

발 간 등 록 번 호

11-1543000-000061-01

수출입 식물병 검역을 위한 진단기술 개발
(Development of molecular diagnostic methods for
quarantine plant pathogens)

서 울 대 학 교

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “수출입 식물병 검역을 위한 진단기술 개발”에 관한 연구과제의 보고서로 제출합니다.

2013년 07월 01일

주관연구기관명 : 서울대학교
주관연구책임자 : 김 국 형
제1세부연구책임자 : 김 국 형
제2세부연구책임자 : 이 용 환
제1협동연구기관명 : 순천향대학교
협동연구책임자 : 윤 성 환
제2협동연구기관명 : 충북대학교
협동연구책임자 : 차 재 순
제3협동연구기관명 : 단국대학교
협동연구책임자 : 김 성 환
제4협동연구기관명 : 경상대학교
협동연구책임자 : 이 현 숙

요 약 문

I. 제 목

수출입 식물병 검역을 위한 진단기술 개발

II. 개발의 목적 및 필요성

검역대상 식물 병원체를 효과적으로 진단 기술 개발 및 관리 분류할 수 있는 시스템개발 구축이 필요하다.

III. 개발 내용 및 범위

본 연구에서는 검역대상 식물병원체 시료 확보 및 병원체 진단을 위한 분자생물학적 기법을 개발하고, 식물병원균 정보, 분자 표지 정보를 포함한 각종 실험적 결과, 계통분류학적 정보 등을 관리할 수 있는 시스템을 개발하고, 동시에 유전체 자료를 활용하여 동정에 도움을 줄 수 있는 시스템을 개발하는 것을 목표로 하였다. 검역대상 병원체 동정을 위해 PCR, RT-PCR, Taqman PCR, ELISA와 같은 분자생물학적 및 생화학적 방법을 이용하였다.

IV. 개발결과

검역대상 곰팡이, 세균, 바이러스를 포함한 식물병원체를 효과적으로 진단하기 위하여, 많은 종류의 검역 대상 병원체들의 시료를 확보하였다. 확보한 시료와 기존에 알려진 병원체의 염기서열 정보들을 바탕으로 다양한 방법의 분자생물학적 기법들을 이용하여 진단키트를 개발하였다. 곰팡이의 경우 곡류, 채소류, 화훼류 수입 식물에서 빈번히 검출될 가능성이 있는 검역종과 근연종 곰팡이의 검출과 동정을 위해 총 32종 PCR 증폭용 프라이머를 개발하였으며, 과수 및 수목류 검역대상 주요 곰팡이의 진단 기술 개발을 위해 분자적 마커를 만들어 PCR을 이용하여 쉽고 빠르게 검출 할 수 있는 방법을 개발하였다. 병원성 세균의 경우 국내 식물검역대상 병원체 세균 5종에 대한 전체 염기서열을 결정하였으며, PCR 및 Taqman PCR용 프라이머를 개발하였다. 식물바이러스의 경우 총 22종의 RNA바이러스에 대한 RT-PCR를 이용한 동정 기법을 개발하였고, 검역용 10종의 식물 바이러스를 대상으로 ELISA와 RT-PCR을 이용한 동정방법을 개발하였다. 식물병원균 정보, 분자 표지 정보를 포함한 각종 실험적 결과, 계통분류학적 정보 등을 웹에서 입력, 수정, 삭제 기능을 포함하는 관리 시스템을 구축하였으며, 유전체 정보를 활용하여 상동성 검색 프로그램인 BLAST와 다중서열정렬을 수행하는 ClustalW 및 다중서열정렬에 기반한 계통분류학적 분석을 수행할 수 있는 QIMS 시스템을 개발하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

5년간의 본 연구를 통해, 총 7건의 특허 출원, 23편 논문 (SCI급 20편, 비SCI급: 3편)출간, 49편의 학술발표, 16명의 연구인력 양성, 2편의 수상실적등의 연구성과를 거두었다. 특히 개발된 검역 기술들은 검역현장 사용을 위해 프로토콜 최적화가 현재 진행 중이다. 또한 본 연구 성과는 PCR, RT-PCR, Taqman PCR 및 ELISA 기술을 이용한 식물병원성 진단키트 개발을 통해 연구개발의 실용화를 위해 노력할 것이며 병원체 유전체 해독 분야, DNA chip 이용 등 다양한 검출기술 개발 분야 등에 활용할 예정이다. 또한 QIMS 개발 결과 검역 과정에서 생산되는 실험적 동정 자료의 저장 및 관리가 가능한 시스템을 구축하였고, 유전체 정보에 기반한 동정 방법 및 체계를 갖추게 되었다. 병원균, 식물병, 기주 정보는 지속적으로 추가 및 갱신되어야 하며, 유전체 정보를 기반으로 하는 검역종 동정의 정확성을 확보하기 위해서는 검색 대상 데이터베이스를 주기적으로 업데이트할 것이다.

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title

Development of molecular diagnostic methods for quarantine plant pathogens

II. The purpose and need for development

To detect plant pathogens for quarantine purposes, it is necessary to develop various detection techniques and a system which manages and classifies plant pathogens efficiently.

III. Contents and scopes

In this project, we achieved several purposes such as obtaining plant materials infected with quarantine pathogens, development of molecular biology techniques to detect pathogens, and establishment of a management system that has input, edit and delete functions to organize plant pathogen information, molecular marker information, various experimental data and phylogenetic information on the web. To detect quarantine plant pathogens, we developed molecular and biochemical methods including PCR, RT-PCR, Taqman PCR, and ELISA.

IV. The results

For efficient development of detecting quarantine plant pathogens including fungi, bacteria, and viruses, many plant samples infected with plant pathogens were obtained. With obtained samples, we developed detection kits using diverse molecular biological methods based on known sequences for pathogens. In case of fungi, we developed a total of 32 primer pairs for PCR to detect fungi which could be frequently identified in crops, vegetables, and flowering plants. For fungi infecting trees, molecular markers based on PCR were developed. In case of pathogenic bacteria, whole genome sequences for five bacteria were determined and detection methods based on PCR and Taqman PCR were developed. In case of quarantine plant viruses, RT-PCR based detection tools were developed for a total of 22 different viruses. In addition, we developed detection methods for 10 quarantine plant viruses based on ELISA and RT-PCR. Moreover, the development of QIMS turned out to be functionally well operating as the detection of 100% homogeneity based on molecular marker sequences, from the internally stored molecular marker database, had been proved. For the blind test, the result retrieved in link with NCBI non-redundant database showed a genus level accuracy and provided basis for the identification. This would be improved to yield more accurate information with consistent updates of the corresponding database.

V. Outcomes and future plans

As a result for five-year study, we applied a total of seven patents, published a total of 23 scientific papers (20 for SCI papers and 3 for non-SCI papers), presented our data 49 times in scientific conference, educated a total of 16 students, and awarded two times. Especially, the developed detection techniques are now being optimized to use in quarantine field. In addition, we will do our best to put the developed methods including PCR, RT-PCR, Taqman PCR, and ELISA to practical use. Along with the developed detection kits for plant pathogens, the genome sequencing of plant pathogens, and DNA chips could be applied for detection tools. The web-based system to archive and manage experimental identification results is developed. In addition, species identification system that is based on genome data is introduced. The information for pathogens, diseases and hosts should be updated and maintained. It is also required to update databases and data sets for identification by genome sequences.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction and Background	7
Chapter 2. Previously Reported Researches and Systems	9
Chapter 3. Result and Outcome of Development	16
Verse 1. Development of RT-PCR based detection tools and standard samples for major quarantine plant viruses	16
Verse 2. Result of Development on Quarantine Information Management system	44
Verse 3. Development of detection techniques for fungi infecting crops, vegetables, and flower plants	61
Verse 4. Development of detection techniques for fungi infecting fruit trees and trees	119
Verse 5. Development of detection tools and standard samples for major quarantine plant bacteria	188
Verse 6. Development of ELISA kits for quarantine plant viruses	260
Chapter 4. Achievement and Contribution on Related Area	329
Chapter 5. Future Application of the Achievement	344
Chapter 6. Scientific and Technological Information Obtained During Development	347
Chapter 7. Status of Research Facilities and Equipments	351
Chapter 8. References	352

목 차

제 1 장	개발과제의 개요	7
제 2 장	국내외 기술개발 현황	9
제 3 장	개발수행 내용 및 결과	16
제 1 절	주요 검역대상 식물 바이러스의 RT-PCR 진단기법 및 진단용 표준시료개발	16
제 2 절	식물병원균 검역 정보 관리 시스템 (QIMS) 구축을 위한 데이터베이스 구축 및 관리 시스템 개발	44
제 3 절	곡류, 채소, 화훼류 작물 검역대상 주요 곰팡이의 진단기술 개발	61
제 4 절	과수 및 수목류 검역대상 주요 곰팡이의 진단기술 개발	119
제 5 절	주요 검역대상 식물 병원성 세균의 진단기법 및 진단용 표준시료개발	188
제 6 절	식물검역용 바이러스 진단용 ELISA Kit 개발	260
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	329
제 5 장	개발 성과 및 성과활용 계획	344
제 6 장	개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	347
제 7 장	개발시설·장비 현황	351
제 8 장	참고문헌	352

제 1 장 개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 목적 및 필요성

식물검역은 식물에 피해를 주는 병해충 및 병원균이 새로운 지역으로 유입되는 것을 사전에 방지하는 일련의 절차를 의미한다. 이는 우리나라에서 보고된 바 없는 해외 병해충 및 병원균의 국내 유입을 방지하여 우리 농작물에 타격을 입히거나 생태계를 교란할 수 있는 가능성을 차단하기 위함이다. 식물검역 실패에 따른 농작물 피해는 그 규모와 피해액을 가늠할 수 없을 정도로 심각한 피해를 줄 수 있기 때문에, 검역의 중요성은 매우 크다고 할 수 있다. 실제로, 1859년 경, 프랑스는 흰가루병에 내성을 가진 포도 묘목을 미국으로부터 대량 수입했다. 그러나 이 과정에서 필록세라(phylloxera)라는 포도나무뿌리진디가 함께 유입되어, 10년 만에 유럽의 포도밭을 초토화시키는 사건이 발생했다. 프랑스를 비롯한 여러 유럽 국가들은 포도나무를 소각하고 방제법에 현상금을 내 걸었을 정도였으니, 당시의 심각성을 충분히 짐작할 수 있다. 이후 1972년 독일은 자국의 포도와 농작물을 보호하기 위해 포도해충 예방령을 제정 공포하고 포도 묘목의 수입을 금지하는데, 근대적인 식물검역의 시작을 이 사건 이후로 보는 견해가 많을 정도로 그 피해가 컸던 것이다. (Pouget, 1990; Granett et al., 2001) 현대적인 검역이 자리를 잡은 이후에도 외래 병원균의 유입으로 인한 피해는 끊이지 않았다. 대표적인 사례가 2004년 11월에 보고된 soybean rust(콩 녹병) 균의 미국내 유입이다. 미국의 농작물 산업 중 콩은 180억 달러에 달하는 시장규모를 자랑할 정도로 중요한 작물이다. 2004년 11월 6일에 처음으로 soybean rust 의심 병반을 루이지애나(Louisiana) 주에서 발견한 이후, 수일 만에 아칸사(Arkansas), 미시시피(Mississippi), 알라바마(Alabama), 플로리다(Florida) 등지에서 soybean rust 양성 반응을 보고하였다고 한다. Soybean rust 병원균은 빠르게 퍼져나갔고, 신속한 방제 노력에도 불구하고 그 해의 손실액이 최대 20억 달러로 추산될 정도로 큰 타격을 입었다 (Stokstad, 2004). 위와 같은 사례에서 보듯이 식물검역의 중요성은 나날이 커져가고 있으며, 국내 유입 이전에 원천봉쇄하는 것만이 최선책임을 잘 보여주고 있다.

세계 각국의 수출입 시장이 개발된 이후 국내 농산물 수입은 매년 증가하고 있다. 국내의 인건비 상승, 농업 종사자의 노령화 등으로 우리나라의 주요 식품 자급률은 계속 떨어지고 있다. 2010년 농촌경제 연구원이 발표한 식품 수급 표에 의하면 우리나라의 농산물 자급률은 곡류 28.0%, 서류 98.4%, 두류 11.0%, 채소류 90.1%, 과일류 81.0% 등으로 자급률이 모자라는 농산물은 해외에서 수입 할 수밖에 없는 실정이다. 또한 지구온난화와 소비자의 고급 농산물 선호로 아열대, 열대 지역의 농산물의 소비가 늘고 있고 우리나라에서 파종하는 종자 및 종묘 증식도 중국, 베트남 등 아열대 지역에서 증식시켜 도입하는 경우가 많아지면서 지금까지 국내에 도입되지 않은 병원균들이 국내에 도입될 위험률이 높아짐에 따라 지금까지 검역대상이 되지 않았으나 도입 위험성이 있는 병원균 검역의 필요성이 높아졌다고 할 수 있다. 현재의 식물검역은 현장검사 및 실험실검사를 거치는 등의 체계를 갖추고 있으나, 유전체 서열정보를 활용한 방법은 구체화 되어 있지 않은 것이 현실이다. 검역정보 관리 시스템(QIMS: Quarantine Information Management System)의 개발은 유전정보를 활용하여 관리종 및 검역종 동정할 수 있는 기능을 구축하고, 실험 정보와 대조하여 좀 더 정확한 검역 결과를 산출하는 데에 초점을 두고 개발되었다.

수입되는 식물은 사용용도에 따라 국내토양에 직접 파종되거나 재식되는 “파종 및 재식용”, 재식되지 않고 소비되는 “파종 및 재식용이 아닌 것”으로 구분된다. 이 중 외래 병해충의 유입위험성이 큰 것은 파종 및 재식용 식물이다. 특히 식물바이러스의 경우 식물체내에 잠복되어 존재해 있다가 토양에 재식되어 식물체로서 생육하게 될 때 병원체의 활동 및 전파가능성이 높으므로 그 중요성은 더욱 크다고 할 수 있다. 본 연구에서는 첨단 검사법 (ELISA, RT-PCR)이 아직 개발되지 않은 관리 바이러스병 30여종 중 바이러스 genome sequence가 알려진 10여종 바이러스의 ELISA 진단법 및 바이러스 진단용 Primer를 개발하기로 하였다. 그러므로 외래 도입 바이러스 병에 대한 피해를 줄이고 이를 예방하기 위해서 이들 바이러스에 대한 진단시스템의 구축이 필요하다. 이는 해외로부터 들어오는 식물에서 바이러스 감염 여부를 확인하고, 식물이 발아하고 자라는 동안에 바이러스가 감염되었는지 미리 확인함으로써 이후 바이러스에 의한 피해를 미리 예방 및 감소시키기 위함이다. 두 번째로 일반적으로 바이러스는 감염된 식물에게 특징적인 증상을 유발시키는데 이러한 증상이 필드에서 바이러스 감염 여부를 진단하는 일차적인 방법이 된다. 하지만 다른 바이러스에 의해서 유발되거나 영양결핍, 수분조절의 실패 등 병원균에 의해서가 아닌 경우에도 비슷한 증상을 보이는 경우가 많이 그 원인 파악이 제대로 되지 않는 경우도 있어 병증만으로는 바이러스 감염을 판단하기가 어렵다. 바이러스 저항성을 가지는 종을 개발한다고 해도 결국 바이러스를 검출할 수 있는 진단시스템이 필요하다. 따라서 항체와 특이 primer를 이용한 PCR을 통한 검출방법은 재현성이 높으며 일반적인 기술을 이용하기 때문에 사용이 용이하고, 민감도와 특이성 역시 높다. 이러한 점을 바탕으로 수입 식물의 잎, 과일, 종자 및 뿌리에서 바이러스 감염 여부를 확인할 수 있는 진단시스템을 구축하고자 하였다. 대상 바이러스가 국내에는 보고된 바가 없기 때문에 순수 분리한 바이러스로 항체제작 등을 할 수 없어 이미 genome sequence가 알려진 검역용 바이러스 10종 (표. 1)의 바이러스 coat protein sequence를 이용하여 바이러스 외피 단백질 유전자를 합성하였다. 이 외피단백질 유전자를 이용하여 재조합 plasmid를 제조하고 E.coli에서 바이러스 외피 단백질을 발현하여 정제한 후 mouse 및 토끼에게 주사하여 단클론 및 복클론 항체를 합성하였다. 또한 외피단백질을 유전자를 표적으로 하는 특이 primer를 제작함으로써 바이러스 입자를 검출해낼 수 있는 진단 시스템을 구축하고자 하였다.

제 2 절 연구개발의 범위

- 분자생물학 및 생화학적 기법을 이용한 식물병원체 동정 및 분류 시스템 개발
- 식물병원체 검역용 표준 표본시료와 유전자시료 개발 및 관리
- 주요 검역대상 병원체 그룹별 검역기법 개발
 - 총 348 종의 검역 대상 곰팡이 병원체 (금지 및 관리병해충) 중 국립식물검역원과의 협의 아래 분자진단기법 개발의 필요성이 제기된 125종 중 40종 (식물검역원 자체 개발 대상 29 종 제외)
 - 검역대상 식물병원성 세균(금지 및 관리세균 42종) 및 유입외래세균(3종) 중 20종 이상의 위험성 평가(PRA datasheet 구축)
 - 검역대상 식물병원성 바이러스(금지 및 관리바이러스 106종 중 진단기법이 기 확보되었거나 검역원 자체 개발대상 바이러스를 제외) 중 20종
 - 기후변화에 따라 돌발 발생가능한 병원체
- 고밀도 곰팡이병원체 검역용 올리고칩 개발 및 식물검역 활용가능성 검토

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절

국내외 관련 특허 분석

1. 2006년에 일본에서 network quarantine system이라는 특허명으로 검역 시스템을 개발한 바 있다. 본 특허는 직접적인 검역 과정 및 분석보다는 검역에 연관된 시스템이라는 측면에 초점을 맞추었으며, 본 과제에서 수행한 QIMS 개발에 포함되어 있는 검역 관련 염기서열 정보를 제공하는 등의 내용은 누락되어 있다. (Naoto *et al.*, 2006) 앞서 언급했듯이, 염기서열 정보를 활용한 검역 관리중 및 금지종의 동정 자료는 검역 과정에서 결정적인 근거로 작용할 수 있기 때문에, 새로운 검역체계에 일조할 수 있을 것으로 본다.

2. 곰팡이 종 분류 분야

○ 곰팡이 종의 분류는 전통적으로 배양체의 특성, 균사와 무성/유성포자의 형태적 특징과 종 내 균주 사이의 유성교배의 여부에 의존하였음. 이러한 특징에 따른 분류는 생물학적 종 (biological species) 개념에 바탕을 둠

○ 최근의 연구 추세는 곰팡이 균주의 유전체에 공통적으로 존재하는 특정 부위 또는 유전자 (예: ITS, *TEFI*, *RPB2*, *TUB1*, *GPD* 등) 의 염기서열을 비교·분석하여 통계적으로 유의한 계통수 (phylogenetic tree)를 작성하는 계통발생학적 연구를 통해 종 동정을 최종 결정함. 이러한 접근방법은 계통발생학적 종 (phylogenetic species) 의 개념에 바탕을 둠

○ *Fusarium* 속 내 종 분류체계의 경우, 예전의 단일 생물학적 종에 속하는 균주들을 중복합체 (species complex) 내 계통발생학적 종으로 세분화 하는 경향이 정착되고 있음 (O'Donnell *et al.*, 2000a, 2000b). 이는 기존의 포자모양 등과 같은 형태적 기준에 의한 분류방식보다 특정 유전자의 염기서열 비교 분석을 통한 계통발생학적 분석방법이 일반화됨에 따라 진행되고 있음. 이에 따라 *Fusarium* 의 개별 종 동정 뿐 아니라 *Fusarium* 중복합체 수준의 동정 기술 개발이 필요하게 됨.

○ 최근 중복합체에 재분류 움직임이 활발한 *Fusarium* 종으로는 *F. graminearum* 중복합체, *F. solani* 중복합체, *F. oxysporum* 중복합체, *F. equiseti-incarnatum* 중복합체, *F. chalydosproum* 중복합체, *F. sporotrichioides* 중복합체 등이 있음.

○ 최근의 유전체 해독 기술의 발달로 계통발생학 연구에서도 1-2 종의 분자마커 유전자가 아닌 다수의 유전자 또는 유전체 내 모든 보존 유전자의 염기서열을 이용한 phylogenomic tree 작성을 통해 특정 종 소속 집단의 분류학적 위치를 재정립하고 있음.

3. 곰팡이 종의 특이 검출 및 동정

○ 현미경 검경을 제외한 곰팡이 종의 특이 검출 및 동정은 주로 PCR 증폭 기법이 개발되었음

○ DNA 염기서열 분석에 의한 종 간 또는 종 내 변이는 RAPD, AFLP 등의 방법으로 동정이 되었으며, 이들 변위 부위로부터 PCR 용 특이 프라이머의 선발이 국내외에서 광범위하게 진행되었음. 하지만 주로 이는 병저항성 식물의 육종, 포장 내 병 발생 예찰 등의 범위에서 사용되었음

○ 특히 국내의 경우, 불특정 다수의 곰팡이 종을 신속하게 검출 동정해야 하는 검역현장에서 PCR 기법의 사용이 아직 실용화되지 못함 (세균과 바이러스 검출에는 ELISA, PCR 기법이 활용됨)

○ 국내에서 식물병 진단 관련 키트를 상업적으로 유통·판매하는 회사는 (주) 기산바이오테크 (www.kisanbio.com) 이 거의 유일함. 바이러스 병원체 380 종, 세균 131 종, 곰팡이 41 종 을 진단할 수 있는 키트와 PCR 검출을 이용한 유전자 진단 키트를 판매하고 있음.

○ 하지만 41 종의 곰팡이 병원체 중 2 종만이 검역 대상 종일 뿐 아니라, 검출 방법도 ELISA 방식임.

○ 국내 기술에 의한 개발·생산된 병원성 곰팡이 진단제품은 전무한 실정임.

○ 국내 식물 곰팡이병 진단 관련 시장의 현황 및 규모에 대한 분석 또한 전무한 실정임.

○ 해외의 경우, 전통적인 PCR 기법 뿐 아니라 정량적 실시간 PCR (quantitative real-time PCR) 기법을 응용하여 곰팡이 종의 특이 검출 뿐 아니라 시료 내 정량적 분석도 시도 중임 (Van Gent-Pelzer et al., 2007). 하지만 이 또한 특정 병원체에 집중되어 있으며, 검역현장에서 광범위하게 적용될 수 있는 실용화 단계는 아님.

○ 한편, PCR 기법 외 DNA chip을 이용한 곰팡이 종 동정 기법에 대한 연구가 진행 중임. 하지만 주요 독성 또는 병원성 곰팡이의 특정 종 내 구분 (differentiation)에 활용 중이나 (Nicolaisen et al., 2005), 검역현장에는 아직 광범위하게 적용되고 있지 않음.

4. 식물성 병원체군의 진단기법을 개발하기 위해서는 점차 생화학적 기법보다는 다양한 종류의 PCR 방법 및 qPCR 방법에 의한 분자생물학적 및 유전적 기법이 더 개발되고 있는 실정이다. 또한 300 bp 이상의 DNA 단편을 probe하기보다는 oligo nucleotide를 직접 probe로 사용하여 검출 민감도도 월등히 향상되고 cross-reaction을 줄이는 방법들로 전환되고 있다. 특히 이를 이용한 macro-array 방법 등을 이용하여 단시간내에 많은 양의 샘플을 검증할 수 있는 기술 등으로 전환되고 있다.

5. 현재 유럽, 북미, 중앙아시아 네팔 지역에서 산림 훼손 피해가 보고되고 있다 2008. 특히 기주 수목에 해를 가하는 바구미, 나무좀류(bark beetle)등에 의한 1차 또는 2차 피해 발생과 관련하여 *Ophiostomatoid* 균류가 밀접하게 관련하는 것으로 보고되고 있다. 최근 자료에 의하면 중앙아시아 부탄 지역의 훼손된 산림으로부터 *Leptographium bhutanense*의 보고가 있으며 이 종이 그 동안 산림의 중요 병원균으로 알려진 다른 *Leptographium* species와 유전학적 연계성이 있음이 제시되었다. 특히 이들 균류는 유해 해충들과 연계 되어있어 그 피해 확산의 우려가 심각한 상황이다. 뿐만 아니라 러시아 핀란드에서는 *Ophiostoma piceae* complex 그룹내에 속하는 *O. karelicum* (2008)을 보고하면서 이들의 병원성에 대한 우려를 표명하고 있다. 또한 최근까지 보고된 캐나다의 Iodepole 소나무 피해가 약 1600만 헥타르에 이르는 엄청난 피해가 발생한 것으로 보고 되었다 이는 Mountain pine beetle 과 소나무의 병원균으로 알려진 *Grossmannia clavigera* 에 의한 것으로 보고되어 현재 이들의 병원성과 Mountain pine beetle 의 관계를 브리티시 컬럼비아 대학의 Dr. Breuil과 미국 농무성의Dr. Klepzig 등을 중심으로 활발한 연구가 진행 중이다. 현재 이 병원균에 대한 초벌 유전체연구가 보고되었다 (2011).

6. 우리나라의 경우 북미, 오세아니아 등에서의 목재 수입에도 불구하고 이들 균에 대한 연구가 미비한 상태이다. 특히 병원균으로 알려진 *Leptographium* species: *L. procerum*, *L. alethinum*, *L. serpens*(*Grossmannia serpens* : telemorph), *L. terebrantis*과 *Grossmannia clavigera* 와 이들의 매개체로 알려진 나무좀류(bark beetle)과 바구미과 해충에 대한 체계적인 연구와 관리 필요성에 대해 간과 하였다. 따라서 식물검역의 체계적인 관리를 위한 이들 균류에 대한 연구가 진행되어야 할 될 것으로 사료 된다. 특히 기후변화에 민감한 곤충류(딱정벌레, 바구미, 나무좀)에 의해 매개 전파되는 수목류에 피해를 주는 곰팡이균에 대한 관리병해로서의 가치에 대한 검토가 요구된다.

7. 가장 최근의 국립식물검역원의 2011년도 2월 검역현황 자료(아래표)에서 보듯이 목재류에서 검출된 해충으로 긴나무좀과, 나무좀과, 거저리과, 바구미 등이 빈도 있게 검출되는데 이들은 *Ophiostomatoid* 균류를 매개하는 매개충으로 알려져 있어서 해충과 더불어 매개되는 곰팡이균

류에 대한 조사 작업도 동반되어야 할 것이다. 이와 관련하여 국제적으로는 International Forestry Quarantine Research Group, IPPC Technical Panel on Forest Quarantine, 그리고 the North American Plant Protection Organization 등에서 중요하게 취급하고 있다. 국내에서는 어느 누구도 이들 산림병해충 나무, 목재 검역에 참여하는 사람이 없어서 검역 및 감염기주 처리 등에 관한 기술적 정보가 취약한 실정이다. 이에 대한 접근도 이루어져야 할 것이다.

병 해 충 명		검출빈도 (2월중)	관련 품목
해충	<i>Platypus</i> sp.(긴나무좀과)	19회	나왕각재, 아카시아나무각재
	<i>Xyleborus agnatus</i> (나무좀과)	17회	나왕각재
	<i>Leiochrinus</i> sp.(거저리과)	17회	나왕각재
	<i>Mitrastethus baridioides</i> (바구미)	16회	호박, 소나무각재

제 2 절

국내외 관련 논문 분석

1. Phytophthora Database

Phytophthora Database(Park *et al.*, 2008b)는 potato late blight의 난균류 병원균인 *Phytophthora infestans*를 포함하는 *Phytophthora* 속(genus)에 대한 marker sequence를 제공하여 동정에 활용할 수 있는 웹 시스템이다. PD는 marker sequence들에 대한 BLAST (Johnson *et al.*, 2008) 기능을 제공하여, 결과 서열에 존재한다면 신속하게 해당 종을 동정할 수 있도록 설계되었다. 이는 QIMS 개발에 포함되어 있는 기능이기도 하다. 그러나 PD는 QIMS와 달리, marker sequence를 제외한 미생물 유전체 정보를 활용할 수 없다는 차이점을 가지고 있다. 또한, PD는 검역에 관련된 종의 marker 정보가 아니라, *Phytophthora* 라는 단일 속의 정보만을 제공하고 있다는 점도 큰 차이점이다. PD는 검역 관리종 및 금지종의 동정에 염기서열 및 단백질 서열 정보를 생물정보학 프로그램을 활용하는 좋은 예시이며, QIMS는 PD가 가지고 있는 marker sequence 정보 활용을 포함하여, 이미 전장 유전체(fully sequenced genome)가 밝혀진 유전체 정보를 동시에 활용할 수 있도록 그 범위를 확장하고자 하였다.

2. Quarantine Activity Reporting System

Quarantine Activity Reporting System (QARS) (Krishnamurthy *et al.*, 2006)는 검역 관련 조치가 취해졌을 경우에 일련의 사건들을 처리할 수 있는 시스템이다. 이 시스템은 검역 작업의 흐름(workflow)을 관리하는 시스템이며, 실제 검역(Inspection) 현장에서 주로 이용하게 되는 병원균 동정이나 병원균에 대한 정보를 관리하는 기능은 빠져있다. 따라서 염기서열 정보에 기반한 병원균 동정을 각종 부가적인 실험 자료 및 marker 자료와 비교하여 판단할 수 있는 QIMS와는 큰 차이점을 가진다고 할 수 있다.

제 3 절

국내외 기타 데이터베이스 분석

1. 미국 농무성(USDA: United States Department of Agriculture)의 Animal and Plant Health

Inspection Service (APHIS) 관할로 운영되고 있는 Plant Protection and Quarantine (PPQ), European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO)의 검역 해충에 대한 데이터베이스인 Quarantine Data Retrieval System (PQR)의 경우, 검역과정에서 필요한 정보를 관리하는 시스템으로 알려져 있다.(<http://www.eppo.int/>) 그러나 실제 검역 현장에서 주로 이용하게 되는 병원균 동정이나 병원균에 대한 생물유전정보를 관리하는 기능은 빠져있다. 따라서 최근 급속한 속도로 추가되고 있는 염기서열 정보에 기반한 병원균 동정을 각종 부가적인 실험 자료 및 분자 표지 자료와 비교하여 판단할 수 있는 QIMS와는 차이점을 가진다고 할 수 있다.

2. 우리나라 식물 검역소에서는 약 105종의 관리바이러스 병이 등록되어 있다(표. 2, 3). 이들 바이러스 병을 검역하기 위하여 바이러스 단백질에 대한 항체를 이용한 ELISA방법과 바이러스 유전체를 검출하기 위한 특이 primer를 개발하여 RT-PCR로 특정 바이러스 존재유무를 판별하고 있다. 이들 관리바이러스 중 약 30종은 이 바이러스를 검역할 수 있는 첨단 검출법(ELISA 및 PCR)이 세계적으로 개발되어 있지 않다. 이들 바이러스는 우리나라에 도입된 바가 없으나 농산물의 수입이 국가별로 다원화되고 그 종류도 다양하게 증가됨에 따라 검역의 필요성이 증가되고 있다. 본 연구에서는 첨단검출 방법이 개발되지 않은 관리바이러스 30종 중 바이러스 유전체 sequence가 구명된 10종(표. 1)에 대한 검출법을 개발하기로 하였다. 이 10종의 바이러스는 우리나라에 도입된 적이 없어 바이러스 입자를 구할 수 없었던 관계로 다른 연구자들이 보고한 바이러스 유전체 sequence를 이용하여 바이러스의 합성 유전자를 만들어 실험을 진행하였다(표. 2, 3).

표. 2. 관리병 해충(virus).

일련번호	병해충명 바이러스 (붉은색은 본 연구과제에서 첨단검사법을 개발)	검사방법			
		ELISA		PCR	첨단검사법 미개발
		기산	바이원		
1	Abutilom mosaic virus	O		X	
2	Alstroemeria mosaic virus	O	O	X	
3	Andean potato latent virus	O	O	감자	
4	Andean potato mottle virus	O	O	감자	
5	Apple necrosis virus				O
6	Arabis mosaic virus	O	O	O	
7	Artichoke Italian latent virus				O
8	Banana bract mosaic virus	O	O	X	
9	Banana bunchy top virus	O	O	X	
10	Bean common mosaic necrosis virus	O	O	종자	
11	Bean golden mosaic virus	O	O	X	
12	Bean pod mottle virus	O	O	종자	
13	Beet black scorch virus		O	X	
14	Beet curly top virus				O
15	Beet mild yellowing virus	O	O	X	
16	Beet necrotic yellow vein virus	O	O	X	

일련번호	병해충명 바이러스 (붉은색은 본 연구과제에서 첨단검사법을 개발)	검사방법			
		ELISA		PCR	첨단검사법 미개발
		기산	바이원		
17	Beet western yellows virus	O	O	X	
18	Blackberry chlorotic ringspot virus				O
19	Blueberry leaf mottle virus	O	O	X	
20	Blueberry red ringspot virus				O
21	Blueberry scorch virus	O	O	X	
22	Blueberry shock virus	O	O	X	
23	Blueberry shoestring virus	O	O	X	
24	Carnation etched ring virus	O	O	카네이션	
25	Carnation necrotic fleck virus	O	O	카네이션	
26	Carnation ringspot virus	O	O	카네이션	
27	Carrot red leaf virus			O	
28	Cherry leaf roll virus	O	O	O	
29	Cherry necrotic rusty mottle virus			O	
30	Cherry rasp leaf virus	O	O	O	
31	Chilli veinal mottle virus	O	O	X	
32	Chrysanthemum stem necrosis virus	O	O	X	
33	Citrus cristicortis disease				O
34	Citrus impietratura disease				O
35	Citrus leprosis virus				O
36	Citrus psorosis virus		O	O	
37	Citrus ringspot virus				O
38	Citrus vein enation-woody gall virus				O
39	Colombian datura virus				O
40	Cowpea chlorotic mottle virus	O	O	O	
41	Cowpea mild mottle virus	O	O	O	
42	Cucumber vein yellowing virus	O		X	
43	Cucurbit yellow stunting disorder virus				O
44	Eggplant mottled crinkle virus				O
45	Eggplant mottled dwarf virus	O		X	
46	Foxtail mosaic virus			O	
47	Fragaria chiloensis virus				O
48	Grapevine fanleaf virus	O	O	O	
49	Impatiens necrotic spot virus	O	O	X	
50	Iris yellow spot tospovirus	O	O	아이리스	
51	La France disease				O
52	Little cherry virus				O
53	Lychnis ringspot virus			O	
54	Maize streak virus	O	O	X	

일련번호	병해충명 바이러스 (붉은색은 본 연구과제에서 첨단검사법을 개발)	검사방법			
		ELISA		PCR	첨단검사법 미개발
		기산	바이원		
55	Melon necrotic spot virus	○	○	○	
56	Mungbean yellow mosaic virus				○
57	Pea enation mosaic virus	○	○	○	
58	Peach rosette mosaic virus	○	○	종자	
59	Peach wart virus				○
60	Peanut clump virus	○	○	○	
61	Pelargonium zonate spot virus	○	○	X	
62	Pepino mosaic virus	○	○	감자	
63	(American) Plum line pattern virus		○	딸기, 장미	
64	Potato aucuba mosaic virus	○	○	감자	
65	Potato mop-top virus	○	○	감자	
66	Potato virus T	○	○	감자	
67	Potato yellow dwarf virus	○	○	감자	
68	Potato yellow vein virus				○
69	Prune dwarf virus	○	○	○	
70	Radish yellow edge virus			○	
71	Raspberry ringspot virus	○	○	○	
72	Rice stripe necrosis benyvirus				○
73	Rice yellow mottle virus	○	○	X	
74	Shallot yellow stripe virus	○	○	마늘, 쪽파	
75	Southern bean mosaic virus	○	○	○	
76	Spinach latent virus			○(종자)	
77	Squash mosaic virus	○	○	○	
78	Strawberry latent ringspot virus	○	○	종자	
79	Strawberry pallidosis virus				○
80	Sweet potato mild mottle virus				○
81	Sweet potato yellow dwarf virus				○
82	Tobacco etch virus	○	○	X	
83	Tobacco leaf curl virus (= Chilli leaf curl virus)				○
84	Tobacco necrosis virus	○	○	○	
85	Tobacco rattle virus	○	○	○	
86	Tobacco ringspot virus	○	○	종자	
87	Tobacco streak virus	○	○	○	
88	Tomato black ring virus	○	○	○	
89	Tomato bushy stunt virus	○	○	○	
90	Tomato chlorosis virus				○
91	Tomato infectious chlorosis virus				○

일련번호	병해충명	검사방법			
		ELISA		PCR	첨단검사법 미개발
	바이러스 (붉은색은 본 연구과제에서 첨단검사법을 개발)	기산	바이원		
92	Tomato ringspot virus	O	O	중자	
93	Tomato yellow leaf curl virus	O	O	X	
94	Wheat high plains virus				O
95	Wheat streak mosaic virus	O	O	중자	
96	White clover mosaic virus	O		O	
	계 (ELISA + PCR 이중검사법 확보종 : 20종)	60	59	26	27 (기 주 수입실적 있는 종: 16)
		63			
97 금지	Plum pox virus	O	O	O	
	계(ELISA + PCR 이중검사법 확보종 : 21종)	61	60	27	27
		64			

표. 3. 관리병 해충(viroid).

일련번호	병해충명	검사방법			
		ELISA		PCR	첨단검사법 미개발
	바이러스	기산	바이원		
1	Apple dimple fruit viroid				O
2	Apple fruit crinkle viroid				O
3	Apple scar skin viroid			O	
4	Chrysanthemum stunt viroid	O			
5	Citrus xyloporosis viroid			O	
6	Peach latent mosaic viroid			O	
7	Tomato chlorotic dwarf viroid				O
	계	1	0	3	3
		1			
8 금지	Potato spindle tube viroid			O	
	계	1	0	4	3
		1			

제 3 장 개발수행 내용 및 결과

제 1 절 주요 검역대상 식물 바이러스의 RT-PCR 진단기법 및 진단용 표준시료개발

1. 연구 배경

세계 무역의 증가로 많은 종류의 식물들이 한국으로 유입되고 있다. 따라서 잠재적이거나 알려지지 않은 병원체, 특히 식물 바이러스, 들이 곡식, 사료, 목재, 채소, 과일, 의약재료등의 기주 식물에 감염되어 유입될 가능성이 있다. 현재 다양한 바이러스에 높은 감수성을 보이는 몇몇 식물들에 대한 수입이 국가 식물 검역소에 의해 엄격하게 제한되고 있다. 하지만 많은 식물 바이러스들의 경우 기주 범위가 잘 알려지지 않기 때문에 한국에 보고되지 않은 외래 식물 바이러스 유입가능성이 높은 편이다. 이러한 보고되지 않은 외국으로 유입된 바이러스의 유입을 막기 위해서는 검역을 위해 특이적이며, 민감도가 높고 빠르게 진단할 수 있는 기술개발이 필수적이다. 알려진 접근 방식중에서 역전사 중합효소 반응 (RT-PCR)방법의 경우 다른 방법에 매우 우수하다고 알려져 있다(Park and Kim, 2004). RT-PCR에 기초한 진단 방법을 위해, 본 연구팀은 한국에 보고되지 않은 검역용 식물 바이러스들을 진단할 수 있는 RT-PCR 프라이머들을 개발하였다.

2. 연구 결과

4년 동안 RT-PCR 기법을 이용한 주요 검역대상 총 22종 식물바이러스를 대상으로 진단기법 및 표준시료 개발을 완료하였다.

가. 검역대상 식물바이러스 중 진단기법 확립을 위한 바이러스를 선정하여 해당 바이러스를 분양, 수집하여 증식 및 순수분리 (CVYV, CYSDV, PAMV, PYDV, ToCV 등 총 5종; 1년차 연구 결과)

(1) 검역 대상 식물 바이러스 중 이미 진단 기법이 확립된 바이러스는 제외하고 아직 검출 기법이 확립되지 않은 바이러스 중 다섯 종류의 바이러스를 선정하여 이를 분양하였다(표 1-1). 선정한 검역 대상 식물바이러스 *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV), *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV), *Potato aucuba mosaic virus* (PAMV), *Potato yellow dwarf virus* (PYDV), *Tomato chlorosis virus* (ToCV) 이들 5종의 바이러스들은(CVYV, CYSDV, PAMV, PYDV, ToCV) 우리나라에서 미 보고된 바이러스들로 수입이 금지된 바이러스들이다. 따라서 본 과제 수행을 위해서 외국에서부터 이들 5종 수입금지 바이러스들을 확보하였고, 격리된 장소에 보관하여 실험을 수행하였다.

표 1-1. 검정대상 바이러스 5종

종류	분류	크기(nt)
<i>Cucumber vein yellowing virus (CVYV)</i>	<i>Potyviridae Ipomovirus</i>	9751
<i>Cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV)</i>	<i>Closteroviridae Closterovirus</i>	9123, 7976
<i>Potato aucuba mosaic virus (PAMV)</i>	<i>Flexiviridae Potexvirus</i>	7059
<i>Potato yellow dwarf virus (PYDV)</i>	<i>Rhabdoviridae Nucleorhabdovirus</i>	12600
<i>Tomato chlorosis virus (ToCV)</i>	<i>Closteroviridae Crinivirus</i>	8595, 8247

외국에서 분양받아 본 연구실에 보관중인 5종의 검역대상 바이러스들에 감염된 시료들을 대상으로 CVYV, CYSDV, PAMV, PYDV, ToCV 등 5종의 바이러스를 특이적으로 검정할 수 있는 RT-PCR 검출법에 이용하기 위한 전체 RNA를 추출하기 위하여 각 시료에서부터 아래와 같이 TRIzol method를 이용하여 핵산을 추출하여 비교해 보았다. 시료로부터 추출한 total RNA중 2ug을 1% agarose gel에서 확인해보았다(그림 1-1).

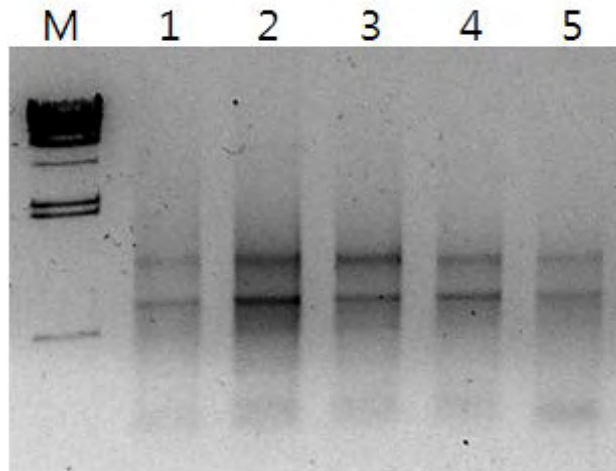


그림 1-1. 검역대상 식물바이러스가 감염된 기주식물에서 분리한 total RNA. M : λ DNA digested with *Hind*III(600ng/5ul), Lane1 : CVYV, Lane2 : CYSDV, Lane3 : PAMV, Lane4 : PYDV, Lane5 : ToCV

(2) 해당 바이러스의 게놈 염기서열을 이용한 primer 제작

각각의 기준에 보고된 바이러스 염기서열을 NCBI에서 찾아 DNASTar 프로그램을 이용하여 기준에 보고된 여러 strain들의 염기서열을 align하여 primer를 제작하였다. CVYV의 검정용 primer는 genomic RNA 중 coat protein으로 보고된 부분을 NCBI accession code AJ301640, AY424869, DQ287319, EF441272, EF538680, NC_006941을 이용하여 제작하였다(그림 1-2). CVYV를 제외한 나머지 검역대상 바이러스 또한 이와 같은 방법을 이용하여

1set의 primer를 제작하였으며, PYDV의 경우에는 3set의 primer를 제작하였다(표 1-2).

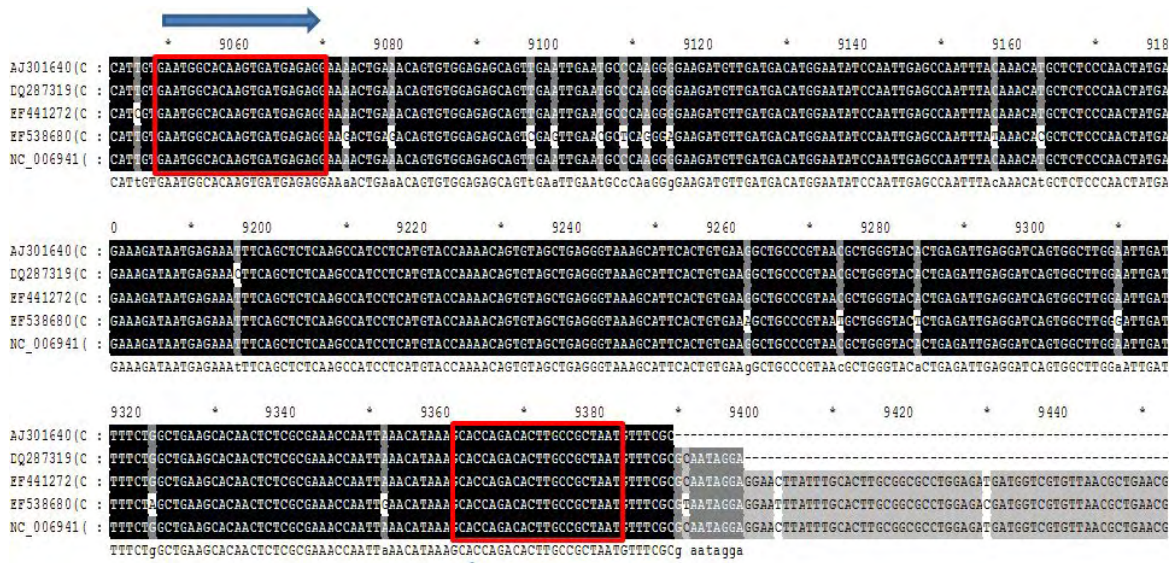


그림 1-2. GenBank에서 얻어진 CVYV의 부분 염기서열alignment와 specific primer 검정에 이용된 염기서열 부분.

Primer	Sequence	Tm(°C)	Length (bp)
CVYV-F	5'-GAATGGCACAAGTGATGAGAGG-3'	55.8	333
CVYV-R	5'-ATTAGCGGCAAGTGTCTGGTG-3'	56.4	
CYSDV-F	5'-GGACGGCTGACTTTATCAATTATG-3'	55.7	300
CYSDV-R	5'-TGTGACACGTTATAATATTTCTTTTC-3'	50.9	
PAMV-F	5'-GCTGTGGGCTGTGTGTAAG-3'	52.8	337
PAMV-R	5'-TCCAATTGCTTTAATGAACGC-3'	53.4	
PYDV-1-F	5'-CGCTCAGTTCGTGCAGTTGT-3'	56.0	195
PYDV-1-R	5'-TCTGATTCTAGTCCACGCTGC-3'	54.2	
PYDV-2-F	5'-GATGCAGTCAGCGGAAGTCAC-3'	56.8	252
PYDV-2-R	5'-GGTAATGGCTGGCAGTCCA-3'	55.4	
PYDV-3-F	5'-GTATAGCAATGCAGATGGGAG-3'	51.3	191
PYDV-3-R	5'-CTCCGATTGTAGAGCAGCAT-3'	55.6	
ToCV-F	5'-GAGGTTAGACCCAAAATGTCCG-3'	56.2	195
ToCV-R	5'-CTGAGATATTCATCAACGAACCAT-3'	53.8	

표 1-2. 검역대상 바이러스(5종) 검정을 위한 primer 디자인.

(3) RT-PCR을 통한 바이러스의 검정 및 반응 조건의 표준화

우선 일차적으로 primer의 증폭 가능성과 기주 식물에 영향을 받지 않고 바이러스를 특이적으로 검출할 수 있는지를 확인하기 위한 RT-PCR을 수행하였다. 먼저, 3ug의 total RNA와 제작한 각 바이러스의 primer중 reverse primer를 이용하여 Reverse transcriptase(Promega)로 1시간 반응하였다. 반응 후 얻은 cDNA 2ul에 4ul 2.5mM dNTP, 10X Ex Taq Buffer(100mM

Tris-HCl(pH 8.3), 500mM KCl, 20mM MgCl₂), 각 25pmole/ul primer sets, 2.5 unit Ex Taq(TaKaRa)를 넣고 총 반응량을 50ul로 맞춘다. PCR 조건은 94°C3분, 94°C20초, 56°C 1분, 72°C40초에서 35cycle/ 72°C 10분/ 4°Cforever로 하였고, 결과는 아래 그림과 같다(그림 1-3). RT-PCR을 통해 증폭된 산물은 1.2% agarose gel에서 1×TAE완충액(40mM Tris, 40mM acetic acid, 2mM EDTA, pH 7.8)으로 전기영동한 후, ethidium bromide로 염색하여 UV illuminator로 밴드를 관찰함으로써 서로 다른 크기의 PCR산물을 쉽게 구분 할 수 있다. 또한 개발된 프라이머들이 검정 대상 기주에서만 특이적으로 바이러스가 검정되는지를 확인하기 위하여 바이러스에 이병된 시료 및 건전한 담배(*Nicotiana benthamiana*)와 토마토에서 추출한 전체 RNA를 음성대조구로 이용하여 제시된 조건으로 RT-PCR을 수행하였다. 실험 결과 각 바이러스의 염기서열을 바탕으로 제작한 특이적인 프라이머들이 그림 3에서 확인할 수 있는 것처럼 바이러스 이병시료 및 양성대조구로 이용된 플라스미드 DNA에서만 특이적으로 원하는 크기의 증폭된 DNA band가 확인되었고 음성대조구로 이용된 다른 식물체인 담배나 토마토에서는 아무런 DNA band들도 증폭되지 않았다. 그림으로 보여준 토마토, 담배 외에 보편적으로 실험실에서 이용되는 명아주, 오이, 호박이나 콩등에서 추출한 전체 RNA를 사용한 시료들에서도 특이적인 DNA band는 증폭되지 않았다. 따라서 이들 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행하였을 때, 바이러스를 특이적으로 검출할 수 있음을 확인하였다.

