

어젠다코드	3 - 12 - 35		구 분	과제완결	
기술분야코드	V2	기술유형코드	C01	작목구분코드	FC-05-0599
과제종류	기관고유		세세부사업	-	
연구과제 및 세부과제			수행기간	과제책임자 및 세부책임자	
서류 안정생산 기술개발			'10~'12	특화작물연구소	김기선
1) 서류 바이러스 실용적 진단기술 확립			'10~'12	특화작물연구소 서류연구	김기선
2) 동해안지역 서류 신소득작목 개발연구			'11~'12	특화작물연구소 서류연구	김기선
색인용어	서류, 바이러스, 감자, 마				

## ABSTRACT

This study was conducted to establish the stable production system of root and tuber crops. The results obtained are as follows.

As a result of antiserum specific test of PVY and PVX in potato viruses to develop Immuno-strip, there has been no response to non-specific immune. It turned out that as for the virus infection rate of *D. alata*, that of YMMV was 56.8%, which was higher than that of JYMV by 21.6%, and that 46.7% of ChYNMV from *D. opposita* genealogy was infected. It is predicted that virus infection would be spread since it is reproduced through the trophoplasm, and thus it is urgent to develop technologies for healthy seedling production and to establish the examination system.

*Apios*(*Apios americana* M.) that is herbaceous climbing plant are studied on physiology as a new crop in the east coast of Gangwondo. *Apios* is suitable for growing in low regions than in high as alpine regions. As for the sprout of *apios*, it is thought that the storage conditions of 15°C or higher and 95% of relative humidity for 15 days or more is effective. Also hermetic storage of tubers in plastic bag for drying prevention is a better way to store them.

### 1. 연구목표

식물에 병을 일으키는 병원체 중에서는 바이러스는 균류나 세균과는 매우 다른 양상을 보인다. 감염된 식물체의 병징은 잎이나 줄기에 괴저, 퇴록, 위축 등 외형적 증상을 육안으로 관찰할 수 있으며 이런 증상들은 모두 작물의 광합성작용을 저해함으로써 결국 품질과 수량을 감소시킨다. 감자 등 서류는 영양체를 이용한 종서 생산체계에서 바이러스 관리는 필수

적이다. 따라서 서류의 안정생산을 위하여 감자의 기본종에서 보급종까지 주요 바이러스(관리병 : PVY, PVX, PLRV 등) 와 바이로이드(금지병 : PSTVd) 검정체계를 구축함으로써 서류를 안정적으로 생산할 수 있다. 따라서 현재까지 개발된 서류 바이러스 진단방법을 개선하여 체계적인 진단기술을 확립하는 것이 필요하다. 또한 동해안지역은 영서지역과 다른 환경적 요인으로 해양성기후에 적합한 새로운 소득 작물의 개발이 요구되어왔다. 또한 동해안 지역은 근권 작물에 적합한 사질토양으로 아피오스와 같은 새로운 서류작물의 개발이 필요하다.

## 2. 재료 및 방법

### <제1세부과제 : 서류 바이러스 실용적 진단기술 확립 >

#### (시험 1) 감자 주요 바이러스 실용적 진단키트 개발

국내 감자에 발생하는 바이러스인 PVY에 대한 immunostrip 신속진단키트를 개발하였다. 감자(품종 수미)에서 황화모자이크 증상을 보이는 이병엽으로부터 PVY를 분리하여, 건전 감자 및 담배에 접종하여 PVY를 증식하고, 바이러스를 순수정제, 항원을 만들어, 토끼(N. white)에 4회 주사하여 항혈청을 제작하였다. 제작된 항혈청은 비특이평가 및 역가를 확인 후 IgG 정제를 하였다. 이 PVY IgG를 소재로 하여 Immunostrip을 제작하였다. 한편, PVX의 immunostrip 제작에는 본원에서 보유하고 항혈청을 이용하였다. immunostrip 키트 제조에는 항체에 금입자( $\varnothing$  40nm)를 결합하여 진단감도를 높이는 방법(www.bioassayworks.com)으로 수행하였다. PLRV의 진단을 위해서는 본원에서 보유하고 있는 항혈청을 이용하여 DAS-ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)키트를 제작하였다. 진단키트 제작에 필요한 IgG 정제를 위하여 IgG 정제키트(Pierce사)를 이용하였으며, 이차항체 결합효소로서 인산가수분해효소(ALP)를 이용하여 Das-ELISA키트를 제작하였다. 감자 갈썩병 바이로이드(PSTVd)의 검정을 위하여는 PSTVd Fast RT-PCR Kit (PLUTOS사)를 이용하였다.

