	0.5-10	P16-40	1.0-100	P29-40	0.4-100
G96-4	0.5-10	G96-4	0.5-10	P16-41	1.0-100	P29-41	0.4-100
G96-3	0.5-10	G96-3	0.5-10	P16-42	1.0-100	P29-42	0.4-100
G96-2	0.5-10	G96-2	0.5-10	P16-43	1.0-100	P29-43	0.4-100
G96-1	0.5-10	G96-1	0.5-10	P16-44	1.0-100	P29-44	0.4-100
G96-0	0.5-10	G96-0	0.5-10	P16-45	1.0-100	P29-45	0.4-100
G96-31	0.5-10	G96-31	0.5-10	P16-46	1.0-100	P29-46	0.4-100
G96-30	0.5-10	G96-30	0.5-10	P16-47	1.0-100	P29-47	0.4-100
G96-29	0.5-10	G96-29	0.5-10	P16-48	1.0-100	P29-48	0.4-100
G96-28	0.5-10	G96-28	0.5-10	P16-49	1.0-100	P29-49	0.4-100
G96-27	0.5-10	G96-27	0.5-10	P16-50	1.0-100	P29-50	0.4-100
G96-26	0.5-10	G96-26	0.5-10	P16-51	1.0-100	P29-51	0.4-100
G96-25	0.5-10	G96-25	0.5-10	P16-52	1.0-100	P29-52	0.4-100
G96-24	0.5-10	G96-24	0.5-10	P16-53	1.0-100	P29-53	0.4-100
G96-23	0.5-10	G96-23	0.5-10	P16-54	1.0-100	P29-54	0.4-100
G96-22	0.5-10	G96-22	0.5-10	P16-55	1.0-100	P29-55	0.4-100
G96-21	0.5-10	G96-21	0.5-10	P16-56	1.0-100	P29-56	0.4-100
G96-20	0.5-10	G96-20	0.5-10	P16-57	1.0-100	P29-57	0.4-100
G96-19	0.5-10	G96-19	0.5-10	P16-58	1.0-100	P29-58	0.4-100
G96-18	0.5-10	G96-18	0.5-10	P16-59	1.0-100	P29-59	0.4-100
G96-17	0.5-10	G96-17	0.5-10	P16-60	1.0-100	P29-60	0.4-100
G96-16	0.5-10	G96-16	0.5-10	P16-61	1.0-100	P29-61	0.4-100
G96-15	0.5-10	G96-15	0.5-10	P16-62	1.0-100	P29-62	0.4-100
G96-14	0.5-10	G96-14	0.5-10	P16-63	1.0-100	P29-63	0.4-100
G96-13	0.5-10	G96-13	0.5-10	P16-64	1.0-100	P29-64	0.4-100
G96-12	0.5-10	G96-12	0.5-10	P16-65	1.0-100	P29-65	0.4-100
G96-11	0.5-10	G96-11	0.5-10	P16-66	1.0-100	P29-66	0.4-100
G96-10	0.5-10	G96-10	0.5-10	P16-67	1.0-100	P29-67	0.4-100
G96-9	0.5-10	G96-9	0.5-10	P16-68	1.0-100	P29-68	0.4-100
G96-8	0.5-10	G96-8	0.5-10	P16-69	1.0-100	P29-69	0.4-100
G96-7	0.5-10	G96-7	0.5-10	P16-70	1.0-100	P29-70	0.4-100
G96-6	0.5-10	G96-6	0.5-10	P16-71	1.0-100	P29-71	0.4-100
G96-5	0.5-10	G96-5	0.5-10	P16-72	1.0-100	P29-72	0.4-100
G96-4	0.5-10	G96-4	0.5-10	P16-73	1.0-100	P29-73	0.4-100
G96-3	0.5-10	G96-3	0.5-10	P16-74	1.0-100	P29-74	0.4-100
G96-2	0.5-10	G96-2	0.5-10	P16-75	1.0-100	P29-75	0.4-100
G96-1	0.5-10	G96-1	0.5-10	P16-76	1.0-100	P29-76	0.4-100
G96-0	0.5-10	G96-0	0.5-10	P16-77	1.0-100	P29-77	0.4-100
G96-31	0.5-10	G96-31	0.5-10	P16-78	1.0-100	P29-78	0.4-100
G96-30	0.5-10	G96-30	0.5-10	P16-79	1.0-100	P29-79	0.4-100
G96-29	0.5-10	G96-29	0.5-10	P16-80	1.0-100	P29-80	0.4-100
G96-28	0.5-10	G96-28	0.5-10	P16-81	1.0-100	P29-81	0.4-100
G96-27	0.5-10	G96-27	0.5-10	P16-82	1.0-100	P29-82	0.4-100
G96-26	0.5-10	G96-26	0.5-10	P16-83	1.0-100	P29-83	0.4-100
G96-25	0.5-10	G96-25	0.5-10	P16-84	1.0-100	P29-84	0.4-100
G96-24	0.5-10	G96-24	0.5-10	P16-85	1.0-100	P29-85	0.4-100
G96-23	0.5-10	G96-23	0.5-10	P16-86	1.0-100	P29-86	0.4-100
G96-22	0.5-10	G96-22	0.5-10	P16-87	1.0-100	P29-87	0.4-100
G96-21	0.5-10	G96-21	0.5-10	P16-88	1.0-100	P29-88	0.4-100
G96-20	0.5-10	G96-20	0.5-10	P16-89	1.0-100	P29-89	0.4-100
G96-19	0.5-10	G96-19	0.5-10	P16-90	1.0-100	P29-90	0.4-100
G96-18	0.5-10	G96-18	0.5-10	P16-91	1.0-100	P29-91	0.4-100
G96-17	0.5-10	G96-17	0.5-10	P16-92	1.0-100	P29-92	0.4-100
G96-16	0.5-10	G96-16	0.5-10	P16-93	1.0-100	P29-93	0.4-100
G96-15	0.5-10	G96-15	0.5-10	P16-94	1.0-100	P29-94	0.4-100
G96-14	0.5-10	G96-14	0.5-10	P16-95	1.0-100	P29-95	0.4-100
G96-13	0.5-10	G96-13	0.5-10	P16-96	1.0-100	P29-96	0.4-100
G96-12	0.5-10	G96-12	0.5-10	P16-97	1.0-100	P29-97	0.4-100
G96-11	0.5-10	G96-11	0.5-10	P16-98	1.0-100	P29-98	0.4-100
G96-10	0.5-10	G96-10	0.5-10	P16-99	1.0-100	P29-99	0.4-100
G96-9	0.5-10	G96-9	0.5-10	P16-100	1.0-100	P29-100	0.4-100

그림 17. 8개 시료 처리에 의하여 나타난 chip 실험 결과. Chip positive control 값을 기준으로 최상위 40개 probe 정보를 나타내었다. 사과 시료인 A5는 314개, A14는 2,520개, A23은 1,274개 probe, A26은 801개, 복숭아 시료인 P16은 1,906개, P29는 846개, 포도 시료인 G9은 2,060개, G26은 319개 probe가 분석 대상으로 나타났다. 현재 이에 대한 분석이 진행되고 있다.

【3년차】 1. 수집된 포장 시료의 정밀 진단

전년도에 분석 완료된 사과 시료에 대한 paired-end RNA sequencing 결과 (2차년도 보고서 참조)에 대한 실험을 수행하였다. 확보된 사과 감염 바이러스 가운데 가장 높은 수준의 변종이 나타난 apple stem pitting virus (ASPV)를 대상으로 실제 시료에 존재하는지 여부를 확인하였다. 약 200여 종의 ASPV 변종으로 추정되는 contig 가운데 서열 상동성이 80%대 수준을 나타내는 contig들이 전체의 70%에 달했으며 이들 가운데 7개 contig를 선별하여 프라이머를 제작한 다음 RT-PCR을 수행하였다(실험 방법 생략). 실험에 활용된 16개 시료는 육안으로 바이러스 이병 가능성이 매우 높은 것들로 시료의 50%가 이들 변종에 감염된 것으로 나타났다.

기준에 알려진 ASPV 서열 정보를 바탕으로 ASPV 검출이 곤란할 것으로 추정되는 선발된 7개 contig의 분포는 일부 사과 시료에 국한된 것이 아니라 바이러스 감염 증상을 나타내는 사과에 일반적으로 존재하는 것으로 추정된다. 따라서 기준에 사과 바이러스 ASPV의 검출 방법에 대한 새로운 접근이 필요할 것으로 판단된다.

ASPV-like contigs (89%-80%)

No	Primer name	Primer sequence	PCR product (b)		Detected sample NO
			p)	n)	
1	AP18-1F	TCAATGAAGGGTCTGAATOC		698	14, 15, 16
	AP64-1R	GCAATTATGATGTTACAGCT			
2	AP64-2F	AGAGGTTGGCCTGATTCT		1104	1, 9, 14, 15, 16
	AP251-2R	TOCCA/CAGAATGCCAGAAC			
3	AP251-3F	CAGAAAAAACTTCATGGTTGC			
	AP243-3R	ACCCAAAAGTTCCAAAGGATC		828	1, 4, 6, 15, 16
4	AP243-4F	TAAAGAGGCGCAGAAAAGACC		1260	10
	AP188-4R	TGCTCATCAAGTGAATTGCTC			
5	AP188-5F	CAGTGAGAGCACAAATGGGTT			
	AP140-5R	GCACACATATCATACCCAGC		948	1, 4, 14, 15, 16
6	AP140-6F	AAGGTTGCAAATTGCTGAG			
	AP22-6R	TGTATTCAACCCATATGCCAC		860	
7	AP22-7F	AGTACTCTACCTCAAGTTGG			
	AP122-7R	TCGCCAAAATTCAACAGCTTG		1600	

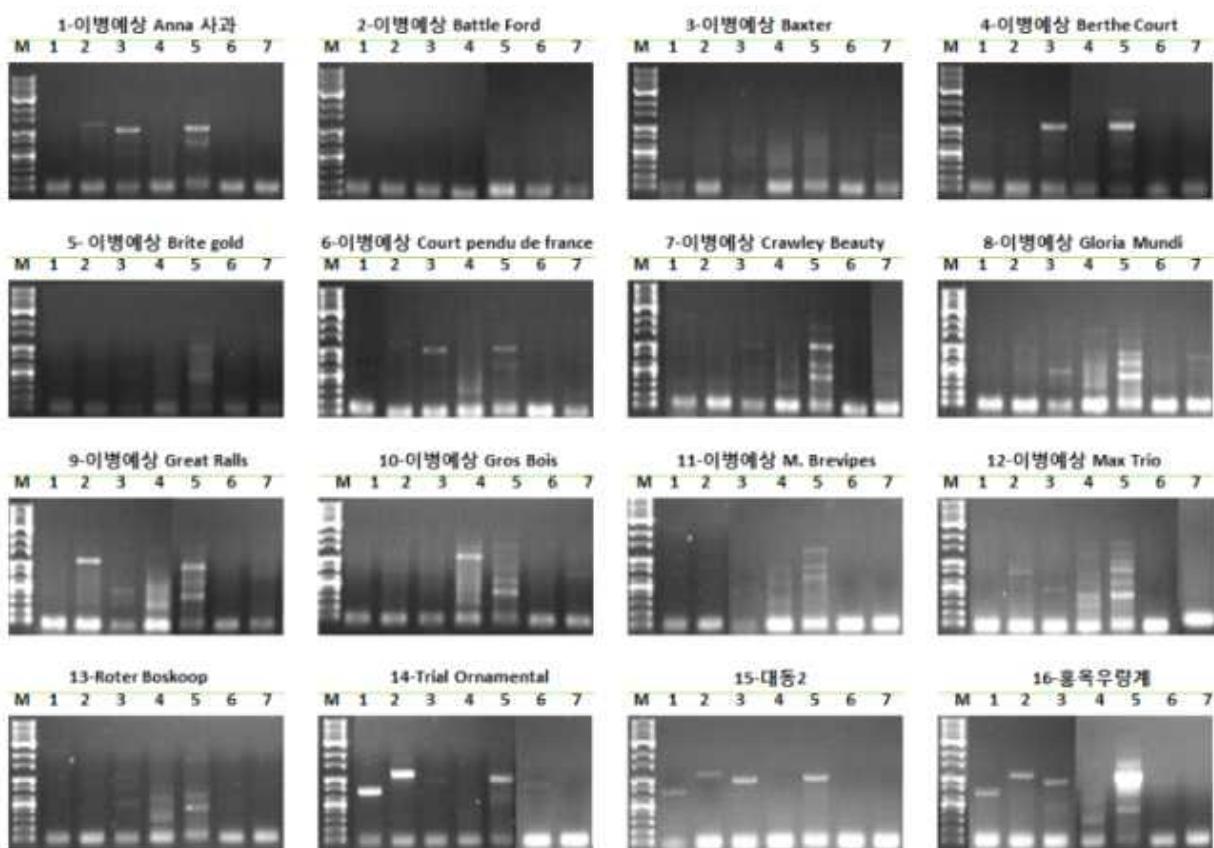


그림 1. 16개 바이러스 이병 의심 증상을 나타내는 사과 시료를 대상으로 ASPV의 변종 발생 수준을 확인한 프라이머 정보 및 RT-PCR 결과.

전년도 보고서에 나타난 결과는 ASPV, ASGV, AGCaV, CTLV, 및 ACSLV 유래의 70~100% 수준의 다양한 상동성을 가진 contig가 매우 고르게 바이러스 이 감염 의심 시료 및 건전 시료

로 판단되어지는 수집된 시료에 존재하는 것이다. 따라서 기존에 알려진 ASPV 서열 정보를 바탕으로 ASPV 검출이 곤란할 것으로 추정되는 선발된 contig들이 이병 의심 시료 대비 상대적으로 건전 시료에 분포하는지 동일한 프라이머 조합들을 활용하여 RT-PCR을 수행하였다.

15개 3품종 (미시마, 홍로, 미야비) 건전 예상 사과 시료를 분석한 결과 매우 특징적인 결과를 얻었다. 건전으로 추정되는 홍로 및 미야비의 경우 이병 의심 시료에서 나타나는 수준과 거의 동일하게 ASPV의 변종에 감염되어 있는 것으로 나타났다. 그러나 미시마의 경우 이들 변종들이 검출되지 않았다. 따라서 전년도 연구 결과와 당해 연도 연구결과를 종합해 보면 사과의 경우 외관상 드러나는 바이러스 의심 증상을 나타내는 개체와 건전한 것으로 추정되는 개체가 가지는 바이러스 감염 수준은 유사한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 기존에 잘 알려진 초본류 감염 바이러스들과 달리 사과와 같은 과수에 발생하는 바이러스의 대부분이 감염에 의한 피해가 거의 나타나지 않는 잠복 바이러스로 추정된다. 따라서 각각의 변종 바이러스들의 전체 게놈 서열을 확보하고 바이러스 이병 증상을 유발하거나 기주에 직접적인 영향을 미치는 변종 바이러스를 확인하는 심층 연구가 매우 시급하다.

ASPV-like contigs (89%-80%)

No	Primer name	Primer sequence	PCR product (bp)	Detected sample No
1	AP18-1F	TCAATGAAGGGTCTGAATCC	698	6,7,8,9,10,11,12,14
	AP64-1R	GCAATTATGATGTTCACAGCT		
2	AP64-2F	AGAGGTTGGCCTGATTTCT	1104	6,7,8,9,10,13
	AP251-2R	TOCCACAGAATGCCAGAAC		
3	AP251-3F	CAGAAAAAACTTCATGGTTGC	828	6,7,8,9
	AP243-3R	ACCCAAAAAGTTCCAAGGATC		
4	AP243-4F	TAAAGAGGCGCAGAAAGACC	1260	
	AP188-4R	TGCTCATCAGTGAATTGCTC		
5	AP188-5F	CAGTGAGAGCACAATGGGTT	948	6,7,8,9,10,11,13
	AP140-5R	GCACACATATCATCACCGC		
6	AP140-6F	AAGGTTGCAAATTGCTCGAG	860	7,11,15
	AP22-6R	TGTATTCAACCTATGCCAC		
7	AP22-7F	AGTACTCTACCTCAAGTTGG	1600	
	AP122-7R	TCGCCAAAATTCACAGCTTG		

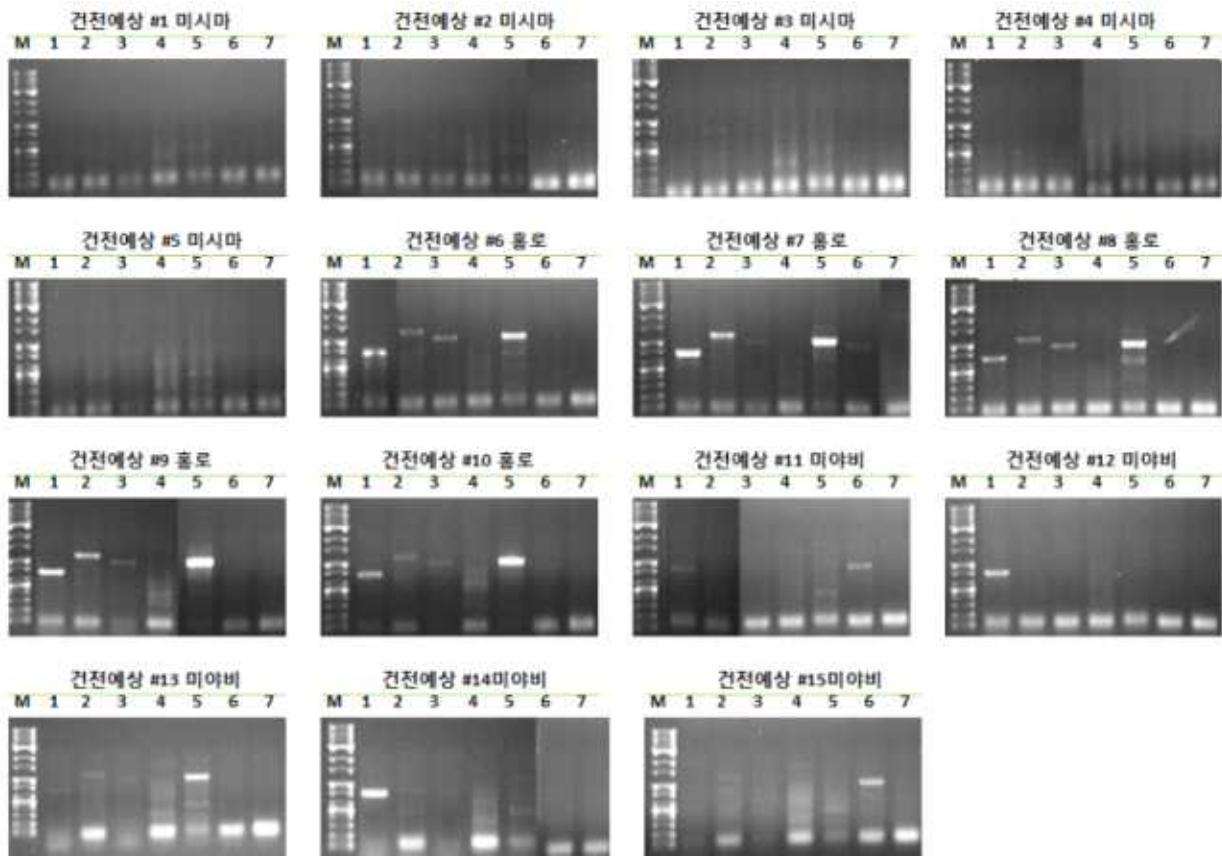
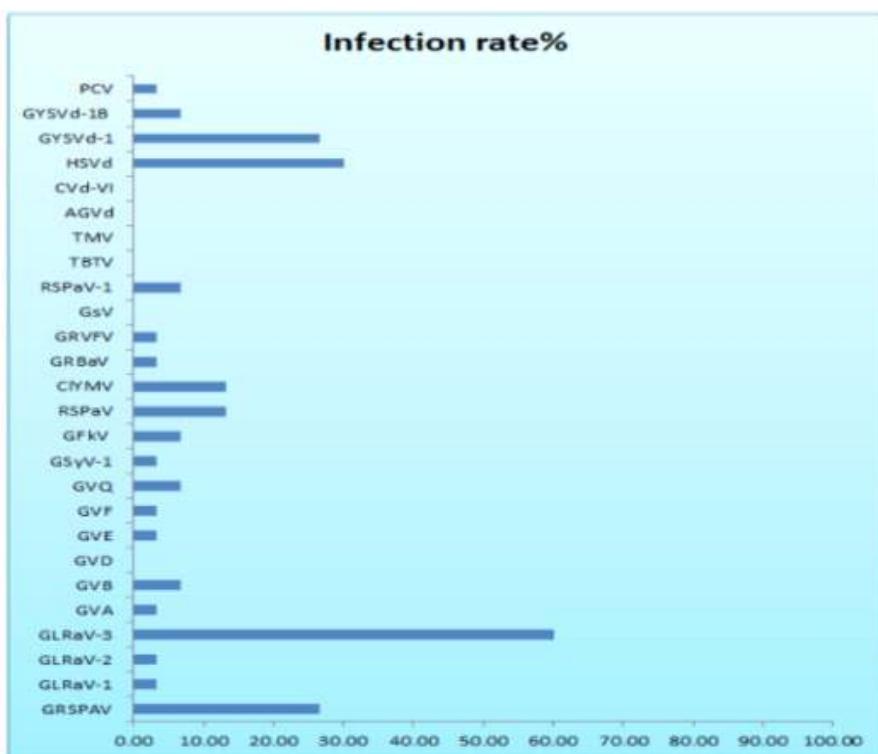
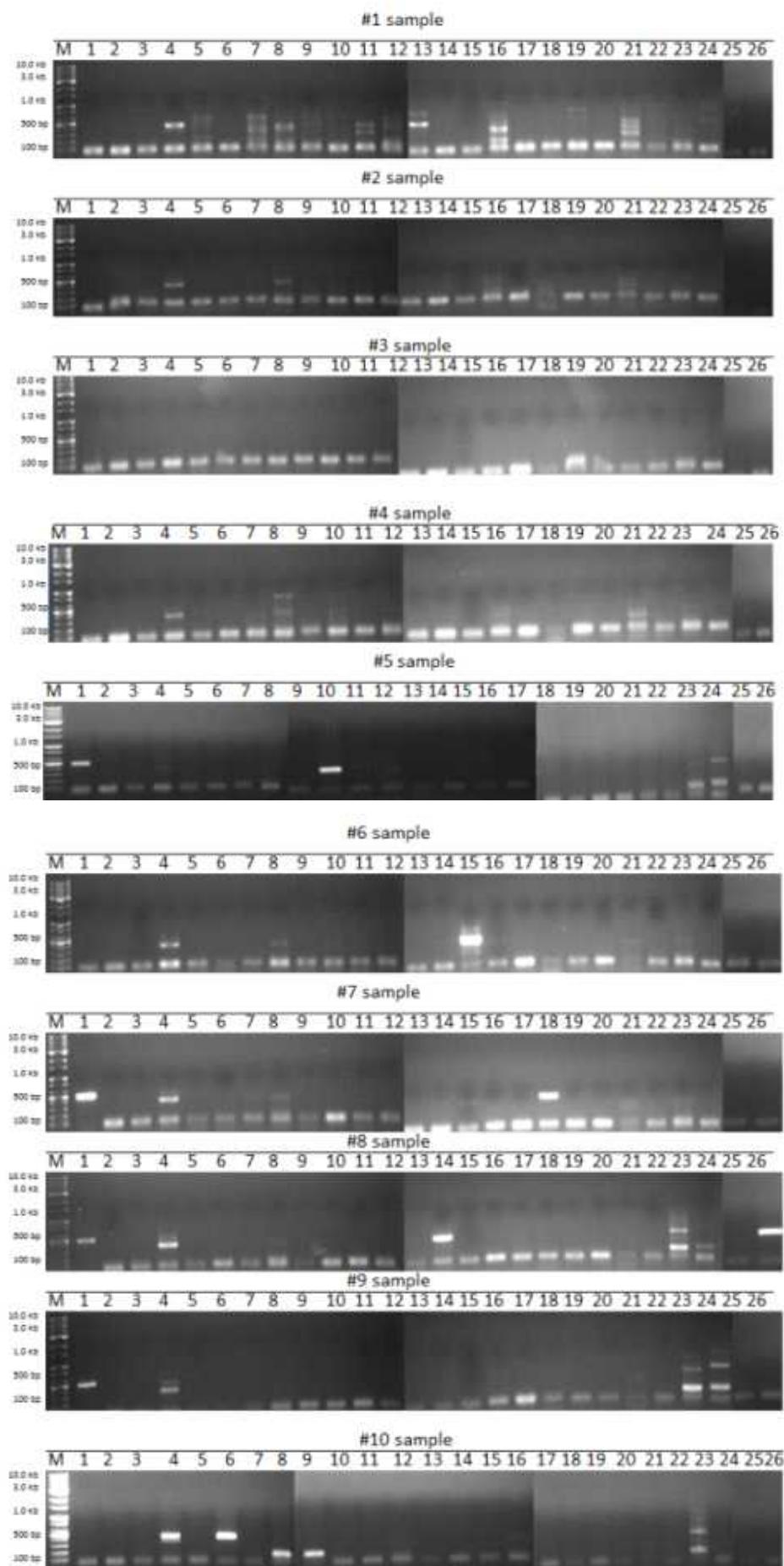


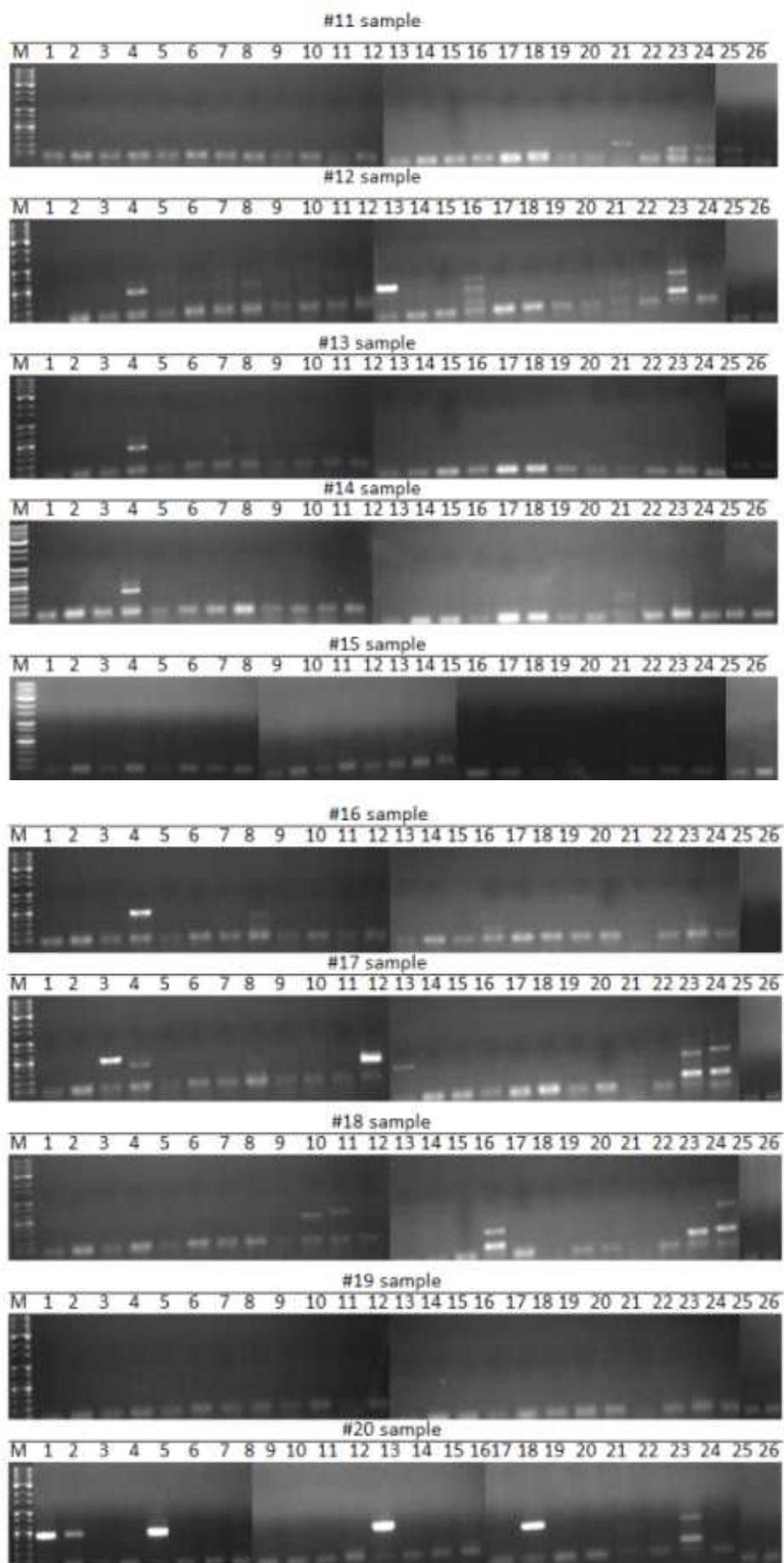
그림 2. 15개 건전한 것으로 추정되는 사과 시료를 대상으로 ASPV의 변종 발생 수준을 확인한 프라이머 정보 및 RT-PCR 결과

포도 시료의 정밀 분석은 전년도에 분석 완료된 포도 시료 30개에 대한 paired-end RNA sequencing 결과에 대한 실험을 수행하였다. Annotation 기준으로 26 종류의 바이러스 및 바이로이드 서열이 존재하는 것으로 나타났다. 26 종류의 바이러스 및 바이로이드 유래 contig를 각 종류에 따라 1개씩 선발하고 기존에 알려진 서열 정보와 비교하여 상동성 70%~100%를 나타내도록 선발하였다. 이들 바이러스 가운데 18개 시료에서 GLRaV3가 검출되어 가장 감염 빈도가 높은 바이러스로 나타났다. 시료들 가운데 가장 많은 바이러스 및 바이로이드가 동시에 감염되어 바이러스에 복합 감염된 시료는 8번 시료이며 4종의 바이러스와 2종의 바이로이드에 동시에 감염된 것으로 나타났다. 26~30번 시료의 경우 건전주로 추정하여 수집된 시료로써 30번을 제외한 모든 시료에서 바이러스 및 바이로이드가 검출되었다. 30번 시료의 경우 실험 오류 가능성에 의하여 바이러스 및 바이로이드가 검출되지 않았을 가능성이 매우 높은 것으로 추정된다.