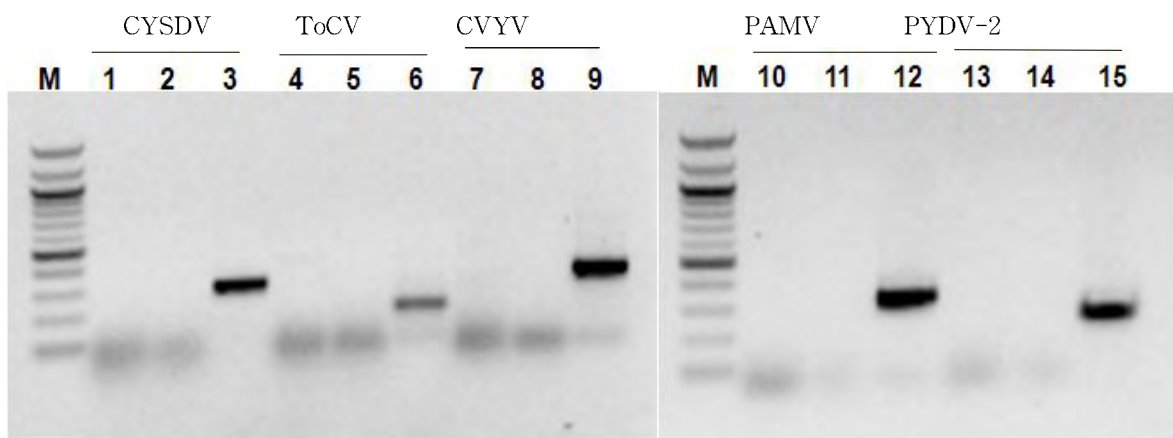


그림 1-3. 바이러스 별로 제작한 특이 프라이머를 이용한 RT-PCR 검정 결과. M: 100bp DNA ladder(NEB), 바이러스에 따라 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR을 수행한 결과이다. Lane1-3 : CYSDV specific primer, Lane 4-6 : ToCV specific primer, Lane7-9 : CVYV specific primer, Lane10-12 : PAMV specific primer. Lane13-15 : PYDV specific primer Lane 3,6,9,12,15 : 해당 바이러스에 감염된 잎에서 추출한 total RNA 이용한 PCR 결과. 대조군으로 건전 식물인 담배와 토마토의 total RNA를 이용하여 해당 프라이머로 증폭하였다. Lane1,4,7,10,13 : 건전한 담배에서 추출한 total RNA 이용한 PCR 결과, Lane 2,5,8,11,14 : 건전한 토마토에서 추출한 total RNA 이용한 PCR 결과.

각 대상 바이러스를 특이적으로 검정할 수 있는 primer 별 최적 annealing 온도를 찾기 위해 gradient PCR을 수행하였다. 이전의 PCR 반응 조건과 같은 조건으로 총 반응량 50ul로 하여 각 primer를 대상으로 하였으며, annealing 온도는 50도, 53.2도 56도로 설정하여 DNA를 증폭 하였다(그림 1-3). PCR 조건은 94°C3분, 94°C20초, 56°C 1분, 72°C 1분에서 30cycle/ 72°C 10분 / 4°Cforever로 설정하였다.

RT-PCR 결과, CYSDV, ToCV, CVYV, PAMV에 특이적으로 제작한 프라이머를 이용하였을 때 원하는 크기의 바이러스 밴드를 검출할 수 있었다(그림 1-4). 세 가지의 primer set를 제작한 PYDV의 경우, PYDV-1과 PYDV-2는 원하는 크기의 밴드만을 검출할 수 있었으나, PYDV-3의 경우에는 원하는 크기의 밴드 외의 더 작은 크기의 밴드를 하나 더 확인할 수 있었다. 이는 온도 조건을 달리 하여 보아도 결과가 달라지지 않는 것으로 보아, 이 프라이머는 바이러스를 검출하기에 적합하지 않은 것으로 예상되어 이후의 실험에서는 해당 프라이머를 제외하기로 하였다. 이 RT-PCR 결과를 통해 프라이머 조합별 공통적으로 사용될 수 있는 annealing 온도를 찾을 수 있었다.

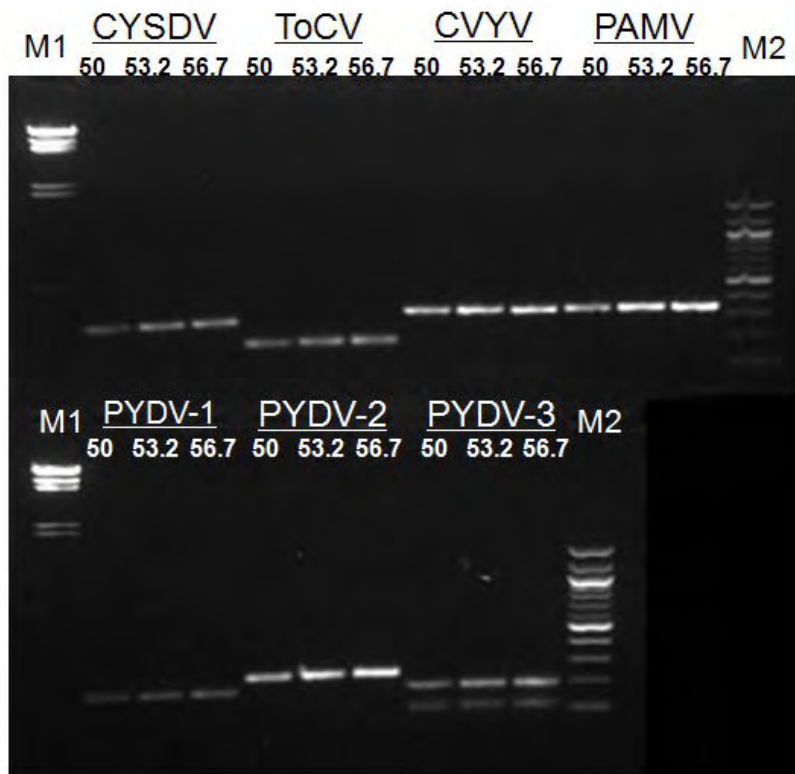


그림 1-4. 각 바이러스 별 검정용 특이프라이머를 이용한 gradient RT-PCR 반응의 결과. M1: λ DNA digested with HindIII(600ng/5ul), M2 : 100bp DNA ladder(NEB)

같은 PCR 반응 조건으로 cycle 수를 35로 늘려서 수행해 본 결과 역시, 다섯 가지 바이러스에 해당하는 프라이머 set 모두 원하는 크기의 하나의 밴드만을 관찰할 수 있었다.

(4) 증폭된 바이러스의 cDNA 절편의 클로닝 및 양성대조구(clone) 확보

CYSDV, ToCV, CVYV, PAMV, PYDV 검출을 위한 각각의 검출용 primer로 얻어진 PCR 산출물을 pGEM T-easy vector에 삽입하여 cloning 하여 이의 염기서열을 분석하여 기존의 보고된 바이러스와 유사성이 있는지를 확인하였고 검정에 양성 대조구로 이용될 pGEM T-easy vector에 클로닝된 플라스미드 DNA를 대량으로 확보함.

(5) PCR 검증용 nested-PCR 검사법 개발 및 프라이머들의 실제 검출 효율성 검증

각 바이러스의 검정에 활용될 프라이머 set들은 감염 가능한 기주, 바이러스의 계통분류학적 유연관계 및 현장 활용성 등을 고려한 동시 검정에 이용할 수 있는 검사법 개발에 10개 이상의 바이러스 검정법이 확인되는 3년차 연구부터 동시검정법 개발에 이용할 것이다.

나. RT-PCR 기법을 이용한 주요 검역대상 식물바이러스의 진단기법 및 표준시료개발(2-3년차 연구 결과)

(BGMV, BBSV, BNYVV, ChiVMV, CSNV, CDV, EMDV, IYSV, PZSV, RYMV, TEV 등 총 11종)

(1) 검역대상 식물바이러스 중 진단기법 확립을 위한 바이러스를 선정하여 해당 바이러스를 분양, 수집하여 증식 및 순수분리

검역 대상 식물 바이러스 중 이미 진단 기법이 확립된 바이러스는 제외하고, 아직 검출 기법이 확립되지 않은 바이러스 중 총 11 종류의 바이러스를 선정하여 이를 DSMZ Gmb H, plant virus collection (Braunschweig, Germany)로부터 바이러스가 감염된 말린 식물 조직 또는 -20°C에서 저장된 total RNA의 상태로 2010년 분양을 받았다 (표 1-3). 모든 바이러스는 국립 검역소의 엄격한 검열을 통해 도입되었고 모든 실험은 국립 검역소 직원과 협력으로 이루어졌다. 선정한 검역 대상 식물바이러스 *Bean golden mosaic virus* (BGMV), *Beet black scorch virus* (BBSV), *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV), *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV), *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV), *Colombian datura virus* (CDV), *Eggplant mottled dwarf virus* (EMDV), *Iris yellow spot virus* (IYSV), *Pelargonium zonate spot virus* (PZSV), *Rice yellow mottle virus* (RYMV), and *Tobacco etch virus* (TEV)로 총 11종으로 아직 우리나라에서 미 보고된 바이러스들로 수입이 금지된 바이러스들이다. 따라서 본 과제 수행을 위해서 외국에서부터 이들 11종 수입금지 바이러스들을 확보하였고, 격리된 장소에 보관하여 실험을 수행하였다.

표 1-3. 2010년 분양받은 검역용 식물 바이러스 11종

Plant virus name	Genus	Family	Type	No. of RNA fragments	Host plants
<i>Colombian datura virus</i> (CDV)	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	ssRNA (+)-strand	1	Tomato, pepino, tobacco, cape gooseberry, petunia
<i>Chilli veinal mottle virus</i> (ChiVMV)	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	ssRNA (+)-strand	1	Pepper, tobacco, nightshade
<i>Tobacco etch virus</i> (TEV)	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	ssRNA (+)-strand	1	Pepper, tomato, tobacco, nightshade,

					pigweed, ground cherry
<i>Chrysanthemum stem necrosis virus</i> (CSNV)	<i>Tospovirus</i>	<i>Bunyaviridae</i>	ssRNA (-)-strand	3	Chrysanthemum, tomato
<i>Iris yellow spot virus</i> (IYSV)	<i>Tospovirus</i>	<i>Bunyaviridae</i>	ssRNA (-)-strand	3	Onions, garlic, leek, iris, lisianthus, jimsonweed, tobacco, redroot pigweed

표 1-4. Potyvirus와 Tospovirus속에 속하는 다섯 개의 검역 바이러스에 대한 설명

Plant virus name	Family	Genus	Type
<i>Bean golden mosaic virus</i> (BGMV)	<i>Geminiviridae</i>	<i>Begomovirus</i>	ssDNA viruses
<i>Beet black scorch virus</i> (BBSV)	<i>Tombusviridae</i>	<i>Necrovirus</i>	ssRNA positive-strand viruses
<i>Beet necrotic yellow vein virus</i> (BNYVV)	Unclassified	<i>Benyvirus</i>	ssRNA positive-strand viruses
<i>Chilli veinal mottle virus</i> (ChiVMV)	<i>Potviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	ssRNA positive-strand viruses
<i>Chrysanthemum stem necrosis virus</i> (CSNV)	<i>Bunyaviridae</i>	<i>Tospovirus</i>	ssRNA negative-strand viruses
<i>Colombian datura virus</i> (CDV)	<i>Potviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	ssRNA positive-strand viruses
<i>Eggplant mottled dwarf virus</i> (EMDV)	<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Nucleorhabdovirus</i>	ssRNA negative-strand viruses
<i>Iris yellow spot virus</i> (IYSV)	<i>Bunyaviridae</i>	<i>Tospovirus</i>	ssRNA negative-strand viruses
<i>Pelargonium zonate spot virus</i> (PZSV)	<i>Bromoviridae</i>	<i>Anulavirus</i>	ssRNA positive-strand viruses
<i>Rice yellow mottle virus</i> (RYMV)	Unclassified	<i>Sobemovirus</i>	ssRNA positive-strand viruses
<i>Tobacco etch virus</i> (TEV)	<i>Potviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	ssRNA positive-strand viruses

3차 년도에서는 2차 년도에서 수입한 11개의 바이러스들 중 DNA바이러스인 BGMV를 제외하고 10종의 바이러스를 RT-PCR로 검출 할 수 있는 바이러스 특이적인 프라이머들을 추가적으로 디자인하고 테스트해보았다. 그 중에서 *Potyvirus*와 *Tospovirus*속에 속하는 다섯 개의 검역 바이러스에 대한 내용을 Plant Pathology J에 출간하였다 (표 1-4).

전체 RNA를 추출하기 위하여 각 시료에서부터 아래와 같이 TRIzol method를 이용하여 핵산을 추출하여 비교해 보았다. 시료로부터 추출한 total RNA중 2 µg을 1% agarose gel에서 확인해보았다(그림 1-5).

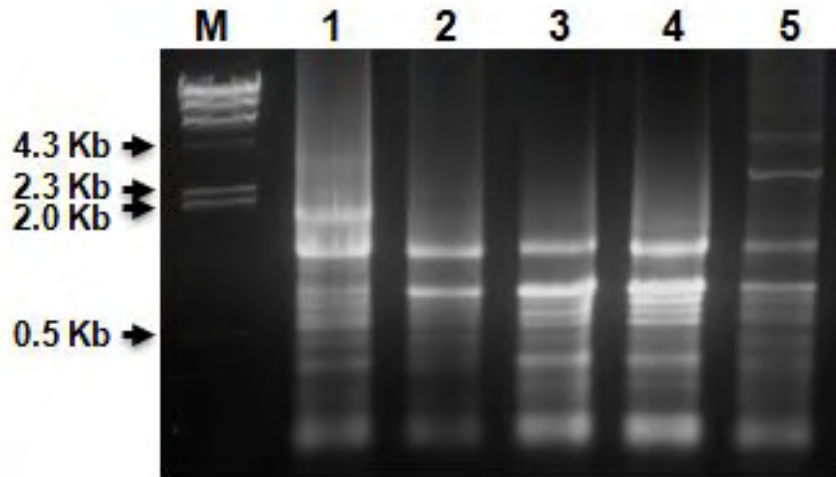


그림 1-5. Isolation of total RNAs.

(A) The quality of isolated total RNAs from virus infected plant leaves. M indicates lamda DNA molecular marker digested with *Hind*III (600 ng/5 μ l). Lane 1: CDV, Lane 2: ChiVMV Lane 3: TEV, Lane 4: CSNV, Lane 5: IYSV.

2) 해당 바이러스의 게놈 염기서열을 이용한 첫 번째 primer pair 제작

기존 연구에서 만든 프라이머뿐만 추가적으로 각각의 바이러스들의 유전자들에 특이적인 프라이머를 제작하였다. 총 32개 (16개 primer-pairs)의 프라이머가 제작되었으며, CDV, ChiVMV, 그리고 TEV의 경우 외피 단백질 (CP)와 polyprotein을 encoding하는 유전자에 각각 두 개 primer-pairs를 제작하였다 (표1-5). T_m값도 일정하게 디자인하였다. CSNV와 IYSV의 경우 Nucleocapsid를 encoding하는 유전자들에 대해 각각 2개 primer-pairs를 디자인하였다.

표 1-5. Nucleotide sequences of oligonucleotide primers used for RT-PCR to detect five quarantine plant viruses.

Index	Name	Amplified region	Nucleotide accession No.	Primer sequences	Length	T _m (°C)	Expected size	RT-PCR result
1	CDV-1_F	Coat protein	FJ821796	5'-GGTGTCTG GACTATGATG GATG-3'	22	52.9	420 bp	Specific
2	CDV-1_R	Coat protein	FJ821796	5'-CCTCTAACC TTGACGCACA CC-3'	21	55.8	420 bp	Specific
3	CDV-2_F	Coat protein	FJ821796	5'-CTGCAGCA ATTCGAAACA ACAC-3'	22	56.9	281 bp	Specific
4	CDV-2_R	Coat protein	FJ821796	5'-GTAAATAC TGACTAACGC CCTTCTG-3'	25	54.5	281 bp	Specific
5	CDV-1_F	polyprotein	AB179622	5'-CAAGATCG AGATGTGAAT GCTG-3'	22	54.5	662 bp	Specific

6	CDV-1_R	polyprotein	AB179622	5'-GTGTGACG TTCCGGTATCC TCTTC-3'	23	56.2	662 bp	Specific
7	CDV-2_F	polyprotein	AB179622	5'-CTGTGCAA GCATCATAGA GTCC-3'	22	54.8	498 bp	Specific
8	CDV-2_R	polyprotein	AB179622	5'-GGTTTGTA GTTCAGCAGA TGGTC-3'	23	54.2	498 bp	Specific
9	ChiVMV-1_F	Coat protein	NC_005778	5'-CAAGCTCA GCCACAGTCTC GTC-3'	22	58.6	550 bp	Specific
10	ChiVMV-1_R	Coat protein	NC_005778	5'-CGCGCTAA TGACATATCG GTAAG-3'	23	57.5	550 bp	Specific
11	ChiVMV-2_F	Coat protein	NC_005778	5'-CTGAATGG ATTGATGGTT TGGTG-3'	23	57.7	389 bp	Specific
12	ChiVMV-2_R	Coat protein	NC_005778	5'-GTGCCTACC CTACCGTCCAG TC-3'	22	58.3	389 bp	Specific
13	ChiVMV-1_F	polyprotein	EF213685	5'-CTCTGAGG GGAAGGCACC ATAC-3'	22	58.4	443 bp	Specific
14	ChiVMV-1_R	polyprotein	EF213685	5'-CAGGGGCA TAATCAAGAA GGTG-3'	22	57.1	443 bp	Specific
15	ChiVMV-2_F	polyprotein	EF213685	5'-GCGGTATG CTTTCGATTT CTATG-3'	23	56.8	404 bp	Specific
16	ChiVMV-2_R	polyprotein	EF213685	5'-GCTAGAAC GGGCGGGGAT AC-3'	20	59.2	404 bp	Specific
17	TEV-1_F	Coat protein	DQ871317	5'-CGCTATGGC CACAAAACCTT CAAT-3'	23	58.9	339 bp	Specific
18	TEV-1_R	Coat protein	DQ871317	5'-GTCATAAT TTGCCTCAGT GTTGG-3'	23	55	339 bp	Specific
19	TEV-2_F	Coat protein	DQ871317	5'-CTAAATGG ATTTATGGTG TGGTG-3'	23	52.6	391 bp	Specific
20	TEV-2_R	Coat protein	DQ871317	5'-CAGTACCC ACGTTGCCAT CA-3'	20	56.3	391 bp	Specific
21	TEV-1_F	polyprotein	NC_001555	5'-GACCCAAA TGAAGGATAC GATAAG-3'	24	54.7	259 bp	Specific
22	TEV-1_R	polyprotein	NC_001555	5'-GTCTCTTC GTTGGGTGCT TTAG-3'	22	54.5	259 bp	Specific
23	TEV-2_F	polyprotein	NC_001555	5'-GTGTGCAA AGAAATTCCA GACTC-3'	23	54.3	529 bp	Specific
24	TEV-2_R	polyprotein	NC_001555	5'-CACCACCAA TTAACACAGA CAAAG-3'	24	55	529 bp	Specific
25	CSNV-1_F	Nucleocapsid protein	AB438998	5'-GCGGAATA CTCTGCACGAC TTG-3'	22	58.4	601 bp	Specific
26	CSNV-1_R	Nucleocapsid protein	AB438998	5'-GCTCTTTG TGCTTTGAAT CCTG-3'	22	55.4	601 bp	Specific
27	CSNV-2_F	Nucleocapsid protein	AB438998	5'-CTTACGGGC TTAGCTTGAA TG-3'	21	53.3	300 bp	Specific

28	CSNV-2_R	Nucleocapsid protein	AB438998	5'-CTCCTTTC ATTCTTGGGT CAC-3'	21	52.4	300 bp	Specific
29	IYSV-1_F	Nucleocapsid protein	AF067070	5'-TCTGGTGA GTGCATATGG TTTGA-3'	23	56.7	420 bp	Unspecific
30	IYSV-1_R	Nucleocapsid protein	AF067070	5'-CTTGGAGG GATTCTTGGG TTTAG-3'	23	56.9	420 bp	Unspecific
31	IYSV-2_F	Nucleocapsid protein	AF067070	5'-GGCGGTCCT CTCATCTTAC TG-3'	21	55	236 bp	Specific
32	IYSV-2_R	Nucleocapsid protein	AF067070	5'-GAAGTTCC AGGAGTGCAT TTAGTC-3'	24	54.9	236 bp	Specific

(3) RT-PCR을 통한 바이러스의 검정 및 반응 조건의 표준화

제작된 primer pairs의 효과를 알기 위하여 RT-PCR을 하였다. 먼저, 3 ug의 total RNA와 제작한 각 바이러스의 primer중 reverse primer를 이용하여 Reverse transcriptase (Promega)로 1시간 반응하였다. 반응 후 얻은 cDNA 2 ul에 4 ul 2.5 mM dNTP, 10X Ex Taq Buffer (100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KCl, 20 mM MgCl₂), 각 25 pmole/ul primer sets, 2.5 unit Ex Taq(TaKaRa)를 넣고 총 반응량을 50 ul로 맞춘다. PCR 조건은 94°C 3분, 94°C 20초, 56°C 1분, 72°C 40초에서 35 cycle/ 72°C 10분/ 4°C forever로 하였고, 결과는 아래 그림과 같다(그림 1-6). RT-PCR을 통해 증폭된 산물은 1.2% agarose gel에서 1×TAE완충액(40mM Tris, 40mM acetic acid, 2mM EDTA, pH 7.8)으로 전기영동한 후, ethidium bromide로 염색하여 UV illuminator로 밴드를 관찰함으로써 서로 다른 크기의 PCR산물을 쉽게 구분 할 수 있다. 그림1-7과 같이 각각의 디자인된 primer-pairs를 가지고 RT-PCR를 수행한 결과 1번과 15번 primer-pair를 제외하고는 모두 단일 밴드의 specific한 RT-PCR결과를 보여주었다. 1번 CDV-CP프라이머의 경우 사용에는 문제가 없지만 15번의 경우 밴드가 2개 나와서 unspecific한 것으로 사용에 문제가 있다.

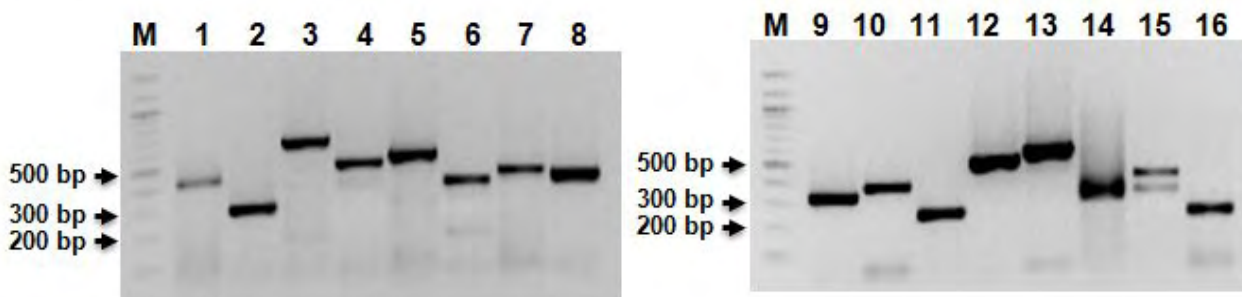


그림 1-6. RT-PCR using following primer pairs. Lane 1: CDV-CP-1, Lane 2: CDV-CP-2, Lane 3: CDV-Poly-1, Lane 4: CDV-Poly-2, Lane 5: ChiVMV-CP-1, Lane 6: ChiVMV-CP-2, Lane 7: ChiVMV-Poly-1, Lane 8: ChiVMV-Poly-2, Lane 9: TEV-CP-1, Lane 10: TEV-CP-2, Lane 11: TEV-Poly-1, Lane 12: TEV-Poly-2, Lane 13: CSNV-N-1, Lane 14: CSNV-N-2, Lane 15: IYSV-N-1, Lane 16: IYSV-N-2.

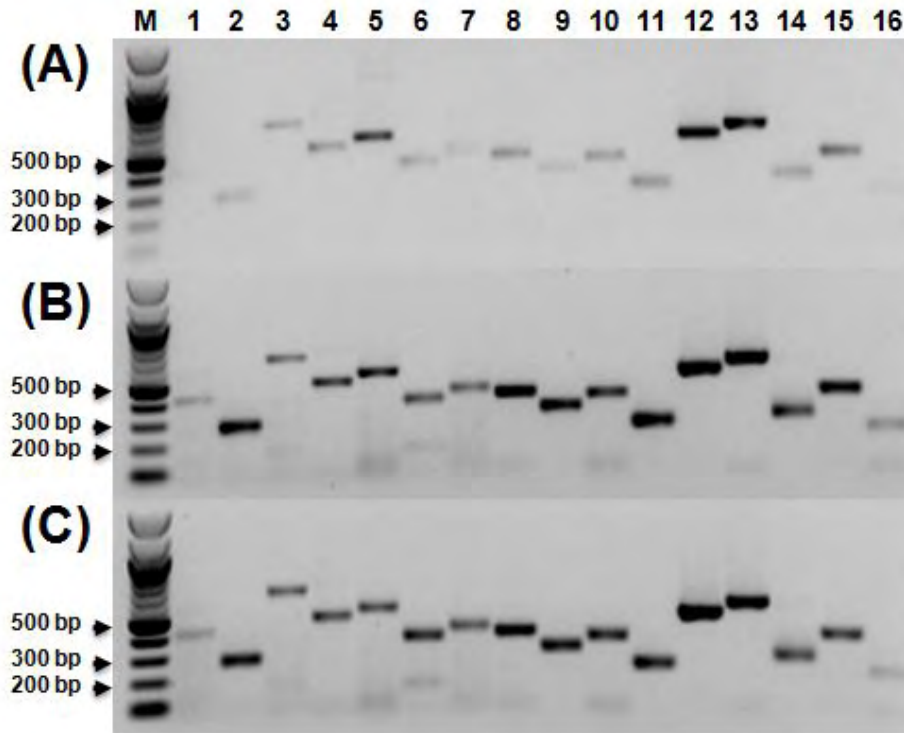


그림 1-7. Gradient RT-PCR to optimize specificity of primer-pairs. M indicates 100 bp DNA ladder purchased from NEB, UK. (A) indicates annealing temperature at 52°C. (B) indicates annealing temperature at 55°C. (C) indicates annealing temperature at 57°C. Lanes 1: CDV-CP-1, 2: CDV-CP-2, 3: CDV-Poly-1, 4: CDV-Poly-2, 5: ChiVMV-CP-1, 6: ChiVMV-CP-2, 7: ChiVMV-Poly-1, 8: ChiVMV-Poly-2, 9: TEV-CP-1, 10: TEV-CP-2, 11: TEV-Poly-1, 12: TEV-Poly-2, 13: CSNV-N-1, 14: CSNV-N-2, 15: IYSV-N-1, 16: IYSV-N-2.

각 대상 바이러스를 특이적으로 검정할 수 있는 primer 별 최적 annealing 온도를 찾기 위해 gradient PCR을 수행하였다. 이전의 PCR 반응 조건과 같은 조건으로 총 반응량 50 ul로 하여 각 primer를 대상으로 하였으며, annealing 온도는 52°C, 55°C, 57°C로 설정하여 DNA를 증폭하였다(그림 1-4). PCR 조건은 94°C 3분, 94°C 20초, annealing 40초, 72°C 1분에서 35cycle/ 72°C 10분/ 4°C forever로 설정하였다. RT-PCR 결과 대부분의 온도에서 PCR product가 증폭되었지만 온도가 높아질수록 band의 농도가 높아졌다. 하지만 57°C보다는 55°C에서 더 좋은 결과가 나온 것으로 사료된다. 또한 control로 쓰인 건전한 식물에서는 증폭되는 절편이 존재하지 않았다. 따라서 이들 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행하였을 때, 바이러스를 특이적으로 검출할 수 있음을 확인하였다 (그림 1-8).

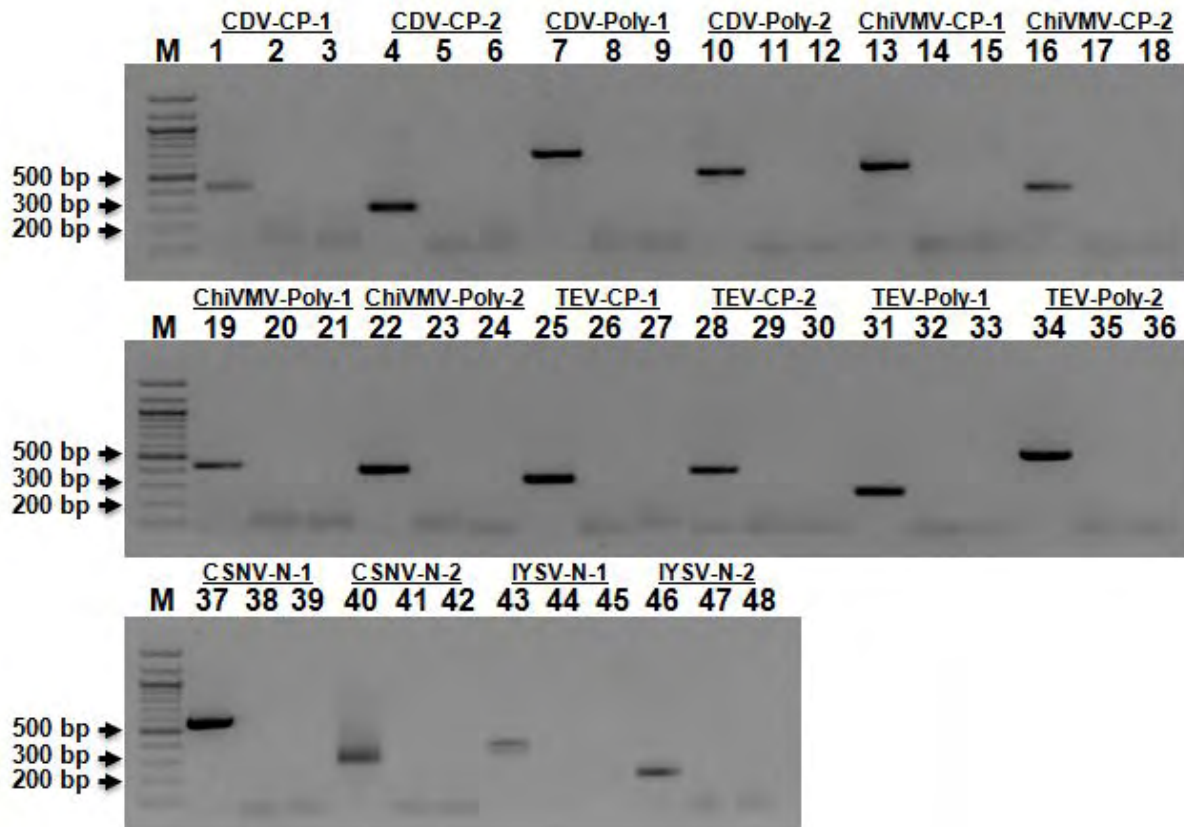


그림 1-8. Specificity of newly designed primers for virus detection by RT-PCR. M indicates 100 bp DNA ladder purchased from NEB, UK. Lanes 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46: total RNAs from virus infected leaves . Lanes 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47: total RNAs from healthy tomato. Lanes 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48: total RNAs from healthy *N. benthamiana*.

(4) 다섯 개 바이러스의 게놈 염기서열을 이용하여 유전자 특이적인 primer pair 제작
 BBSV, BNYVV, EMDV, PZSV, 및 RYMV 바이러스에 대한 RT-PCR용 프라이머를 3쌍씩 새롭게 디자인하였다. BNYVV, PZSV, 및 RYMV의 경우 외피단백질(CP)부분을 이용하였다 (그림 1-9).

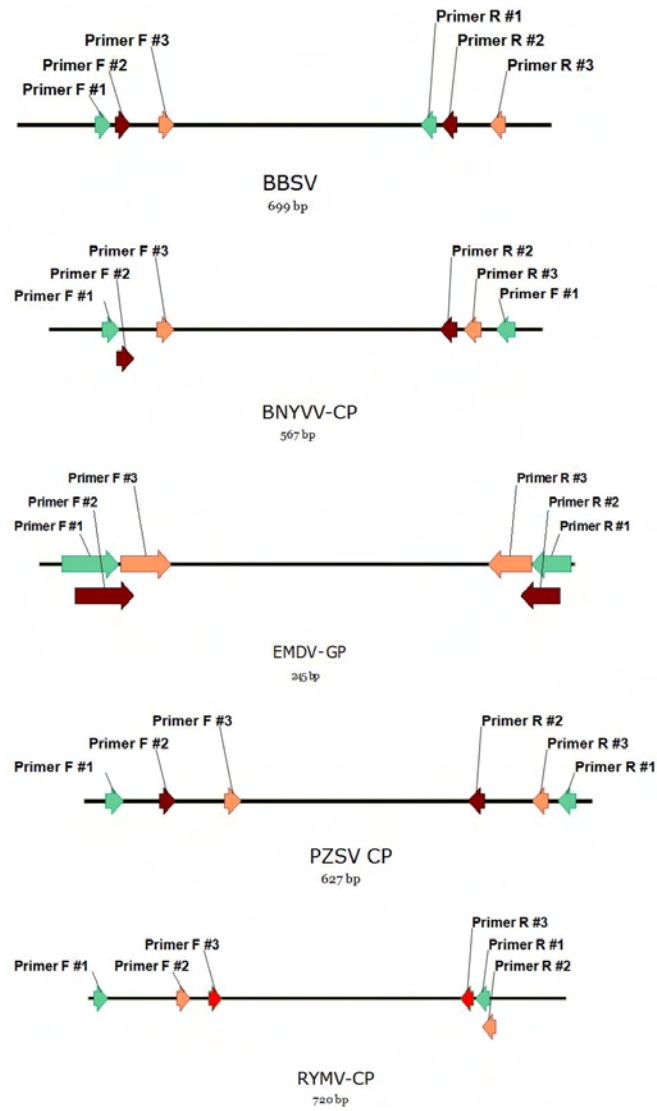


그림 1-9. BBSV, BNYVV, EMDV, PZSV, 및 RYMV 바이러스 검출용 RT-PCR용 프라이머의 위치

5종류의 검염 바이러스에 대한 프라이머를 테스트하기 전에 바이러스가 감염된 샘플로부터 total RNA를 추출하여 quality를 확인해보았다. 그림 1-10처럼 모든 RNA의 샘플들의 상태가 매우 좋았다. 또한 추출한 total RNA를 템플레이트로 하여 RT-PCR로 증폭해 보았다. 모든 샘플로부터 원하는 결과의 RT-PCR product를 얻을 수 있었다(그림 1-11).

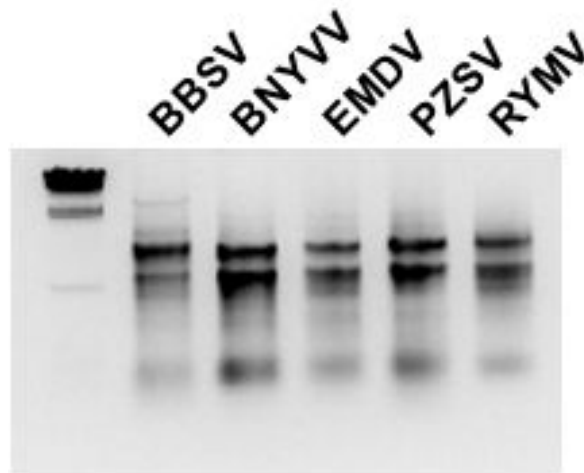


그림 1-10. Extracted total RNAs from virus infected samples

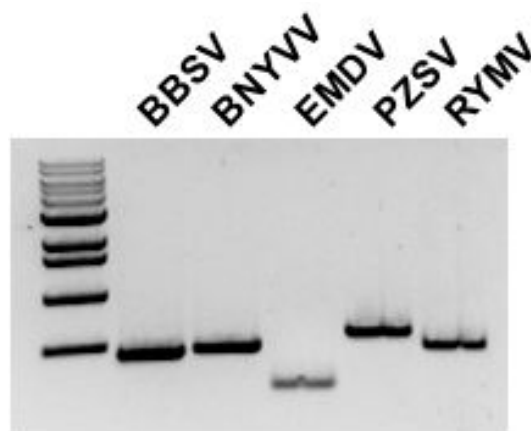


그림 1-11. 외피 단백질 부분의 primer를 이용하여 RT-PCR로 증폭된 결과

이번에는 디자인한 모든 primer-pair들을 이용하여 RT-PCR를 수행하였다. EMDV의 경우 2번과 3번 프라이머를 이용할 때 약한 밴드가 검출되었지만 다른 프라이머들은 원하는 사이즈의 RT-PCR product를 얻을 수 있었다 (그림 1-12). RYMV의 3번 프라이머는 검출에 실패하였다.

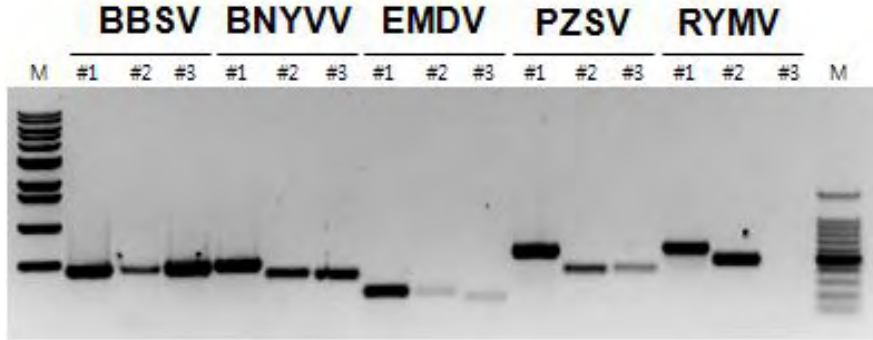


그림 1-12. 3개 primer-pairs를 이용하여 RT-PCR한 결과

적절한 annealing 온도값을 알기 위하여 세 개의 서로 다른 온도조건에서 gradient RT-PCR를 수행하였다(그림 1-13). 수행결과 프라이머의 종류에 따라 각기 다른 연구 결과를 얻었다. BBSV와 BNYVV의 경우 어떤 온도에 관계없이 충분한 양의 product를 얻을 수 있었지만 EMDV의 3번 프라이머, PZSV의 2번과 3번 그리고 RYMV의 2번 3번 프라이머에서 좋지 않은 RT-PCR결과를 얻었다.

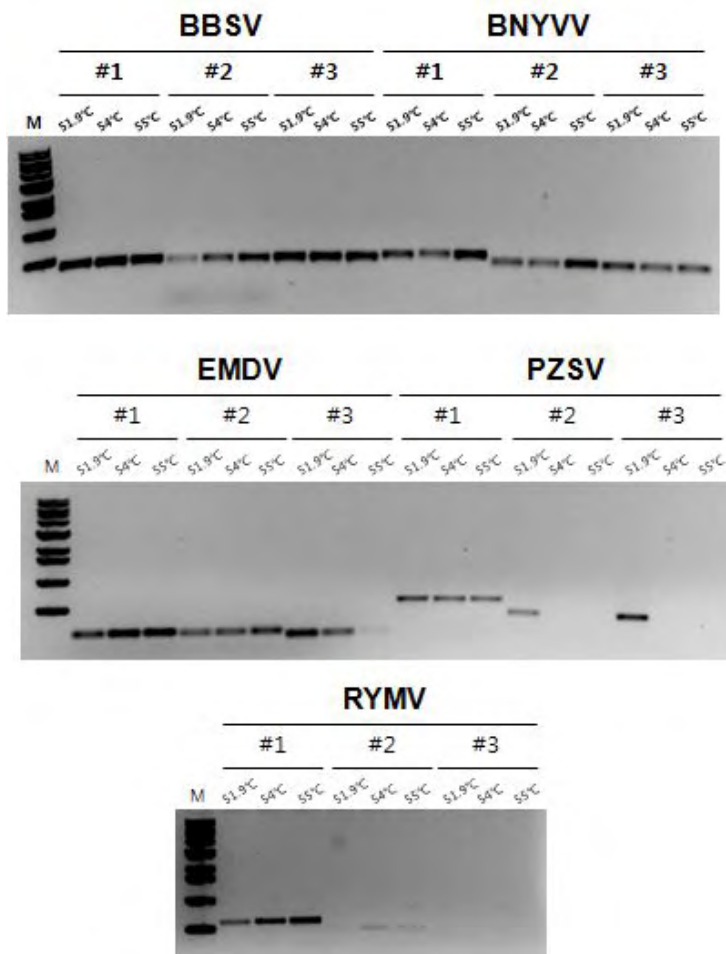


그림 1-13. 서로 다른 온도에서 gradient RT-PCR한 결과

다. RT-PCR 기법을 이용한 주요 검역대상 식물바이러스의 진단기법 및 표준시료개발 (AIMV, CRSV, PepMV, PVT, SPMMV, WSMV 총 6종; 4년차 연구 결과)

검역 바이러스를 진단하기 위하여 각각 총 3개씩 프라이머세트를 제작하였다.

표 1-6. AIMV, CRSV, PepMV, PVT, SPMMV, WSMV 등 6종 검역바이러스의 특징

Virus	Genus	Family	Host plant
<i>Alstroemeria mosaic virus</i> (AIMV)	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	Alstroemeria
<i>Carnation ringspot virus</i> (CRSV)	<i>Dianthovirus</i>	<i>Tombusviridae</i>	Carnation, pear, apple
<i>Pepino mosaic virus</i> (PepMV)	<i>Potexvirus</i>	<i>Alphaflexiviridae</i>	Pepino, tomato, potato
<i>Potato virus T</i> (PVT)	<i>Tepovirus</i>	<i>Betaflexiviridae</i>	Potato, <i>Chenopodium quinoa</i>
<i>Sweet potato mild mottle virus</i> (SPMMV)	<i>Ipomovirus</i>	<i>Potyviridae</i>	Sweet potato, tomato
<i>Wheat streak mosaic virus</i> (WSMV)	<i>Tritimovirus</i>	<i>Potyviridae</i>	Wheat, oat, foxtail, barnyardgrass

AIMV, CRSV, PepMV, PVT, SPMMV, WSMV 등 총 6개 검역 바이러스를 대상으로 RT-PCR 진단 키트를 제작하였다. AIMV, SPMMV, WSMV의 경우 Potyviridae과에 속하며, CRSV는 Tombusviridae과, PepMV는 Alphaflexiviridae과 PVT는 Betaflexiviridae과에 속한다 (표 1-6). 6개의 바이러스 진단을 위한 RT-PCR 프라이머는 각각 3쌍씩 디자인하였다(표 1-7).

표 1-7. The list of primer sets for quarantine viruses detection by RT-PCR for this study (AIMV, CRSV, PepMV, PVT, SPMMV, and WSMV).

Index	Sequence (5' to 3')	Expected size (bp)
AIMV_F_#1	GGAAAAATGCGATTGCCTAA	1000
AIMV_R_#1	CCCGGAACTTTCATAAAGCA	
AIMV_F_#2	CACCGCAACAGATTGACATT	700
AIMV_R_#2	CACCCCACTCTTCCAAAGAA	
AIMV_F_#3	TTCGTGGAGTTGGATGATGA	600
AIMV_R_#3	CGGCATGTATGGTTCCTTTT	

CRSV_F_#1	GACAATCCCGAAAATCCAAA	1027
CRSV_R_#1	TACGGGAAGTACGGTTACG	
CRSV_F_#2	CTAGCAACCCACCGAAGAAG	791
CRSV_R_#2	CAACACTGGCTGTGCAAAAT	
CRSV_F_#3	ACGCAACCACCCAGATAGTC	511
CRSV_R_#3	TACACGTCCCCTACCTCGTC	
PepMV_F_#1	CAGCCGACTTCTCAAATCCT	628
PepMV_R_#1	GGTGCATCAATTGCGTACAT	
PepMV_F_#2	GGGTTTAGCAGCCAATGAGA	399
PepMV_R_#2	GCAAGGGCACCATATTTAGC	
PepMV_F_#3	TAACCCATCAGATGCACCAC	244
PepMV_R_#3	CACGTCAGCATAAGCACGAG	
PVT_F_#1	GGACCCAACAACCTTTTGTGC	623
PVT_R_#1	TAGCTTCACCGTCCATTGTG	
PVT_F_#2	CCACTCAGGCTCTGAAGGAT	400
PVT_R_#2	TCGAAAGCAACCCATTTAGC	
PVT_F_#3	AGCTTTGTCCAACACTTCAACA	250
PVT_R_#3	AGCTCCCAGACCTTGAATGA	
SPMMV_F_#1	GGGCACAACAAATTGTGAGA	661
SPMMV_R_#1	CGCCTTGTAACGTTTCGCTG	
SPMMV_F_#2	ACTGCCAGCATGGATTGTTA	493
SPMMV_R_#2	GTCGAGTTGAGCTCCTCTCA	
SPMMV_F_#3	CACAGGATTTGGCGCTTTAT	277
SPMMV_R_#3	CACAGCTCTCCATGTGTGCT	
WSMV_F_#1	CAAAAGGGACGGGTGGTTC	760
WSMV_R_#1	TCCCTCACATCATCTGCATC	
WSMV_F_#2	TTCCAGCACCAAAGATCACA	507
WSMV_R_#2	AATCACACGCTGCCACAATA	
WSMV_F_#3	TAGGAACTTGGCGTGTGTG	323
WSMV_R_#3	GTTCTGTATTCCGCGTAGCC	

프라이머 디자인할 때 고려사항으로는 서로 다른 바이러스를 동시에 진단 가능할 수 있도록 증폭된 PCR product의 크기를 서로 다르게 제작하였다. 예를 들면 AIMV 진단 RT-PCR 프라이머의 경우 600bp, 700bp, 1000bp 길이의 product가 증폭되며 WSMV의 경우 323bp, 507bp, 760bp가 증폭되도록 하였다. 각 바이러스가 감염된 식물 샘플로부터 total RNA를 추출한 후 추출한 RNA의 질의 전기영동을 통해 확인하였다(그림 1-14).

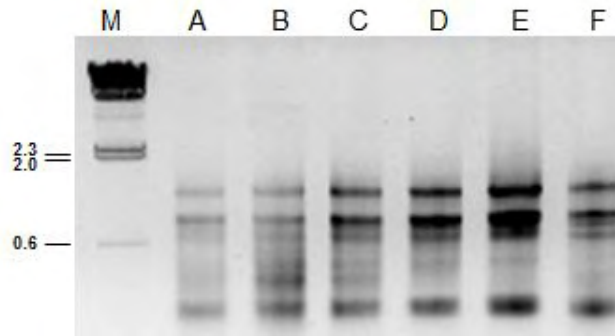


그림 1-14. Extracted total RNAs of plant viruses from virus-infected tissues. Each lane contains total RNAs of AIMV (A), CRSV (B), PepMV (C), PVT (D), SPMMV (E), and WSMV(F), respectively. Lane M demonstrates lambda DNA marker digested by *HindIII* used for molecular size marker.

제작된 RT-PCR 프라이머를 이용하여 각 바이러스로 추출한 total RNA를 template로하여 RT-PCR를 수행하였다. RT-PCR 수행시 최적의 annealing 온도를 알기 위해 총 3개의 서로 다른 온도(50℃, 54.8℃, 58℃)를 설정하여 수행하였다. 수행결과 대체적으로 모든 primer들이 서로 다른 온도에서 예상했던 크기의 PCR product를 증폭하였다(그림 1-15).

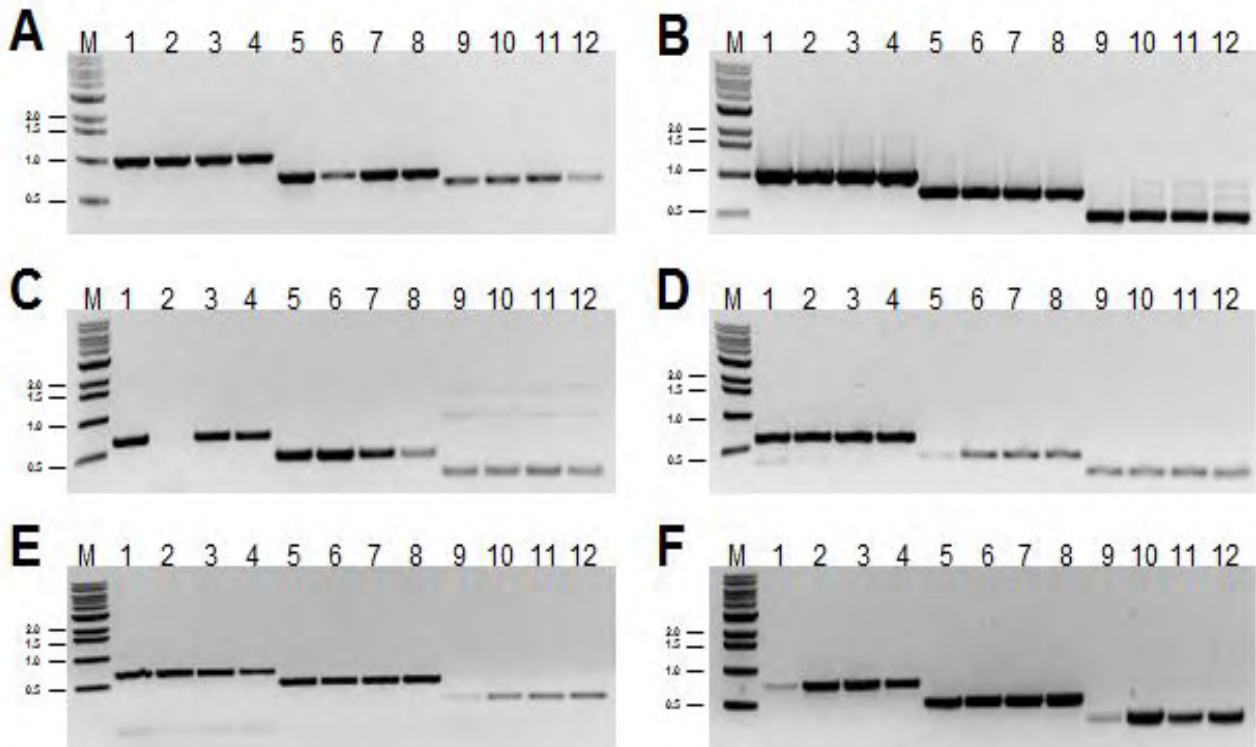


그림 1-15. Amplification of each different regions of six plant quarantine viruses nucleic acid (A: AIMV, B: CRSV, C: PepMV, D: PVT, E: SPMMV, F: WSMV) with three PCR primer sets and annealing temperature. Each lane shows respective annealing temperature : 50℃ (lane 1, 5, 9), 52℃ (lane 2, 6, 10), 54,8℃ (lane 4, 8, 12), and 58℃ (lane 4, 8, 12). PCR reaction was carried out with three primer sets #1 (lane 1-4), #2 (lane 5-8), and #3 (lane 9-12). M above lane means 1kb DNA ladder marker (Bioneer, Daejeon, Korea).