#### (시험 2) 마 주요 바이러스 분리, 동정 및 진단기술 개발

바이러스 검정 대상의 유전자원은 수집된 계통에서 괴경 형태가 양호한 개체를 선발하였다. 선발된 계통들은 망실하우스에 격리재배 하였고, 재배방법 및 포장관리는 표준재배법을 준용하였다. 1차 진단은 포장내에서 바이러스 병징을 확인하였고 주당 2-3개의 엽을 채취하였다. 2차 정밀진단은 실험실에서 진단키트를 이용하여 확인하였다. 검정량은 둥근마(*D. alata*) 74, 단마(*D. opposita*) 63, 그리고 동그란마(*D. opposita*) 3 등 140주이다. RT-PCR 반응을 위하여 진단키트(Bioneer kit)의 매뉴얼에 의하여 준비하였다. 매뉴얼의 순서는 주형 RNA 5ul 에 프라이머 세트(Table 11) 3ul와 멸균수 12ul를 첨가하였다. 전기영동 조건은 RT-PCR에서 증폭된 시료들과 마커를 각각 5ul 씩 1.0% gel(EtBr 3ul)에 넣어 100v로 30분간 처리하였다. 마커 밴드크기는 YMMV는 345bp, JYMV는 241bp, ChYNMV는 252bp 였다. 시료의 감염 확인은 형성된 시료의 밴드를 암실에서 마커와 비교하여 판별하였다.

1) RT-PCR 조건(YMMV, JYMV)

1 cycle(50°C 30min, 94°C 2min) → 2~36 cycle(94°C 15sec, 45°C 15sec, 72°C 30sec) → 37 cycle(72°C 5min)

2) RT-PCR 조건(ChNMV)

1~34 cycle(42°C 30min, 95°C 2min) → 35 cycle(95°C 1min, 57°C 1min, 72°C 1min)

(시험 3) 감자 유전자원 및 육성계통의 바이러스와 바이로이드 검정

감자 종서관리를 위하여 법정관리병인 PVY, PVX, PLRV, PSTVd에 대하여 검정을 실시하였다. 검정량은 기내 유전자원과 기본식물은 실내에서 RT-PCR을 이용하여 전수검사를 실시하였고 육성품종 및 농가실증재배는 생육 기간중 3회에 걸쳐 검정하였다.

**<제2세부과제 : 동해안지역 서류 신소득작목 개발연구 >**

(시험 1) 아피오스 안정생산을 위한 지대별 생산성 검정

본 시험은 2011부터 2012까지 평난지(강릉, 24m), 중산간지(횡성, 450m), 고랭지(평창, 600m)에서 지대별로 수행하였다. 실험품종은 레드(Red-vine)계통을 재배농가에서 분양받아 이용하였다. 재배방법은 3월초 맹아된 괴경을 선별하여 3월 20일과 25일 지대별로 노지에 정식하였다. 재식밀도는 70×30cm로 하여 흑색비닐 멀칭재배를 하였다. 지상부 생육 상황은 정식 후 수시로 관찰하였으며 10월 하순에 수확 후 지하부의 수량을 조사하였다.

(시험 2) 아피오스 동계 저장방법 구명

동계 기간중 아피오스 저장환경 시험을 위하여 시설내 상온, 저온저장고(4°C), 노지 움저장에서 11년 11월 10일 부터 12년 2월 20일(130일)까지 각각 저장하였다. 보관방법은 비닐, 포대, 스티로폼박스, 양파망 등 처리하여 저장 후 맹아율 및 맹아소요일수를 조사하였다.

