

어젠다코드	1 - 3 - 8		구분	완결	
기술분야코드	V1	기술유형코드	P01	작목구분코드	VC-01-090203
과제종류	공동연구		세세부사업	생명산업기술개발	
연구과제 및 세부과제			수행기간	소속	과제책임자
시설재배에 적합한 복합내병성, 단절간 호박품종의 개발보급			'12~'16	홍익바이오	서상기
1) 호박바이러스(WMV, ZYMV) 및 흰가루병의 내병성 검정 및 선발			'12~'16	환경농업연구과	권순배
색인용어	호박, 쥬키니황화모자이크바이러스, 수박모자이크바이러스, 흰가루병, 내병성검정				

## ABSTRACT

This study has been conducted to development of the mass, high effective diagnosis methods to the major viruses (zucchini yellow mosaic virus, watermelon mosaic virus) and powdery mildew disease infecting pumpkins. Also, for combined disease resistance diagnosis of 2 pumpkin viruses and powdery mildew disease and selection of the disease resistance lines for breeding new pumpkin cultivars. The results of this study are as follows. Firstly establishment of mass diagnostic technology for efficiency of disease resistance test : establishment of inoculation method for pressurized fine particle spray (Inoculation rate ; 95% or more). Secondly, diagnosis and selection of disease resistant lines using mass inoculation techniques : selected 47 lines for 5 years and development of a quick and on-site diagnostic kit for two kinds of pumpkin viruses (zucchini yellow mosaic virus, watermelon mosaic virus). These results will contribute to the production of environmentally friendly agricultural products by reducing production costs to develop pumpkin varieties that are resistant to viruses and powdery mildew diseases, and will help many farmers early diagnosis and prevention of spread of pumpkin viral diseases using on site viral diagnostic kit.

### 1. 연구목표

본 과제는 호박의 신품종 육종을 수행함에 있어서 효율적인 바이러스(WMV 및 ZYMV)와 흰가루병 검정기술을 개발하고, 이 검정기술을 활용한 내병성 호박 계통의 선발이 주목적이며, 수박모자이크바이러스(WMV)와 쥬키니황화모자이크바이러스(ZYMV) 감염 여부를 호박재배의 영농현장에서 실용적으로 조기진단 할 수 있는 바이러스 현장검정키트의 개발을 두 번째 목적으로 하여 연구를 수행하였다.

## 2. 재료 및 방법

〈세부과제 : 호박바이러스(WMV, ZYMV) 및 흰가루병의 내병성 검정 및 선발〉

### (시험 1) 호박 내병성품종 육성을 위한 검정용 표준 병원균주 선발

애호박 및 주키니호박으로부터 자연 감염된 수박모자이크바이러스와 주키니황화모자이크바이러스의 순수분리 및 흰가루병(*S. fusca*) 균주를 채집하여 계대배양하면서 보존하며 실험의 접종원으로 이용하였다.

### (시험 2) 내병성 검정 효율화를 위한 대량접종기술 확립

바이러스 접종 효율화를 위해 Spray gun method의 개선을 통한 바이러스 종류별, 유묘 생육기에 따른 고효율 접종법 확립을 도모하였다. 계대배양한 각 바이러스 균주의 이병즙액을 CO<sub>2</sub> 가압(2, 3, 4 bar) 미립자분무장치에 의한 접종방법의 효율화를 검토하였다. 흰가루병의 고효율 spore spray inoculation method 확립을 위하여 계대배양한 각 균주의 흰가루병 포자를 10<sup>6</sup> spores/L 농도 현탁액의 분무접종(10, 50, 100ml/주)법을 검토하였다.

### (시험 3) 단독 및 복합내병성 계통의 선발

상기 병원균에 대한 단독, 복합내병성 계통 선발의 내병성 판별기준은 다음의 매뉴얼에 따랐다.

#### (1) 바이러스 저항성(내병성) 판정

바이러스의 인공접종 후 나타나는 식물체에 발현되는 외형적인 병징의 조사는 주 전체의 위축, 잎의 모자이크 증상 등을 육안으로 관찰하여, 조사 계통별로 등급별 발병지수(0-9)로 표시하였다. 또한, 바이러스를 접종한 호박 계통들 중에서 외부병징이 발현되지 않는 계통들에 대하여는 항체진단(ELISA, immunostrips)과 유전자진단(RT-PCR)법을 활용하여, 무병징감염 계통 또는 무감염 계통(조합)을 검정하였다.

