

어젠다코드	1 - 3 - 8		구분	완결	
기술분야코드	V2	기술유형코드	P01	작목구분코드	VC-01-0999
과제종류	기관고유		세부사업	-	
과제명	강원도 문제 병해충 방생실태 조사 및 방제체계 확립				
과제책임자	성명		직급	소속기관 및 부서	
	이재홍		농업연구사	강원도원 환경농업연구과	
연구기간	2019~2023		참여연구기관	-	
세부과제명			부서	세부책임자	연구기간
1) 무 시들음병 방제기술 개발			환경농업연구과	이재홍	'19~'23
2) 주요 바이러스 피해경감기술 개발			환경농업연구과	원헌섭	'19
3) 고랭지 배추 씨스트선충류 발생분포 조사 및 방제 기술 개발			환경농업연구과	황세정	'19
색인용어	무 시들음병 바이러스, 씨스트선충, 발생, 방제				

ABSTRACT

This study researched the current occurrence status of viral diseases of solanaceous crops in the main production areas of Gangwon province. In the results, CMV, BBWV2, PepMoV, and TSWV were verified in peppers and paprika of Gangwon province. During the research period, there were no crops suspected or infected by PepMoV, so that it is judged that there is no villiferous or infected aphid by this virus in Gangwon-do. For development and distribution of the rapid diagnostic kits for major horticultural viruses, we successfully developed seven speedy immunochromatographic strips(SIS) kits for diagnosis against PMMoV(pepper mild mottle virus), CMV(cucumber mosaic virus), ZYMV(zucchini yellow mosaic virus), WMV(watermelon mosaic virus) and TSWV(tomato spotted wilt virus). 15,000 virus diagnostic kits were distributed to farmers and the county agricultural technology centers in Gangwon province. Horticultural viruses diagnostic workshop was conducted one times for the last years. Such results of this study could be used as the basic data for the stable production of crops through the early prevention of plant diseases occurring in the solanaceous crops of Gangwon region.

This studies were carried out to investigate the occurrence patterns of cyst nematodes in Gangwon province and to develop control techniques. Beet root cyst nematode(*Heterodera schachtii*) and Clover cyst nematode(*Heterodera trifolii*), Which are tagers for public control, are occur only in Gangwon province. Cyst nematodes are very difficult to control when they occur, and the control methods that can be used in farmers are also tricky. Therefore, several experiments were performed, including developmental surveys to find ways to

effectively control cyst nematodes. After the first occurrence in Taebaek-si in 2011, the occurrence increased to surrounding areas. And, in 2018, Cyst nematodes are occurring in Jeongseon-gun, Samcheok-si, Gangneung-si and Yeongwol-gun including Taebaek-si. No The Occurrence of Cyst nematodes could not be confirmed outside of Taebaek-si, Jeongseon-gun, Samcheok-si, Gangneung-si, and Yeongwol-gun in 2019. 76 samples suspected of developing cyst nematodes were analyzed. Of these 68 samples, Cyst nematode genes are expressed. In addition, clover cyst nematode(*H. trifolii*) was identified in 63 samples of more than 90%. The occurrence of cyst nemaotedes was mainly seen at adjacent sites. For the first time this year, the nematode had a high density of more than 500 eggs except Gohan-eup, Jengseon-gun.

1. 연구목표

기후 온난화 및 세계화에 따른 농산물 교역 증가로 인해 새로운 바이러스가 돌발적으로 발생하여 생물학적 생태파괴로 인한 피해가 계속 확대되고 있고 신규바이러스 또한 매년 증가하고 있다. 2004년 토마토덤불위축바이러스(*Tomato bushy stunt virus*, TBSV)를 시작으로 2007년 호박모자이크 바이러스(*squach mosaic virus*, SqMV), 2008년 감자갈쭉바이로이드(*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd) 와 토마토황화잎말림바이러스(*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV), 2010년 사탕무황화바이러스(*Beet western yellows virus*, BWYV), 2012년 순무황화모자이크바이러스(*Turnip yellow mosaic virus*, TYMV), 2013년 토마토퇴록바이러스(*Tomato chlorosis virus*, ToCV) 와 질경이모자이크포텍바이러스(*Plantago asiatica mosaic virus*, PIAMV)가 발생을 하였다. 또한, 전 세계적으로 농작물에 감염하는 바이러스는 1,200종 이상이 보고되고 있다. 우리나라의 재배작물에서도 상당수의 바이러스 피해가 발생하고 있으며 원예작물에만 100여종 이상이 보고되고 있다(한국식물병명목록, 2009). 오이, 호박, 고추, 배추 등 채소류 및 나리 등 화훼류에서 바이러스병은 수량 감소 및 품질 저하의 주요한 원인이므로 바이러스병의 사전 예방대책은 매우 중요하다. 즉, 바이러스병의 급격한 확산을 막기 위해서는 우선적으로 1차감염주에 대한 바이러스 감염여부를 조기에 진단하여 신속히 이병주를 제거함으로써 포장내의 바이러스 확산을 막을 수 있다. 바이러스를 진단할 수 있는 검사 방법은 유전자진단법(Sharma 등, 2000) 및 바이러스 항원과 특이항체 반응을 이용한 효소면역측정법(Zein 등, 2006)이 일반적으로 활용되고 있으나, 이 방법들은 전문화된 검사 인력과 고가의 실험장비를 필요할 뿐 만 아니라 검사 시간과 검사 비용이 많이 소요되는 단점이 있다. 따라서, 강원도 주요 재배작목에서 발생하는 바이러스의 종류를 파악하는 것과 조기진단을 하는 것은 바이러스병에 의한 피해를 사전에 예방할 수 있는 중요한 기초자료이다. 이에 본 과제에서는 강원도 지역 및 작목별 바이러스 종류 및 분포현황과 고가의 시험장비 없이 5분이내의 검사시간으로 바이러스를 현장에서 신속하게 진단할 수 있는 진단키트(Zhang 등, 2006)를 개발하여 농업현장에 보급하여 조기진단에 활용하기 위한 목적으로 수행하였다.