AIMV의 경우 50℃, 54.8℃에서 증폭이 잘 되었으며, 58℃에서는 증폭된 product의 양이 적었으며, CRSV 프라이머의 경우 모든 온도조건에서 원하던 크기의 PCR product를 보여주었다. 제작된 프라이머의 바이러스 특이성 테스트를 위하여 바이러스 감염 샘플, 건강한 담배, 건강한 토마토, 감자바이러스 X에 감염된 담배, 오이모자이크 바이러스에 감염된 담배로부터 total RNA를 추출하여 RT-PCR를 수행하였다. 수행결과 모든 프라이머들이 바이러스 특이적인 것으로 나타났다(그림 1-16).

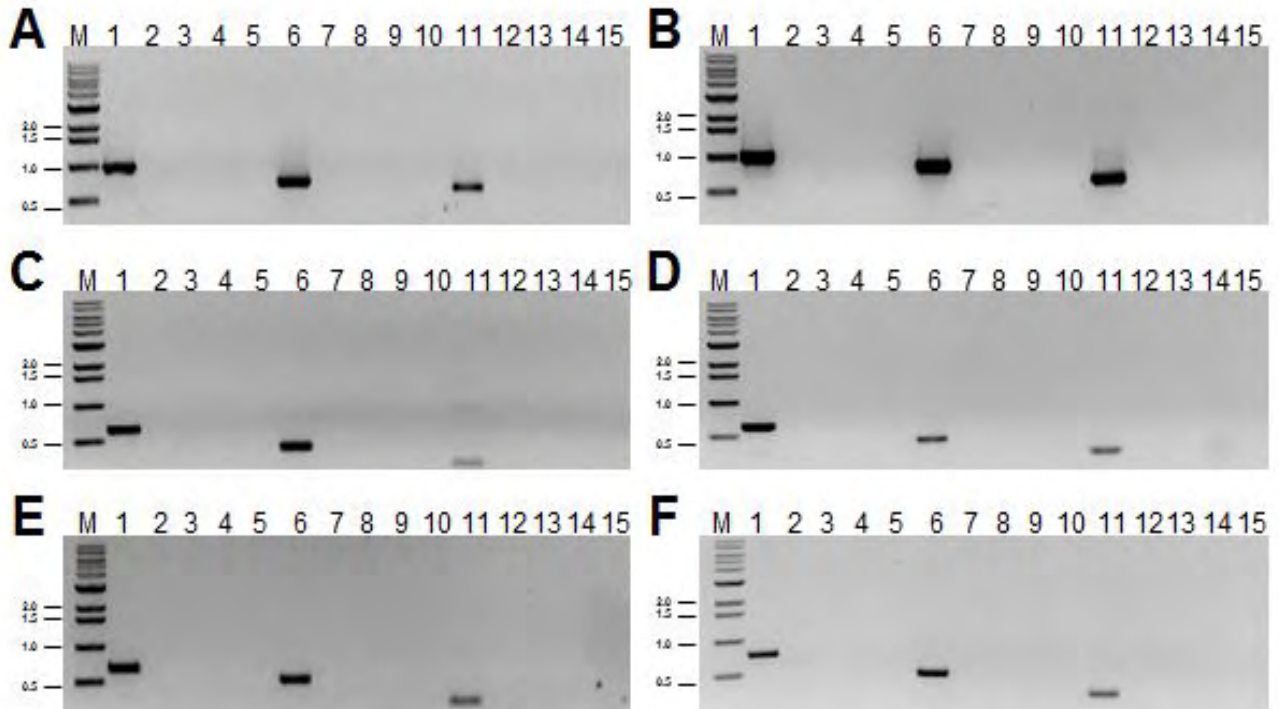


그림 1-16. Primer specificity test with other host, non-host, and plant pathogenic virus nucleic acid. Amplification of each different regions of six plant quarantine viruses nucleic acid (A: AIMV, B: CRSV, C: PepMV, D: PVT, E: SPMMV, F: WSMV). All numbers describe different cDNA sample used for PCR reaction (Lane 1, 6, 11 : positive control for each virus; Lane 2, 7, 12 : Healthy *Nicotiana benthamiana* Lane 3, 8, 13 : Healthy *Lycopersicon esculentum* Lane 4, 9, 14 : Potato virus X-infected *N. benthamiana* Lane 5, 10, 15 : Cucumber mosaic virus-infected *N. benthamiana*). M above lane means 1kb DNA ladder marker (Bioneer, Daejeon, Korea).

첨부 1. CVYV, CYSDV, PAMV, PYDV, ToCV, BNYVV, ChiVMV, CSNV,
CDV, IYSV 검정용 실험서(예시)

LAB. MANUALS

수출입 식물 바이러스 검역을 위한 진단기술 개발

Development of molecular diagnostic methods for quarantine
plant viruses

(Cucumber vein yellowing virus (CVYV), Cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV), Potato aucuba mosaic virus (PAMV), Potato yellow dwarf virus (PYDV), Tomato chlorosis virus (ToCV), Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV), Chilli veinal mottle virus (ChiVMV), Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV), Iris yellow spot virus (IYSV))

국립식물검역소

첨부1.1. Silica column RNA extraction kit를 이용한 RNA 분리 방법

- ① Total RNA를 추출하기 위해서 감염된 잎 또는 가지를 액체질소를 사용하여 막자사발에 담아 잘 마쇄한 후, 약 5 mg~20 mg 정도를 2 ml tube에 옮겨 담는다.
- ② 각 tube에 600 μ l의 Lysis buffer를 넣고 vortexing하고, 실온에서 30초 동안 incubation한다.

* Lysis buffer

kit안에 들어있는 Binding buffer 450 μ l에 150 μ l의 TE buffer를 첨가하여 준비해둬

- ③ 1분간 최대속도 (12,~13,000rpm)에서 원심분리하고 상층액을 주사기를 이용하여 취하고 syringe filter를 이용하여 새 tube에 옮겨 담는다.

* column에 상층액을 걸러야하므로 식물조직이 존재하면 안됨.

- ④ filter로 걸러낸 상층액에 300 μ l의 Isopropanol을 첨가하고 5~6회 inverting하여 섞은 다음 내장된 column에 옮겨담는다.
- ⑤ 1분간 원심 분리하여 내린 용액을 버리고, 600 μ l의 SuperWash 용액으로 세척한 후, 600 μ l의 1 \times RNA Wash buffer로 두 번 Washing한다.
- ⑥ column을 약 1분간 최대속도로 원심 분리하여 Washing buffer를 완전히 제거한다.
- ⑦ column을 새 tube에 옮긴 다음, 약 50~100 μ l의 elution buffer를 넣고 실온에서 약 5분간 둔다.
- ⑧ 약 2분간 원심분리한 후, 약 5 μ l 정도 취해서 1% agarose gel에서 확인한다.

첨부1.2. Viral dsRNA extraction

전체 RNA를 추출하여 바이러스를 검출하는 방법은 추출된 total RNA내에 바이러스의 RNA 말고도 숙주의 RNA도 존재하므로, 바이러스 검출효율이 다소 떨어질 수 있다. 따라서 ssRNA를 genome으로 갖는 바이러스에서 바이러스 복제과정에서 중간단계로 잠깐 형성하는 dsRNA가 존재하는데, 이 dsRNA만을 순화하면 나머지 숙주와 바이러스의 ssRNA가 모두 제거되고, 바이러스 검출 효율을 높일 수 있다.

- (1) total RNA 용액에 최종 2 M 이되도록 LiCl을 첨가한 후, 4°C에서 16시간 배양시킨다.
- (2) 13000rpm에서 15분간 원심 분리하여 ssRNA를 침전시킨 다음, 상층액을 취한다.
- (3) 취한 dsRNA를 포함하고 있는 상층액에 동량의 isopropanol과 0.1배의 5M ammonium acetate를 첨가하고, - 20°C에서 2시간 침전시킨다.
- (4) 13000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 dsRNA pellet을 얻은 다음, 75% Et-OH로 13000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 washing한다.
- (5) pellet의 양을 비교하여 적당량의 DEPC-dH₂O를 넣는다.

첨부1.3. 검역용 식물바이러스의 RT-PCR 방법

RNA 분리



분리한 RNA를 이용한 reverse transcription 반응



heat inactivation하여 잘 섞어 -20°C 보관 또는 PCR



PCR tube에 필요한 시료를 첨가하고 잘 섞은 후 온도와 시간이 program된 PCR 증폭기로 옮긴 후 PCR 실시

※ 검정하고자 하는 바이러스 종류에 따라 RT와 PCR의 온도와 시간 조건이 조금씩 다름



1% - 1.5% agarose gel 전기영동으로(electrophoresis) 바이러스 특이 DNA 증폭여부 확인

첨부1.4. RT-PCR reaction

가. RT reaction

(1) 다음의 용액을 1.5ml microcentrifuge용 튜브에 담는다.

5 μ l total RNA 또는 dsRNA
3 μ l 25pmol/ μ l reverse primer
5.5 μ l RNase-free water

(2) 95 °C에서 5분간 가열하여 RNA를 denature시킨다.

(3) 튜브를 얼음박스에 옮기고 다음 용액을 첨가한다.

2 μ l 5X MMLV RT buffer
4 μ l 2.5 mM dNTP mix
0.5 μ l MMLV RT (100 units)

(4) 40 °C에서 5분간 반응시킨다.

(5) 열처리(99 °C에서 5분간)로 반응 혼합체중의 효소를 denature시킨다.

(6) 180 μ l의 RNase-free water을 첨가하여 10배 희석시킨후,
PCR반응에 이용할 때까지 -20 °C에 보관한다.

나. PCR reaction

5 μ l 10X PCR buffer
2 μ l 25 pmoles/ μ l primer mix
3 μ l 2.5 mM dNTP mix
5 μ l cDNA
0.5 μ l Taq polymerase (2.5 units)
34.5 μ l sterile water

첨부1.5. CVYV (2개), CYSDV (2개), PAMV (1개), PYDV (2개), ToCV (1개)
진단용 특이프라이머

Index	Name	Amplified region	Accession No.	Primer sequences	Length	Tm (°C)	size
1	CVYV-1_F	Coat protein	NC_006941	5'-GAATGGCACAAAGTGATGAGAGG-3'	22	55.8	334
2	CVYV-1_R	Coat protein	NC_006941	5'-ATTAGCGGCAAGTGCTGGTG-3'	21	56.4	334
3	CVYV-2_F	Coat protein	NC_006941	5'-GGCACAAAGTGATGAGAGGAAAAC-3'	23	56.4	331
4	CVYV-2_R	Coat protein	NC_006941	5'-CATTAGCGGCAAGTGCTGGTG-3'	22	59.1	331
5	CYSDV-1_F	Coat protein	AJ243000	5'-GGACGGCTGACTTTATCAATTATG-3'	24	55.7	301
6	CYSDV-1_R	Coat protein	AJ243000	5'-TGTGACACGTTATAATATTTCTTTTC-3'	26	50.9	301
7	CYSDV-2_F	Coat protein	EF538681	5'-CATGCACGGTGACCAAAGAAG-3'	22	59	289
8	CYSDV-2_R	Coat protein	EF538681	5'-CAAAGCCTGGCATTTCATCAAC-3'	22	58.1	289
9	PAMV-1_F	RNA polymerase	NC_003632	5'-GCTGTGGGCTGTGTGTAAG-3'	20	52.8	338
10	PAMV-1_R	RNA polymerase	NC_003632	5'-TCCAATTGTCTTTAATGAACGC-3'	22	53.4	338
11	PYDV-1_F	Nucleocapsid	EU183122	5'-CGCTCAGTTCGTGCAGTTGT-3'	20	56	196
12	PYDV-1_R	Nucleocapsid	EU183122	5'-TCTGATTCTAGTCCACGCTGC-3'	21	54.2	196
13	PYDV-2_F	Nucleocapsid	EU183122	5'-GATGCAGTCAGCGGAAGTAC-3'	21	56.8	253
14	PYDV-2_R	Nucleocapsid	EU183122	5'-GGTAATGGCTGGCAGTCCA-3'	19	55.4	253
15	ToCV-1_F	Coat protein	FM206381	5'-GAGGTTAGACCCAAAATGTCCG-3'	22	56.2	196
16	ToCV-1_R	Coat protein	FM206381	5'-CTGAGATATTCATCAACGAACCAT-3'	24	53.8	196

첨부1.6. BNYVV, ChiVMV, CSNV, CDV, IYSV 진단용 특이프라이머

Index	Name	Amplified region	Accession No.	Primer sequences	Length	Tm (°C)	Size
1	BNYVV-1_F	Coat protein	AY771348	5'-GATCGATGGGCCCGTGTTC-3'	20	60.8	474
2	BNYVV-1_R	Coat protein	AY771348	5'-CAGGTGTCCATGGTAACTTCAAC-3'	23	54.8	474
3	ChiVMV-1_F	Coat protein	NC_005778	5'-CAAGCTCAGCCACAGTCTCGTC-3'	23	58.6	550
4	ChiVMV-1_R	Coat protein	NC_005778	5'-CGCGCTAATGACATATCGGTAAG-3'	23	57.5	550
5	CSNV-1_F	Coat protein	AB438998	5'-GCGGAATACTCTGCACGACTTG-3'	22	58.4	601
6	CSNV-1_R	Coat protein	AB438998	5'-GCTCTTTGTGCTTTGAATCCTG-3'	22	55.4	601
7	CDV-1_F	Coat protein	AB179622	5'-CAAGATCGAGATGTGAATGCTG-3'	22	54.5	662
8	CDV-1_R	Coat protein	AB179622	5'-GTGTGACGTTCCGGTATCCTCTTC-3'	23	56.2	662
9	IYSV-1_F	RNA polymerase	AF067070	5'-TCTGGTGAGTGCATATGGTTTGA-3'	23	56.7	420
10	IYSV-1_R	RNA polymerase	AF067070	5'-CTTGAGGGATTCTTGGGTTTAG-3'	23	56.9	420

첨부1.7. PCR reaction conditions for 10 quarantine plant viruses

10개 바이러스 모두 동일 PCR조건에서 검역이 가능하다.

Optimized PCR condition

94 °C	3'	} X 35 cycles
94 °C	20''	
55 °C	40''	
72 °C	1'	
72 °C	10'	
4 °C	∞	

제 2 절 식물병원균 검역 정보 관리 시스템 (QIMS) 구축을 위한 데이터베이스 구축 및 관리 시스템 개발

1. 개발 접근방법

QIMS 개발은 기구축되어 있는 PD의 유전체 정보 활용 기능을 포괄하면서, marker sequence가 아닌 미생물 유전체 정보를 활용할 수 있도록 개발 범위를 설정하였다. 또한 실험적 데이터의 입력과 수정을 포함한 관리를 할 수 있도록 기능을 개발하여, 하나의 웹 시스템에서 서로 다른 두 종류의 자료를 종합하여 활용할 수 있도록 설계하였다. 생물정보학 프로그램을 이용한 염기서열 분석 이 외에도, 얻어진 서열 정보가 이미 알려진 유전체 중에서 어떤 종에 가까운 지 판단하는 근거를 제공하기 위해서, ClustalW (Larkin *et al.*, 2007)를 통한 다중서열정렬(MSA: multiple sequence alignment) 및 phylogenetic tree를 이용한 계통분류학적 연관관계 자료를 활용할 수 있도록 설계하였다.

2. 개발내용

가. 메인페이지

메인 페이지는 검역정보 시스템의 각 세부 컴포넌트를 한 눈에 파악할 수 있는 도식을 추가하였다(그림 2-1). 각 메뉴는 상단의 메뉴바에서 선택할 수 있으며, 해당 웹사이트는 Microsoft Internet Explorer 및 Mozilla Firefox 등을 포함한 다수의 최신 웹 브라우저를 통해 이용할 수 있도록 개발하였다.

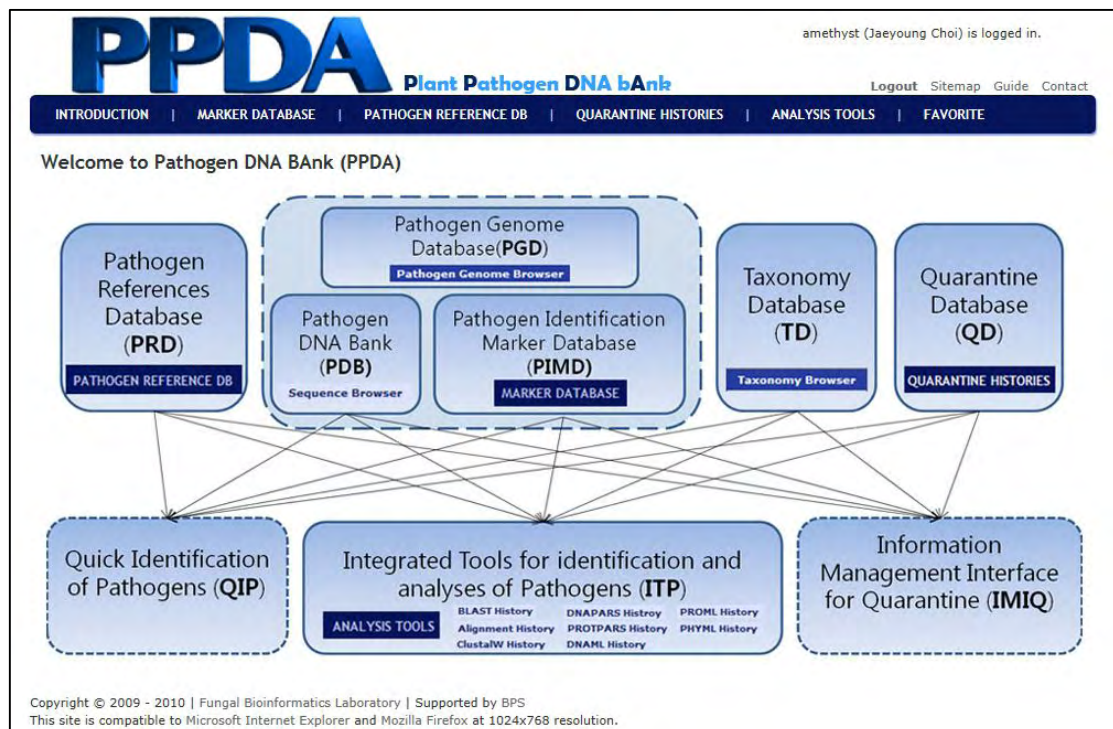


그림 2-1 검역정보 관리 시스템의 메인화면 갈무리

아래에 기술하는 각 항목의 소제목들은 실제 검역정보 관리 시스템의 메뉴 이름으로 작성하였다. 그 이하의 제목들도 각 메뉴에 해당하는 기능의 이름으로 작성하였다.

나. MARKER DATABASE

검역 금지종 및 관리종 동정을 위해서는 종 특이적 분자 표지를 개발하는 것이 가장 단 시간 내에 동정해 낼 수 있는 방법이 될 수 있다. MARKER DATABASE는 본 과제 수행 중에 개발된 분자 표지 자료를 입력 및 관리하고, 각 분자 표지가 어떤 isolate에서 유래하였는지, 분자 표지의 염기서열 정보는 무엇인지에 대한 관리를 위한 데이터베이스이다.

(1) Marker Browser

그림 2-2는 분자 표지 정보를 관리하는 Marker Browser의 갈무리 사진이다. 각 분자 표지의 이름, 유형, 분자 표지 염기서열 정보의 유무, 해당 분자 표지로 생물정보학 프로그램을 구동한 횟수 등을 표시하고 있다.

MARKER BROWSER > LIST OF MARKERS

Marker Browser
List of markers

This page displays the list of markers.

Function

Search by Name

There are 21 markers.

Chk	Name	Type	Comment	# of sequences	# of histories	Function
<input type="checkbox"/>	16S rRNA	Sequencing	X. campestris pv. poinsetticola	0	0	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	DNAlyaseF - DNAlyaseR	PCR		N/A	0	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	MAT1-1F - MAT1-1R	PCR		N/A	0	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	Tsolre1FM - Tredo1R	PCR		N/A	0	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	Tsolre1FM - Tsol1R	PCR		N/A	0	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	smibo1 FM - semi1 RM	PCR		N/A	0	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	smibo1 FM - stilbo1 RM	PCR		N/A	0	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	ToCV	PCR		N/A	0	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	PYDV-3	PCR		N/A	0	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	PYDV-2	PCR		N/A	0	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	PYDV-1	PCR		N/A	0	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	PAMV	PCR		N/A	0	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	CYSDV	PCR		N/A	0	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	CVYV	PCR		N/A	0	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	MAT1-1-1	Sequencing		8	0	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	DNAlyase_MAT1-1-3	Sequencing		18	0	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	DNAlyase	Sequencing		35	0	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	b-tubulin	Sequencing		81	0	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	Calmodulin	Sequencing		72	0	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	RPB2	Sequencing		124	0	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>

1 / 2 pages 20 items per page

그림 2-2 Marker Browser 목록 화면의 갈무리

(2) Isolate Browser

그림 2-3은 본 연구 수행 중에 target으로 설정된 isolate에 대한 정보를 관리하는 Isolate Browser의 갈무리 사진이다. 각 종의 이름 및 isolate 정보를 조회할 수 있다. Isolate 이름은 공인된 KACC 및 CBS의 isolate number를 사용하는 것을 원칙으로 한다.

그림 2-4는 Isolate Browser에서 임의의 isolate 정보를 선택했을 때 나타나는 상세 정보 화면이다. 상세 정보에서는 해당 종 및 isolate와 연관된 염기서열 정보를 제공한

다. Isolate 정보와 marker sequence 간의 cross-linking을 통하여 자료 조회의 효율성을 높일 수 있도록 개발하였다.

ISOLATE BROWSER > LIST OF ISOLATES

Isolate Browser

List of isolates

This page displays the list of isolates stored in this database.

Function [Delete checked items](#)

Search by There are 195 isolates.

Chk	Name	Species name	Comment	Create date	Function
<input type="checkbox"/>	45236	<i>Pleospora tomatonis</i>	KACC, CBS No: 109844	2011-02-16 15:34:11	Modify Del
<input type="checkbox"/>	45235	<i>Pleospora sedicola</i>	KACC, CBS No: 109843	2011-02-16 15:34:11	Modify Del
<input type="checkbox"/>	45263	<i>Drechslera nodulosa</i>	KACC, CBS No: 160.58	2011-02-16 15:34:11	Modify Del
<input type="checkbox"/>	45262	<i>Drechslera kusanoi</i>	KACC, CBS No: 157.6	2011-02-16 15:34:11	Modify Del
<input type="checkbox"/>	45260	<i>Drechslera iridis</i>	KACC, CBS No: 503.73	2011-02-16 15:34:11	Modify Del
<input type="checkbox"/>	45259	<i>Drechslera iridis</i>	KACC, CBS No: 226.66	2011-02-16 15:34:11	Modify Del
<input type="checkbox"/>	45258	<i>Drechslera gigantea</i>	KACC, CBS No: 163.91	2011-02-16 15:34:11	Modify Del
<input type="checkbox"/>	45256	<i>Drechslera ellisii</i>	KACC, CBS No: 193.62	2011-02-16 15:34:11	Modify Del
<input type="checkbox"/>	45255	<i>Drechslera chloridis</i>	KACC, CBS No: 246.77	2011-02-16 15:34:11	Modify Del
<input type="checkbox"/>	45252	<i>Curvularia pallescens</i>	KACC, CBS No: 338.64	2011-02-16 15:34:11	Modify Del
<input type="checkbox"/>	45251	<i>Curvularia pallescens</i>	KACC, CBS No: 194.62	2011-02-16 15:34:11	Modify Del
<input type="checkbox"/>	45250	<i>Curvularia pallescens</i>	KACC, CBS No: 169.53	2011-02-16 15:34:11	Modify Del
<input type="checkbox"/>	45247	<i>Curvularia brachyspora</i>	KACC, CBS No: 553.89	2011-02-16 15:34:11	Modify Del
<input type="checkbox"/>	45248	<i>Curvularia brachyspora</i>	KACC, CBS No: 186.5	2011-02-16 15:34:11	Modify Del
<input type="checkbox"/>	45385	<i>Cochliobolus victoriae</i>	KACC, CBS No: 287.51	2011-02-16 15:34:11	Modify Del
<input type="checkbox"/>	45384	<i>Cochliobolus victoriae</i>	KACC, CBS No: 174.57	2011-02-16 15:34:11	Modify Del
<input type="checkbox"/>	45382	<i>Cochliobolus spicifer</i>	KACC, CBS No: 418.67	2011-02-16 15:34:11	Modify Del
<input type="checkbox"/>	45381	<i>Cochliobolus spicifer</i>	KACC, CBS No: 371.72	2011-02-16 15:34:11	Modify Del
<input type="checkbox"/>	45383	<i>Cochliobolus spicifer</i>	KACC, CBS No: 364.7	2011-02-16 15:34:11	Modify Del
<input type="checkbox"/>	45336	<i>Cochliobolus spicifer</i>	KACC, CBS No: 246.62	2011-02-16 15:34:11	Modify Del

1 / 10 pages 20 items per page

[Input new isolate](#)

그림 2-3 Isolate Browser의 목록 화면의 갈무리

ISOLATE BROWSER > LIST OF ISOLATES > DETAILED INFORMATION OF ISOLATE

Isolate Browser

Detailed information of isolate

Detailed Information of Isolate

Isolate name
45236

Species name
Pleospora tomatonis

Related sequences

Name	Marker name	Length (bp)	Create date
RPB2: 45236	RPB2	957	2011-02-16 17:32:01

Comment
KACC, CBS No: 109844

Create date
2011-02-16 15:34:11

Update date
This record has never been updated.

[Back](#)

그림 2-4 Isolate Browser의 상세정보 화면 갈무리

그림 2-5는 Isolate Browser의 상세화면에서 연관된 분자 표지 염기서열 정보로 연결된 화면이다. 선택된 분자 표지의 이름과 isolate 및 종 정보를 포함하여 염기서열 정

보를 제공한다.

SEQUENCE BROWSER > SEQUENCE LIST > DETAILED INFORMATION OF SEQUENCE

Sequence Browser

Detailed information of sequence

Detailed Information of Sequence

Marker sequence ID	384
Name	RPB2: 45236
Marker name	RPB2
Isolate name	45236
Species name	<i>Pleospora tomatonis</i>
Sequence	<pre>+ 1 TGT TGCTCTCACCAACTTTGCGCTCOCATG6AAACCATGATBAAOBTCTATAC TACCCCTCAGAAGCCCTT6GC6ACACTCGATCAATB6GATACCTCAAGTTCCGTGAACCTCC76C 121 T66ACAAAT6GCCATT6TCGCCATTGCTACATAOC6T6GTTACAACCCAG6A6GATTC6TCTATTAT6AACCAG6AC6GATCGATOC6T6GTTCTGTTCOC6AAGTCTGTTC TACCGT6C6GTA 241 CACT6AGCAAG6AAGC6AAT6GTGT6AT6TTC6T6A6C6GTT6OS6A6G6CCTAC6C6GT6C6S6ATAC6TCTT6C6T6C6A6G6T66A6CC6TAC6S6AC6A6C6TC6A6S6AC6G6O6G6T6T6T 361 T6C6T6CT6G6T6T6G6T6T6C6T6G6T6AT6AC6AT6CAT6AT6BAAA6G6CAG6AC6CC6AT6G6S6AC6G6AC6G6TC6AG6AG6CT6G6T6CAAAA6G6CC6ACT6C6AC6CC6A6G6C6A6T6T6C6AC 481 6CC6CC6TC6G6A6G6C6AC6G6AAA6C6G6T6AT6G6T6CA6G6T6G6T6T6C6C6C6AC6A6C6C6G6A6G6AC6T6C6G6AT6C6G6T6CA6G6T6C6G6T6CA6A6G6ACT6CC6A6G6T6G6C6TC6A6AT6G6T6G6AC6A 601 6TT6C6G6T6C6T6T6C6G6T6CA6A6G6G6T6CC6AT6G6T6AT6CA6T6T6CC6C6C6G6A6G6A6CA6T6G6C6CT6C6CA6G6A6G6G6T6CT6C6AC6CC6G6C6T6A6T6AT6CA6CC6C6C6AC6G6CA6T6C6C6C6T6C 721 G6G6T6G6AC6A6TC6G6CC6ATT6A6T6C6A6T6G6T6C6C6T6T6C6AAA6T6G6C6G6C6C6AT6C6AG6C6A6G6A6G6G6G6C6AC6G6C6C6C6CT6T6AC6G6AC6T6A6CC6G6T6G6AC6A6G6T6C6G6AC6T6C6C 841 C6A6G6AC6G6C6G6CT6ACC6AAA6G6C6G6G6CT6G6AAA6T6AT6T6T6ACA6C6G6C6C6AC6G6G6CA6G6A6G6T6G6S6C6G6CA6A6T6T6CT6T6G6G6T6C6G6AC6T6ACT6ACC6A6G6T6C6C6G6C6AT6AT</pre>
Comment	
Create date	2011-02-16 17:32:01
Update date	This record has never been updated.
Creator	amethyst (Jaeyoung Choi)

[Back](#)

그림 2-5 Isolate Browser에서 연관된 분자 표지 염기서열 정보를 표시한 화면의 갈무리

(3) Sequence Browser

SEQUENCE BROWSER > LIST OF SEQUENCES

Sequence Browser

List of sequences

This page displays the list of sequences.

Function

Search by There are 419 sequences.

Chk	Name	Marker Name	Species Name	Create Date	Function
<input type="checkbox"/>	RPB2: K44841	RPB2	Bipolaris sorokiniana	2011-02-16 17:32:01	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	RPB2: K44840	RPB2	Bipolaris cynodontis	2011-02-16 17:32:01	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	RPB2: K41026	RPB2	Bipolaris oryzae	2011-02-16 17:32:01	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	RPB2: K41025	RPB2	Bipolaris oryzae	2011-02-16 17:32:01	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	RPB2: K41024	RPB2	Curvularia lunata	2011-02-16 17:32:01	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	RPB2: K41020	RPB2	Curvularia lunata	2011-02-16 17:32:01	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	RPB2: K40920	RPB2	Bipolaris sorokiniana	2011-02-16 17:32:01	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	RPB2: K40919	RPB2	Bipolaris coicis	2011-02-16 17:32:01	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	RPB2: K40918	RPB2	Bipolaris coicis	2011-02-16 17:32:01	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	RPB2: K40917	RPB2	Bipolaris coicis	2011-02-16 17:32:01	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	RPB2: K40916	RPB2	Bipolaris coicis	2011-02-16 17:32:01	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	RPB2: K40853	RPB2	Bipolaris oryzae	2011-02-16 17:32:01	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	RPB2: K40852	RPB2	Bipolaris coicis	2011-02-16 17:32:01	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	RPB2: K40392	RPB2	Curvularia lunata	2011-02-16 17:32:01	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	RPB2: 45473	RPB2	Cochliobolus carbonum	2011-02-16 17:32:01	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	RPB2: 45385	RPB2	Cochliobolus victoriae	2011-02-16 17:32:01	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	RPB2: 45384	RPB2	Cochliobolus victoriae	2011-02-16 17:32:01	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	RPB2: 45383	RPB2	Cochliobolus spicifer	2011-02-16 17:32:01	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	RPB2: 45382	RPB2	Cochliobolus spicifer	2011-02-16 17:32:01	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>
<input type="checkbox"/>	RPB2: 45381	RPB2	Cochliobolus spicifer	2011-02-16 17:32:01	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>

1 / 21 pages 20 items per page

그림 2-6 Sequence Browser 목록 화면의 갈무리

Sequence Browser는 연구 기간 중 개발된 분자 표지의 정보를 염기서열과 함께 조회할 수 있도록 개발하였다. 앞서 언급하였듯이, Sequence Browser는 Isolate Browser와 cross-link 되어 있다. 각 검역 대상종 정보로부터 어떤 분자 표지가 있는지를 알아볼 필요가 있으므로, Isolate Browser로부터의 접근도 가능하도록 개발하였다. 정보 탐색의 동선을 최소화하기 위하여, 분자 표지 정보에서 역으로 isolate 정보로 접근할 필요가 없도록 하였다. 이는 분자 표지 정보의 상세보기 화면에는 종 정보가 함께 표시되기 때문이다. 그림 2-6은 Sequence Browser의 목록화면이다. 분자 표지의 이름과 유전자 이름, 종 정보를 확인할 수 있다. 각 분자 표지를 선택하면 그림 5에서 보는 바와 같이 상세한 정보와 염기서열을 확인할 수 있다.

다. PATHOGEN REFERENCE DATABASE

PATHOGEN REFERENCE DB는 병원균 정보 및 해당 병원균이 일으키는 병 정보, 숙주 정보를 관리하는 데이터베이스이다. 각 병원균의 정보와 해당 병원균에서 개발된 분자 표지 정보를 연동하여, 선택된 종에 어떤 분자 표지가 존재하는 지를 한 눈에 알 수 있도록 개발하였다. 병원균 정보는 Host Browser와도 연동되도록 설계하였고, 각 병원균의 기주 식물 정보를 입력하면 바로 연동되도록 개발하였다.

(1) Pathogen Browser

Pathogen Browser에서는 병원균의 정보를 조회 및 관리할 수 있다. 그림 2-7은 Pathogen Browser의 목록 화면이다. 종 명, 병원균의 간단한 구분, 관리병/금지병 여부를 확인할 수 있다. 더불어, 특정 병원균의 전장유전체(fully sequenced genome)이 해독되어 있는 경우에는 Genome 버튼이 활성화 된다. 이 경우에는 Pathogen Genome Browser에서 유전체 정보를 시각적으로 조회할 수 있게 된다. 그림 2-8은 Pathogen Browser에서 *Cochliobolus spicifer*를 선택한 상세보기 화면이다. 상세보기 화면에서는 목록화면에서 제시된 정보 이 외에도, 선택된 종에 해당하는 분자 표지 정보 및 검역 금지병/관리병 여부를 함께 제공하도록 개발하였다. 병원균 정보와 분자 표지 정보를 직접적으로 연결함으로써, 자료 조회의 효율성을 높이고자 하였다.

Function [Delete checked items](#)

Search by There are 523 pathogens.

Chk	Species Name	Classification	Comment	Create Date	Function
<input type="checkbox"/>	<i>Fragaria chiloensis virus</i>	Virus	관리병	2010-06-03 13:12:22	No Genome Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Volutella pachysandricola</i>	Fungi	관리병	2010-06-03 13:12:02	No Genome Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Pseudocercospora punicae</i>	Fungi	관리병	2010-06-03 13:11:54	No Genome Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Phaeoacremonium viticola</i>	Fungi	관리병	2010-06-03 13:11:32	No Genome Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Inonotus weirei</i>	Fungi	관리병	2010-06-03 13:11:14	No Genome Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Hypoxylon mammatum</i>	Fungi	관리병	2010-06-03 13:10:44	No Genome Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Hendersonia sp.</i>	Fungi	관리병	2010-06-03 13:10:32	No Genome Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Gymnosporangium libocedri</i>	Fungi	관리병	2010-06-03 13:10:19	No Genome Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Fusicoccum sp.</i>	Fungi	관리병	2010-06-03 13:10:00	No Genome Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Cercospora richardiaeicola</i>	Fungi	관리병	2010-06-03 13:09:04	No Genome Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Grapevine flavescence</i>	Phytoplasma	금지병	2010-05-25 10:20:33	No Genome Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Apple proliferation phytoplasma</i>	Phytoplasma	금지병	2010-05-25 10:20:16	No Genome Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Xylella fastidiosa</i>	Bacteria	금지병	2010-05-25 10:20:00	No Genome Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Erwinia amylovora</i>	Bacteria	금지병	2010-05-25 10:19:38	No Genome Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Citrus greening disease-associated bacterium</i>	Bacteria	금지병	2010-05-25 10:19:22	No Genome Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Potato spindle tuber viroid</i>	Viroid	금지병	2010-05-25 10:18:58	No Genome Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Plum pox potyvirus</i>	Virus	금지병	2010-05-25 10:18:38	No Genome Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Synchytrium endobioticum</i>	Fungi	금지병	2010-05-25 10:18:18	No Genome Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Phytophthora ramorum</i>	Oomycetes	금지병	2010-05-25 10:18:02	Genome Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Peronospora tabacina</i>	Fungi	금지병	2010-05-25 10:17:42	No Genome Modify Del

1 / 27 pages 20 items per page

[Input New Pathogen Data](#)

그림 2-7 Pathogen Browser 목록 화면의 갈무리

PATHOGEN BROWSER > PATHOGEN LIST > DETAILED INFORMATION OF PATHOGEN

Pathogen Browser

Detailed information of pathogen

Detailed Information of Pathogen

Pathogen ID
79

Species name
Cochliobolus spicifer

Classification
Fungi

Hosts(0)

List of sequences

Name	Species name	Length (bp)
RPB2: 45377	<i>Cochliobolus spicifer</i>	957
RPB2: 45379	<i>Cochliobolus spicifer</i>	958
RPB2: 45381	<i>Cochliobolus spicifer</i>	957
RPB2: 45382	<i>Cochliobolus spicifer</i>	957
RPB2: 45383	<i>Cochliobolus spicifer</i>	957

Comment
관리명

Create Date
2010-05-19 14:40:28

Update Date
2010-06-10 10:14:15

Creator
genesis24 (Donghan Kim)

[Back](#)

그림 2-8 Pathogen Browser에서 *Cochliobolus spicifer*를 선택한 상세보기 화면의 갈무리

(2) Disease Browser

Disease Browser는 병원균에 의해 발생하는 병 정보를 관리할 수 있는 곳이다. 병 정보는 영문 및 국문 병명과 함께 병원균을 함께 입력하도록 하였다. 이로써 병 정보와 병원균 정보가 연동되고 병원균 정보는 이미 기주 정보와 연동되어 있으므로, 병/병원균/기주 정보가 모두 연동되는 시스템을 제공하게 된다. 그림 2-9는 Disease Browser의 병 정보 관리 화면이다. 예시로 입력된 영문 및 국문 병명과 해당 병원균의 증명을 확인할 수 있다.

DISEASE BROWSER > LIST OF DISEASES

Disease Browser

List of diseases

Disease view page

Function [Delete checked items](#)

Search by

There are 1 diseases.

Chk	English Name	Korean Name	Pathogen	Create Date	Function
<input type="checkbox"/>	potato wart	감자 암줄병	Synchytrium endobioticum	2013-04-16 19:24:12	<input type="button" value="Modify"/> <input type="button" value="Del"/>

/ 1 pages items per page

그림 2-9 Disease Browser의 병 정보 목록 화면

DISEASE BROWSER > DISEASE LIST > INPUT DISEASE INFORMATION

Disease Browser

Input disease information

Input Disease Information

English Name

Korean Name

Pathogen Name

- Botryosphaeria canescens
- Botryodiplodia hypodermia
- Botryosphaeria parva
- Botryosphaeria sp.
- Botryosphaeria stevensii
- Botryosphaeria zeae
- Botrytis anthophila
- Capnodium citri
- Catacauma sabal
- Centrospora acerina
- Ceratocystis fagacearum
- Ceratocystis fimbriata
- Ceratocystis paradoxa
- Ceratocystis ulmi
- Ceratocystis virescens
- Cercospora angolensis
- Cercospora dudliae
- Cercospora fuliginosa
- Cercospora medicaginis
- Cercospora papayae
- Cercospora rubi
- Chalaropsis thielavioides
- Cerotelium fici
- Chrysomyxa abietis
- Chrysomyxa arctostaphyli
- Ciborinia camelliae
- Claviceps africana
- Claviceps gigantea
- Cochliobolus australiensis
- Cochliobolus carbonum

Input Back

laboratory | Supported by BPS
and Mozilla Firefox at 1024x768 resolution.

그림 2-10 Disease Browser의 입력 화면. Pathogen Browser의 내용과 연동되어 있음을 확인할 수 있다.

(3) Host Browser

HOST BROWSER > LIST OF HOSTS

Host Browser

List of hosts

Host view page

Function [Delete checked items](#)

Search by

There are **81** hosts.

Chk	Species Name	Comment	Create Date	Function
<input type="checkbox"/>	<i>Cajanus indicus</i>	비름기콩	2010-05-26 18:47:45	Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Alstromeria aurea</i>	알스트로메리아	2010-05-26 18:47:28	Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Rubus fruticosus</i>	블랙베리	2010-05-26 18:47:12	Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Pelargonium inquinans</i>	제라늄	2010-05-26 18:46:56	Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Ulmus rubra</i>	적느릅나무	2010-05-26 18:46:33	Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Corchorus capsularis</i>	장마	2010-05-26 18:36:41	Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Cucurbita moschata</i>	호박	2010-05-26 18:36:26	Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Cucurbita maxima</i>	호박	2010-05-26 18:36:12	Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Cucurbita pepo</i>	호박	2010-05-26 18:36:01	Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Secale cereale</i>	호밀	2010-05-26 18:35:45	Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Vitis vinifera</i>	포도	2010-05-26 18:35:29	Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Vitis labrusca</i>	포도	2010-05-26 18:35:16	Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Petunia integrifolia</i>	패튜니아	2010-05-26 18:35:03	Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Petunia axillaris</i>	패튜니아	2010-05-26 18:34:45	Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Linodendron tulipifera</i>	튤립나무	2010-05-26 18:34:28	Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Solanum lycopersicum</i>	토마토	2010-05-26 18:34:10	Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Actinidia deliciosa</i>	키위	2010-05-26 18:33:55	Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Actinidia chinensis</i>	키위	2010-05-26 18:33:39	Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Glycine max</i>	콩	2010-05-26 18:33:02	Modify Del
<input type="checkbox"/>	<i>Theobroma cacao</i>	코코아	2010-05-26 18:32:47	Modify Del

1/5 pages 20 items per page

[Input New Host Data](#)

그림 2-11 Host Browser 목록 화면의 갈무리

Host Browser는 검역 금지병/관리병이 발생하는 기주 식물 정보를 관리하는 곳이다. 이명법(bionomial naming)으로 표현한 종명과 우리말에 해당하는 이름을 병기하였다. (그림 2-11) 그림 8에서 제시된 바와 같이, Pathogen Browser와 함께 연동되도록 설계하였으며, 자료 입력과 동시에 연동되도록 설계하였다.

(4) Pathogen Genome Browser

Pathogen Genome Browser는 전장유전체 정보가 존재하는 검역종을 대상으로, 유전체 정보 및 예측된 유전자 모델을 제공한다. 그림 2-12에 제시된 바와 같이, 계통분류 정보와 유전체 정보가 버튼 형식으로 제공된다. 그림 2-13은 Contig 버튼을 선택했을 때 나타나는 화면이다. 여기에서는 전장 유전체의 DNA 염기서열을 조회할 수 있으며, SNUGB (Seoul National University Genome Browser) (Jung *et al.*, 2008) 버튼이 활성화 되어 있는 경우에는, 유전체 정보를 시각적으로 볼 수 있는 genome browser가 그림 2-14와 같이 나타나게 된다. 그림 2-15은 예측된 유전자 모델을 보여주고 있다. Protein/tRNA/rRNA 버튼이 활성화 되어 있는 경우, 해당 종의 전장유전체에 대한 각 항목별 유전자 예측 자료를 조회할 수 있다. 유전체 정보는 Comparative Fungal Genomics Platform (CFGP; <http://cfgp.snu.ac.kr>) (Choi *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2008a)과 연동되도록 개발하였다.

CONTIG BROWSER > LIST OF CONTIG DATA SETS

Contig Browser
Contig Data Set List
Contig data set view page

Function

Dataset Name : There are 15 records.

No	Dataset Name	NCBI Accession	# Refs.	Taxonomy	Source	Functions
1	<i>Cucumber vein yellowing virus</i>	Cucumber vein yellowing virus strain ALM32, complete genome.	0	Potyviridae> Not defined	NCBI	<input type="button" value="Contig"/> <input type="button" value="Protein"/> <input type="button" value="tRNA"/> <input type="button" value="rRNA"/>
2	<i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i>	Cucurbit yellow stunting disorder virus isolate AILM segment RNA1, complete sequ	0	Closteroviridae> Not defined	NCBI	<input type="button" value="Contig"/> <input type="button" value="Protein"/> <input type="button" value="tRNA"/> <input type="button" value="rRNA"/>
3	<i>Erwinia pyrifoliae Ep1/96</i>	FP236842	0	Enterobacteriaceae> Enterobacteriales	NCBI	<input type="button" value="Contig"/> <input type="button" value="Protein"/> <input type="button" value="tRNA"/> <input type="button" value="rRNA"/>
4	<i>Fusarium graminearum 3A</i>	supercont3.1	1	Nectriaceae> Hypocreales	Broad Institute	<input type="button" value="Contig"/> <input type="button" value="Protein"/> <input type="button" value="tRNA"/> <input type="button" value="rRNA"/>
5	<i>Fusarium oxysporum 2A</i>	supercont2.1	1	Nectriaceae> Hypocreales	Broad Institute	<input type="button" value="Contig"/> <input type="button" value="Protein"/> <input type="button" value="tRNA"/> <input type="button" value="rRNA"/>
6	<i>Fusarium solani 2</i>	sca_8_chr1_1_0	1	Nectriaceae> Hypocreales	DOE JOINT GENOME INSTL..	<input type="button" value="Contig"/> <input type="button" value="Protein"/> <input type="button" value="tRNA"/> <input type="button" value="rRNA"/>
7	<i>Fusarium verticillioides 3A</i>	supercont3.1	1	Nectriaceae> Hypocreales	Broad Institute	<input type="button" value="Contig"/> <input type="button" value="Protein"/> <input type="button" value="tRNA"/> <input type="button" value="rRNA"/>
8	<i>Impatiens necrotic spot virus</i>	Impatiens necrotic spot virus segment M, complete sequence.	0	Bunyaviridae> Not defined	NCBI	<input type="button" value="Contig"/> <input type="button" value="Protein"/> <input type="button" value="tRNA"/> <input type="button" value="rRNA"/>

그림 2-12 Pathogen Genome Browser 목록 화면의 갈무리

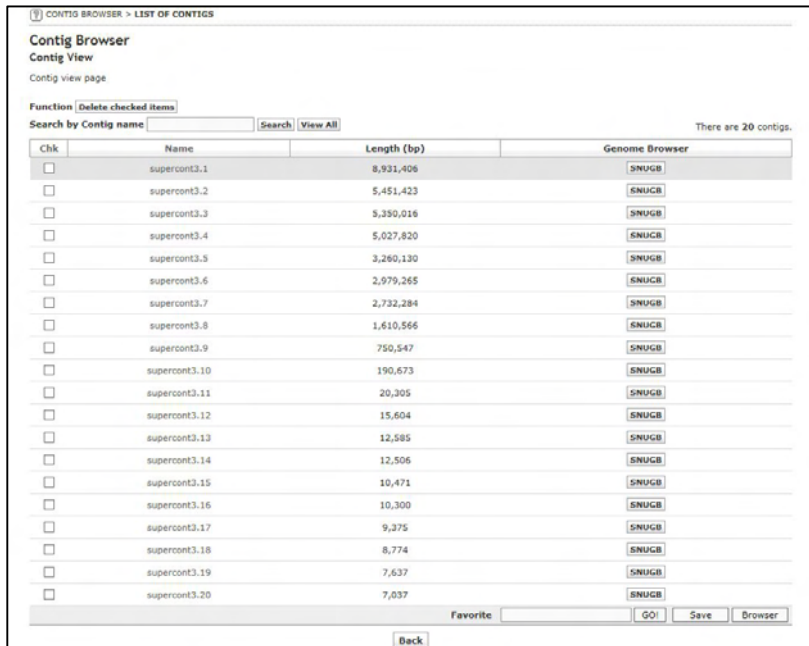


그림 2-13 Pathogen Genome Browser에서 하나의 종을 선택한 화면. 우측의 SNUGB 버튼을 이용하여 유전체를 탐색할 수 있다.

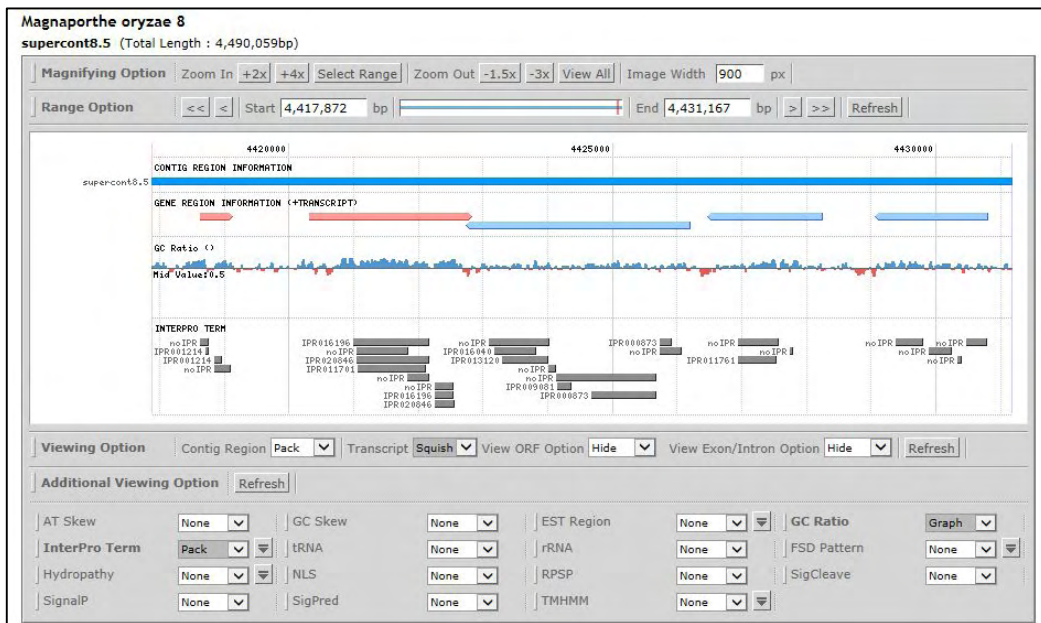


그림 2-14 SNUGB 기능을 실행한 화면의 갈무리. 대상 유전자 주변의 유전자들과 GC 함량 그래프, 단백질 도메인 영역을 시각적으로 표현할 수 있다.