(시험 3) 아피오스 맹아율 향상을 위한 환경 구명

맹아처리를 위한 항온항습기의 환경조건으로 온도는 15°C, 20°C 및 25°C, 상대습도는 50%, 70%, 90%를 조합하여 처리하였다. 처리기간은 30일로 하였으며 조사내용은 시험 2와 같다.

**3. 결과 및 고찰**

**<제1세부과제 : 서류 바이러스 실용적 진단기술 확립 >**

(시험 1) 감자 주요 바이러스 실용적 진단키트 개발

신속진단키트(Immunostrip) 개발 소재로 이용된 PVY 및 PVX 각각 항혈청에 대한 특이성 검정 결과 비특이 반응은 보이지 않았다. 따라서 이의 정제된 항체를 이용하여 신속진단

키트를 제작하였다(그림 2). 또한 PLRV 진단을 위하여 Das-ELISA법을 확립하였다(그림3). 감자갈축병의 진단을 위하여 PSTVd Fast RT-PCR Kit (PLUTOS사)와 Plant RNA Extraction kit (INTRON)를 조합하는 방법으로 안정적인 진단법을 확립하였다(그림 4).

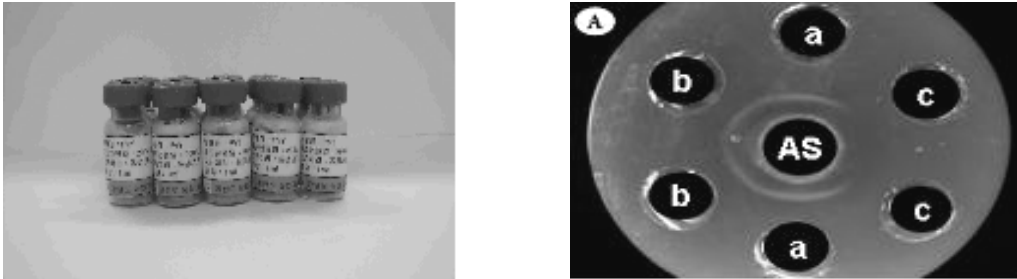


그림 1. PVY-o 항혈청 제조 및 특이성 검증



신속진단키트

진단과정(3분)

진단키트 보급

그림 2. PVY 및 PVX 신속진단키트 및 진단과정

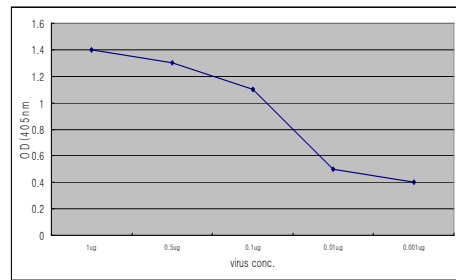


그림 3. PLRV 항혈청과 바이러스 농도별 ELISA 측정치

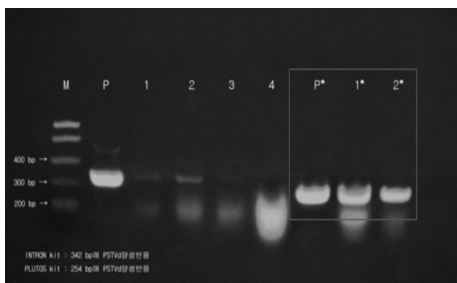


그림 4. 최적 PSTVd 검출 조합 확립( PLUTOS 키트 사용결과) 및 이병주 형태(2,4열)

