

과 제 구 분	기관프로젝트	Code: LS0603	수행구분	전반기	연구기간	'00~'02(완결)
연구 과제명	수출유망 신작목 개발연구				과제책임자	정 병 찬
세부 과제명	나리무병주 생산을 위한 바이러스 검정체계 확립					
연구원별임무						
구 분	소 속	성 명	담 당 임 무			
세부과제 책임자	특화작목개발시험장	권순배	설계 및 시험총괄			
공동 연구자	"	허수정	바이러스진단 및 조직배양			
	원예연구과	엄남용	조직배양 및 시료수집			
	"	김영진	조직배양 종구 관리			
색인용어	나리, 바이러스, 무병주, 바이러스진단법					

ABSTRACT

It is a price of expensive bulb among problems to be the most important in lily culture and this brings deterioration of management income in farming families growing a lily.

This study was conducted to develop a cheap viral diagnosis kit and development of usable diagnosis program, which lily culture farmers can easily use. It was developed the antibody and genetic diagnosis techniques that can detect main viruses(LSV, CMV, LMoV) infecting lily. A ELISA diagnosis kit newly developed can be detected LSV and CMV at the same time. A merit of this kit is a labor force reduction effect of 50% and a cost reduction effect of 85% which compared with the existing commercial kits. And it was developed 3 pairs primers about three kinds of viruses for genetic diagnosis(RT-PCR). Moreover, it was established with the distinction basis that could easily judge a viral infection state it by a naked eye in lily culture field.

Consequently, using several diagnosis technology developed in this study and established effective viral detection program in a large amount of production process of lily bulb. The accomplishment results of the actual proof test in field that used this program, it was possible to control lower viral infection rate by a 1.8% level until the last production process of lily bulb.

1. 연구배경

본도의 나리재배 면적은 전국대비 24%로 높은 비중을 차지하며 특히 구근 생산은 42%를 강원도가 차지하고 있다. 화훼류 중 수출주력 작목으로 지속적으로 재배면적이 증가하고 있으나 아직까지 종구자급율이 저조하여 화란 등지에서 수입하여 사용하므로 경쟁력 약화의 요인으로 작용하고 있다. 따라서 본 도에서는 2004년부터 100% 종구자급화를 목표로 현재 대량 종구증식 사업을 수행하고 있다.

국제 경쟁력이 있는 고품질의 절화를 생산하기 위하여는 토양소독, 병해충방제 및 재배 기술개발 등이 중요하나 그보다도 먼저 바이러스가 감염되지 않은 무병종구 생산이 필수적이다.

무병, 무량종구는 생장점배양에 의해 생산가능하나 기술수준, 생장점크기, 바이러스 종류 등에 따라 바이러스 무병주 획득에 차이가 있어 생장점으로 배양한 구근이 모두 바이러스 무병주라고 단정할 수 없다.

따라서 정확하고 신뢰성 있는 바이러스 검정법이 수반된 무병종구생산 체계의 구축이 필수적이다. 바이러스의 검정방법은 항체 및 유전자진단법이 있으나, 각 방법은 실제 활용에 있어 장단점이 있기 때문에 생장점배양에서 포장양구시 까지 종구의 생육단계별로 실용적으로 활용될 수 있도록 간편한 바이러스 검정기술의 체계 확립이 필요한 실정이다.

세계적으로 나리에 발생하는 바이러스는 LSV(Lily symptomless virus), CMV(Cucumber mosaic virus), LRV(Lily rosette virus), LMoV(Lily mottle virus), BBWV(Broad bean wilt virus), LRSV(Lily ringspot virus), TRSV(Tobacco ringspot virus), CTLV(citrus tatter leaf virus) 등 20여종이 외국에서는 보고되어 있으나 우리나라에서는 CMV, LSV, LMoV의 피해가 심하다. LSV의 숙주범위는 나리과 식물에 국한되지만 CMV는 상당히 많은 작물이나 잡초 등의 보독주가 전염원임과 동시에 진딧물류에 의해 비연속적으로 옮긴다.