CONTIG BROWSER > LIST OF PROTEINS

Contig Browser
Protein View
Protein view page

Function

Search by There are 20 proteins.

Chk	Locus Name	Gene	Protein Name	Length(aa)	Position	Annotation
<input type="checkbox"/>	CAX53759.1	miuC	Protein miuC, involved in modulation o..	146	1 ~ 441	i
<input type="checkbox"/>	CAX53760.1	asnC	AsnC-family transcriptional regulator	153	634 ~ 1095	i
<input type="checkbox"/>	CAX53761.1		conserved uncharacterized protein	719	1213 ~ 3372	i
<input type="checkbox"/>	CAX53762.1	viaA	Protein viaA (VWA-domain protein inter..	486	3436 ~ 4896	i
<input type="checkbox"/>	CAX53763.1	ravA	Regulatory ATPase variant A	497	4893 ~ 6386	i
<input type="checkbox"/>	CAX53764.1	kup	Low affinity potassium transport syste..	622	6644 ~ 8512	i
<input type="checkbox"/>	CAX53765.1		conserved uncharacterized protein	2,090	8616 ~ 14888	i
<input type="checkbox"/>	CAX53766.1		conserved uncharacterized protein	1,981	15051 ~ 20996	i
<input type="checkbox"/>	CAX53767.1		conserved uncharacterized protein	132	21292 ~ 21690	i
<input type="checkbox"/>	CAX53768.1	budR	HTH-type transcriptional regulator Bud..	293	21697 ~ 22578	i
<input type="checkbox"/>	CAX53769.1	budA	Acetolactate decarboxylase	260	22683 ~ 23465	i
<input type="checkbox"/>	CAX53770.1	budB	Acetolactate synthase, catabolic	559	23485 ~ 25164	i
<input type="checkbox"/>	CAX53771.1	rbsD	D-ribose high-affinity transport syste..	139	25383 ~ 25802	i
<input type="checkbox"/>	CAX53772.1	rbsA	D-ribose high-affinity transport prote..	501	25810 ~ 27315	i
<input type="checkbox"/>	CAX53773.1	rbsC	Ribose transport permease system prote..	322	27318 ~ 28286	i
<input type="checkbox"/>	CAX53774.1	rbsB	D-ribose-binding periplasmic protein	293	28436 ~ 29317	i
<input type="checkbox"/>	CAX53775.1	rbsK	Ribokinase	309	29379 ~ 30308	i
<input type="checkbox"/>	CAX53776.1	rbsR	Transcriptional repressor for rbs oper..	330	30320 ~ 31312	i
<input type="checkbox"/>	CAX53777.1	mdtD	MFS family transport protein	465	31309 ~ 32706	i
<input type="checkbox"/>	CAX53778.1	mobA	Molybdopterin-guanine dinucleotide bio..	187	38614 ~ 39177	i

1 / 183 pages 20 items per page

Favorite

그림 2-15 Pathogen Genome Browser에서 *Erwinia pyrifoliae* Ep1/96의 유전체에서 예측된 유전자들의 목록.

라. QUARANTINE HISTORIES

QUARANTINE HISTORIES 메뉴는 검역 절차 중에서 실험실 동정의 결과를 수집하고 관리할 수 있도록 개발하였다. PCR, ELISA 및 sequencing에 의한 실험실 동정 결과는 가장 정확한 동정 방법이므로, 유전체 및 분자 표지 염기서열을 이용한 동정 예측 결과가 이를 뒷받침 할 수도 있다. 이들 자료는 gel image, ELISA 결과 사진, sequencing 결과로 얻어진 염기서열 등으로 구분되며, 상세한 설명을 덧붙여 검색이 가능하도록 하였다. 세 가지 History 메뉴는 공히 실험자료 저장의 기능이 가장 크며, 인터페이스 또한 동일하므로, PCR History Browser를 예시로 살펴보도록 하겠다. PCR History Browser는 PCR을 통한 실험 결과를 관리하는 곳이다. 그림 2-16과 같이 각 실험은 하나의 실험 결과(history)로 저장되며, 검색 기능을 통해 특정 분자 표지나 병원체를 검색할 수 있도록 개발하였다. 그림 2-17를 보면 실험 결과 사진과 상세한 설명을 조회할 수 있다. 이들 실험 결과가 축적되면 식물검역 과정의 실험실 동정 단계에서 reference로 활용할 수 있으므로, 검역 동정 결과에 더욱 정확성을 기할 수 있을 것이다.

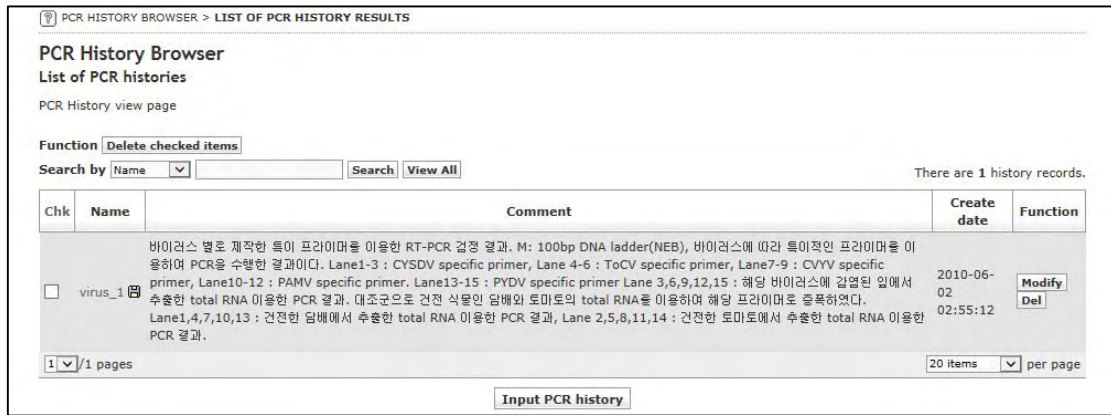


그림 2-16 PCR History Browser 목록 화면의 갈무리

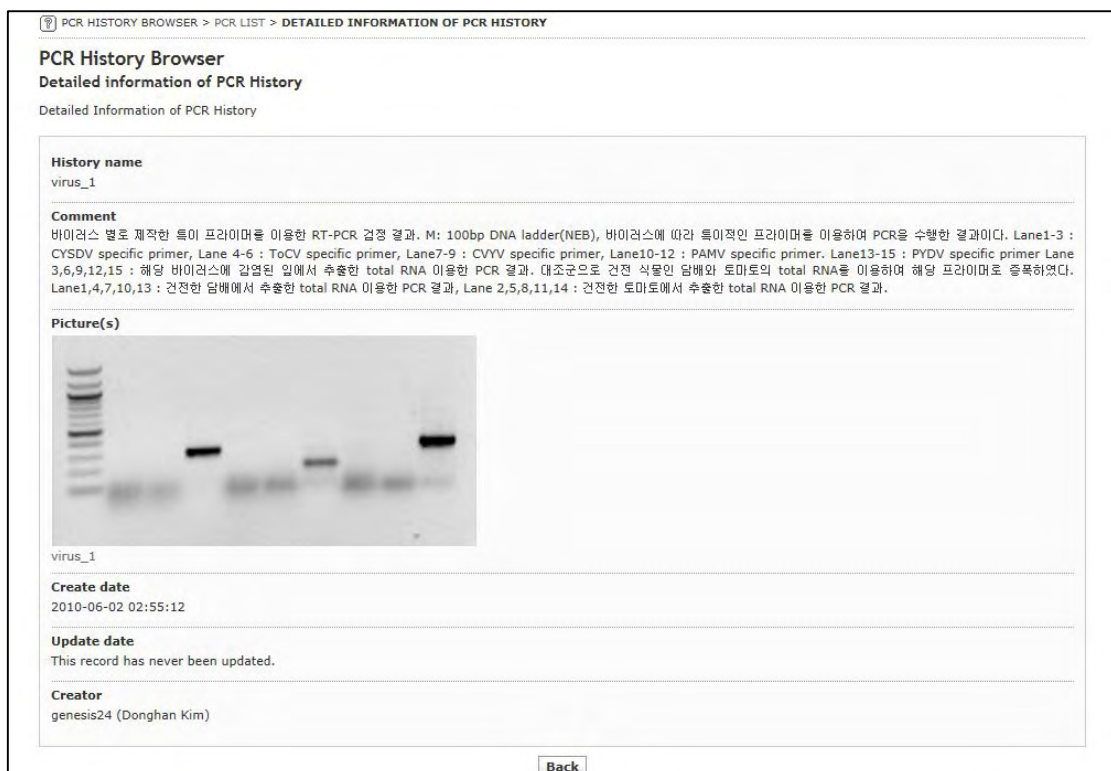


그림 2-17 PCR History Browser 상세보기 화면의 갈무리

마. ANALYSIS TOOLS

(1) Taxonomy Browser

Taxonomy Database의 활용을 극대화하기 위하여, 종 정보를 탐색하는 기능 이외의 유용한 기능들을 추가하였다. 특정 종명을 검색하면, 해당 taxonomy를 자동으로 펼쳐주는 기능을 통해 사용성을 높였으며, 이는 다양한 분석을 신속하게 할 수 있도록 도와줄 것이다. Sequencing 기술의 발전에 따라, 검역종 중에는 이미 진장유전체의 염기서열 및 단백질 서열들이 공개된 경우가 다수 존재한다. 이런 정보를 활용하게 될 필요성을 예측하여, genome 및 proteome 자료를 내려받기 할 수 있도록 기능을 추가하였다. 또한, 사용자가 선택한 taxonomy에 속하는 종에 해당하는 marker sequence가 QIMS에 존재한다면, 이들 염기서열들만 추려낼 수도 있다. (그림 2-18) 이에 덧붙여, 본 시스템은 CFGP의 Favorite과 실시간으

로 연동되는 장점을 활용하여, 사용자가 선택한 종에 대해서 Favorite에 저장할 수 있는 기능도 추가함으로써 CFGP에서 genomic feature 탐색 및 다양한 생물정보학 프로그램을 확장성 있게 사용할 수 있도록 배려하였다.

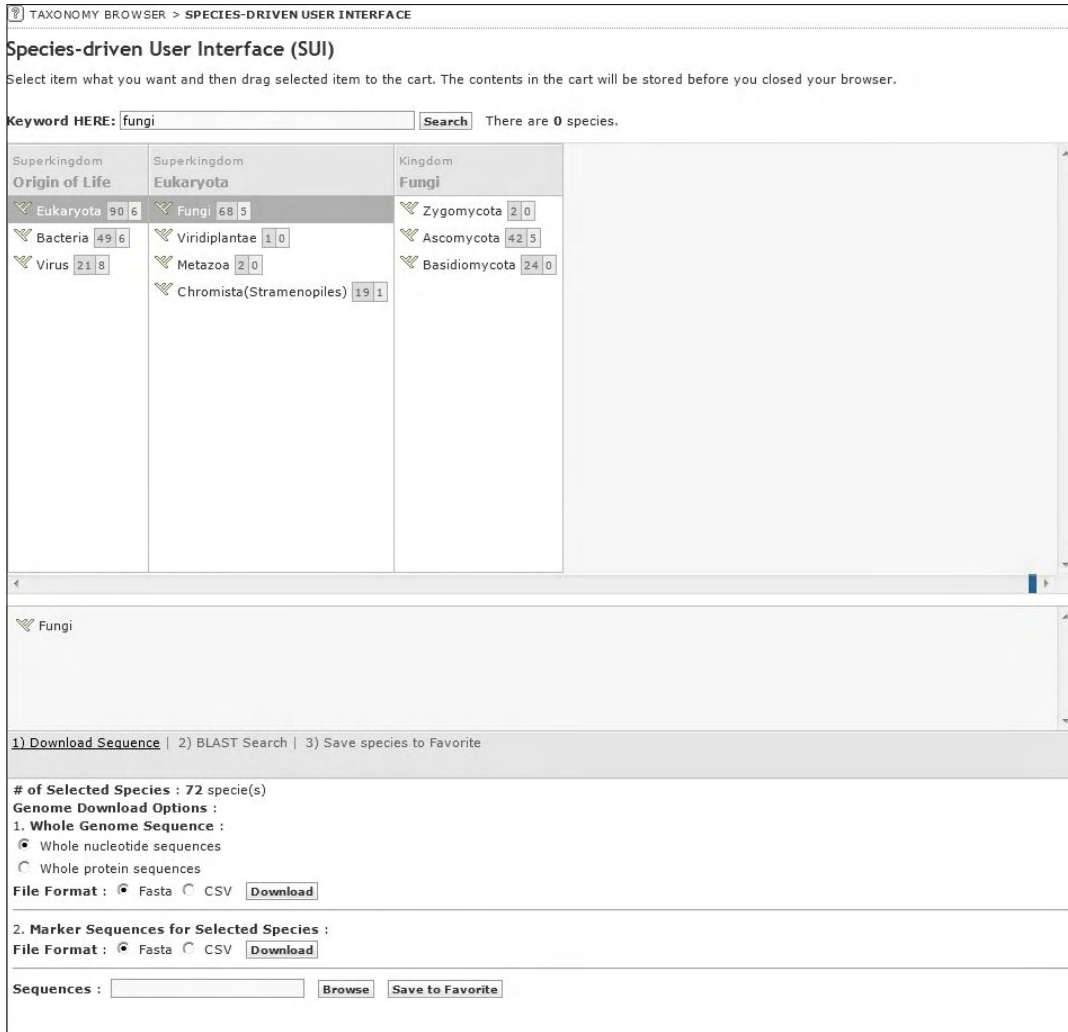


그림 2-18 확장된 기능의 SUI. 사용자가 선택한 taxonomy 이하의 종들을 찾아내어, genome, proteome, marker sequences를 내려받거나, Favorite에 저장하거나 BLAST search를 바로 수행할 수 있다.

(2) BLAST History

BLAST는 염기서열 상동성 조사에 가장 널리 사용되는 프로그램이다. 그림 2-19에서 보는 바와 같이 QIMS 데이터베이스에 저장된 분자 표지 sequences에 대해서 BLAST를 수행할 수 있을 뿐만 아니라, CFGP에 탑재되어 있는 NCBI NR 데이터베이스 및 155종의 곰팡이 및 난균류의 전장유전체에 대해서도 수행할 수 있도록 개발하였다. 따라서, 분자 표지가 부족한 검역종이나 신규 검역종에 대해서도 유전체 정보를 기반으로 한 종 동정에 대한 단서를 제공할 수 있을 것이다.

BLAST Search

Search Name

Choose Search Set

(Combined) 150 fungal and 5 Oomycetes genomes [Lastupdate : 2009-06-29 01:56:37]
 (NCBI) NR 2007.06.04 [Lastupdate : 2007-06-06 11:30:27]
 Whole Nucleotide Sequences [Lastupdate : 2012-01-23 16:36:10]

of Sequences from Favorite
 12 amino acid sequences.

Program Select & Options

Program

Limit Expect Value

Number of matching sequences

Matrix

그림 2-19 BLAST 실행 화면의 갈무리

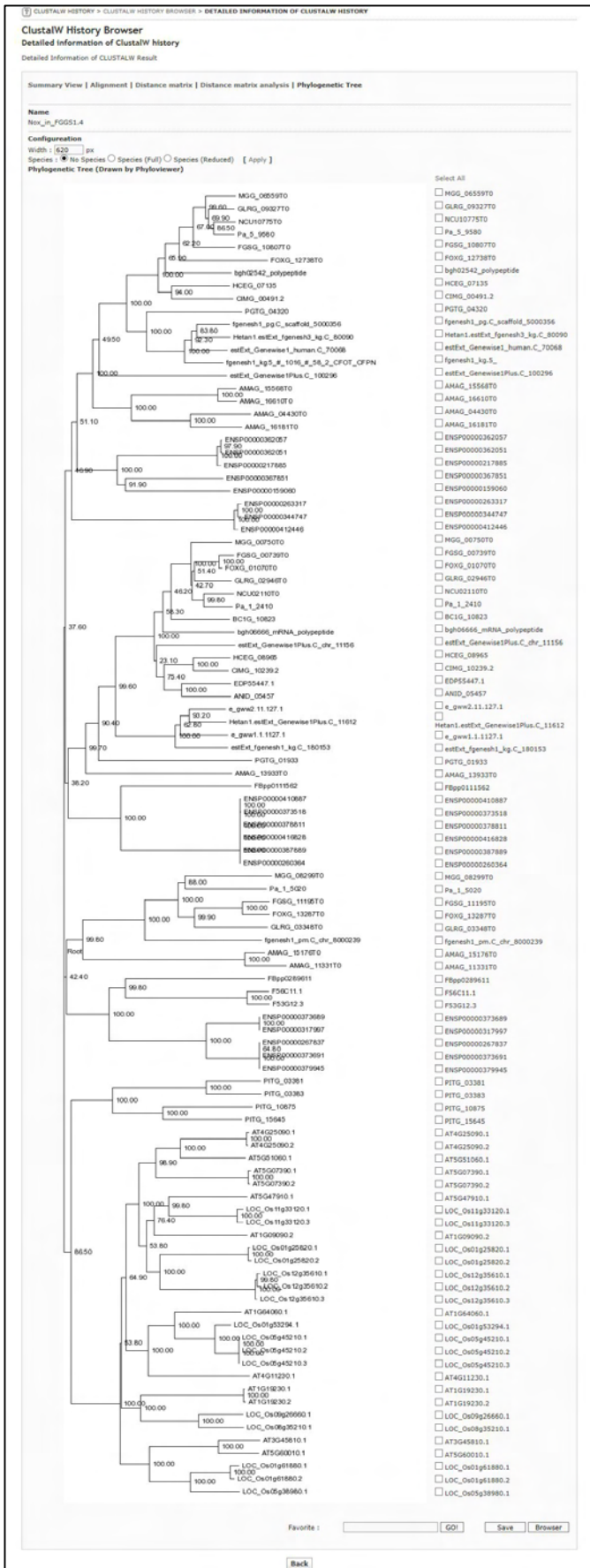


그림 2-20 ClustalW 실행결과로 얻어진 계통분류학적 트리의 갈무리.

(3) ClustalW History

그림 2-20은 ClustalW의 결과로 생성된 계통분류학적 트리이다. QIMS에서의 ClustalW 실행은 QIMS 내부의 염기서열 뿐만 아니라, CFGP에 연동된 다양한 유전체 정보를 함께 활용할 수 있도록 개발되었기 때문에, 다각적인 계통분류학적 분석을 도와줄 수 있다.

(4) Other Phylogenetic Tools

ClustalW 이 외에도 QIMS에는 5가지의 다른 계통분류학적 분석 도구를 사용할 수 있다. 이들은 ClustalW의 다중서열정렬 결과를 입력값으로 하여 수행할 수 있으며, neighbor-joining 이 외의 알고리즘을 활용한 분석도 가능하다. 이는 계통 분류학적으로 좀 더 정확한 정보를 제공하기 위한 것이며, 계통분류학적 위치를 결정하는 데에 다각적인 근거를 제시할 수 있는 토대가 될 수 있다. (그림 2-21)

(5) FAVORITE

이 메뉴를 CFGP에서 생성한 sequence set을 검역정보 관리 시스템에서 활용하기 위한 것이다. 검역종에 대한 정보가 공개된 웹 시스템인 CFGP에서 노출되어서는 안 되기 때문이다. 이들 외래 자료를 검역정보 관리 시스템에서는 활용할 수 있도록 하고, 또한 검역정보 관리 시스템에서 생성한 자료는 CFGP에서 사용 가능하도록 설계함으로써, 자료 분석의 유연성을 확보하고자 하였다.

PROTPARS HISTORY BROWSER > LIST OF PROTPARS HISTORIES > PROTPARS RESULT

PROTPARS History Browser

PROTPARS result

This page presents the detailed information of PROTPARS result.

Name
addd [Modify](#)

of sequences
10

Name
addd

of sequences
10

Phylogenetic tree

Consensus tree

[Download PHB file](#)

Maximum Parsimony Tree(s)

[Download PHB file](#)

GSVIVP00016253001
 LOC_Os12g38780.1
 LOC_Os12g38780.2
 AAEL011712-PA
 LOC_Os03g1180.1
 fgenes2_kg_6_759_AT5G07920.1
 AT5G07920.1
 estExt_fgenes4_pm_C_LG_XII0225
 30138.m004002
 GLEAN_20650

[Select All](#)

Comment

Options
 Search for best tree : Yes
 Randomize input order of sequences :
 Selected outgroup sequence : GSVIVP00016253001
 Input sequences interleaved : Yes
 Terminal type : ANSI

Elapsed time
2.52s

Create date / Update date
2012-09-14 20:22:48 /

Creator
amethyst (Jaeyoung Choi)

그림 2-21 PROTPARS 실행 결과. ClustalW로 생성된 다중서열정렬 결과를 핵산 염기서열 및 단백질 염기서열을 이용하여 다른 유전체에서 예측된 유전자들과 비교분석이 가능하다.

3. 개발결과

검역정보 관리 시스템은 검역종들에 대한 각종 분자 표지 정보와 실험 정보를 저장 및 관리하고, 염기서열 및 유전체 정보를 이용한 종 동정을 위한 체계를 갖추는 것이 가장 큰 목표이다. 개발 결과로 수집된 분자 표지들을 유전체 기반의 BLAST 데이터와 QIMS 내부의 분자 표지 데이터베이스를 이용하여 동정을 실시해 보았다. 그림 2-22은 b-tubulin: SNU-lyco 및 RPB2: 45382 분자 표지 염기서열을 QIMS 내부의 분자 표지 데이터베이스에 BLAST를 수행한 모습이다. 두 개의 분자 표지 모두 QIMS의 Marker Database에 포함되어 있으므로, 100% 상동성으로 발견되는 것을 확인할 수 있다. 그림 2-23은 두 개의 분자 표지 염기서열을 NCBI non-redundant 데이터베이스에 BLAST를 수행한 결과이다. b-tubulin: SNU-lyco는 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*에서 분리된 분자 표지이고, RPB2: 45382는 *Cochliobolus spicifer*에서 분리된 것이다. Best hit들만 추려서 살펴보면, 각각 *Fusarium fujikuroi*와 *Cochliobolus heterostrophus*에서 가장 상동성이 높은 염기서열이 발견됨을 확인할 수 있었다. 이들은 속(genus) 수준의 정확성으로 종을 동정하는 데에 성공하였다. 각각 97.73% 와 90.61%의 염기서열 상동성을 나타낸 이

결과는 종 동정에 있어서 유전체 정보를 활용해야 할 필요를 잘 보여주고 있다. 만약 분석 대상이 된 염기서열들이 알려지지 않은 종에서 분리된 것이거나 기존에 알려진 분자 표지와 100% 일치하지 않는다면, 유전체 정보를 활용한 결과가 좋은 단서 및 근거로 그 역할을 할 수 있을 것으로 기대할 수 있다. 다수의 검역종들은 그 유전체 정보가 밝혀지지 않았으므로 알려진 근연종에서 분석 대상 시료의 염기서열과 매우 높은 상동성을 보인다면, 동정에 도움을 줄 수 있기 때문이다.

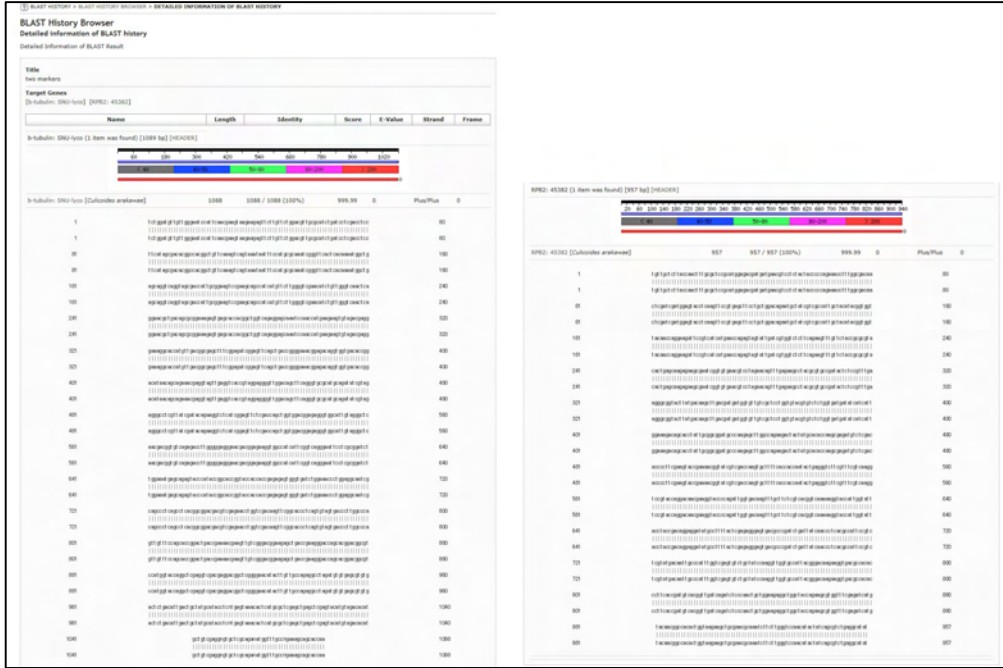


그림 2-22 b-tubulin: SNU-lyco 및 RPM2: 45382 분자 표지를 QIMS내부의 Marker Database에 BLAST를 수행한 결과.



그림 2-23 b-tubulin: SNU-lyco 및 RPM2: 45382 분자 표지를 NCBI non-redundant 데이터베이스에 BLAST를 수행한 결과.

제 3 절 곡류, 채소, 화훼류 작물 검역대상 주요 곰팡이의 진단기술 개발

1. 검역대상 곰팡이의 수집 및 보관

가. 연구 대상 곰팡이의 수집 전략

곡류, 채소, 화훼류에 주로 발생하는 곰팡이병원체 중 농림수산물검역검사본부 (국립식물검역원)와 협의하여 선정된 *Fusarium* 속과 *Bipolaris/Drechslera/Cochliobolus* 속 곰팡이 중 검역종과 근연종을 총 연구기간 동안 국내외 곰팡이 culture collection 기관 [네덜란드의 CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures), 미국의 FRC (Fusarium Research Center), 한국의 Korean Agricultural Culture Collection (KACC) 등] 으로부터 수입 또는 분양받아 수집·보관하였다. 곰팡이 수집 즉시 감자한천 agar (PDA) 배지 위에 접종하여 균사체를 확보한 후 20% glycerol 용액으로 만든 stock culture 를 -70℃에 보관하였다. 또한 액체배양을 통해 다량의 균사체를 확보한 후 동결건조 후 냉동 (-20℃) 보관 하였다. 검역곰팡이의 안전한 보관과 외부 유출 방지를 위하여 농림수산물검역검사본부의 규정에 따라 실험실 내 균주 안전관리 내부지침을 마련하여 운영하였다. 수입 기간이 종료된 곰팡이는 농림수산물검역검사본부 직원의 입회하에 멸균 후 폐기하였다.

나. 수집 곰팡이의 균학적 특성 분석 및 계놈 DNA 확보

수집 곰팡이를 감자한천배지, 카네이션 배지 등에 접종하여 각 곰팡이의 성장속도, 균총 형태, 색소생성 여부, 공중균사와 무성포자의 형태 등 기본적인 균학적 특성을 수집하고 분류군별로 특성을 비교·분석하였다. 수집 곰팡이의 액체배양을 통해 확보한 균사체로부터 계놈 DNA를 추출하여 냉동 (-20℃) 보관 하였다.

2. 수집 곰팡이의 계통분류학적 분석

수집 곰팡이의 종동정을 명확히 검정하기 위하여 DNA 염기서열 비교분석을 통한 계통수 (phylogenetic tree) 작성을 수행하였다. 이를 위해 곰팡이의 계놈 DNA 로부터 Table 3-1 에 명시된 PCR 프라이머 조합을 이용하여 *TEF1* (translation elongation factor 1-alpha), *RPB2* (RNA polymerase II subunit), *TUB1* (beta-tubulin), *calM* (calmodulin), *GPD* (Glyceraldehyde 6-phosphate dehydrogenase), mating-type (*MAT*) 등의 유전자를 증폭하였다. 증폭 DNA 절편을 pGEMT 벡터에 삽입한 후 형질전환을 통해 대장균 세포에 도입하여 영구 보관하였다. 증폭 유전자의 염기서열을 결정한 후 분류군 별 해당 유전자의 염기서열을 Clustral W 방법에 의해 정렬하였다. 염기서열 정렬을 바탕으로 MEGA 4.01 프로그램 내 UPGMA, NJ (Neighbor Joining), MP (Maximum Parsimony) 방법을 이용하여 계통수를 작성하였다. 계통수내 통계적으로 유의한 BS (Bootstrap) 수치에 따라 명확히 구별된 독립적인 subclade의 존재 여부에 따라 수집 균주의 종동정을 계통발생학적 수준에서 검정하였다.

Table 3-1. Primers used in this study to amplify DNA fragments from *TEF1*, *TUB1*, *calM*, and *MAT* genes

Primer name	Nucleotide sequence (5' to 3')	Amplified genes (references)
EF-1	ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC	<i>TEF1</i> (O'Donnell et al., 1998)
EF-2	GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT	
tubT1	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	<i>TUB1</i> (O'Donnell and Cigelnik 1997)
tubT22	TCTGGATGTTGTTGGGAATCC	
fRPB2-7cR	CCCATRGCTTGYTTRCCCAT	RPB2 (Liu 1999)
fRPB2-11aR	GCRTGGATCTTRTCRTCSACC	
CLOX1	CAGCAAAGCATCAGACCACTATAACTC	<i>calM</i> (Mulè et al., 2004)
CLOX2	CTTGTCAGTAACTGGACGTTGGTACT	
MAT1-1F	GTCAAGGTGAATTGCCACGATG	<i>MAT</i> locus (this study)
MAT1-1R	CTTCAACTCTACAACCTCCACCATTAT	
DNAlyase_UP	TTTTACAGGCGCCAACGACAC	<i>MAT</i> locus (this study)
MAT1-3_UP	CTCTCATGGGGCCGAAGTTTA	
DNAlyaseF	TTCAACACCAAATCCCACATCTC	
DNAlyaseR	ATCAGCTGCCGCTGTAAAACGT	

3. 주요 곰팡이 종의 특이 PCR 증폭을 위한 프라이머의 제작 및 특이성 검증

매년 식물검역현장에서 발견되는 곰팡이 병원체 중 90-95% 은 비검역대상 곰팡이다. 하지만 이들 중 상당수는 검역종과 같은 분류군 소속이거나 근연종으로서 형태적 검정만으로는 구분이 어려울 경우가 많다. 따라서 검역종 뿐 아니라 비검역 근연종 곰팡이의 특이 검출이 필수적이다. 이를 위해 수집 곰팡이의 계통발생학 분석을 위해 증폭된 여러 분자표지 유전자의 염기서열을 여러 분류군 별로 종합적이고, 광범위하게 정렬하여 종간 변이 부위를 선정한 다음 그러한 부위로부터 검역종과 근연종의 종특이 프라이머 조합을 제작하였다. 한편 계통발생학 분석에 사용된 유전자의 염기서열로부터 종특이 프라이머를 선별하기 어려울 경우, NCBI 데이터베이스에 이미 등재된 특정 종의 다른 유전자 또는 해독 유전체 서열 (본 과제책임자의 연구결과 포함) 의 일부를 사용하였다. 종특이 후보 프라이머 조합의 특이성은 대상 곰팡이와 다수의 근연종 곰팡이의 게놈 DNA, 식물시료 게놈 DNA 를 template 로 이용한 PCR 증폭으로 검증하였다.

4. 국내유통 수입식품 내 오염 곰팡이의 계통발생학적 종 동정

본 과제에서 제작한 특이 프라이머 조합의 유용성을 검증하기 위하여 2년에 걸쳐 시중에 유통되는 수입식품 (주로 과일류)로부터 *Fusarium* 과 그 밖의 주요 곰팡이의 오염 실태를 조사하고, 계통발생학적 방법으로 종 동정을 수행 하였다.

5. PCR 증폭을 통한 *Fusarium* 곰팡이의 검출 및 동정 체계 구축

본 과제를 통해 제작한 각종 PCR 증폭용 특이 프라이머를 이용하여 식물검역현장에서 사용 가능한 프로토콜을 제작하였다. 여기에는 식물시료로부터 배양된 곰팡이의 게놈 DNA 또

는 식물시료 게놈 DNA의 추출, PCR 증폭 조건, 주요 *Fusarium* 검역종과 근연종의 PCR 검출 체계도 등이 포함되어 있다.

6. 연구자료의 데이터베이스 구축

수집 균주의 종류, 균학적 특성, 증폭 유전자의 염기서열 등 연구 자료를 세부 2 과제의 검역정보통합관리시스템에 저장·관리 하였다.

7. 검역대상 곰팡이의 발생 현황 모니터링 및 분류학적 검토

온라인 검색과 문헌 조사 등을 통해 주요 검역곰팡이의 분류학적 연구와 해외 식물병 발생·피해 현황을 매년 조사하였다. 또한 다른 세부과제책임자, 농림수산검역검사본부와 함께 연구결과 협의를 하고 검역현장에서 검출기술의 활용방안 등을 논의하였으며, 검역현장에서 검출되는 곰팡이의 종동정 관련 자문을 실시하였다.

2. 연구결과

가. 연구대상 균주의 수집

총 4 년의 연구기간 동안 *Fusarium* 속 곰팡이는 아종, 변종 등을 포함하여 총 62종 194 주 (검역종 7종, 43 주 포함), *Bipolaris/Drechslera/Cochliobolus* 속 곰팡이는 총 29 종 68 주 (검역종 9 종 25 주 포함) 를 국내외 기관으로부터 수입 또는 분양받아 수집하였다. 수집균주의 증명, 분리 기주 등에 관한 자세한 정보는 Table 3-2 - Table 3-5 (검역종은 진하게 표시) 에 명시하였다.

Table 3-2. Quarantine species belonging to the genus of *Fusarium* examined in this study

anamorph (무성세대)	teleomorph (유성세대)	disease	host
<i>Fusarium culmorum</i>	unknown	foot and root rot, head blight	밀, 보리 등 곡류 종자
<i>F. semitectum</i> var. <i>majus</i>	unknown	Fusarium rot	기장, 멜론
<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>radicis-lycopersici</i>	unknown	Fusarium crown and root rot	토마토, 참두, 강낭콩, 칼로베,
<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i>	unknown	Panama disease, wilt	마나나
<i>F. redolens</i> (syn. <i>F. oxysporum</i> var. <i>redolens</i>)	unknown	wilt, dampig-off, cortical rot	아스파라거스, 오이, 당근, 아만, 토마토, 참두, 완두콩, 물엿
<i>F. solani</i> f.sp. <i>cucurbitae</i>	unknown	Fusarium crown and foot rot	박과류
<i>F. stilboides</i>	<i>Gibberella stilboides</i>	bark disease, collar rot	커피종자

Table 3-3. The collected fungal species belonging to the genus *Fusarium*

Strain	Species	Origin	T	R	Bt	C
Section: <i>Fusarium</i>						
Z3639	<i>F. graminearum</i>	wheat	+	+	+	+
Z3643	<i>F. graminearum</i>	wheat	+	+	+	+
F16	<i>F. asiaticum</i>	barley, NRRL 13818	+	+	+	+
F20	<i>F. boothii</i>	corn, NRRL 26916	+	+	+	+

F24	<i>F. mesoamericanum</i>	banana, NRRL 25797	+	+	+	+
F30	<i>F. brasiliicum</i>	NRRL 31281	+	+	+	+
F34	<i>F. meridionale</i>	orange twig, NRRL28723	+	+	+	+
F37	<i>F. lunulosporum</i>	citrus, NRRL 13393	+	+	+	+
H48661	<i>F. pseudograminearum</i>	-	+	+	+	
44846	<i>F. pseudograminearum</i>	CBS 109956 (Austria)				
42162	F. culmorum (authentic)	NRRL 25475 (Denmark)	+	+		
42161, F39	F. culmorum (authentic)	NRRL 3288 (Colombia)	+	+	+	+
41312	F. culmorum (authentic)	CBS 579.97 (Denmark)	+	+		
45282	F. culmorum (authentic)	CBS 123685	+	+		
45285	F. culmorum (authentic)	CBS 119870	+			
42099	<i>F. culmorum</i>	CNU 040567-A (Korea)	+	+		
43800	<i>F. culmorum</i>	KUC 5013 (Korea)	+			
41317	<i>F. sambucinum</i> var. <i>sambucinum</i>	CBS 136.73 (Austria)	+	+		
42160	<i>F. cerealis</i> (syn. <i>F. crookwellense</i>)	NRRL25805(Colombia)	+	+		
42159	<i>F. cerealis</i>	NRRL 25491 (Netherlands)	+	+		
Section: Roseum						
44820	<i>F. avenaceum</i>	CBS 407.86 (Denmark)	+	+		
45280	<i>F. avenaceum</i>		+	+		
45281	<i>F. avenaceum</i>		+	+		
101139	<i>F. heterosporum</i>	CBS 101139 (Turkey)				
782.83	<i>F. heterosporum</i>	CBS 782.83 (Australia)				
Section: Arthrosporiella						
K41036	<i>F. semitectum</i> (syn. <i>F. incarnatum</i>)	<i>Carthamus tinctorius</i> (홍화)	+	+	+	
GS2-2	<i>F. semitectum</i>	friut melon	+	+	+	
GS2-18	<i>F. semitectum</i>	friut melon	+	+	+	
41036	<i>F. semitectum</i>	NPQS, Korea	+	+		
C145.44	<i>F. semitectum</i> var. <i>majus</i> (authentic)	-	+	+	+	+
C161.25	<i>F. semitectum</i> var. <i>majus</i> (authentic)	-	+	+	+	+
C163.57	<i>F. semitectum</i> var. <i>majuss</i>	-	+	+	+	+
C544.96	<i>F. camptoceras</i>	CBS 544.96 (Cuba)				
C193.65	<i>F. camptoceras</i>	CBS 193.65 (Costa Rica)				
C119877	<i>F. nelsonii</i>	CBS119877 (unknown)				
C119876	<i>F. nelsonii</i>	CBS 119876 (South Africa)				
Section: Elegans						
K40031	<i>F. oxysporum</i> f.sp.<i>radicis-lycopersici</i> race3	-	+	+	+	+
O1090	<i>F. oxysporum</i> f.sp.<i>radicis-lycopersici</i>	tomato MR13	+	+	+	+
O1092	<i>F. oxysporum</i> f.sp.<i>radicis-lycopersici</i>	tomato Ontario Pink	+	+	+	+
O1097	<i>F. oxysporum</i> f.sp.<i>radicis-lycopersici</i>	tomato	+	+	+	+
O1101	<i>F. oxysporum</i> f.sp.<i>radicis-lycopersici</i>	tomato	+	+	+	+
O1102	<i>F. oxysporum</i> f.sp.<i>radicis-lycopersici</i>	tomato	+	+	+	+
O1973	<i>F. oxysporum</i> f.sp.<i>radicis-lycopersici</i>	<i>Solanum esculentum</i>	+	+	+	+
O2022	<i>F. oxysporum</i> f.sp.<i>radicis-lycopersici</i>	-	+	+	+	+
O2023	<i>F. oxysporum</i> f.sp.<i>radicis-lycopersici</i>	-	+	+	+	+
K40032	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> race 3	-	+	+	+	+
K40037	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> race 2	-	+	+	+	+
K40038	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> race 2	-	+	+	+	+
K40046	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> race 1	-	+	+	+	+
K40047	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> race 1	-	+	+	+	+
SNU-lyco	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	-	+	+	+	+

O0225	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i>	banana				
O1223	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> race 1			+	+	
O1564	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> race 1	banana	+	+	+	+
O1565	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> race 1	banana	+	+	+	+
O1566	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> race 1	banana	+	+	+	+
O1567	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> race 2	banana	+	+	+	+
O1568	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> race 4	banana	+	+	+	+
O1955	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i>	banana				
O1968	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i>	banana				
42271	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>asparagi</i>	KCTC 16315				
42273	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>chrythamemi</i>	KCTC 16323				
42274	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i>	KCTC16314				
42276	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>conglutinans</i>	KCTC16316				
42275	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>glycines</i>	KCTC 16334				
42795	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lactucae</i>	Kim JY (GF2006112902)				
42272	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>cassiae</i>	KCTC 16317				
42169	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>fragariae</i>	NRRL 26438				
42172	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>pisi</i>	NRRL 29869				
42173	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>sesami</i>	NRRL 26385				
K40052	<i>F. oxysporum</i>	<i>Gladiolus gandavensis</i>	+	+	+	+
K40053	<i>F. oxysporum</i>	<i>Cucumis sativus</i>	+	+	+	+
K41081	<i>F. oxysporum</i>	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>japonica</i>	+	+	+	+
K41083	<i>F. oxysporum</i>	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>japonica</i>	+	+	+	+
K41087	<i>F. oxysporum</i>	<i>Cymbidium ensifolium</i>	+	+	+	+
K41088	<i>F. oxysporum</i>	<i>Phalaenopsis</i> sp.	+	+	+	+
K41090	<i>F. oxysporum</i>	<i>Cymbidium goeringii</i> (춘란)	+	+	+	+
K40236	<i>F. oxysporum</i>	<i>Dianthus caryophyllus</i> (카네이션)	+	+	+	
K44305	<i>F. oxysporum</i>	<i>Aralia elata</i> (두릅)	+	+	+	+
O1140	<i>F. oxysporum redolens</i>	wheat crown	+	+	+	+
O1265	<i>F. oxysporum redolens</i> (authentic)	cucumber	+	+	+	
O1266	<i>F. oxysporum redolens</i> (authentic)	cucumber	+	+	+	+
O1320	<i>F. oxysporum redolens</i>	soil	+	+	+	+
O1380	<i>F. oxysporum redolens</i>	soil	+	+	+	+
O1523	<i>F. oxysporum redolens</i>	nut	+	+	+	+
O1792	<i>F. oxysporum redolens</i>	-	+	+	+	+
O1793	<i>F. oxysporum redolens</i>	-	+	+	+	+
O1891	<i>F. oxysporum redolens</i> (authentic)	soil	+	+	+	+
O1893	<i>F. oxysporum redolens</i> (authentic)	soil	+	+	+	+
O1926	<i>F. oxysporum redolens</i>	soybean cyst nematode roots	+	+	+	+
Sections: <i>Martiella</i> & <i>Ventricosum</i>						
S0201	<i>F. solani</i> f.sp. <i>cucurbitae</i> race 2	-		+	+	+
S0202	<i>F. solani</i> f.sp. <i>cucurbitae</i> race 2	-		+	+	+
S0203	<i>F. solani</i> f.sp. <i>cucurbitae</i> race 2	-		+	+	+
S0687	<i>F. solani</i> f.sp. <i>cucurbitae</i> race 1	-		+	+	+
S0688	<i>F. solani</i> f.sp. <i>cucurbitae</i> race 1	-		+	+	+
S0696	<i>F. solani</i> f.sp. <i>cucurbitae</i> race 1	-		+	+	+
42180	<i>F. solani</i> f.sp. <i>cucurbitae</i>	NRRL 22142 (USA)				
42176	<i>F. solani</i> f.sp. <i>cucurbitae</i>	NRRL 22153				

42177	<i>F. solani</i> f.sp. <i>batas</i>	NRRL 22400 (USA)				
42178	<i>F. solani</i> f.sp. <i>mori</i>	NRRL 22230 (Japan)				
42181	<i>F. solani</i> f.sp. <i>pisi</i>	NRRL 22278				
42182	<i>F. solani</i> f.sp. <i>robiniae</i>	NRRL 22162 (Japan)				
43387	<i>F. solani</i>	KUC3081 (Korea)				
K40384	<i>F. solani</i>	-	+	+	+	
K41092	<i>F. solani</i>	<i>Phalaenopsis</i> sp. (호접란)	+	+	+	+
K41093	<i>F. solani</i>	<i>Cymbidium ensifolium</i>	+	+	+	
45118	<i>F. solani</i>					
45299	<i>F. solani</i>					
45300	<i>F. solani</i>					
45301	<i>F. solani</i>					
Section: Liseola						
M21	<i>F. verticillioides</i> (A+)	-	+	+	+	
M23	<i>F. verticillioides</i> (A-)	-	+	+	+	+
45825	<i>F. verticillioides</i>	Korea				
45826	<i>F. verticillioides</i>	Korea				
42852	<i>F. verticillioides</i>	KCTC 6065				
42699	<i>F. verticillioides</i>	NRRL 20956				
42698	<i>F. verticillioides</i>	NRRL 22001 (China)				
41321	<i>F. verticillioides</i>	CBS 576.78				
44025	<i>F. proliferatum</i>	FMCO2 (Korea)				
44024	<i>F. proliferatum</i>	FMCO1 (Korea)				
42694	<i>F. proliferatum</i>	NRRL 25306				
42693	<i>F. proliferatum</i>	NRRL 25175				
42692	<i>F. proliferatum</i>	NRRL 22003 (China)				
45822	<i>F. proliferatum</i>	Korea				
45823	<i>F. proliferatum</i>	Korea				
45824	<i>F. proliferatum</i>	Korea				
JA10	<i>F. fujikuroi</i>	-	+	+	+	+
NS8	<i>F. fujikuroi</i>	-	+	+	+	+
44021	<i>F. fujikuroi</i>	FMJC5 (Korea)				
44019	<i>F. fujikuroi</i>	FMBG1 (Korea)				
44017	<i>F. fujikuroi</i>	FMCOD2 (Korea)				
44015	<i>F. fujikuroi</i>	FMJC4 (Korea)				
44010	<i>F. fujikuroi</i>	FMJCD6 (Korea)				
44009	<i>F. fujikuroi</i>	FMJCD7 (Korea)				
44004	<i>F. fujikuroi</i>	FMJCD5 (Korea)				
42687	<i>F. fujikuroi</i>	NRRL 22013				
42686	<i>F. fujikuroi</i>	NRRL 22012				
45819	<i>F. fujikuroi</i>	Korea				
45820	<i>F. fujikuroi</i>	Korea				
45821	<i>F. fujikuroi</i>	Korea				
42702	<i>F. globosum</i>	NRRL 26131	+	+		
42701	<i>F. globosum</i>	NRRL 25190	+	+		
42696	<i>F. subglutinans</i>	NRRL 13588				
44946	<i>F. circinatum</i> (<i>F. subglutinans</i> f.sp. <i>pini</i>)	CBS 405.97 (USA)	+	+		
44570	<i>F. circinatum</i>	MAFF 239493 (USA)	+	+		
44569	<i>F. circinatum</i>	MAFF 239421 (Japan)	+	+		
42695	<i>F. sacchari</i>	NRRL 22006				
42689	<i>F. nygamai</i>	NRRL 13448 (Austria)	+	+		
42688	<i>F. nygamai</i>	NRRL 25449 (Morocco)	+	+		
44819	<i>F. acutatum</i>	CBS 402.97 (India)				

Section: <i>Gibbosum</i>					
44803	<i>F. acuminatum</i>	CBS 334.75 (Turkey)	+	+	
45278	<i>F. acuminatum</i>		+	+	
45287	<i>F. equiseti</i>		+	+	
45288	<i>F. equiseti</i>		+	+	
45289	<i>F. equiseti</i>		+	+	
45290	<i>F. equiseti</i>		+	+	
45291	<i>F. equiseti</i>		+	+	
C119878	<i>F. compactum</i>	CBS 119878 (South Africa)			
C466.92	<i>F. compactum</i>	CBS 466.92 (Sudan)			
Section: <i>Sporotrichiella</i>					
H11568	<i>F. chlamydosporum</i>	-	+	+	+
45537	<i>F. poae</i>	CBS 119846	+	+	
45538	<i>F. poae</i>	CBS 120998	+	+	
45539	<i>F. poae</i>	CBS 446.67	+	+	
H11553	<i>F. sporotrichioides</i>		+	+	+
C249.61	<i>F. sporotrichioides</i> var. <i>minus</i>	CBS 249.61 (USSR)			
C180.32	<i>F. sporotrichioides</i> var. <i>sporotrichioides</i>	CBS 180.32 (Japan)			
C411.86	<i>F. tricinctum</i>	CBS 411.86 (Denmark)			
C253.50	<i>F. tricinctum</i>	CBS 253.50 (Finland)			
C615.87	<i>F. chlamydosporum</i> var. <i>chlamydosporum</i>	CBS 615.87 (Cuba)			
C698.74	<i>F. chlamydosporum</i> var. <i>chlamydosporum</i>	CBS 698,74 (France)			
Section: <i>Lateritium</i>					
41034	<i>F. lateritium</i>	NPQS, Korea	+	+	
C319.73	<i>F. stilboides</i> (authentic)	-	+	+	+
C746.79	<i>F. stilboides</i> (authentic)	-	+	+	+
C101890	<i>F. stilboides</i> (authentic)	-	+	+	+
C101891	<i>F. stilboides</i> (authentic)	-	+	+	+
C101892	<i>F. stilboides</i> (authentic)	-	+	+	+
C115624	<i>F. stilboides</i> (authentic)	-	+	+	+

T: *TEF1*, R:*RPB2*, Bt: *TUB1*, C: *caM*

+: nucleotide sequence available.

authentic: confirmed by a phylogenetic analysis.

나. 수집 곰팡이의 균학적 특성 수집 및 분석

수집 곰팡이를 감자한천배지와 카네이션 배지 위에 접종하여 각 곰팡이의 성장속도 (Fig. 3-1), 균총 형태, 색소생성 여부, 공중균사와 무성포자의 형태 (Figs. 3-2 to 3-4) 등 기본적인 균학적 특성을 수집하고 분류군별로 특성을 비교·분석하였다.