0 : 발병 없음, 1 : 어린 잎 병징경미, 3 : 전체 잎 병징경미, 5 : 전체 잎 모자이크 병징 또는 경미한 위축, 7 : 일부 낙엽 또는 위축, 9 : 심한 위축 또는 낙엽
---

#### (2) 흰가루병 저항성 판정

발병정도는 병반면적율로 0%인 경우 (0, 무감염), 0.1~5%인 경우는 (1, 경미), 5.1~20% 경우를 (2, 약), 20.1~30는 (3, 중), 30.1~40는 (4, 심), 40.1이상 이상인 경우는 (5, 극심) 으로 지수화하여 각 계통(조합)의 흰가루병 내병성을 검정하였다. 본 선발 매뉴얼에 따라 흰가루병 내병성 또는 저항성 호박 계통(조합)을 선발하였다.

#### (시험 4) 호박 바이러스 진단키트 개발

내병성 검정의 효율성을 높이기 위하여 호박 맞춤형 「실시간 진단키트(Immunostrips), 현장진단 키트」 및 「다량 신속진단키트(ELISA)」 개발을 수행하였다. 실시간 진단키트는 ZYMV 또는 WMV 감염 유무를 육종포장에서 실시간 검정에 활용하고, 다량 신속진단키트는 육종 과정 중 다수의 내병성계통들의 ZYMV, WMV의 식물체내 감염 정도를 정량적으로 분석하는데 활용하고, 아울러 개발된 바이러스 진단키트는 호박 등 박과류 재배농가의 바이러스 조기 진단 진단서비스에 이용함으로써 농가의 바이러스병 조기진단을 위한 애로기술 해결에도 도움을 주고자 하였다.

### 3. 결과 및 고찰

〈2012년 수행〉

#### (시험 1) 내병성 검정용 표준 병원균주 동정

내병성 검정에 활용할 병원균의 표준균주를 선발 하였다. 주키니황화모자이크바이러스(ZYMV)는 강원도 춘천의 주키니 재배포장에서 심한 모자이크 증상을 보이는 감염주로부터 ZYMV를 분리하였다. 수박모자이크바이러스(WMV)는 강원도 화천의 애호박포장에서 전형적인 WMV 증상을 보이는 감염주로부터 분리하였다. 2종의 바이러스 균주의 동정(Identification)은 본원이 보유하고 있는 각 바이러스의 표준항체에 대한 항원항체면역반응(agar gel double diffusion test)을 통하여 확인 하였다. 또한 흰가루병은 강원도농업기술원 애호박 시험포장에서 채집하여, 흰가루병원균 분류 기준에 의거하여 동정하였다. 또한 순수분리한 바이러스 및 흰가루병원균은 시판 애호박(농우애 호박) 및 주키니(서울올주키니)에 인공접종하여 각 균주의 이병엽을 냉동보존 또는 식물체에 유지 하면서 시험의 접종원으로 사용하였다. 본 실험에서 분리한 2종 바이러스에 대한 항원항체면역검정 결과, ZYMV 및 WMV로 동정되었으며, 건전애호박 유묘에 인공접종한 결과 전형적인 바이러스 병징이 재현되었다. 호박의 주키니황화모자이크바이러스와 수박모자이크바이러스는 바이러스 분류상 Group IV(+ssRNA, Potyviridae과, Potyvirus에 속하는 750nm의 사상형 바이러스이다. 이들 바이러스는 거의 대부분의 박과작물들에 감염성을 가지며, 전염방법은 진딧물 및 즙액전염이 주 경로이다.

호박의 흰가루병은, 주로 잎에 발생하며 잎자루와 줄기에도 발생한다. 잎에는 처음 흰색의 분생 포자가 점점이 나타나고, 진전되면 잎 전체에 밀가루를 뿌려 놓은 것 같은 증상으로 변한다. 기온이 서늘해지면 병반상에 자낭각이 형성된다. 자낭각의 형태로 병든 식물체 잔재에서 월동하여 1차전염원이 되며, 분생포자가 공기전염 되어 계속해서 발생한다. 흰가루병 접종원은 강원도 농업기술원 애호박 시험포장에서 채집하였으며 *Sphaerotheca fusca*로 동정되었다. 이 균주는 생물검정 격리 온실에서 애호박 및 주키니호박에 계대보존하면서 실험에 이용하였다. 흰가루병 포자 현탁액을 호박 건전묘 잎에 분무접종시 감염이 용이하였다. 또한 본시험 수행되는 인도네시아 포장의 경우