이들 주요 바이러스는 시기에 관계없이 발생하며 병징은 잎에 진한 녹색과 연한 녹색의 모자이크 증상이 생긴다. 잎 전체가 위축되고 기형이 되며 꽃은 잘 피지 못하고 꽃봉오리가 뒤틀리고 찢어진다. 잎에 불규칙한 황색의 줄무늬 반점이 생기고 반점들이 차츰 모여서 잎맥을 따라 가늘고 길게 나타나며 후에 잎은 말라서 위축되고 전체가 갈색으로 된다. 병의 증상만으로는 어떤 바이러스가 감염되었는지 정확한 진단이 어려우며 중복감염되면 단독감염 때보다 증상이 심하고 피해가 크다. CMV와 LSV의 중복감염으로 구근의 인편에 갈색 둥근 무늬가 형성되기도 한다.

본 연구에서는 고가의 종구 수입에 따른 생산농가의 채산성악화 개선, 저급종구의 국내 유통으로 인한 악성바이러스의 확산억제 및 국내화훼시장의 국제경쟁력 향상을 위하여 나리의 무병종구 생산 단체나 재배농가에서 손쉽게 사용할 수 있는 검정프로그램 및 검정비용을 획기적으로 낮출 수 있는 진단키트를 개발하기 위하여 본 시험을 실시하였다.

2. 재료 및 방법

가. 재배포장에서 바이러스병의 병징유형 및 이병율 조사

2000~2001년에 걸쳐서 강원도 평창 강릉, 춘천에서 재배되고 있는 포장에서 바이러스 병징유형 및 이병율을 조사하였다. 이때 조사포장은 수입종구를 직접 재배한 포장, 국내에서 유통되고 있는 종구를 재배하는 포장을 대상으로 하였다. 조사시기는 유묘기, 생육중기 및 개화기 등 전 생육기간을 통하여 실시하였으며, 병징의 유형과 분포는 품종별, 지역별로 육안검정 및 항체검정을 실시하였다.

나. 조직배양에 의한 기본종구 대량배양

실험에 공시한 나리는 재배면적이 많은 오리엔탈계통의 Casablanca, Marcopolo, Le Rebe, Acapulco, Siberia 등 5품종을 대상으로 하였다. 조직배양용 모구로 사용할 구근을 적절한 소독액에 소독한 후 무균상에서 생장점을 0.2~0.4mm 크기로 잘라 기내배양하였다. 본 시

험에 사용된 배지와 배양조건은 MS 기본배지에 NAA 0.1mg/L를 첨가하여 pH를 5.7로 조정된 배지에서 배양하였다. 배양은 조도 1,500Lux, 일장 16시간으로 조절하였고, 배양온도는 23~25℃로 유지하였다. 기내 증식은 생장점 배양 3개월 후 자구를 분할하여 MS기본배지에 BA 2.0, NAA 0.1mg/L조건에서 5~7회 정도 계대배양하여 증식하였다.

다. 종구 증식 단계별 주요 바이러스 검정기술 개발

바이러스 검정은 LSV, CMV, LMoV를 대상으로 모구, 조직배양단계에서 생장점 배양 3개월 후, 1차 및 2차 계대배양 후에 바이러스 검정을 실시하였다. 이때의 바이러스 검정 방법은 각 바이러스에 대한 ELISA 혹은 RT-PCR검정방법을 이용하였다. 각 바이러스 별 사용된 ELISA키트는 시판제품 및 자체개발한 것을 사용하였다. LMoV의 ELISA검정에는 Agdia사의 진단시약을 구입하여 사용하였으며, CMV 및 LSV의 검정에는 본 연구실에서 자체 생산한 폴리클로날 항체를 이용하여 진단키트를 개발하였다. 또한 진단노력을 획기적으로 절약하기 위하여 수종의 바이러스를 1회의 진단으로 검정을 할 수 있는 검정키트의 개발을 검토하였다. RT-PCR용 진단 프라이머는 각 바이러스의 계통별 외피단백질 유전자 염기서열을 비교하여 비교적 변이가 적은 공통배열을 참조하여 디자인하였고, 이를 이용하여 주요 바이러스 3종 바이러스의 검출에 있어 민감도 및 특이성 정도를 검토하였다. 또한 포장에서 이병주제거 작업의 효율성을 높이기 위하여 각 바이러스별 특징적인 병징 유형을 토대로 육안검정기준의 확립을 검토하였다.