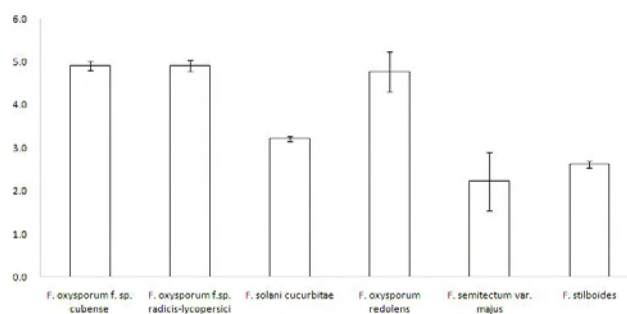


Fig. 3-1. 수집 *Fusarium* 종의 균사성장 속도

Table 3-4. Quarantine species belonging to the genera of *Bipolaris*, *Drechslera*, and *Cochliobolus* examined in this study

anamorph (무성세대)	teleomorph (유성세대)	disease	host
<i>Bipolaris cynodontis</i>	<i>Cochliobolus cynodontis</i>	leaf blotch	목초종자
<i>B. sacchari</i>	unknown	eye spot	사탕수수
<i>B. australiensis</i>	<i>C. australiensis</i>	leaf blight	벼, 잔디, 기타식물
<i>B. zeicola</i>	<i>C. carbonum</i>	leaf spot	곡류종자
<i>B. hawaiiensis</i>	<i>C. hawaiiensis</i>	leaf spot	비둘기콩, 코코넛, 망고, 감자, 옥수수
<i>B. spicifera</i>	<i>C. spiciferus</i>	bipolaris disease	고추, 목화, 보리 등
<i>B. victoriae</i>	<i>C. victoriae</i>	vitoria leaf blight	곡류종자
<i>Drechslera gigantea</i>	unknown	zonate eye spot	목초종자
<i>D. iridis</i> , or <i>B. iridis</i>	unknown	ink disease	곡류종자

Table 3-5. Fungal species of *Bipolaris*, *Drechslera*, and *Cochliobolus* collected in this study

KACC no.	CBS no.	species	<i>TEF1</i>	<i>RPB2</i>	<i>GPD</i>
K40852		<i>Bipolaris coicis</i>	+	+	
K40915		<i>Bipolaris coicis</i>	+		
K40916		<i>Bipolaris coicis</i>	+	+	
K40917		<i>Bipolaris coicis</i>	+	+	+
K40918		<i>Bipolaris coicis</i>	+	+	
K40919		<i>Bipolaris coicis</i>	+	+	+
K41024		<i>Curvularia lunata</i>	+	+	+
K41020		<i>Curvularia lunata</i>	+	+	+
K40861		<i>Curvularia lunata</i>	+		+
K40392		<i>Curvularia lunata</i>	+	+	+
K41019		<i>Bipolaris sorokiniana</i>	+		
K40920		<i>Bipolaris sorokiniana</i>	+	+	+
K40921		<i>Bipolaris sorokiniana</i>	+		+
K44841		<i>Bipolaris sorokiniana</i>	+	+	+
K41025		<i>Bipolaris oryzae</i>	+	+	+
K41026		<i>Bipolaris oryzae</i>	+	+	+
K40853		<i>Bipolaris oryzae</i>	+	+	+
K44840		<i>Bipolaris cynodontis</i>	+	+	+
45190	402.84	<i>Bipolaris bicolor</i>	+	+	+
45239	690.96	<i>Bipolaris bicolor</i>		+	
45240	275.91	<i>Bipolaris luttrellii</i>			+
45241	136.29	<i>Bipolaris maydis</i>		+	+
45242	574.73	<i>Bipolaris maydis</i>	+	+	+
		<i>Bopolaris maydis</i> (C4 strain from Cornell Univ.)		+	
45192	308.67	<i>Bipolaris papendorffii</i>	+		+
45194	155.26	<i>Bipolaris sacchari</i>			+
45244	197.33	<i>Bipolaris sacchari</i>			+
45245	325.64	<i>Bipolaris sacchari</i>	+		+
45195	736.84	<i>Bipolaris sacchari</i>			+
45196	249.49	<i>Bipolaris sorghicola</i>	+		+
45246	326.64	<i>Bipolaris sorghicola</i>			+
45197	776.84	<i>Bipolaris sorghicola</i>		+	+

45198	240.77	<i>Bipolaris urochloae</i>	+		+
K43385		<i>Cochliobolus australiensis</i>	+		+
45206	172.57	<i>Cochliobolus australiensis</i>	+	+	+
45207	705.71	<i>Cochliobolus australiensis</i>		+	+
45471	237.77	<i>Cochliobolus carbonum</i>	+		+
45473	316.64	<i>Cochliobolus carbonum</i>		+	+
45367	103.97	<i>Cochliobolus hawaiiensis</i>	+	+	+
45369	183.75	<i>Cochliobolus hawaiiensis</i>		+	+
45370	297.94	<i>Cochliobolus hawaiiensis</i>		+	+
45371	448.72	<i>Cochliobolus hawaiiensis</i>			+
45373	243.77B	<i>Cochliobolus hawaiiensis</i>	+	+	+
45334	156.6	<i>Cochliobolus homomorphus</i>	+	+	
45374	110.14	<i>Cochliobolus sativus</i>	+	+	+
45335	122920	<i>Cochliobolus sativus</i>			+
45377	197.31	<i>Cochliobolus spiciferus</i>		+	+
45379	211.34	<i>Cochliobolus spiciferus</i>	+	+	
45336	246.62	<i>Cochliobolus spiciferus</i>			
45383	364.7	<i>Cochliobolus spiciferus</i>	+	+	+
45381	371.72	<i>Cochliobolus spiciferus</i>	+	+	+
45382	418.67	<i>Cochliobolus spiciferus</i>	+	+	+
45384	174.57	<i>Cochliobolus victoriae</i>		+	+
45385	287.51	<i>Cochliobolus victoriae</i>		+	
45248	186.5	<i>Curvularia brachyspora</i>		+	+
45247	553.89	<i>Curvularia brachyspora</i>	+	+	+
45250	169.53	<i>Curvularia pallescens</i>			+
45251	194.62	<i>Curvularia pallescens</i>			+
45252	338.64	<i>Curvularia pallescens</i>			+
45255	246.77	<i>Drechslera chloridis</i>	+	+	+
45256	193.62	<i>Drechslera ellisii</i>	+		+
45258	163.91	<i>Drechslera gigantea</i>		+	
45259	226.66	<i>Drechslera iridis</i>	+	+	
45260	503.73	<i>Drechslera iridis</i>		+	+
45262	157.6	<i>Drechslera kusanoi</i>			
45263	160.58	<i>Drechslera nodulosa</i>			+
45235	109843	<i>Pleospora sedicola</i>		+	+
45236	109844	<i>Pleospora tomatonis</i>	+	+	+

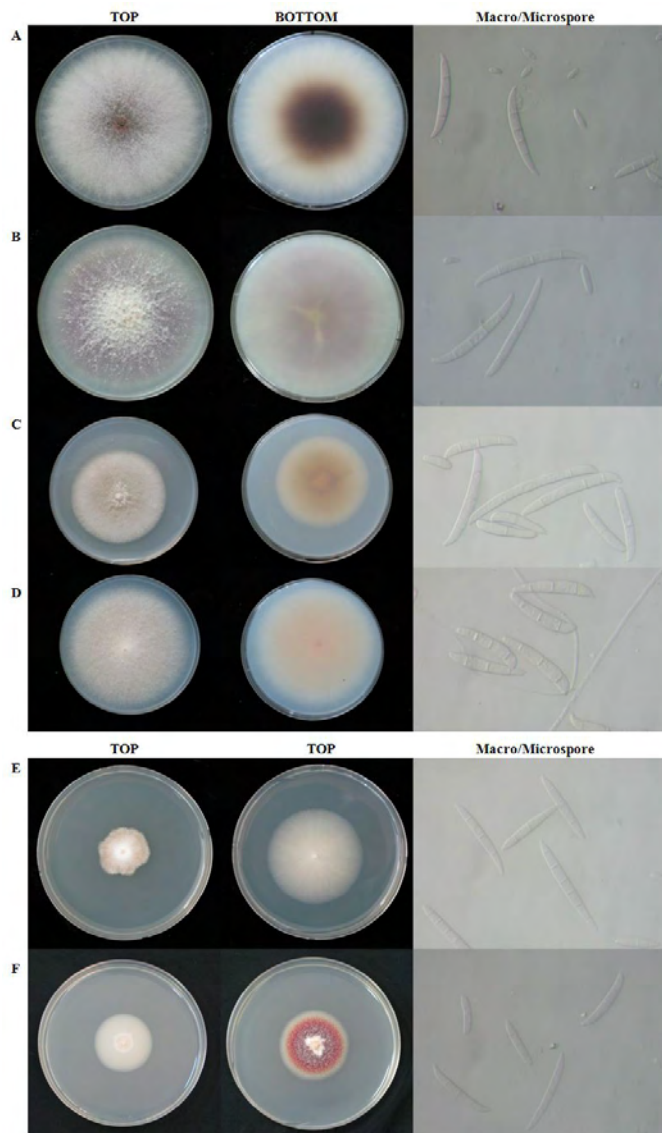


Fig. 3-2. Morphology of mycelial colony and asexual spores of the quarantine *Fusarium* species. (A) *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, (B) *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, (C) *F. oxysporum redolens*, (D) *F. solani cucurbitae*, (E) *F. semitectum* var. *majus*, (F) *F. stilboides*.

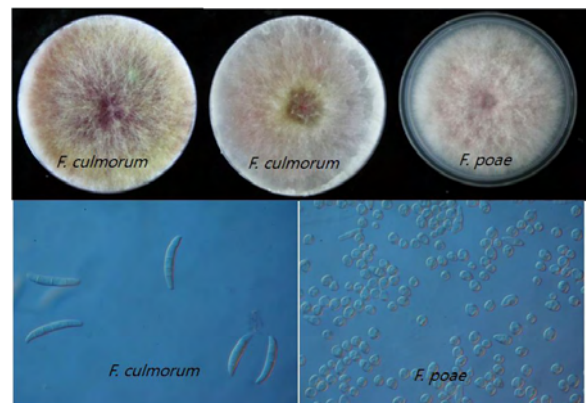


Fig. 3-3. Morphology of mycelial colony and asexual spores of the quarantine species of *Fusarium culmorum* and *F. poae*.

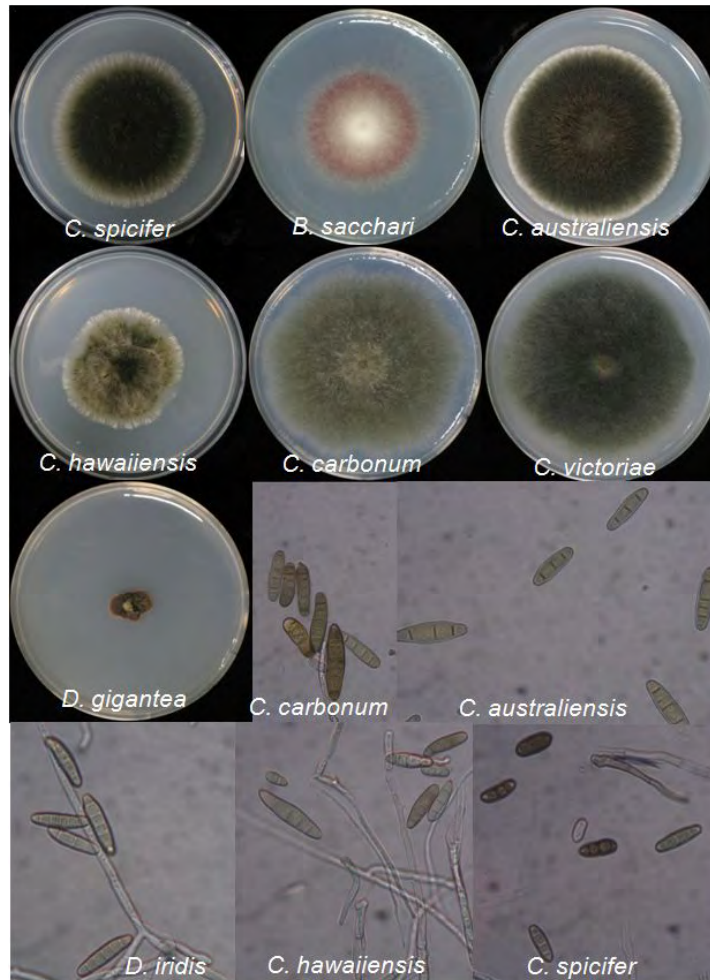


Fig. 3-4. Morphology of mycelial colony and asexual spores of the quarantine species of *Bipolaris/Drechslera/Cochliobolus*.

다. 수집 곰팡이 균주의 계통수 (phylogenetic tree) 작성

(1) 1, 2년차 수집 *Fusarium* 종 균주의 계통수 작성

총 81 주의 수집 곰팡이로부터 *TEF1* 유전자 81 종, *RPB2* 유전자 81 종, *calM* 유전자 75 종을 증폭, cloning 한 후 염기서열을 결정하였다. 이와 같이 확보한 각 유전자의 염기서열을 Clustral W 방법에 의해 정렬한 후 MEGA 프로그램 등을 이용하여 계통수를 작성하였다. (Figs. 3-5 to 3-6). *TEF1* 과 *RPB2* 유전자의 염기서열을 이용하여 작성한 계통수의 경우, *F. oxysporum* 집단을 제외한 모든 공시균주 집단들이 각각의 분류학적 위치에 따라 통계적으로 유의하게 grouping 되었음 (Fig. 3-5). 이를 통해 수집한 종들의 분류학적 위치를 다시 한 번 확인할 수 있었을 뿐 아니라, *TEF1* 과 *RPB2* 유전자 염기서열을 이용하여 종 특이적 프라이머를 제작할 가능성을 확인하였다. 하지만 *calM* 유전자의 염기서열을 이용하여 작성한 계통수의 경우 수집 종의 분류군에 따른 grouping 이 이루어 지지 않아 종 특이 프라이머 제작이 어려웠다 (Fig. 3-6). 한편 *TEF1* 과 *RPB2* 염기서열을 이용한 계통발생학 분석을 통해 *F. oxysporum redolens* 의 일부 균주 (O1265, O1266, O1891, O1893) 와, *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* 의 일부 균주 (O1092, 1097, 1101, 1102) 는 독립적인 subclade 안에

grouping 이 되었으나 그 외 균주의 경우, forma specialis 수준의 grouping 은 기대하기 어려움 (Fig. 3-5). 이를 통해 이전 연구자들이 제안한 바와 같이 *F. oxysporum* 집단에서 f. sp 수준에서의 분화는 유전적 다양성에 의한 계통발생학적 유사성으로 grouping 되기 어려움을 다시 한 번 확인하게 되었다. 하지만 grouping 이 된 일부 *F. oxysporum redolens* 와 *radicis-lycopersici* 균주들은 유전적 다양성이 서로 유사한 f. sp 그룹이기 때문에 이들에 대한 f. sp 수준의 특이 primer 제작은 가능할 수도 있다고 판단되었다.

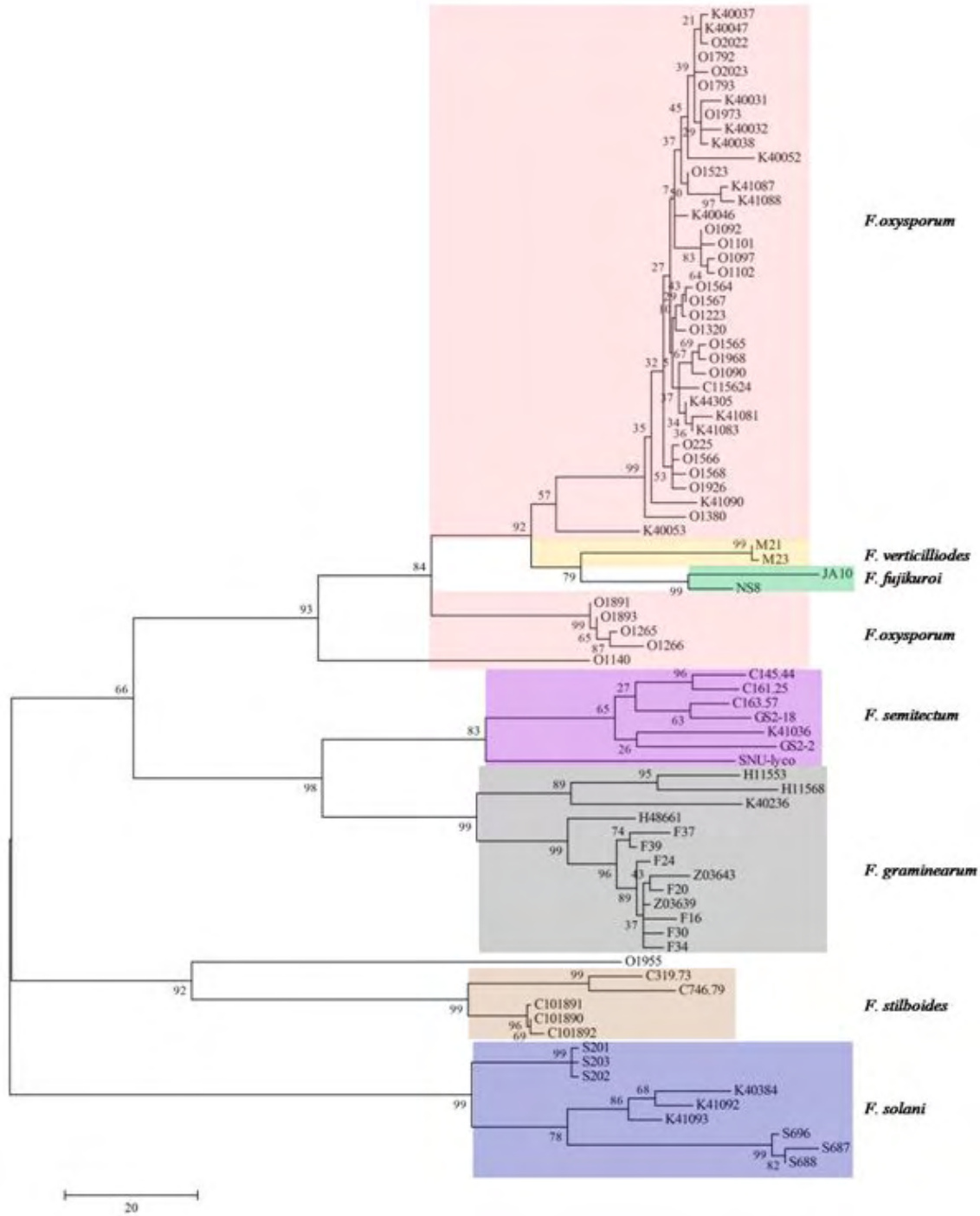


Fig. 3-5. Phylogenetic tree constructed based on the combined *TEF1* and *RPB2* genes of the collected *Fusarium* species using the maximum parsimony (MP) method. Number of nodes represent bootstrap values estimated from 1,000 replications of the data set.

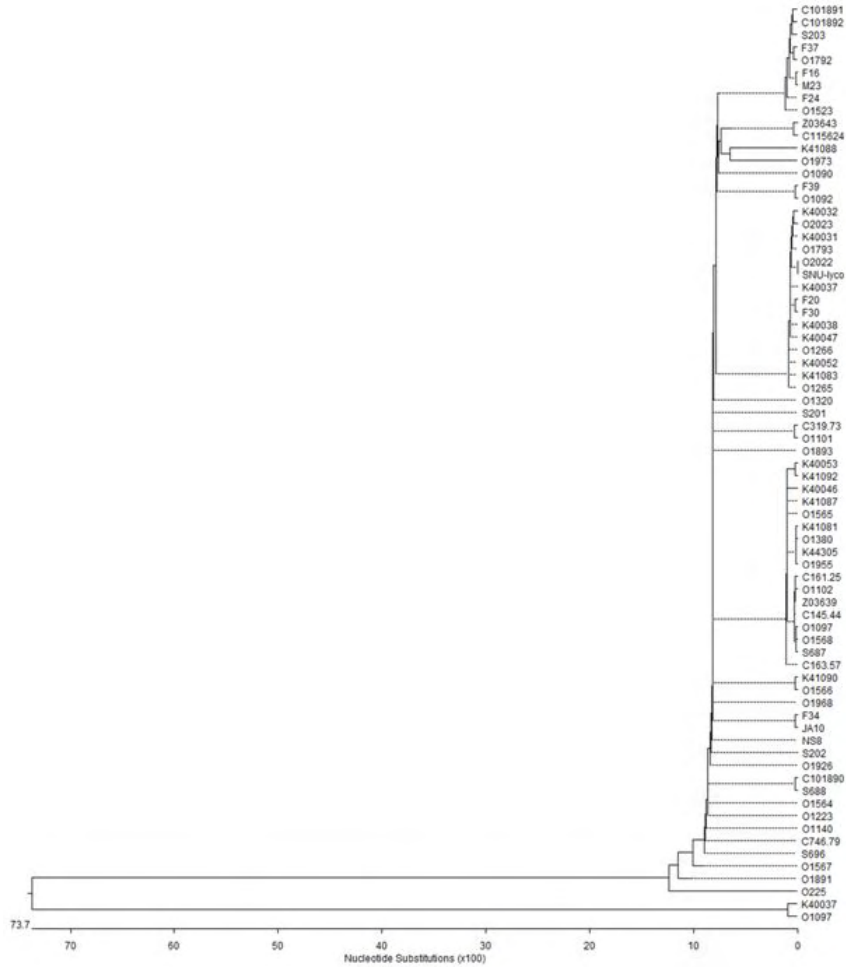


Fig. 3-6. Phylogenetic tree constructed based on the *calM* gene of the collected *Fusarium* species using the Lagergene Clustal W method.

한편 좀 더 다양한 유전자를 이용한 *F. oxysporum* f. sp 수준의 유전적 다양성 분석을 위하여 *F. oxysporum* 의 mating type (*MAT*) 유전자좌 (locus) 에 위치하고 있는 *MAT* idiomorph (*MAT1-1-1*, *MAT1-1-3*) 와 flanking region 을 포함하는 1 kb 부위를 증폭하여 염기서열을 비교하였다 (Fig. 3-7). *MAT* 유전자의 염기서열을 이용할 경우, 앞서 *TEF1* 과 *RPB2* 에 의한 phylogenetic tree 와 마찬가지로 *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* 의 일부 균주 (O1092, 1097, 1101, 1102) 가 grouping 되었다 (Fig. 3-7).

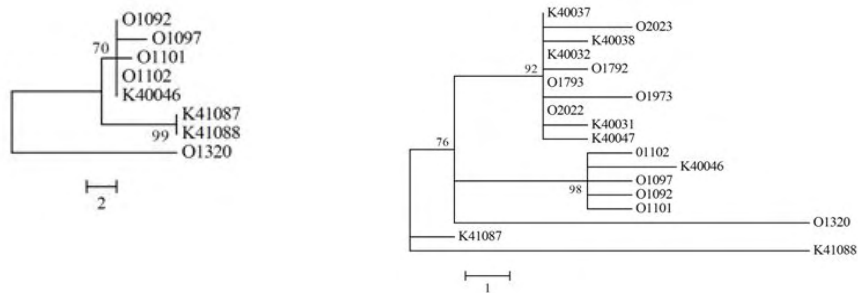


Fig. 3-7. Phylogenetic analysis of the *MAT1-1-1* and *MAT1-1-3* genes of the collected *F. oxysporum* species using the maximum parsimony (MP) method. Number of nodes represent bootstrap values estimated from 1,000 replications of the data set. (A) *MAT1-1* (B) *MAT1-3*.

하지만 위의 1 차년도 계통발생학 연구에서 아래의 분류군에 대한 사항은 여전히 불분명하였다.

- *F. oxysporum* var. *redolens* 의 종 분류가 불분명함 (11 주 중 4 주 만이 같은 subclade 에 속함).
- *F. solani* f. sp. *cucurbitae* 와 *F. solani* 의 유연관계가 불분명함.
- *F. stilboides* 의 종 분류: 총 4 주 중 1 주의 계통발생학적 위치가 불분명함.
- *F. semitectum* var. *majus* 와 *F. semitectum* 의 구분이 명확하지 않음.
- *F. oxysporum* 의 f. sp 수준에서 분류가 불분명함.

위와 같은 미비점을 보완하기 위하여 1, 2 차 년도에 걸쳐 확보한 총 130 균주와 NCBI database 에 존재하는 26 주의 표준균주(*F. redolens* 7주, *F. solani* f. sp. *cucurbitae* 14 주, *F. stilboides* 2주, *F. semitectum* 3주) 의 *TEF1* 염기서열을 비교하여 maximum parsimony (MP with 1000 bootstrap replications) 분석방법으로 계통수를 다시 작성하였다 (Fig. 3-8). Fig. 3-8 의 계통수는 총 99 의 taxa로 구성되어 있으며, 총 786 character 중 384 개는 constant 하며, 317 개는 parsimony-informative 함. 이를 통해 총 481 개의 MP tree가 만들어 졌다. 이 중BS 90% 이상의 subclade 가 7 개로 구분되었다. 이는 대부분 수집 *Fusarium* 균주들의 종 그룹 수와 일치하였다. *F. stilboides* 의 경우, 총 6 주 중 5 주는 한 subclade 에 속하나 나머지 하나 (C115624) 는 *F. oxysporum* complex 에 속하였다. 이는 C115624의 종 분류에 오류가 있을 가능성을 시사한다. 총 3 주의 *F. semitectum* var. *majus* 는 2 주의 *F. semitectum* 과 같은 subclade 에 속하였지만 2 균주의 *F. semitectum* 균주가 *F. semitectum* 에 존재하는 2 종의 variety (*semitectum*, or *majus*) 중 *majus* 에 속하는 지는 추가 검정이 필요하다. 총 6 주의 *F. solani* f. sp. *cucurbitae* 의 경우, 두 개의 subclade 로 나뉘어 졌다 (각 3 주씩). 각 subclade의 균주들은 *F. solani* f. sp. *cucurbitae* 의 race 1과 race 2 의 표준균주들과 일치하였다. 이를 통해 1차년도 확보 *F. solani* f. sp. *cucurbitae* 균주는 race 1과 race 2 로 구분이 가능하며, f. sp 수준이 밝혀지지 않은 *F. solani* 균주와도 확연히 구분되었다. 또한 이들은 race 수준이 아니라 계통발생학적으로 뚜렷이 구분되는 종이라는 기존 연구결과를 뒷받침한다. 따라서 이 들 race를 각각 구분할 수 있는 특이 primer 의 제작이 추가로 요구된다. *F. oxysporum* var. *redolens*의 경우, 총 11 주 중 4 주만 같은 subclade 안으로 묶이고 나머지 균주는 *F. oxysporum* complex 의 subclade 안에 포함되었다. 하지만 *F. redolens* 표준균주가 4 균주의 subclade 안에 포함되었기 때문에 4 균주를 제외한 나머지 7균주는 *F. oxysporum* 균주의 부정확한 종 동정으로 판단됨. 이는 최근 *F. redolens* 를 *F. oxysporum* complex에서 분리하여 새로운 종으로 구분하려는 경향과 일치한다. 한편 *F. oxysporum* f. sp 수준의 검역 종은 *F. oxysporum* complex 내에서 계통발생학적으로 구분이 매우 어려움이 알려져 있다. 검역종 중 하나인 *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* 에 특이적으로 알려진 기존의 primer set (Hirano and Arie, 2006) 조차 근연종인 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 의 일부 수집종에서 특정 DNA 절편을 증폭시켰다. 결국, 수집한 모든 *F. oxysporum* 균주는 97% BS 수준에서 하나의 큰 subclade 안에 포함되었으나 f. sp. 수준의 구분은 이루어 지지 않았다.

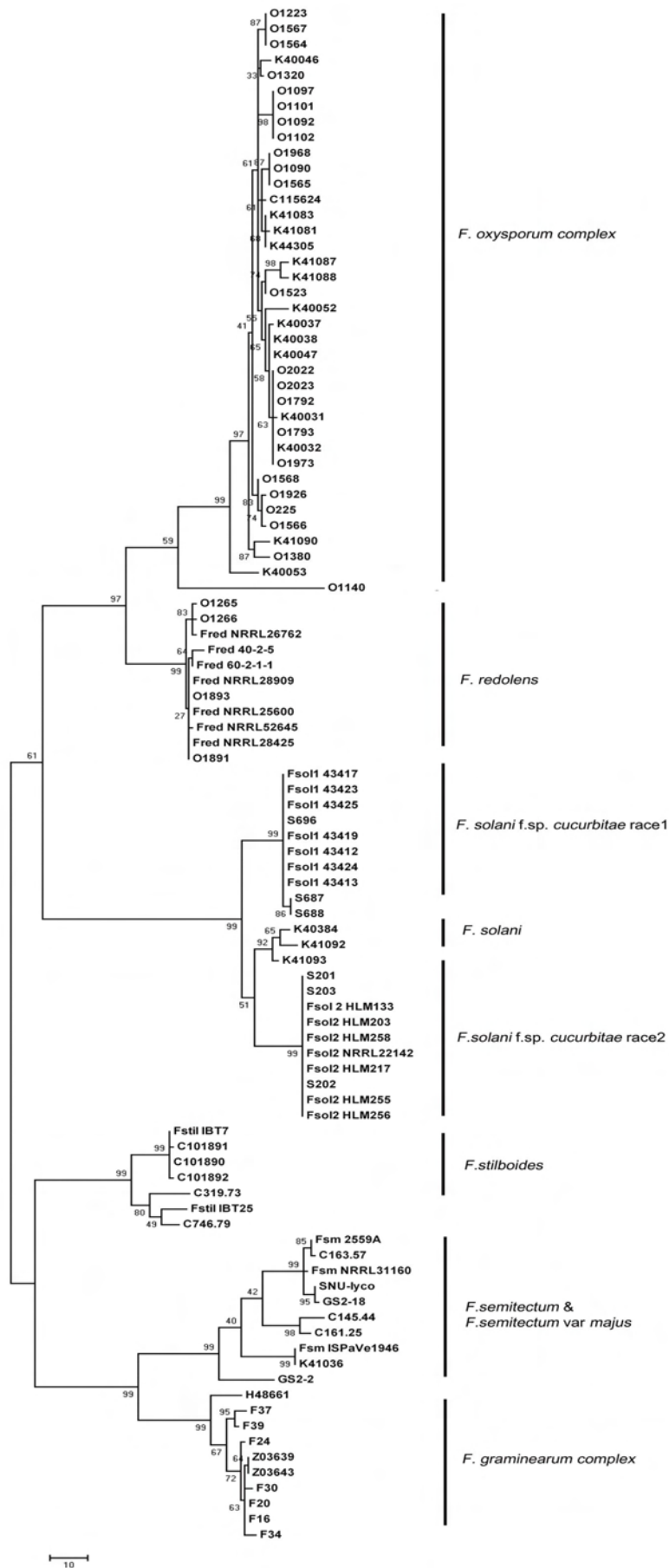


Fig. 3-8. A phylogenetic tree constructed from the *TEF1* genes of the collected *Fusarium* species using the maximum parsimony method.

(2) 3, 4차년도 수집 *Fusarium* 종 균주의 계통수 작성

3 차년도 수집 검역 *Fusarium* 종인 *F. culmorum* 7 주와 *F. poae* 3 주의 계통발생학적 위치를 확인하기 위하여 *TEF1* 과 *RPB2* 유전자 염기서열을 이용하여 Maximum parsimony 방법 (bootstrap 1,000 반복) 으로 계통수를 작성하였다 (Fig. 3-9). 계통수 작성을 위하여 1, 2차년도 수집 *Fusarium* 종 균주 뿐 아니라 *F. culmorum*, *F. poae* 같이 붉은 색소를 형성하는 근연종 (*F. graminearum* 중복합체, *F. pseudograminearum*, *F. cerealis* 등)의 염기서열을 포함 하였다.

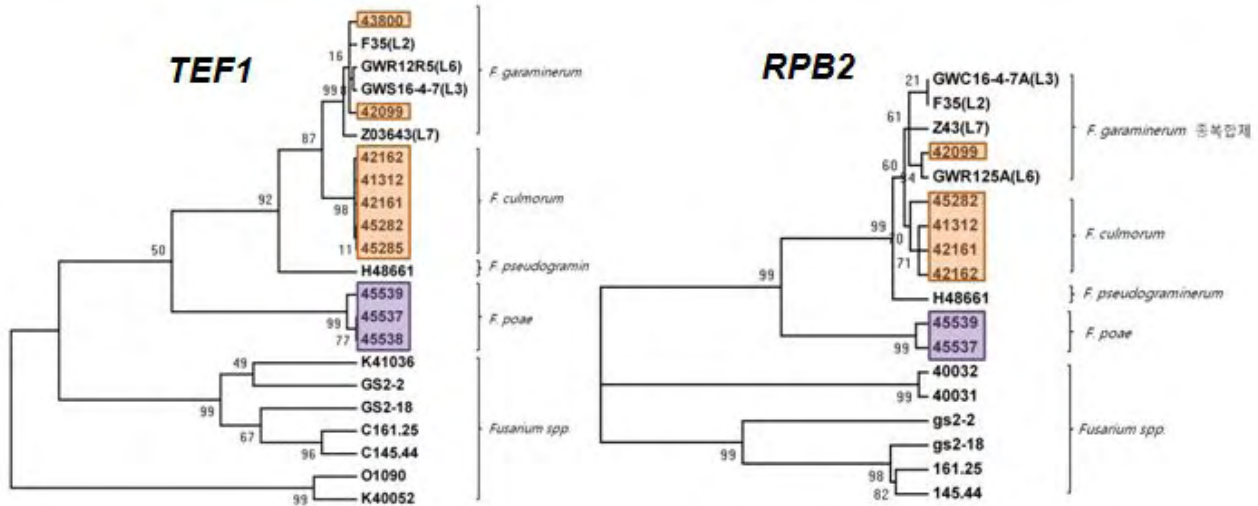


Fig. 3-9. Phylogenetic trees constructed from the *TEF1* and *RPB2* genes of the collected *Fusarium* species using the maximum parsimony method.

F. culmorum 7 균주 중 KACC 42099 과 43800 를 제외한 5 균주는 *TEF1* 염기서열을 이용한 계통수에서 BS 98% 이상으로 독립적인 subclade 를 형성하였다. 이들 예외적인 2 균주는 *F. graminearum* subclade 에 속하였기 때문에 *F. culmorum* 균주로 간주하기 어렵다. 또한 이들 균주만 한국에서 분리되었기 때문에 보고 당시 포자의 형태적 모양에 의해 *F. culmorum* 으로 잘못 동정되었을 가능성이 있다. *F. culmorum* 의 경우, 특히 우리나라 토종 *F. graminearum* 중복합체 (lineage 6 또는 *F. asiaticum*) 와 분생포자의 모양이 비슷하기 때문에 이와 같은 오동정의 경우가 발생한다. 따라서 본 과제에서 확보한 5 주의 *F. cumolorum* 균주만이 authentic 한 종으로 판단되어 이후 종 특이 프라이머의 제작과 검정에 사용하였다. *F. poae* 3 균주는 *TEF1* 과 *RPB2* 의 계통수 모두에서 BS 99% 의 수준으로 독립적인 subclade 를 형성 하기 때문에 authentic 한 종으로 판단된다. 한편 4 년차 수집 14 주 (*F. sporotrichioides*, *F. heterosproum*, *F. camptoceras*, *F. nelsonii*, *F. compactum*, *F. tricinatum*, *F. chlyamydosporum*) 도 모두 분류군에 따라 독립적인 subclade 에 grouping 되었다.

(3) *Bipolaris/Drechslera/Cochliobolus* 종 곰팡이의 계통분석

NCBI 등의 데이터베이스에 *Bipolaris/Drechslera/Cochliobolus* 종 곰팡이의 *RPB2* 와 *TEF1* 유전자 정보가 전무하기 때문에 표준균주 없이 본 과제에서 확보한 균주의 유전자 염기

서열을 이용하여 계통수를 작성하였다 (Fig. 3-10). *RPB2* 유전자의 염기서열을 비교하여 작성된 계통수가 *TEF1* 유전자의 계통수보다 수집된 *Bipolaris/Drechslera/Cochliobolus* 종의 구분과 유사하였다. *RPB2* 계통수에 따르면 검역종 중 *D. iridis* 는 총 2 균주 모두 단일 subclade (BS 99%) 안에 포함되었다. *Cochliobolus hawaiiensis* 는 분석된 총 5 균주 중 4균주가 BS 97% 수준의 단일 subclade 에 포함되었으며, 나머지 한 균주 (45373) 는 *C. heterostrophus* (*B. maydis*)의 subclade 에 포함되었다. 하지만 *TEF1* 계통수에서는 45373 이 또 다른 균주인 45367과 별도의 subclade 안에 함께 포함되었기 때문에 두 subclade 중 어느 것이 authentic *C. hawaiiensis* 인지는 아직 불명확하다. *C. spicifier*는 *RPB2* 계통수에서 총 5 균주 중 3 균주가 단일 subclade (BS 99%) 안에 포함되었으며 이러한 추세는 *TEF1* 계통수에서도 확인되었다. 하지만 나머지 균주인 45382와 45379 가 각각 *C. australiensis* 또는 *C. victoriae* 균주와 함께 묶이기 때문에 이들 균주의 분류학적 위치는 아직 불분명하다. 이와 달리 *C. australiensis*, *C. carbonum*, *C. victoriae* 의 경우 분석된 각 종의 2 균주가 모두 단일 subclade 안에 포함되지 않았기 때문에 이들 종의 동정은 명확하지 않다. 단지 *RPB2* 계통수에 따르면 *C. carbonum* 45473 균주와 *C. victoriae* 45385 가 BS 99% 수준의 단일 subclade 안에 함께 포함되었다. 이들 두 종이 원래 계통발생학적으로 매우 유사하며, 단지 HC-toxin 또는 victorin 이라는 기주특이적 독소의 생성능력에 따라 기주특이성만 다르다는 기존 보고에 따르면 45473 과 45385 의 종 동정은 정확하다 판단할 수 있다. 한편 1 균주씩만 수집된 검역종인 *D. gigantea* 와 *B. cynodontis* 균주의 종 동정 명확성 여부는 불분명하다. 이들 검역종의 근연종 (*C. lunata*, *B. coicis*, *B. oryzae*, *B. maydis* 등) 균주들도 *RPB2* 계통수에 따르면 대체로 단일 subclade 안에 포함되어 종 동정의 명확성을 판단할 수 있었다.

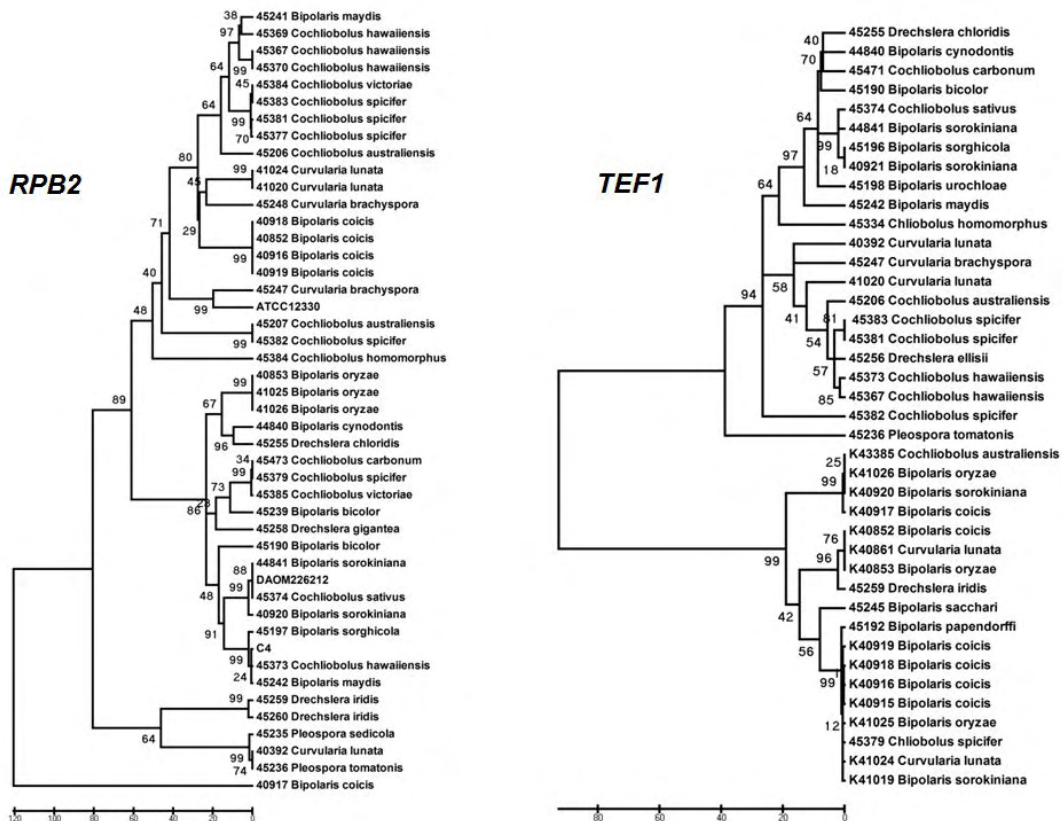


Fig. 3-10. Phylogenetic trees constructed from the *RPB2* or *TEF1* genes of the collected *Bipolaris/Drechslera/Cochliobolus* species using the maximum parsimony method.

라. 주요 곰팡이의 종 특이적 프라이머 의 제작 및 검증

(1) *Fusarium* 속 곰팡이의 종 특이적 프라이머

(가) 검역종 *Fusarium* 곰팡이의 종 특이 프라이머

분류군 사이에 증폭한 유전자의 염기서열을 비교·분석하여 종 특이적 프라이머의 염기서열부위를 결정하였다 (Fig. 3-11). *F. solani* f. sp. *curcurbitae* 와 *F. oxysporum* var. *redolens* 의 특이 프라이머 조합은 *TEF1* 유전자의 염기서열, *F. semitectum* var. *majus* 와 *F. stilboides* 는 *RPB2* 유전자의 염기서열로부터 제작하였다. 하지만 *MAT* 유전자 염기서열의 경우 비교 균주 (*F. oxysporum*) 사이에 매우 잘 보존되어 있기 때문에 분류군에 특이적인 염기서열 부위를 찾기 어려웠다 (Fig. 3-12). PCR 프라이머 조합 선발 시 검출 대상 곰팡이로부터 특정 DNA 절편의 증폭 유무 뿐 아니라 증폭 DNA 의 크기 변이에 의한 진단도 가능할 수 있는 primer 의 조합을 시도하였다.

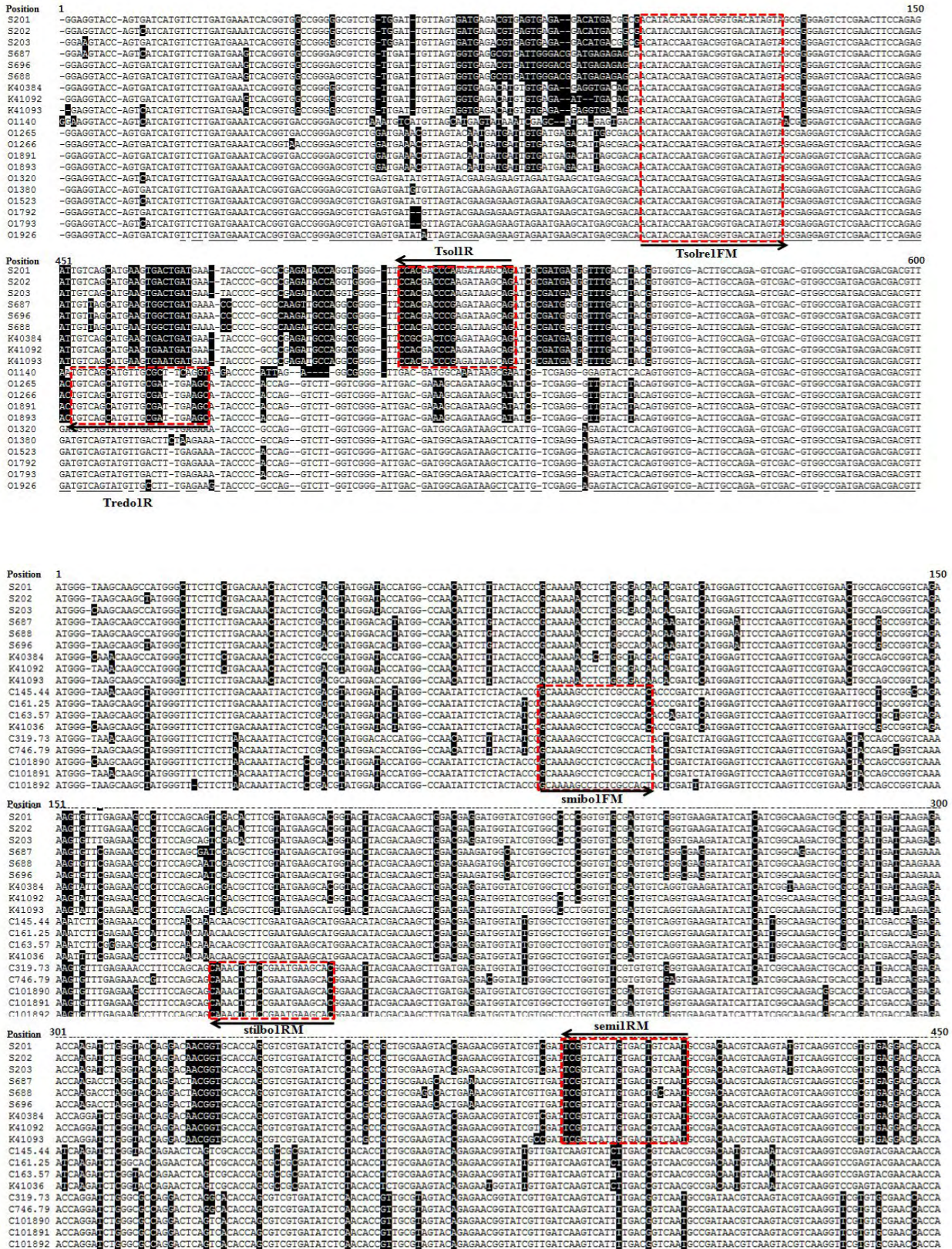


Fig. 3-11 . Nucleotide alignment of partial *TEF1* (upper) from the *F. solani* and *F. oxysporum redolens* strains, and *RPB2* genes (bottom) (B) from *F. semitectum* and *F. stilboides* strains. The positions of specific primers are indicated by black arrows.

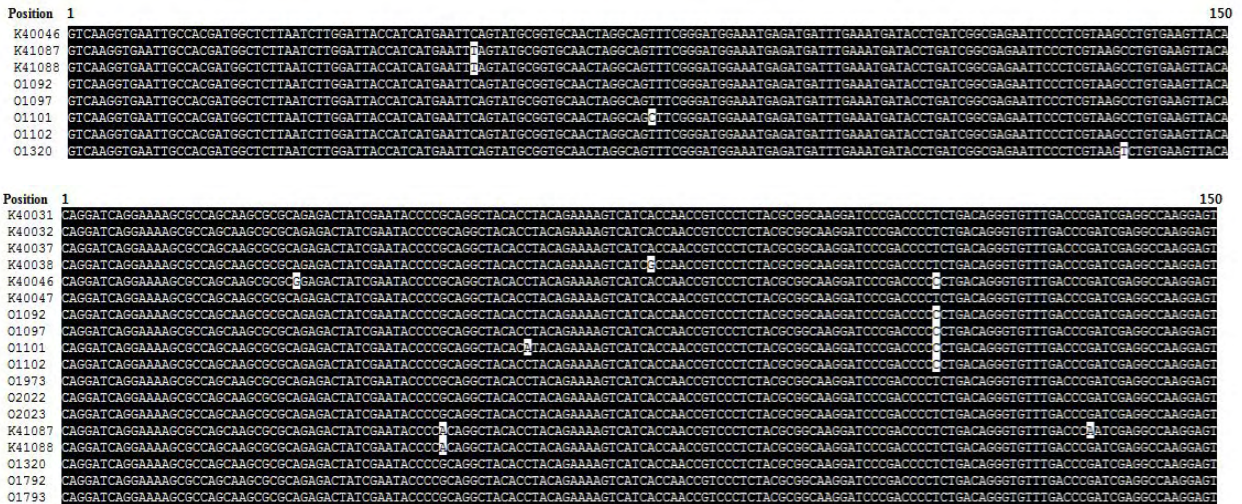


Fig. 3-12 . Nucleotide alignment of partial *MAT1-1-1* (upper) and *MAT1-1-3* genes (bottom) from *F. oxysporum* strains.

(가) *F. semitectum* var *majus* 와 *F. stilboides* 의 특이적 검출

두 종의 동시 검출을 위한 PCR 의 경우, forward primer 는 한 종류의 primer (smibo1FM) 만 사용 가능하다. *F. semitectum* var *majus* 의 특이 검출을 위해서는 semilRM 을 forward primer 로 사용 하였으며, *F. stilboides* 의 특이 검출을 위해서는 stilbo1RM 을 forward primer 로 사용하였다 (Tables 3-6 & 3-7).

Table 3-6. Species-specific primers for the quarantine *Fusarium* spp.

Name	Nucleotide sequence (5' to 3')	characteristics
smibo1FM	GCAAAAGCCTCTCGCCAC	a forward primer for both <i>F. semitectum</i> var <i>majus</i> & <i>F. stilboides</i>
semi1RM	AGGTGTAGAGATATCGCGG	a reverse primer for <i>F. semitectum</i> var <i>majus</i>
stilbo1RM	GTGCTTCATTTCGGAGAGTTTG	a reverse primer for <i>F. stilboides</i>
Tsolre1FM	ACATACCAATGACGGTGACATAGTA	a forward primer for both <i>solani cucurbita</i> & <i>F. oxysporum redolens</i>
Tsol1R	CTGCTTATCTTGGGTCGTGG	a reverse primer for <i>F. solani cucurbita</i>
Tredo1R	TTCGACTCGCCGCTCCCA	a reverse primer for <i>F. oxysporum redolens</i>
Fsc1	CGTGATTGGGACGGATGAGAGA	a forward primer for <i>F. solani</i> f. sp. <i>cucurbitae</i> (<i>Fsc</i>) race1
Fsc2	ACGTGAGTGAGAGACATGACGG	a forward primer for <i>Fsc</i> race 2
Fsolc1R1	TGGCATCTTGGGCGGGGGGT	a reverse primer for <i>Fsc</i> race 1
Fsolc1R2	TTCACAACAGACACTGACTCG	a reverse primer for <i>Fsc</i> race 2
FstR1	GACACCAATAGTACCCTTTTGTC	a reverse primer for <i>F. stilboides</i>
Tpo3	GTGATGGATCGAGGGAAAGTA	a forward primer derived from <i>TEF1</i> for <i>F. poae</i>
Tpo4	GAATCTCAACTCCGCTTTGACA	a reverse primer derived from <i>TEF1</i> for <i>F. poae</i>
Tcul1	CGTGCGCGCTAGGGAATGGT	a forward primer derived from <i>TEF1</i> for both <i>F. culmorum</i> and <i>F. graminearum</i> species complex
Tcul2	ACCACTGTGAGTAGCACTGCATC	a reverse primer derived from <i>TEF1</i> for both <i>F. culmorum</i> and <i>F. graminearum</i> species complex
FculPiP nF/p1	AATTCAGTCGCTTATTCTTCA	a forward primer derived from <i>Pip1</i> for <i>F. culmorum</i>
FculPiP nR/p1	TAAAACCACCAAGCTGGATA	a reverse primer derived from <i>Pip1</i> for <i>F. culmorum</i>
FculTri101 nF/p1	ACCCAAAGCCTGTAATTATG	a forward primer derived from <i>Tri101</i> for <i>F. culmorum</i>
FculTri101 nR/p1	CCAAAGTCGTACTCCCATAA	a reverse primer derived from <i>Tri101</i> for <i>F. culmorum</i>

Table 3-7. Specific primer pairs for the quarantine *Fusarium* spp.