고랭지배추에 발생하는 공격방제 대상선충인 사탕무씨스트선충과 클로버씨스트선충은 국내에서 강원도에서만 유일하게 발생하고 있는 선충이다. 도내에서만 발생하는 사탕무씨스트선충과 클로버

씨스트선충은 연도별 누적 피해면적이 점점 증가하고 있으며, 2017년도는 156ha가 넘는 피해면적을 나타내기도 했다. 강원도 내에서는 강릉, 삼척, 태백, 정선, 영월군에서 씨스트선충의 발생이 확인되었고, 이러한 발생은 인접한 시군을 중심으로 점차 퍼져나가고 있으며, 한 번 발생이 확인된 포장에서의 박멸이 되지 않고, 발생포장 주변으로 매년 신규발생포장도 증가하고 있는 추세를 보이고 있다. 이렇게 선충의 증식이 가속화 되고 있는 상황에서도 농가에서는 방제를 할 수 있는 방법은 한정적이다. 현재 고랭지 배추에서 씨스트선충 방제에 사용할 수 있는 약제가 많지 않을뿐더러 가장 효과가 좋다고 알려져 있는 다조멧 입제는 훈증성 약제이기 때문에 약제처리 후 비닐멀칭이 필수적이다. 그렇지만 경사가 심한 고랭지 배추 재배지에서는 비용과 노동력 등의 이유로 비닐멀칭 작업이 쉽지가 않다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 본 연구과제는 고랭지 배추에 발생하고 있는 씨스트선충의 발생양상조사를 실시하고 이러한 선충을 방제할 수 있는 방제약제선발에 목표를 두고 수행되었다.

2. 재료 및 방법

〈제2세부과제: 원예작물 주요 바이러스병 피해경감기술개발〉

(시험 1) 원예작물 재배지 매개충 발생밀도 및 보독률 분석

강원지역 원예작물 재배지에서 발생하는 바이러스 발생양상 조사를 위해 춘천, 철원, 인제의 고추 및 파프리카에 발생하는 바이러스의 발생양상을 조사하였다. 조사 시기는 정식 후 30일경, 60일 및 수확기에 실시를 하였다. 작목별 조사 시기 및 대상바이러스로는 고추는 춘천과 인제에서 CMV, TSWV, BBWV2, PepMoV에 대해, 파프리카는 춘천과 철원에서 CMV, TSWV, BBWV2, PepMoV에 대한 발생양상조사를 실시하였다. 포장에서 채집된 바이러스 증상시료는 RT-PCR방법을 이용하여 바이러스를 검정하였다. 우선 채집된 시료를 1.5ml 튜브에 1cm×1cm크기로 잘라 마쇄한 후 easy-spin™ [DNA free] Total RNA Extraction kit(iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)를 이용하여 사용자 매뉴얼에 따라 분리를 하였으며, 감염 식물체에서 전체 핵산을 분리한 후 핵산 추출물을 진단에 이용하였다. 유전자 진단에 대상 바이러스의 특이프라이머는 농촌진흥청 국립농업과학원 작물 보호과에서 디자인한 프라이머를 사용하였다(표 1). PCR 조성액 총액은 20μl로 1×AccuPower® PCR Master Mix(Bioneer, Daejeon, Korea) 2μl, Forward primer(10 pmol) 1μl, Reverse primer(10 pmol) 1μl, RNA 2μl, D.W 14μl로 반응시켰다.

RT-PCR 조건은 55°C에서 30분, 95°C에서 10분 역전사 반응 뒤 95°C에서 10분간 denaturation 후, 95°C에서 30초, 57°C에서 40초, 72°C에서 45초로 35회로 진행하였고 TbLCV(*Tobacco leaf curl virus*) 와 TYLCV는 95°C에서 3분간 denaturation 후, 94°C에서 20초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분로 35회 조건으로 진행하였다. PCR이 완료되면 각 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동을 통해 감염여부를 확인하였다. 매개충별 보독률 분석을 통한 유연관계를 파악하기 위해 총채벌레, 진딧물을 채집하여 보독률 조사를 실시하였다. 채집된 시료는 매개충의 유전자추출을 위해서 PCR방법을 이용하여 바이러스를 검정하였다. 우선 채집된 시료를 1.5ml 튜브에 총채벌레 및 진딧물을 각각 3마리씩 나눠 담고 마쇄한 후 해당 매개충별 추출 키트를 사용하여 DNA 및 RNA를

추출하였다. 사용키트는 easy-spin™ [DNA free] Total RNA Extraction kit(iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)를 이용하여 사용자 매뉴얼에 따라 분리를 진행하였다. 유전자 진단에 대상 바이러스의 특이 프라이머는 농촌진흥청 국립농업과학원 작물보호과에서 디자인한 프라이머를 사용하였다(표 1). PCR 조성액 총액은 20μl로 Maxime PCR PreMix Kit(i-MAX™ II)(iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea) 2μl, Forward primer(10 pmol) 1μl, Reverse primer(10 pmol) 1μl, DNA 2 μl, D.W 14μl로 TYLCV는 반응시켰고, RT-PCR 조성액 총액은 20μl로 SuPrimeScript RT-PCR Premix(2X)(GeNet Bio, Daejeon, Korea) 2μl, Forward primer(10 pmol) 1μl, Reverse primer (10 pmol) 1μl, DNA 2μl, D.W 14μl로 TSWV를 반응시켰다.

PCR은 95°C에서 3분간 denaturation 후, 95°C에서 20초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분으로 35회로 진행하였고, TbLCV(*Tobacco leaf curl virus*) 와 TYLCV는 95°C에서 3분간 denaturation 후, 94°C에서 20초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분로 35회 조건으로 진행하였고, RT-PCR 조건은 55°C에서 30분, 95°C에서 10분 역전사 반응 뒤 95°C에서 10분간 denaturation 후, 95°C에서 30초, 57°C에서 40초, 72°C에서 45초로 35회로 진행하였고 PCR과 RT-PCR이 완료되면 각 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동을 통해 감염여부를 확인하였다.