Primer set	Config No	Virus Name	Abbreviation	Identity	Accession No	Config length	Primer name	Sequence	PCR product	Detected sample
1	G309	Grapevine rupestris stem pitting-associated virus	GRSPAV	96%	JX515892	2602	GRSPAV-like-G309-F	CCTTGGGGCTCCACAGACAA	474	3,7,8,9,20,22,25,28
2	G122	Grapevine leafroll-associated virus 1	GLRaV-1	88%	JQ023131	704	GLRaV-1-like-G122-F	GGCAACTCTCCACAAATTAA	477	20
3	G355	Grapevine leafroll-associated virus 2	GLRaV-2	99%	AP039204	1360	GLRaV-2-like-G355-F	TTTGCGTAGGAGCACGTACA	439	17
4	G215	Grapevine leafroll-associated virus 3	GLRaV-3	99%	JX558645	1783	GLRaV-3-like-G215-F	CGATATTTCACCTCCCGGATA	439	1,2,4,6,7,
							GLRaV-3-like-G215-R	TTGTTGGGAGAGCGCATGTTT	413	8,9,10,12,13,14,16,17,25,26,27,28,29
5	G174	Grapevine virus A	GVA	79%	KC962564	7363	GVA-like-G174-F	GGCTGGGGACACATCAAATCT	486	20
6	G143	Grapevine virus B	GVB	78%	JX513887	2608	GVB-like-G143-F	GGCTGCGAACGTTTTATGG	425	10,24
7	G145	Grapevine virus D	GVD	70%	JY77884	382	GVD-like-G145-F	GGGGACGAGATGAGGGAGAT	138	
8	G128	Grapevine virus E	GVE	99%	GU903011	782	GVE-like-G128-F	GGCTAATGCAACGGCTTCTT	168	10
9	G288	Grapevine virus F	GVF	75%	JK105428	230	GVF-like-G288-F	CTAGAGGCCATGCAATCTAG	175	10
10	G32	Grapevine virus G	GVG	85%	JF977041	479	GVG-like-G32-F	GGTGAACCAGGCGACGTTTT	373	5,10
11	G311	Grapevine Spreit Virus-1	GSV-1	87%	JF458028	968	GSV-1-like-G311-F	GGACATTGACACACTCTG	428	11
							GSV-1-like-G311-R	CAAGCGATCTGAGGTCCTG	428	
12	G283	Grapevine fleck virus	GVF	94%	JJ59022	406	GVF-like-G283-F	CCCCTGCTCACTCTCTCT	349	17,23
13	G305	Rupestris stem pitting-associated virus	RSPaV	94%	JY968590	3971	RSPaV-like-G305-F	CGGGGGATGAAACAGAGAAG	487	1,12,17,20
14	G207	Clerodendrum yellow mosaic virus	CMV	77%	JF408037	798	CMV-like-G207-F	GGTCGTCAGAACCCCTATAT	474	8,23,26,29
15	G125	Grapevine red blotch-associated virus	GRBaV	99%	KC896824	3330	GRBaV-like-G125-F	TTTGGGTCGATTGTTGAA	438	8
16	G225	Grapevine rupestris vein feathering virus	GRPV	88%	JY706984	224	GRPV-like-G225-F	CTTTAACCCCTGCTTTCAC	151	18
17	G81	Grapevine satellite virus	GSV	94%	KC149510	1094	GSV-like-G81-F	TGAAAGGAAATGCGCGACTA	448	
18	G307	Rupestris stem pitting associated virus-1	RSPaV-1	96%	JF037138	4083	RSPaV-1-like-G307-F	CTATGCTTACAGACTTGAA	488	7,20
19	G322	Tobacco bushy top virus satellite-like RNA	TBTV	84%	AM235742	518	TBTV-like-322-F	ACGACAGCTAACTCCCTTG	425	
20	G191	Tobacco mosaic virus	TMV	99%	HE818411	2759	TMV-like-191-F	CCCTTCCCTTAACTCCAGGT	451	
21	G312	Australian grapevine viroid	AGVd	100%	KP780334	370	AGVd-like-For	CGGCGATGTTACACAGGAAAC	242	
22	G330	Citrus viroid VI	CVd-VI	82%	KC788198	330	CVd-VI-like-For	CGGGCGATCATAAAGCTCTC	178	
23	G377	Hop stunt virus	HSVd	100%	KP007325	297	HSVd-like-For	CGGCGATGTTACACAGGAAAC	185	3,8,9,12,17,18,20,22,25,
24	G280	Grapevine yellow speckle viroid 1	GYSVd-1	100%	JF746187	367	GYSVd-1-like-For	CGCTGTTGCTCTTGTTT	245	8,8,17,18,22,26,27,28,
25	G331	Grapevine yellow speckle viroid 1B	GYSVd-1B	99%	JF4348	363	GYSVd-1B-like-For	GGACAGCTCCGCTGACTA	215	22,25
							GYSVd-1B-like-Rev	GGGGCCCTCTCTCTAAAGATUC	215	
26	G45	Pepper cryptic virus	PCV	72%	JN117278	1569	PCV-like-For	CTGGGCCCCCTCTCTCTCT	330	8
							PCV-like-Rev	GGCGAGGCGCTCCATTACAT	330	







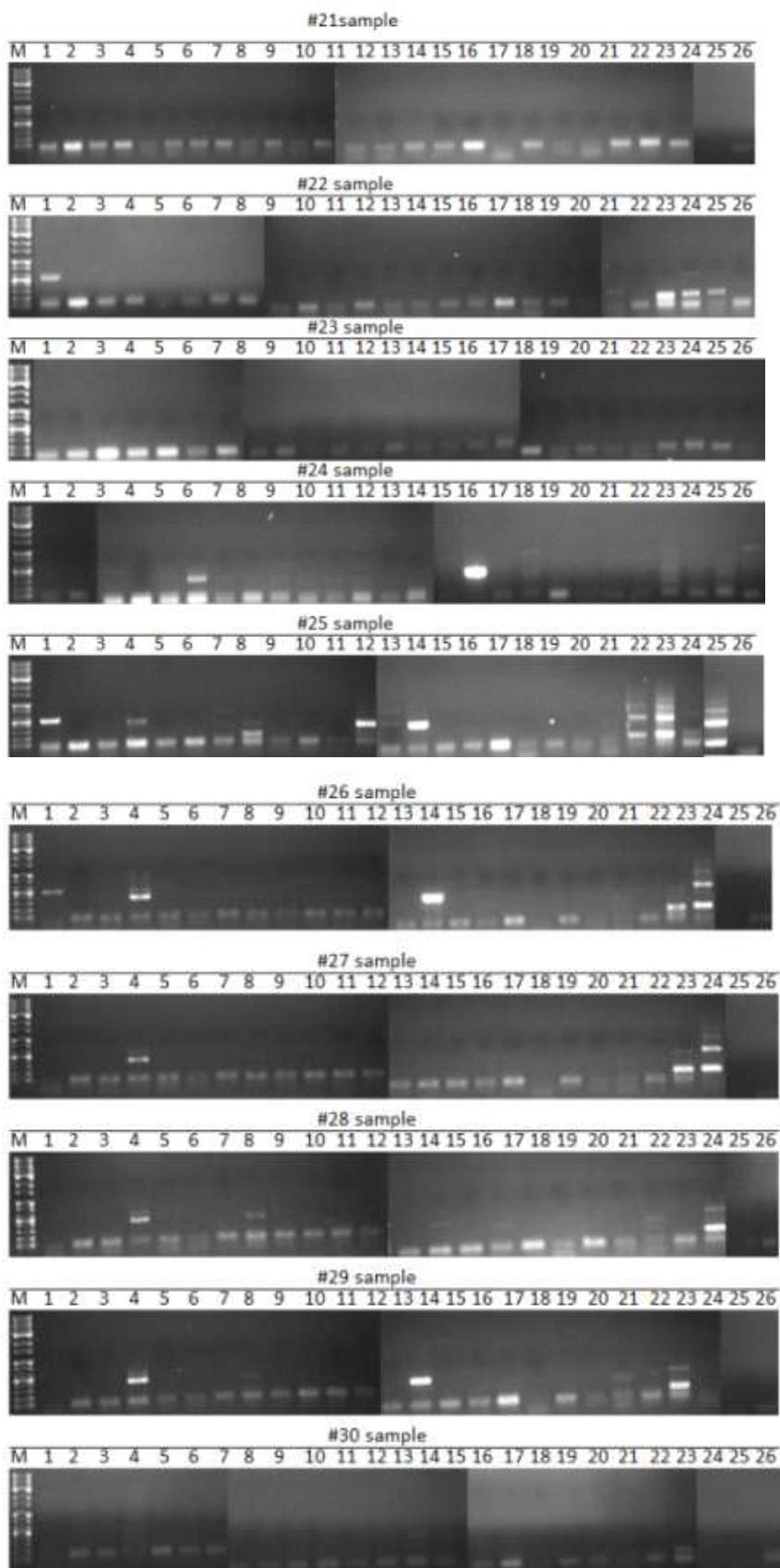
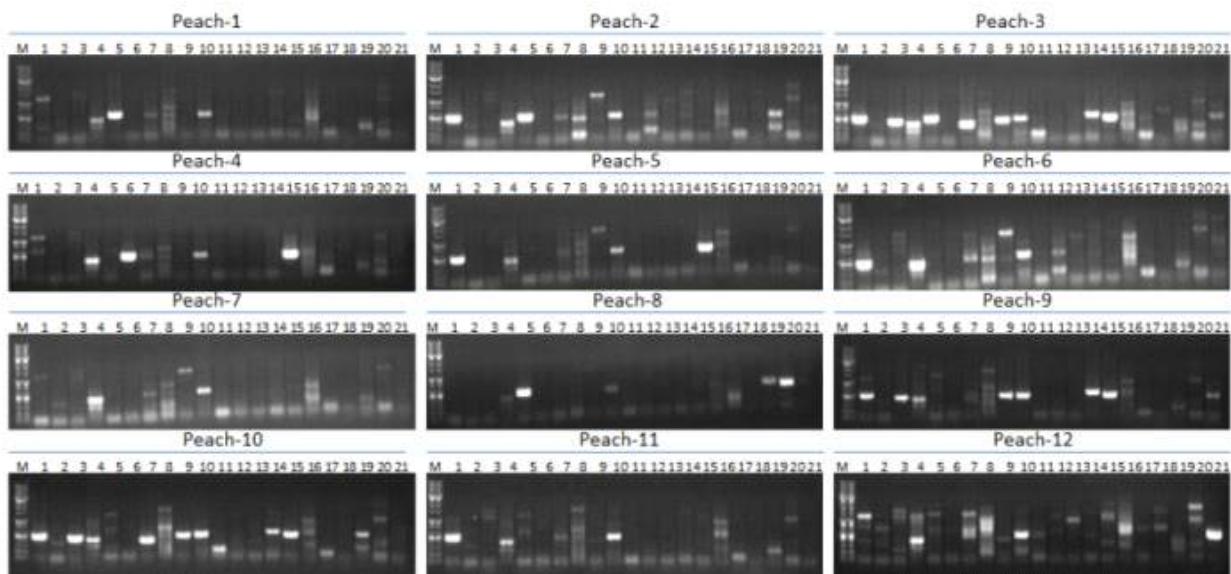
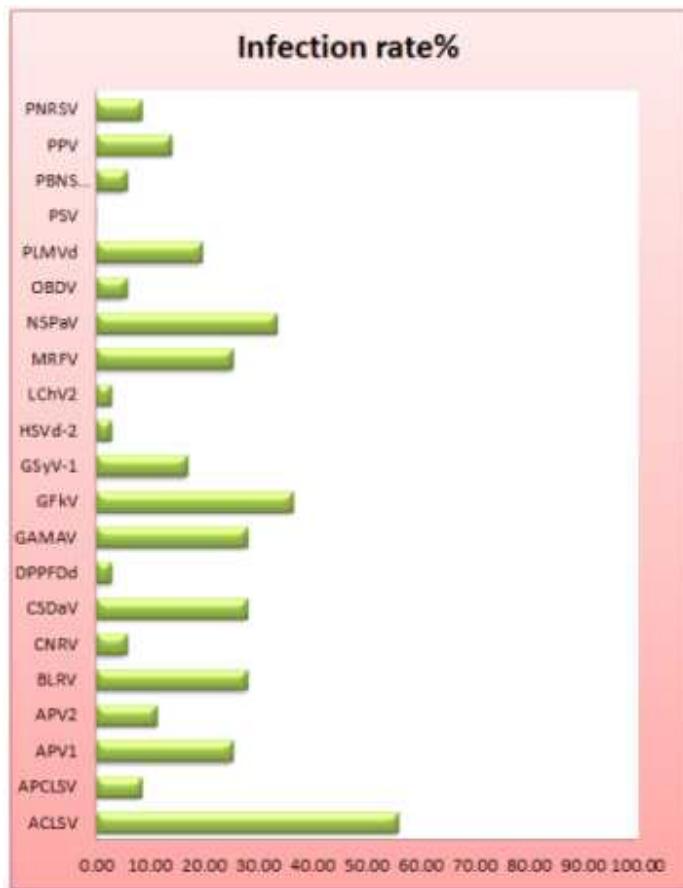


그림 3. 30개 포도 시료를 대상으로 26종의 바이러스 및 바이로이드 검출 결과, 바이러스, 바이로이드의 발생 빈도, 및 RT-PCR 결과

복숭아 및 핵과류 시료의 정밀 분석은 전년도에 분석 완료된 복숭아 시료 36개에 대한 paired-end RNA sequencing 결과에 대한 실험을 수행하였다. Annotation 기준으로 21 종류의 바이러스 및 바이로이드 서열이 존재하는 것으로 나타났다. 21 종류의 바이러스 및 바이로이드 유래 contig를 각 종류에 따라 1개씩 선별하고 기존에 알려진 서열 정보와 비교하여 상동성 69%~100%를 나타내도록 선별하였다. 이들 바이러스 가운데 예상한 바와 같이 36개 시료 가운데 20개 시료가 ACLSV에 감염된 것으로 나타났다. 이들 21종 바이러스 및 바이로이드 가운데 3종은 신종으로 추정되며 2종의 바이러스의 전체 게놈 서열이 완성되어 보고할 예정이다. 복숭아 및 핵과류는 예상과 달리 복합 감염의 정도가 매우 높은 것으로 나타났다. 사과 및 포도의 경우도 동일 개체에 여러 종류의 변종 또는 서로 다른 종의 바이러스가 복합 감염되어 있는 것으로 나타났으나 복숭아 및 핵과류의 복합 감염 정도가 가장 높게 나타났다. 이러한 RT-PCR 결과는 비특이 반응 등의 실험 오류에 의하여 나타날 수 있기 때문에 3번 시료를 대상으로 증폭된 RT-PCR 산물의 염기 서열을 결정하여 확인하였다. 그 결과 정확하게 예상되는 바이러스 및 바이로이드 서열이 얻어졌으며 9종류의 바이러스 및 1종의 바이로이드에 복합 감염된 것으로 최종 확인되었다.

Primer set	Contig no	Virus Name	Abbreviation	Identity	Accession No	Contig length	Primer name	Sequence	PCR product	Detected sample
1	P389	Apple chlorotic leaf spot virus	ACLSV	95%	JN634780	7585	ACLSV-P389-For	CACAGGCCACACCATCTG	479	3.3.5.9.10.11.13.14.15.16.21.22.23.25.26.32.3 4.35.36
2	P480	Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus	APCSV	81%	AY713379	3274	APCSV-P480-For	GGCGAATGAAAATTCCAAA	484	14.13.34
3	P305	Asian prunus virus 1	APV1	73%	JN24737	5224	APV1-P305-For	CATTCAGACTCTTGTCAAA	420	3.9.10.13.14.13.34.35.36
4	P294	Asian prunus virus 2	APV2	81%	DQ28537	1573	APV2-P294-For	CCCCACAGTCACCTTTCACTT	416	4.8.10.12
5	P430	Bear leafroll virus	BLRV	68%	AM41393	5824	BLRV-P430-like For	GTAAGGTTTACCTGGACCA	487	1.2.5.8.14.19.21.22.31.36
							BLRV-P430-like Rev	ATCGACAGTTTGCGACCA		
6	P419	Cherry necrotic rugose mottle virus	CNRV	80%	AF237816	8438	CNRNV-P419-For	TCTCTAACTCAGATCCCTTGG	453	4.6
							CNRNV-P419-Rev	CTTGGAGGCGAGGAGGAGG		
7	P152	Citrus sudden death-associated virus	CSDV	77%	DO185573	382	CSDV-P152-For	GTCGAATACTCGGAGTGT	541	3.10.13.14.15.27.31.34.35.36
							CSDV-P152-Rev	GCTGAAATTCAGCAGAGAG		
8	P140	Dapple plum and peach fruit disease virus	DPFDv	100%	D13764	287	DPFDv-P140-For	CTCTGCCTTCGAAACACCAT	122	3
							DPFDv-P140-Rev	GGCGCAGTAGAACAAADC		
9	P38	Grapevine asteroid mosaic-associated virus	GAMAV	74%	AU248357	577	GAMAV-P38-For	TGCTGACTATGAGGGCGATE	431	3.9.10.13.14.15.32.34.35.36
							GAMAV-P38-Rev	TGACCGGATCAATTGACGAGA		
10	P158	Grapevine fleck virus	GVF	73%	AJ309022	873	GVF-P158-For	TCTCCGAGCTCAACATCT	431	3.8.9.10.11.12.14.15.32.34.35.36
							GVF-P158-Rev	AGCAGGAGCACTGTTTTT		
11	P41	Grapevine Syring Virus-1	GSyV-1	78%	JN498228	251	GSyV-1-P41-For	CACTCCAAAGGACGAAATC	180	3.10.14.19.31.34
							GSyV-1-P41-Rev	GGTGGCTTGGTTTATAGTG		
12	P138	Hop stunt virus	HSv-2	99%	KU734184	287	HSv-2-P138-For	TCTAGAAATCACGGAGAG	177	6
							HSv-2-P138-Rev	GGCGCAGTAGAGACAAAGC		
13	P449	Little cherry virus-2	LCV-2	80%	AP531505	812	LCV-2-P449-For	AAATGATGATGAGGGCAAGTG	471	35
							LCV-2-P449-Rev	CGTGTAGAGAACGGGGCTCA		
14	P40	Mare's rapido fino virus	MRFV	72%	EM521134	1546	MRFV-P40-For	ACTACGCTCTCCACACCTCA	522	3.9.10.13.14.32.34.35.36
							MRFV-P40-Rev	GAGATCTCAACACGCGCTGC		
15	P57	Nezzerine stem pitting-associated virus	NSPAV	96%	KP858562	4718	NSPAV-P57-For	GGCGAAGCTCTGACTGGAC	453	3.4.5.9.10.14.15.21.32.34.35.36
							NSPAV-P57-Rev	CCGATCCGAGACCAATCTAA		
16	P178	Out blue dwarf virus	OBDV	75%	U87832	894	OBDV-P178-For	AAACCCAGCAGAACGTCAC	581	12.32
							OBDV-P178-Rev	GTAGAGACCGGGGTTTGG		
17	P93	Peach latent mosaic virus-d	PLMvd	98%	JP888803	337	PLMvd-P93-For	CCGGCGTAGAACAGGATTA	107	3.8.10.11.14.15
							PLMvd-P93-Rev	TTCAAGAATCGCGAGTTG		
18	P211	Pearnut stunt virus	PSV	99%	JP838186	371	PSV-P211-For	TCAGAAGGGCGATGTTTGG	153	
							PSV-P211-Rev	CCAGGAGGCGACATTCTGAG		
19	P181	Plum bark necrosis stem pitting-associated virus	PBNSPV	98%	KC390348	9019	PBNSPV-P181-For	TTTGTGTTGCGTGGAAATA	478	14.34
							PBNSPV-P181-Rev	ACAATAGGCGCCACCGAG		
20	P38	Plum pox virus	PPV	99%	AB545926	9791	PPV-P38-For	ATGGCGAGTCCTGAGTTCT	437	8.20.24.31.33
							PPV-P38-Rev	AAATTGCGCTTTGATGCTTC		
21	P208	Prunus necrotic ringspot virus	PNRSV	98%	JN418774	5527	PNRSV-P208-For	TCCGCTCTGATATGTTCT	460	9.12.34
							PNRSV-P208-Rev	CCGGCGATGGAGTTAGAGAG		



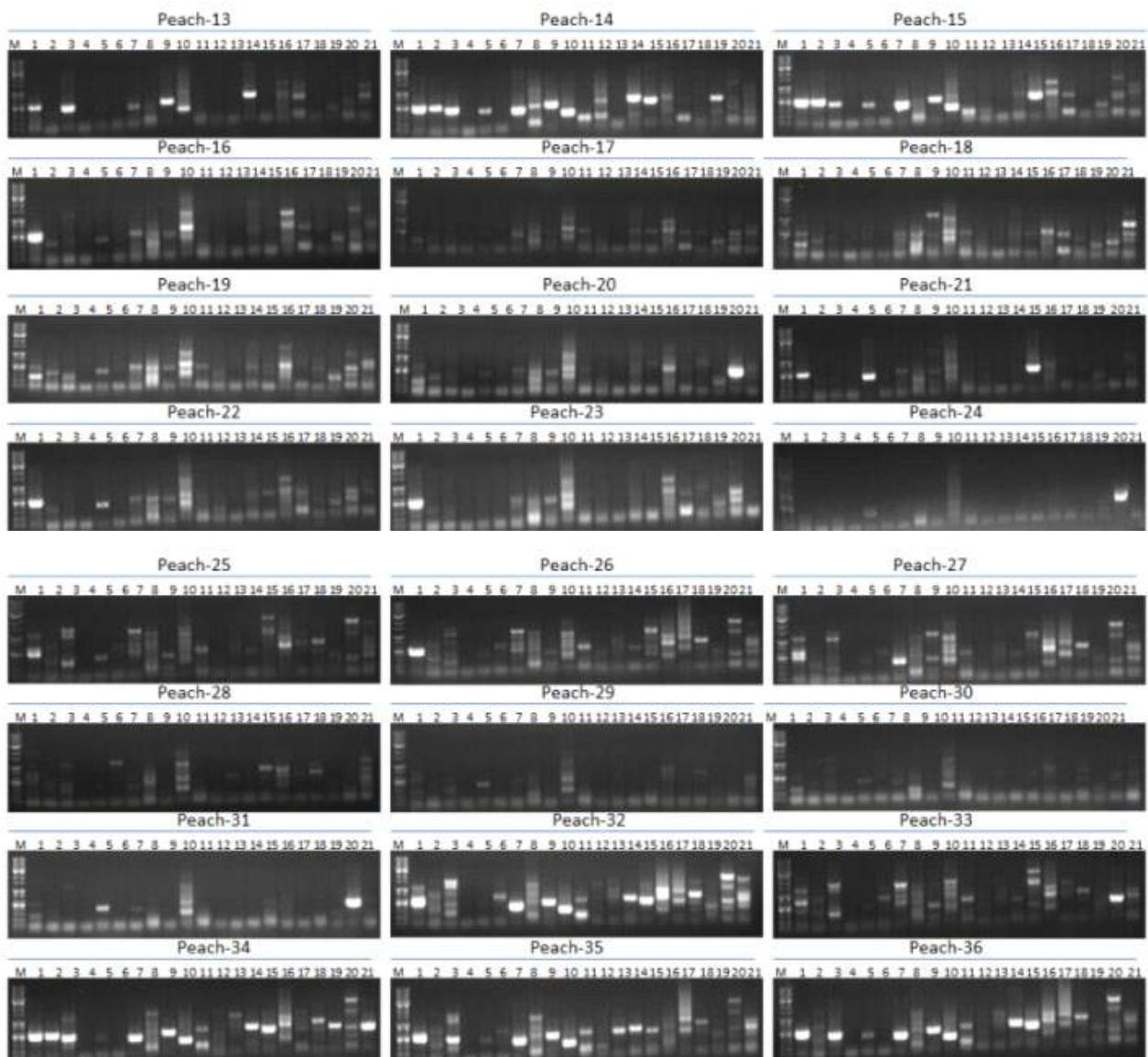


그림 4. 36개 복숭아 및 핵과류 시료를 대상으로 21종의 바이러스 및 바이로이드 검출 결과, 바이러스, 바이로이드의 발생 빈도, 및 RT-PCR 결과