Primer pair	Primer specificity	PCR size (bp)
smibo1FM + semi1RM	<i>F. semitectum</i> var <i>majus</i>	424
smibo1FM + stilbo1RM	<i>F. stilboides</i>	265
Tsolre1FM + Tsol1R	<i>F. solani</i> f. sp. <i>cucurbita</i> race 1 & race 2 (동시 검출)	550
Tsolre1FM + Tredo1R	<i>F. redolens</i> (syn. <i>F. oxysporum</i> var <i>redolens</i>)	343
Tsolre1FM + Tredo1R + Tsol1R for multiplex PCR	<i>F. solani</i> f. sp. <i>cucurbita</i> race 1 & race 2, & <i>F. redolens</i> (동시 검출)	
Fsc1 + Tso1R	<i>F. solani</i> f. sp. <i>cucurbitae</i> race 1	580
Tsolre1FM + Fsolc1R1 (for nested PCR)	<i>F. solani</i> f. sp. <i>cucurbitae</i> race 1	526
Fsc2 + Tso1R	<i>F. solani</i> f. sp. <i>cucurbitae</i> race 2	580
Tsolre1FM + Fsolc2R1 (for nested PCR)	<i>F. solani</i> f. sp. <i>cucurbitae</i> race 2	174
Smibo1FM + Fst1	<i>F. stilboides</i>	578
Smibo1FM + Stilbo1RM (for nested PCR)	<i>F. stilboides</i>	263
Tpo3 + Tpo4	<i>F. poae</i>	190
Tcul1 + Tcul2	<i>F. culmorum</i> & <i>F. graminearum</i> species complex (동시 검출)	360
FculPiP nF/p1 + FculPiP nR/p1	<i>F. culmorum</i>	782
FculTri101 nF/p1 + FculTri101 nR/p1	<i>F. culmorum</i>	778

PCR 증폭 조건은 다음과 같다:

- 5 min at 94°C; 1 min at 94°C, 30s at 55°C, 1 min at 72°C for 30cycles; 3 min at 72°C followed by cooling at 4°C

PCR 증폭 결과, *F. semitectum* var. *majus*로 부터는 424 bp, *F. stilboides* 로부터는 265bp 의 특이적인 band 를 각각 얻을 수 있었다. 하지만 다른 *Fusarium* 종 균주로부터는 비특이적인 산물조차 증폭되지 않았다 (Fig. 3-13). 이를 통해 위의 3 종류의 프라이머로 2 종의 검역 *Fusarium* 곰팡이 (*F. semitectum* var. *majus*, *F. stilboides*) 를 동시에 특이적으로 증폭할 수 있었다. 또한 증폭의 여부 뿐 아니라 증폭 DNA 조각의 특정한 크기에 의해서도 종 특이적 PCR 검출을 확인할 수 있었다.

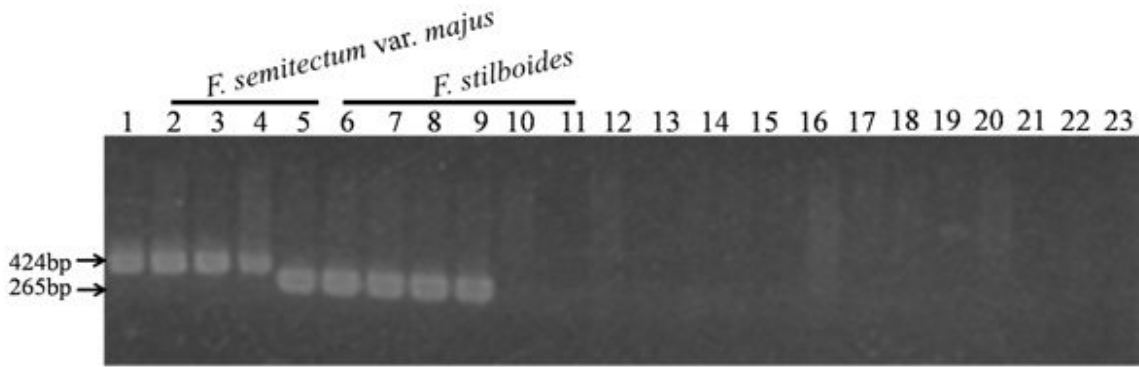


Fig. 3-13. Specific PCR amplification for *F. semitectum* var. *majus*, and *F. stilboides*, respectively. Lanes 1-4: *F. semitectum* var. *majus*; 5-9: *F. stilboides*; 11-23: other *Fusarium* spp.

(나) *F. solani cucurbitae* 와 *F. oxysporum redolens* 의 특이적인 검출

앞서 *F. semitectum* var. *majus* 와 *F. stilboides* 의 경우와 마찬가지로 3 종류의 프라이머로 2 종 (*F. solani cucurbitae*, *F. oxysporum redolens*) 의 검역 종을 동시에 검출할 수 있다. forward primer 로는 두 종 모두 한 종류의 primer (Tsolre1FM) 만 사용가능하며, *F. solani cucurbitae*의 특이 검출을 위해서는 Tsol1R를 reverse primer 로, *F. oxysporum redolens* 의 특이 검출을 위해서는 Tredol1R 을 reverse primer 로 사용하였다 (Tables 3-6 & 3-7). PCR 증폭 조건은 다음과 같다:

- 5 min at 94°C; 1 min at 94°C, 30s at 54-60°C, 1 min at 72°C for 30cycles; 3 min at 72°C followed by cooling at 4°C

PCR 증폭 결과, *F. solani* f. sp. *cucurbitae* 로부터 550 bp 의 특이적인 PCR 산물을 증폭할 수 있음. 이 경우, *F. solani cucurbitae* 외 다른 *Fusarium* 종과 *F. solani* 균주에서 조차 특이적인 DNA 절편이 증폭되지 않았다 (Fig. 3-14). 계통발생 분석을 통해 한 group 으로 묶이는 *F. redolens* (syn. *F. oxysporum* var. *redolens*) 4 균주로부터는 343bp 의 특이적인 DNA 절편이 증폭되었다. 하지만 같은 group 으로 묶이지 않는 다른 *F. oxysporum* var. *redolens* 균주와 기타 *Fusarium* 종으로부터는 특이적인 산물이 증폭되지 않았다 (Fig. 3-15).

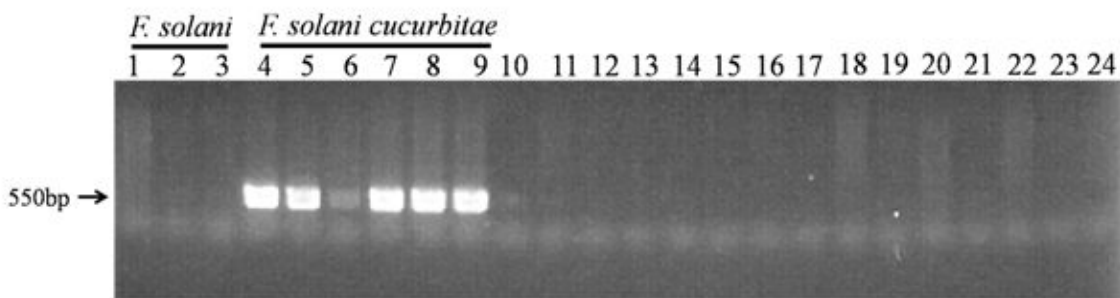


Fig. 3-14. Specific PCR amplification of *F. solani cucurbitae*. Lanes 10-24: Other *Fusarium* spp.

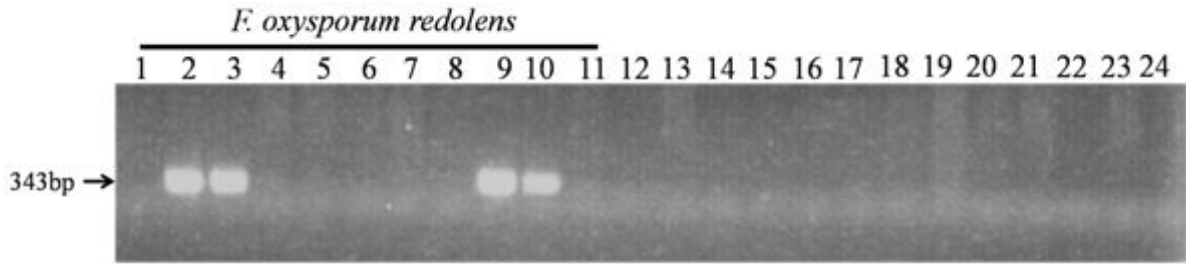


Fig. 3-15. Specific PCR amplification of the phylogenetically similar *F. oxysporum redolens* strains. Lanes 12-24: Other *Fusarium* spp.

한편, Tsolre1FM 의 염기서열은 *F. solani* f. sp. *cucurbitae* 와 *F. solani* 의 *TEF1* 유전자에 동시에 conserved 되어 있기 때문에 Tso11R 과 함께 multiplex PCR을 수행할 경우, *F. redolens* 뿐 아니라 *F. solani* f. sp. *cucurbitae* race 1, race 2 와 일부 *F. solani* 균주도 함께 증폭할 수 있었다 (Fig. 3-16). 이때 *F. redolens* 와 *F. solani* 균주는 증폭된 DNA 절편의 크기에 따라 구분이 가능하다.

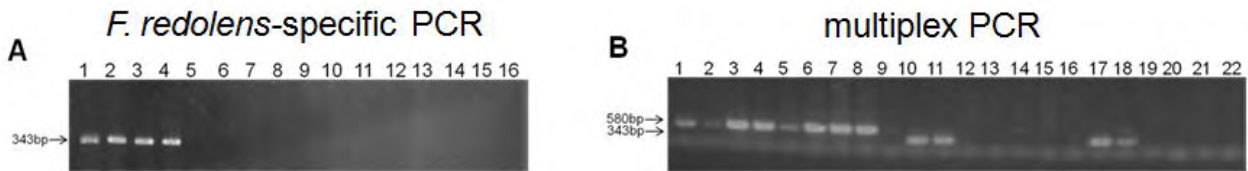


Fig. 3-16. Specific amplification of the *TEF1* regions from genomic DNA of the *F. redolens* isolates using the primers Tsolre1FM and Tredo1R (A) and from those of the *F. redolens* and *Fsc* isolates using the three primers Tsolre1FM, Tredo1R, and Tso11R. (B) Lanes 1-4: the *F. redolens* isolates; 5-9: other *F. redolens* isolates; 10-16: other *Fusarium* spp.(B) Lanes 1-2: the *F. solani* isolates; 3-5: *Fsc* race 2 isolates; 6-8: the *Fsc* race 1 isolates; 10, 11, 17, 18: the *F. redolens* isolates; 12-16: other *F. redolens* isolates; 19-22: other *Fusarium* spp.

(다) *F. solani* f. sp. *cucurbitae* race 1 과 race 2 의 특이적인 검출

1 년차 연구와 달리 *F. solani* f. sp. *cucurbitae* 의 race 1과 race 2의 구분이 계통발생학적으로 명확해짐에 따라 각 race 균주들을 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머 조합을 *TEF1* 유전자 염기서열로부터 제작하였다 (Tables 3-6 & 3-7). 프라이머 Fsc1 와 Tso11R 조합과 nested 프라이머인 Tsolre1FM 과 Fsolc1R1 조합은 race 1 균주로부터 580bp 와 526bp의 DNA 절편을 각각 증폭하였다. 하지만 race 2 와 그 밖의 *F. solani* 균주, 다른 *Fusarium* 균주로부터는 어떠한 DNA 절편도 증폭하지 않았다. 또한 nested 프라이머조합은 첫 번째 프라이머 조합에 의해 증폭된 PCR 산물을 100배 희석한 후 template 로 사용하였을 경우에도 특이 DNA 절편을 증폭하였다. 프라이머 Fsc2 와 Tso11R 조합과 nested 프라이머인 Tsolre1FM 과 Fsolc2R1 조합은 race 2 균주로부터 각각 580bp 와 174 bp 의 특이적인 DNA 절편을 증폭하였다 (Fig. 3-17).

F. solani f. sp. *cucurbitae*-specific PCR

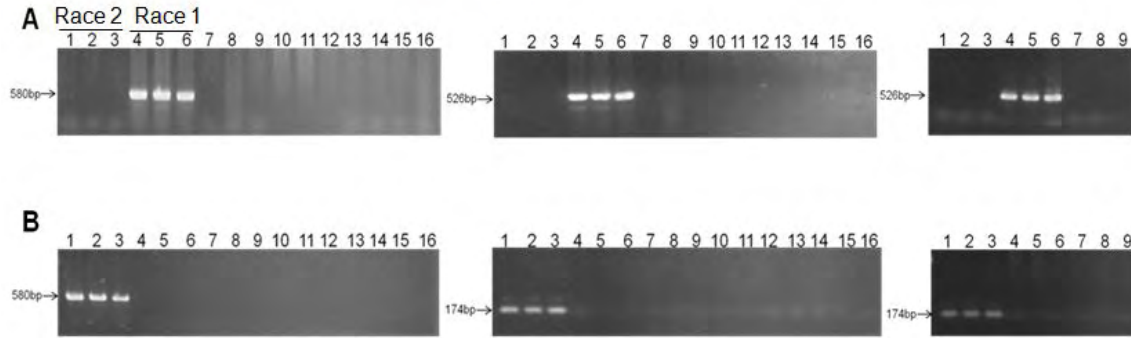


Fig. 3-17. Amplification of the *TEF1* region from the isolates of *F. solani* f.sp. *cucurbitae* (*Fsc*) race1 (A) and race2 (B). (A) Left panel: PCR amplification of a 580-bp fragment from genomic DNA of the *Fsc* race1 isolates with the primers *Fsc1* and *Tsol1R*. Lanes 1-3: the *Fsc* race 2 isolates; 4-6: the *Fsc* race 1 isolates; 7-9: the *F. solani* isolates; 10-16: other *Fusarium* spp. Middle panel: PCR amplification of a 526-bp fragment from genomic DNA of the *Fsc* race 1 isolates with the primers *Tsolre1FM* and *Fsolc1R1*. The lane descriptions are the same as those for the left panel. Right panel: PCR amplification of the 526-bp fragment from the 100-fold-diluted PCR products in the left panel as template DNA with *Tsolre1FM* and *Fsolc1R1*. The lane descriptions are the same as those for the left panel. (B) Left: PCR

(라) *F. stilboides* 의 특이적인 검출

RPB2 유전자의 염기서열로부터 제작한 프라이머조합 (*Smibo1FM* 과 *Fst1*)을 사용할 경우, 종 동정이 확인된 총 5 주의 *F. stilboides* 로부터 578bp의 특이 DNA 절편이 증폭되었다 (Fig. 3-18). 또한 *F. stilboides* 의 특이 PCR 검출을 다시 한 번 검증하기 위해 nested 프라이머인 *Stilbo1RM* 을 *Smibo1FM*과 함께 사용할 경우, 263bp의 특이 DNA 절편이 증폭되었다 (Tables 3-6 & 3-7) (Fig. 3-18). 특이 프라이머에 의한 PCR 검출한계는 1-10 pg fungal genomic DNA per PCR reaction 으로 결정되었다.

F. stilboides-specific PCR

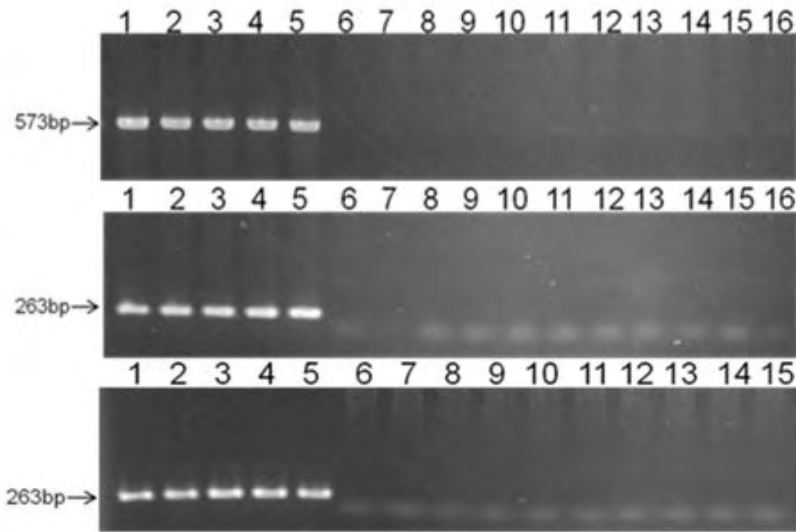


Fig. 3-18. Specific amplification of *TEF1* regions from the isolates of *F. stilboides*. Upper panel: PCR amplification of a 578-bp fragment from genomic DNA of the *F. stilboides* isolates with the primers SmibolFM and FstR1. Lanes 1 - 6: the *F. stilboides* isolates; 7 - 16: other *Fusarium* spp. Middle panel: PCR amplification of a 263-bp fragment from genomic DNA of the *F. stilboides* isolates with the primers SmibolFM and StibolRM. Bottom panel: PCR amplification of the 263-bp fragment from the 100-fold-diluted PCR products in the upper panel as template DNA with SmibolFM and StibolRM.

(마) 검역종 *F. oxysporum* 의 특이적인 검출을 위한 *MAT* 유전자 유래 종 특이 프라이머 제작

F. oxysporum 의 f. sp 수준에서 변이를 보이는 부위를 *TEF1* 과 *RPB2* 유전자의 염기서열 내에서 찾지 못함에 따라 교배형 유전자 (*MAT*) 의 염기서열을 비교 분석하였다. 이를 위해 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 의 *MAT* 유전자 부위 염기서열을 바탕으로 primer 조합을 제작하였다. *MAT1-1-1* 유래 primer 조합으로는 *F. oxysporum* 공시균주 중 8 주, *MAT1-1-3* 유래 primer 조합으로는 18 주, *MAT* idiomorph 인근 부위의 DNA lyase 유전자 유래 primer 조합으로는 34 주로부터 해당 유전자 부위를 증폭할 수 있었다 (Figs 3-19 to 3-21). 종 특이 분자표지의 개발을 위해 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* [DNA] 3020054-3029053 + 의 *F. oxysporum* supercontig 2.3 에 해당하는 유전체 서열을 이용하였다.

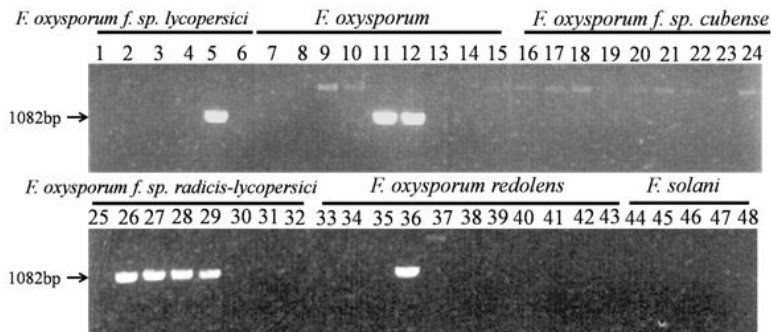


Fig. 3-19. PCR amplification of *F. oxysporum* strains with a *MAT1-1-1* primer pair derived from *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* genome.

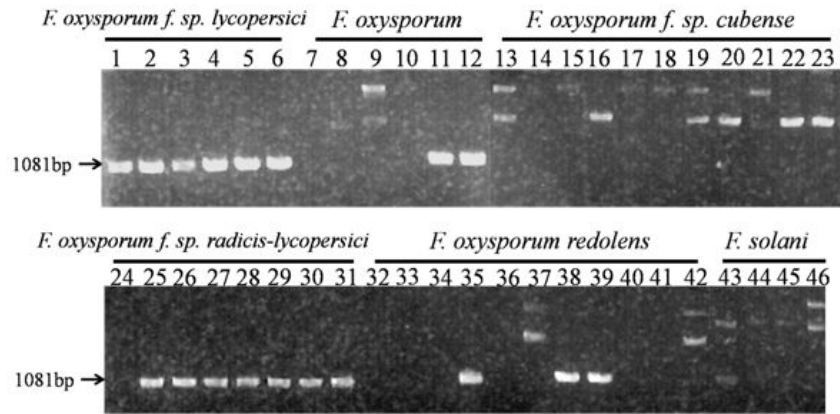


Fig. 3-20. PCR amplification of *F. oxysporum* strains with a *MAT1-1-3* primer pair derived from *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* genome.



Fig. 3-21. PCR amplification of *F. oxysporum* strains with a DNA lyase gene primer pair derived from *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* genome.

MAT 인근 부위의 3 종 유전자에서 유래한 프라이머 조합 중 DNA lyase 유전자 유래 프라이머가 대부분 *F. oxysporum* 공시균주의 게놈 DNA로부터 2054 bp 의 산물을 증폭하였다. 따라서 DNA lyase 유전자의 염기서열을 비교 분석함으로써 특정 *F. oxysporum* f. sp 검역종을 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머의 제작을 시도하였다. 또한 *Fusarium* species 81 주로부터 β -tublin 유전자 (*TUB1*) 의 염기서열을 확보하여, 그로부터 종 특이 프라이머의 제작을 시도하였다.

(바) *F. poae* 의 특이적 검출

TEF1 염기서열로부터 유래한 primer 조합 Tpo3 와 Tpo4 (Table 6 & &) 는 계통발생분석을 통해 검증된 3 주의 *F. poae* 로부터 190bp의 특이적인 DNA 절편을 증폭하였다 (Fig. 3-22). 하지만 이 프라이머 조합은 *F. poae* 의 근연종인 *F. sporotrichioides*, *F. tricinctum*을 포함하여 모든 분석 대상 *Fusarium* 종과 다른 속의 곰팡이 종으로부터는 특이적인 DNA 절편을 증폭하지 못하였다. 이를 통해 Tpo3 와 Tpo4 조합은 *F. poae* 검출용 특이 프라이머임이 검증되었다.



Fig. 3-22. Specific PCR amplification of *F. poae*. (lane M: a 100bp ladder, lane1-3: *F. poae*, lanes 4-16 : other *Fusarium* spp.)

(사) *F. culmorum* 의 특이적 검출

F. culmorum 은 유럽 등의 온난기후지역에서 밀, 보리, 수수, 옥수수 등의 곡류에 이삭 마름병과 줄기썩음병, 뿌리썩음병 등의 병해를 일으키는 식물병원균이다 (Leslie and summerell, 2006; Scherm, B., et al, 2013). 일반적으로 곡류에 같은 병징들을 유발하는 *F. graminearum*, *F. sambucinum* 등 과 혼재하여 분리가 되며, 균사 또는 포자의 형태적 특징만으로는 *F. culmorum*을 위 종들과 구분하는 것은 거의 불가능하다. 감염된 곡류의 이삭에서 스테로이드 (Burmeister, H. R., and R. F. Vesonder., 1990)와 곰팡이독소인 모닐리포민 (moniliformin)(Scott, P. M., et al, 1987), 트라이코신 (trichothecene)(Marasas, W. F. O., 1984;), 푸자린시 (fusarin C)(Farber, J. M., and G. W. Sanders. 1986), 지날레논 (zearalenone)(Marasas, W. F. O., 1984) 등을 생산 축적하여, 오염된 곡류를 섭취한 인간과 가축에 중독증을 유발한다. 특히 트라이코신 (trichothecene)은 인축에 대한 중독증 뿐 아니라 식물병의 확산에도 작용하는 병원성 인자로 보고가 되어 많은 연구가 진행되어 왔다. *F. culmorum*은 주로 식물잔재물에 섞여 토양에 존재하고 빗물에 의한 확산을 통해 식물에 감염되며 (Jenkinson, P., and D. W. Parry., 1994), 바람 등에 의한 공기 확산은 발생하지 않는 것으로 알려져 있다. 또한 아직까지 유성생식이 보고가 되지 않았다 (Toth, B., et al, 2004). 검역 종인 *F. culmorum*을 형태적으로 유사한 종들과 구분하여 식물체에서 빠르게 검출하기 위한 방법이 요구되나 아직까지 효과적인 방법이 확립되지 못하였다 (Scherm, B., et al, 2013). 본 과제에서는 *F. culmorum* 근연종들의 *TEF1* 과 *RPB2* 염기서열을 비교하여 *F. culmorum* 특이 프라이머 부위를 선별하려 하였으나, 두 종류의 유전자 염기서열에서는 *F. graminearum* 중복합체 균주들과 구별 지을 수 있는 의미 있는 수준의 종특이적 변이 부위를 발견할 수 없었음. *F. culmorum* 의 *TEF1*에서 유래한 프라이머 조합 Tcull1 와 Tcul2 의 경우 (Tables 3-6 & 3-7), 5 주의 *F. culmorum* 뿐 아니라 분석 대상 *F. graminearum* 중복합체 균주 모두의 게놈 DNA 로부터 360bp 크기의 DNA 조각을 증폭하였으나 *F. culmorum* 또는 *F. graminearum* 중복합체의 또 다른 근연종인 *F. pseudograminearum* 과 *F. cerealis* 를 비롯하여 다른 *Fusarium* 종의 게놈 DNA로부터는 특정 DNA 조각을 증폭하지 못하였다. 이를 통해 Tcull1 와 Tcul2 는 일단 *F. culmorum* 과 *F. graminearum* 중복합체를 동시에 검출하는 프라이머 조합으로 유용할 것으로 판단된다 (Fig. 3-23).

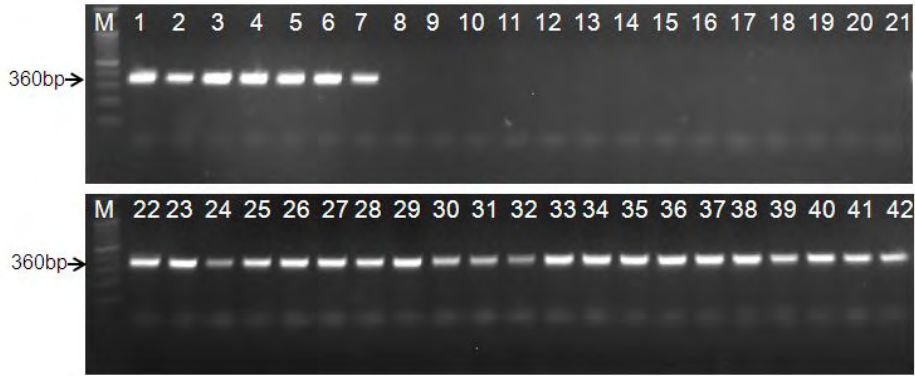


Fig. 3-23. Specific PCR amplification of *F. culmorum* and the *F. graminearum* species complex. (lane M: a 100bp ladder, lanes 1-7: *F. culmorum*, lanes 8-21: other *Fusarium* spp., lanes 22-42: *F. graminearum* complex).

F. culmorum 과 *F. graminearum* 종복합체 균주 사이를 구별할 수 있는 *F. culmorum* 종 특이 프라이머의 제작을 위하여 *TEF1* 이나 *RPB2* 유전자를 제외한 다른 유전체 부위를 비교 분석하였다. 먼저 지금까지 문헌상 염기서열이 밝혀진 *F. culmorum* 유전자 [phosphate permease 유전자 (*Pip*) 와 *Tri101* 유전자] 를 NCBI 데이터베이스로부터 확보한 후, 각 유전자의 ortholog를 *F. graminearum* 종복합체 소속 야생균주의 유전체 데이터베이스 (본 과제책임자 연구진 해독) 로부터 추출하였다. 두 종에 속하는 균주로부터 확보한 약 0.9 kbp 크기의 *Pip* 유전자와 1.3 kbp 크기의 *Tri101* 유전자의 염기서열 정렬을 통해 두 종 사이의 변이 염기서열을 확인할 수 있었으며, 이들 부위로부터 특이 프라이머 조합을 제작할 수 있었다 (Tables 3-6 & 3-7, Figs. 3-24 to 3-25). 이들 프라이머는 모두 해당 유전자의 코딩 영역에 위치하였다. 프라이머 FculPiP nF/p1와 FculPiP nR/p1은 *Pip* 유전자로부터, 프라이머 FculTri101 nF/p1와 FculTri101 nR/p1는 *Tri101* 유전자의 염기서열로부터 제작되었다.

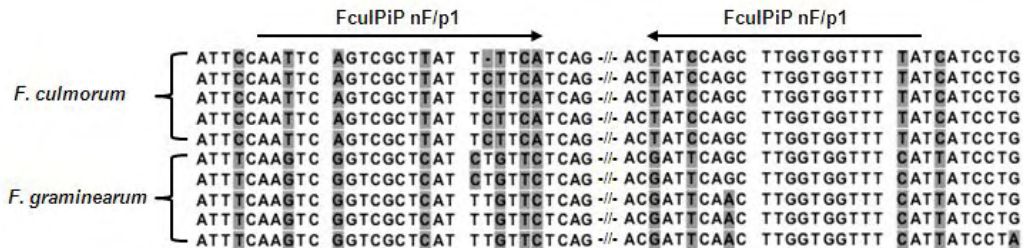


Fig. 3-24. Nucleotide alignment of the *PiP* genes from *F. culmorum* and *F. graminearum* isolates. The variant nucleotides among the two species isolates were indicated with shade boxes. //: discontinuity.

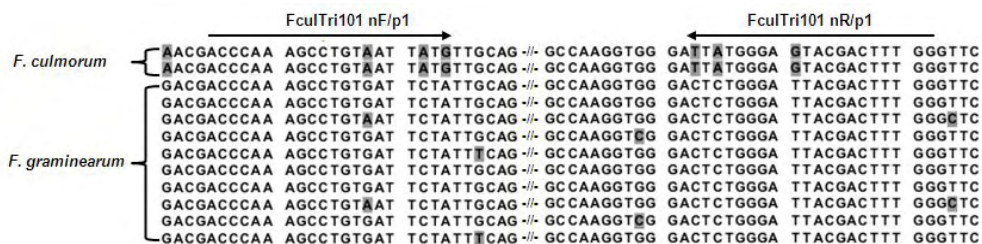


Fig. 3-25. Nucleotide alignment of the *Tri101* genes from *F. culmorum* and *F. graminearum* isolates. The variant nucleotides among the two species isolates were indicated with shade boxes. //: discontinuity.

여러 *Fusarium* 종 균주의 게놈 DNA를 대상으로 프라이머 조합 FculPiP nF/p1와 FculPiPnR/p1을 한 쌍으로 하거나(Fig. 25), 프라이머 FculTri101 nF/p1와 FculTri101 nR/p1을 한 쌍으로 하여(Fig. 3-26) PCR 증폭한 결과, 6 주의 분석대상 모든 *F. culmorum* 균주로부터 782 bp 와 778 bp 의 DNA 절편이 각각 증폭되었으나, 모든 분석대상 *F. graminearum* 종복합체 야생균주 (*F. graminearum sensu stricto*, *F. asiaticum*, *F. boothii*, *F. meridionale*) 로 부터는 해당 DNA 절편을 증폭하지 못하였다 (Figs 3-26 to 3-27). 한편, *F. graminearum* 종복합체와 가장 가까운 근연종 (*F. pseudograminearum*, *F. cerealis*) 뿐 아니라 그 밖의 근연종 (*F. sambucinum*, *F. sporotrichioides*) 균주로부터도 해당 DNA 절편이 증폭되지 못하였기 때문에 이를 통해 이들 프라이머 조합은 *F. culmorum* 의 종특이 프라이머로 최종 검증되었다.

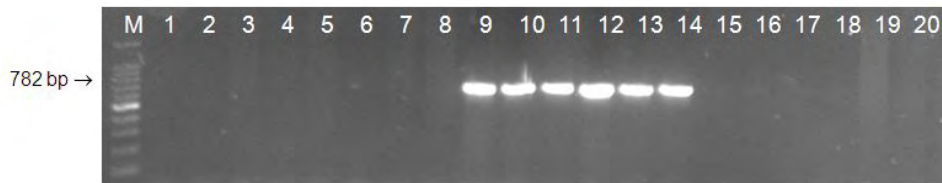


Fig. 3-26. PCR amplification of the *Pip* gene fragment from *F. culmorum*. Lanes M: a 100-kb ladder, 1-8: *F. graminearum* species complex isolates, 9-14: *F. culmorum* isolates, 15-16: *Fusarium* spp., 17: *F. cerealis*, 18: *F. pseudograminearum*, 19: *F. sambucinum*, 20: *F. sporotrichioides*.

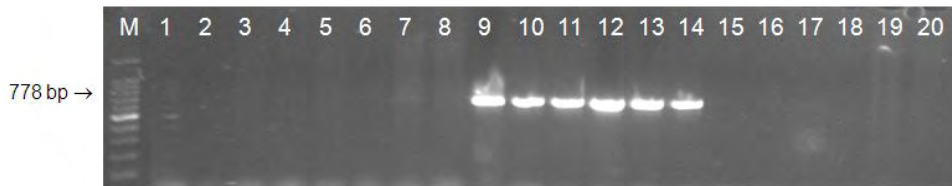


Fig. 3-27. PCR amplification of the *Tri101* gene fragment from *F. culmorum*. Lanes M: a 100-kb ladder, 1-8: *F. graminearum* species complex isolates, 9-14: *F. culmorum* isolates, 15-16: *Fusarium* spp., 17: *F. cerealis*, 18: *F. pseudograminearum*, 19: *F. sambucinum*, 20: *F. sporotrichioides*.

이 중 FculTri101 nF/p1와 FculTri101 nR/p1 프라이머 조합의 검출한계를 조사한 결과, 최소 1.5 pg/ μ l 농도 수준의 *F. culmorum* 게놈 DNA로부터 특정 DNA 절편을 증폭할 수 있음이 검정되었다 (Fig. 3-27).

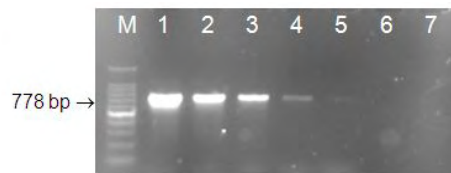


Fig. 3-28. Amplification of *Tri101* from *F. culmorum* genomic DNA with FculTri101 nF/p1 and FculTri101 nR/p1. M: a 100-bp ladder, Lane 1: fungal genomic DNA at 0.3 μ g/ml; 2-7: 10-fold serial dilutions of genomic DNA in lane 1.

(2) 비검역종 *Fusarium* 곰팡이의 특이 프라이머

최근 *Fusarium* 속 곰팡이의 분류는 예전 단일 종으로 동정되었던 균주집단 내 계통발생학적 변이의 존재로 종복합체 (species complex) 개념을 도입하였다. 예를 들어 *F. graminearum* 의 경우, 이 그룹에 속하는 균주들이 전 세계적으로 15 개 이상의 지역 특이적 lineage (계통)로 나뉘면서 각각을 더 이상 lineage 가 아닌 계통발생학적 종 (phylogenetic species) 으로 구분한다. 즉, *F. graminearum* 종복합체 안에 *F. asiaticum*, *F. graminearum*, *F. boothii*, *F. meridionale*, *F. brasiliicum*, *F. mesoamericaum* 등의 여러 종들이 포함되어 있다. *G. fujikuroi* 종복합체의 경우도, 예전 mating population 으로 구분되었던 그룹들을 개별 종 (*F. fujikuroi*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. subglutinans* 등) 으로 포함하고 있다. 한편 예전부터 기주특이성에 따라 forma specialis 수준으로 분화를 인정하였던 *F. oxysporum* 과 *F. solani* 도 종복합체로 명명하였을 뿐 아니라 *F. semitectum* 도 종복합체로 추정하고 있음. 따라서 주요 *Fusarium* 종복합체 (주로 검역종을 포함하고 있는 복합체) 특이 프라이머 와 종복합체 내 종-특이 프라이머 조합을 이용하여 검역시료에 오염되어 있는 *Fusarium* 곰팡이의 검출·동정을 수행하고자 하였다.

Table 3-8. Species- or species-complex-specific primers designed or used for detection of non-quarantine *Fusarium* spp.

Primer	Sequence (5'→3')	Size (bp)	Specificity
Tpro1	CATCTTGGAAGACAACATGCT	150	derived from <i>TEF1</i> for detection of <i>F. proliferatum</i>
Tpro2	CAAGTGAAATCGGTGGGCAGA		
Rsemi1	GGAGAATCAAGATCTCGGTAC	355	derived from <i>RPB2</i> for detection of the putative <i>F. semitectum</i> species complex and <i>F. equiseti-incarnatum</i> species complex
Rsemi3	AAGTGTTGAGACTTTACTTAGC		
Rsol2	CGTCGCYATYGCTTGCTACTC	192	derived from <i>RPB2</i> for detection of the <i>F. solani</i> species complex
Rsol4	ACCYTGCTTCATACGAAGCGTCGA		
Roxy1	AGATGGTATCGTGGCTCCTGGTGTC CGTG	346	derived from <i>RPB2</i> for detection of the <i>F. oxysporum</i> species complex
Roxy3	GATATCGGGAGTAAGACCTTCTCG		
rp32	ACAAGTGTCCCTTGGGTCCAGG	680	derived from <i>PKS1</i> for detection of the fumonisin-producing <i>F. fujikuroi</i> species complex (Proctor et al., 2004)
rp33	GATGCTCTTGGAAGTGGCCTACG		
FoDL-1	TTTTACAGGCGCCAACGACAC	2054	derived from <i>MAT</i> locus for detection of <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> and f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>
FoMAT1-rev	CTCTCATGGGGCCGAAGTTTA		
RVER1	CCTTAACTACACTGAAATCTTTG	208	derived from <i>RPB2</i> for detection of <i>F. verticillioides</i>
RVER2	TATCACGACGTTGATGCGAC		
979 nF/p1	CGCCGATTTGAGGTTTGGAT	500	for <i>F. fujikuroi</i> , <i>F. proliferatum</i> , & <i>F. concentricum</i> (동시 검출)
979 nR/p1	GTTAGTTCTCTCGTCCCTCTTCTT		
999 nF/p1	GTTGGTCTGAATTGGGCTGTT	220	for <i>F. fujikuroi</i> & <i>F. proliferatum</i> (동시 검출)
999 nR/p1	CGCTTCCAGACACCACCAT		
946 nF/p1	TGGTCCGCTAATCCCTTCGAT	700	for <i>F. fujikuroi</i> & <i>F. concentricum</i> (동시 검출)
946 nR/p1	GTTTTGCAGCTGGGTCGATTTT		
950 nF/p1	CGGGCATTGTGAAAGAGGTAT	350	for only <i>F. fujikuroi</i>
950 nR/p1	AGGCGAGTGTACGGGTAGAT		
F. concentricum2-F	GTTTCGAGAAGGTTAGTCTCCT	170	for <i>F. concentricum</i>
F.concentricum2-R	CATTGAGATTGTGGAGAGGGC		
F.subglutinans-F	CCTTTGCCCATCGATTCTCCA	170	for <i>F. subglutinans</i>
F.subglutinans-R	TGAGAGGGCAGAAACGCGCATC		
FculRPB2 nF/p1	CTGGGRACACGAACTCAGACACAT	340	for the section <i>Fusarium</i>
FculRPB2 nR/p1	CCTCCAGTGTGAGACCTTACTCAA		
FculRPB2 nF/p1	CTGGGRACACGAACTCAGACACAT	310	for the section <i>Fusarium</i>
FculRPB2 nR/p2	TACTCAAAAGACACTCAATCAAAT GG		

(가) *Gibberella fujikuroi* 종복합체 소속 주요 종의 특이적 검출

*Fusarium*을 불완전세대로 갖는 곰팡이 종의 집단으로서 전 세계적으로 벼, 옥수수, 수수, 기장 등의 주요 곡물을 비롯한 각종 식물에 오염되어 주요 식물병해를 일으켜 막대한 경제적 손실을 초래한다 (Leslie and Summerell, 2006). 이 종복합체에는 현재 50 여종의 생물학적 종 (biological species) 과 계통발생학적 종 (phylogenetic species) 가 포함되어 있다 (Leslie and Summerell, 2006; Leslie et al., 2007; O'Donnell et al., 1998). 비록 이 종복합체 소속 종 중 우리나라의 *Fusarium* 검역종은 포함되어 있지 않으나 수입검역식물시료, 특히 곡

물시료에서 빈번히 발생할 가능성이 매우 높다. 이들 중 일부는 이병 또는 오염식물 내 식물호르몬인 지베렐린 뿐 아니라 푸모니신 이라는 폴리케티드 (polyketide) 계통의 곰팡이독소를 생성하여 사람과 가축에 심각한 중독증을 일으키기도 한다 (Marasas et al., 1988; Nelson et al., 1993 Munkvold and Desjardins, 1997; Marasas, 2001). 이러한 종들에는 *F. fujikuroi*, *F. verticillium*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. concentricum* 등이 대표적이다. 이들 종들은 모두 푸모니신을 생성하기 때문에 푸모니신 생합성 유전자인 *FUM1* (polyketide synthase 유전자) 유래 rp32 와 rp33 프라이머 조합 (Table 3-8) 을 사용할 경우, 이들 종들을 동시에 검출할 수 있음이 검증되었다. (Fig. 3-28). 하지만 이들 종은 포자의 모양을 비롯한 여러 균학적 특징이 서로 매우 비슷하기 때문에 형태적으로 구별하기 어렵다. 따라서 rp32 와 rp33 조합을 이용한 PCR 결과 양성반응을 보인 시료의 경우, 본 과제에서 개발한 여러 종특이 프라이머 를 사용하여 종 수준의 동정이 가능하다.

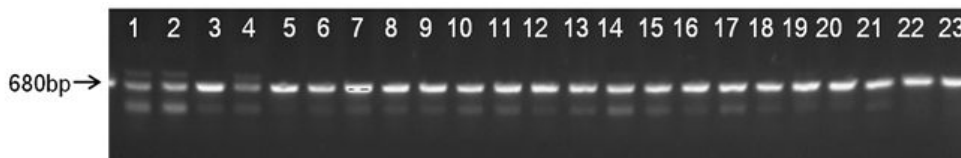


Fig. 3-29. Specific PCR amplification of the *G. fujikuroi* complex. (lanes 1-8: *F. verticillides*, lanes 9-15: *F. proliferatum*, 16-21: *F. fujikuroi*, lanes 22-23: *F. subglutinans*) [from Kang et al., 2011 (본 과제 성과물)].

① *F. verticillioides* 의 특이적 검출

F. verticillioides (완전세대: *G. moniliformis*, MP A)는 *G. fujikuroi* 종복합체 소속 중 중 푸모니신 고생산 종으로서 주로 옥수수에 빈번히 오염되어 줄기나 이삭에 뿌리 썩음병을 일으키나 (Jurjevic et al., 2005), 우리나라를 비롯한 세계 여러 지역의 벼에는 거의 오염 발생되지 않는다. 하지만 *F. verticillioides* 뿐 아니라 옥수수에 빈번히 오염되는 *G. fujikuroi* 종복합체 중에 *F. proliferatum* (*G. intermedia*, MP D 소속), *F. subglutinans* (*G. subglutinans*, MP E), *F. fujikuroi* (*G. fujikuroi*, MP C) 균주들도 푸모니신을 생성한다 (Jurjevic et al., 2005). 특히 *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* 균주의 종 특이적 동정과 검출을 위하여 특이 프라이머 조합의 개발이 시도되었다 (Mule et al., 2004; Patino et al., 2004; Sreenivasa et al., 2008; Yazeed et al., 2011). *F. verticillioies* 종 특이 프라이머를 제작하기 위하여 수집 균주의 *TEF1* 유전자 (Kim et al., unpublished data) 와 본 연구에서 증폭한 *RPB2* 유전자 염기서열을 사용하였다. ~680bp 크기의 *TEF1* 유전자 염기서열을 균주 별로 정렬하였을 경우, 3 종의 *G. fujikuroi* 종 복합체 균주 내에서 총 68 bp의 염기서열의 변이를 확인할 수 있었다. 하지만 이들 변이 부위는 증폭된 *TEF1* 유전자에 골고루 분포하고 있기 때문에 *F. verticillioides* 균주에 특이적인 프라이머를 제작할 정도의 연속적인 변이 부위를 찾기 어려웠다. 실제로 몇몇 변이부위로부터 제작한 프라이머 조합을 사용하여 PCR 증폭을 한 결과, *F. verticillioides* 균주 특이적 증폭 양상을 관찰할 수 없었다 (data not shown). 반면, ~970 bp 크기의 *RPB2* 유전자 염기서열의 정렬을 통해 총 50여 bp의 변이 서열을 확인하였으며, 이들 부위로부터 RVER1 과 RVER2 를 특이 프라이머 후보 조합으로 제작할 수 있었다. 이들 프라이머는 모두 *RPB2* 유전자의 코딩 영역에 위치함. RVER1 과 RVER2 조합을 이용한

PCR 증폭 결과, 3 종의 푸모니신 생성 *G. fujikuroi* 종 복합체 수집 균주들 중 오직 *F. verticillioides* 의 게놈 DNA로부터 208 bp의 DNA 절편이 특이적으로 증폭되었다 (Fig. 3-30). 이들 프라이머의 특이성을 좀 더 검정하기 위하여 이들 3 종 외 다른 *Fusarium* 속 곰팡이(*F. oxysporum*, *F. graminearum* 등)과 옥수수에서 자주 발생하는 *Fusarium* 속 외 다른 곰팡이 (*C. heterostrophus*, *C. carbonum*, 등) 의 게놈 DNA 를 주형으로 PCR 을 수행한 결과, 특이적 DNA 절편이 전혀 검출되지 않았다. 이를 통해 RVER1 과 RVER2 프라이머의 종 특이성이 검정되었다.

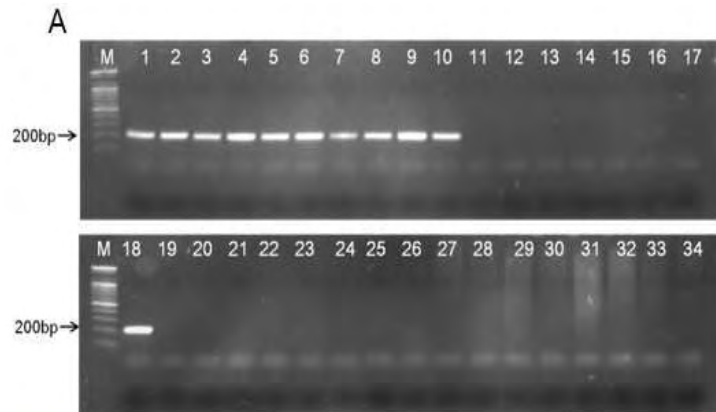


Fig. 3-30. Specific PCR amplification of *F. verticillioides*. (lane M: a 100bp ladder, lanes 1-10 & 18: *F. verticillides*, lanes 11-15: *F. fujikuroi*, lanes 16-17: *F. subglutinans*, lanes 19-27: *F. proliferatum*, 28-34: other *Fusarium* spp. (농진청 어젠다 과제와 공동사사)

한편, 기존에 제작된 *F. verticillioides* 증폭용 프라이머 조합 (VER1 과 VER2, Mulé et al., 2004)을 사용하였을 경우, 분석대상 곰팡이 균주 중 오직 *F. verticillioides* 균주로부터 특이 절편이 증폭되어, 본 연구에서 개발된 프라이머들의 특이성이 최소한 기존 개발 프라이머와 비슷함을 알 수 있었다. 하지만 본 연구에서 개발된 특이 프라이머는 지금까지 시도되지 않았던 *RPB2* 유전자로부터 제작되었기 때문에 칼모듈린 (calmodulin) 유전자 (Mulé et al., 2004), *TEF1* 유전자(Bezuidenhout et al., 2006), 유전자간 스페이스 서열(intergenic spacer sequence, IGS) 부위(Patino et al., 2004; Sreenivasa et al., 2008), RAPD 표지인자(Yazeed et al., 2011) 등으로부터 유래된 기존 특이 프라이머 조합들과 달리 신규성을 갖는다고 할 수 있다.

그리고 RVER1과 RVER2 프라이머의 검출한계를 검정하기 위하여 *F. verticillioides* 균주 게놈 DNA를 125 µg/ml의 농도로부터 10배씩 희석하여 PCR을 수행한 결과, 0.125 pg/µl 수준의 곰팡이 DNA로부터도 특이 DNA 절편을 증폭할 수 있었다 (Fig. 29). 한편, 여러 곡물 시료로부터 *F. verticillioides* 의 PCR 검출여부를 검정하기 위하여, 200mg 의 벼와 옥수수 시료로부터 Food Kit (NucleoSpin©Food, Germany)를 이용하여 게놈 DNA를 추출한 후, 위에서 언급한 조건으로 PCR 을 수행하였다. 실험 결과, 총 5 종의 옥수수 시료 중 3 종에서 특이 절편이 검출되었으나 총 10 종의 벼 시료로부터는 특이 절편이 증폭되지 않았다 (Fig. 3-30). 한편, RVER1과 RVER2 프라이머 조합은 이들에 의해 증폭된 DNA 절편의 크기 (208 bp)를 고려할 때 향 후 정량적 실시간 PCR (qRT-PCR) 을 이용한 식물시료 내 *F. verticillioides* 오염의 정량적 분석에도 사용 가능하다.