에서는 따뜻한 기후의 영향으로 자낭각(포자)을 형성하는 세대가 없이도 연중 분생포자가 주 전염원으로 역할을 하여, 인도네시아 호박재배지에는 자연발생하는 흰가루병이 늘 상존함을 관찰할 수 있었다. 이 점에 착안하여 다량의 육성계통을 1차 선발하는 인도네시아포장에서 흰가루병 저항성(내병성) 호박계통의 선발에는 흰가루병 인공접종법을 사용하는 국내의 선발시험과 다르게 인공접종법을 사용하지 않고, 호박 생육 전 기간의 관찰을 통하여 흰가루병에 강한 계통을 선발하였고, 2차선발은 국내 실험포장에서 실시하였다.

### (시험 2) 내병성 검정 효율화를 위한 대량접종기술 확립

바이러스 대량접종은 가압 미세분무기를 이용하였다. 접종원으로는 각각의 바이러스에 감염된 애호박 또는 주키니잎 10g을 100ml~200ml의 0.1M 인산완충액(pH7.2, 0.2% sodium silfite, 10mM 2-mercaptoethanol)을 넣고 냉각된 막자사발에서 미세하게 분쇄 후, 2겹 거즈로 거른 이 병즙액에 1%의 celite 545와 1%의 카보랜덤(400grit)를 첨가하여 분무액으로 사용하였다. ZYMV 또는 WMV2를 high pressure spray gun을 이용하여 호박의 유식물체에 즙액접종(압력 2 bar) 결과 95% 이상의 감염율을 높일 수 있었다. 또한 애호박 1주당 접종에 소요되는 시간은 평균 2초 정도로 면봉 등을 이용하는 관행접종방법에 소요 되는 약 20초에 비하여 접종시간을 10배 단축할 수 있었다. 이는 대량의 선발육종에 유용하게 이용될 수 있는 방법이라고 판단되었다. 흰가루병의 접종은 Spore spray inoculation method를 사용하였다. 애호박에서 계대배양한 흰가루병 포자를 수거하여 멸균증류수로  $10^6$  spores/L 농도로 현탁액을 조제하여 일반 소형 스프레이로 잎에 분무하여 접종하였다. 접종엽의 흰가루병 발생율은 100%로 안정적 병징이 발현되었다.

### (시험 3) 내병성 계통의 선발

2012년 1년차 시험에서는 호박 육성조합 234계통을 공시하여 4회에 걸쳐서 인도네시아 육종포장 및 강원도농업기술원 내병성 검정시설에서 수행하였다. 실험바이러스로는 주키니황화모자이크바이러스(Zucchini Yellow Mosaic Virus, ZYMV)와 수박모자이크바이러스(Watermelon mosaic virus2, WMV2), 오이모자이크바이러스(Cucumber mosaic virus) 그리고 흰가루병원균(*Sphaerotheca fusca*)을 접종원으로 사용하였다. 호박 육성조합에 대한 병원균의 접종방법은 상기의 재료 및 방법에 따랐다.

#### (가) 인도네시아 육종포장에서 바이러스 내병성 선발시험

본 시험은 2012년 1월부터 3월에 걸쳐 수행되었다. 본시험에 공시한 계통은 162계통(SQ1~162)으로 ZYMV와 CMV에 대한 내병성 검정을 실시하였으며, 그 결과 34계통의 내병성계통을 선발하였다.

#### (나) 흰가루병 저항성 계통 선발

본 시험은 2012년 5월부터 8월에 걸쳐 강원도농업기술원 포장에서 수행하였다. 본 시험에는 흰가루병에 대한 내병성 검정을 실시하였다. 그 결과 흰가루병 내병성 2계통 선발 (K05, K06)을 선발하였다. 이 2계통은 흰가루병 발병도는 주당 흰가루병 발생 병반면적율이 0.1~5% 수준인 발병도1.2~1.3의 높은 저항성을 보였다.

#### (다) 국내포장 바이러스 내병성 선발시험

2012년 5월부터 8월에 걸쳐 강원도농업기술원 포장에서 수행되었다. 본시험에는 주키니 황화모자이크바이러스(ZYMV)에 저항성을 평가하였다. 그 결과 K03 및 K05를 선발하였다.