표 1. 바이러스 의심주 진단에 사용한 프라이머 목록

바이러스	프라이머 이름	염기서열 (5'-3')	PCR산물 크기(bp)
CMV	CMV DP u1 CMV DP d2	CGTCGTGGTTCCCGCTCCG AGCGCGCATCGCCGAAAGAT	690bp
BBWV2	BBWV2 1-1u BBWV2 1R	AAACAAACAGCTTTCGTTCCG GCCATCTCATTTGGCATGG A	380bp
PepMoV	PepMoV u1 PepMoV d1	AATGGCACGTCCCCAAA TCTCTCTCATGCCAACTACGA	705bp
TSWV	TSWV 6F TSWV 6R	GAGATTCTCAGAATCCCAGT AGAGCAATCGTGTCAATTTTATTC	459bp

(시험 2) 원예작물 바이러스 진단키트 제작·보급

현장진단키트(Speedy immunochromatographic strip, SIS kit)를 제조하고자 하는 바이러스는 고추연한열룩바이러스(PMMoV), 오이모자이크바이러스(CMV), 추키니황화모자이크바이러스(ZYMV) 수박모자이크바이러스(WMV), 토마토반점위조바이러스(TSWV)를 공시하였다. 바이러스는 각각 바이러스 특성에 맞는 기주식물에 접종하여 감염엽에 증식된 바이러스를 순수분리, 정제하였다. 정제된 각각의 순화바이러스액은 토끼에 면역을 시킴으로써 각 바이러스의 항혈청을 얻었다. 각 바이러스 항혈청은 다시 면역글로블린(IgG)으로 정제하여, 각 바이러스 현장진단키트의 항체로 사용하였다.

현장진단키트는 5개의 주요 부품(샘플패드, 컨주게이트패드, 니트로셀룰로즈막, 흡수패드, 지지판)과 바이러스 정제항체(IgG) 및 항체-금 접합체(colloidal gold-IgG)로 구성하였다. 현장진단키트의 조립 모식도는 그림1과 같다.

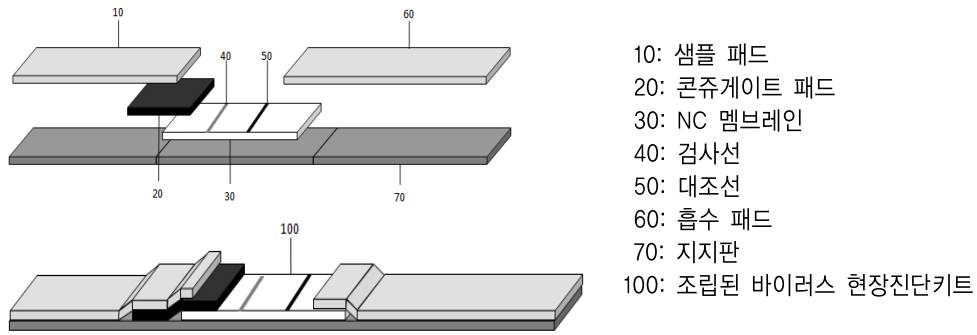


그림 1. 면역크로마토그래피를 이용한 바이러스현장진단키트 모식도

〈제3세부과제: 고랭지 배추 씨스트선충류 발생분포 조사 및 방제기술 개발〉

(시험 1) 고랭지 배추 씨스트선충류 신규 발생포장 분포 조사

강원지역 씨스트선충 기발생시군인 강릉시, 태백시, 삼척시, 정선군, 영월군을 중심으로 신규발생 의심 포장의 토양을 시군 농업기술센터로부터 의뢰받아 토양속에 있는 씨스트선충의 밀도조사와 종 동정을 진행하였다.

씨스트선충의 발생이 의심되는 포장에서 30개 지점 이상을 선정하여 토양을 채취한다. 작물 근권을 중심으로 깊이 20cm까지의 토양을 채취한다. 토양은 작물재배 후기에 채취하는 것이 밀도조사에 용이하다. 채집된 토양은 비닐봉지에 넣어 마르지 않게 하고, 40℃이상에 노출시키지 않고, 10~15℃에 보관하여, 채집한지 한 달이 넘어가기 전에 씨스트선충을 분리한다. 채집된 토양에서 큰 돌을 골라낸 뒤, 잘 섞은 후 2mm체로 쳐서 통과한 토양 500cm³를 취하여 선충분리에 사용한다. 500cm³ 토양을 2L 비커에 넣고 물을 2/3 채운 후 잘 섞어준다. 그 후 20mesh체를 통해 물과 섞은 토양을 최대한 빨리 부어 20mesh 체위의 찌꺼기를 위에서 아랫방향으로 씻어 내리고 위에 걸러진 찌꺼기는 버린다. 20mesh를 이용하여 걸러진 토양은 30초간 방치하여 가라앉힌 후 60mesh 체에 천천히 분는다. 60mesh 체위에 모인 흙(씨스트+잔재물)을 200ml 비이커에 모은다. 모은 씨스트를 counting dish위에 두고 해부현미경으로 관찰하여 씨스트 수를 counting 한다. counting 한 씨스트를 깨서 씨스트 안에 있는 알 수 조사를 실시한다. 1.5ml tube 하나에 씨스트 6개씩 넣어 총 5개의 tube를 만들어 씨스트를 깨트려 나오는 알 수를 counting한다.

Sample 을 25~50mg 정도(씨스트 3개) 파쇄 용구를 이용하여 충분히 파쇄하고 1.5ml Tube에 옮겨 200ul 의 Tissue Lysis Buffer (TL) 을 넣는다. Proteinase K 20ul를 첨가하고 60℃ 에서 조직이 모두 용해될 때까지 보관 한다. 200ul의 Binding buffer(GC) 를 넣고 효과적인 mixing 를 위해 용액을 강하게 Vortexing 한다. 100ul의 Isopropanol을 넣고 pipetting 하여 완벽하게 섞고 뚜껑에 용액이 남지 않도록 spin down 한 후에 Binding column에 용액을 모두 옮긴다. 뚜껑을 닫고 1분간 약 8000rpm(6000g) 에서 원심분리한다.

Binding column을 Tube에서 빼내어 새로운 1.5ml collection tube에 끼운다. 500ul의 W1 buffer를 넣고 1분간 약 8000rpm(6000g)에서 원심분리한다. Binding column을 빼내어 Collection tube에 담긴 폐액을 버리고 다시 끼우고 500ul의 W2 buffer를 넣고 1분간 약 8000rpm(6000g)에서 원심분리한다. 약 13000rpm(10000g) 으로 1분간 원심분리하여 Ethanol을 완전히 제거한다. 1.5ml

tube로 Binding column을 옮기고 200ul의 Elution buffer를 넣고

1분간 약 8000rpm(6000g) 에 원심분리하여 1.5ml tube에 DNA 용액을 얻는다. 추출한 DNA를 표 2와 같은 조건으로 qRT-PCR을 돌린다. qRT-PCR결과 positive control의 ct값과 검사시료의 ct값을 비교하여 유전자 증폭 유무를 확인한다.