(시험 2) 마 주요 바이러스 분리, 동정 및 진단기술 개발

시험포장에서 바이러스 감염에 대한 조사결과 잎의 전면에 걸쳐 짙은 갈색의 괴사 반점이 불규칙하게 흩어진 증상이 관찰되었다(그림 1). 그리고 줄기, 엽병 및 지체부에서도 괴저가 형성되었다. Potyvirus에 감염된 마의 공통적인 증상은 모자이크, 엽맥을 따라 녹색 밴드 형성(vein banding), 잎의 황화(yellowing), 퇴록반문(mottle), 퇴록반점(chlorotic spot), 잎의 굴곡(crinkle), 괴사반점(necrotic spot)등이 나타난다고 하였다(Odu 등, 2001). 시험포장에서도 potyvirus에 속하는 YMMV에 감염된 등근마의 잎에서 엷은 노란색 모자이크의 전형적인 증상을 관찰할 수 있었다. 이런 증상은 수집된 등근마 모든 계통에서 정도의 차이는 있었으나 광범위하게 나타났다. Aleman 등(2003)은 마의 바이러스중 YMMV는 전 세계적으로 광범위하게 이병되었다고 보고하였는데 유전자원도 이미 그 지역에서 감염되어 유입되었을 것으로 추정된다. ChYNMV는 잎에 모자이크 증상과 함께 괴저반점을 유발하나 기형을 일으키지 않는다고 하였다(Fukumoto, 1978). 입자는 660nm의 사상형으로 진딧물에 의해 비영속적으로 전파되는 특징이 있다. Kang 등(2003)은 국내에서 재배되고 있는 대부분의 장마가 잎에 모자이크와 괴저반점 증상을 보이고 있어 ChYNMV가 광범위하게 감염되어 있을 것으로 보고하였다. 포장내에서도 *D. opposita*의 잎에서 괴사반점의 병징을 쉽게 관찰할 수 있었다(그림 1). 마 바이러스 3종에 대한 2차 유전자 진단 검사 결과 등근마의 바이러스 이병율은 YMMV가 56.8%로 JYMV 21.6%보다 높았으며 ChYNMV는 *D. opposita* 계통에서 46.7%로 나타났다(표 3). 주어나 괴경을 이용하여 번식하는 마의 재배특성상 앞으로도 지속적으로 바이러스 이병이 확산될 것으로 예측된다. 따라서 무병종묘 생산을 위한 번식기술 개발과 체계적인 검정 시스템 구축이 시급한 것으로 판단된다.

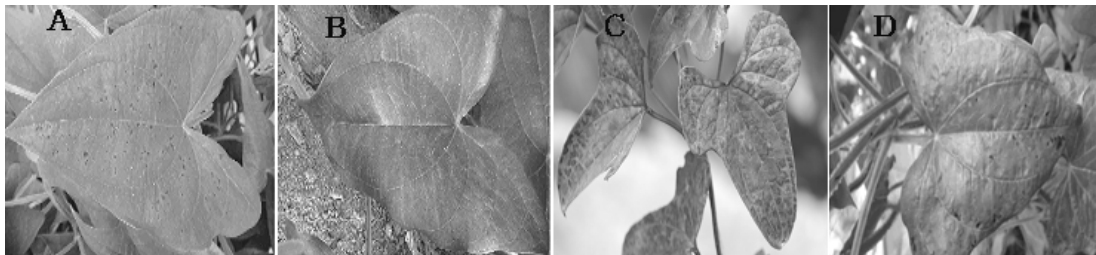


그림 2. 1차 바이러스 진단(시험포장 병징확인)

표 1. 마 바이러스 3종 감염율(12)

계 통	YMMV	JYMV	ChYNMV	Total infection rate
<i>D. alata</i>	56.8	21.6	0	62.1
<i>D. opposita</i>	0	0	47.6	47.6

(시험 3) 감자 유전자원 및 육성계통의 바이러스와 바이로이드 검정

특화작물연구소에서 육성중인 감자 계통을 대상으로 주요 바이러스 4종(PVY, PVX, PLRV, PSTVd)과 바이로이드를 진단하였다. 유전자원과 기본식물은 자원의 중요성을 감안하

여 전수검사를 하였으며, 계통선발 및 육성계통의 시험포장은 생육중기에 의심되는 시료를 채취 후 2차 정밀진단을 실시하였다. 검정결과 계통선발세대의 시험포장에서는 감염주가 없었으며 육성계통에서도 이병주 없이 양호하였다.