#### (라) 복합내병성 계통의 선발

2012년 8월부터 10월에 걸쳐 강원도농업기술원 포장에서 수행하였다. 본시험에서 ZYMV, WMV2 및 *Sphaerotheca fusca*에 복합 내병성계통을 실시하였다. ZYMV 단독 내병성 25계통, WMV 단독 내병성 25계통, 흰가루병 단독 내병성 16계통을 선발하였다. 또한 바이러스 및 흰가루병에 복합저항성을 가지는 11 계통이 선발되었다.

### <2013년 수행>

#### (시험 1) 내병성계통의 선발

호박 육성조합 169계통을 공시하여 2차에 걸쳐 인도네시아 육종포장과 강원도농업기술원 내병성 검정시설에서 수행하였다. 주키니황화모자이크바이러스, 수박모자이크바이러스 그리고 흰가루병 원균을 접종원으로 사용하였다. 호박 육성조합에 대한 병원균의 접종방법 및 각 병원균의 저항성 판별은 연구수행방법에 기술된 방법을 따랐다.

#### (가) 인도네시아 육종포장에서 바이러스 내병성계통 선발

본 시험은 2013년 1월부터 3월에 걸쳐 수행되었다. 공시계통은 127계통으로 ZYMV와 WMV에 대한 내병성 검정을 실시하여 46종 바이러스 내병성계통을 선발하였다.

#### (나) 국내포장에서 바이러스 내병성계통 선발

본 시험은 2013년 9월~10월에 걸쳐 수행하였다. 공시한 42계통은 2013년 인도네시아 포장의 1차 내병성 검정에서 저항성을 나타냈던 선발 계통이다. 국내 선발시험에서 복합바이러스 내병성 계통은 8종(KB05, KB07, KB08, KB09, KB11, KB12, KB13, KB35)이 선발되었다. 바이러스 저항성 8계통 중에서 흰가루병에 매우 강한 계통은 5종(KB05, KB07, KB08, KB09, KB13)을 선발하였다.

#### (시험 2) 호박바이러스 현장진단키트 개발

ZYMV 항원 정제를 위해 바이러스병에 감염된 호박의 잎으로부터 순수분리한 ZYMV를 접종원으로 이용하였다. 본 바이러스의 외피단백질을 코딩하는 염기서열이 국내에서 기보고된 ZYMV-k1 계통의 염기서열과 98%의 상동성을 보여 국내에 과거부터 다발생하고 있는 ZYMV로 확인되었다. 이 바이러스는 온실에서 잡균에 오염되지 않게 건전하게 생육시킨 애호박 유묘에 ZYMV를 인공 접종하여 바이러스를 대량증식하였다. 인공접종법은 금강사(600mesh)를 본엽이 4~6엽 정도 자란 애호박의 잎에 소량씩 산포하고 ZYMV 감염 즙액을 소형멸균거즈구(Ø2cm)에 충분히 흡수시켜서 잎 표면을 약하게 문지르면, 금강사에 의해 생성된 엽조직세포의 상처부분을 통하여 ZYMV는 건전 호박에 감염시켜서 증식시켰다. 약 20일이 경과한 후에, ZYMV 병징을 보이는 호박잎을 채취하여 조직 내의 바이러스를 정제하여 항원으로 이용하였다. ZYMV의 정제방법은 다음 방법으로 수행