라. 종구 생육단계별 바이러스의 최적 검정시기 및 검정횟수 구명 시험

종구의 대량생산을 위한 모구, 기내배양 및 포장양구 기간중에서 바이러스검정의 시기 및 검정횟수를 얼마로 하는 것이 가장 효율적인가를 검토하기 위하여 시험을 실시하였다. 바이러스 검정방법으로는 대량검정에 적합한 ELISA법을 사용하였다. 바이러스 검정의 최적조건확립을 위하여는 종구생육 단계별 검정시료 채취시기, 검정조직부위, 시료량과 바이러스 검출 민감도를 주요 평가요소로 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 재배포장에서 바이러스병의 병징유형 및 이병율 조사

나리 생육기간중에 나타나는 병징은 일반적으로 황화얼룩무늬(yellow mottling), 줄무늬(stripe) 및 모자이크(mosaic)증상 등 3종류의 병징으로 구분되었으며, 이러한 병징들의 발현에 따라 잎의 기형이나 식물체의 위축을 초래하는 경우도 간혹 발견되었다. 전체 바이러스의 이병율은 조사지역 및 품종에 따라 차이를 보였으나, 평균 47.6%의 이병율을 나타냈으며 심한 포장에서는 100%로 조사되었다. 이병율은 수입 1년차 종구를 재배한 포장보다, 국내에서 수년간 재사용한 종구를 재배한 포장에서 절대적으로 이병율이 높게 나타났다. (표 1) 이는 종구 가격이 비싸기 때문에 생산비 절감차원에서 한번 사용한 종구를 수회에 걸쳐 재사용하는 과정에서 바이러스 오염율이 증가한 것으로 판단되었다. 수입 1년차 종구 역시 품종 및 수입경로에 따라 차이는 있으나 23~29%의 높은 바이러스 오염율을 나타내, 금후 철저한 대책 수립이 필요할 것으로 사료되었다. 본 조사기간동안 조사된 주요 바이러스

스의 종류별 이병율은 LMoV, LSV, CMV순으로 높게 나타났다.

표 1. 강원도 나리 재배포장에서의 바이러스 감염실태 조사

7 조사 년도	조사 지역	품종	검정 개체수	바이러스별 이병주수 ¹⁾				이병율 (%)	비 고
				CMV	LSV	LMoV	복 합 감 염 주		
2000	춘천	콘아모르	60	0	8	10	2	27.0	수입1년차 구
	평창,춘천	카사블랑카	68	68	52	68	68	100.0	국내유통 구
	춘천	시베리아	90	2	15	6	2	23.0	수입1년차 구
2001	강릉	로사토	260	0	51	42	17	29.2	수입1년차 구
	평창	르네브	240	34	80	94	67	58.8	국내유통 구

1) 검정법 : ELISA

주요 3종바이러스의 특징적인 병징을 관찰하기 위하여 재배포장에서 생육중의 앞에서 나타난 여러증상 (모자이크, 퇴록반문, 괴저반점, 엽꼬임증상, 화편퇴록, 무증상)을 나타낸 잎을 채취하여 ELISA방법으로 바이러스 종류를 분류해본 결과는 표2와 같았다. 대부분의 바이러스가 단독감염시 모자이크 증상을 나타냈으며 복합감염시에는 괴저반점 내지 화편퇴록증상이 추가되었다. 본 시험에서 조사바이러스이외의 나리 감염 바이러스(BBWV, LVX, CTLV, TRSV)의 감염여부는 ELISA로 조사한 결과 발견되지 않았다. 표2에서 조사된 바이러스 이병종류별 특징적인 병징유형은 생육중의 나리에 있어 감염바이러스를 판별하는데 기준으로 이용할 수 있을 것으로 판단되었다. 이 기준은 포장에서 이병주제거 자체실증시험에 활용되었다.