표 2. 씨스트선충 동정을 위한 qRT-PCR 조건

Step	Time	Temperature
Enzyme activation	3min	95℃
Amplification (35cycle)	DNA denaturation	10sec
	Primer annealing	60sec
	Primer extension	30sec
Melt curve	0.2-0.5℃ steps	72℃→95℃

3. 결과 및 고찰

〈제2세부과제: 원예작물 주요 바이러스병 피해경감기술개발〉

(시험 1) 원예작물 재배지 매개충 발생밀도 및 보독률 분석

첫 번째로 고추에 발생한 바이러스 발생양상 조사를 위해 춘천과 인제의 고추재배지에서 시료를 채집하였다. 조사일에 따른 감염률을 보면 5월에는 두 지역 모두 감염이 없었고, 6월에는 인제에서 의심증상이 있었지만 바이러스에 의한 병징은 아니었다. 7월에는 춘천은 감염률은 100%였으며, 인제에서는 2%였다. 8월은 춘천지역에서만 조사를 실시하였는데 8월 평균 감염률은 67.3%였다. 9월의 감염률은 68%를 보였으며, 인제에서는 100%를 보였다. 인제에서는 8월 이후부터 고추에 총채벌레가 다 발생하여 바이러스 발생이 증가한 것으로 판단되었다. 9월 말 춘천의 감염률은 78.3%였으며, 마지막으로 10월 조사에서는 춘천에서 감염률은 47.8%를 보였다. 파프리카에서의 감염률은 7월부터 바이러스 의심증상이 발생되기 시작했는데 춘천에서는 54.8%를 보였으며 철원에서의 감염률은 2%를 보였다. 이 후 8월부터 9월까지는 춘천에서만 조사를 실시하였는데 8월 평균 감염률은 67.9%로 나타났다. 9월은 74%였으며, 마지막으로 10월 조사에서는 춘천은 71%로 나타났고 철원에서는 발병이 없었다. 춘천에서의 바이러스 발생이 지속된 이유는 재배기간 동안 매개충 방제를 위한 약제처리를 하지 않아 수확 후기까지 지속된 것으로 판단된다(표 3.).

표 3. 작목별 바이러스 감염률

- 고추

(단위: %)

조사지점	조사일								
	5.2	6.4	7.9	8.16	8.29	9.10	9.18	9.26	10.15
춘천	0.0	0.0	100	70.5	64	68	-	78.3	47.8
인제	0.0	0.0	2.0	-	-	-	100	-	-

- 파프리카

(단위: %)

조사지점	조사일								
	5.2	6.4	7.9	8.16	8.29	9.10	9.18	9.26	10.15
춘천	0.0	0.0	54.8	65.5	70.2	78	-	70.9	71.0
철원	김화읍1	0.0	0.0	2.0	-	-	-	100	-
	김화읍2								

바이러스종류별 평균 감염비율을 보면 고추의 경우 BBWV2가 68.1%로 가장 높았으며 CMV가 55.4%로 두 번째로 높은 감염률을 보였고 TSWV 가 41.0%였으며, PepMoV는 감염되지 않았다. 파프리카는 TSWV가 52.9%로 가장 높았고, BBWV2 40.6%, CMV 36.3%순이었으며 고추와 마찬가지로 PepMoV는 감염되지 않은 것으로 봤을 때 고추와 파프리카 발생한 진딧물은 PepMoV는 매개하지 않는 것으로 판단된다(표 4.).

표 4. 바이러스 종류 별 감염비율

(단위: %)

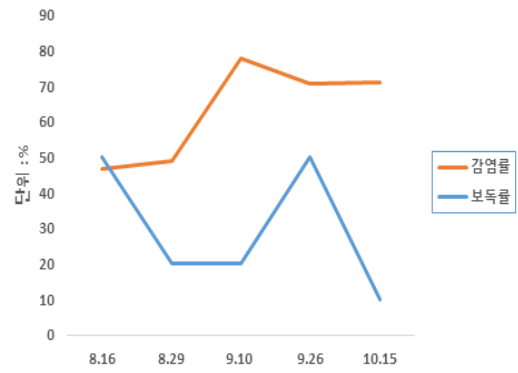
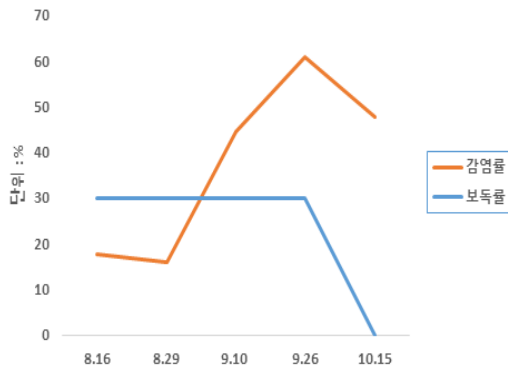
작목	바이러스	평균	조사일						
			7.9	8.16	8.29	9.10	9.18	9.26	10.15
고추	CMV	55.4	25	47	64	56	100	69.6	26.1
	TSWV	41.0	0	17.7	16	44.5	100	60.9	47.8
	BBWV2	68.1	100	70.6	56	68	60	78.3	43.5
	PepMoV	0.0	0	0	0	0	0	0	0
파프리카	CMV	36.3	19.4	50	70.2	16	-	48.4	50
	TSWV	52.9	54.8	46.6	48.9	78	-	70.9	71.0
	BBWV2	40.6	32.3	65.5	42.5	38	-	61.3	44.7
	PepMoV	0.0	0	0	0	0	-	0	0