되었다. 먼저 ZYMV에 감염된 신선한 호박잎 200g에 600밀리리터의 0.1몰의 인산완충액(pH7.0)을 넣고, 저속기로 착즙액을 내어 8,000xg에서 30분간 1차 원심분리한 후, 상등액을 2차로 76,000xg에서 2시간 동안 초원심분리(Beckman, USA)하였다. 원심분리 된 펠렛(pellet)을 20% 설탕액에 재부유시키고, 설탕밀도 구배 초원심분리(sucrose density gradient ultracentrifugation, 60,000xg, 90분)를 수행한 다음, 가시광하에서 튜브 내 유백색 층의 바이러스 분획(fraction)을 분리하였다. 이 분획액을 0.01몰의 인산완충액(pH7.0)에 재희석하여 120,000xg에서 2시간 동안 초원심분리(Beckman, USA)하였다. 원심분리 된 펠렛(pellet)을 2ml 0.01몰의 인산완충액(pH7.0)에 용해시킨 후, 다시 8,000xg에서 30분간 원심분리하여, ZYMV를 분리하였다. ZYMV 항체 제조는 상기단계에서 정제된 ZYMV 항원을 면역원으로 사용하여 뉴질랜드 화이트 레비트에 면역시켰다. 1회 면역은 0.5ml Freund's complete adjuvants에 희석한 0.5mg/ml의 항원을 주사하고, 그 2주 간격으로 2회 더 Freund's incomplete adjuvants에 희석한 항원을 주사한다. 부분채혈 및 미침강반응법으로 역가를 확인하고, 역가상승을 위하여 추가로 0.5mg/ml의 항원을 1회 혈관주사하고 10일 후에 16시간 절식시킨 면역동물의 경동맥으로부터 채혈을 실시하였다. 채취한 혈액은 2,000xg에서 5분간 원심분리하여 항혈청액을 얻고, 여기에 0.01% 소듐아자이드(sodium azide)를 첨가, 1ml 바이알에 분주하여 동결건조시켜 보존하였다. 보존 항혈청으로부터 면역글로블린 항체 정제키트를 이용하여 항체를 정제하였다. 얻어진 항체는, ZYMV항원을 면역원으로 하여 제조된 ZYMV에만 특이적인 반응을 하는 항체이다. 현장진단키트의 스트립의 제조시 멤브레인 코팅 공정은 니트로셀룰로오스 멤브레인의 검사선 "V" 위치에 ZYMV에 특이적인 항원에 대한 항체를 코팅하고, 대조선 "C" 위치에는 산양 항토끼 항체를 각각 코팅하였다. 여기서, 상기 ZYMV 항원에 대한 항체는, PBS(phosphate buffered saline, pH 7.0)를 이용하여 0.5~1.0mg/ml 농도로 희석하여 사용하였다. 항체-금 접합체 제조 공정은 ZYMV 항체를 금콜로이드와 결합시켰다. 구체적으로, 염화금을 시트르산 나트륨 용액으로 환원시켜, 532nm에서의 흡광도가  $10 \pm 1$ 이 되도록, 약 40nm 크기의 금 입자를 제조하였다. 상기 금 입자를 PEG(poly ethylene glycol) 용액으로 안정화시킨 후, ZYMV 항체에 일정 비율(10 $\mu$ g/ml)로 혼합하고, 폴리에스테르 또는 유리 섬유에 함침 및 건조시켜, 금-패드 제조하였다. 흡수 패드 제조 및 스트립 조립은 상기 니트로셀룰로오스 멤브레인 상단에 건조된 흡수 패드를 부착하여, 니트로셀룰로오스 멤브레인을 통과한 반응 용액이 잘 흡수될 수 있도록 하였다. 조제 현장진단키트의 ZYMV 바이러스의 검출 한계를 시험하기 위하여, ZYMV 바이러스의 농도를 희석하면서 미세침강반응(Microprecipitation) 시험을 실시하였으며, 그 결과 미세침강반응 역가는 U형의 96 웰 플레이트(well plate)의 13개의 웰(well)에 PBS(pH7.2)를 50 $\mu$ l씩 첨가하고, 1번 웰(well)에 ZYMV 항혈청을 50 $\mu$ l 첨가한 후, 2배 단계 희석하였다. 그 후, 각 웰에 0.1mg/ml 농도의 ZYMV를 50 $\mu$ l 씩 첨가하고 잘 흔든 다음, 37 $^{\circ}$ C에서 120분간 정치하였다. 미침강반응 역가는 각 웰의 항원-항체 반응에 의해 만들어진 응집물을 만드는 항체의 최고 희석 배수로 결정하였다. ZYMV 항체의 미침강반응 역가는 1/32이고, 신속 면역크로마토그래피 진단 키트에 의한 ZYMV 검출한계는 검체내의 바이러스 농도가 0.1mg/ml 경우는 1/4,096 희석배수(0.024 $\mu$ g/ml)까지 검출할 수 있었다.