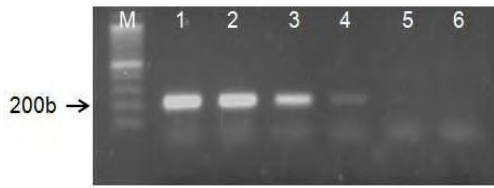


Fig. 3-31. Amplification of *RPB2* from *F. verticillioides* genomic DNA with RVER1 and RVER2. M: a 100-bp ladder, Lane 1: fungal genomic DNA at 0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 2-6: 10-fold serial dilutions of genomic DNA in lane 1.

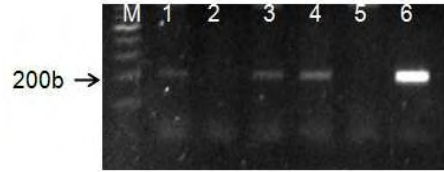


Fig. 3-32. Amplification of the *F. verticillioides*-specific DNA fragment from genomic DNA of corn samples using RVER1 and RVER2. M: a 100-bp ladder, Lanes 1-5: corn genomic DNAs, 6: fungal genomic DNA

② *F. proliferatum* 의 특이적 검출

*F. proliferatum*은 *G. fujikuroi* 종 복합체 (MP D, 완전세대: *G. intermedia*) 내 푸모니신 고생산 종으로서 *F. verticillioides* 와 달리 옥수수 뿐 아니라 밀, 보리 등에서 빈번히 검출될 뿐 아니라 옥수수 등에서는 *F. verticillioides* 와 함께 검출되기도 하며 때때로 black point symptoms를 일으킨다. 또한 바나나, 소나무, 아스파라거스, 야자수, 난 등의 다양한 식물에서도 검출된다. 이병식물 내에 푸모니신 뿐 아니라 모닐리포민 (moniliformin), 뷰베리신 (beauvericin), 푸사린산 (fusaric acid) 등의 다양한 독성물질을 생성한다. *F. proliferatum* 의 특이 검출·동정을 위하여 본 연구에서 증폭한 *G. fujikuroi* 종복합체 균주들의 *TEF1* 유전자 염기서열을 사용하였다. 총 680bp 크기 이하의 *TEF1* 유전자 염기서열의 정렬을 통해 총 68bp 의 변이 서열을 확인하였으며, 이들 부위로부터 TPRO1과 TPRO2 를 특이 프라이머 후보 조합으로 제작하였다 (Table 3-8). 이들 프라이머는 모두 *TEF1* 유전자의 코딩 영역에 위치한다. PCR 결과 3 종의 푸모니신 생성 *G. fujikuroi* 종 복합체 수집 균주들 중 오직 *F. proliferatum* 의 게놈 DNA로부터 150bp의 DNA 절편이 특이적으로 증폭되었다 (Fig. 3-31, Table 3-9). 이들 프라이머의 특이성을 좀 더 검정하기 위하여 이들 3 종 외 다른 *Fusarium* 속 곰팡이(*F. oxysporum*, *F. gramineum* 등)의 게놈 DNA를 주형으로 PCR을 수행한 결과, 특이적 DNA 절편이 전혀 검출되지 않았음 (데이터 미포함). 이를 통해 TPRO1과 TPRO2 프라이머의 종특이성이 검정되었음. 한편, 기존에 개발된 *F. proliferatum* 증폭용 프라이머 조합 PRO1과 PRO2 (Mulé et al., 2004) 의 경우, *F. proliferatum* 뿐 아니라 *F. verticillioides* 로부터도 예상 크기의 DNA조각이 증폭되어 특이성이 의심되었다 (Table 3-9). 이를 통해 기존 프라이머 조합에 비해 TPRO1과 TPRO2의 종 특이성이 뛰어난을 알 수 있었다. 한편 최근 Jurado 등 (2010) 에 의해 새롭게 개발된 *F. proliferatum* 특이 프라이머는 푸모니신 생합성 *FUM1* 유전자의 염기서열로부터 유래하였으며, 모든 분석대상 *F. proliferatum* 으로부터 예상 크기의 DNA 조각을 증폭하였다. 하지만 *F. fujikuroi* 와 *F. globosum* 균주의 일부 균주로부터도 같은 크기의 DNA 조각을 증폭하였다. 따라서 본 과제를 통해 개발된 TPRO1 과 TPRO2 는 지금까지 개발된 *F. proliferatum* 특이 프라이머와 달리 *TEF1* 유전자의 염기서열로부터 유래하여 신규성을 가질 뿐 아니라, 종 특이성이 현저히 뛰어나다고 할 수 있다. 한편 TPRO1과 TPRO2 프라이머의 검출한계를 검정하기 위하여 *F. proliferatum* 균주 게놈 DNA를 425ng/ μl 의 농도로부터 10배씩 희석하여 PCR을 수행한 결과, 0.425pg/ μl 수준의 곰팡이 DNA로부터 특이 프라이머를 증폭할 수 있었음 (Fig. 3-32). 또한 증폭 DNA 의 크기가 200 bp 이하이기 때문에 추후 정량적 실

시간 PCR (qRT-PCR) 방법에도 적용이 충분히 가능하다.

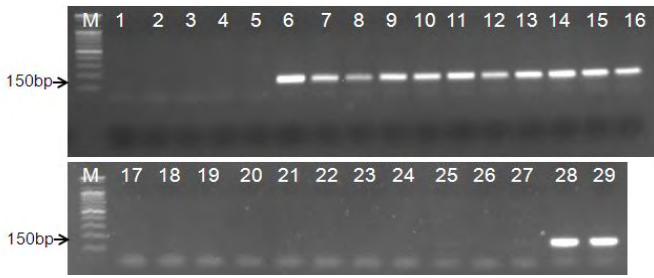


Fig. 3-33. Specific PCR amplification of *F. proliferatum* (lane M: a 100bp ladder, lanes 1-5: *F. verticillides*, lanes 17-24: *F. fujikuroi*, lanes 26-27: *F. subglutinans*, lanes 6-16 & 28-29: *F. proliferatum*).

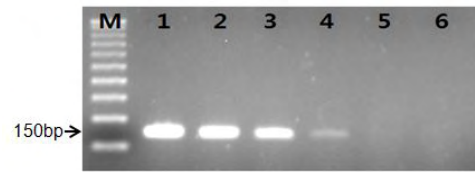


Fig. 3-34. Amplification of *TEF1* from *F. proliferatum* genomic DNA with RVER1 and RVER2. M: a 100-bp ladder, Lane 1: fungal genomic DNA at 0.125 μ g/ml; 2-6: 10-fold serial dilutions of genomic DNA in lane 1.

③ *F. fujikuroi* 의 특이적 검출

F. fujikuroi (MP C, 완전세대: *G. fujikuroi*)는 *G. fujikuroi* 종 복합체 중 중 *F. verticillioides*, *F. proliferatum* 과 달리 푸모니신 저생산 종 또는 저생산 종이다. 하지만 벼에 지베렐린을 다량 생성하여 벼키다리병을 일으켜 막대한 손실을 초래한다. 또한 이병식물 내에 지베렐린뿐 아니라 카로티노이드 (carotenoids), 모닐리포민 (moniliformin), 뷰베리신 (beauvericin) 등의 다양한 독성물질을 생성한다. *F. fujikuroi* 는 전 세계적으로 벼 뿐 아니라 옥수수에 빈번히 오염된다. 본 과제책임자는 우리나라 *F. fujikuroi* B14 균주의 유전체를 Illumina HiSeq 기술로 해독하였다 (Jeong et al., 2013). 최종 유전체 assembly 는 총 333 scaffolds 내 454 contigs 로 구성되어 있으며, AUGUST tool을 이용하여 총 14,017 유전자를 예측하였다. 이 중 BLASTP 검색을 통해 13,734 유전자가 동정되었다. B14 균주의 유전체는 지금까지 해독된 *Fusarium* 속 유전체 중 *F. verticillioides* 7600 균주와 가장 유사하였다 (83% coverage). 한편 *F. oxysporum* 4287 균주와 *F. graminearum* PH-1 균주의 유전체와는 각각 57%, 29% 의 % coverage를 보였다. *F. fujikuroi* 특이 프라이머는 *F. verticillioides*, *F. proliferatum* 의 경우와 달리 아직까지 제작된 적이 없다. 본 과제에서도 *TEF1*, *RPB2*, *TUB1*, calmodulin 유전자의 염기서열을 이용하여 *F. fujikuroi* 종 특이 프라이머 제작을 시도 하였으나 특히 *F. fujikuroi*, *F. proliferatum* 사이를 구별할 수 있는 프라이머 제작에 실패하였다. 이는 *F. fujikuroi* 와 *F. proliferatum* 이 서로 매우 유사함을 뒷받침한다. 따라서 *F. fujikuroi* 종특이 검출을 위하여 보다 광범위한 유전체 수준에서 *G. fujikuroi* 종복합체 소속 균주의 유전체의 비교분석이 필요하다. 이를 위해 *F. fujikuroi* B14 유전체의 Illumina reads를 *F. verticillioides* 7600 유전체에 mapping 하여, unmapped 되는 reads를 얻었다. 이들을 *de novo* assembly를 통해 보다 긴 assembly를 얻은 후, NCBI 검색을 통해 단백질 서열을 가지고 있는 unmapped contig를 선별하였다. 또한 *F. fujikuroi* 와 그 외 다른 *G. fujikuroi* 종복합체 소속 종 (*F. proliferatum*, *F. sacchari*, *F. globosum*, *F. verticillioides*)이 갖고 있는 지베렐린 생합성 유전자군 (비록 지베렐린은 *F. fujikuroi* 만 생성) 내 cytochrome P450 monooxygenase (P450-1, P450-4) 유전자의 염기서열 (Malonek et al., 2005)을 바탕으로 총 26 종의 프라이머 조합을 제작하였다. 이 들 프라이머 조합의 특이성은 *F. fujikuroi* 와 가장 가까운 *F. proliferatum* 을 비롯하여 *F. verticillioides*, *F. subglutinans*, *F. concentricum* 의 *G. fujikuroi*

중복합체 소속 종과 *F. commune*, *F. oxysporum* 의 게놈 DNA를 이용하여 검정하였다. 실험 결과, *F. fujikuroi* 만 종특이적으로 증폭하는 프라이머조합은 1 종에 불과하였으나, 그 외 여러 종류의 프라이머 조합을 사용할 경우, *F. fujikuroi* 종 특이적으로 검출할 수 있었다.

㊸ 프라이머 조합 979 nF/p1 + 979 nR/p1: 이 조합을 이용한 PCR 결과, *F. fujikuroi* 뿐 아니라 *F. proliferatum*, *F. concentricum* 으로부터 500bp 크기의 DNA 절편이 동시에 증폭되었다 (Fig. 3-35). 이 프라이머 조합은 이 들 3 종의 *G. fujikuroi* 중복합체 소속 종의 동시 검출에 유용하다.

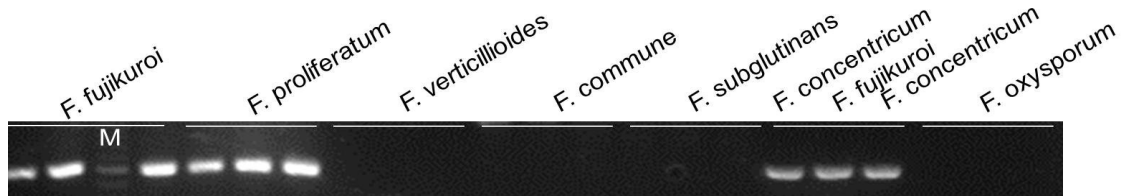


Fig. 3-35. PCR amplification of *F. fujikuroi*, *F. proliferatum*, and *F. concentricum* with the primers 979 nF/p1 + 979 nR/p1. M: 100-bp ladder.

㊹ 프라이머 조합 999 nF/p1 + 999 nR/p1: 이 프라이머 조합을 이용한 PCR 결과, *F. fujikuroi* 와 *F. proliferatum* 로부터 220bp 크기의 DNA 절편이 동시에 증폭되었다 (Fig. 3-36). 이 프라이머 조합은 이 들 2 종의 *G. fujikuroi* 중복합체 소속 종의 동시 검출에 유용하다.

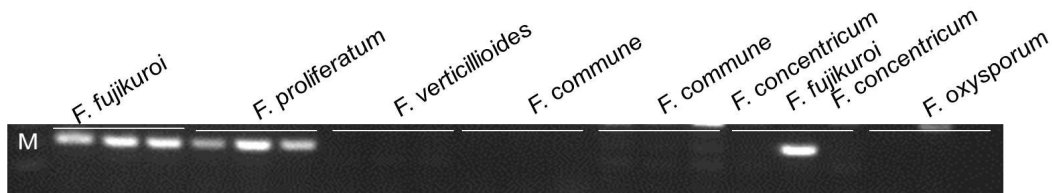


Fig. 3-36. PCR amplification of *F. fujikuroi* and *F. proliferatum*, and *F. concentricum* with the primers 999 nF/p1 + 999 nR/p1. M: 100-bp ladder.

㊺ 프라이머 조합 946 nF/p1 + 946 nR/p1: 이 프라이머 조합을 이용한 PCR 결과, 모든 분석 대상 *F. fujikuroi* 와 일부 *F. concentricum* 균주로부터 700 bp 크기의 DNA 절편이 동시에 증폭되었다 (Fig. 3-37). 이 프라이머 조합은 다음의 프라이머조합과 함께 사용할 경우, *F. fujikuroi* 종특이 검출에 사용할 수 있다.



Fig. 3-37. PCR amplification of all of the examined *F. fujikuroi* and one isolates of *F. concentricum* with the primers 946 nF/p1 + 946 nR/p1. M: 100-bp ladder.

㉔ 프라이머 조합 950 nF/p1 + 950 nR/p1: 이 프라이머 조합을 이용한 PCR 결과, 모든 분석 대상 *F. fujikuroi* 균주에서만 350 bp 크기의 DNA 절편이 특이적으로 증폭되었다 (Fig. 38). 이 프라이머 조합은 단독으로, 또는 앞의 946 nF/p1 + 946 nR/p1 프라이머조합과 함께 사용할 경우, *F. fujikuroi* 종특이 검출에 사용할 수 있었다. 좀 더 많은 *F. fujikuroi* 균주를 대상으로 하는 PCR의 경우에도 종특이적 증폭을 관찰할 수 있었다.

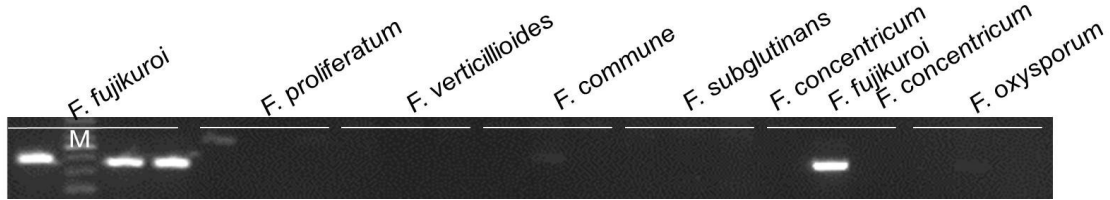


Fig. 3-38. Specific PCR amplification of *F. fujikuroi* with the primers 950 nF/p1 +950 nR/p1. M: 100-bp ladder.

④ *F. concentricum*의 특이적 검출

앞서 기술한 *F. fujikuroi*의 종특이 검출을 위해 유전체 분석을 통해 제작한 프라이머 조합의 대부분은 *F. fujikuroi* 뿐 아니라 또 다른 *G. fujikuroi* 종복합체 소속 종인 *F. concentricum*의 일부 균주도 증폭하였다. *F. concentricum*은 Asian brown plant hopper에서 처음 동정 (Nirenberg and O'Donnell, 1998)된 이래 벼에서 검출이 확인되었으나, 식물 병원성, 푸모니신 생성 여부 등은 아직 밝혀지지 않았다 (모닐리포민 생성 능력이 밝혀짐). 이들 프라이머 조합에 의한 *F. fujikuroi* 종특이 검출을 다시 한 번 확정하기 위하여, *F. concentricum* RPB2 유전자 염기서열을 여러 근연종의 염기서열과 비교 정렬하여 2종의 프라이머 조합을 제작하였으며, 이 중 프라이머 조합 F. concentricum2-F + F. concentricum2-R이 *F. concentricum*의 게놈 DNA로부터 170 bp 크기의 종특이적 DNA 절편을 증폭하였다 (Fig. 39). 반면, *F. fujikuroi*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. commune*, *F. subglutinans*, *F. oxysporum* 균주로부터는 해당 DNA 절편이 증폭되지 않았다. 이 프라이머 조합을 이용한 PCR 결과, *F. fujikuroi* 균주가 증폭되지 않았기 때문에 *F. concentricum*의 종특이 검출 뿐 아니라, *F. fujikuroi* 종특이 검출의 negative control로도 유용하게 사용할 수 있다.

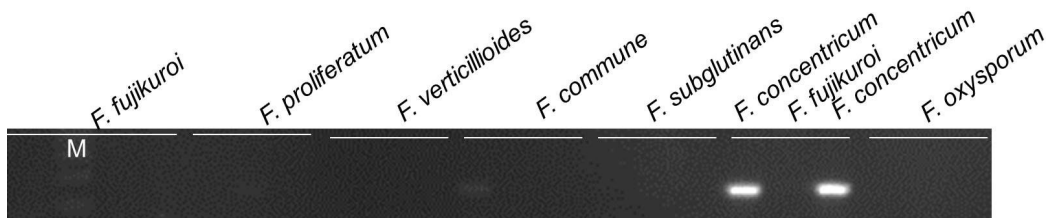


Fig. 3-39. Specific PCR amplification of *F. concentricum* with the primers F. concentricum2-F + F.concentricum-R. M: 100-bp ladder.

⑤ *F. subglutinans*의 특이적 검출

F. subglutinans (MP E, 완전세대: *G. subglutinans*)는 *G. fujikuroi* 종복합체 소속 종으로서, 전 세계적으로 옥수수, 망고, 파인애플, 소나무를 비롯한 다양한 식물에 오염되어 여러

식물병을 일으킬 뿐 아니라 계통학적으로 서로 다른 lineage 로 세분화되어 있다. 본 과제에서는 벼를 비롯한 곡물에 주로 발생하는 *F. subglutinans* 종특이적으로 검출하기 위하여 *TEF1* 유전자의 염기서열로부터 유래한 *F. subglutinans* 종특이 프라이머 조합 (F.subglutinans-F + F.subglutinans-R)을 제작하였다. PCR 증폭결과, 분석대상의 모든 *F. subglutinans* 를 제외한 다른 *G. fujikuroi* 종복합체 소속 종의 균주는 170 bp 크기의 특정 DNA 절편이 증폭되지 않았다 (Fig. 3-40). 이를 통해 F.subglutinans-F + F.subglutinans-R 의 프라이머 조합은 *F. subglutinans* 의 종특이 검출에 유용하게 사용할 수 있음이 검증되었다.

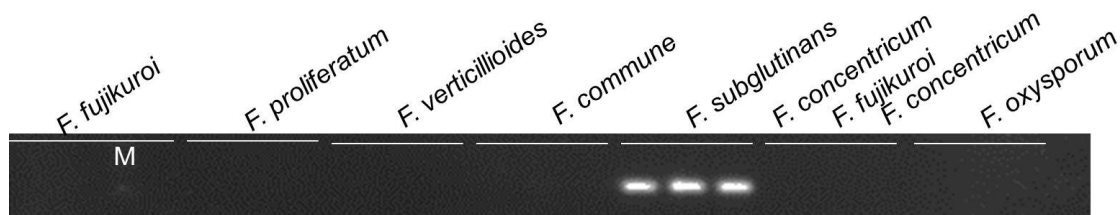


Fig. 3-40. Specific PCR amplification of *F. subglutinans* with the primers F.subglutinans-F + F.subglutinans-R. M: 100-bp ladder.

Table 9. PCR amplification from *G. fujikuroi* species complex isolates using several primer pairs

Species	isolate	Host	Origin	Primer pairs				
				PRO1/2	VER1/2	rp32/33	RVER1/2	TPRO1/2
<i>F. fujikuroi</i>	K44021	rice seed	KACC(Korea)	+	-	+	-	-
	K44019	rice seed	KACC(Korea)	+	-	+	-	-
	K44017	rice seed	KACC(Korea)	+	-	+	-	-
	K44015	rice seed	KACC(Korea)	+	-	+	-	-
	K44010	rice seed	KACC(Korea)	+	-	+	-	-
	K44009	rice seed	KACC(Korea)	+	-	+	-	-
	K44004	rice seed	KACC(Korea)	+	-	+	-	-
	K42687		KACC	+	-	+	-	-
	K42686		KACC	+	-	+	-	-
	os5	corn	Kim et al	-	-	+	-	-
	os6	corn	Kim et al	+	-	+	-	-
	os8	corn	Kim et al	-	-	+	-	-
	os11	corn	Kim et al	-	-	+	-	-
	os25	corn	Kim et al	+	-	+	-	-
	B3	rice	Kim et al	-	-	+	-	-
	B6	rice	Kim et al	+	-	+	-	-
	B10	rice	Kim et al	+	-	+	-	-
	B14	rice	Kim et al	-	-	+	-	-
	B15	rice	Kim et al	-	-	+	-	-
	V21	rice	Kim et al	+	-	+	-	-
	V27	rice	Kim et al	+	-	+	-	-
	V38	rice	Kim et al	+	-	+	-	-
	V42	rice	Kim et al	+	-	+	-	-
	V66	rice	Kim et al	+	-	+	-	-
	C14-v13	corn	Kim et al	+	-	+	-	-
	C12-v11	corn	Kim et al	+	-	+	-	-
C7a-v3	corn	Kim et al	+	-	+	-	-	
C7b-v41	corn	Kim et al	+	-	+	-	-	
C7a-v4	corn	Kim et al	+	-	+	-	-	
C6-v4	corn	Kim et al	+	-	+	-	-	
<i>F. proliferatum</i>	K44025	rice seed	KACC(Korea)	+	-	+	-	+
	K44024	rice seed	KACC(Korea)	+	-	+	-	+
	K42694		KACC	+	-	+	-	+
	K42693		KACC	+	-	+	-	+

	K42692		KACC(China)	+	-	+	-	+
	os17	corn	Kim et al	-	-	+	-	+
	os18	corn	Kim et al	-	-	+	-	+
	os30	corn	Kim et al	-	-	+	-	+
	os32	corn	Kim et al	+	-	+	-	+
	os46	corn	Kim et al	+	-	+	-	+
	os58	corn	Kim et al	+	-	+	-	+
	os65	corn	Kim et al	+	-	+	-	+
	os66	corn	Kim et al	+	-	+	-	+
	B2	rice	Kim et al	+	-	+	-	+
	B43	rice	Kim et al	+	-	+	-	+
	V90	rice	Kim et al	+	-	+	-	+
	V107	rice	Kim et al	+	-	+	-	+
	V116	rice	Kim et al	+	-	+	-	+
	V170	rice	Kim et al	+	-	+	-	+
	V217	rice	Kim et al	+	-	+	-	+
	V219	rice	Kim et al	+	-	+	-	+
	V233	rice	Kim et al	+	-	+	-	+
	C10e-v24	corn	Kim et al	+	-	+	-	+
	C6-v5	corn	Kim et al	+	-	+	-	+
	C7b-v18	corn	Kim et al	+	-	+	-	+
	C7b-v13	corn	Kim et al	+	-	+	-	+
	C6-v2	corn	Kim et al	+	-	+	-	+
	C5-v6	corn	Kim et al	+	+	+	-	+
<i>F</i>	K42699		KACC	-	+	+	+	-
<i>verticilliodes</i>	K42698		KACC(China)	-	+	+	+	-
	K41321		KACC	-	+	+	+	-
	os9	corn	Kim et al	+	+	+	+	-
	os14	corn	Kim et al	+	+	+	+	-
	os20	corn	Kim et al	-	+	+	+	-
	os21	corn	Kim et al	-	+	+	+	-
	os24	corn	Kim et al	-	+	+	+	-
	os26	corn	Kim et al	+	+	+	+	-
	os34	corn	Kim et al	-	+	+	+	-
	os35	corn	Kim et al	-	+	+	+	-
	os40	corn	Kim et al	-	+	+	+	-
	os44	corn	Kim et al	-	+	+	+	-
	os45	corn	Kim et al	-	+	+	+	-
	os48	corn	Kim et al	-	+	+	+	-
	os52	corn	Kim et al	-	+	+	+	-
	os53	corn	Kim et al	-	+	+	+	-
	os67	corn	Kim et al	-	+	+	+	-
	B1	rice	Kim et al	+	+	+	+	-
	B26	rice	Kim et al	+	+	+	+	-
	C12-v32	corn	Kim et al	+	+	+	+	-
	C8e-v1	corn	Kim et al	+	+	+	+	-
	C8e-v50	corn	Kim et al	+	+	+	+	-
	C7a-v39	corn	Kim et al	+	+	+	+	-
	C10e-v52	corn	Kim et al	+	+	+	+	-
	C10e-v30	corn	Kim et al	+	+	+	+	-
	C8e-v5	corn	Kim et al	+	+	+	+	-
	C7a-v25	corn	Kim et al	+	+	+	+	-
<i>F.</i>	OS12	corn	Kim et al	+	-	+	-	-
<i>subglutinans</i>	OS13	corn	Kim et al	+	-	+	-	-
	OS23	corn	Kim et al	+	-	+	-	-
	OS47	corn	Kim et al	+	-	+	-	-

(나) *F. graminearum* 종복합체 포함 *Fusarium* section 의 동시 검출

F. graminearum 종복합체에는 현재 15 종 이상의 계통발생학적 종이 포함되어 있다. 전 세계적으로 분포하며, 벼, 밀, 옥수수, 보리 등 곡물에 주로 발생하여 병을 일으킬 뿐 아니라 곰팡이독소생성으로 공중보건 측면을 포함하여 막대한 경제적 손실을 초래한다. 우리나라에는 현재까지 4 종 (*F. graminearum*, *F. asiaticum*, *F. boothii*, *F. meridionale*) 의 분포가 확인되었다. *F. graminearum* 종복합체 소속 종 중 우리나라 검역종으로 등재된 종은 없으나 이 복합체와 매우 비슷한 *F. culmorum* 이 검역종으로 등재되어 있다. *F. culmorum* 종특이 프라이머의 제작 및 검정은 앞서 기술하였다. *F. graminearum* 종복합체를 포함한 *Fusarium* section 에 속하는 종들을 동시에 검출하기 위하여 본 과제에서 확보한 각종 *Fusarium* 속 곰팡이의 RPB2 유전자 염기서열을 정렬 비교한 후 *Fusarium* section (*F. graminearum* 종복합체, *F. pseudograminearum*, *F. culmorum*, *F. sambucinum*, *F. cerealis* 포함) 에만 특이적인 프라이머 조합 2 종 (FculRPB2 nF/p1 + FculRPB2 nR/p1, FculRPB2 nF/p1 + FculRPB2 nR/p2)을 제작하였다. 이들 프라이머 조합을 이용한 PCR 증폭 결과, *Fusarium* section 에 포함되는 *Fusarium* 종 곰팡이로부터는 각각 340 bp 와 310 bp 크기의 DNA 절편이 증폭된 반면, *G. fujikuroi* 종복합체 소속 종 뿐 아니라 *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. equiseti*, *F. stilboides*, *F. semitectum* 등의 다른 *Fusarium* 종 곰팡이로부터는 증폭되지 않았다 (Fig. 3-41). 이를 통해 2 종 프라이머 조합은 검역시료로부터 분리한 붉은색의 *Fusarium* 추정 곰팡이의 광범위한 동정에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

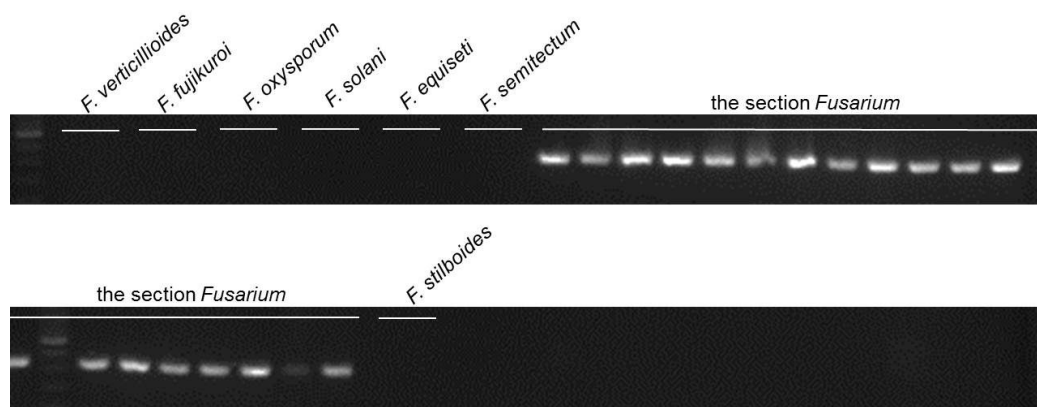


Fig. 3-41. Simultaneous PCR amplification of the species belonging to the section *Fusarium*. with the primers FculRPB2 nF/p1 and FculRPB2 nR/p1.

(다) *F. solani* 종복합체 소속 종의 동시 검출

현재 45 종 이상의 계통발생학적 종이 포함되어 있으며, 이 중 대부분은 전 세계적으로 토양과 각종 식물의 잔재물에 분포한다. 곡물과 채소류 등에 빈번히 발생하여 막대한 경제적 손실을 초래할 뿐 아니라 최근 면역력이 저하된 사람의 감염균으로도 주목받고 있다. *F. solani* f. sp. *cucurbitae* 가 우리나라에서 *F. solani* 종복합체 소속 검역종으로 등재되어 있다. RPB2 염기서열에서 유래한 primer 조합 Rsol2 와 Rsol4 은 *F. solani* f. sp. *cucurbitae* race 1 과 race 2 뿐 아니라 분석대상 모든 *F. solani* 종복합체 균주의 게놈 DNA 로부터 192bp 크기의 종복합체 특이 DNA 조각을 증폭한다. 하지만 *F. solani* 종복합체를 제외한 다른 *Fusarium*

중복합체와 그 외 *Fusarium* 종들로부터는 아무런 DNA 조각을 증폭하지 않았다 (Fig. 40). 따라서 Rsol2 와 Rsol4 조합 (Table 3-9)의 PCR 에서 양성반응을 보인 시료의 경우, *F. solani* f. sp. *cucurbitae* race 1과 race 2 특이적인 프라이머 조합 (Fsc1/Tsol1R 과 Fsc2/Tsol1R) (Table 3-6) 으로 검역종의 오염 여부를 추가 검정할 수 있다. 이 때 음성반응이 나온 시료의 경우, 비검역 *F. solani* 중복합체의 검출로 판정할 수 있다.

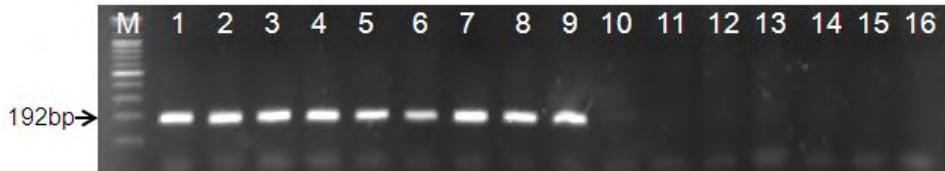


Fig. 3-42. Specific PCR amplification of the *F. solani* complex (lane M: a 100bp ladder, lanes 1-3 : *F. solani* , lanes 4-9 : *F. solani cucurbitae* race 1 & 2, lanes 10-16 : other *Fusarium* spp.)

(라) *F. oxysporum* 중복합체 소속 종의 동시 검출

현재까지 150 여 종의 식물을 감염시키는 종들이 포함되어 있음. 또한 식물병원균으로서뿐 아니라 부생균 또는 endophyte 로서 각종 식물에 발생하여 막대한 경제적 손실을 일으킨다. 현재까지 *Fusarium* 중복합체 중 가장 많은 종으로 구성되어 있다. 우리나라에서는 *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, f. sp. *cubense*, f. sp. *citri*, f. sp. *cattayae* 와 최근까지 이 복합체에 포함되었다가 독립된 종으로 구분되기 시작한 *F. redolens* (*F. oxysporum* var. *redolens*) 가 검역종으로 등재되어 있다. *TEF1* 에서 유래한 primer 조합 Roxy1 과 Roxy3 (Table 3-9) 는 분석대상 *F. oxysporum* 중복합체 대부분과 일부 *G. fujikuroi* 중복합체 균주의 게놈 DNA 로부터 346bp 크기의 중복합체 특이 DNA 조각을 증폭하였다 (Fig. 3-43).

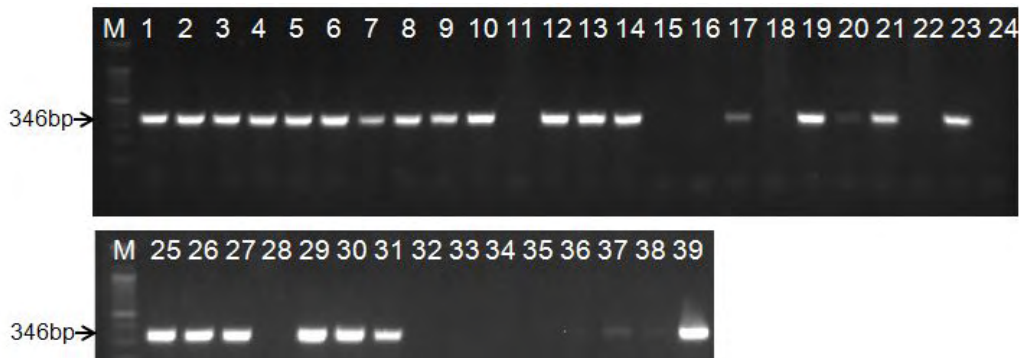


Fig. 3-43. Specific PCR amplification of the *F. oxysporum* complex using Roxy1 and Roxy3 (M: a 100bp ladder, lanes 1-6: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* , lanes 7-15 & 39: *F. oxysporum* lanes 16-24: *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, lanes 25-31: *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, lanes 32-36: *F. solani* complex, lanes 37-38: *F. redolens*).

또한, *MAT* 유전자 유래 primer 조합 FoDL-1과 FoMAT1-rev (Table 3-9) 은 분석대상 *F. oxysporum* 중복합체 중 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 와 *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* 종 대부분과 그 외 f. sp 수준이 규명되지 않은 일부 *F. oxysporum* 균주의 게놈 DNA 로부터 2,054bp 크기의 특이 DNA 조각을 증폭하였다. 이 primer 조합의 경우 교배형이 *MAT1-1* 인 균주에만 반응하지만 다른 *Fusarium* 중복합체로부터는 아무런 DNA 조각을 증폭하지 않았기 때문에 위의 Roxy1 과 Roxy3 primer 조합과 상호보완적으로

사용이 가능하다 (Fig. 3-44).

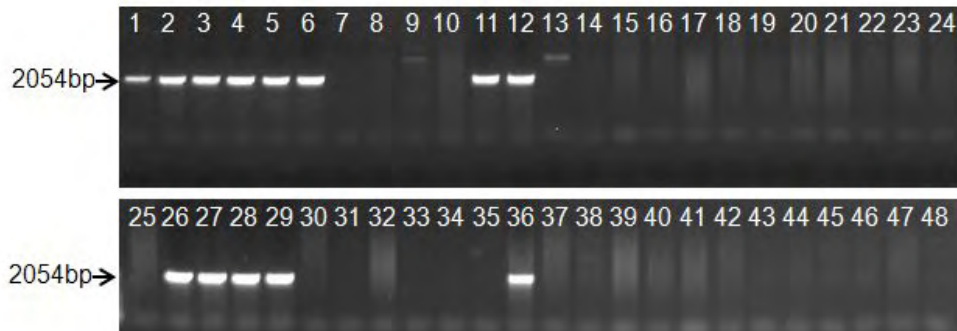


Fig. 3-44. Specific PCR amplification of the *F. oxysporum* complex using FoDL-1 and FoMAT1-rev (lanes 1-6 : *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, lanes 7-15 & 36 : *F. oxysporum* lanes 16-24 : *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, lanes 25-32 : *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, lanes 33-35: *F. redolens*, lanes 37-40: *F. solani* complex, lanes 41-43: *F. semitectum* complex, lanes 44-46: *F. stilboides*, lanes 47-48: *F. gramineum*).

(마) *F. semitectum* 종복합체 소속 종의 동시 검출

전 세계적으로 분포하여 각종 식물병을 일으킨다. 다른 *Fusarium* 종복합체와 달리 *F. semitectum* 그룹은 아직 명확한 종복합체로 명명되지 않으나 최근 계통발생학 연구를 통해 종복합체로서의 가능성이 제시되었다. 현재까지 2 종류의 variety (*F. semitectum* var. *semitectum*, *F. semitectum* var. *majus*) 로만 구분되어 있으며 이 중 우리나라에서는 *F. semitectum* var. *majus* 가 검역종으로 등재되어 있다. 하지만 *F. equiseti-incarnatum* 종복합체 소속 *F. incarnatum* 의 경우, *F. semitectum* 으로 동정되기 때문에 이 들 사이의 명확한 계통발생학적 유연관계 분석이 시급하다. *RPB2* 로부터 유래된 primer 조합 Rsemi1 과 Rsemi3 (Table 3-9) 는 *F. semitectum* var. *majus* 를 포함한 분석대상 모든 *F. semitectum* 균주로부터 355bp 크기의 종복합체 특이 DNA 조각을 증폭하며, 분석대상의 다른 *Fusarium* 종복합체 (*F. equiseti-incarnatum* 종복합체 제외) 로부터는 특이 DNA 조각을 증폭하지 않아 종복합체 특이성이 검정되었다 (Fig. 3-45). Resemi1 과 Rsemi3 조합을 이용한 PCR 결과, 양성반응을 보인 시료의 경우, *F. semitectum* var. *majus* 특이 추정 primer 조합인 SmibolFM 과 Semi1RM 을 이용할 수 있다.

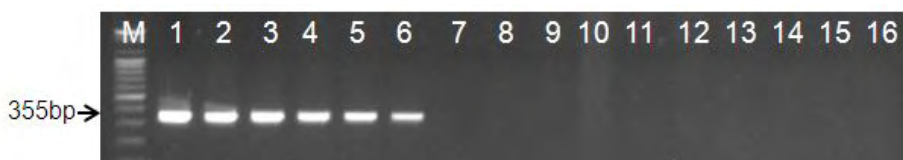


Fig. 3-45. Specific PCR amplification of the putative *F. semitectum* complex (lane M: a 100bp ladder, lanes 1-3: *F. semitectum*, lanes 4-5: *F. semitectum* var. *majus*, lanes 7-16: other *Fusarium* spp).

나. *Bipolaris/Drechslera/Cochliobolus* 속 검역종의 특이 검출

(1) *RPB2*, *TEF1* 유전자 염기서열 유래 특이 프라이머 조합

Fusarium 검역종과 달리 *Bipolaris/Drechslera/Cochliobolus* 종 곰팡이 균주들은 *RPB2* 와 *TEF1* 유전자의 염기서열의 비교만으로 종 수준의 구분이 명확하지 않았다. 더욱이 균주들 사이의 유전자 염기서열 변이가 종 특이 프라이머를 제작할 정도로 크지 않았다. 5 종의 *Bipolaris/Drechslera/Cochliobolus* 검역곰팡이의 특이 검출을 위한 프라이머 조합 (Table 3-10) 을 제작하여 PCR 증폭을 시도하였다.

Table 3-10. Specific primers designed for the quarantine *Bipolaris/Drechslera/Cochliobolus* species in this study

Primer	Sequence (5'-3')	primer specificity	amplified gene
G14-F1	GCGGCCGAGGTACTTACGACAGGT	for <i>C. victoriae</i> & <i>C. carbonum</i>	a subtractive clone G14 (unpublished data)
G14-R1	AGCGGAAATAAGCAAAGGCAGAGG		
G15-F1	CAGCAGGTGGAGAGGTTGAGG	for <i>C. victoriae</i> & <i>C. carbonum</i>	a subtractive clone G15 (unpublished data)
G15-R1	TATTGGGATTTATTTTGGAGTAG		
Victo-F1	CTACCCGAAGGCACCGACAT	for <i>C. victoriae</i> & <i>C. carbonum</i>	victoriocin gene from <i>C. victoriae</i>
Victo-R1	G TTCCTCCAGCACCAGCCCTTATC		
DirRf1	GCCATTGGCAACTACCCGATCG	for <i>D. iridis</i>	<i>RPB2</i>
DirRr1	GGTGCTTCGTAGTGGGGTTGGG		
DirRf2	AAAGCCATTGGCAACTACCCGA	for <i>D. iridis</i>	<i>RPB2</i>
DirRr3	TGCGGAACCTTGGTAGTTCGC		
AusTf1	GGCGAGTAGCCCTTTTCTTGTG	for <i>C. australiensis</i>	<i>TEF1</i>
AusTr1	AACGTCGTGAAGCAGCTGAACAG		
CynTf1	CTCTTTTATTTGTTTACATA	for <i>B. cynodontis</i>	<i>TEF1</i>
CynTr1	AAGAGTTGGCTGCGGAGAGAAC		

일반적인 PCR 증폭 조건은 “2min at 94°C, 30sec at 94°C, 30sec at 50°C-65°C, 30sec at 72°C, 3min at 72°C, 10min at 4°C” 이며, annealing temperature 는 primer 의 Tm 수치에 따라 조정하였다.

(가) *Drechslera iridis* 의 특이적인 검출

RPB2 유전자 염기서열에서 유래한 프라이머 조합 (DirRf1 과 DirRr1) (Table 3-10) 은 수집 곰팡이 총 68 주 중 *D. iridis* 2 균주 뿐 아니라 근연종인 *C. hawaiiensis* 3 균주, *C. victoriae* 1 균주, *C. homomorphus* 1 균주, *C. sativus* 1 균주, *B. sorhicola* 1 균주로부터 439bp 의 DNA 절편을 증폭하였다 (data not shown). *D. iridis* 균주의 특이적 PCR 검출을 위하여 제작한 두 번째 primer 조합 (DirRf2 와 DirRr3) 은 2 균주의 *D. iridis* 로부터 527bp 의 DNA 절편을 증폭하였으나 나머지 수집 곰팡이로부터는 특이 절편을 증폭하지 못하였음 (Fig. 3-46A).

(나) *Cochliobolus australiensis* 의 특이적인 검출

TEF1 유전자 염기서열에서 유래한 프라이머 조합 (AusTf1 과 AusTr1) (Table 3-10) 은 수집 곰팡이 총 68 주 중 *C. australiensis* 45206 균주로부터 196bp의 특이 DNA 절편을 증폭하였으며, 나머지 2 주의 *C. australiensis* 수집균주 뿐 아니라 다른 수집균주로부터는 특이

절편을 증폭하지 않았다 (Fig. 3-46B). 따라서 이 프라이머 조합의 종 특이성은 추후 검증이 필요하며, 증폭되지 않은 *C. australiensis* 균주의 종 동정 검증도 필요하다.

(다) *Bipolaris cynodontis* 의 특이적인 검출

TEF1 유전자 염기서열에서 유래한 프라이머 조합 (CynTf1 과 CynTr1) (Table 10) 은 수집 곰팡이 중 오직 *B. cynodontis* 44840 균주로부터 228bp 의 특이 DNA 절편을 증폭하였다 (Fig. 3-46C). 하지만 이 균주만이 유일한 *B. cynodontis* 수집균주이기 때문에 균주의 추가 수집 후 primer 의 특이성 검정이 필요하다.

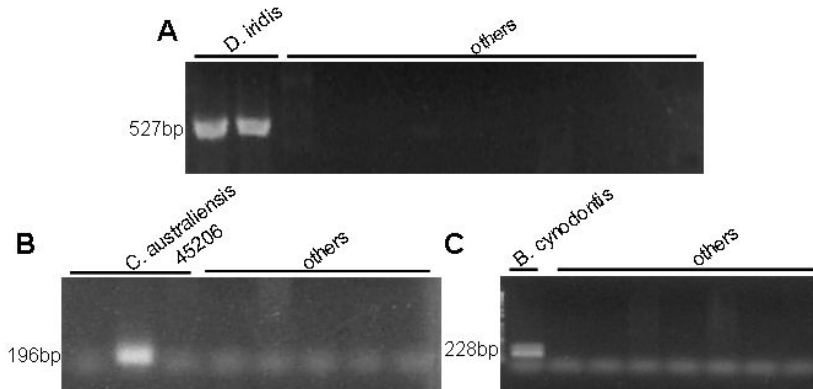


Fig. 3-46. Amplification of specie-specific DNA fragments from the isolates of *D. iridis* with DirR2 and DirR3 at 50 °C of annealing temperature (A), *C. australiensis* with AusTf1 and AusTr1 at 58 °C (B), and *B. cynodontis* with CynTf1 and CynTr1 at 50 °C (C).

(2) 특정 형질 유래 특이 primer 조합

앞서 기술한 *RPB2* 와 *TEF1* 유전자 염기서열 유래 프라이머 조합에 의한 PCR 검출의 대안으로 이 들 균주 중 *C. victoriae* 과 *C. carbonum* 를 대상으로 두 종 사이의 계놈 subtraction clone 또는 특정 형질 유전자의 염기서열에서 유래한 특이 primer 를 제작하였다 (Table 3-10). 현재까지 *C. victoriae* 과 *C. carbonum* 동시 검출용 프라이머 조합 3 종을 확보하였다.

(가) *C. victoriae* 와 *C. carbonum* 의 동시 검출

① 두 종 사이의 계놈 subtraction clone 염기서열 유래 primer

이들 두 종은 기주특이적 독소 생성을 제외하고 서로 같은 종으로 언급될 정도로 유연관계가 가깝기 때문에 이들 종 사이의 계놈 subtraction을 통해 *C. victoriare* 의 계놈에만 특이적으로 존재할 것으로 추정하는 DNA clone 을 총 20 종 확보하였다 (Yun & Turgeon, unpublished data). 이 들 clone 들의 염기서열에서 유래한 프라이머를 제작하여 *C. victoriae* 와 *C. carbonum* 을 비롯한 총 66 주의 수집균주를 대상으로 PCR 증폭을 수행하였다. 2 종의 primer 조합 (G15-F1 과 G15-R1, G14-F1 과 G14-R1) (Table 3-10) 을 사용할 경우, 예상과 달리 *C. victoriae* 균주 뿐 아니라 *C. carbonum* 으로부터 특이적인 DNA 절편 (크기: 각각 353bp 와 346bp)이 증폭되었으며, 그 외 모든 수집종 으로부터는 특이 절편이 증폭되지 않았다 (Fig. 3-47 A&B). 하지만 G15-F1 과 G15-R1 조합은 단일 subclade 안에 함께 포함된 *C.*

victoriae 45385 균주와 *C. carbonum* 45473 균주로부터만 특이 절편을 증폭하였다.

② *C. victoriae* 의 victoriocin 유전자 유래 특이 primer

최근 de Sá 등 (2010) 에 의해 *C. victoriae* 균주의 게놈에만 존재하는 것으로 알려진 항균성 단백질 victoriocin 이 동정되었다. 이 victoriocin 유전자의 염기서열로부터 프라이머 조합 (VictoF1 과 VictoR1) (Table 3-10) 을 제작하였다. PCR 증폭결과, 예상과 달리 *C. victoriae* 뿐 아니라 *C. carbonum* 균주로부터 240bp 의 특이 DNA 절편이 증폭되었다 (Fig. 3-47C).

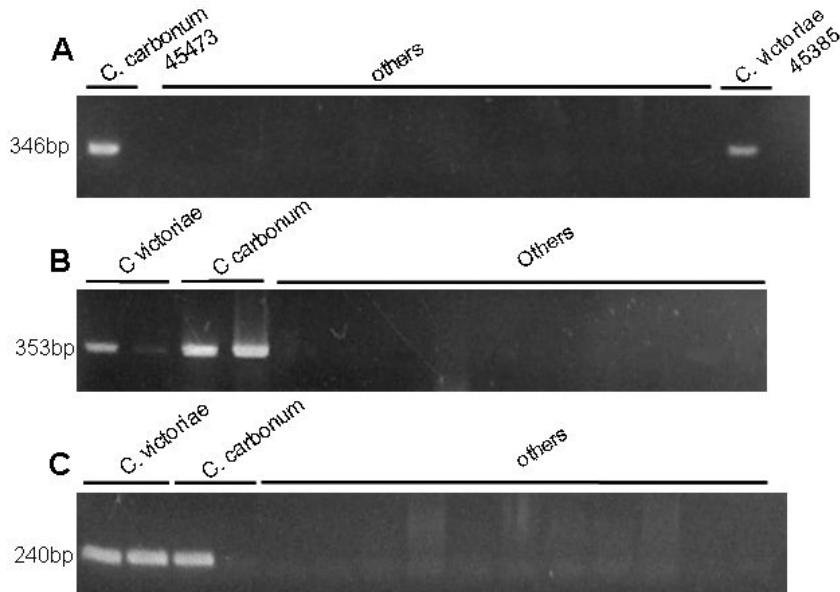


Fig. 3-47. Amplification of specie-specific DNA fragments from the isolates of *C. carbonum* and *C. victoriae* with G15-F1 and G15-R1 at 55°C of annealing temperature (A), with G14-F1 and G14-R1 at 65 °C (B), and with VictoF1 and VictoR1 at 55°C (C).

5. PCR 증폭을 통한 *Fusarium* 곰팡이 검출·동정 체계 및 프로토콜

지금까지 개발된 중복합체-특이 또는 종-특이 PCR primer 조합을 이용하여 식물시료로부터 오염 가능한 *Fusarium* 곰팡이의 검출과 동정에 필요한 과정과 프로토콜을 아래와 같이 작성하였다.

가. 식물시료의 처리

검역용 식물시료로부터 오염곰팡이를 배양한 후 곰팡이의 게놈 DNA를 추출하거나, 식물시료로부터 직접 게놈 DNA 를 추출할 수 있다.

(1) 식물시료 오염 곰팡이의 게놈 DNA 추출 방법

- ① 화염살균한 면도칼 또는 수술용 칼을 이용하여 식물시료 표면을 1cm×1cm (가로×세로)의 크기로 자른 다음, 1% NaOCl 용액에 1 분간 담가 표면살균을 한다.
- ② 표면살균한 시료를 살균수로 2 번 세척한 후 ampicillin 또는 kanamycin 75 ppm 이 첨가된 감자한천배지 (PDA) 또는 완전배지 (CM) 의 표면에 치상한다 (이 때 배지 하나 당 식물시료 5-6를 치상한다).