표 2. 감자 유전자원 및 육성계통의 검정 현황

구 분	유전자원	기본식물	계통선발 (2, 3세대)	육성계통 (시험포, 농가)
시료량	220점	450점	700점	200점
검정방법	전수검사	전수검사	1차 병징 확인 2차 시료채취	1차 병징 확인 2차 시료채취
1단계 진단	RT-PCR	RT-PCR	휴대용 진단키트 ELISA, RT-PCR	휴대용 진단키트 ELISA, RT-PCR
2단계 진단				
감염율(%)	0	0	0	0

<제2세부과제 : 동해안지역 서류 신소득작목 개발연구>

(시험 1) 아피오스 안정생산을 위한 지대별 생산성 검정

아피오스의 출현율은 지대가 높을 수록 낮은 경향을 보였으며 개화기도 고랭지가 평난지보다 약 6일정도 늦은 것으로 나타났다(표 3). 또한 낙엽기도 평난지에 비해 13일정도 빠른 경향이였다. 지대별 총수량도 평난지가 932kg/10a로 가장 많았으며 주당괴경중도 208.2g으로 가장 무거웠다. 이것은 아피오스의 지하부 괴경비대가 종화기인 8월 중순 이후부터 급격히 증가하는 점을 감안할 때 후반 생육기간이 긴 평난지가 유리한 원인으로 판단된다. 따라서 아피오스의 안정적인 재배지는 중산간지보다 낮은 지대가 적합한 것으로 나타났다.

표 3. 지대별 생육상황

구 분	출현율 (%)	개화기 (월.일)	종화기 (월.일)	낙엽기 (월.일)
평난지	72.1	7.11	8.17	10.23
중산간지	67.0	7.15	8.23	10.25
고랭지	60.5	7.17	8.25	10.10

표 4. 지대별 수량성

구 분	주당괴경중 (g/주)	괴경 분포(%)				총수량 (kg/10a)	상품수량 <sup>z</sup> (kg/10a)
		1g이하	1~5g	6~10g	10g이상		
평난지	208.2	15.5	63.9	14.8	5.8	932	732
중산간지	185.7	22.7	56.3	15.8	5.2	699	529
고랭지	158.9	26.5	52.1	14.9	6.5	623	460

<sup>z</sup>상품수량 기준 : 괴경 1g 이상

(시험 2) 아피오스 동계 저장방법 구명

동계기간 중 아피오스의 다양한 저장환경에서 저장 후 멥아울을 조사한 결과 보관 장소는 움 저장>저온저장고>상온(창고) 순으로 양호하였다. 아피오스의 보관재료별 멥아울은 비닐 재료가 상온 등 모든 저장환경에서 75.8~88.5%로 가장 높게 나타났다. 이것은 아피오스의 멥아울은 동계 저장 중 습도 유지와 밀접한 관련이 있는 것으로 사료되며 움 저장에서 비닐을 이용한 보관방법이 가장 적합한 것으로 생각된다.

표 5. 저장환경에 따른 멥아울 (단위 : %)

보관방법	저장환경		
	상온(창고)	저온저장고(4℃)	움 저장
비닐	75.8	82.7	88.5
포대	22.5	74.2	91.5
스치로폼박스	45.5	78.8	처리없음
양파망	0.2	0.8	62.2

(시험 3) 아피오스 멥아울 향상을 위한 환경 구명

과종 전 최아를 위한 아피오스의 환경을 구명하기 위하여 인큐베이터에서 온도 및 습도별로 멥아울을 조사한 결과 저장환경과 마찬가지로 온도보다는 상대습도에서 의한 영향이 큰 것으로 나타났다. 상대습도가 90%일 경우 모든 처리온도에서 82.3~85.5%로 양호하였다. 한편 멥아소요일수는 고습조건에서 온도가 높을수록 단축되는 것으로 조사되었다. 따라서 아피오스의 수확 후 관리는 동계기간 동안 비닐을 이용한 움 저장으로 저장한 후에 3월 초 온도 15℃ 이상, 상대습도 90%에서 최아하여 이용하는 것이 가장 적합하였다.