표 2. 감염 바이러스 종류별 특징적인 병징 유형 비교

바이러스	조사주수	병 징 (주)					비 고
		모자 이 크	퇴 록 반 문	괴 저 반 점	엽 꼬 임, 생 육 불 량	화 편 퇴 록	
소 계	150						
CMV	3	3	3	-	3	-	
LSV	27	27	-	-	3		
LMoV	18	18	-	-	7	6	
CMV+LSV	9	9	7	6	5	-	
LSV+LMoV	18	18	10	2	12	9	
CMV+LSV+LMoV	3	3	3	3	3	3	
건전	72	-	-	-	-	-	

- 조사품종 : 콘아모르, -조사방법 : ELISA

2. 종구 증식 단계별 주요 바이러스 검정기술 개발

가. 주요 바이러스 진단 기술 확립

1) 나리 주요 바이러스 동시진단용 ELISA키트개발

나리의 주요바이러스인 LSV 및 CMV를 동시에 진단할 수 있는 진단키트를 개발하여 최적 사용조건을 확립하였다(표3). 이 키트는 기존의 단일바이러스 진단방식의 키트에 비하여 검정노력이 반으로 절감되고, 가격면에서도 수입진단키트의 15%수준이기때문에 종구생산비를

크게 낮출 수 있을 것으로 평가되었다. LMoV의 진단에 필요한 항체는 구입하여 사용하였다(표 4).

표 3. 나리 바이러스 (LSV+CMV)의 동시 진단 ELISA키트의 적정 사용 조건

바이러스	최 적 조 건			평균 OD ₄₀₅ 치	검출 한계 농도 (ng/ml)	
	항체농도 ($\mu\text{g/ml}$)	이병즙액 희석(배)	효소표지 항체희석(배)		개발키트	수입키트
LSV+CMV	4	$10^{-1} \sim 10^{-2}$	5×10^{-2}	1.5 ± 0.5	5	-
대조구(LSV)	2	"	5×10^{-2}	1.5 ± 0.5	5	5
대조구(CMV)	"	"	"	"	"	"

- 진단방법 : 바이러스 항체코팅(4시간)→이병식물 즙액처리(4)→효소표지항체 반응(4)→기질첨가 이병유무 진단(1/2)

표 4. Lily mottle virus(LMoV)의 항체진단법 확립

진단키트	최 적 조 건			평균 OD ₄₀₅ 치	검출한계 희석배수 (w/v)
	이병즙액 희석(배)	항체농도 ($\mu\text{g/ml}$)	효소표지 항체희석(배)		
Potyvirus group	$10 \sim 10^{-2}$	2	2×10^{-2}	1.5 ± 0.5	이병염 10^{-5}

2) 유전자 진단법 확립

각 바이러스에 대한 특이프라이머를 제작하여 PCR진단법을 확립하였다(표 5). 각 바이러스이병주의 즙액을 PCR반응시킨 후 전기영동한 결과 각 바이러스의 존재여부를 확인할 수 있는 PCR산물이 생성되었다(그림 1).

표 5. 나리 주요바이러스의 유전자진단을 위한 특이 프라이머 세트의 염기배열 디자인

바이러스	프라이머 염기배열(5'-3')	검출 한계 농도 (ng/ml)	특이 밴드 크기(bp)
LSV	GATGTCGAAGGTGTCAAAGCTGC CACTGTTAGAGCAACGACTAACCC	$10^{-2} <$	551
CMV	GAGTCATGGACAAATCTG AACACGGATTCAAATCTGG	"	650
LMoV	GGCTGTTTCATCTGGAAGTGTGC CATGGTTTGTGCATAGAGAATGG	"	300

- 진단방법 : RNA추출(0.5시간) → 역전사효소(0.5) → PCR반응(1.5) → 전기영동으로 이병 유무 판정(0.5)