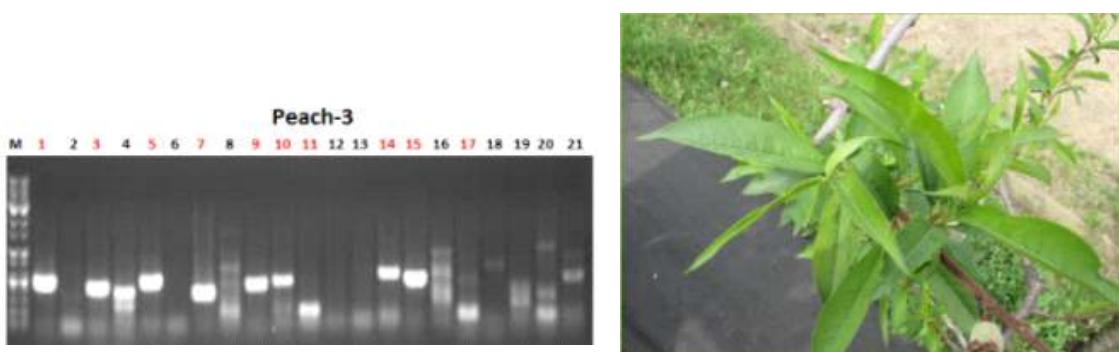


그림 5. 3번 복숭아 시료를 대상으로 21종류의 바이러스 및 바이로이드 검출 RT-PCR 결과 및 붉은 색으로 표시된 레인의 RT-PCR 산물의 결정된 염기 서열 리스트

Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV)
>seq 441 bp

TCCAGCATTGGGAGATAGAATTCTCCAGAGTTACATTAAGATGAAGTGCACTT
 GGGTTGCAGGTTGGGGGTTCGCCATCATGAGATTACGAGAGGTTCAACTTCCCT
 GTTCAATACCCCTGCCAACATGGTGTTCACGTTCTGCAGATATGAGGTACCGGATGGGAC
 TCCAATTGCTTGCCGGGATGACATGTGCGCCTTGAGAAACTTGAGGGAGATTGACAC
 TCATGAGTTATCCTGAATAAGTTGAGTTAAAAGCGAAAGTTAACAGAACAAAAGTACC
 AATGTTCTGCGGATGGCGATTGTGTTGATGGTCTAATCAAGGAGCCTGCCTGATT
 TGAAAGATTGCAAGTTGCGATCGAAAACGGGAGGTTAATGGATGTAATAGACTCATATT
 CTTGGATTCCCATTGCCAA

Asian prunus virus 1 (APV1)

>seq 368 bp

GTGATTGTTGAGAAGCAGACTTCTAGTTAGGGCAAAGGCAGAAGGGATCTGGGA
 CTGTGGCAAGAGGGCACCTCTCCCCAGGGCATTACTTCACAATGGACCCAACCTCCAAT
 CCTATTATCAGCATTCCAGGAATGTAGTGAGGGCGTGTCTCCTTAACTTCCGCC
 ATCATGTCAATAACATCTGGGTTGCCAACAAACACACTTGCGGAGAGTTGGAGATA
 CAGAGGTCTTTTGATGTTGATAAGGAGGAGCTTCACTTACGCTGCGAAAAATTTC
 ACACATTCCCTGTTGCCGGATGGTAGTTGCTTTGGCACAGCATGGGTCTTTACNT
 TGGTAAAA

Bean leafroll virus (BLRV)

>seq_54416 314 bp

GTGTTCTTGGTTAGACTCCGGGTTCCAACCCTCTGCACAATGCCCTGTTGC
 TGTGGAAAGGAGAGTTTACTGTTGGGAAGGGTACTGATGTTGACTTCCATTGGTACC
 TAGTCATGGCATTTCATAAGCTCGCTTATTCCGTACTCCATAATAAAAGAAGTAGG
 GTTCTGTAAGGTACATAGTCCGATGGCTTGCAATGACATACCAGGCACAAAGCGCAC
 TCAGTATATACATGCTGTTGCTTAAGACGGTCACCGTCCAGGTTAAAGATTCTTT
 TGTGACTGCATTTC

Citrus sudden death-associated virus (CSDaV)

>seq 293 bp

GTCACTGGCCATGATTCACTGCCTTCGACCAGTCCCAGCACGGAGAGGGGTTTGCTCG
 AGAGGAAGAAAATGGAACGACTGTCGATCCCAGAGCATCTCATCGAGCTGCATGTGCATC
 TGAAGACCAATGTCTCGACTCAGTTGGCCCCCTGACCTGCATCGTCTCACCGGAGAAC
 CAGGAACCTATGATGACAACACCGATTACAATATTGCGGTGATCTACTCCGAGTACGCCT
 GTGACAGTGTCCCCCTCATGGTCTCCGGCGACGACTCTGCTGAAATTGCA

Grapevine asteroid mosaic-associated virus (GAMAV)

>seq 383 bp

TGAGAGGGTGAGTCTGAAATCCTGGAAAGCGGAGGGCACCTACCCCTGGTGATGGAAA
 CATCGGAGCTCTGGCATGGGCGGGACTTCCCGCGCGATGATTTGCTTTGTTGG
 CGCCGCGGAGGGAGAGCCCAGACGGCGTGAGAGGGCCAAGGGGATCCTCGAAGGCGCTT
 CGAGGAGCTCCATGGGTATCTCACCGATCTTGAGAACGAGCTTGGCTGGGTGGCGT
 GACGGCAGAAGTCGAAGCAGGCCTCTGGTAAGGCACGGCATCAATGGGTAGAAGCT
 GCCAAAGTTGGTCTCCGAGGGAGTGGCCAACGGAGAACCTGGTGAGGTACGAGGCGAGCT
 TCTCGTCATGGAATTCCGTCAAA

Grapevine fleck virus (GFkV)

>seq 221 bp

TGCCGGGTCTGTGATCGACGAGGGCTACAAGCTCCCACGGGGTACGTTGACCTCGCC
 ATTCAATCGGGATCCCTCGGGTTGAGTTGTCATCCTCTCGGAGACCCCTCCAGGGAGA
 GTACCACTCCACCCATCCAGACTCCTCCAACCACCGCCTGTCATCCGAGCTCAAGCACCT
 GAGGCCCTACCTGGACTACTGCCTTGGAAGCCGCCGC

Grapevine Syrah Virus-1 (GSyV-1)

>seq 114 bp

```
CGCGCCTACCGCAGGAATCCCAATGACACCCTCCCATTGACGAGGCCCTGTTGCCGA  
ATGCATTGCCCTCAACGAGTCGCGCAGCTAACATCTAAAACCCAAGGCCACCAA
```

Maize rayado fino virus (MRFV)

>seq 473 bp

```
GTGTCCTTCTTGCCTCTCCGTCAGAGTTCTATGGCCTCCAAACCATCNCCGCCCGCTC  
ACCAACCGACGGCTGACCCTCACCGGTGGTGACCCCTACTCTCGCCGGCTCCGATCCGC  
GGCCCCACAGACCCCCGGCCCGTCCCCGTCCACCCGAGACGATGTCTCCTCACCCAGGAG  
ACCATCGTTCCGGCGATGGCGAGCTGCCCTGCAGCCGTCGACACGACGTTCTGCCG  
GAGACTCGCCGGCCCTCCATCAAGATGTCCCATCAGCAATGCCGAGCCGGCCAGCCC  
ACCACCATCAAGTTCTCCGACACCGCCCACGAGCCGTTACCCGGCGAGGACTCCAC  
GCTCTCGCTGCCACTTCCAGCCAGCAAATGACCCAGAAATGCGAGAAATCGTTTCCGG  
GATCAGATGTCATGCCAGTTCCCTTCTGGACGCCGTTGGAAGATCTCAA
```

Nectarine stem pitting-associated virus (NSPaV)

>seq 389 bp

```
GAGAAAGCCATCCAGCAAGGGAAGAGCAGGGAGAGGATGGTAAAAGGATTGTTCCGCC  
AGATTGTAATAAATGGGCTTGGGTGAGGAACATCAAACAAGGAGAAGAGAAGAGAGCGC  
GACACTTCATCCCGCTTATGTAATGTCAAAGAACCTCGTCTCAGAGGCGACGATGTCT  
CGAAGGTTACAATTCAAAGATACTGTTGAGCAATTCTGTGATGCCAACGACTTCTCTGG  
AGGCCAAGACGCAACTAATCAAGGTTGCACTAATGATGGTGCCGGTCCCCACCAAAACTG  
AGATAGACATGGCAATGGTAGTCATTGCCCGCGCAGAGGCACTCCGACACCAATTGG  
AGTGCATTGAGTCTCAGGTTTTAGATG
```

Peach latent mosaic viroid (PLMVd)

>seq 138 bp

```
CCTCCACCTGGGGTGCCTATCCGAGCACTGCTTTGGTAGAAAGGCTAACGACGTC  
GCAATGACGTAAGGTGGGACTTTCCCTACAGTTGAGCGGTGAACTAGAGGGAGTGT  
GATCCTGGTACCGCCGTA
```

2. 포장 시료에 의한 칩의 검증

전년도에 제작된 과수 바이러스 진단용 칩을 활용하여 포장에서 수집된 시료를 칩에 처리하여 제작된 과수 바이러스 진단용 칩의 활용 가능성을 시험하였다. 본 과제에서 수집된 시료들은 감염 바이러스가 확인되었기 때문에 바이러스 이병 증상이 있으며 포장에서 문제가 되는 시료를 활용하는 것이 바람직하다. 따라서 주관기관인 국립원예특작과학원으로부터 바이러스 이병 증상을 나타내고 포장에서 수집되었으나 감염 바이러스가 확인되지 않은 시료를 분양 받아 활용하였다. 전년도와 마찬가지로 total RNA의 추출은 국립원예특작과학원의 주관과제 책임자인 조인숙 박사의 협조를 얻어 해당 기관이 보유한 Nuclisens easyMAG system을 활용하였다.

과수 바이러스 진단용 칩 실험 방법을 간단하게 요약하면 :

(1) 증폭 및 표지

: Total RNA 500ng을 이용하여 Cyanine 3가 표지된 cRNA를 키트(Agilent's Low RNA Input Linear Amplification kit)를 사용하여 합성. 표지 및 합성된 cRNA는 스펙트로포토

메터를 이용하여 정량.

(2) 칩 혼성화 반응

: 표지된 cRNA를 혼성화 키트(Agilent's Gene Expression Hybridization Kit)를 활용하여 칩(Agilent technologies, 8x60K)에 처리

(3) 미반응 표지 cRNA 제거

: 혼성화 반응이 완료된 칩에 존재하는 프로브와 반응하지 않은 표지 cRNA를 베퍼(Agilent's Gene Expression Wash Buffer)를 이용하여 제거

(4) 칩 판독 및 이미지 분석

: 미반응 표지 cRNA가 제거된 칩은 판독기에서 판독하고 판독기에 탑재된 프로그램에 의해 생성되는 각각 프로브의 시그널을 확인

(5) 데이터 분석

: 프로그램(GeneSpring GX12 software)에 의하여 정규화된 프로브의 값을 확인

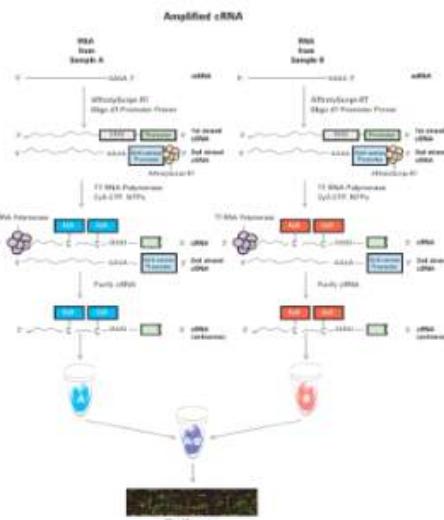
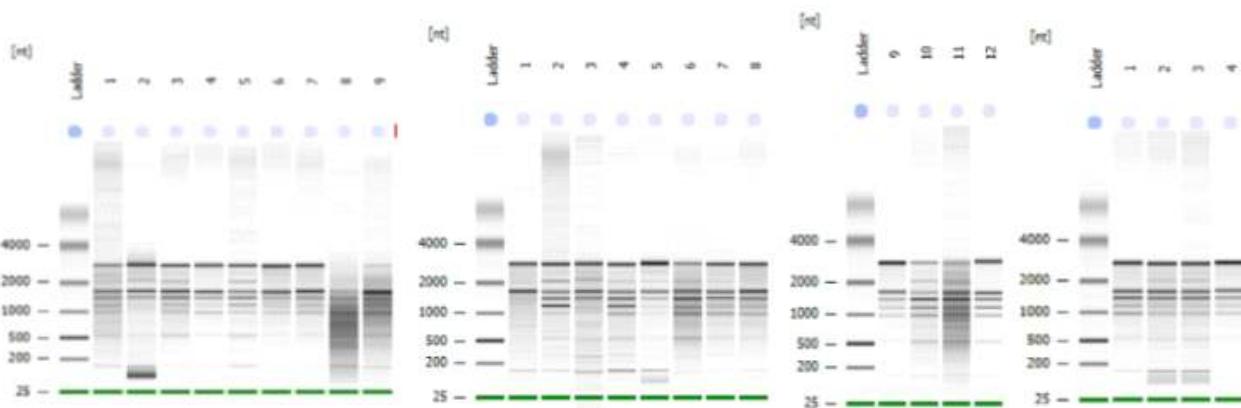


그림 6. Agilent microarray 실험 전체 과정 모식도



No.	Sample name	RNA Conc. (ng/μl)	rRNA ratio (28S/18S)	RIN	%of total Area	Degradation pattern	QC Pass or Not pass	No.	Sample name	RNA Conc. (ng/μl)	rRNA ratio (28S/18S)	RIN	%of total Area	Degradation pattern	QC Pass or Not pass
1	1	61.8	1.1	5.9	13.2	-	Pass	1	1	38.6	1.3	6.6	25.7	-	Pass
2	2	67.8	1.6	6.5	16.5	-	Pass	2	2	64.6	1.4	7.2	19.4	-	Pass
3	3	202.1	1.1	6.1	22.6	-	Pass	3	3	26.5	1.2	6.4	24.4	-	Pass
4	4	66.2	1.2	6.8	46.5	-	Pass	4	4	39.4	1.4	6.2	15.7	-	Pass
5	5	36.3	1.3	7.2	29.5	-	Pass	5	5	2586.2	2.0	7.6	42.2	-	Pass
6	6	110.8	1.2	6.5	33.2	-	Pass	6	6	102.8	1.0	4.7	9.2	Detected	Not Pass
7	7	99.8	1.2	6.4	26.9	-	Pass	7	7	78.2	1.3	6.0	19	-	Pass
8	8	94.6	0.6	3	3.1	Detected	Not Pass	8	8	94.1	1.0	5.9	20.9	-	Pass
9	9	168.3	0.2	4.3	6.5	Detected	Not Pass								
9	9	66.2	1.7	7.3	44.1	-	Pass	9	9	88.1	1.3	6.1	29.4	-	Pass
10	10	49.2	0.6	5.6	16.8	-	Pass	10	10	90.7	1.4	6.2	21.4	-	Pass
11	11	69.5	0.8	4	6.8	Detected	Not Pass	11	11	66.7	1.8	6.1	17.3	-	Pass
12	12	141.3	1.3	6.3	38.4	-	Pass	12	12	96	1.7	7	37.7	-	Pass

그림 7. 과수 바이러스 진단용 칩 검증을 위하여 활용된 핵산의 질적 평가. 통과 기준은 (1) rRNA ratio (28S/18S)>1.8, (2) % of total area (18S+28S)>50%, (3) RIN>5, (4) No degradation pattern. 4개 시료를 제외한 모든 시료가 Bio-analyser 2100 장비로 측정하여 QC를 통과하였으며 최종적으로 electropherogram에 의하여 확인되었다.

no.	Probe	Value	Target	no.	Probe	Value	Target	no.	Probe	Value	Target
1	669-18	8.3	ACLSV	35	730-86	5.1	ACLSV	68	942-1	4.3	PNRSV
2	398-22	7.4	GLRaV-2	36	529-9	5.1	GRPVF	69	923-35	4.3	PNRSV
3	545-4	6.7	Viroid	37	787-417	5.1	CNRMV	70	464-15	4.3	GSyV-1
4	927-5	6.6	PNRSV	38	926-7	4.9	PNRSV	71	922-24	4.3	PNRSV
5	415-32	6.6	GLRaV-3	39	411-44	4.9	GLRaV-3	72	741-47	4.2	APCLSV
6	868-7	6.6	PBNSPaV	40	777-46	4.9	APV2	73	35-31	4.2	ASGV
7	942-10	6.3	PNRSV	41	927-9	4.9	PNRSV	74	430-147	4.2	GVA
8	545-9	6.3	Viroid	42	452-8	4.9	GVE	75	281-24	4.1	ASGV
9	941-2	6.3	PNRSV	43	430-195	4.8	GVA	76	920-19	4.1	PNRSV
10	923-36	6.2	PNRSV	44	329-6	4.8	GRSPAV	77	536-22	4.1	TMV
11	922-11	6.1	PNRSV	45	545-10	4.7	Viroid	78	276-31	4.1	ACLSV
12	926-25	6.1	PNRSV	46	285-3	4.7	ASGV	79	731-23	4.1	ACLSV
13	921-91	6.0	PNRSV	47	329-9	4.7	GRSPAV	80	49-36	4.1	ASPV
14	926-3	5.9	PNRSV	48	329-2	4.7	GRSPAV	81	243-49	4.1	ACLSV
15	927-13	5.9	PNRSV	49	515-38	4.7	RSPaV	82	532-15	4.1	RSPaV-1
16	921-36	5.9	PNRSV	50	221-50	4.7	ASPV	83	21-31	4.1	ASPV
17	221-80	5.8	ASPV	51	942-5	4.7	PNRSV	84	221-20	4.1	ASPV
18	777-15	5.8	APV2	52	943-13	4.6	PNRSV	85	965-6	4.0	HSVd
19	941-8	5.8	PNRSV	53	545-5	4.6	Viroid	86	485-7	4.0	RSPaV
20	669-12	5.7	ACLSV	54	279-2	4.6	ASGV	87	965-17	4.0	HSVd
21	922-15	5.6	PNRSV	55	787-31	4.6	CNRMV	88	479-44	4.0	RSPaV
22	269-16	5.6	ACLSV	56	285-11	4.6	ASGV	89	947-26	4.0	PNRSV
23	923-40	5.5	PNRSV	57	964-27	4.6	PPV	90	435-76	3.9	GVB
24	941-6	5.5	PNRSV	58	778-9	4.5	APV2	91	921-23	3.9	PNRSV
25	398-10	5.5	GLRaV-2	59	213-18	4.5	ASPV	92	730-54	3.9	ACLSV
26	728-26	5.5	ACLSV	60	922-10	4.5	PNRSV	93	421-8	3.9	GLRaV-3
27	410-163	5.4	GLRaV-3	61	278-2	4.5	ASGV	94	517-11	3.9	RSPaV
28	731-2	5.3	ACLSV	62	464-42	4.5	GsyV-1	95	410-117	3.9	GLRaV-3
29	415-11	5.3	GLRaV-3	63	259-11	4.4	ACLSV	96	514-28	3.9	RSPaV
30	282-24	5.3	ASGV	64	965-12	4.4	HSVd	97	965-15	3.9	HSVd
31	421-19	5.2	GLRaV-3	65	921-77	4.4	PNRSV	98	328-2	3.9	GRSPAV
32	941-5	5.2	PNRSV	66	464-31	4.4	GsyV-1	99	806-7	3.9	NSPaV
33	891-36	5.1	PBNSPaV	67	411-19	4.3	GLRaV-3	100	726-62	3.9	ACLSV
34	269-57	5.1	ACLSV								

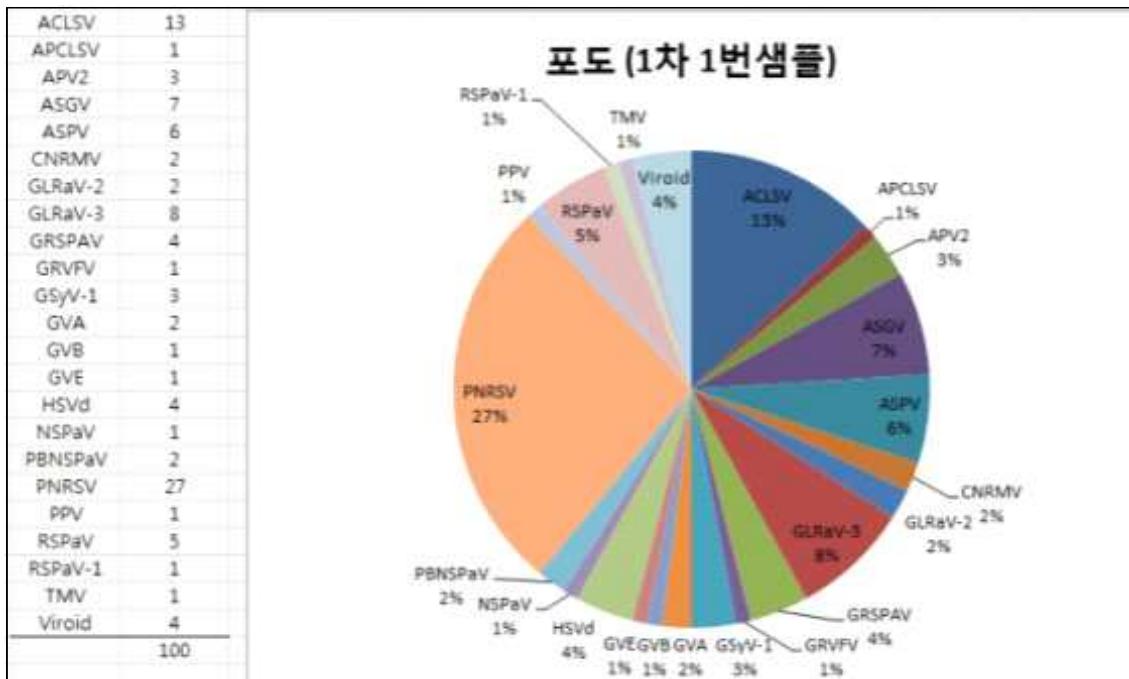


그림 8. 과수 바이러스 진단용 칩을 활용하여 포장에서 수집된 포도의 진단 결과

no.	Probe	Value	Target	no.	Probe	Value	Target	no.	Probe	Value	Target
1	358-35	13.7	GRSPAV	35	362-16	11.1	GRSPAV	68	359-11	10.5	GRSPAV
2	359-23	13.5	GRSPAV	36	539-58	11.1	ToLCGV	69	474-3	10.5	RSPaV
3	358-23	13.5	GRSPAV	37	359-21	11.1	GRSPAV	70	363-2	10.5	GRSPAV
4	359-34	13.3	GRSPAV	38	359-7	11.0	GRSPAV	71	329-4	10.4	GRSPAV
5	481-18	12.0	RSPaV	39	481-17	11.0	RSPaV	72	359-28	10.4	GRSPAV
6	363-14	11.9	GRSPAV	40	539-18	11.0	ToLCGV	73	481-27	10.4	RSPaV
7	328-8	11.9	GRSPAV	41	539-64	11.0	ToLCGV	74	539-39	10.4	ToLCGV
8	474-8	11.9	RSPaV	42	479-18	11.0	RSPaV	75	329-9	10.4	GRSPAV
9	329-8	11.8	GRSPAV	43	363-13	10.9	GRSPAV	76	481-6	10.4	RSPaV
10	358-20	11.7	GRSPAV	44	359-31	10.9	GRSPAV	77	363-7	10.4	GRSPAV
11	474-7	11.6	RSPaV	45	359-8	10.9	GRSPAV	78	359-17	10.3	GRSPAV
12	328-7	11.6	GRSPAV	46	539-21	10.9	ToLCGV	79	362-8	10.3	GRSPAV
13	481-7	11.6	RSPaV	47	359-9	10.9	GRSPAV	80	539-13	10.3	ToLCGV
14	481-19	11.6	RSPaV	48	479-36	10.9	RSPaV	81	362-10	10.3	GRSPAV
15	363-8	11.6	GRSPAV	49	363-5	10.9	GRSPAV	82	474-9	10.2	RSPaV
16	358-11	11.5	GRSPAV	50	328-3	10.8	GRSPAV	83	468-2	10.2	GFKV
17	539-61	11.5	ToLCGV	51	358-29	10.8	GRSPAV	84	474-10	10.2	RSPaV
18	329-7	11.5	GRSPAV	52	358-30	10.8	GRSPAV	85	481-29	10.2	RSPaV
19	359-20	11.5	GRSPAV	53	363-4	10.8	GRSPAV	86	479-53	10.1	RSPaV
20	481-9	11.4	RSPaV	54	363-10	10.8	GRSPAV	87	539-35	10.1	ToLCGV
21	363-9	11.4	GRSPAV	55	328-2	10.8	GRSPAV	88	328-6	10.1	GRSPAV
22	358-9	11.4	GRSPAV	56	358-12	10.8	GRSPAV	89	479-54	10.1	RSPaV
23	358-32	11.4	GRSPAV	57	481-26	10.7	RSPaV	90	362-13	10.1	GRSPAV
24	358-7	11.3	GRSPAV	58	481-25	10.7	RSPaV	91	329-11	10.1	GRSPAV
25	359-12	11.3	GRSPAV	59	479-35	10.7	RSPaV	92	329-2	10.0	GRSPAV
26	481-8	11.3	RSPaV	60	358-19	10.7	GRSPAV	93	328-11	10.0	GRSPAV
27	481-28	11.3	RSPaV	61	359-19	10.7	GRSPAV	94	474-2	10.0	RSPaV
28	358-21	11.3	GRSPAV	62	328-4	10.7	GRSPAV	95	539-57	10.0	ToLCGV
29	359-29	11.2	GRSPAV	63	539-36	10.7	ToLCGV	96	541-22	10.0	ToLCGV
30	358-8	11.2	GRSPAV	64	362-11	10.6	GRSPAV	97	540-6	10.0	ToLCGV
31	329-3	11.2	GRSPAV	65	362-6	10.6	GRSPAV	98	481-15	9.9	RSPaV
32	358-33	11.2	GRSPAV	66	362-15	10.6	GRSPAV	99	328-10	9.9	GRSPAV
33	363-3	11.2	GRSPAV	67	474-11	10.5	RSPaV	100	358-31	9.9	GRSPAV
34	474-4	11.1	RSPaV								