표 6. 온도 및 습도 조건에 따른 멥아울 및 멥아소요일수 (단위 : %, 일)

환경조건	온도(소요일)		
	15℃	20℃	25℃
습도 50%	22.1(25)	10.8(19)	5.5(13)
" 70%	69.3(23)	64.3(15)	55.4(12)
" 90%	82.3(19)	87.7(13)	85.5(12)

4. 적 요

<제1세부과제 : 서류 바이러스 실용적 진단기술 확립>

(시험 1) 감자 주요 바이러스 실용적 진단키트 개발

- 가. 신속진단키트(Immunostrip) 개발 소재로 이용된 PVY 및 PVX 각각 항혈청에 대한 특이성 검정 결과 비특이 반응은 보이지 않았음

나. 감자갈썩병의 진단을 위하여 PSTVd Fast RT-PCR Kit (PLUTOS사)와 Plant RNA Extraction kit (INTRON)를 조합하는 방법으로 안정적인 진단법을 확립하였음

(시험 2) 마 주요 바이러스 분리, 동정 및 진단기술 개발

가. 1차 포장 병징확인 후 2차 유전자 진단 검사 결과 마 바이러스 3종 확인됨

나. 등근마의 바이러스 이병율은 YMMV가 56.8%로 JYMV 21.6%보다 높았으며 ChYNMV는 *D. opposta* 계통에서 46.7%로 나타남

(시험 3) 감자 유전자원 및 육성계통의 바이러스와 바이로이드 검정

가. 감자 유전자원 및 기본식물 등 바이러스 검정결과 감염주 없었음

#### <제2세부과제 : 동해안지역 서류 신소득작목 개발연구>

(시험 1) 아피오스 안정생산을 위한 지대별 생산성 검정

가. 지대별 생산성은 평년지가 833kg/10a로 가장 수량이 많았음

나. 지대가 높을 수록 생육 및 수량이 불리하였으며 중산간지 이하가 재배에 적합하였음

(시험 2) 아피오스 동계 저장방법 구명

가. 동계 저장방법은 포대를 이용한 움 저장이 가장 양호하였음

(시험 3) 아피오스 멩아울 향상을 위한 환경 구명

가. 아피오스 멩아조건은 온도 20℃에서 습도 90%이상으로 구명됨

## 5. 인용문헌

강원도농업기술원. 2008. 시험연구보고서. P527

강원도농업기술원. 2010. 시험연구보고서. p256

Kang, D.K., T. Kondo, J.H. Shin, H.Y. Shin, J.H. Sung, S.G. Kang, and M.U. Chang. 2003. Chinese yam necrotic mosaic virus isolated from Chinese yam in Korea. Res. Plant Dis. 9:107-115.

Tanno, N. Tanno, M. Yokota, T. Abe, M. Okagami, N. 1995. Promotive and inhibitory effect of uniconazole and prohexadione on the sprouting of bulbils of Chinese yam, *Dioscorea opposita*. Plant Growth Regulation. 16(2) : 129-134.

Tochihara, H. 1993. Yams. In: Tsuchizaki, T., Tochihara, H., Kameya, M., Yanase, H.(eds) Plant virus diseases in Japan.

Torpe, T. A. 1980. Organogenesis in vitro : Structural, Physiological and biochemical aspects., Int. Rev. Cytol., Suppl. II A:71-111.

## 6. 연구결과 활용

연도(연차)	활용구분	제 목
2011(1년)	기초자료	식용마 바이러스병 진단기술 개발 및 감염 씨마에 의한 수량성 감소 해석(자체)
2012(2년)	논문	아열대마의 저장중 부패억제를 위한 큐어링 효과 (한국자원식물학회지 제25권 제4호)
	영농활용	아피오스 지대별 생산성과 적정 저장·매아 조건(자체)
	영농활용	대서마( <i>D. alata</i> ) 재배시 경제적인 사각별형 지주모형 선발(자체)

## 7. 연구원 편성

구분	소속	직급	성명	수행업무	참여년도		
					'10	'11	'12
과제책임자	특화작물연구소	농업연구사	김기선	과제총괄	○	○	○
1세부책임자	"	"	김기선	주관수행	-	-	○
1세부책임자	환경농업연구과	"	권순배	주관수행	○	○	-
2세부책임자	특화작물연구소	"	김기선	주관수행	-	○	○
공동연구자	"	"	최성진	조사업무지원	○	○	○
"	"	"	박천규	"	○	○	○
"	"	"	맹진희	"	○	○	○
"	"	농업연구관	김재록	"	○	○	○
"	"	기능직	김정기	시험포장관리	○	○	○