## 〈2014년 수행〉

### (시험 1) 내병성계통의 선발

인도네시아 육종포장에서 선발은 2014년 1월부터 3월에 걸쳐 수행되었다. 본 시험에 공시한 계통은 205계통으로 ZYMV와 WMV에 대한 내병성 검정을 실시하였으며, 그 결과 34계통의 바이러스 내병성계통을 선발하였다. 국내 포장에서 내병성 선발시험은 2014년 9월~10월에 걸쳐 강원 농업기술원에서 수행하였다. 공시 34계통은 2014년 인도네시아의 1차 내병성 검정에서 선발된 계통이다. 그 결과, 2차 선발된 바이러스(WMV 및 ZYMV) 및 흰가루병에 내병성인 계통은 11(KC03, KC06, KC21, KC24, KC6, KC27, KC28, KC29, KC30, KC33, KC34)종은 외관상 건전주와 유사한 내병성을 보였다. 이들 11계통의 세포조직내부에서의 바이러스 감염, 증식여부를 RT-PCR로 분석한 결과, KC6 및 KC34계통은 무감염하는 고도 저항성 계통이고, 나머지 9계통(KC03, KC21, KC24, KC6, KC27, KC28, KC29, KC30, KC33)은 WMV 및 ZYMV에 감염은 일어나지만, 병징 발현이 강하게 억제되는 내병성형질을 가짐을 알 수 있었다.

### (시험 2) 호박 바이러스 현장진단키트 개발

오이모자이크바이러스(CMV)를 항원으로 토끼에서 항혈청을 제조하고, 감마글로브린을 정제하여, 전년도에 제작한 주키니황화모자이크바이러스(ZYMV)의 immunostrips 제조방법에 따라 CMV 현장진단키트를 제작하였다. 그림1은 특허출원한 ZYMV 키트의 요약 명세서이다.

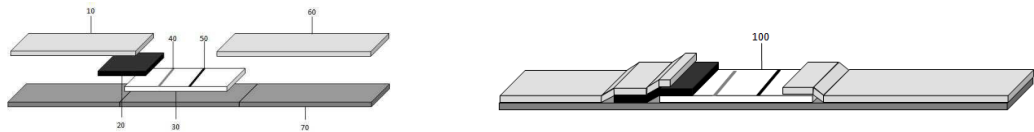


그림 1. ZYMV 현장진단키트 개발 (특허출원번호 10-2014-0141843)

면역크로마토그래피를 이용한 ZYMV 신속 진단키트 및 ZYMV 진단방법에 관한 것으로 보다 상세하게는 종이 또는 플라스틱 소재의 지지판 위에 검사선과 대조선을 포함하는 니트로셀룰로오스 멤브레인(nitrocellulose membrane)이 구성되고 상기 니트로셀룰로오스 멤브레인의 한쪽에는 콘쥬게이트 패드(conjugate pad)를 중첩되게 붙이고, 상기 콘쥬게이트패드 위에 바이러스 감염증액을 흡수하는 샘플 패드(sample pad)가 중첩되어 구성되며; 상기 니트로셀룰로오스 멤브레인의 타측에는 지지판(supported plate) 위에 반응이 종료된 바이러스 감염증액을 흡수하는 흡수 패드(absorption pad)로 구성되는 면역크로마토그래피를 이용한 ZYMV 신속 진단키트 및 면역크로마토그래피를 이용한 ZYMV 진단방법

## 〈2015년 수행〉

### (시험 1) 내병성계통의 선발

2015년 인도네시아 육종포장 및 강원도농업기술원 격리온실에서 수행하였다. 선발계통 28종은 2015년 인도네시아의 1차 내병성 검정에서 선발된 계통들이다. 육안검정 및 유전자검정에서 바이러스 내병성인 계통은 9(KA102, KA104, KA106, KA107, KA108, KA109, KA110, KA113, KA124)

계통이 선발되었다). 이들 9계통에 대한 바이러스 이병여부를 RT-PCR로 분석한 결과, 5계통 (KA106, KA107, KA108, KA109, KA110)은 3종 바이러스에 전혀 감염하지 않는 고도 저항성 계통이었다. KA102, KA104, KA113, KA124는 ZYMV에만 미약한 양성반응을 나타냈다. 이 결과로부터 국내에 주로 발생하는 ZYMV, CMV, WMV에 대하여 내병성 형질의 가진 추키니호박 7계통, 단호박 1계통 및 애호박 1계통이 선발되었다. 상기 9계통은 흰가루병에도 내병성을 가지는 계통으로 선발되었다.

**(시험 2) 호박 바이러스 현장진단키트 개발**

정제한 WMV 항원을 면역원으로 뉴질랜드 화이트 레비트에서 항혈청을 제조하였으며, 완성된 항체는 WMV에 특이적인 반응을 나타냈다. 항체를 이용하여 제작된 WMV 현장진단키트의 진단 한계농도를 그림 2에 나타냈다.