매개충 보독률을 보면 진딧물은 고추에서는 CMV와 BBWV2의 보독이 최소 30에서 최대 70%의 보독률을 보였다. 특히 9월 과 10월에 매개충 보독률이 가장 높게 나타났다. 파프리카에서는 고추와 마찬가지로 CMV와 BBWV2의 보독률이 가장 높았으며, CMV는 10월 BBWV2는 9월과 10월에 가장 높은 보독률을 보였다. 총채벌레 보독률은 고추에서는 조사기간 동안 30%의 보독율을 보였고 파프리카에서는 8월과 9월에 50%로 높은 보독률을 보였다(표 5.). 바이러스 감염률과 매개충 보독률과의 상관관을 보면 TSWV의 경우 감염율이 증가함에 따라 매개충 보독률이 증가하는 경향을 보였는데 이러한 결과는 총채벌레에 의해서만 감염이되는 총채전염의 특성상 이병주의 증가로 인한 바이러스를 보독한 매개충이 증가하는 정의관계를 보이는 것으로 판단되었다(그림 2.). 바이러스 감염에 따른 병징으로는 CMV와 BBWV2는 고추에서 과실기형을 보였고, 파프리카에서는 CMV로 인한 퇴록증상과 TSWV에 의한 윤문형 반점이 나타났다(그림 3.).

표 5. 매개충 보독률 분석결과

(단위: %)

채집 지역	매개충	작목	바이러스	조사일				
				8.16	8.29	9.10	9.26	10.15
춘천	진딧물	고추	CMV	60	30	60	50	50
			BBWV2	60	70	20	50	50
			PepMoV	0	0	0	0	0
		파프리카	CMV	60	60	50	0	50
			BBWV2	70	60	0	50	50
			PepMoV	0	0	0	0	0
	총채벌레	고추	TSWV	30	30	30	30	0
		파프리카		50	20	20	50	10



고추
파프리카
그림 2. TSWV의 감염률 및 매개충 보독률 유연관계



CMV로 인한 고추 과실기형



BBWV2로 인한 고추 과실기형

그림 3. 작목별 주요 바이러스 병징



CMV로 인한 파프리카 퇴록증상



TSWV로 인한 파프리카 윤문형성

그림 3. 작목별 주요 바이러스 병징(계속)

(시험 2) 원예작물 바이러스 진단키트 제작·보급

2019년에는 고추연한열룩바이러스(PMMoV), 오이모자이크바이러스(CMV), 추키니황화모자이크바이러스(ZYMV) 수박모자이크바이러스(WMV), 토마토반점위조바이러스(TSWV)를 각각 1천점 씩 총 5천점의 진단키트를 제작하였다. 이렇게 제작된 키트는 강원도 18개 시·군농업기술센터 원예작물 담당자를 대상으로 3월에 바이러스예방교육 및 사용방법에 워크숍을 실시하여 무상공급을 하였으며, 수량은 철원군을 제외한 17개 시·군 농업기술센터에 각각 260점씩 진단키트를 보급하였다(표 6., 그림 4.). 보급 받은 시군에서는 현장에서 진단키트를 활용하여 바이러스 의심증상에 대한 조기진단 및 예방을 실시하였으며, 진단키트로 확인 되지 않은 바이러스는 기술원 민원의뢰를 통해 PCR분석을 실시하였다.

표 6. 원예작물 바이러스 진단키트 보급내역

인수기관	박과류(오이, 멜론, 수박 등)			가지과류(고추, 토마토, 파프리카 등)				
	CMV	ZYMV	WMV	CMV	PMMoV	TSWV		
농업기술센터	춘천시	35	55	40	35	55	40	
	원주시	35	55	40	35	55	40	
	강릉시	35	55	40	35	55	40	
	동해시	35	55	40	35	55	40	
	태백시	35	55	40	35	55	40	
	속초시	35	55	40	35	55	40	
	삼척시	35	55	40	35	55	40	
	홍천군	35	55	40	35	55	40	
	횡성군	35	55	40	35	55	40	
	영월군	35	55	40	35	55	40	
	평창군	35	55	40	35	55	40	
	정선군	35	55	40	35	55	40	
	화천군	35	55	40	35	55	40	
	양구군	35	55	40	35	55	40	
	인제군	35	55	40	35	55	40	
	고성군	35	55	40	35	55	40	
양양군	35	55	40	35	55	40		
본원	환경과	70	10	80	70	10	80	
		4,740	665	945	760	665	945	760



워크숍 참석자 단체사진



진단키트 사용방법 시연

그림 4. 바이러스 진단키트 워크숍

〈제3세부과제: 고랭지 배추 씨스트선충류 발생분포 조사 및 방제기술 개발〉

(시험 1) 고랭지 배추 씨스트선충류 신규 발생포장 분포 조사

2011년 강원도 태백시에서 최초 발생한 씨스트선충은 발생 후 인근 시군으로 확대되었으며, 2018년 태백을 포함한 정선, 삼척, 강릉, 영월에서 추가적으로 발생이 확인되었다. 2019년 신규발생 의심포장 토양을 통한 씨스트선충 발생밀도 조사 및 종 동정결과 강릉시, 태백시, 삼척시, 강릉시, 영월군 5개시군 이외의 지역에서는 추가적인 씨스트선충의 발생을 확인하지 못하였다(그림 5).

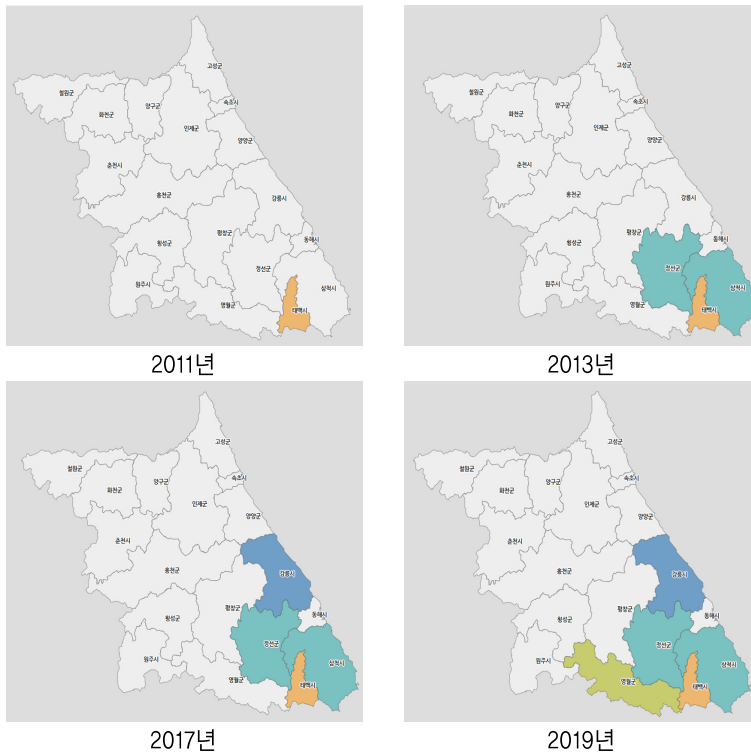


그림 5. 강원지역 씨스트선충류 발생시군('17~'19)