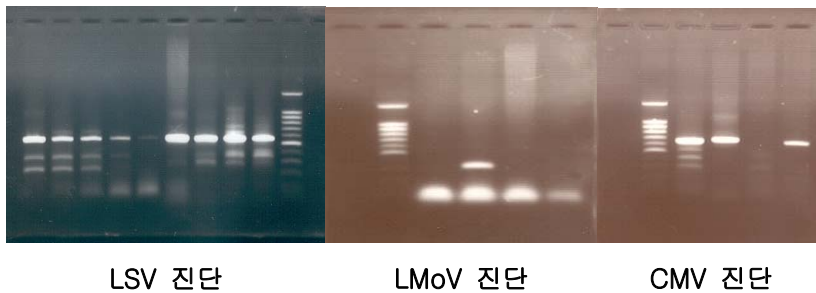


그림 1. 나리 주요바이러스의 유전자진단 결과 전기영동사진

나. 종구 생육단계별 바이러스의 최적 검정시기 및 검정횟수 구명 시험

무병, 우량종구 대량생산의 성공여부는 종구생산 과정에서 각 생육단계별로 바이러스의 정확한 진단 및 2차감염으로 인한 바이러스병의 확산 방지가 중요한 관건이다. 그러나 종구생산과정은 모구선발에서 개화구 육성까지 약 4년의 장기간이 소요되기 때문에 이 기간 동안 바이러스 검정이 효율적으로 이루어질 필요가 있다. 본 연구에서는 검정의 효율성을 높이기 위한 방안으로 모구, 기내의 계대배양묘, 정식 후 포장양구묘를 대상으로 최적 검정시기 및 적정검정횟수를 검토하였다. 표6의 결과에서처럼 최적 검정시기는 모구선발시 및 1차계대배양 후 60일 경과 시 인편 혹은 경엽을 100mg 채취하여 ELISA방법으로 검정하는 것이 바이러스 검출감도가 높았다. 포장에 정식한 묘의 경우는 본엽 4~5매가 출현한 시기부터 바이러스 이병주는 병징이 선명하게 나타남으로 육안검정이 효과적이었으며, ELISA법에서도 10⁻⁵희석액까지 바이러스 이병여부 검정이 가능하였다. 결과적으로 적정검정시기 및 횟수는 전 종구생산과정동안 1) 모구 및 기내배양시 각 1회 ELISA검정 2) 포장양구시 2회/년 육안검정을 실시하는 것이 효과적으로 판단되었다(표 7).

표 6. 시료채취 시기별 주요 3종 바이러스의 검출한계

바이러스 검정시기	채취부위(mg)	이병즙액희석(w/v)					비고
		10	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
모구 선발 시	인편(100)	1.6 ¹⁾	1.5	1.1	0.7	0.2	
계대배양 후 30일	인편+경엽(")	1.1	0.7	0.4	0.2	0.2	기내배양
계대배양 후 60일	경엽(")	2.5	1.5	1.2	0.6	0.2	"
정식 후 본엽 4~5매	엽(")	2.8	2.8	2.8	2.3	0.7	망실재배
건전주	엽(")	0.13	0.15	0.16	0.14	0.15	

1) ELISA reader에서 O.D값 0.30이상 : 이병판정

표 7. 나리 종구 생산시 주요 바이러스 (OM, LSV, LMoV)의 효율적인 진단을 위한 검정 프로그램

종구 육성단계	시기	바이러스 검정				비고
		방법	조직(부위)	시료량(mg)	횟수	
모구 선발	모구선발 시	ELISA	인편	100	1	이병주 제거
기내 배양	1차계대배양 60일경과 후	ELISA	경엽	100	1	"
포장 양구 ¹⁾ (소 중 개화구)	생육기간중	육안검정	엽	-	2회/년	"
	"	항체진단	엽	100	-	육안판별 곤란시 활용

1) 포장양구는 진단물 비래 방지를 위하여 망실재배

다. 개발된 바이러스 검정 프로그램에 따른 나리 종구 생산시 주요 바이러스 경감효과 조사

개발된 바이러스 검정 프로그램에 따라 나리 종구 대량생산 전과정동안 바이러스검정을 실시한 결과 최종 양구단계(종구~개화구)까지 낮은 바이러스 이병율의 유지가 가능하였다. 즉 2000

부터 2002년까지 3년에 걸쳐 실증시험을 실시한 결과, 표 8과 같이 바이러스 이병율을 1.8%(LMoV-0.4, LSV-1, CMV-0.4)수준까지 유지할 수 있어 「네델란드 구근품질 등급 (S> EE> E> ST)규정」의 EE급(LMoV-0.5, LSV-5, LVX-1)이상의 바이러스 오염도가 낮은 고품질 종구의 대량생산이 가능하였다. 따라서 금후 나리종구 대량생산 사업 시의 바이러스 검정은 본 연구에서 도출된 검정프로그램을 활용하게 되면 거의 완벽한 수준의 바이러스-free종구 생산이 가능할 것으로 결론되었다.