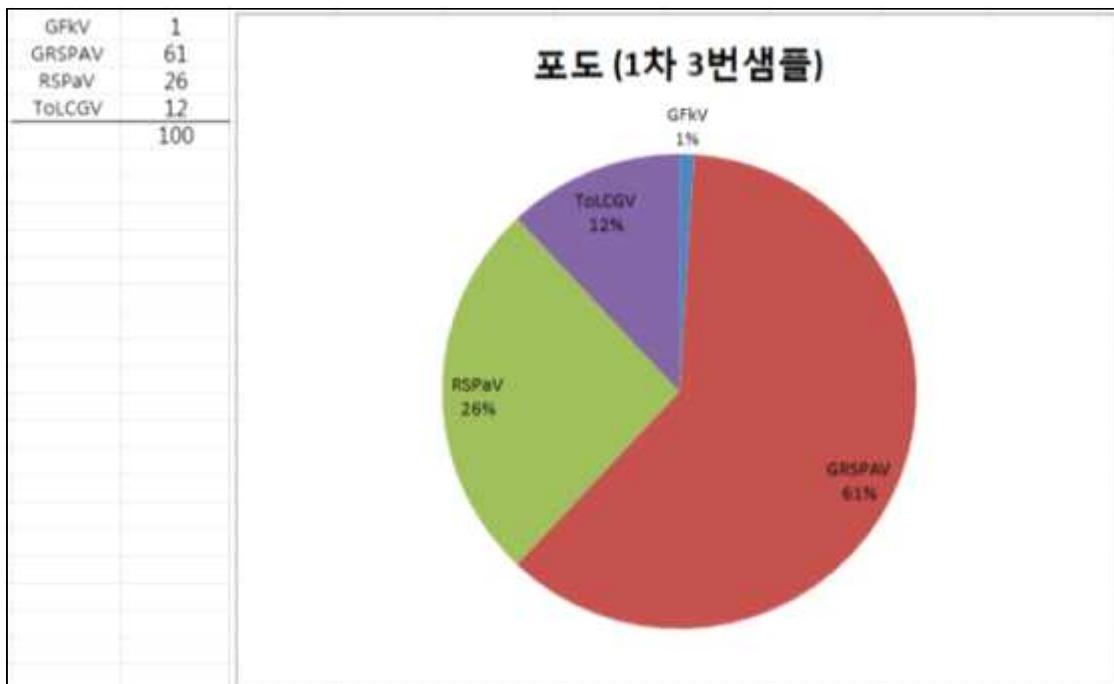


그림 9. 과수 바이러스 진단용 칩을 활용하여 포장에서 수집된 포도의 진단 결과

no.	Probe	Value	Target	no.	Probe	Value	Target	no.	Probe	Value	Target
1	358-35	12.7	GRSPAV	35	329-4	10.2	GRSPAV	68	365-3	9.6	GRSPAV
2	359-23	12.5	GRSPAV	36	524-26	10.2	CIYMV	69	474-6	9.6	RSPaV
3	359-34	12.4	GRSPAV	37	475-7	10.2	RSPaV	70	358-21	9.6	GRSPAV
4	358-23	12.3	GRSPAV	38	539-35	10.2	ToLCGV	71	524-34	9.6	CIYMV
5	539-58	11.9	ToLCGV	39	481-28	10.1	RSPaV	72	358-30	9.6	GRSPAV
6	539-61	11.6	ToLCGV	40	481-9	10.1	RSPaV	73	481-17	9.6	RSPaV
7	539-36	11.6	ToLCGV	41	539-57	10.0	ToLCGV	74	526-29	9.6	CIYMV
8	539-21	11.5	ToLCGV	42	328-6	10.0	GRSPAV	75	541-3	9.6	ToLCGV
9	329-8	11.4	GRSPAV	43	358-9	10.0	GRSPAV	76	328-3	9.6	GRSPAV
10	328-8	11.3	GRSPAV	44	359-29	10.0	GRSPAV	77	328-11	9.6	GRSPAV
11	359-12	11.2	GRSPAV	45	363-9	10.0	GRSPAV	78	539-64	9.6	ToLCGV
12	526-20	11.1	CIYMV	46	359-20	10.0	GRSPAV	79	474-4	9.6	RSPaV
13	539-18	11.1	ToLCGV	47	541-22	10.0	ToLCGV	80	539-22	9.6	ToLCGV
14	481-18	10.7	RSPaV	48	539-13	10.0	ToLCGV	81	329-11	9.5	GRSPAV
15	539-39	10.6	ToLCGV	49	526-19	10.0	CIYMV	82	360-3	9.5	GRSPAV
16	363-14	10.6	GRSPAV	50	329-3	9.9	GRSPAV	83	363-4	9.5	GRSPAV
17	526-10	10.6	CIYMV	51	481-19	9.9	RSPaV	84	524-10	9.5	CIYMV
18	539-14	10.5	ToLCGV	52	481-8	9.9	RSPaV	85	539-43	9.5	ToLCGV
19	540-6	10.5	ToLCGV	53	363-5	9.9	GRSPAV	86	475-10	9.5	RSPaV
20	539-23	10.5	ToLCGV	54	363-3	9.9	GRSPAV	87	539-12	9.5	ToLCGV
21	328-7	10.4	GRSPAV	55	329-9	9.9	GRSPAV	88	359-21	9.5	GRSPAV
22	474-8	10.4	RSPaV	56	359-7	9.8	GRSPAV	89	517-3	9.5	RSPaV
23	328-2	10.4	GRSPAV	57	358-33	9.8	GRSPAV	90	481-25	9.5	RSPaV
24	481-7	10.4	RSPaV	58	359-31	9.8	GRSPAV	91	329-2	9.5	GRSPAV
25	329-7	10.4	GRSPAV	59	474-9	9.8	RSPaV	92	539-3	9.5	ToLCGV
26	328-4	10.4	GRSPAV	60	541-11	9.8	ToLCGV	93	524-36	9.5	CIYMV
27	474-7	10.4	RSPaV	61	475-8	9.8	RSPaV	94	359-17	9.5	GRSPAV
28	363-8	10.3	GRSPAV	62	518-138	9.8	RSPaV	95	539-5	9.5	ToLCGV
29	539-2	10.3	ToLCGV	63	539-25	9.7	ToLCGV	96	329-6	9.5	GRSPAV
30	539-24	10.3	ToLCGV	64	359-10	9.7	ToLCGV	97	481-26	9.4	RSPaV
31	539-46	10.3	ToLCGV	65	358-29	9.7	GRSPAV	98	363-10	9.4	GRSPAV
32	358-20	10.2	GRSPAV	66	524-12	9.7	CIYMV	99	539-55	9.4	ToLCGV
33	358-32	10.2	GRSPAV	67	474-2	9.6	RSPaV	100	363-13	9.4	GRSPAV
34	358-7	10.2	GRSPAV								

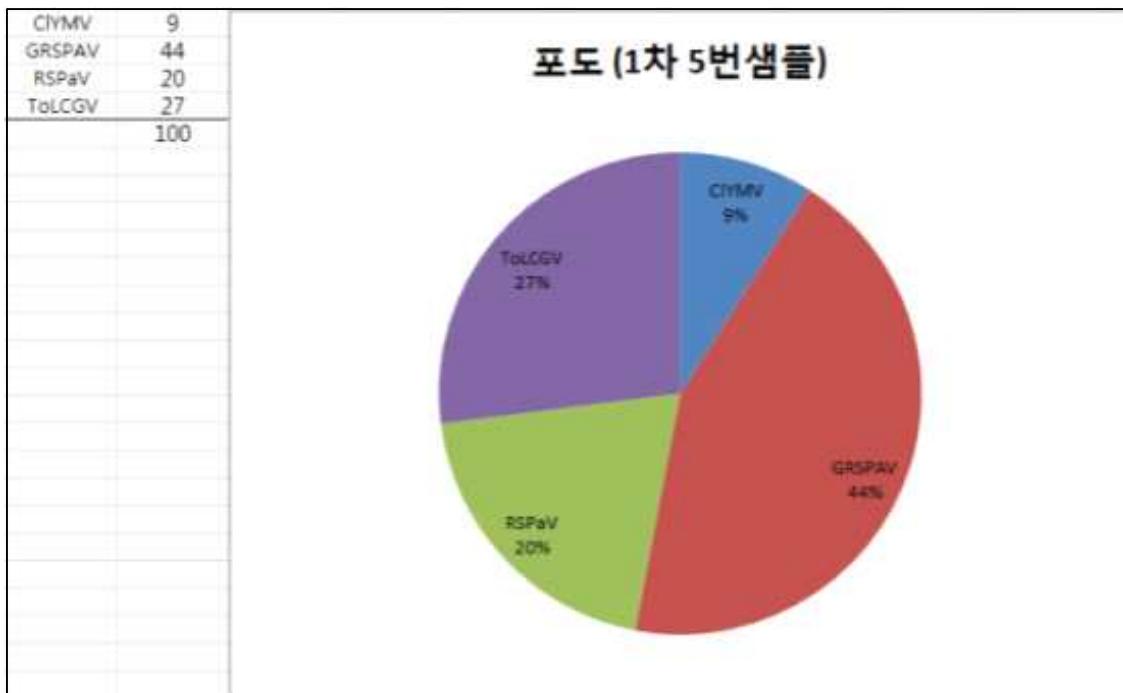


그림 10. 과수 바이러스 진단용 칩을 활용하여 포장에서 수집된 포도의 진단 결과

no.	Probe	Value	Target	no.	Probe	Value	Target	no.	Probe	Value	Target
1	359-34	12.60	GRSPAV	35	358-9	9.84	GRSPAV	68	328-3	9.26	GRSPAV
2	358-35	12.40	GRSPAV	36	358-7	9.83	GRSPAV	69	359-10	9.26	GRSPAV
3	358-23	12.31	GRSPAV	37	474-2	9.83	RSPaV	70	519-4	9.23	RSPaV
4	359-23	12.08	GRSPAV	38	329-3	9.83	GRSPAV	71	358-19	9.23	GRSPAV
5	329-8	11.37	GRSPAV	39	359-8	9.80	GRSPAV	72	481-15	9.22	RSPaV
6	481-18	11.34	RSPaV	40	363-5	9.80	GRSPAV	73	475-9	9.19	RSPaV
7	328-8	11.11	GRSPAV	41	359-31	9.76	GRSPAV	74	358-30	9.17	GRSPAV
8	358-20	10.90	GRSPAV	42	359-29	9.73	GRSPAV	75	359-17	9.17	GRSPAV
9	363-14	10.83	GRSPAV	43	475-8	9.71	RSPaV	76	481-27	9.16	RSPaV
10	329-4	10.64	GRSPAV	44	363-8	9.70	GRSPAV	77	512-65	9.16	RSPaV
11	328-4	10.59	GRSPAV	45	516-16	9.63	RSPaV	78	539-58	9.15	ToLCGV
12	359-12	10.40	GRSPAV	46	474-10	9.60	RSPaV	79	475-3	9.13	RSPaV
13	329-2	10.37	GRSPAV	47	481-7	9.60	RSPaV	80	359-28	9.10	GRSPAV
14	359-20	10.32	GRSPAV	48	521-74	9.60	RSPaV	81	521-4	9.09	RSPaV
15	328-6	10.30	GRSPAV	49	475-10	9.60	RSPaV	82	358-11	9.08	GRSPAV
16	363-9	10.28	GRSPAV	50	363-2	9.59	GRSPAV	83	518-138	9.07	RSPaV
17	358-12	10.27	GRSPAV	51	358-8	9.59	GRSPAV	84	365-6	9.06	GRSPAV
18	474-7	10.23	RSPaV	52	358-33	9.57	GRSPAV	85	329-11	9.05	GRSPAV
19	475-7	10.10	RSPaV	53	474-8	9.57	RSPaV	86	475-2	9.02	RSPaV
20	329-7	10.04	GRSPAV	54	519-30	9.55	RSPaV	87	474-5	9.01	RSPaV
21	481-28	10.04	RSPaV	55	360-89	9.54	GRSPAV	88	474-4	9.00	RSPaV
22	359-11	10.03	GRSPAV	56	358-29	9.54	GRSPAV	89	364-5	8.99	GRSPAV
23	474-6	10.01	RSPaV	57	518-74	9.51	RSPaV	90	521-3	8.99	RSPaV
24	481-8	10.00	RSPaV	58	475-6	9.50	RSPaV	91	474-3	8.97	RSPaV
25	328-7	9.98	GRSPAV	59	532-3	9.49	RSPaV-1	92	519-55	8.97	RSPaV
26	365-3	9.97	GRSPAV	60	517-8	9.41	RSPaV	93	519-54	8.95	RSPaV
27	481-25	9.97	RSPaV	61	360-46	9.41	GRSPAV	94	360-88	8.95	GRSPAV
28	328-9	9.95	GRSPAV	62	360-3	9.37	GRSPAV	95	519-3	8.90	RSPaV
29	328-11	9.94	GRSPAV	63	359-7	9.32	GRSPAV	96	515-65	8.90	RSPaV
30	329-9	9.90	GRSPAV	64	329-6	9.32	GRSPAV	97	539-36	8.88	ToLCGV
31	328-2	9.89	GRSPAV	65	517-3	9.31	RSPaV	98	516-10	8.87	RSPaV
32	358-32	9.88	GRSPAV	66	517-13	9.31	RSPaV	99	358-21	8.86	GRSPAV
33	481-9	9.87	RSPaV	67	364-9	9.28	GRSPAV	100	512-194	8.86	RSPaV
34	474-9	9.84	RSPaV								

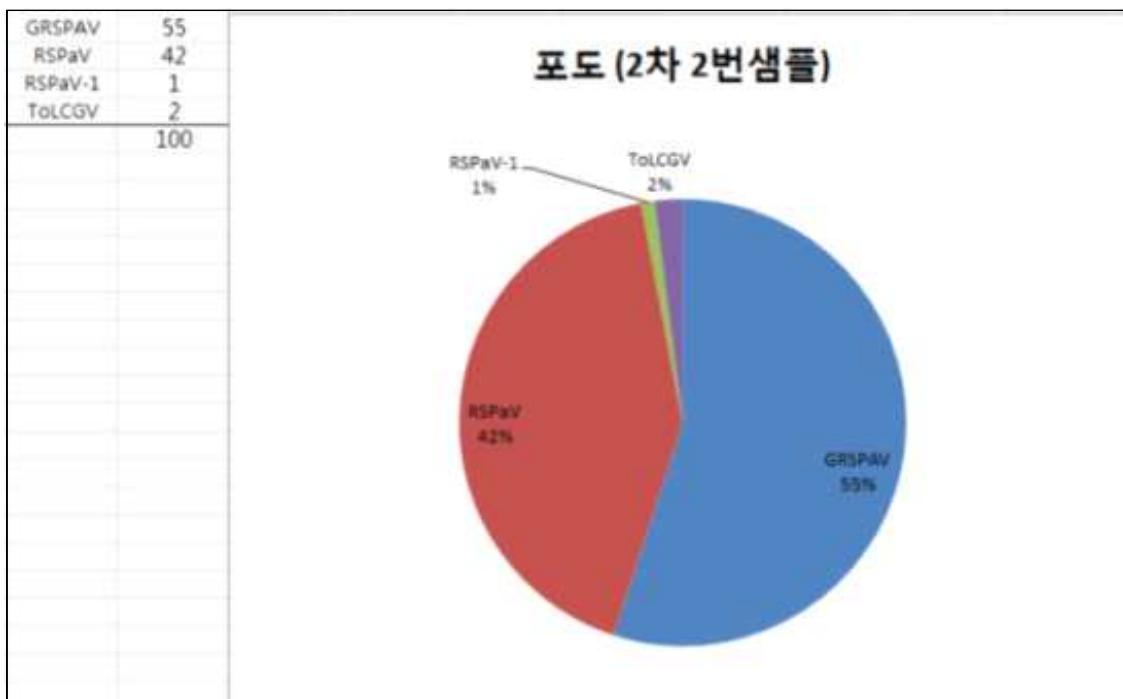


그림 11. 과수 바이러스 진단용 칩을 활용하여 포장에서 수집된 포도의 진단 결과

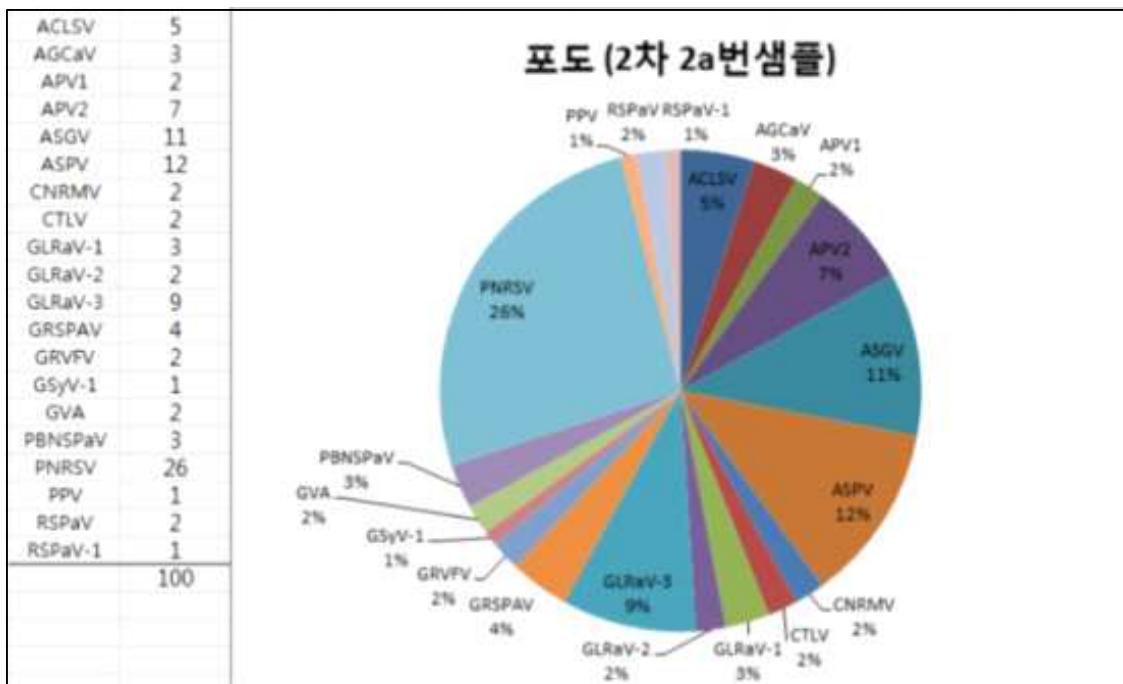


그림 12. 과수 바이러스 진단용 칩을 활용하여 포장에서 수집된 포도의 진단 결과

no.	Probe	Value	Target	no.	Probe	Value	Target	no.	Probe	Value	Target
1	411-65	15.78	GLRaV-3	35	411-46	15.05	GLRaV-3	68	410-107	14.36	GLRaV-3
2	411-40	15.75	GLRaV-3	36	410-172	15.00	GLRaV-3	69	410-118	14.36	GLRaV-3
3	411-16	15.56	GLRaV-3	37	410-49	14.99	GLRaV-3	70	415-62	14.35	GLRaV-3
4	410-175	15.53	GLRaV-3	38	411-41	14.99	GLRaV-3	71	411-20	14.31	GLRaV-3
5	411-43	15.46	GLRaV-3	39	410-115	14.99	GLRaV-3	72	410-52	14.22	GLRaV-3
6	411-18	15.45	GLRaV-3	40	410-121	14.98	GLRaV-3	73	411-66	14.21	GLRaV-3
7	411-71	15.44	GLRaV-3	41	411-61	14.98	GLRaV-3	74	410-185	14.20	GLRaV-3
8	411-44	15.42	GLRaV-3	42	410-55	14.96	GLRaV-3	75	411-17	14.19	GLRaV-3
9	410-111	15.39	GLRaV-3	43	410-179	14.93	GLRaV-3	76	411-75	14.17	GLRaV-3
10	411-63	15.30	GLRaV-3	44	411-34	14.89	GLRaV-3	77	410-62	14.11	GLRaV-3
11	410-181	15.36	GLRaV-3	45	410-169	14.88	GLRaV-3	78	411-23	14.08	GLRaV-3
12	411-38	15.29	GLRaV-3	46	410-57	14.86	GLRaV-3	79	411-72	14.07	GLRaV-3
13	410-173	15.28	GLRaV-3	47	411-48	14.86	GLRaV-3	80	410-186	14.07	GLRaV-3
14	410-178	15.27	GLRaV-3	48	411-35	14.85	GLRaV-3	81	410-124	14.01	GLRaV-3
15	411-21	15.26	GLRaV-3	49	411-47	14.84	GLRaV-3	82	411-37	13.96	GLRaV-3
16	411-22	15.25	GLRaV-3	50	410-117	14.81	GLRaV-3	83	410-183	13.88	GLRaV-3
17	410-114	15.24	GLRaV-3	51	410-51	14.79	GLRaV-3	84	410-110	13.75	GLRaV-3
18	410-56	15.24	GLRaV-3	52	410-170	14.75	GLRaV-3	85	415-41	13.59	GLRaV-3
19	411-13	15.22	GLRaV-3	53	410-180	14.74	GLRaV-3	86	411-9	13.57	GLRaV-3
20	411-67	15.21	GLRaV-3	54	411-68	14.73	GLRaV-3	87	411-24	13.54	GLRaV-3
21	410-53	15.14	GLRaV-3	55	410-182	14.65	GLRaV-3	88	410-61	13.52	GLRaV-3
22	410-45	15.13	GLRaV-3	56	410-47	14.63	GLRaV-3	89	411-36	13.51	GLRaV-3
23	410-119	15.13	GLRaV-3	57	410-120	14.55	GLRaV-3	90	359-34	13.33	GRSPAV
24	411-62	15.10	GLRaV-3	58	411-60	14.54	GLRaV-3	91	358-23	13.23	GRSPAV
25	410-113	15.10	GLRaV-3	59	410-184	14.50	GLRaV-3	92	410-59	13.23	GLRaV-3
26	411-10	15.10	GLRaV-3	60	410-122	14.48	GLRaV-3	93	410-109	13.17	GLRaV-3
27	410-116	15.10	GLRaV-3	61	411-12	14.48	GLRaV-3	94	358-35	13.12	GRSPAV
28	411-69	15.09	GLRaV-3	62	411-45	14.48	GLRaV-3	95	410-54	13.11	GLRaV-3
29	410-48	15.09	GLRaV-3	63	410-58	14.46	GLRaV-3	96	449-2	13.07	GVE
30	410-108	15.09	GLRaV-3	64	411-49	14.43	GLRaV-3	97	417-7	13.04	GLRaV-3
31	411-42	15.08	GLRaV-3	65	410-176	14.42	GLRaV-3	98	359-23	12.95	GRSPAV
32	411-59	15.07	GLRaV-3	66	410-171	14.39	GLRaV-3	99	411-50	12.95	GLRaV-3
33	410-177	15.07	GLRaV-3	67	411-19	14.37	GLRaV-3	100	410-44	12.86	GLRaV-3
34	411-70	15.06	GLRaV-3								