2016년 qRT-PCR 결과 양성반응을 나타낸 49건의 시료중 사탕무씨스트선충은 40%, 클로버씨스트선충은 51%, 콩씨스트선충은 10%의 비율로 동정된 결과를 얻을 수 있었다. 하지만 중 동정이 시작되었던 2016년도 이후 사탕무씨스트선충의 발생비율이 점차 감소하는 양상을 보이는 것을 확인할 수 있었고, 그에 반해 클로버씨스트선충의 발생비율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(표 7). 2017년 씨스트선충 유전자 양성반응을 나타낸 71건의 시료 중 72%의 시료가 클로버씨스트선충 유전자 발현이 되었다는 것을 확인할 수 있었고, 사탕무씨스트선충은 약 10%의 비율로 유전자 발현이 된 것을 확인할 수 있었다. 2018년과 2019년에는 신규발생이 의심되는 포장에 대한 조사가 이루어졌으며, 2018년도에는 70%가 2019년도에는 90%의 비율로 클로버씨스트선충의 발생비율 나타냈다(그림 6). 강원지역에서 시간이 지남에 따라 클로버씨스트선충의 발생이 증가하는 명확한 이유는 본 과제를 통해서 구명하지 못했지만 앞으로 꾸준한 발생양상 조사를 통해 사탕무씨스트선충과 클로버씨스트선충의 발생비율에 대한 명확한 원인규명을 할 예정이다.

표 7. 연도별 씨스트선충 발생현황('16~'19)

발생연도	분석시료	양성반응	동정결과		
			사탕무씨스트선충	클로버씨스트선충	콩씨스트선충
2016	209	49	19	25	5
2017	214	71	5	51	18
2018*	44	19	1	13	6
2019*	76	68	3	63	8

* 씨스트선충 신규발생 의심포장 조사

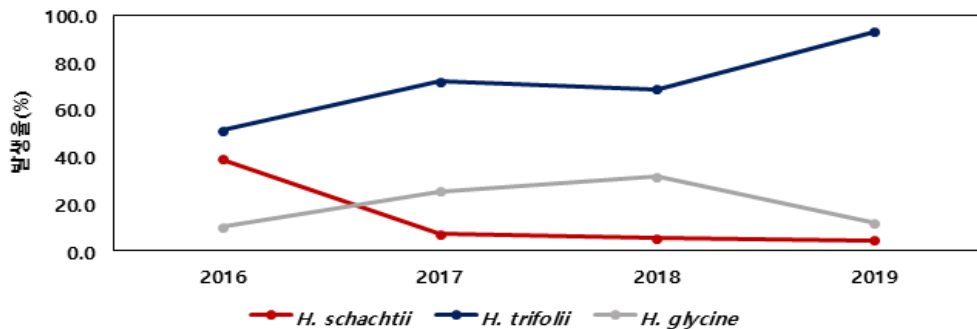


그림 6. 연도별 씨스트선충 발생현황

강원지역 씨스트선충 최초 발생시군인 태백시에서는 2019년 37개의 발생의심 포장에 대한 밀도 조사와 중 동정을 실시하였다. 37개의 시료 중 32개의 시료에서 씨스트선충 유전자의 발현이 확인되었고, 5개의 시료에서는 씨스트선충 유전자의 발현이 확인되지 않았다. 32개의 시료 모두 클로버씨스트선충 유전자의 발현이 확인되었으며, 또 다른 공적방제대상 씨스트선충이 사탕무씨스트선충의 발생을 확인되지 않았다. 공적방제대상 씨스트선충은 아니지만 클로버씨스트선충과 사탕무씨스트선충과 속이 같은 종인 콩씨스트선충은 3개의 포장에서 발생한 것을 확인되었고, 콩씨스트선충이 발생한 포장은 모두 클로버씨스트선충과 복합감염되어있는 포장으로 나타났다. 씨스트선충이 신규로 발생한

포장의 경우 씨스트 알 수 가 1개 이상이 되면 공적방제 대상포장이 된다. 태백시의 경우 씨스트선충 유전자가 양성반응을 나타낸 포장은 모두 공적방제 대상 포장으로 선정되었다(표 8.).

표 8. 태백시 신규발생포장 씨스트선충 발생밀도 및 종 동정

지점	씨스트 수 (개/500cm ²)	알 수 (개/500cm ²)	유전자 분석결과		
			사탕무씨스트선충	클로버씨스트선충	콩씨스트선충
1	450	38,055	음성	양성	음성
2	785	43,123	음성	양성	양성
3	1,570	73,424	음성	양성	음성
4	2,455	345,828	음성	양성	음성
5	1,975	107,243	음성	양성	음성
6	295	26,176	음성	양성	음성
7	745	95,484	음성	양성	음성
8	515	108,167	음성	양성	음성
9	3,105	1,410,188	음성	양성	음성
10	1,240	142,972	음성	양성	음성
11	805	44,812	음성	양성	양성
12	255	8,373	음성	양성	음성
13	275	1,998	음성	양성	음성
14	1,275	94,138	음성	양성	음성
15	0	0	-	-	-
16	665	67,897	음성	양성	음성
17	1,060	62,575	음성	양성	음성
18	6,315	502,674	음성	양성	음성
19	1,955	221,762	음성	양성	음성
20	75	5,145	음성	양성	음성
21	285	29,783	음성	양성	음성
22	0	0	-	-	-
23	5	0	-	-	-
24	0	0	-	-	-
25	35	864	음성	양성	음성
26	1,795	244,180	음성	양성	음성
27	580	85,647	음성	양성	음성
28	1,725	242,190	음성	양성	음성
29	175	5,544	음성	양성	음성
30	2,325	350,455	음성	양성	음성
31	805	117,047	음성	양성	음성
32	1,685	123,005	음성	양성	음성
33	5	395	음성	음성	양성
34	0	0	-	-	-
35	10	0	음성	양성	음성
36	770	84,341	음성	양성	음성
37	15	0	음성	양성	음성