표 8. 실증시험('00~'02)수행 결과, 종구 증식단계별 바이러스 이병율 경감 추이

증식단계	조사 년도	조사 주수	조사 부위	이병주수 ¹⁾				이병율 (%)
				CMV	LMoV	LSV	계	
배양용 모구	2000	617	인편	30	55	61	146	23.1
기내배양구	2000	5,286	경엽	214	41	100	355	6.5
소구	2001	630	엽	4	2	6	12	1.9
종구	2002	1350	엽	6	4	14	24	1.8

1) 바이러스 종류별 이병주수 조사 : ELISA

4. 적 요

가. 진단법 개발

- 1) 항체진단법 (ELISA)
 - 나리에 발생하는 LSV 및 CMV-lily의 동시진단용 키트 자체개발
 - 검정노력 절감 (50%↓) : 1회 진단으로 2종 바이러스 진단 가능
 - 진단키트 구입비용 절감(85%↓) : 기존(수입 키트 : 2종 바이러스 검정 = 2,000원/점)
→ 신개발 키트 (300원/점)
 - LMoV의 진단은 Potyvirus group진단용 키트 이용 체계확립
- 2) 유전자진단법 (RT-PCR)
 - 유전자 진단용 primer 3종 개발 및 신속RT-PCR법 확립(3시간)
- 3) 육안검정을 위한 판별기준 정립

바이러스	특징적 병징
CMV	모자이크> 퇴록반문> 엽꼬임, 생육불량
LSV	모자이크> 퇴록반문> 생육불량
LMoV	모자이크> 엽꼬임, 생육불량> 화편퇴록
CMV+LSV	모자이크> 퇴록반문> 괴사반점> 엽꼬임, 생육불량
LSV+LMoV	모자이크> 퇴록반문> 엽꼬임, 생육불량> 화편퇴록> 괴사반점
CMV+LSV+LMoV	모자이크, 퇴록반문, 괴사반점, 엽꼬임, 생육불량, 화편퇴록

나. 종구 증식단계별 검정기준 정립

- 1) 모구(1회) : 선발 후 인편을 ELISA 검정
- 2) 기내 배양(1회) : 1차 계대배양 후 2개월 경과 시 경엽을 ELISA 검정
- 3) 포장 양구(2회/년)
 - 육안검정 : 명료한 병징 발현주(바이러스판별기준 참조)
 - 향체진단 : 생육불량 및 감염의심주

종구생산단계	바이러스 검정방법 및 횟수
↓ 모 구 선 발	↓
↓ 생장점배양	ELISA (1차)
↓ 1차 계대배양	↓ ELISA (2차)
↓2~3개월	또는
2, 3, 4차 계대배양	ELISA (2차)
↓6~9개월	
구비대, 저온처리	↓
↓5~6개월	
순화, 소구양구	육안 (3차)
↓ 중 구	↓
↓ 개화구	육안 (4차)

- 바이러스 검정 프로그램 모식도 -

다. 개발된 바이러스 검정 프로그램 활용효과 시험

- 나리 종구 생산시 최종 양구단계 (중구~개화구)까지 낮은 바이러스 이병율 유지가능
 - 3년간('00~'02) 실증시험결과, 바이러스 이병율을 1.8%(LMoV=0.4, LSV=1, CMV=0.4)수준까지 유지할 수 있어 「네델란드 구근품질 등급(S> EE> E> ST)규정」의 EE급(LMoV=0.5, LSV=5, LVX=1)이상 고품질 종구 생산가능

5. 인용문헌

Allen, TC. 1980. Diagnosis of virus diseases of lilies. Lily Yb. N. Amer. Lily Soc.33:41~43.
 Clark, M and Adams, A.N 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J.Gen Virol 34: 475~483
 Lawson, RH 1981. Controlling virus disease in major international flower and bulb crops. Plant Disease 65:780~786

6. 연구결과 활용제목

- 나리의 우량종구 생산을 위한 주요 바이러스 검정 프로그램 개발 (2002. 영농활용)
- 나리의 주요 2종 바이러스 (LSV, CMV) 동시진단용 ELISA키트 개발 (2002. 영농활용)