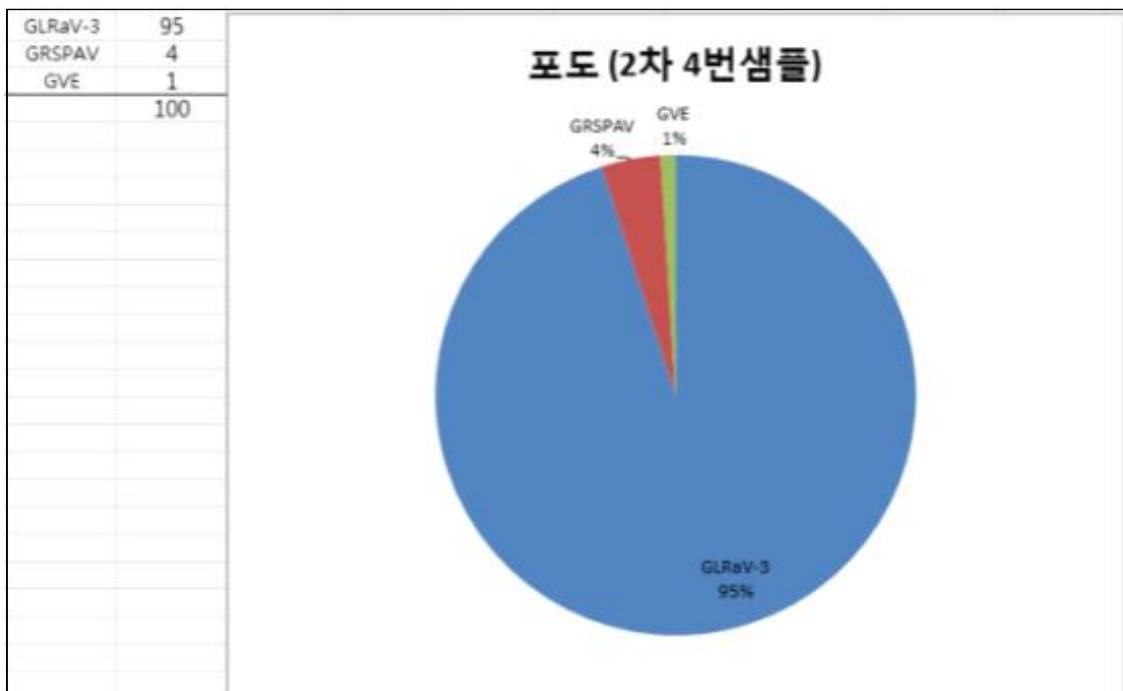


그림 13. 과수 바이러스 진단용 칩을 활용하여 포장에서 수집된 포도의 진단 결과

no.	Probe	Value	Target	no.	Probe	Value	Target	no.	Probe	Value	Target
1	40-24	11.1	ASGV	35	160-7	8.5	ASPV	68	241-102	7.6	ACLSV
2	119-4	10.6	ASPV	36	212-8	8.4	ASPV	69	579-4	7.6	ACLSV
3	119-10	10.2	ASPV	37	264-18	8.4	ACLSV	70	55-13	7.6	ASGV
4	117-8	10.1	ASPV	38	117-2	8.4	ASPV	71	160-4	7.5	ASPV
5	55-9	9.8	ASGV	39	162-14	8.4	ASPV	72	117-1	7.5	ASPV
6	40-16	9.8	ASGV	40	119-7	8.3	ASPV	73	40-6	7.5	ASGV
7	117-4	9.7	ASPV	41	162-5	8.2	ASPV	74	289-9	7.5	ASGV
8	230-7	9.6	ASPV	42	52-17	8.2	ASGV	75	613-251	7.5	ACLSV
9	40-23	9.5	ASGV	43	155-20	8.2	ASPV	76	562-4	7.5	ACLSV
10	155-21	9.4	ASPV	44	87-6	8.2	ASPV	77	264-5	7.5	ACLSV
11	160-11	9.2	ASPV	45	40-15	8.2	ASGV	78	35-22	7.5	ASGV
12	55-8	9.2	ASGV	46	241-99	8.1	ACLSV	79	264-8	7.4	ACLSV
13	55-24	9.2	ASGV	47	55-21	8.1	ASGV	80	87-9	7.4	ASPV
14	40-8	9.1	ASGV	48	230-8	8.1	ASPV	81	87-14	7.4	ASPV
15	613-126	9.1	ACLSV	49	257-100	8.1	ACLSV	82	264-15	7.4	ACLSV
16	230-4	9.0	ASPV	50	578-8	8.0	ACLSV	83	87-11	7.4	ASPV
17	117-11	9.0	ASPV	51	264-17	8.0	ACLSV	84	256-102	7.4	ACLSV
18	117-9	9.0	ASPV	52	35-3	8.0	ASGV	85	160-3	7.4	ASPV
19	257-99	9.0	ACLSV	53	613-121	8.0	ACLSV	86	257-49	7.4	ACLSV
20	119-8	8.9	ASPV	54	212-3	8.0	ASPV	87	40-12	7.3	ASGV
21	87-3	8.8	ASPV	55	155-6	8.0	ASPV	88	155-19	7.3	ASPV
22	190-1	8.8	ASPV	56	55-5	8.0	ASGV	89	230-5	7.3	ASPV
23	119-5	8.8	ASPV	57	563-4	7.9	ACLSV	90	212-6	7.3	ASPV
24	117-5	8.8	ASPV	58	155-18	7.9	ASPV	91	230-11	7.3	ASPV
25	87-5	8.8	ASPV	59	77-4	7.9	ASPV	92	212-2	7.3	ASPV
26	56-27	8.8	ACLSV	60	231-9	7.9	ASPV	93	257-102	7.3	ACLSV
27	160-8	8.7	ASPV	61	40-5	7.8	ASGV	94	231-7	7.3	ASPV
28	55-17	8.7	ASGV	62	257-47	7.8	ACLSV	95	40-20	7.2	ASGV
29	212-12	8.7	ASPV	63	257-48	7.7	ACLSV	96	231-4	7.2	ASPV
30	52-9	8.7	ASGV	64	256-99	7.7	ACLSV	97	298-8	7.2	ASGV
31	231-6	8.6	ASPV	65	289-14	7.7	ASGV	98	234-6	7.2	ACLSV
32	155-7	8.5	ASPV	66	298-4	7.7	ASGV	99	212-7	7.2	ASPV
33	155-5	8.5	ASPV	67	257-45	7.7	ACLSV	100	46-20	7.2	ASPV
34	87-17	8.5	ASPV								

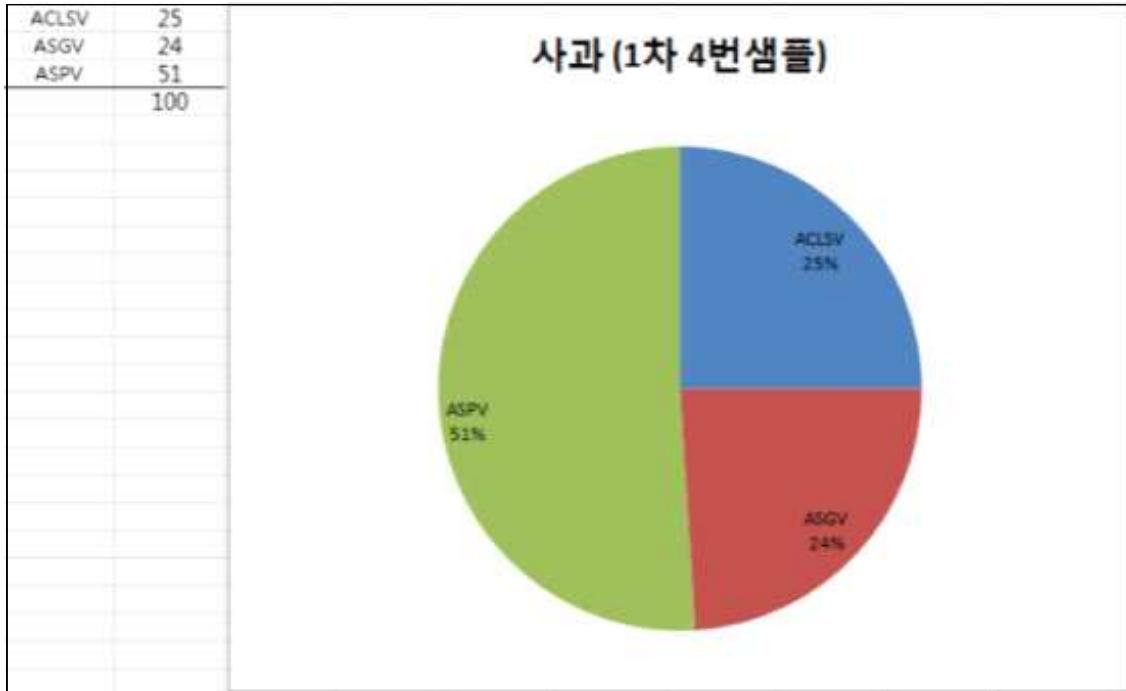


그림 14. 과수 바이러스 진단용 칩을 활용하여 포장에서 수집된 사과의 진단 결과

no.	Probe	Value	Target	no.	Probe	Value	Target	no.	Probe	Value	Target
1	119-4	11.89	ASPV	35	219-7	8.45	ASPV	68	19-30	7.69	ASPV
2	119-10	11.77	ASPV	36	212-7	8.44	ASPV	69	87-11	7.63	ASPV
3	117-4	11.73	ASPV	37	162-5	8.42	ASPV	70	221-63	7.56	ASPV
4	119-8	11.40	ASPV	38	77-9	8.40	ASPV	71	175-4	7.56	ASPV
5	117-11	11.21	ASPV	39	155-18	8.38	ASPV	72	89-13	7.55	ASPV
6	117-8	11.08	ASPV	40	190-5	8.38	ASPV	73	229-4	7.55	ASPV
7	119-5	10.74	ASPV	41	77-3	8.37	ASPV	74	56-18	7.53	ASPV
8	230-4	10.23	ASPV	42	87-14	8.34	ASPV	75	111-2	7.50	ASPV
9	119-7	10.22	ASPV	43	12-14	8.33	AGCaV	76	46-28	7.48	ASPV
10	230-7	9.96	ASPV	44	154-17	8.31	ASPV	77	231-3	7.48	ASPV
11	56-27	9.96	ASPV	45	45-1	8.29	ASPV	78	105-2	7.45	ASPV
12	155-21	9.83	ASPV	46	102-12	8.26	ASPV	79	19-9	7.44	ASPV
13	87-5	9.82	ASPV	47	77-11	8.24	ASPV	80	19-5	7.44	ASPV
14	212-12	9.79	ASPV	48	117-1	8.23	ASPV	81	77-10	7.41	ASPV
15	46-20	9.67	ASPV	49	219-13	8.19	ASPV	82	94-18	7.40	ASPV
16	87-17	9.61	ASPV	50	89-25	8.14	ASPV	83	94-34	7.39	ASPV
17	87-3	9.58	ASPV	51	231-7	8.11	ASPV	84	190-4	7.37	ASPV
18	190-1	9.48	ASPV	52	175-2	8.09	ASPV	85	105-7	7.36	ASPV
19	231-6	9.44	ASPV	53	219-2	8.07	ASPV	86	94-33	7.36	ASPV
20	155-5	9.30	ASPV	54	227-11	8.05	ASPV	87	175-18	7.29	ASPV
21	117-9	9.26	ASPV	55	212-10	8.03	ASPV	88	46-9	7.29	ASPV
22	117-5	9.16	ASPV	56	155-20	7.96	ASPV	89	221-45	7.26	ASPV
23	87-6	9.09	ASPV	57	155-7	7.96	ASPV	90	230-8	7.24	ASPV
24	117-2	9.08	ASPV	58	12-27	7.96	AGCaV	91	307-8	7.23	AGCaV
25	212-8	8.97	ASPV	59	89-38	7.92	ASPV	92	155-14	7.21	ASPV
26	51-14	8.92	ASPV	60	12-17	7.91	AGCaV	93	46-10	7.21	ASPV
27	212-3	8.91	ASPV	61	177-7	7.85	ASPV	94	102-3	7.19	ASPV
28	51-28	8.75	ASPV	62	45-10	7.76	ASPV	95	119-1	7.17	ASPV
29	51-3	8.70	ASPV	63	12-3	7.74	AGCaV	96	77-4	7.17	ASPV
30	162-14	8.59	ASPV	64	23-10	7.73	ASPV	97	12-9	7.15	AGCaV
31	51-27	8.53	ASPV	65	154-50	7.72	ASPV	98	154-34	7.14	ASPV
32	463-7	8.51	G5yV-1	66	219-11	7.71	ASPV	99	230-3	7.14	ASPV
33	77-7	8.50	ASPV	67	230-11	7.70	ASPV	100	111-6	7.13	ASPV
34	87-9	8.47	ASPV								

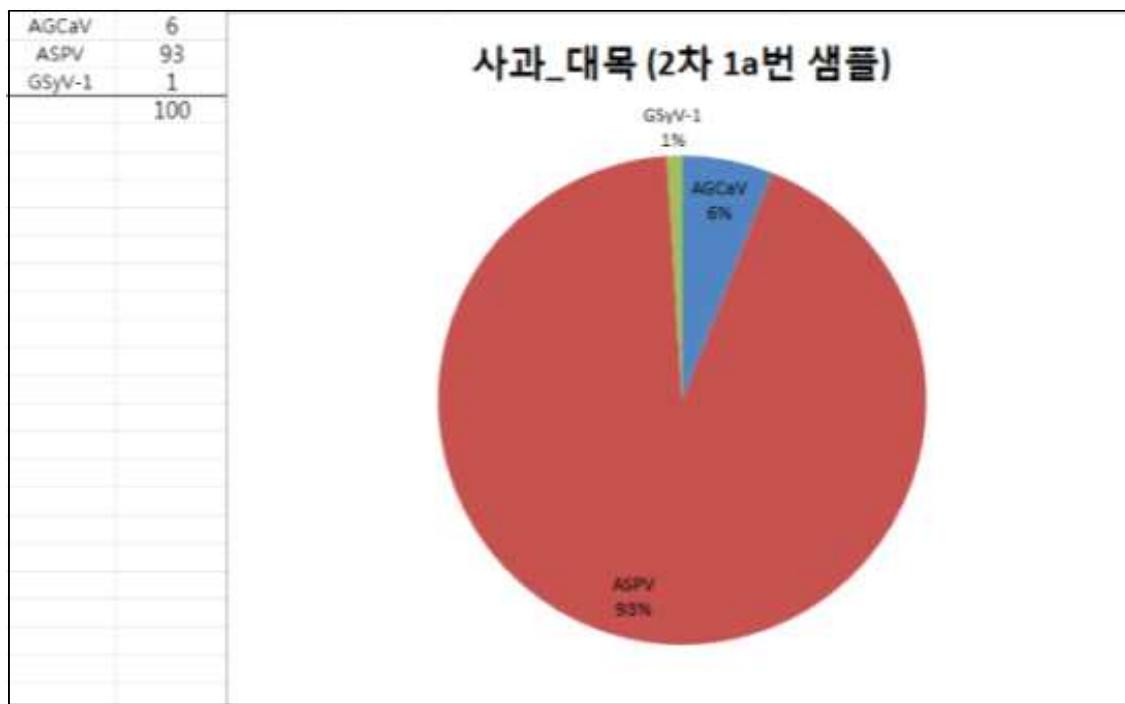


그림 15. 과수 바이러스 진단용 칩을 활용하여 포장에서 수집된 사과 대목의 진단 결과

no.	Probe	Value	Target	no.	Probe	Value	Target	no.	Probe	Value	Target
1	613-246	14.72	ACLSV	35	681-1	13.83	ACLSV	68	566-2	13.40	ACLSV
2	681-11	14.56	ACLSV	36	769-19	13.81	APV2	69	769-4	13.39	APV2
3	579-2	14.55	ACLSV	37	681-7	13.77	ACLSV	70	613-243	13.38	ACLSV
4	613-121	14.52	ACLSV	38	613-122	13.76	ACLSV	71	562-1	13.37	ACLSV
5	562-2	14.47	ACLSV	39	578-2	13.74	ACLSV	72	682-5	13.37	ACLSV
6	681-4	14.47	ACLSV	40	783-10	13.71	APV2	73	783-33	13.36	APV2
7	562-8	14.47	ACLSV	41	575-2	13.69	ACLSV	74	578-9	13.34	ACLSV
8	579-8	14.43	ACLSV	42	783-24	13.68	APV2	75	566-13	13.34	ACLSV
9	578-11	14.39	ACLSV	43	680-1	13.68	ACLSV	76	770-9	13.31	APV2
10	563-8	14.37	ACLSV	44	769-12	13.64	APV2	77	264-26	13.30	ACLSV
11	613-126	14.37	ACLSV	45	768-4	13.63	APV2	78	769-11	13.30	APV2
12	680-9	14.36	ACLSV	46	613-245	13.62	ACLSV	79	783-21	13.29	APV2
13	564-7	14.29	ACLSV	47	681-8	13.62	ACLSV	80	681-6	13.29	ACLSV
14	578-4	14.28	ACLSV	48	753-33	13.61	APV1	81	769-5	13.23	APV2
15	613-249	14.27	ACLSV	49	681-9	13.59	ACLSV	82	579-4	13.22	ACLSV
16	613-120	14.25	ACLSV	50	680-6	13.59	ACLSV	83	562-4	13.21	ACLSV
17	264-17	14.24	ACLSV	51	577-8	13.58	ACLSV	84	682-7	13.20	ACLSV
18	575-5	14.23	ACLSV	52	783-22	13.57	APV2	85	579-1	13.20	ACLSV
19	564-4	14.21	ACLSV	53	769-13	13.57	APV2	86	770-6	13.20	APV2
20	783-12	14.18	APV2	54	578-1	13.54	ACLSV	87	783-34	13.19	APV2
21	257-47	14.15	ACLSV	55	577-5	13.52	ACLSV	88	783-9	13.19	APV2
22	613-248	14.12	ACLSV	56	562-5	13.52	ACLSV	89	586-11	13.16	ACLSV
23	769-20	14.12	APV2	57	769-18	13.51	APV2	90	613-119	13.15	ACLSV
24	563-5	14.10	ACLSV	58	578-6	13.50	ACLSV	91	768-6	13.14	APV2
25	682-6	14.08	ACLSV	59	770-4	13.50	APV2	92	613-116	13.12	ACLSV
26	681-2	14.06	ACLSV	60	579-5	13.49	ACLSV	93	566-10	13.09	ACLSV
27	578-8	13.99	ACLSV	61	682-3	13.46	ACLSV	94	769-16	13.06	APV2
28	769-7	13.99	APV2	62	753-11	13.46	APV1	95	682-4	13.04	ACLSV
29	783-35	13.97	APV2	63	682-2	13.46	ACLSV	96	681-5	13.00	ACLSV
30	566-5	13.93	ACLSV	64	613-244	13.45	ACLSV	97	769-17	12.99	APV2
31	783-11	13.89	APV2	65	563-4	13.44	ACLSV	98	753-30	12.97	APV1
32	783-23	13.86	APV2	66	769-6	13.44	APV2	99	577-4	12.96	ACLSV
33	575-13	13.84	ACLSV	67	578-7	13.43	ACLSV	100	585-14	12.96	ACLSV
34	563-2	13.84	ACLSV								

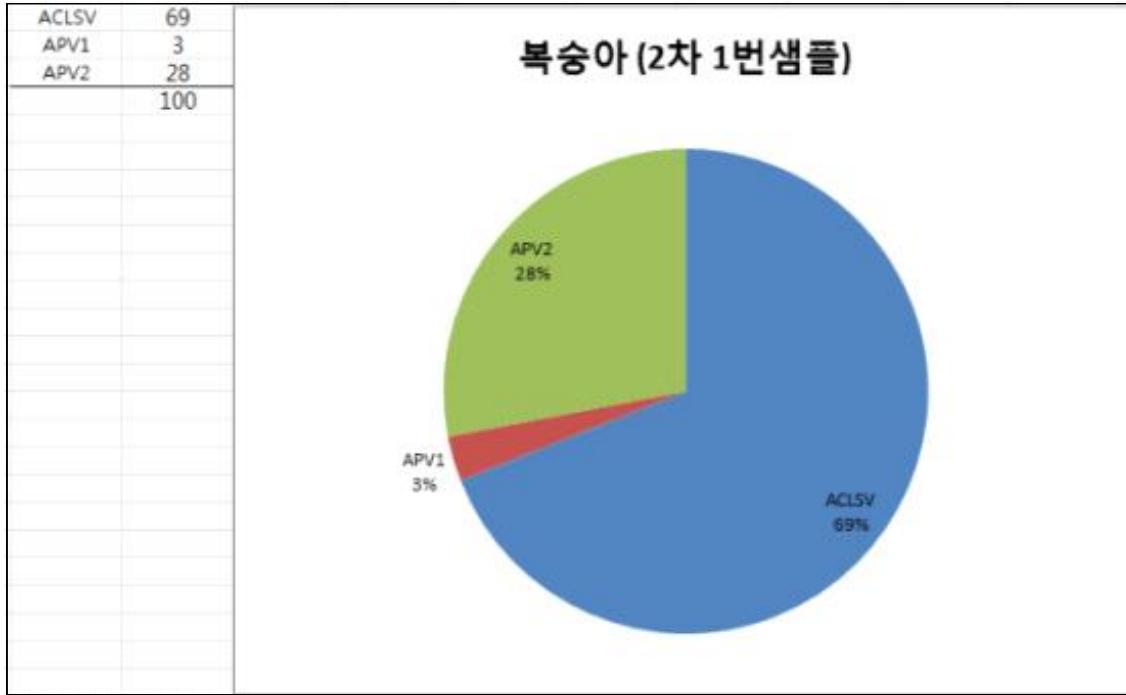


그림 16. 과수 바이러스 진단용 칩을 활용하여 포장에서 수집된 복승아의 진단 결과

no.	Probe	Value	Target	no.	Probe	Value	Target	no.	Probe	Value	Target
1	579-2	10.83	ACLSV	35	578-8	9.54	ACLSV	68	803-3	8.71	MRPV
2	562-2	10.78	ACLSV	36	680-1	9.50	ACLSV	69	613-37	8.67	ACLSV
3	613-249	10.44	ACLSV	37	578-1	9.48	ACLSV	70	578-3	8.66	ACLSV
4	562-8	10.38	ACLSV	38	562-10	9.41	ACLSV	71	613-119	8.65	ACLSV
5	613-125	10.31	ACLSV	39	613-243	9.39	ACLSV	72	623-15	8.64	ACLSV
6	562-4	10.30	ACLSV	40	682-6	9.36	ACLSV	73	681-9	8.64	ACLSV
7	613-251	10.30	ACLSV	41	577-6	9.25	ACLSV	74	681-6	8.63	ACLSV
8	613-126	10.29	ACLSV	42	613-122	9.25	ACLSV	75	579-10	8.62	ACLSV
9	579-4	10.27	ACLSV	43	681-1	9.24	ACLSV	76	578-9	8.61	ACLSV
10	563-8	10.27	ACLSV	44	682-5	9.18	ACLSV	77	803-8	8.58	MRPV
11	578-11	10.27	ACLSV	45	241-102	9.17	ACLSV	78	613-116	8.56	ACLSV
12	579-8	10.26	ACLSV	46	586-7	9.14	ACLSV	79	577-5	8.54	ACLSV
13	681-4	10.26	ACLSV	47	575-3	9.08	ACLSV	80	562-5	8.53	ACLSV
14	613-246	10.25	ACLSV	48	578-7	9.06	ACLSV	81	579-5	8.51	ACLSV
15	564-7	10.23	ACLSV	49	710-8	9.02	ACLSV	82	682-4	8.51	ACLSV
16	681-11	10.18	ACLSV	50	575-11	8.98	ACLSV	83	624-8	8.51	ACLSV
17	613-121	10.13	ACLSV	51	682-2	8.96	ACLSV	84	788-3	8.50	CSDaV
18	578-4	9.99	ACLSV	52	256-102	8.94	ACLSV	85	257-102	8.47	ACLSV
19	680-9	9.94	ACLSV	53	681-7	8.89	ACLSV	86	788-14	8.44	CSDaV
20	613-247	9.92	ACLSV	54	575-2	8.89	ACLSV	87	588-12	8.44	ACLSV
21	613-248	9.92	ACLSV	55	624-4	8.88	ACLSV	88	681-2	8.42	ACLSV
22	575-5	9.91	ACLSV	56	263-1	8.87	ACLSV	89	623-5	8.42	ACLSV
23	563-10	9.91	ACLSV	57	586-13	8.86	ACLSV	90	613-6	8.41	ACLSV
24	563-2	9.86	ACLSV	58	613-244	8.85	ACLSV	91	693-2	8.40	ACLSV
25	563-4	9.79	ACLSV	59	562-1	8.84	ACLSV	92	681-5	8.38	ACLSV
26	564-4	9.75	ACLSV	60	682-8	8.84	ACLSV	93	682-7	8.37	ACLSV
27	613-120	9.71	ACLSV	61	803-9	8.80	MRPV	94	575-8	8.36	ACLSV
28	681-8	9.70	ACLSV	62	577-4	8.79	ACLSV	95	788-9	8.35	CSDaV
29	575-13	9.67	ACLSV	63	587-15	8.74	ACLSV	96	257-42	8.35	ACLSV
30	566-5	9.67	ACLSV	64	578-10	8.73	ACLSV	97	587-9	8.35	ACLSV
31	564-9	9.65	ACLSV	65	579-1	8.72	ACLSV	98	566-2	8.35	ACLSV
32	563-5	9.62	ACLSV	66	651-12	8.71	ACLSV	99	691-42	8.34	ACLSV
33	613-245	9.61	ACLSV	67	586-14	8.71	ACLSV	100	682-3	8.28	ACLSV
34	577-8	9.57	ACLSV								