2019년 삼척시 씨스트선충 신규발생 의심포장의 분리동정은 31건의 시료를 대상으로 진행되었다. 31건의 토양시료를 체법을 이용하여 선충을 분리해본 결과 3개 토양시료를 뺀 28건의 토양시료에서 씨스트와 알을 분리 할 수 있었다. 분리된 알을 이용하여 qRT-PCR로 유전자 분석을 한 결과 사탕무 씨스트선충은 4번 시료에서 유전자발현이 되는 것을 확인할 수 있었고, 본 시료는 클로버씨스트선충 이나 콩씨스트선충과 복합감염되지 않은 토양에서 채취되었다는 것을 확인하였다. 클로버씨스트선충은 26개의 토양시료에서 유전자발현이 되었으며, 그 중 6개의 토양시료는 콩씨스트선충과 복합감염된 것을 확인할 수 있었다. 삼척시 또한 태백시와 마찬가지로 신규발생 의심포장 중 씨스트선충이 분리된 모든 포장은 1개 이상의 알이 분리되었지 때문에 공격방제가 이루어 질 것으로 판단된다.

표 9. 삼척시 신규발생포장 씨스트선충 발생밀도 및 종 동정

지점	씨스트 수 (개/500cm ²)	알 수 (개/500cm ²)	유전자 분석결과		
			사탕무씨스트선충	클로버씨스트선충	콩씨스트선충
1	182	407	음성	양성	음성
2	650	286	음성	양성	음성
3	119	1,187	음성	양성	음성
4	230	322	양성	음성	음성
5	373	91	음성	음성	양성
6	0	0	-	-	-
7	0	0	-	-	-
8	1,605	51,574	음성	양성	음성
9	445	13,276	음성	양성	음성
10	2,005	68,036	음성	양성	음성
11	1,235	47,712	음성	양성	음성
12	755	11,727	음성	양성	음성
13	335	5,036	음성	양성	음성
14	780	23,400	음성	양성	음성
15	1,425	66,153	음성	양성	음성
16	500	14,783	음성	양성	음성
17	840	81,060	음성	양성	음성
18	65	626	음성	양성	음성
19	345	22,294	음성	양성	음성
20	270	25,533	음성	양성	음성
21	1,555	310,896	음성	양성	음성
22	575	42,090	음성	양성	음성
23	145	2,243	음성	양성	양성
24	175	8,394	음성	양성	음성
25	485	44,620	음성	양성	음성
26	310	27,673	음성	양성	양성
27	280	19,983	음성	양성	양성
28	465	48,112	음성	양성	음성
29	240	17,992	음성	양성	양성
30	3,955	253,383	음성	양성	양성
31	0	0	-	-	-

정선군은 2019년 총 8개의 지점에서 씨스트선충 발생의심 포장에 대한 밀도조사와 종 동정을 진행하였다. 체법을 이용하여 씨스트를 분리해본결과 8개 토양시료에서 모두 씨스트와 알이 분리되었고, 이중 2개의 토양시료에서는 사탕무씨스트선충의 유전자가 발현된 것을 qRT-PCR을 알 수 있었다. 75%해당되는 6개의 토양시료에서는 클로버씨스트선충 유전자가 발현되었고, 이중 1개 포장은 콩씨스트선충과 복합감염이 일어난 것을 알 수 있었다. 앞서 언급했던 두 개의 시군과 마찬가지로 정선군 역시 모든 토양시료에서 씨스트선충의 알이 분리된 것으로 보아 8개의 포장에 대한 공적방제가 이루어질 것으로 보인다.

표 10. 정선군 신규발생포장 씨스트선충 발생밀도 및 종 동정

지점	씨스트 수 (개/500cm ²)	알 수 (개/500cm ²)	유전자 분석결과		
			사탕무씨스트선충	클로버씨스트선충	콩 씨스트선충
1	522	2,888	음성	양성	음성
2	230	3,803	음성	양성	음성
3	50	7	음성	양성	양성
4	350	19,005	음성	양성	음성
5	150	3,130	음성	양성	음성
6	145	4,026	음성	양성	음성
7	355	37,867	양성	음성	음성
8	560	64,808	양성	음성	음성

2019년 씨스트선충(사탕무씨스트선충, 클로버씨스트선충) 발생이 확인된 신규 발생포장에 대해 공적방제 대상의 기준이 되는 씨스트 알 수를 대상으로 한 발생분포를 확인해 보았다. 기본적으로 강원지역은 발생시군이 인접한 지점에서 주로 씨스트선충의 발생을 보이는 것으로 확인되었고, 올해 발생한 신규포장의 경우 정선군 고한읍을 제외한 모든 포장에서 씨스트 알 수 가 500개 이상을 높은 밀도를 보이는 것을 확인할 수 있었다.



* 씨스트 알 수(개/500cm²): ■ 0~100, ■ 100~500, ■ 500 이상

그림 7. 2019년 신규발생포장 지역별 발생분포

4. 적 요

〈제2세부과제: 원예작물 주요 바이러스병 피해경감기술개발〉

(시험 1) 원예작물 재배지 매개충 발생밀도 및 보독률 분석

- 가. 고추, 파프리카에 발생한 바이러스 종류로는 CMV, TSWV, BBWV2, PepMoV였으며, 고추에서는 BBWV2, CMV, TSWV 순으로 감염율이 높았으며, 파프리카에서는 TSWV, BBWV2, CMV 순으로 감염율을 나타냈다.
- 나. 매개충 보독률 분석결과 진딧물은 고추와 파프리카에서 모두 PepMoV의 보독을 제외한 3종의 바이러스(CMV, TSWV, BBWV2)의 보독을 확인 하였으며, 총채벌레는 고추, 파프리카 모두 TSWV의 보독을 확인하였으며, 감염율 증가와 함께 매개충의 보독률도 증가하는 정의 상관관계를 보였다.