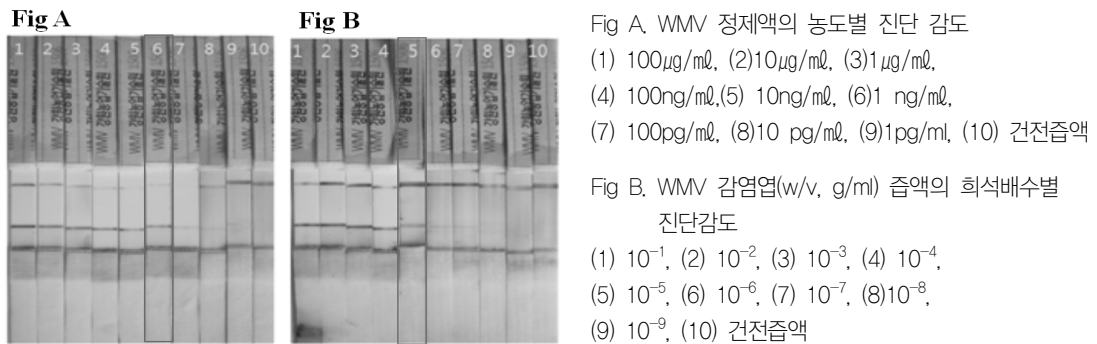


그림 2. WMV 현장진단키트(WMV-SIS kit)의 진단 한계농도

**<2016년 결과>**

**(시험 1) 내병성 검정용 표준 바이러스 균주의 유전자 분석**

2012년부터 2016년에 본 시험에서 이용된 2종의 바이러스 균주에 대한 유전자 분석을 실시하였다. ZYMV 분리주는 2005년 안동지역의 호박에서 채집되어 보고된 ZYMV KR-PA와 97.2%의 높은 유전자 상동성을 가짐을 확인하였다. 또한, WMV는 국내에서 분리 보고된 WMV 계통인 accession number AB369278 분리주와 97.%의 높은 상동성을 보였으며, 동시에 접종실험을 통한 기주식물에서 병원성이 재현되었다(그림 3).



그림 3. 실험에 이용된 균주(ZYMV, WMV, 흰가루병)의 시판애호박 품종에서 재현된 병징

내병성 검정 효율화를 위한 바이러스의 대량접종기술로서 가압 미세분무장치를 활용하여 바이러스 감염즙액에 0.5% celite 545와 0.5% 카보란덤(400grit)을 첨가하여 인공접종시 95%의 높은 접종효율을 얻었으며 접종에 소요되는 시간도 관행접종법보다 10배의 효율이 높았다(그림 22). 흰가루병의 접종은 spore spray inoculation method를 사용하였다. 애호박에서 계대배양한 흰가루병 포자를 수거하여 멸균증류수로 106 spores/L 농도로 현탁액을 조제하여 일반 소형스프레이로 잎에 분무하여 접종하였다. 접종엽의 흰가루병 병징의 재현율은 100%로 안정적이었다(그림 4).

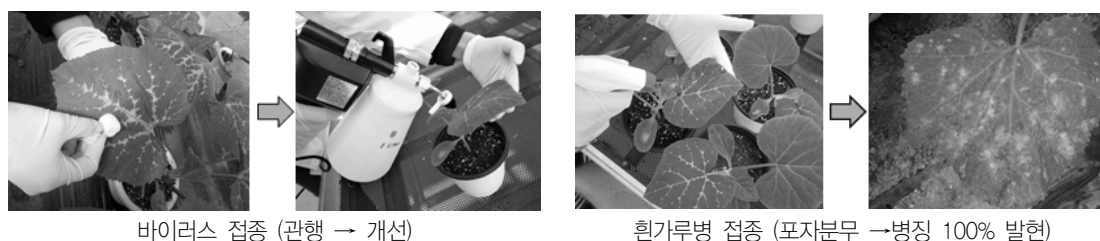


그림 4. 가압미세분무법에 의한 바이러스 및 흰가루병 접종법 개선

#### (시험 2) 호박바이러스 현장진단키트 개발

본 시험을 통하여 개발한 ZYMV, WMV 현장진단키트를 각각 1,000개씩 제조하였다. 이는 도내 농업기술센터 및 호박 등 과채류 재배농가에 분양하여 바이러스의 현장진단에 활용되었으며, 그 결과로 바이러스 감염주를 조기에 식별하여 제거함으로써 2차적인 피해 확산 억제 수단으로 유용하게 활용될 수 있었다.