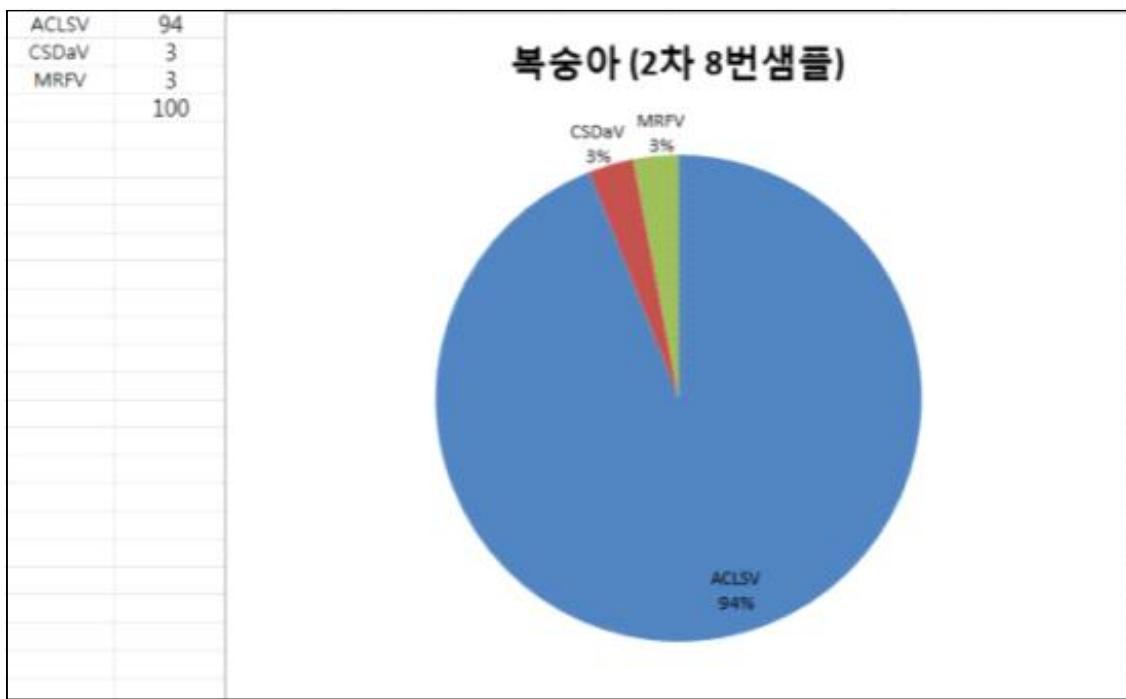


그림 17. 과수 바이러스 진단용 칩을 활용하여 포장에서 수집된 복승아의 진단 결과

no.	Probe	Value	Target	no.	Probe	Value	Target	no.	Probe	Value	Target
1	753-11	13.9	APV1	35	564-7	12.1	ACLSV	68	768-2	11.3	APV2
2	753-33	13.9	APV1	36	753-7	12.1	APV1	69	563-2	11.3	ACLSV
3	753-23	13.9	APV1	37	783-15	12.0	APV2	70	783-17	11.3	APV2
4	783-12	13.7	APV2	38	769-16	12.0	APV2	71	754-12	11.2	APV1
5	769-13	13.6	APV2	39	562-8	12.0	ACLSV	72	681-4	11.2	ACLSV
6	769-20	13.6	APV2	40	754-8	11.9	APV1	73	783-26	11.2	APV2
7	769-7	13.5	APV2	41	579-8	11.9	ACLSV	74	563-10	11.2	ACLSV
8	783-23	13.4	APV2	42	562-2	11.9	ACLSV	75	681-11	11.2	ACLSV
9	768-4	13.4	APV2	43	783-28	11.8	APV2	76	785-9	11.2	APV2
10	783-35	13.4	APV2	44	754-13	11.8	APV1	77	682-6	11.2	ACLSV
11	753-22	13.4	APV1	45	754-1	11.8	APV1	78	563-5	11.2	ACLSV
12	769-10	13.1	APV2	46	754-14	11.7	APV1	79	769-19	11.1	APV2
13	769-6	13.1	APV2	47	753-16	11.7	APV1	80	783-5	11.1	APV2
14	783-8	13.0	APV2	48	578-8	11.6	ACLSV	81	769-14	11.1	APV2
15	783-24	13.0	APV2	49	563-8	11.6	ACLSV	82	783-36	11.1	APV2
16	770-4	13.0	APV2	50	746-67	11.6	APV1	83	613-246	11.1	ACLSV
17	753-30	12.8	APV1	51	785-16	11.6	APV2	84	783-21	11.1	APV2
18	783-32	12.8	APV2	52	753-34	11.6	APV1	85	754-6	11.1	APV1
19	768-8	12.8	APV2	53	755-4	11.5	APV1	86	579-4	11.0	ACLSV
20	770-5	12.8	APV2	54	783-4	11.5	APV2	87	747-26	11.0	APV1
21	769-3	12.7	APV2	55	753-4	11.5	APV1	88	562-4	11.0	ACLSV
22	770-8	12.6	APV2	56	564-4	11.5	ACLSV	89	747-67	11.0	APV1
23	768-5	12.6	APV2	57	564-9	11.5	ACLSV	90	755-9	11.0	APV1
24	753-8	12.6	APV1	58	754-4	11.5	APV1	91	783-13	11.0	APV2
25	770-1	12.5	APV2	59	613-126	11.5	ACLSV	92	785-7	11.0	APV2
26	753-20	12.5	APV1	60	770-2	11.5	APV2	93	755-2	10.9	APV1
27	753-19	12.5	APV1	61	783-11	11.4	APV2	94	768-6	10.9	APV2
28	783-9	12.4	APV2	62	783-27	11.4	APV2	95	754-3	10.9	APV1
29	579-2	12.3	ACLSV	63	783-1	11.4	APV2	96	562-10	10.9	ACLSV
30	769-17	12.3	APV2	64	578-4	11.4	ACLSV	97	783-3	10.9	APV2
31	783-20	12.3	APV2	65	755-8	11.4	APV1	98	600-9	10.9	ACLSV
32	613-249	12.2	ACLSV	66	613-121	11.3	ACLSV	99	783-16	10.9	APV2
33	768-1	12.2	APV2	67	613-251	11.3	ACLSV	100	753-2	10.9	APV1
34	754-5	12.2	APV1								



체리 (1차 7번샘플)

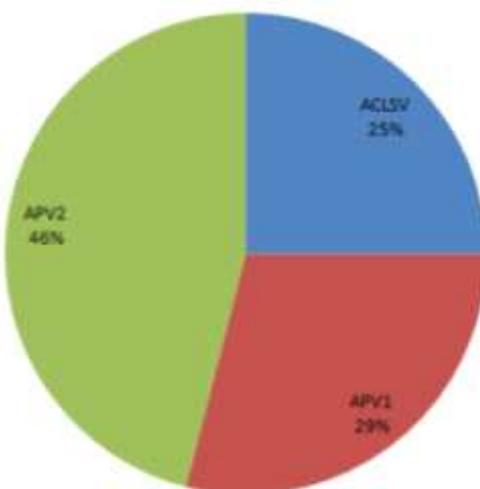


그림 18. 과수 바이러스 진단용 칩을 활용하여 포장에서 수집된 체리의 진단 결과

no.	Probe	Value	Target	no.	Probe	Value	Target	no.	Probe	Value	Target
1	796-3	12.13	GSyV-1	35	799-12	8.27	GSyV-1	68	795-18	7.69	GSyV-1
2	796-9	11.69	GSyV-1	36	797-12	8.18	GSyV-1	69	795-3	7.68	GSyV-1
3	796-15	11.54	GSyV-1	37	800-7	8.14	GSyV-1	70	801-9	7.66	GSyV-1
4	796-13	11.48	GSyV-1	38	796-11	8.14	GSyV-1	71	799-7	7.65	GSyV-1
5	797-20	11.45	GSyV-1	39	800-8	8.10	GSyV-1	72	800-1	7.63	GSyV-1
6	796-10	11.37	GSyV-1	40	801-21	8.09	GSyV-1	73	800-19	7.61	GSyV-1
7	796-8	11.31	GSyV-1	41	798-2	8.05	GSyV-1	74	801-33	7.56	GSyV-1
8	797-7	11.29	GSyV-1	42	799-3	8.02	GSyV-1	75	795-11	7.54	GSyV-1
9	797-13	10.60	GSyV-1	43	801-36	7.99	GSyV-1	76	801-25	7.53	GSyV-1
10	796-14	10.30	GSyV-1	44	800-3	7.98	GSyV-1	77	800-12	7.50	GSyV-1
11	797-21	10.22	GSyV-1	45	801-20	7.92	GSyV-1	78	799-14	7.48	GSyV-1
12	797-2	10.18	GSyV-1	46	795-6	7.91	GSyV-1	79	801-7	7.46	GSyV-1
13	797-3	10.18	GSyV-1	47	801-1	7.91	GSyV-1	80	801-26	7.45	GSyV-1
14	797-9	10.08	GSyV-1	48	795-12	7.90	GSyV-1	81	795-5	7.44	GSyV-1
15	797-10	10.01	GSyV-1	49	799-6	7.90	GSyV-1	82	801-10	7.43	GSyV-1
16	796-1	9.91	GSyV-1	50	801-2	7.89	GSyV-1	83	799-11	7.39	GSyV-1
17	797-14	9.88	GSyV-1	51	798-1	7.88	GSyV-1	84	430-53	7.36	GVA
18	797-8	9.75	GSyV-1	52	801-23	7.88	GSyV-1	85	800-18	7.36	GSyV-1
19	797-16	9.70	GSyV-1	53	799-8	7.87	GSyV-1	86	798-4	7.36	GSyV-1
20	797-15	9.60	GSyV-1	54	799-10	7.86	GSyV-1	87	800-16	7.34	GSyV-1
21	797-5	9.53	GSyV-1	55	800-13	7.84	GSyV-1	88	796-7	7.34	GSyV-1
22	797-17	9.51	GSyV-1	56	795-8	7.82	GSyV-1	89	798-6	7.25	GSyV-1
23	796-2	9.27	GSyV-1	57	374-14	7.81	GLRaV-1	90	799-13	7.23	GSyV-1
24	796-4	9.26	GSyV-1	58	801-13	7.80	GSyV-1	91	379-18	7.21	GLRaV-1
25	797-1	9.24	GSyV-1	59	800-9	7.79	GSyV-1	92	801-11	7.20	GSyV-1
26	801-27	8.80	GSyV-1	60	799-1	7.75	GSyV-1	93	798-13	7.20	GSyV-1
27	801-14	8.57	GSyV-1	61	801-24	7.74	GSyV-1	94	795-13	7.19	GSyV-1
28	795-14	8.45	GSyV-1	62	799-5	7.73	GSyV-1	95	787-280	7.18	CNRMV
29	801-34	8.43	GSyV-1	63	800-20	7.72	GSyV-1	96	799-4	7.18	GSyV-1
30	796-5	8.38	GSyV-1	64	795-7	7.72	GSyV-1	97	800-6	7.17	GSyV-1
31	801-35	8.36	GSyV-1	65	800-10	7.72	GSyV-1	98	374-9	7.14	GLRaV-1
32	798-10	8.32	GSyV-1	66	795-1	7.70	GSyV-1	99	798-18	7.14	GSyV-1
33	798-9	8.31	GSyV-1	67	801-8	7.69	GSyV-1	100	45-1	7.13	ASPV
34	798-17	8.31	GSyV-1								

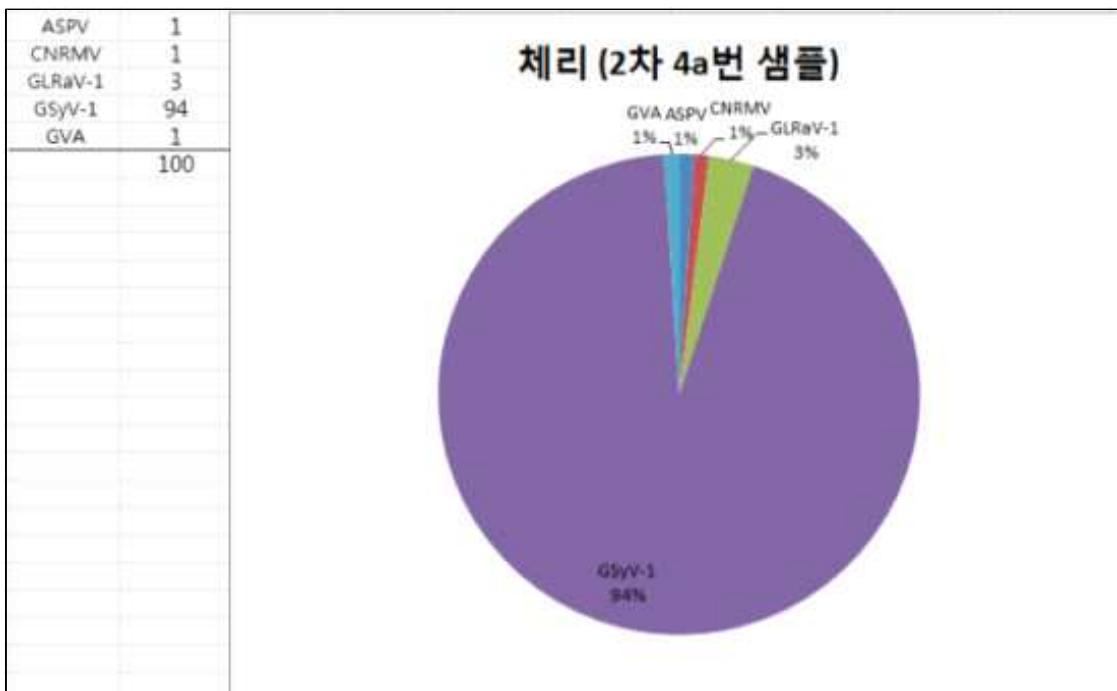


그림 19. 과수 바이러스 진단용 칩을 활용하여 포장에서 수집된 체리의 진단 결과

no.	Probe	Value	Target	no.	Probe	Value	Target	no.	Probe	Value	Target
1	742-44	10.1	APCLSV	35	46-22	5.3	ASPV	68	953-1	4.5	PNRSV
2	plantP2	9.7	-	36	209-8	5.3	ASPV	69	585-16	4.5	ACLSV
3	798-9	9.6	GSyV-1	37	412-49	5.3	GLRaV-3	70	223-1	4.5	ASPV
4	741-16	9.0	APCLSV	38	815-18	5.3	NSPaV	71	278-87	4.4	ASGV
5	798-1	8.6	GSyV-1	39	462-17	5.2	GSyV-1	72	956-35	4.4	PNRSV
6	455-9	8.1	GVF	40	909-1	5.2	PBNNSPaV	73	786-248	4.4	BLRV
7	232-8	7.2	ACLSV	41	801-4	5.2	GSyV-1	74	463-19	4.4	GSyV-1
8	455-6	7.1	GVF	42	102-26	5.2	ASPV	75	300-2	4.4	AGCaV
9	436-70	7.1	GVB	43	124-1	5.1	ASPV	76	plantP7	4.4	-
10	463-7	7.0	GSyV-1	44	370-11	5.1	GLRaV-1	77	788-10	4.4	CSDaV
11	741-69	6.9	APCLSV	45	846-39	5.0	PBNNSPaV	78	207-23	4.4	ASPV
12	124-8	6.8	ASPV	46	372-18	5.0	GLRaV-1	79	436-18	4.4	GVB
13	941-3	6.7	PNRSV	47	789-2	5.0	GAMaV	80	585-9	4.3	ACLSV
14	37-5	6.7	ASGV	48	132-8	5.0	ASPV	81	946-8	4.3	PNRSV
15	633-4	6.5	ACLSV	49	984-126	5.0	PPV	82	737-82	4.3	APCLSV
16	232-5	6.4	ACLSV	50	208-15	4.9	ASPV	83	788-4	4.3	CSDaV
17	37-27	6.1	TMV	51	388-13	4.9	GLRaV-2	84	787-16	4.3	CNRMV
18	747-35	6.1	APV1	52	207-13	4.9	ASPV	85	376-7	4.3	GLRaV-1
19	387-8	6.0	GLRaV-2	53	132-13	4.9	ASPV	86	829-20	4.3	OBDV
20	742-16	5.9	APCLSV	54	923-27	4.9	PNRSV	87	386-22	4.2	GLRaV-2
21	956-67	5.8	PNRSV	55	209-3	4.8	ASPV	88	746-32	4.2	APV1
22	528-20	5.8	GRBaV	56	945-7	4.8	PNRSV	89	388-22	4.2	GLRaV-2
23	921-82	5.7	PNRSV	57	412-28	4.8	GLRaV-3	90	787-74	4.1	CNRMV
24	925-38	5.7	PNRSV	58	387-18	4.8	GLRaV-2	91	400-21	4.1	GLRaV-2
25	498-58	5.7	RSPaV	59	786-32	4.8	BLRV	92	437-7	4.1	GVD
26	633-12	5.7	ACLSV	60	386-13	4.8	GLRaV-2	93	468-2	4.1	GfKV
27	747-32	5.7	APV1	61	221-82	4.7	ASPV	94	817-1	4.1	NSPaV
28	464-9	5.6	GSyV-1	62	246-49	4.7	ACLSV	95	539-63	4.1	ToLCGV
29	921-85	5.5	PNRSV	63	46-12	4.7	ASPV	96	847-88	4.0	PBNNSPaV
30	790-12	5.5	GAMaV	64	530-31	4.7	Gsv	97	829-9	4.0	OBDV
31	847-74	5.5	PBNNSPaV	65	102-15	4.7	ASPV	98	194-5	4.0	ASPV
32	436-44	5.4	GVB	66	956-65	4.7	PNRSV	99	26-44	4.0	ASPV
33	209-13	5.3	ASPV	67	795-3	4.6	GSyV-1	100	837-65	4.0	PBNNSPaV
34	944-38	5.3	PNRSV								

plant	2
ACLSV	7
AGCaV	1
APCLSV	5
APV1	3
ASGV	2
ASPV	18
BLRV	2
CNRMV	2
CSDaV	2
GAMaV	2
GfKV	1
GLRaV-1	3
GLRaV-2	7
GLRaV-3	2
GRBaV	1
Gsv	1
GSyV-1	8
GVB	3
GVD	1
GVF	2
NSPaV	2
OBDV	2
PBNNSPaV	5
PNRSV	12
PPV	1
RSPaV	1
TMV	1
ToLCGV	1
	100

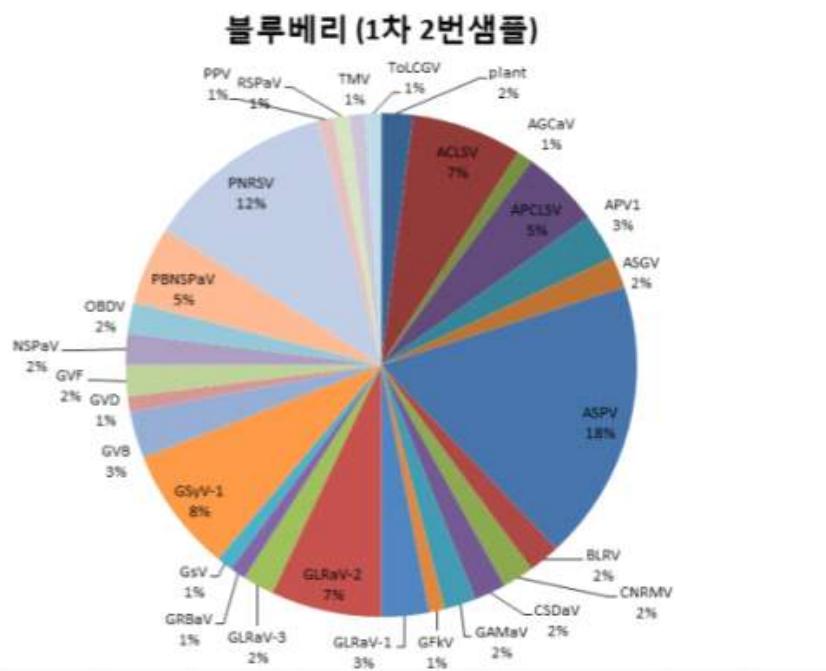


그림 20. 과수 바이러스 진단용 칩을 활용하여 포장에서 수집된 블루베리의 진단 결과

no.	Probe	Value	Target	no.	Probe	Value	Target	no.	Probe	Value	Target
1	484-9	8.84	RSPaV	35	326-4	5.67	CMV	68	352-2	4.43	GRSPaV
2	15-24	8.55	AGCaV	36	836-13	5.63	PBNSPaV	69	280-21	4.43	ASGV
3	326-13	7.64	CMV	37	148-13	5.57	ASPV	70	737-52	4.43	APCLSV
4	326-2	7.64	CMV	38	484-13	5.43	RSPaV	71	32-10	4.42	ACLSV
5	814-112	7.49	NSPaV	39	44-8	5.33	ASPV	72	737-84	4.41	APCLSV
6	950-3	7.43	PNRSV	40	227-4	5.26	ASPV	73	737-82	4.41	APCLSV
7	463-7	7.31	GSyV-1	41	527-37	5.25	GRBaV	74	836-66	4.37	PBNSPaV
8	plantP2	7.24	-	42	185-8	5.19	ASPV	75	25-10	4.32	ASPV
9	484-4	7.23	RSPaV	43	326-7	5.12	CMV	76	533-2	4.32	RSPaV-1
10	926-28	7.12	PNRSV	44	460-4	5.09	GSyV-1	77	534-8	4.32	TBTV
11	921-94	7.11	PNRSV	45	354-10	5.03	GRSPaV	78	778-18	4.31	APV2
12	326-5	7.10	CMV	46	909-1	4.97	PBNSPaV	79	196-3	4.27	ASPV
13	326-10	6.99	CMV	47	210-13	4.97	ASPV	80	440-16	4.23	GVE
14	923-39	6.90	PNRSV	48	730-5	4.96	ACLSV	81	649-10	4.21	ACLSV
15	952-12	6.80	PNRSV	49	964-156	4.92	PPV	82	891-42	4.19	PBNSPaV
16	460-13	6.68	GSyV-1	50	353-2	4.90	GRSPaV	83	44-22	4.15	ASPV
17	326-8	6.62	CMV	51	846-39	4.89	PBNSPaV	84	333-2	4.15	GRSPaV
18	814-34	6.61	NSPaV	52	952-7	4.89	PNRSV	85	741-36	4.14	APCLSV
19	31-50	6.54	ApLV	53	172-9	4.88	ASPV	86	plantP4	4.14	-
20	950-10	6.46	PNRSV	54	926-48	4.82	PNRSV	87	964-104	4.14	PPV
21	926-6	6.44	PNRSV	55	325-23	4.79	TSV	88	370-14	4.11	GLRaV-1
22	944-22	6.41	PNRSV	56	503-4	4.76	RSPaV	89	267-13	4.11	ACLSV
23	836-119	6.38	PBNSPaV	57	527-39	4.75	GRBaV	90	430-77	4.07	GVA
24	922-14	6.26	PNRSV	58	94-34	4.73	ASPV	91	773-1	4.07	APV2
25	921-39	6.22	PNRSV	59	847-74	4.73	PBNSPaV	92	688-9	4.06	ACLSV
26	463-19	6.12	GSyV-1	60	300-1	4.68	AGCaV	93	509-96	4.05	RSPaV
27	31-33	6.12	ApLV	61	436-5	4.64	GVB	94	904-38	4.05	PBNSPaV
28	326-1	5.93	CMV	62	509-5	4.60	RSPaV	95	503-19	4.04	RSPaV
29	862-66	5.89	PBNSPaV	63	278-47	4.53	ASGV	96	737-41	4.00	APCLSV
30	26-23	5.81	ASPV	64	327-2	4.51	GRSPaV	97	267-8	4.00	ACLSV
31	210-1	5.78	ASPV	65	497-5	4.49	RSPaV	98	257-83	3.97	ACLSV
32	862-13	5.75	PBNSPaV	66	720-20	4.47	ACLSV	99	249-35	3.97	ACLSV
33	326-11	5.70	CMV	67	15-10	4.44	AGCaV	100	497-29	3.95	RSPaV
34	172-1	5.69	ASPV								

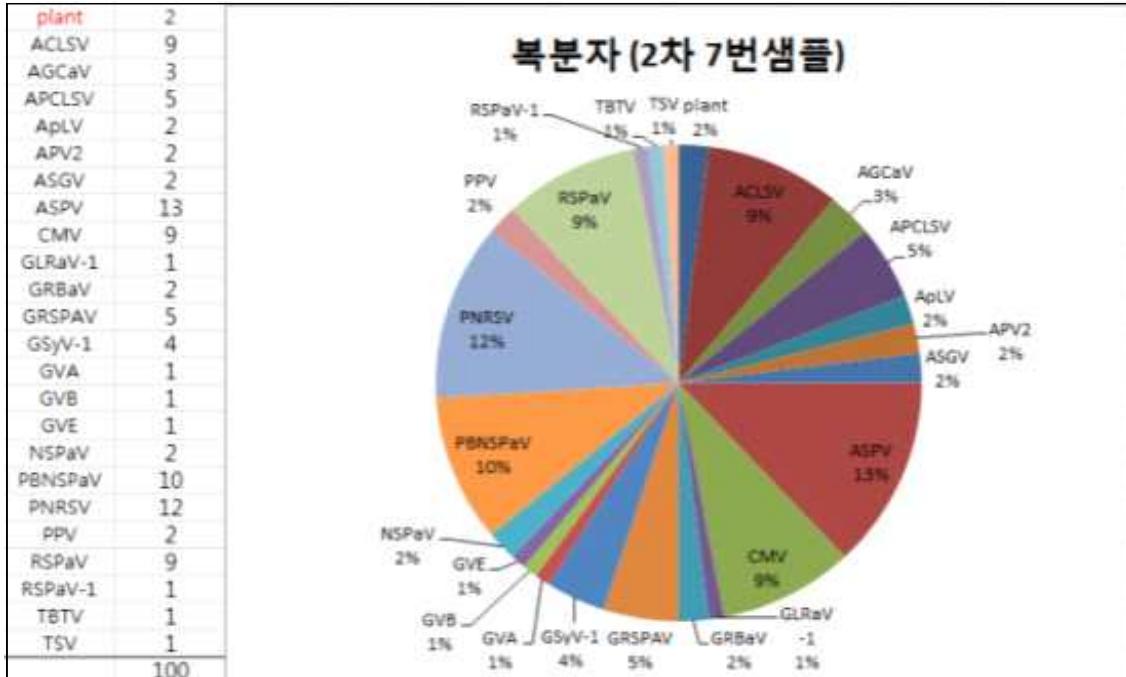


그림 21. 과수 바이러스 진단용 칩을 활용하여 포장에서 수집된 복분자의 진단 결과

no.	Probe	Value	Target	no.	Probe	Value	Target	no.	Probe	Value	Target
1	55-9	13.5	ASGV	35	117-9	10.0	ASPV	68	11-18	9.3	ASGV
2	40-24	13.5	ASGV	36	155-17	10.0	ASPV	69	293-20	9.3	ASGV
3	55-17	13.1	ASGV	37	87-2	9.9	ASPV	70	38-5	9.3	ASGV
4	40-16	13.1	ASGV	38	87-5	9.9	ASPV	71	9-12	9.3	ASGV
5	55-8	12.9	ASGV	39	155-4	9.9	ASPV	72	87-8	9.3	ASPV
6	40-8	12.9	ASGV	40	284-7	9.9	ASGV	73	321-49	9.3	PBNSV
7	55-24	12.7	ASGV	41	55-3	9.8	ASGV	74	162-9	9.3	ASPV
8	40-23	12.2	ASGV	42	40-4	9.8	ASGV	75	52-9	9.3	ASGV
9	55-25	12.1	ASGV	43	40-6	9.8	ASGV	76	155-11	9.3	ASPV
10	160-11	11.5	ASPV	44	11-13	9.8	ASGV	77	162-3	9.2	ASPV
11	55-13	11.3	ASGV	45	321-17	9.7	PBNSV	78	155-3	9.2	ASPV
12	55-5	11.2	ASGV	46	11-12	9.6	ASGV	79	77-4	9.2	ASPV
13	55-20	11.1	ASGV	47	321-13	9.6	PBNSV	80	321-32	9.2	PBNSV
14	40-5	11.0	ASGV	48	119-4	9.6	ASPV	81	155-10	9.2	ASPV
15	160-7	10.9	ASPV	49	162-13	9.6	ASPV	82	11-14	9.2	ASGV
16	55-4	10.9	ASGV	50	162-4	9.6	ASPV	83	162-5	9.2	ASPV
17	55-21	10.8	ASGV	51	11-23	9.6	ASGV	84	87-5	9.2	ASPV
18	230-7	10.8	ASPV	52	11-20	9.6	ASGV	85	52-1	9.2	ASGV
19	298-4	10.7	ASGV	53	11-4	9.6	ASGV	86	613-65	9.2	ACLSV
20	277-9	10.6	ASGV	54	55-15	9.6	ASGV	87	11-5	9.1	ASGV
21	40-12	10.5	ASGV	55	117-5	9.5	ASPV	88	55-23	9.1	ASGV
22	55-16	10.5	ASGV	56	324-12	9.5	PBNSV	89	55-14	9.1	ASGV
23	531-12	10.5	PCV	57	277-2	9.5	ASGV	90	41-12	9.1	ASGV
24	40-15	10.5	ASGV	58	293-19	9.5	ASGV	91	321-53	9.1	PBNSV
25	11-24	10.4	ASGV	59	55-19	9.5	ASGV	92	11-35	9.1	ASGV
26	55-6	10.4	ASGV	60	38-15	9.5	ASGV	93	293-7	9.1	ASGV
27	11-19	10.4	ASGV	61	117-8	9.5	ASPV	94	155-15	9.0	ASPV
28	40-20	10.3	ASGV	62	11-34	9.5	ASGV	95	124-3	9.0	PBNSV
29	531-62	10.3	PCV	63	160-3	9.4	ASPV	96	155-9	9.0	ASPV
30	298-8	10.1	ASGV	64	55-22	9.4	ASGV	97	4-11	9.0	ASGV
31	87-13	10.1	ASPV	65	11-25	9.4	ASGV	98	11-32	9.0	ASGV
32	324-19	10.0	PBNSV	66	324-4	9.3	PBNSV	99	710-3	9.0	ACLSV
33	832-19	10.0	PBNSPaV	67	41-24	9.3	ASGV	100	286-9	9.0	ASGV
34	38-24	10.0	ASGV								