(시험 2) 원예작물 바이러스 진단키트 제작 보급

- 가. CMV등 5종 5천점을 제작하여 17개 시·군 농업기술센터 각각 260점 씩 총 4740점을 무상 보급하였으며, 바이러스 진단키트 워크숍 개최를 통해 바이러스병 예방교육 및 진단키트 사용실습을 진행하였고 진단키트 사용으로 인한 바이러스 조기예방대책을 홍보하였다.

〈제3세부과제: 고랭지 배추 씨스트선충류 발생분포 조사 및 방제기술 개발〉

(시험 1) 고랭지 배추 씨스트선충류 신규 발생포장 분포 조사

- 가. 2011년 태백에서 최초발생 후 인근 시군으로 확대되었으며, 2018년 태백을 포함한 정선, 삼척, 강릉, 영월에서 씨스트선충류가 발생되고 있음. 2019년 태백, 정선, 삼척, 강릉, 영월 외 시군에서의 씨스트선충 발생은 되지 않았음.
- 나. 2019년 씨스트선충 신규 발생 의심포장에 대한 분석은 총 76개의 시료를 대상으로 이루어졌으며, 이중 68개의 토양시료에서 씨스트선충 유전자 양성반응 확인함. 68건의 토양시료에서 90% 이상인 63개의 시료에서 클로버씨스트선충의 감염이 확인되었음.
- 다. 신규발생포장에 대한 씨스트 알 수를 대상으로 한 발생분포 확인결과, 시군이 인접한 지점에서 씨스트선충의 발생을 보임. 올해 발생한 신규포장의 경우 정선군 고한읍을 제외하고 씨스트 알 수가 500개 이상으로 높은 밀도를 보였음.

5. 인용문헌

- 한국식물병리학회. 2009. 한국식물병명목록 제5판. Cho, J. D., Kim, J. S., Kim, J. Y., Kim, J. H., Lee, S. H., Choi, G. S. et al. 2005. Occurrence and symptoms of tomato spotted wilt virus on vegetables in Korea. Res. Plant Dis. 11: 213-216.
- Cho, J. D., Kim, J. S., Lee, S. H., Choi, G. S. and Jeong, B. N. 2007. Viruses and symptoms on peppers and their infection types in Korea. Res. Plant Dis. 13: 75-81.

Cho, J. D., Lee, J. H., Ko, S. J., Choi, H. S., Lee, S. H., Choi, G. S. and Kim, J. S. 2011. Symptoms of Cucumber Virus Diseases Occurred in Sangju and Gurye in 2006 and 2007. Res. Plant Dis. 17(2): 196–204. (In Korean)

Choi, H. S., Lee, S. H., Kim, M. K. Kwak, H. R., Kim, J. S., Cho, J. D. and Choi, G. S. 2010. Occurrence of virus diseases on major crops in 2009. Res. Plant Dis. 16: 1–9. (In Korean)

Czosnek, H. 1999. Tomato yellow leaf curl virus. CMI/AAB Descriptions of plant viruses. No. 368.

Diener, T. O. and Raymer, W. B. 1971. Potato spindle tuber viroid. CMI/ AAB Descriptions of plant viruses. No. 66.

Kwon, S.B., Park D.G, Won, H.S., Moon Y.G., et al., Spread of Cyst Nematodes in Highland Chinese Cabbage Field in Gangwon-do., The Korean Journal of Appl. Entomol., Vol. 57., No. 4., p.339–345

Ko, H.R., Kim, E.H., Kim, S.J., Lee, J.K., Lee, W.H., Rapid Methods to Distinguish *Heterodera schachtii* from *Heterodera glycines* Using PCR Technique., Res. Plang. Dis. 23(3): 241–248(2017)

Lee, J.k., Park, B.Y., Jo, M.R., Jeon, J.Y., 국가관리 사탕무씨스트선충(*Heterodera schachtii*) 발생 및 방제 추진 현황., The Korean Journal of Appl. Entomol., 2013., p36

Lee, J.k., Park, B.Y., Jo, M.R., Ko, H.R., Kim, S.J., 고랭지 배추 사탕무씨스트선충 (*Heterodera schachtii*) 발생 및 확산방지 방안, The Korean Journal of Appl. Entomol., 2014., p55

Jeong, M.G., Lee, D.W., Effect of Inoculum Density and Temperature on Clover Cyst Nematode, *Heterodera trifolii*., The Korean Journal of Appl. Entomol., Vol. 58., No. 1., p.49–54

Shin, J.H., MD Faisal Kabir., Lee, D.W., 배추 재배지에서 사탕무씨스트선충에 대한 생물검정., 한국농약과학회지., 2015. 10., p.83

6. 연구결과 활용

연도(연차)	활용방안	제 목			
2019(1년)	홍보	원예작물 바이러스 현장진단키트 보급			
	학술발표	강원도 횡성군 TSWV 발생양상			
	워크숍	원예작물 바이러스 현장진단키트 제작·보급			
	기초자료	강원지역 고랭지배추 씨스트선충 신규발생포장 밀도조사 및 종 동정			
성과지표명	연도	1년차(2019)		계	
		목표	실적	목표	실적
학술 발표	국제	-	-	-	-
	국내	-	1	-	1

성과지표명	연도	1년차(2019)		계	
		목표	실적	목표	실적
품종	출원	-	-	-	-
	등록	-	-	-	-
영농 활용	기술	-	-	-	-
	정보	-	-	-	-
기술이전		-	-	-	-
정책제안		-	-	-	-
농자재 등록		-	-	-	-
홍보		-	1	-	1
기술지도		-	1	-	1
계		-	3	-	3

7. 연구원 편성

구 분	소 속	직 급	성 명	수행업무	참여년도
					'19
과제책임자	환경농업연구과	농업연구사	이재홍	과제 총괄	○
2세부책임자	"	농업연구사	원현섭	세부주관 수행	○
공동연구자	"	농업연구관	정태성	시험수행 협조	○
	"	농업연구사	이안수	시험수행 협조	○
	"	"	황세정	시험수행 협조	○
3세부책임자	환경농업연구과	농업연구사	황세정	세부과제 수행	○
공동연구자	"	농업연구사	원현섭	조사분석지원	○
	"	"	이안수	조사분석지원	○
	"	농업연구관	정태성	평가분석지원	○
	"	"	홍대기	평가분석지원	○