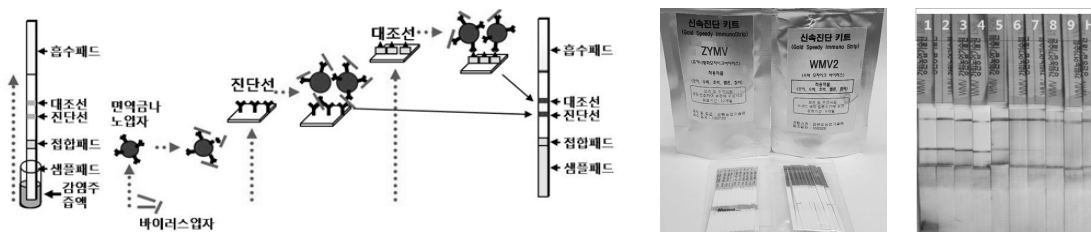


그림 5. 바이러스 현장진단키트 제조 모식도, 농가분양용 키트 및 현장진단 결과

## 4. 적 요

#### (시험 1) 내병성 검정 효율화를 위한 대량접종기술 확립

본 시험에 이용된 ZYMV 및 WMV 분리주는 항혈청 검사 및 유전자 상동성 비교검사에서 국내의 호박에서 주로 발생하는 계통의 바이러스임이 확인되었다. 바이러스 내병성 검정 효율을 향상시키기 위한 바이러스의 대량접종기술로서 가압 미세분무법 활용한 95%의 높은 접종법을 확립하였으며 접종소요시간은 관행접종법보다 10배의 효과가 높았다. 흰가루병은 멸균증류수로  $10^6$  spores/L 농도로 현탁액을 조제하여 휴대형 스프레이로 잎에 분무시 100% 접종율로 안정적 접종법이 정립하였다.

### (시험 2) 내병성 계통의 검정 및 선발

2012년부터 2016년에 걸쳐 실시한 바이러스(ZYMV, WMV) 및 흰가루병 내병성 호박계통 선발을 위한 내병성 검정 계통은 총 1,290계통(조합)으로 12,900주 이상이 접종 및 검정되었다. 이 중에서 복합내병성 47계통이 선발되었다. 이 선발계통은 본 과제의 최종목표인 호박 신품종 육성을 위한 특성검정(수량성 등)을 위한 내병성계통으로 활용되었다.

### (시험 3) 호박바이러스 현장진단키트 개발

2013년부터 2016년에 걸쳐 호박의 주요바이러스인 ZYMV, WMV의 현장진단키트를 개발하여 호박 육종시 바이러스 검정과 농가포장에서 바이러스병 확산을 예방하기 위한 조기진단에 활용하였다.

## 5. 인용문헌

- Lai, W., Fung, D. Y. C., Xu, Y., Liu, R. and Xiong, Y. 2009. Development of a colloidal gold strip for rapid detection of ochratoxin A with mimotope peptide. Food Control 20: 791-795.
- Moon, J., Kim, G. and Lee, S. 2012. A gold nanoparticle and aflatoxin B1-BSA conjugates based lateral flow assay method for the analysis of aflatoxin B1. Materials 5: 634-643.

## 6. 연구결과 활용

연도(연차)	활용방안	제 목
2014(3년)	특허출원	면역크로마토그래피 이용 주키니황화모자이크바이러스의 신속 진단키트 및 진단방법
2015(4년)	학술발표	수박모자이크바이러스(WMV)의 현장진단용 SIS-gold 키트(학회)
2016(5년)	영농기술	호박바이러스 현장진단키트 2종(ZYMV, WMV) 보급 및 현장활용(자체)

## 7. 연구원 편성

구분	소속	직급	성명	수행업무	참여년도				
					'12	'13	'14	'15	'16
과제책임자	홍익바이오	대표이사	서상기	과제 총괄	○	○	○	○	○
1세부책임자	환경농업연구과	농업연구관	권순배	세부주관 수행	○	○	○	○	○
공동연구자	환경농업연구과	농업연구사	문윤기	내병성검정	○	○	○	○	-
	"	"	이재홍	시험연구지원	○	○	○	○	○
	"	농업연구관	정태성	시험연구지원	○	○	○	○	○
	"	농업연구사	원헌섭	내병성검정	-	-	-	-	○
	"	공무직	조순옥	흰가루병 검정	○	○	○	○	○
"	기간제	박동권	바이러스 검정	-	-	-	○	○	