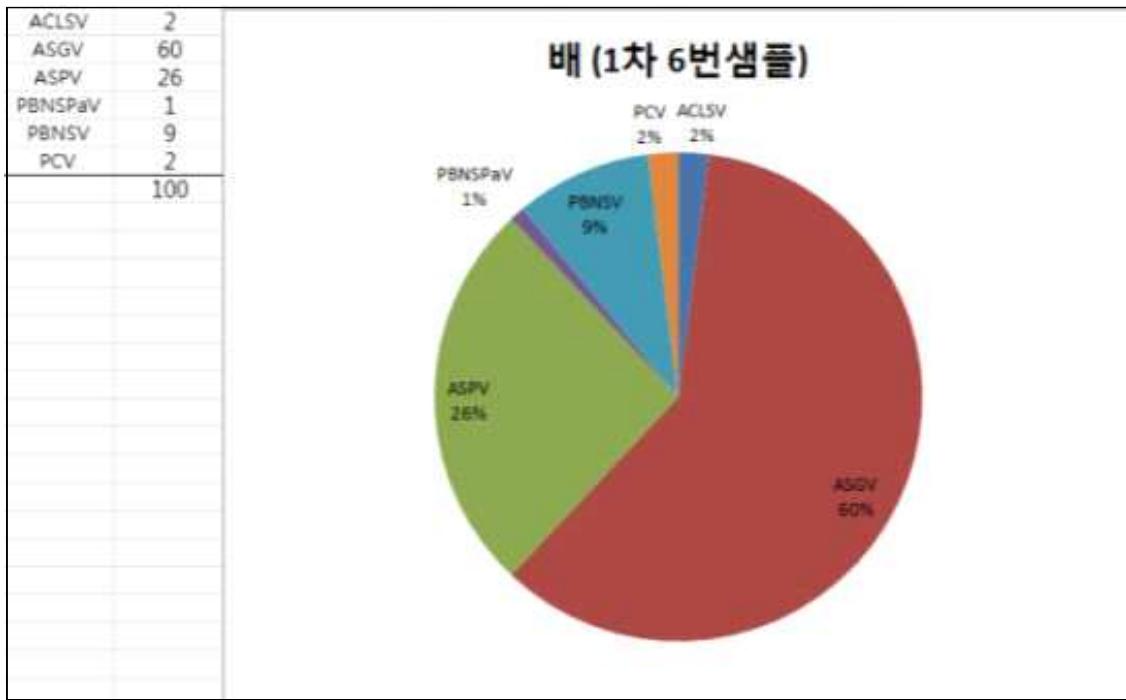


그림 22. 과수 바이러스 진단용 칩을 활용하여 포장에서 수집된 배의 진단 결과

no.	Probe	Value	Target	no.	Probe	Value	Target	no.	Probe	Value	Target
1	796-3	9.7	GSyV-1	35	856-19	7.7	PBNNSPaV	68	797-15	7.2	GSyV-1
2	796-9	9.5	GSyV-1	36	869-18	7.7	PBNNSPaV	69	871-2	7.2	PBNNSPaV
3	796-10	9.4	GSyV-1	37	889-12	7.6	PBNNSPaV	70	915-17	7.2	PBNNSPaV
4	796-15	9.3	GSyV-1	38	856-10	7.6	PBNNSPaV	71	871-11	7.2	PBNNSPaV
5	796-13	9.1	GSyV-1	39	856-6	7.6	PBNNSPaV	72	856-1	7.2	PBNNSPaV
6	796-14	8.9	GSyV-1	40	856-3	7.6	PBNNSPaV	73	879-1	7.2	PBNNSPaV
7	797-20	8.8	GSyV-1	41	856-24	7.5	PBNNSPaV	74	888-10	7.2	PBNNSPaV
8	796-8	8.7	GSyV-1	42	865-9	7.5	PBNNSPaV	75	797-16	7.2	GSyV-1
9	797-7	8.5	GSyV-1	43	796-5	7.5	GSyV-1	76	856-21	7.2	PBNNSPaV
10	874-80	8.5	PBNNSPaV	44	879-9	7.5	PBNNSPaV	77	874-33	7.2	PBNNSPaV
11	796-4	8.4	GSyV-1	45	915-11	7.5	PBNNSPaV	78	888-6	7.2	PBNNSPaV
12	856-9	8.3	PBNNSPaV	46	915-6	7.4	PBNNSPaV	79	874-83	7.2	PBNNSPaV
13	881-7	8.3	PBNNSPaV	47	865-6	7.4	PBNNSPaV	80	889-17	7.2	PBNNSPaV
14	888-3	8.3	PBNNSPaV	48	874-86	7.4	PBNNSPaV	81	888-8	7.1	PBNNSPaV
15	796-1	8.3	GSyV-1	49	797-1	7.4	GSyV-1	82	856-8	7.1	PBNNSPaV
16	856-25	8.2	PBNNSPaV	50	879-14	7.4	PBNNSPaV	83	796-11	7.1	GSyV-1
17	879-3	8.2	PBNNSPaV	51	798-9	7.4	GSyV-1	84	871-9	7.1	PBNNSPaV
18	881-9	8.1	PBNNSPaV	52	915-7	7.4	PBNNSPaV	85	814-133	7.1	NSPaV
19	881-12	8.0	PBNNSPaV	53	865-10	7.4	PBNNSPaV	86	869-28	7.1	PBNNSPaV
20	797-9	8.0	GSyV-1	54	860-2	7.4	PBNNSPaV	87	856-14	7.1	PBNNSPaV
21	888-7	7.9	PBNNSPaV	55	859-2	7.4	PBNNSPaV	88	862-38	7.1	PBNNSPaV
22	797-8	7.9	GSyV-1	56	889-6	7.4	PBNNSPaV	89	865-8	7.1	PBNNSPaV
23	797-14	7.9	GSyV-1	57	888-9	7.4	PBNNSPaV	90	871-2	7.1	PBNNSPaV
24	856-17	7.9	PBNNSPaV	58	797-17	7.4	GSyV-1	91	798-17	7.0	GSyV-1
25	881-1	7.9	PBNNSPaV	59	889-11	7.4	PBNNSPaV	92	797-3	7.0	GSyV-1
26	865-3	7.9	PBNNSPaV	60	889-7	7.3	PBNNSPaV	93	856-5	7.0	PBNNSPaV
27	865-7	7.9	PBNNSPaV	61	888-1	7.3	PBNNSPaV	94	869-10	7.0	PBNNSPaV
28	797-2	7.9	GSyV-1	62	915-1	7.3	PBNNSPaV	95	879-8	7.0	PBNNSPaV
29	856-11	7.9	PBNNSPaV	63	865-1	7.3	PBNNSPaV	96	862-91	7.0	PBNNSPaV
30	915-12	7.8	PBNNSPaV	64	881-6	7.3	PBNNSPaV	97	798-1	7.0	GSyV-1
31	797-13	7.8	GSyV-1	65	888-5	7.3	PBNNSPaV	98	869-8	7.0	PBNNSPaV
32	787-4	7.7	CNRMV	66	865-5	7.3	PBNNSPaV	99	864-19	7.0	PBNNSPaV
33	797-10	7.7	GSyV-1	67	797-21	7.3	GSyV-1	100	860-9	7.0	PBNNSPaV
34	879-7	7.7	PBNNSPaV								

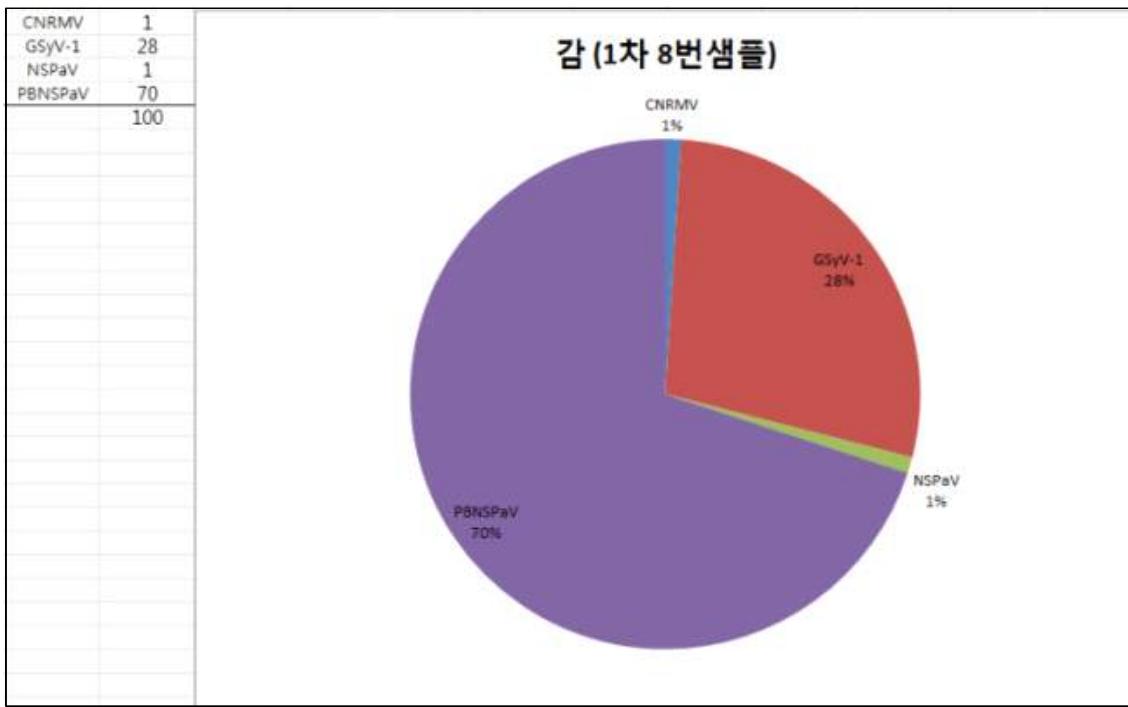


그림 23. 과수 바이러스 진단용 칩을 활용하여 포장에서 수집된 감의 진단 결과

3. 프로브의 재설계 및 교체

전년도에 제작되어 활용된 사과, 포도, 복숭아 및 헥과류에 발생하는 신·변종, 국내 미보고종을 포함하여 약 15,000여개의 프로브에 더하여 당해 연도에는 약 70여종의 사과, 포도, 복숭아 및 헥과류 발생 바이러스를 추가하여 과수 바이러스 특이 프로브를 디자인 하고 있다. 이에 덧붙여 감, 체리, 복분자를 포함하여 해외로부터 도입된 과수인 블루베리, 아로니아, 참다래, 등에서 국내 발생 바이러스 정보를 확보하여 추가적인 프로브를 디자인하여 활용할 계획이다.

Common Name	Scientific Name	Total Disease of Apple				
		Type Name	Acronym	Family	Genre	Reference
Apple	Apple latent mosaic virus	ALMV		Bunyaviridae	Phytovirus	
	Apple green leaf virus	AGLV			Phytovirus	
	Apple latent virus	ALV			Phytovirus	
	Apple latent virus	ALMV			Phytovirus	
	Apple latent mosaic virus	ALMV			Phytovirus	
	Apple latent mosaic virus	ALMV		Dennardiidae	Dennisia	Marcelli et al., 2011
	Apple latent variegation virus	ALVV			Dennisia	
	Apple latent variegation virus	ALVV			Dennisia	
	Apple latent variegation virus	ALVV			Dennisia	
	Apple latent variegation virus	ALVV			Dennisia	
Total Disease of Apple						
Apple	Apple latent mosaic virus	ALMV		Pomoviridae	Apple-mosaic	Marcelli et al., 2011
	Apple single fruit	ASPV			Apple-mosaic	
	Apple fruit mottle virus	AFMV			Apple-mosaic	

Common Name	Scientific Name	Total Disease of Peach				
		Type Name	Acronym	Family	Genre	Reference
Peach	Peach latent mosaic virus	PLMV		Bunyaviridae	Phytovirus	
	Peach latent mosaic virus	PLMV			Phytovirus	
	Peach latent mosaic virus	PLMV			Phytovirus	
	Peach latent mosaic virus	PLMV			Phytovirus	
	Peach latent mosaic virus	PLMV			Phytovirus	
	Prunus latent mosaic virus	PLMV		Dennardiidae	Dennisia	Marcelli et al., 2011
	Prunus latent mosaic virus	PLMV			Dennisia	
	Prunus latent mosaic virus	PLMV			Dennisia	
	Prunus latent mosaic virus	PLMV			Dennisia	
	Prunus latent mosaic virus	PLMV			Dennisia	
Total Disease of Peach						
Peach	Peach latent mosaic virus	PLMV		Pomoviridae	Prunus	Marcelli et al., 2011
	Peach ring leaf virus	PRLV			Prunus	
	Peach ring leaf virus	PRLV			Prunus	
Peach	Peach rosette mosaic virus	PRMV		Dennardiidae	Dennisia	Marcelli et al., 2011
	Peach rosette mosaic virus	PRMV			Dennisia	
	Peach rosette mosaic virus	PRMV			Dennisia	
	Peach black ring virus	PRBV			Dennisia	
	Peach black ring virus	PRBV			Dennisia	

그림 24. 과수 바이러스 진단용 칩에 탑재되는 사과 포도 복숭아 및 핵과류 바이러스의 리스트
회색으로 표시된 바이러스 및 바이로이드는 기존 칩에 탑재된 바이러스 및 바이로이드

<위탁과제 : 사과 바이러스 발현 억제 기술 개발>

1. 국내발생 ACLSV, ASGV, ASPV isolate 간 유전자 다양성 조사 및 유전자 염기서열 완성
충남/충북/경남/경북 지역에서 그림 1과 같이 바이러스 감염 증상을 나타내는 과수를 중심으
로 시료를 수집하여 유전자 서열분석을 진행하였다. 채집해 온 일 혹은 열매 샘플을 기 확보
한 사과 total RNA 추출 방법(CTAB method)를 이용하여 total RNA를 추출하고, PCR을 통
해 ASGV, ASPV, ACLSV 감염 유무 확인하였다.



그림 1. 바이러스에 감염된 사과나무와 건전 사과나무

바이러스에 감염된 경우, 수세가 약하고 과실에 착색이 불량함을 확인하였다.

표 1과 같이 총 65개의 샘플이 채집되었고 그 중 ASGV 20개, ASPV 1개, ACLSV 3개가 진단되었다(표 1, 그림 2). nad5 mRNA를 이용한 RT-PCR 및 real-time qPCR 분석 방법을 확보하였다(그림 2).

표 1. 샘플 채집 및 진단 결과

채집지역	채집 샘플	진단결과		
		ASGV*	ACLSV*	ASPV*
충남 예산	25	6	0	0
충북 충주	15	0	1	0
경남 창원	2	0	0	0
경북 군위	16	9	2	1
경북 청송	7	5	0	0
합계	65	20	3	1

*ASGV: *Apple stem grooving virus*, ACLSV: *Apple chlorotic leaf spot virus*, ASPV: *Apple stem pitting virus*

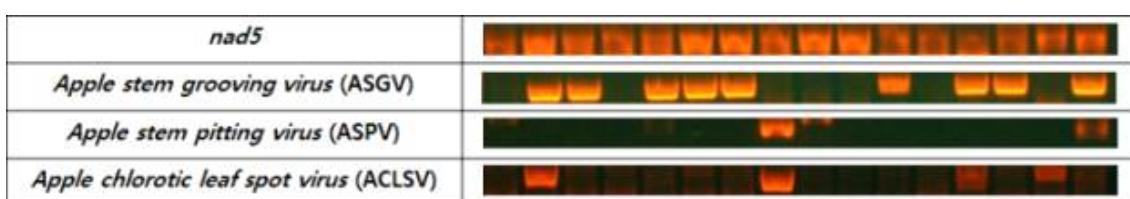


그림 2. 사과 바이러스 시료 수집 및 진단을 통한 유전자 다양성 조사

ASGV/ACLSV 가 확인된 샘플에서는 각각 바이러스의 CP(coat protein)와 MP(movement protein)을 확보하였다. Isolate 간 유전자 서열 분석을 실시하였다(그림 3).

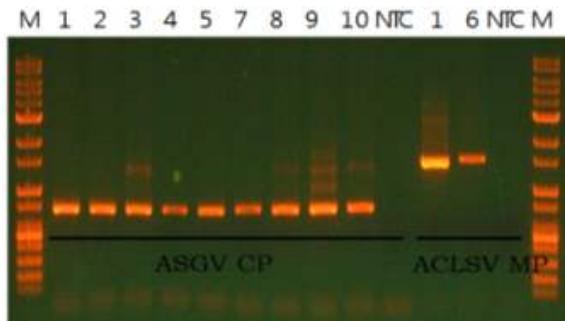


그림 3. ASGV, ACLSV isolate간 CP, MP 염기서열 확보

ASGV isolate간의 CP 염기서열을 분석한 결과, wild type과 91% 정도의 상동성이 있음을 확인하였고 채집 지역에 따른 차이는 없었으나 다른 나라(일본, 중국, 독일)의 개체들과는 그룹이 분리됨을 확인하였다(그림 4).

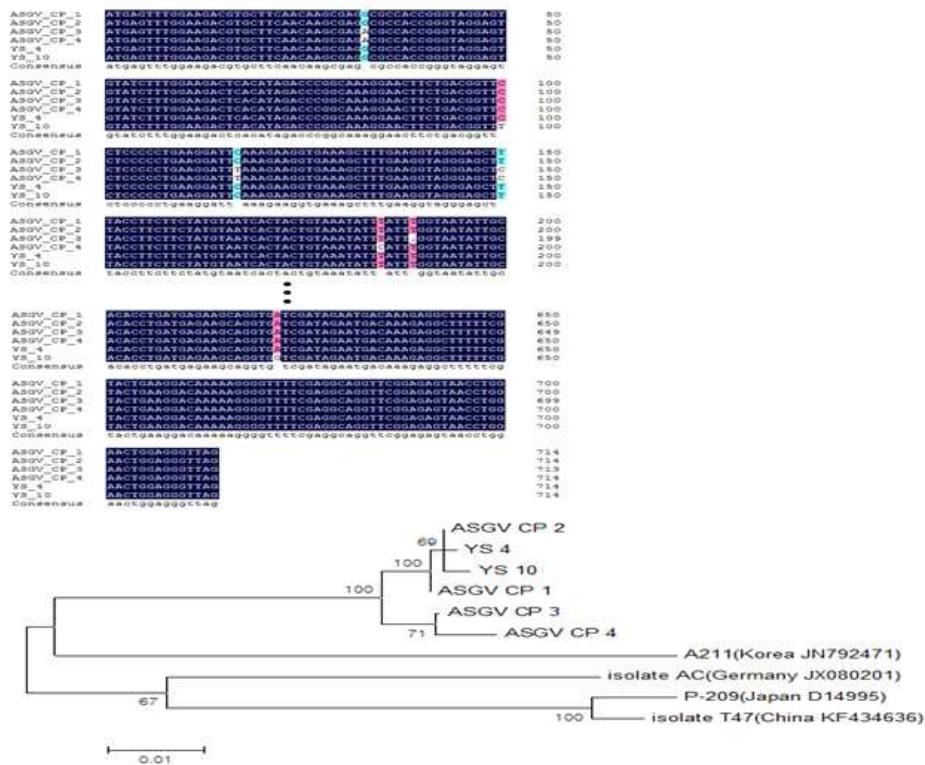


그림 4. ASGV CP 염기서열 분석 및 phylogenetic analysis

ACLSV isolate간의 MP 염기서열을 분석한 결과, wild type과 82~85% 정도의 상동성이 있음을 확인하였고 채집 지역이나 나라에 따른 차이는 없는 것으로 확인하였다(그림 5).

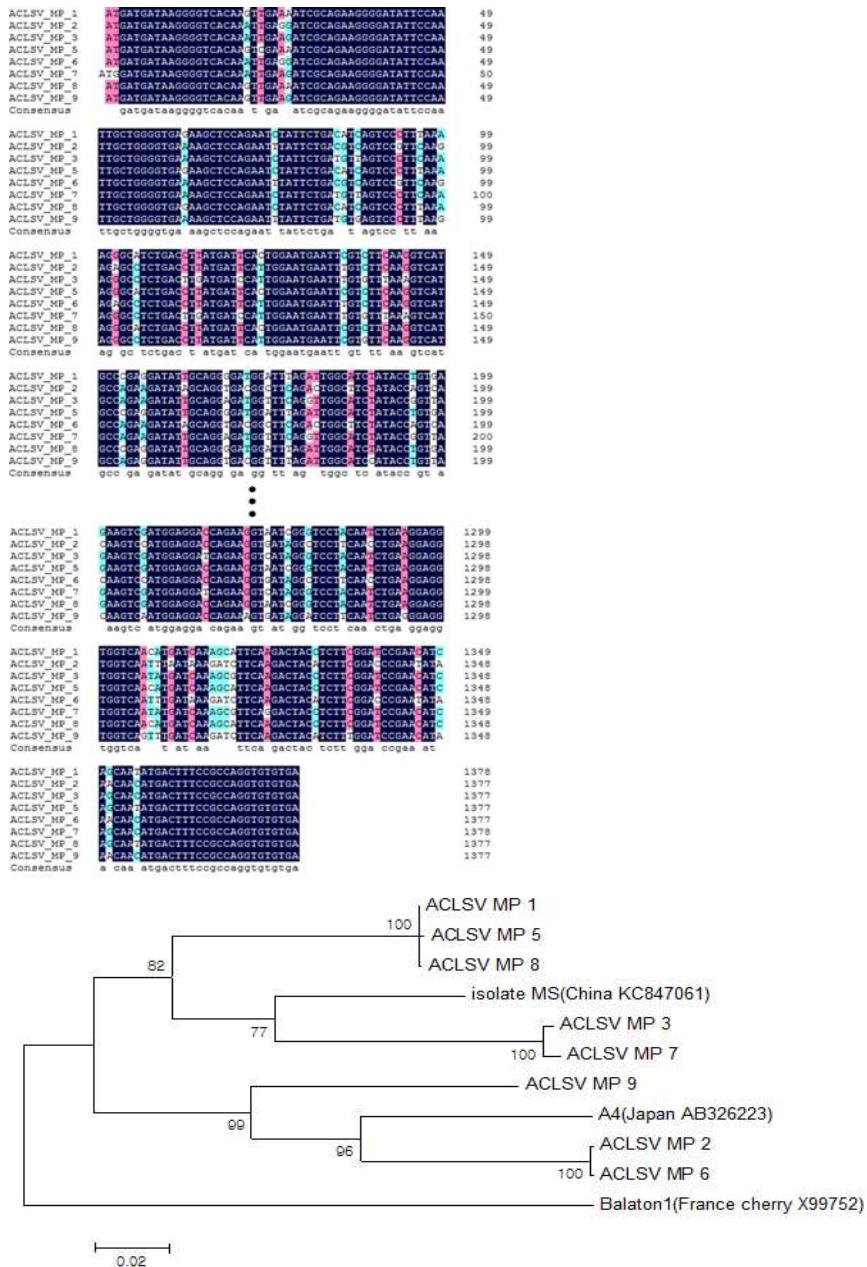


그림 5. ACLSV MP 염기서열 분석 및 phylogenetic analysis

확보된 ASGV CP와 ACLSV MP는 단백질 발현 벡터와 GFP 발현 벡터 (pGD, pGDG)에 cloning하여 gene silencing suppressor 기능 및 cell wall localization 차이를 분석하였다. ALSV에 국내발생 바이러스의 RNAi-(ACLSV-ASGV-ASPV) 삽입 및 발현양상과 RNAi 작용 기작 모델식물에서 확인하였다. ALSV viral vector에 Potexvirus CP 삽입한 후, 담배에 두 번에 나눠 ALSV, Potexvirus, Potexvirus CP가 cloning된 ALSV를 각각 접종하였다(그림 6).



그림 6. ALSV vector에 Potexvirus CP cloning 및 접종

담배에 각각의 바이러스를 두 번에 나누어 접종한 후, 병징의 발달과 RT-PCR을 통해 Potexvirus의 복제가 제어됨을 확인하였다(그림 7).

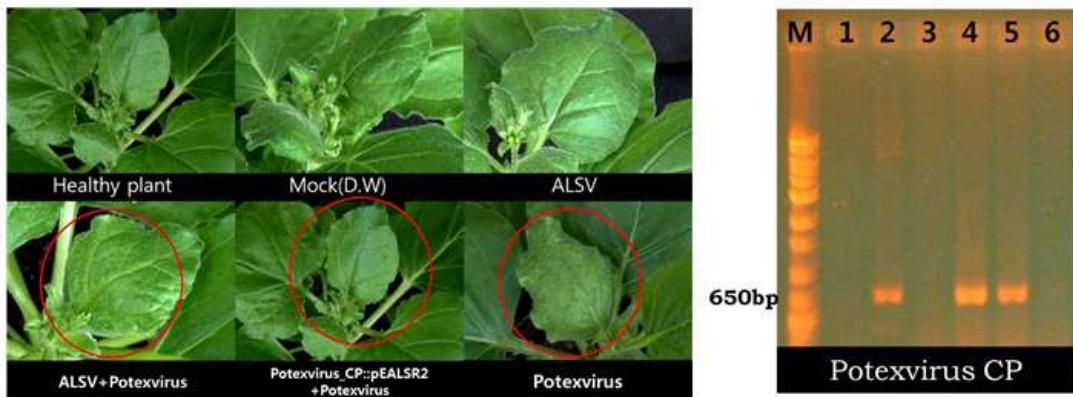


그림 7. RNAi에 따른 병징 발달의 차이와 RT-PCR 결과를 통한 RNAi 효과 확인
(M: 1Kb marker, 1: D.W, 2: Potexvirus cDNA(Positive control), 3: Mock, 4:
ALSV_Potexvirus, 5: Potexvirus, 6: Potexvirus CP::pEALST2L5R5+Potexvirus)

3. RNAi 염기서열 평가방법 개발 및 적용방법 확립

국내 분포된 바이러스 조사를 통해 바이러스의 염기서열 확인 후 RNAi 서열을 확정하였고 ACLSV와 ASGV의 conserved region (ACLSV MP 89bp, ASGV CP 109bp)을 확보하고(표2), 이를 TRV에 cloning하여 사과 바이러스 RNAi를 생산하는 construct 제작하였다(그림 8). ACLSV MP와 ASGV CP 각각이 cloning 된 PVX(그림 9)를 사과바이러스 RNAi를 생산하는 식물에 접종, RNAi 발현과 바이러스 억제 효과를 검정하였다(그림 10).

표 2. ACLSV, ASGV RNAi 염기서열

ACLSV RNAi 발현 염기서열(89 bp)	ASGV RNAi 발현 염기서열(109 bp)
TTCCTGGCCCGAGAAGGCAGACCCCTT CATGGAAGGCACAGGGCAATACTGGAA ACAGATATTGGAGTCCATCTTCGCGA ACATAGCGAT	TACATGAAAGGTGGTCCAAAGGACTG GCCACCAACATTACAAGAAATGGCCC AAAGCTTTGAAAAAAAGTCCGTGGGT GGCATTGACTTGCCACTGGTCTAA AAAT

TRV based VIGS system

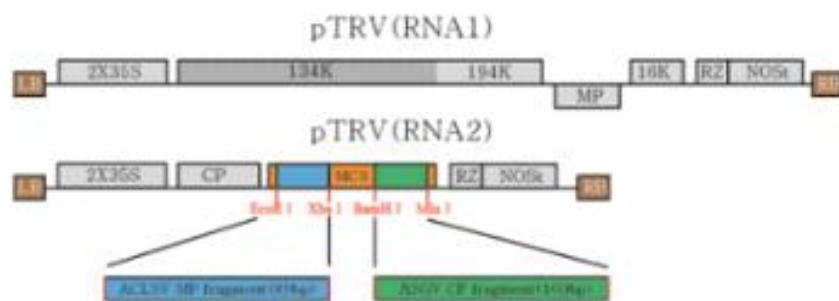


그림 8. ACLSV, ASGV RNAi construct

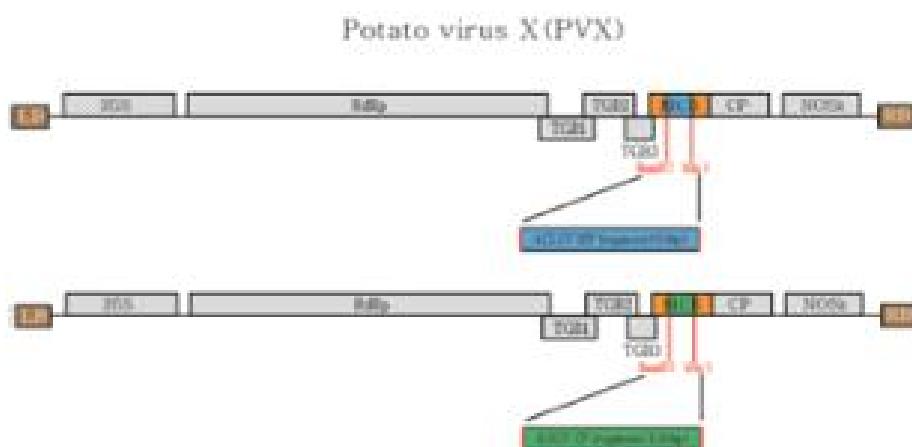


그림 9. ACLSV, ASGV 각각의 단편이 cloning 된 PVX

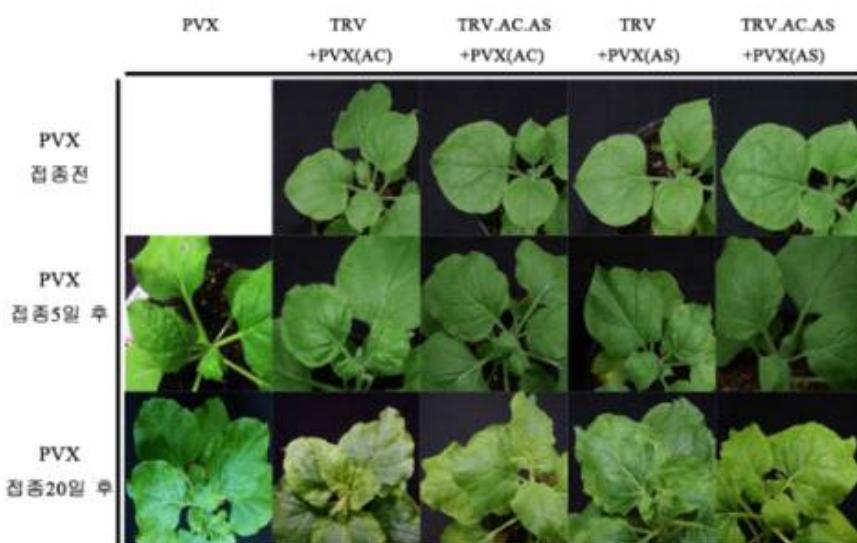


그림 10. 모델식물(담배) RNAi 효능평가 (TRV.AC.AS; 그림 4 TRV RNAi construct, PVX(AC); 그림 5 PVX construct(위), PVX(AS); 그림 5 PVX construct(아래))

조직배양묘에 RNAi 접종을 위한 사과바이러스 ACLSV 발현 ACLSV 감염성 클론제작 및 접종 방법을 확립하였다.

가. RNAi 적용 감염성 클론 제작을 위한 ACLSV 전체염기서열 분석(그림 11) 및 Genbank 등록 (KX506849)

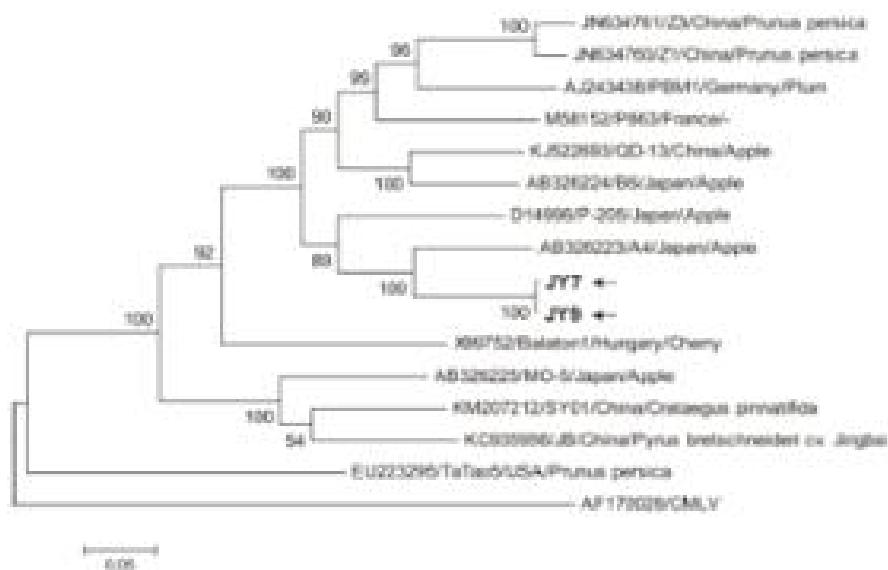


그림 11. ACLSV phylogenetic analysis (full-genome sequence)

나. 전제 유전자를 증폭하여 binary vector에 클로닝(그림 12).

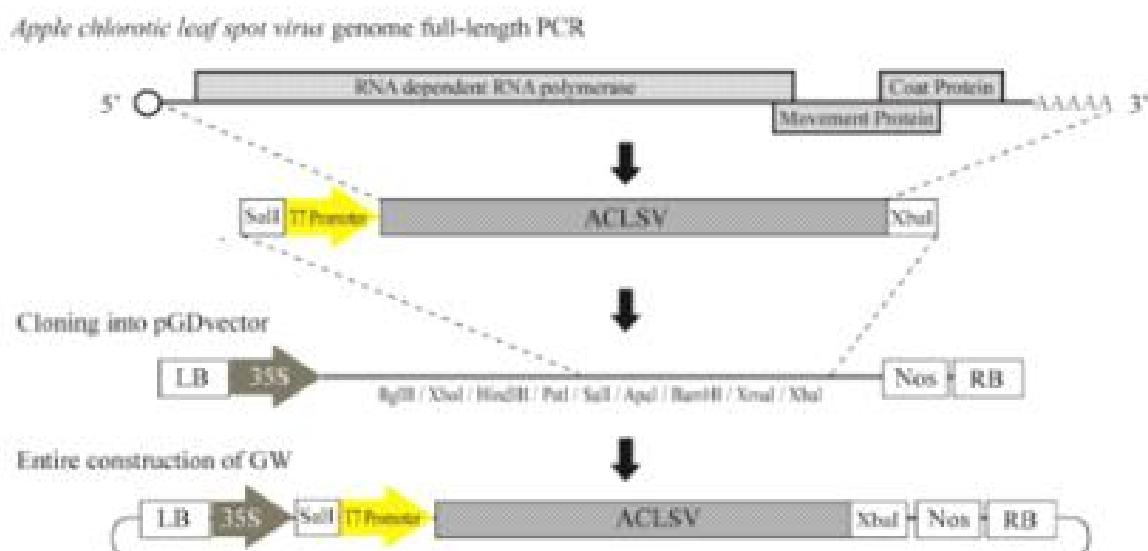


그림 12. ACLSV infectious clone 제작

다. 제작된 infectious clone의 감염성 확인

라. 제작된 infectious clone은 명아주에 Agroinfiltration 은 불가했으나 in vitro transcription 으로 접종성공(그림 13).

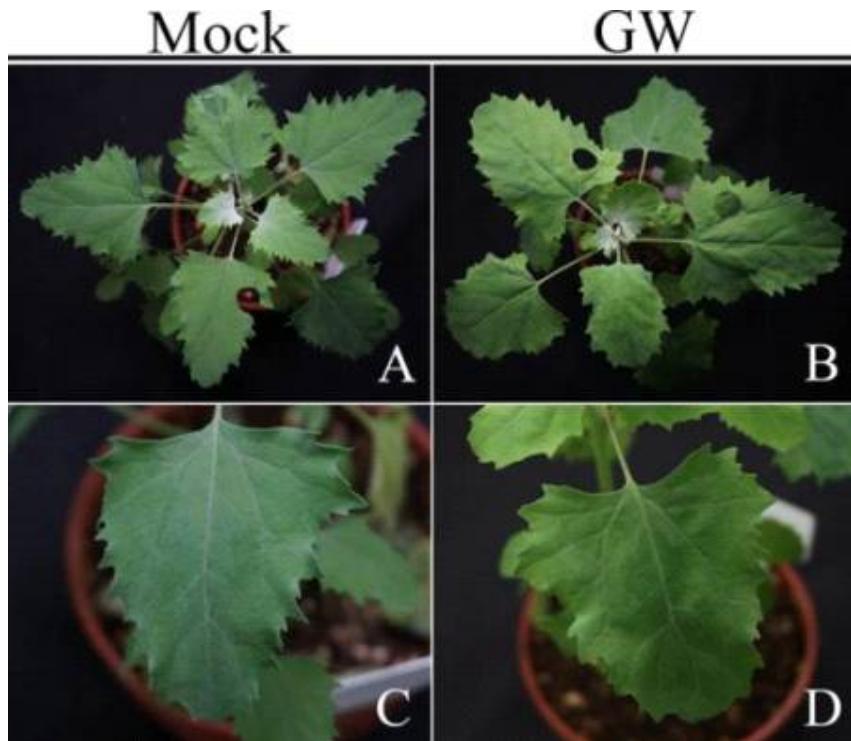


그림 13. 명아주 ACLSV infectious clone 접종 및 감염성 확인

마. *N. benthamiana* 에 1차 접종(Agroinfiltration) 16시간 후 담배즙액접종을 통한 명아주 접종 가능성 확인(표 3).

표 3. Indirect Agroinfiltration을 이용한 ACLSV 명아주 접종 효율 확인

Plant	8 hpi	16 hpi	24 hpi
Chenopodium	1/10	7/10	9/10

제 4 장 목표달성도 및 관련분야 기여도

제1절 : 목표대비 달성도

당초 목표	가중치(%)	개발 내용	달성도(%)
1) 사과 바이러스 무독화 효율 증진 기술 개발(10% 이상 증진)	20	1) 사과 바이러스 무독화 효율 증진 기술 개발 - 항바이러스제 처리에 의한 무독화 효율 20% 이상 증진	100
2) 사과 바이러스, 바이로이드 현장 진단용 키트 개발	30	2) 사과 바이러스, 바이로이드 현장 진단용 키트 개발 - 사과 바이러스 Immuno-strip 키트 개발 - 사과 바이로이드 LAMP 키트 개발	100
3) 과수 바이러스 진단용 올리고 DNA chip의 실용화	50	3) 과수 바이러스 진단용 올리고 DNA chip의 실용화 - 370여종 바이러스, 7,500 프로브 탑재 칩 개발	100
사과 바이러스 무독화 기술 향상 및 진단용 DNA칩 개발	100%	사과 바이러스 무독화 기술 향상 및 진단용 DNA칩 개발	100

제2절 : 정량적 성과(논문게재, 특허출원, 기타)를 기술

성과지표명	구분	당초 목표(전체)	실적	달성도 (%)	가중치 (%)
논문게재	SCI	9	12	133	20
	비SCI	2	2	100	15
산업재산권	출원	3	4	133	15
	등록		3		
학술발표	국제	3	5	167	10
	국내	6	8	133	10
영농기술·정보 기관제출		3	3	100	20
생명정보 등록 · 기타		3	26	867	5
홍보		20	38.8	194	5
계		53	99.1	1,827	100

제 5 장 연구 결과의 활용 계획

사과 바이러스 무독화 효율 증진을 위해 열처리(37°C)시 항바이러스체를 처리하여 사과 우량묘목 생산에 활용하고 사과 바이러스, 바이로이드 진단키트는 현장 모니터링 및 우량묘목 병원체 검정에 활용될 예정이다. 확보된 기술은 자두곰보바이러스(PPV) 등 과수 신문제 바이러스 현장진단키트 개발에 적용 확대할 계획이다. 과수 바이러스 진단용 DNA칩은 국가관리 바이러스 모니터링 및 미해결 민원에 대한 원인 구명에 활용하고 관련 기관에 기술이전 할 계획이며 과수 우량묘목 생산 및 농산물 수출입관련 과수 바이러스 진단에 활용 가능하다.

‘17년도 신규과제인 ‘NGS기술을 이용한 과수 바이러스 유전체 분석 및 동정’을 통해 과수 바이러스 종류 및 프로브를 업데이트하고 특허출원을 수행할 계획에 있다.

* 특허출원 목록

- 사과 바이로이드 LAMP 진단용 프라이머 세트 및 이의 용도
- 과수 바이러스 진단 및 검출을 위한 프로브 세트 및 이의 용도

제 6 장 연구 과정에서 수집한 해외 과학 기술 정보

USDA-ARS 연구팀은 핵과류에서 발생하는 자두곰보바이러스(PPV)의 등온증폭 유전자 진단 기술인 AmplifyRP 진단키트를 Agdia사의 공동연구를 통해 개발하였다. NGS 기술을 이용해서 포도 신문재 바이러스 GRBaV가 동정되었고 현재 미국 캘리포니아 주는 GRBaV의 예찰 및 박멸 프로그램이 실시되고 있다. 또한 식물 검역 및 무병묘 생산을 위해 NGS 분석기술이 활용되고 있다.

제 7 장 연구 개발 결과의 보안 등급

보안 등급 분류	보 안	일반
		○
결정 자유	「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제 24조의 4(분류 기준) 제1항 각목에 해당하지 않음	

제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구 시설/ 연구 장비 명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천 원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치장소)	NTIS장비 등록 번호
원예원	식물생장 조절실	DS-15CL	1	1998-07-20	40,150,000	다솔과학	원예원 214호	NFEC-201 1-02-1442 02
원예원	미량원심분리기	LE-80K	1	2001-11-01	75,629,190	Beckman	원예원 213호	NFEC-201 1-02-1442 09
원예원	유전자 증폭기	Chromo4/P TC-0200	1	2006-07-21	59,302,080	MJ Research	원예원 213호	NFEC-201 1-02-1442 15
원예원	진단키트 제조기	IN/PD-04-02	1	2008-08-29	88,499,400	Mdi Co	원예원 109호	NFEC-201 1-02-1442 07
원예원	핵산증폭 측정기	NanoDrop 2000	1	2010-03-22	32,282,800	Thermo Scientific	원예원 213호	NFEC-201 1-01-1383 92
원예원	동결건조시스템	FDU-2100	1	2010-04-30	37,036,160	Eyela	원특환 온실 104호	NFEC-201 1-01-1383 95
원예원	중합효소연쇄반응(PC R)	CFX96	1	2013-07-12	43,964,620	Bio-rad	원예원 214호	NFEC-201 4-02-1856 01
원예원	식물세포핵산추출도구	NucliSens EazyQ System	1	2014-05-28	94,419,560	Biomerieux	원예원 213호	NFEC-201 4-10-1920 95
원예원	바이러스 유전자정량 분석 시스템	Gbox chemi XX6	1	2015-09-01	7,000,000	Syngene	원예원 213호	NFEC-201 6-03-2081 16

제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

기술적 위험요소 분석으로 각 연구실은 각종 바이러스 실험을 안전하게 수행할 수 있도록 상급 기관 및 학교 측으로부터 주기적으로 안전 점검과 진단을 받고 있으며 참여연구원은 월별 또는 분기별로 안전교육을 수료하도록 하고 있다. 또한 참여연구원들은 1년에 한 번씩 건강검진을 실시하여 연구를 수행함에 있어 신체적인 문제가 발생하지 않도록 관리하고 있다.

안전관리대책으로 실험 시 발생할 수 있는 다양한 사고를 예방하기 위해 일회용 장갑, 실험복의 착용을 의무화하고 있으며 마스크와 보안경 등도 상시 준비되어 있음. 연구원의 신체 오염 시 사용 할 수 있는 세척제와 비상용 샤워, 세안기가 구비되어 있다.

제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지 / 특허등록국가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부 /인용횟수 등)
1	특허 (출원)	복숭아 식물 유래 신규한 복숭아 황반 클로스테로바이러 스 유전자	생공연		대한민국	-	2014.08.27	단독사사	-
2	특허 (등록)	복숭아 식물 유래 신규한 복숭아 황반 클로스테로바이러 스 유전자	생공연		대한민국	-	2016.04.12	단독사사	-
3	논문	Genomic detection and characterization of a Korean isolate of Little cherry virus 1 sampled from a peach tree	생공연		Virus Genes	1.285	2015.08.28	단독사사	SCI
4	논문	First Report of Grapevine red blotch-associated virus on Grapevine in Korea	생공연		Plant Disease	3.020	2016.09.01	단독사사	SCI
5	논문	Deep sequencing analysis of apple infecting viruses in Korea	원예원		Plant Pathology Journal	0.718	2016.10.01	단독사사	SCI
6	논문	First report of Persimmon cryptic virus and Persimmon virus A in Korea	원예원		Journal of Plant pathology	1.043	2016.11.01	단독사사	SCI

제 11 장 기타사항

제 12 장 참고문헌

- 농림축산식품부, 2016. 과수 무병묘 생산·유통 활성화 방안
- 농촌진흥청, 2014. 과수 바이러스 무병묘 생산 보급 및 안전관리 체계화 연구
- Akbas, B., Degirmenci, K. 2010. Simultaneous detection of Apple mosaic virus in cultivated hazelnuts by one-tube RT-PCR. *Afr. J. Biotechnol.* 9, 1753-1757
- Al Rwahnih, M., Dave, A., Anderson, M., Uyemoto, J. K., Sudarshana, M. R. 2012. Association of a circular DNA virus in grapevine affected by red blotch disease in California. In Proceedings of the 17th Congress of ICVG, Davis, CA, USA.
- Anderson, R.C., Su, X., Bogdan, G.J., Fenton, J., 2000. A miniature integrated device for automated multistep genetic assays. *Nucleic Acids Res.* 28, e60 (i.vi).
- Barba, M., Czosnek, H., Hadidi, A. 2014. Historical perspective, development and applications of Next-Generation Sequencing in plant virology. *Viruses* 6, 106-136.
- Boonham, N., Walsh, K., Smith, P., Madagan, K., Graham, I., Barker, I., 2003. Detection of potato viruses using microarray technology: towards a generic method for plant viral disease diagnosis. *J. Virol. Methods* 108, 181-187.
- Bystricka, D., Lenz, O., Mraz, I., Dedic, P., Sip, M., 2003. DNA microarray: parallel detection of potato viruses. *Acta Virol.* 47, 45-48.
- Bystricka D1, Lenz O, Mraz I, Piherova L, Kmoch S, Sip M. 2005. Oligonucleotide-based microarray: a new improvement in microarray detection of plant viruses. *J Virol Methods.* 128, 176-82.
- Cho, I.S., Choi, G.S., Kwon, S.J. 2015. Molecular diagnostic assay for the simultaneous detection of pome fruit viruses. *International Jl of Applied Science and Technology.* 5, 39-46.
- Cole, K.A., Krizman, D.B., Emmer-Buck, M.R., 1999. The genetic of cancer-a 3D model. *Nat. Genet. Suppl.* 21, 38-41.
- Desprez, T., Amselem, J., Caboche, M., Hofte, H., 1998. Differential gene expression in *Arabidopsis* monitored using cDNA arrays. *Plant J.* 14, 643-652.
- Giampetrucci, A., Roumi, V., Roberto, R., Malossini, U., Yoshikawa, N., La Notte, P., Terlizzi, F., Credi, R., Saldarelli, P. 2012. A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in cv. Pinot gris. *Virus Res.* 163, 262-268
- Hacia, J.G., 1999. Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *Nat. Genet. Suppl.* 21, 42-47.
- Hassan, M., Myrta, A., Polak, J., 2006. Simultaneous detection and identification of four pome fruit viruses by one-tube pentaplex RT-PCR. *J. Virol. Methods* 133, 124-129.
- Kim, H.R., Choi, Y.M., Ylem, M.S., Kim, K.H., Kim, K.R. 1997. Effects of antivirals on eradication of ACLSV and ApMV in apple trees. *Hort. Environ. Biotechnol.* 5, 281-282.
- Kim, H.R., Chung, J.D., Park, J.W., Choi, Y.M., Ylem, M.S. 2003. Effects of thermotherapy

- and shoot apical meristem culture, antiviral compounds for GLRaV-3 elimination in grapevines. Korean J. Plant Biotech. 30, 155–160.
- Kim, H.R. 2004a. Studies on fruit tree virus disease. Res. Report RDA.
- Kim, H.R., Kim, J.S., Hwan, J.H., Lee, S.H., Choi, G.S., Choi, Y.M. 2004b. Influence of ACLSV-infection on fruit quality of 'Hongro' apples. Res. Plant Dis. 10, 145–149.
- Kinard, G. R., Scot, S. W., & Barnett, O. W. 1996. Detection of Apple chlorotic leaf spot and Apple stem grooving virus using RT-PCR. Plant Disease, 80, 616–621.
- Lee, G.P., Ryu, K. H., Kim, H. R., Kim, C. S., Lee, D. W., Kim, J. S., Park, M. H., Noh, Y. M., Choi, S. H., Han, D. H., Lee, C. H. 2002. Cloning and phylogenetic characterization of coat protein genes of two isolates of Apple mosaic virus from 'Fuji' apple. Plant Pathol J. 18, 259–265.
- Lee, G.P., Min, B.E., Kim, C.S., Choi, S.H., Harn, C.H., Kim, S.U., Ryu, K.H., 2003. Plant virus cDNA chip Hybridization for detection and differentiation of four cucurbit-infecting Tobamoviruses. J. Virol. Methods 110, 19–24.
- Lockhart, D.J., Dong, H., Byrne, M.C., Follettie, M.T., Gallo, M.V., Chee, M.S., 1996. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. Nat. Biotechnol. 14, 1675–1680.
- Menzel, W., Jelkmann, W., 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.
- Park, J., Lee, K., Kim, E., Cho, Y., Park, Y., 2001. Simultaneous detection and genotyping of hepatitis C virus (HVC) by oligonucleotide microarray. Clin. Chem. 47, 329.
- Proudhlkov, D., Kirillov, E., Cumakov, K., Donlon, J., Rezapkin, G., Mirzabekov, A., 2000. Analysis of mutations in oral poliovirus vaccine by hybridization with generic oligonucleotide microchips. Biologicals 28, 57–66.
- Saiki, R.K., Walsh, P.S., Levenson, C.H., Erlich, H.A., 1989. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 6230–6234.
- Salem, N., Mansour, A. and Al-Musa A. 2005. Viruses of pome fruit trees in Jordan. J. Plant Pathol. 87, 123–126.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., Brown, P.O. 1995. Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. Science. 270, 467–470.
- Shim, H. K., Min, Y. J., Hong, S. Y., Kwon, M. S., Kim, D. H., Yang, J.M. 2004. Nucleotide sequence of a Korean isolate of Apple stem grooving virus associated with black necrotic leaf spot disease on pear (*Pyrus pyrifolia*). Mol. Cells 18, 192–199.
- Yoshikawa, N., Yamagishi, N., Yaegashi, H., Ito, T. 2012. Deep sequence analysis of viral small RNAs from a green crinkle-diseased apple tree. Petria 22, 292–297.

주 의

1. 이 보고서는 농촌진흥청에서 시행한 「FTA대응경쟁력향상기술개발사업」의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농촌진흥청에서 시행한 「FTA대응경쟁력향상기술개발사업」의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.