③ 치상한 배지를 25℃에서 2-3일 동안 배양하여 오염곰팡이의 균총 (colony) 의 출현을 확인한다.

④ 오염곰팡이의 균총 중 *Fusarium* 곰팡이의 특징을 보이는 균총으로부터 이썬시개를 이용하여 0.5cm×0.5cm 크기를 자른 다음 그로부터 직접 곰팡이 게놈 DNA 를 추출한다.

* *Fusarium* 곰팡이 균총의 특징: 대체로 균사생장이 빠르며, 하얗거나 옅은 붉은색을 띠는 공중균사를 형성하며, 배지의 뒤에는 하얗거나, 노랗거나 분홍색을 나타냄.

* *Fusarium* 추정 곰팡이 균총으로부터 게놈 DNA 추출법

- 균총을 1.5ml Eppendorf tube 에 넣는다.
- 500 μ l extraction buffer [0.5M EDTA, 1M Tris-Cl(pH 8.0), 1M KCl] 를 첨가한다.
- sonication 용 drill 로 균사체를 30초- 1분 동안 분쇄한다.
- Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol(25:24:1) 용액 300 μ l 을 첨가한 후 30초 동안 vortex 한 후 원심분리 (12000rpm, 10min, 상온) 한다.
- 상층액 (200-300 μ l) 을 새로운 Eppendorf tube 에 옮긴 후, RNase 2 μ l 를 첨가한다.
- 37℃에서 15분 동안 처리한 후, 동량 (200-300 μ l) 의 2-propanol 을 첨가하여 상온에서 5 분 동안 보관 한다.
- 원심분리 (12000rpm, 10min, 상온) 후, 상층액을 버리고 1ml의 차가운 70% 에탄올 용액 (-20℃ 에 보관했던 것) 을 첨가하여 pellet 을 세척한다.
- 원심분리 (12000rpm, 5min, 상온) 후, 상층액을 버리고, tube 를 페이퍼타월 위에 거꾸로 세워 상온에서 1시간 동안 건조한 다음 TE 용액 50 μ l 에 녹인다.
- * 추출에 사용한 곰팡이 균사체의 양이 적어, TE 용액 내 존재하는 곰팡이 게놈 DNA 는 전기영동을 통해 단일밴드가 확인 되지 않을 수 있음.

④ 곰팡이 게놈 DNA 추출용 균총의 일부를 추후 순수분리 또는 형태관찰 등을 위해 새로운 배지에 옮겨 배양한다.

(2) 식물시료로부터 직접 게놈 DNA 추출 방법

한편, 검역용 식물시료로부터 오염곰팡이를 배양하지 않고, MACHEREY-NAGEL 사의 NucleoSpin[®] Food kit 를 사용하여 직접 게놈 DNA를 추출할 수 있었다 (DNA 추출용 시중 kit 중 가장 효과가 좋음).

(3) 사용 게놈 DNA 종류에 따른 장단점 분석

- 곰팡이 게놈 DNA: 식물시료로부터 직접 배양을 통해 확보한 곰팡이의 게놈 DNA 를 사용하였기 때문에 PCR 증폭을 통한 *Fusarium* 동정의 결과를 신뢰할 수 있으나 곰팡이 배양기간 (2-3일) 이 소요되는 단점이 있다. 하지만 현행 식물검역현장에서 소요되는 시간과 큰 차이가 없을 것으로 예상된다.

- 식물시료 게놈 DNA: 식물시료로부터 직접 게놈 DNA 를 추출하기 때문에 곰팡이 배양 시간이 필요하지 않으나, 일반적으로 PCR 증폭 산물의 양이 매우 적어 결과의 신뢰성을 위해 *Fusarium* 곰팡이의 실제 오염 여부를 추후 확인할 필요가 있다.

나. PCR 증폭을 통한 검출·동정 체계

Fig. 3-48 와 같은 과정을 통해 먼저 *Fusarium* 추정 곰팡이 게놈 DNA 또는 식물시료 DNA로부터 중복합체 특이 primer 조합을 이용한 1차 PCR 증폭으로 중복합체 수준의 동정을 수행할 수 있으며, 이 때 양성반응을 보인 시료의 경우, 종특이 primer 조합을 이용한 2차 PCR 증폭으로 종 수준의 동정°C이 가능하다. 일반적인 PCR 증폭 조건은 다음과 같다.

94°C 2min, 30 cycles of [94°C 30sec, (55-60°C) 30sec, 72°C 30sec], 72°C 5min, 4°C 10min
 하지만 *F. redolens* 와 *F. stilboides* 특이 primer 조합과 *F. poae* 특이 primer 조합을 이용한 PCR 증폭은 1차 PCR을 거치지 않고 직접 수행한다.

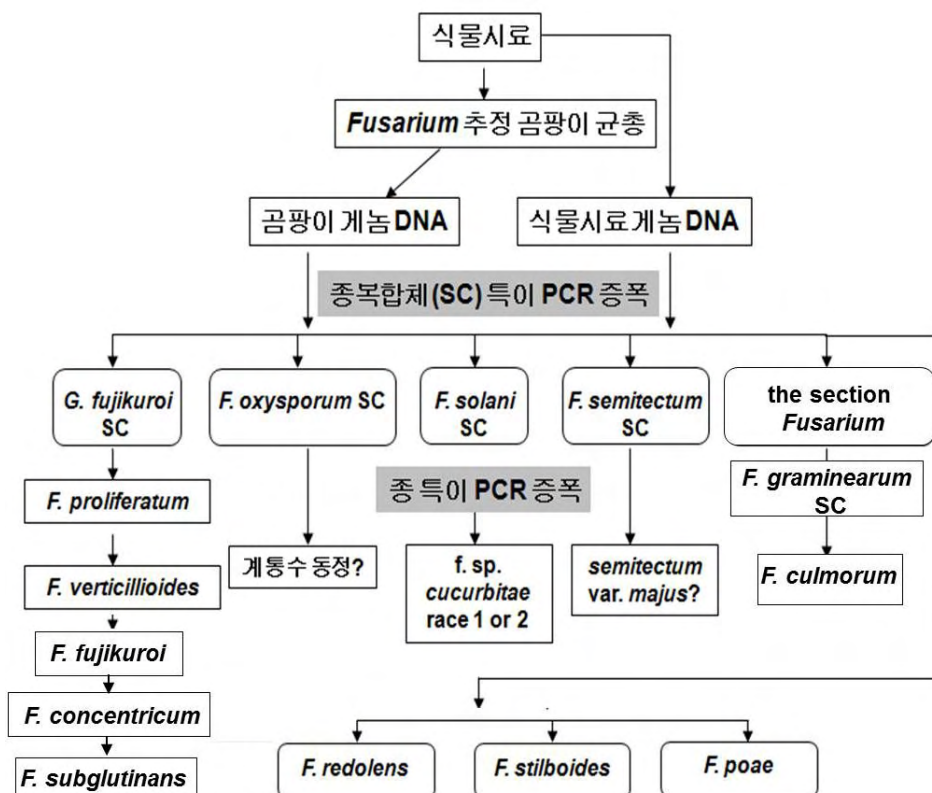


Fig. 3-48. Flow chart of the detection/identification of *Fusarium* species possibly contaminated on plant samples by PCR amplification using the species-complex-specific and species-specific primer sets.

6. 국내 유통 수입과일류로부터 곰팡이의 검출·동정

가. PCR 프라이머를 이용한 *Fusarium* 검출 및 동정

본 과제에서 구축한 PCR 증폭 *Fusarium* 검출 및 동정 체계의 유용성을 검증하기 위하여 시중에 유통되는 수입과일류로부터 *Fusarium* 곰팡이의 오염 여부와 종 동정을 시도하였

다. *Fusarium* 곰팡이가 검출된 과일의 종류, 수입국가, 수집 장소 등은 Table 3-11 to 3-12 에 정리하였다. 수입과일의 표면 조각을 PDA 에 치상하여 3 일 동안 배양하였을 때 다양한 곰팡이의 균총과 함께 *Fusarium* 추정 균총도 확인할 수 있었다 (Fig. 3-49).

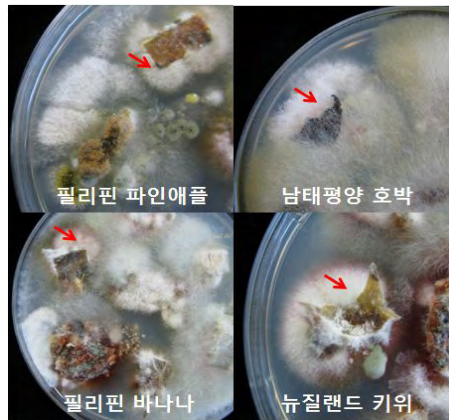


Fig. 3-49. Fungal colonies from imported fruit samples. Putative *Fusarium* isolates were indicated by arrows.

Fusarium 추정 균총으로부터 추출한 게놈 DNA 를 이용한 PCR 증폭결과, 총 15 균주 중 14 균주로부터 *F. oxysporum* 종복합체, *F. graminearum* 종복합체, *F. semitectum* 종복합체 등의 특이 프라이머 조합에 의한 DNA 조각이 증폭되었다 (Figs. 3-50 to 3-53). 이 중 *F. graminearum* 종복합체 양성 시료의 경우, 계통수 작성을 통해 *F. graminearum* 종복합체 내 *F. cortaderiae* (lineage 8) 으로 최종 동정되었다. 하지만 *F. semitectum* 종복합체 특이 PCR 에서 양성반응을 보인 균주의 경우, 계통수 작성을 통해 *F. incarnatum* 으로 최종 동정되었다. 이는 *F. semitectum* 종을 *F. equiseti-incarnatum* 종복합체으로 재분류하려는 최근의 추세를 뒷받침한다. 또한 *G. fujikuroi* 종복합체 프라이머에 양성반응을 보인 균주는 *F. proliferatum* 특이 프라이머 조합에 의해 특이 DNA 절편이 증폭되어 *F. proliferatum* 으로 최종 동정되었으며 (Fig. 3-50) 이는 이후 계통수 작성을 통한 종 동정으로도 확인되었음 (Fig. 3-48).

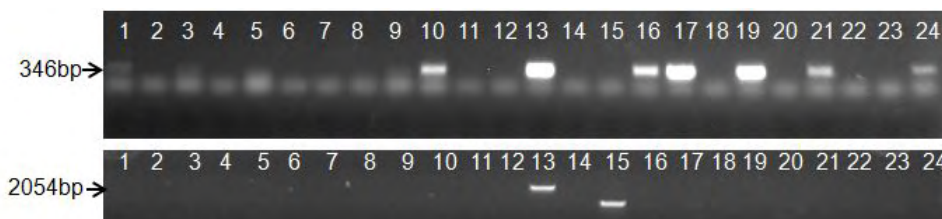


Fig. 3-50. PCR amplification from genomic DNAs of fruit samples (lanes 1-12) or fungal colonies (lanes 13-24) using the *F. oxysporum* species complex specific 프라이머 sets (Roxy1 and Roxy3 for the upper panel and FoDL-1 and MAT1-rev for the lower panel). Upper panel: lane 10, pineapple DNA; lane 13, BN-P-CJ3-2; lane 16, MG-P-YI3; lane 17, PA-P-YI4; lane 19, PK-S-AS1-1; lane 21, OR-U-CA1; lane 24, KW-N-AS'2-2; Down panel: lane 13, BN-P-CJ3. Refer to the isolates names in Table 4.



Fig. 3-51. Specific PCR amplification of the *F. graminearum* species complex using the primer set Tcull1 and Tcull2 (lane14: KW-N-CJ4, lane23: KW-N-AS'2-1).

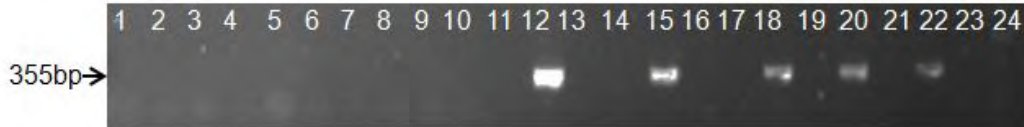


Fig. 3-52. Specific PCR amplification of the *F. semitectum* species complex using the 프라이머 set Rsem1 and Rsem3 (lane 12: GF-U-CJ2, lane 15:KW-N-YI2, lane 18: GF-U-YI5, lane 20: PK-S-AS1-2, lane22: MB-P-CA2).

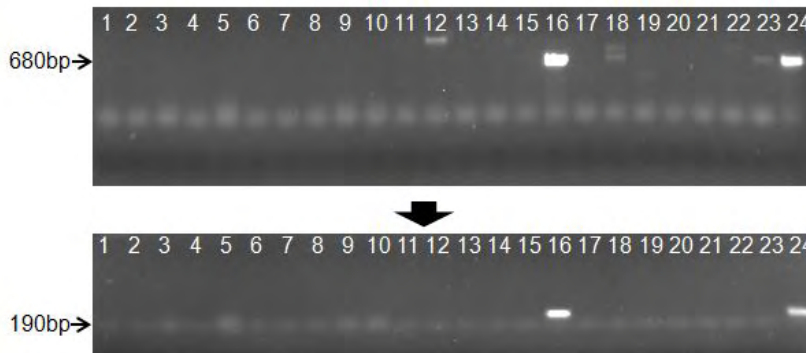


Fig. 3-53. Specific PCR amplification of the *G. fujikuroi* species complex using the primer set rp32 and rp33 (upper panel, lane 16: MG-P-YI3, lane 18:GF-U-YI5, lane 23: KW-N-AS'2-1, lane 24: KW-N-AS'2-2) and specific amplification of *F. proliferatum* using Tpro1 and Tpro2 (lower panel, lane 16: MG-P-YI3, lane 24: KW-N-AS'2-2).

나. 본 과제의 *Fusarium* 염기서열 데이터베이스를 이용한 수입과일 유래 *Fusarium* 곰팡이의 동정

현재까지 개발된 특이 프라이머 조합을 이용한 PCR 증폭으로 종 동정이 명확하지 않은 균주들의 경우, 본 과제의 *Fusarium* 종 염기서열 데이터베이스를 이용한 계통수 작성을 통해 종 동정을 수행하였다 (Tables 3-11 to 3-12, Figs. 3-51 to 3-52).

(1) *Fusarium* 염기서열 데이터베이스 구축 및 종 동정 과정

데이터베이스는 본 과제의 총 연구기간 동안 축적한 authentic *Fusarium* 염기서열 (주로 *TEF1* 과 *RPB2*) (Tables 3-6) 과 NCBI 로부터 확보한 염기서열로 구성되어있으며, 종 동정 방법은 아래와 같다.

- 수입과일에서 분리한 *Fusarium* 추정 균종의 게놈 DNA 로부터 *TEF1* 유전자를 PCR 증폭하여, 증폭 산물을 clean-up 한 후 증폭용 프라이머 를 이용하여 염기서열 결정을 의뢰함 (일반적으로 3 일정도 소요).
- *TEF1* 염기서열을 우선 NCBI 데이터베이스에 검색하여, 염기서열 유사도 98-100% 수준으로 검색되는 곰팡이 종을 확인함. 검색된 곰팡이 종의 *TEF1* 염기서열을 본 과제의 데이터베이스에 첨가한 다음, NCBI로 검색된 *Fusarium* 종의 염기서열과 함께 MP 또는 NJ (Neighbor-Joining) 방법으로 계통수를 작성함. 이를 통해 수입과일로부터 배양한 *Fusarium* 곰팡이의 종을 동정함.

- 이 방법은 PCR 증폭에 의한 동정보다 소요시간은 3일 정도 더 걸리지만 특이 프라이머 조합에 의한 PCR에서 음성반응을 보인 경우, 시도해 볼 만하다 판단됨.
- 온라인 상 *TEF1* 염기서열의 유사도를 이용한 *Fusarium* 동정 체계로는 이미 미국 펜실바니아 주립대에서 구축한 *Fusarium* ID (<http://www.fusarium.org/index.php>) 가 존재함. 하지만 *Fusarium* ID 의 경우, NCBI 에 존재하는 *Fusarium* 곰팡이의 *TEF1* 염기서열을 해당 균주의 분류학적 재확인 없이 단순히 다운로드 받아서 구축하였기 때문에 동일한 종의 균주가 계통수에서 서로 다른 subclade 에 존재하는 경우가 종종 발생하였음. 또한 우리나라 검역 *Fusarium* 종 균주의 경우, 자료가 매우 불충분함. 이에 반해 본 과제에서 구축한 데이터베이스는 우리나라 검역종의 염기서열을 실제 균주 게놈 DNA로부터 확보하였을 뿐 계통발생학 분석을 통해 종 동정의 신뢰성이 높은 균주의 염기서열로만 구성되어 있어 그 유용성이 높다고 판단됨.

(2) 수입과일에서 검출 · 동정한 *Fusarium* 곰팡이의 특징

2012년 수입 과일로부터 총 7 종, 2013년 수입 과일로부터 총 6 종의 *Fusarium* 이 검출되었으나 우리나라의 검역종 (관리병해충) 은 검출되지 않았다.

- ① *F. nelsonii*: 파인애플에서 검출되었음. *F. chlamydosporum* 중복합체에 속하는 종으로서, 1998년 처음 기술되었으며, 남아프리카에서 식물 잔재물, *Medicago* 의 뿌리, 수수 등에서 분리되었음. 아직까지 식물병원성이나 곰팡이독소 생성능은 보고되지 않음.
- ② *F. equiseti* or *F. incarnatum*: 자몽, 키위, 망고에서 총 5 균주가 분리되었으며, 계통수에서 *F. incarnatum-equisetii* subclade [*F. semitectum* 균주 (gs2-2 와 gs2-18) 도 포함됨] 에 모두 BS 99% 수준으로 grouping 됨 (Fig. 51). 이를 통해 두 종이 *F. incarnatum-equisetii* 이라는 새로운 중복합체를 구성한다는 것 뿐 아니라 *F. semitectum* 과 *F. incarnatum* 중복합체 사이의 계통발생학적 유사성도 확인 됨. 따라서 이들 균주가 본 과제에서 개발한 *F. semitectum* 중복합체 특이 프라이머 와 반응한 결과 또한 뒷받침 됨. 하지만 *F. semitectum* 과 *F. incarnatum* 중복합체의 구분을 위한 후속 연구가 필수적임. 이 중복합체는 전 세계적으로 다양한 식물에 발생하며 *F. equiseti* 의 경우, 심각한 식물병원균은 아니나 박과 식물의 뿌리에 병을 일으킬 뿐 아니라 다양한 곰팡이독소를 생성하는 것으로 보고됨.
- ④ *F. cortaderiae*: 키위에서 2 균주 분리됨. 계통수에서 *F. graminearum* 중복합체 subclade 에 BS 99% 수준으로 존재하며, 중복합체 내 lineage 8 균주와 BS 89% 수준으로 같은 subclade 에 존재함. 이 종은 뉴질랜드, 호주, 브라질의 목초류, 옥수수, 카네이션, 보리 등에서 보고됨. 본 과제 개발 *F. graminearum* 중복합체 특이 프라이머 에 의해 특이 절편이 증폭됨.
- ⑤ *F. guttiforme* or *F. ananatum*: 파인애플에서 1 균주 분리됨. 계통수에서 *F. guttiforme* 균주 또는 *F. anatum* 균주와 BS 90% 수준으로 함께 묶임. 이들 균주의 subclade 가 *G. fujikuroi* 중복합체 subclade 옆에 위치하고 있기 때문에 이들 균주가 *G. fujikuroi* 중복합체에 속하는 종으로 추정된다는 기존 보고를 뒷받침 함. 1998 년 브라질

의 파인애플에서 처음 보고됨. 종종 *G. fujikuroi* 종복합체의 *F. subglutinans* 또는 *F. sacchari* 와 형태적으로 구별하기 어려움. 브라질의 경우, 파인애플의 주요 식물병원균임. *F. ananatum* 은 파인애플 병원균으로서 *F. guttiforme* 과 매우 비슷하나 계통발생학적으로는 뚜렷이 구분됨 (본 계통수에서는 구분이 되지 않음). 푸모니신 생성유전자의 부재로 rp32 와 rp33 프라이머 에 의해서는 PCR 증폭이 되지 않은 것으로 추정함. 그러나 *F. oxysporum* 종복합체와 *G. fujikuroi* 종복합체 일부를 증폭하는 Roxy1 과 Roxy2 프라이머 에 의해서는 증폭됨.

⑥ *F. lacertarum*: 단호박에서 1 균주 검출됨. *F. incarnatum-equisetti* 종복합체 subclade 내에서 *F. lacertatum* 균주들과 BS 92% 수준으로 함께 묶임. 이는 *F. lacertatum* 도 *F. incarnatum-equiseti* 종복합체의 구성 종이라는 기존 보고와 일치함. 인도의 도마뱀의 피부에서 검출이 보고됨. *F. semitectum* 종복합체 특이 프라이머 에 의해 증폭됨.

⑦ *F. sacchari*: 오렌지에서 1 균주 검출됨. 계통수에서 *G. fujikuroi* 종복합체 내 *F. sacchari* 균주들과 BS 99% 수준으로 함께 묶임. 같은 종복합체 내 다른 종들 특히 *F. subglutinans* 와 형태적으로 구분이 어려움. 주로 사탕수수 나 수수에 병을 일으킴. 푸모니신 생성유전자의 부재로 rp32 와 rp33 프라이머 조합에 의한 PCR 증폭은 관찰되지 않은 것으로 추정함. 그러나 *F. oxysporum* 종복합체와 *G. fujikuroi* 종복합체 일부를 증폭하는 Roxy1 과 Roxy2 프라이머 에 의해서는 증폭됨.

⑧ *F. oxysporum* 종복합체: 바나나와 단호박에서 각각 1 균주씩 분리됨. 계통수에서 *F. oxysporum* 종복합체 subclade 에 99% 수준으로 묶임. 하지만 계통수 작성을 통해서도 forma specialis 수준의 동정은 어려움. *F. oxysporum* 종복합체 특이 프라이머 에 의해 증폭됨.

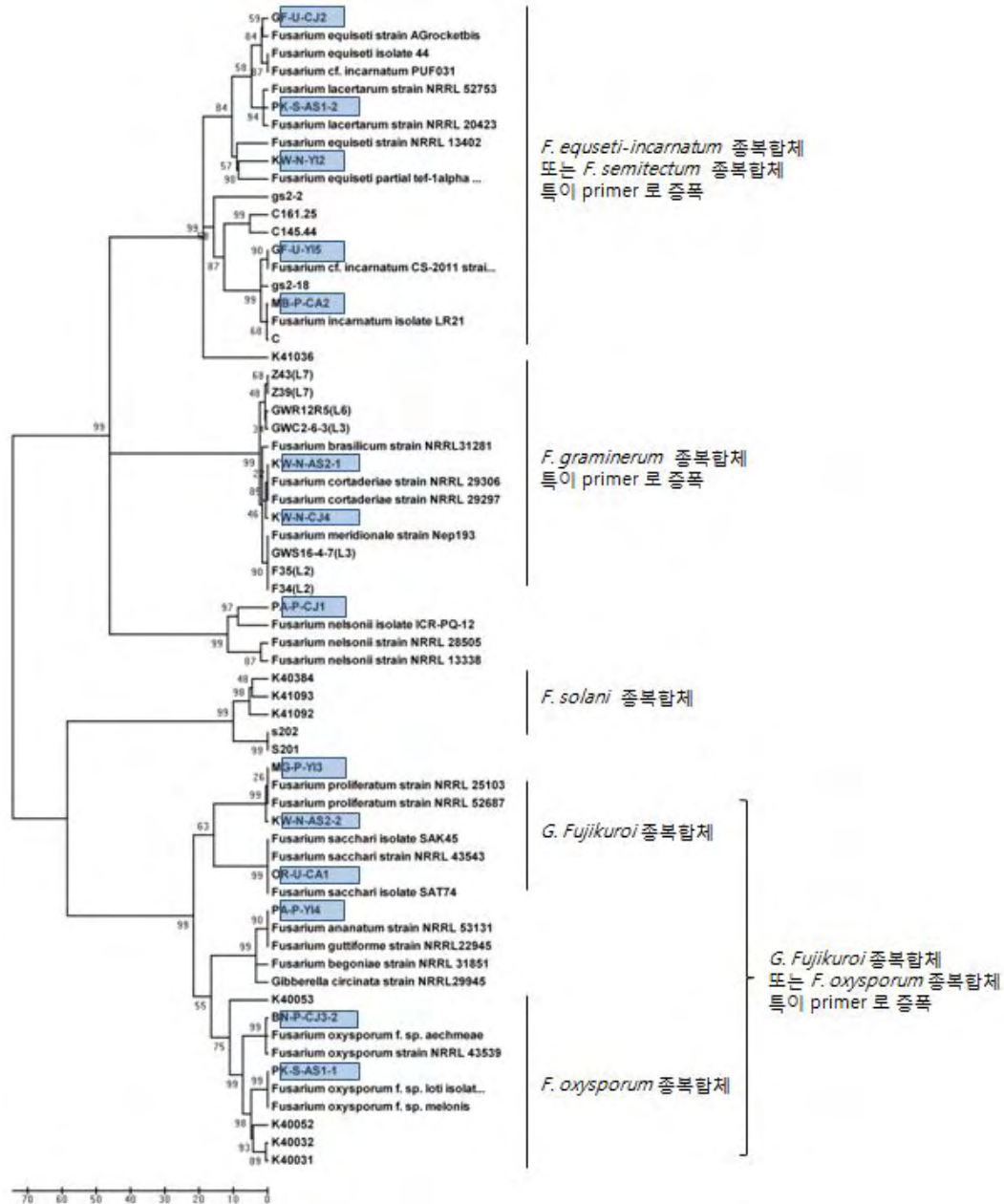


Fig. 3-54. A phylogenetic tree constructed from the *TEF1* genes of the *Fusarium* isolates (indicated by rectangular boxes) from imported fruits in 2012.

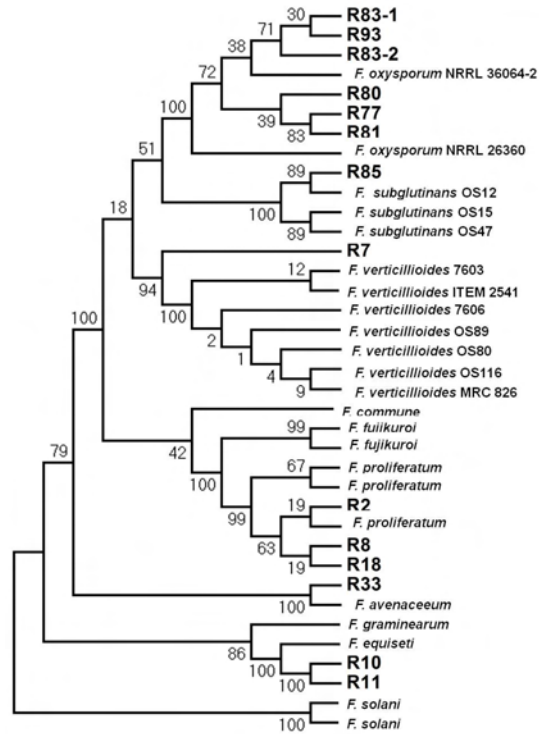


Fig. 3-55. A phylogenetic tree constructed from the *TEF1* genes of the *Fusarium* isolates from imported plants in 2013.

Table 3-11. *Fusarium* species obtained from imported fruits in 2012

Name	Host	Country	Area	species
PA-P-CJ1	pineapple	philippines	충북 청주시	<i>F. nelsonii</i>
GF-U-CJ2	grapefruit	USA	충북 청주시	<i>F. equiseti</i> or <i>F. incarnatum</i> *
BN-P-CJ3-2	banana	philippines	충북 청주시	<i>F. oxysporum</i> species complex*
KW-N-CJ4	kiwi	New Zealand	충북 청주시	<i>F. cortaderiae</i> (<i>F. graminearum</i> species complex* lineage 8)
KW-N-YI2	kiwi	New Zealand	경기 용인시	<i>F. equiseti</i> *
MG-P-YI3	mango	philippines	경기 용인시	<i>F. proliferatum</i> *
PA-P-YI4	pineapple	philippines	경기 용인시	<i>F. guttiforme</i> or <i>F. ananatum</i> *
GF-U-YI5	grapefruit	USA	경기 용인시	<i>F. incarnatum</i> *
PK-S-AS1-1	pumpkin	South pacific	충남 아산시	<i>F. oxysporum</i> species complex* (f.sp. <i>melonis</i> 또는 f.sp. <i>loti</i>)
PK-S-AS1-2	pumpkin	South pacific	충남 아산시	<i>F. lacertarum</i> *
OR-U-CA1	orange	USA	충남 천안시	<i>F. sacchari</i> *
MB-P-CA2	mango	philippines	충남 천안시	<i>F. incarnatum</i> *
KW-N-AS'2-1	kiwi	New Zealand	경기 안산시	<i>F. cortaderiae</i> (<i>F. graminearum</i> species complex* lineage 8)
KW-N-AS'2-2	kiwi	New Zealand	경기 안산시	<i>F. proliferatum</i> *

*detected by the PCR amplification procedure

Table 3-12. *Fusarium* species obtained from imported fruits in 2013

Name	Host	Country	Area	Species
R2	pumpkin	Tonga	충남 아산시	<i>F. proliferatum</i>
R7	asparagus	Philippines	충남 아산시	<i>F. verticillioides</i>
R8	asparagus	Philippines	충남 아산시	<i>F. proliferatum</i>
R10	asparagus	Philippines	충남 아산시	<i>Fusarium equiseti</i>
R11	banana	Philippines	충북 청주시	<i>Fusarium equiseti</i>
R18	pumpkin	Tonga	충남 아산시	<i>F. proliferatum</i>
R33	kiwi	New Zealand	충북 청주시	<i>F. avenaceum</i>
R77	asparagus	Philippines	경기 용인시	<i>F. oxysporum</i>
R80	pumpkin	Tonga	충남 아산시	<i>F. oxysporum</i>
R81	pumpkin	Tonga	경기 용인시	<i>F. oxysporum</i>
R83-1	pumpkin	Tonga	경기 용인시	<i>F. oxysporum</i>
R83-2	pumpkin	Tonga	경기 용인시	<i>F. oxysporum</i>
R85	dahlia	Mexico	경기 용인시	<i>F. subglutinans</i>
R93	asparagus	Peru	경기 용인시	<i>F. oxysporum</i>

다. 수입과일에서 분리한 *Fusarium* 외 다른 곰팡이의 동정

Fusarium 외 다른 곰팡이 일부의 균종으로부터 확보한 *TEF1* 또는 *RPB2* 유전자의 염기서열을 NCBI 에 검색한 결과를 Tables 3-13 to 3-14에 정리하였다. 이들은 주로 균총 색이 검은색 또는 푸른색 계통이며, 특히 검은색 균주는 *Pleospora* 또는 *Cochliolobus* 속 곰팡이였다. 하지만 염기서열 유사도가 95-97%에 불과하기 때문에 NCBI 검색만으로는 정확한 동정이 어려웠다. NCBI 데이터베이스에 이들 속 곰팡이 종의 *TEF1* 또는 *RPB2* 유전자 염기서열 자료가 매우 불충분하기 때문으로 판단된다.

Table 3-13. Other fungal species obtained from imported fruits in 2012

Name	Host	Country	Area	Species	Identity (%)
PG-U-CJ1	pomegranate	USA	충북 청주시	Pleospora herbarum , Cochliobolus heterostrophus	97
LM-U-CJ2	lemon	USA	충북 청주시	Pleospora herbarum , Cochliobolus heterostrophus	97
GF-U-CJ5	grapefruit	USA	충북 청주시	Phaeosphaeria nodorum	95
OR-S`-CJ6	orange	South America	충북 청주시	Pleospora herbarum , Cochliobolus heterostrophus	98
OR-S`-CJ7	orange	South America	충북 청주시	Pleospora herbarum , Cochliobolus heterostrophus	97
KW-N-CJ8	kiwi	New Zealand	충북 청주시	Pleospora herbarum , Cochliobolus heterostrophus	97
MG-P-Y1	mango	Philippines	경기 용인시	Diaporthe phaseolor	98
GF-U-Y2	grapefruit	USA	경기 용인시	Penicillium chrysogen	97
LM-U-Y3	lemon	USA	경기 용인시	Pleospora herbarum	98
PA-P-Y4	pineapple	Philippines	경기 용인시	pleospora herbarum	97
KW-N-Y6	kiwi	New Zealand	경기 용인시	Cochliobolus heterostrophus	99
GF-U-Y7	grapefruit	USA	경기 용인시	Diaporthe phaseolorum	96
RG-U-Y8	red grape	USA	경기 용인시	Penicillium marneffeii	96
PG-U-Y9	pomegranate	USA	경기 용인시	Penicillium freii	97
CC-B-AS1	coconut	Vietnam	충남 아산시	Neofusicoccum mangiferae	98
GG-U-AS2	greengrape	USA	충남 아산시	Penicillium marneffeii	97
RG-U-AS3	red grape	USA	충남 아산시	Penicillium freii	99
AV-N-AS6	avocado	New Zealand	충남 아산시	Cryphonectria parasitica	99

Table 3-145. Other fungal species obtained from imported fruits in 2013

Name	Host	Country	Area	Species
R12	kiwi	New Zealand	충남 아산시	Diaporthe eres
R14	kiwi	New Zealand	서울시 송파구	Diaporthe eres
R19	kiwi	New Zealand	경기 용인시	Diaporthe eres
R27	asparagus	Philippines	경기 용인시	Aspergillusoryzae
R43	avocado	USA	충북 청주시	Diaporthe eres
R59	avocado	USA	경기 용인시	Thielavia terrestris
R61	avocado	USA	경기 용인시	Chaetomium elatum
R5	pumpkin	Tonga	충남 아산시	Lizonia sexangularis
R30	pumpkin	Tonga	경기 용인시	Mycosphaerella citrullina
R9	asparagus	Philippines	충북 청주시	Chaetomium elatum
R23	broccoli	China	충남 아산시	Thielavia terrestris
R25	banana	Philippines	충남 아산시	Chaetomium globosum
R88	banana	Philippines	경기 용인시	Chaetomium globosum
R13	kiwi	New Zealand	충남 아산시	Mycosphaerella citrullina
R16	kiwi	New Zealand	경기 용인시	Mycosphaerella citrullina
R49	kiwi	New Zealand	서울시 송파구	Mycosphaerella citrullina
R55	kiwi	New Zealand	서울시 송파구	Chaetomium elatum
R57	kiwi	New Zealand	경기 용인시	Pleospora herbarum
R21	sweetie	Israel	충남 아산시	Pleospora herbarum
R31	lemon	USA	충남 아산시	Pleospora herbarum
R62	avocado	USA	경기 용인시	Chaetomium elatum
R63	avocado	USA	충남 아산시	Chaetomium elatum
R68	melon	USA	충북 청주시	Pleospora herbarum
R84	garlic stem	China	경기 용인시	Pleospora herbarum

7. 연구자료의 데이터베이스 구축 및 연구협의

본 과제 수행 중 도출된 아래의 연구결과를 제 2 세부과제에서 구축 중인 식물병원균 검역 정보 관리 시스템 (QIMS) 에 제공하였다.

- 검역 종과 비검역 종의 균학적·병리학적 특성
- 분자마커 개발용 primer 와 증폭 DNA 의 염기서열
- 특이 primer 의 염기서열 및 PCR 증폭 결과

또한 검역 현장에서 대조균으로 사용 가능한 아래의 유전자원을 확보하였다.

- 검역 종 및 근연 종 곰팡이의 게놈 DNA
- 검역 종 유래 유전자가 cloning 된 plasmid DNA 및 *E. coli* 배양체
- 이들 유전자원의 농립수산검역검사본부에 제공 가능

한편 본 과제의 연구결과를 제 2협동과제 (과수 및 수목류 검역 곰팡이 연구)의 과제 책임자와 연 2 회 이상 협의하였으며, 농립수산검역검사본부와 연구진행 상황을 협의하고, 검역식물시료에 발생한 *Fusarium* 균주의 종 동정 자문 (식물검역부 목포지원)에 임하였다. 또한 농립수산검역검사본부 자체 워크샵에 참석하여 구두발표를 하였으며, 농립수산검역검사본부가 주관하는 수출입 검역관련 과제의 심사에 적극 참여하였다.

8. 검역종의 최근 병 발생 현황 분석

온라인과 최신 문헌 검색을 통해 검역 곰팡이 종의 식물체 내 오염 또는 식물병 발생 현황을 조사하였다.

- *C. spicifer*: 미국으로부터 국내에 수입된 곡물종자에서 검출됨 (Koo et al., 2003. Plant Pathol. J. 19: 133-137). 형태적 분류 연구임. 최근 병 발생으로는 미국 미시시피 지역 목초류 (forage bermudagrass) (Pratt, 2005. Phytopathology 95: 1183-1190), 밀 (Gonzalez & Trevathan, 2004. J. Phytopathol. 148: 77-85)에서 발생. 이집트의 야생식물 종에서 검출 보고 (Naggar & Hafez, 2003. Feddes Repertorium 114: 1-2, 74-90). 인도에서 groundnut의 병원균으로 보고 (Vaishnav & Savaliya, 1990. Indian Phytopathol. 43: 124).
- *C. hawaiiensis*: 태국의 이병식물로부터 발생 보고 (Worapattamasri et al. 2009. J. Agri. Technol. 5: 143-155). 인도에서 발생 보고 (http://www.dfid.gov.uk/r4d/PDF/Outputs/CropProtection/R6695_FTR_outputs.pdf)
- *B. australiensis*: 위의 *C. hawaiiensis* 의 병 발생보고 (태국, 인도)에서 함께 보고됨. 중국에서 turgrass 의 brown leaf spot 원인균으로 보고됨 (Fang et al. 2006. Plant Pathol. New Disease Reports 14: 15).
- *B. sacchari*: 태국의 이병식물로부터 발생 보고 (Worapattamasri et al. 2009. J. Agri. Technol. 5: 143-155). 이란에서 밀 stem-base disease 의 원인균으로 보고됨 (Soleimani & Kazemi, 2005. Plant Pathol. 55: 305). 중국의 사탕수수에서 보고됨 (Huang, 2004. Indian J. Microbiol. 6: 262-265).
- *B. cynodontis*: 태국의 이병식물로부터 발생 보고 (Worapattamasri et al. 2009. J. Agri. Technol. 5: 143-155). 미국 미시시피 지역에서 Bermudagrass에서 발생 보고 (Pratt. Plant Dis. 2006, 90: 528).
- *D. gignatea*: 일본에서 벼의 eyespot 과 turgrass의 zonate eyespot 의 원인균으로 보고됨

(Sato et al. 1990. Rept. Tottori. Mycol. Inst. 28: 175-184).

- 호주에서 식물병원균, 부생균, endophyte 로 존재하는 *Fusarium* 곰팡이를 계통별로 구분하여 보고함. 또한 호주에 존재하지 않은 *Fusarium* 종들을 보고하고 식물검역의 관점에서 이들의 중요점 등을 논의함 (Summerell et al. 2011. *Fusarium* species associated with plants in Australia. Fungal Div. 46: 1-27).
- *F. poae*: 케냐의 밀시료에서 우리나라 검역종인 *F. poae*를 비롯한 T-2 독소 생성 *Fusarium* 종의 발생을 보고함 (Muthomi et al. 2012. Occurrence of *Fusarium* species and associated T2-toxin in Kenyan wheat. Agri. Sci. 3: 24-34).
- *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*: 인도네시아의 바나나에서 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* 의 새로운 race 4 발생을 보고함 (Wibowo et al. 2011. Occurrence of Tropical Race 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in Indonesia. Plant Pathol. J. 27: 280-284).
- *F. redolens*: 캐나다 Saskatchewan 지방의 chickpea, pea, lentil, durum wheat 등에서 *F. redolens* 의 발생을 보고함 (Taheri et al. 2011. First report of *Fusarium redolens* from Saskatchewan and its comparative pathogenicity. Can. J. Plant Pathol. 33: 559-564). 레바논, 모로코, 파키스탄, 스페인에서 chickpea 의 시들음병징으로부터 *F. redolens* 의 발생을 보고함 (Jiménez-Fernández et al. 2011. Molecular and pathogenic characterization of *Fusarium redolens*, a new causal agent of Fusarium yellows in chickpea. Plant Dis. 95: 860 - 870). 알제리와 지중해 국가의 토마토에 존재하는 *F. redolens* 집단의 유전적 다양성 보고 (V. Edel-Hermann, N. Gautheron, C. Steinberg. 2012. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* and related species pathogenic on tomato in Algeria and other Mediterranean countries. Plant Pathol. 61: 787-800).
- *F. solani* f. sp. *cucurbitae*: 튀니지아의 watermelon에서 발생하는 *F. solani* f. sp. *cucurbitae* 집단의 분석 보고 (Boughalleb-M'Hamdi et al. 2011. Population dynamics of *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* and *F. solani* f.sp. *cucurbitae* in commercial watermelon fields in Tunisia. Res. Plant Biol. 1: 38-42).
- *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*: 남아프리카공화국의 토마토에서 발생한 *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*를 보고함 (Jacobs & Heerden. 2012. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in South Africa. Australian Plant Dis. Notes. DOI: 10.1007/s13314-011-0039-1).
- *F. culmorum*: 최근 *F. culmorum* 의 유전적 다양성, 곰팡이독소 생합성, 병발생 및 저항성 기작, 진단 방법, 유전체 분석 등에 대한 종합적 보고. (Scherm B, Balmas V, Spanu F, Pani G, Delogu G, Pasquali M, Migheli Q. 2013. *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. Mol. Plant Pathol. 14: 323-41)
- *F. poae*: 아르헨티나의 토양으로부터 *F. poae*를 비롯한 곰팡이독소 생성 *Fusarium* 종의 검출 보고 (C Flores, S San Martín, L Carrillo, N Bejarano. 2013. *Fusarium* species of the Quebrada de Lozano, Jujuy, Argentina Rev Argent Microbiol. ;37:109-12).
- *F. stilboides*: 케냐의 밀에서 *F. stilboides*, *F. poae* 의 감염 보고 (J.W. Muthomi, S.L. Musyimi, J.M. Wagacha, R.D. Narla. 2012. Occurrence of *Fusarium* species and associated T2-toxin in Kenyan wheat. Agric. Sci. 3: 24-34).

제 4 절 과수 및 수목류 검역대상 주요 곰팡이의 진단기술 개발

1. 검역 균주 *Ceratocystis ulmi* 유사분류 그룹 *Ophiostoma piceae*, *O. quercus*, *O. floccosum* 구별 마커 개발

우선 국내 식물 검역대상 목록에서 *Ceratocystis*와 *Ophiostoma* 속에 균류를 대상으로 지금까지 균학적으로 분류학상 중에 대한 명칭 변화 및 분류학상의 위치 변동이 있었는지 자료 조사를 수행하고 target 곰팡이 종에 대한 체계적 접근을 시도하였다.

조사 결과 분류학상 변화가 있는 균은: *Ceratocystis* 속의 *Ceratocystis ulmi* 와 *Ophiostoma* 속의 불완전 세대인 *Leptographium wagenari* 였다. *Ceratocystis ulmi*는 *O. piceae ulmi*로 불리기도하고 형태적으로 유전적으로 *Ceratocystis piceae* 와 구분이 힘들어 오랜 기간 분류학적으로 이름 변동이 있어왔다. *Ceratocystis piceae* 는 *O. piceae* 또는 *Ceratostomella piceae* 로 명명되어 불리고도 하고, 또 다른 유사균인 *O. quercus*는 *Ceratocystis querci*, *C. quercus*, *Ceratostomella querci*, *C. quercus*로 불려진다. *O. floccosum*은 *Ceratocystis floccosa* 로 명명되기도 한다. 이들은 모두 *O. piceae* complex group으로 분류된다. 이에 따라 이 그룹에 속하는 균류에 대한 구분을 먼저 시도하면서 검역균주의 구분에 접근하는 시도를 하였다.

Ophiostoma ulmi, *O. himal-ulmi*, *O. novo-ulmi* subsp. *novo-ulmi*, *O. novo-ulmi* subsp. *americana*, *O. piceae*, *O. quercus*, *O. floccosum*, *O. setosum* 관련 균주 및 *Leptographium* 균주는 국내외 연구자와 culture collection에서 구입 또는 분양을 받았다 (표 4-1). 검역대상 종 이외에도 계통 분류학적으로 근연 관계가 가까운 *Ophiostoma* 종 또한 같이 분양을 의뢰하였다.

표 4-1. 수집된 *O. piceae* 와 근연종 목록

<i>Species</i>	Isolate no. ^a	Host	Origin	Collector
<i>O. piceae</i>	W5	Spruce	Austria	Helmschlager
	AU55-3	Lodgepole pine	Canada	Uzonovic
	AU100-1	Black spruce	Canada	Uzonovic
	AU160-1	Hemlock	Canada	Uzonovic
	AU184-4	White spruce	Canada	Uzonovic
	1-N-1-2	Scotch pine	Germany	Schroeder
	YCC069	Yezo spruce	Japan	Yamaoka
	YCC120	Yezo spruce	Japan	Yamaoka
	DUCC 2313	Japanese red pine	Korea	Hyun
	DUCC 0510	Japanese black pine	Korea	Hyun
	(=DKM0510)			
	HMIPC	unknown	Poland	Kowalski
	HMIPC	Spruce	Poland	Helmschlager
	HA378	Spruce	Sweden	Helmschlager
H2181	Sitka spruce	United	Webber	

	H2009	Scotch pine	Kingdom United Kingdom	Webber
<i>O. quercus</i>	HA366	Oak	Austria	Helmschlager
	AU13	Hemlock	Canada	Uzonovic
	AU160-9	Hemlock	Canada	Clark
	DUCC1319	Korean pine	Korea	Hyun
	DUCC0611	Japanese red pine	Korea	Hyun
	(=DKM0611)			
	DUCC1642	Japanese black pine	Korea	Hyun
	DUCC1207	Radiata pine	Korea	Hyun
	DUCC1110	unknown	Korea	Hyun
	HMIPC15807	Oak	Poland	Helmschlager
	H1039	Oak	United Kingdom	Webber
	H1042	Oak	United Kingdom	Webber
	T10M167	Oak	United states	Zuzwik
	T8M157	Oak	United states	Zuzwik
<i>O. brevisculum</i>	DUCC3001	Japanese black pine	Korea	Hyun
	DUCC3002	Japanese red pine	Korea	Hyun
<i>O. canum</i>	CBS118668	pine shoot beetle	Austria	Krisits
	NFRI 1652/2	Scotch pine	Netherland	NFRI
<i>O. flexuosum</i>	DS-YS-B-2	Unknown	Canada	Uzonovic
	CBS 208.83	Norway Spruce	Norway	Soheim
<i>O. setosum</i>	KACC43420	Radiata pine	Korea	Kim
	(=KUC2030)			
	AU160-25	Unknown	Canada	Uzonovic
<i>O. subalpinum</i>	JCM11876	Veitch's fir	Japan	Othaka
<i>O. bacillisporum</i>	CBS771.71	European beech	Germany	Zimmermann
<i>O. tsotsi</i>	CBS122287	Eucalyptus	South Africa	De Beer
<i>O. himal-ulmi</i>	CBS374.67	Kashmir elm	India	Rebel
<i>O. novo-ulmi</i>	KACC 41753	The american elm	USA	Smalley
	(=CBS 119476)			
<i>O. ulmi</i>	KACC 40252			
	(= RTH 638)			
<i>O. floccosum</i>	DUCC0514	Japanese black pine	Korea	Yun
	DS1/3B-2	Unknown	Canada	Uzonovic
<i>O. minus</i>	1-N-4-2	Scotch pine	Germany	Schroeder
	AU123-151	Jack pine	Canada	Uzonovic
<i>O. kryptum</i>	CBS116179	European larch	Austria	Kirisits
<i>O. tetropii</i>	CBS140.51	Norway spruce	Sweden	Mathiesen-Käärík
<i>O. ips</i>	DUCC1301	Japanese black pine	Korea	Kim
	AU123-456	Jack pine	Canada	Uzonovic
<i>O. bicolor</i>	JCM9358	Yezo spruce	Japan	Yamaoka
<i>O. nigrocarpum</i>	JCM11702	Japanese red pine	Japan	Masuya
<i>O. piliferum</i>	KUC2039	Radiata pine	Korea	Kim
<i>O. botuliforme</i>	JCM11706	Japanese red pine	Japan	Masuya
<i>O. longicollum</i>	JCM10198	Oak	Japan	Masuya
<i>O. stenoceras</i>	CBS1078	Chicago hospital	United states	Davidson
<i>O. aureum</i>	ATCC 16936	Lodgepole pine	Canada	Robinson-Jeffrey

(= <i>G. aurea</i>)				
<i>G. crassivaginata</i>	C1509			
<i>O. americanum</i>	CMW0495	European larch	United states	Bergdahl
(= <i>G. Americana</i>)				
<i>O.larics</i>	JCM9812	Larch	Japan	Yamaoka
(= <i>G. larics</i>)				
<i>L. abietinum</i>	CBS109704	Engelmann spruce	United states	De Beer
<i>L. terebrantis</i>	CBS118620	Japanese black pine	United states	Taptar
<i>Aspergillus</i> sp.	DUCC	Japanese red pine		
<i>Mucor</i> sp.	DUCC	Korean pine		
<i>Penicillium</i> sp.	DUCC	Japanese black pine		
<i>Trichoderma</i> sp.	DUCC	Japanese red pine		

^a **DUCC**, Dankook University Culture Collection, Cheonan, Chungnam, Korea; **NFRI**: Norwegian Forest Research Institute culture collection, Høgskoleveien 12, N-1432 Ås, Norway; **YCC**: Yamaoka Culture Collection, Institute of Agriculture and Forestry, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, Japan; **CBS-KNAW**: Centraalbureau voor Schimmelcultures—an institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences (KNAW), Utrecht, The Netherlands; **ATCC**: American Type Culture Collection, University Boulevard, Manassas, Vermont, USA; **CMW**: Culture Collection of the Forestry and Agricultural Biotechnology Institute (FABI), University of Pretoria, Pretoria, South Africa; **KUC**: Korea University Culture Collection, Anam-dong, Sungbuk, Seoul, Korea; **KACC**: Korean Agricultural Culture Collection, Su-won, Gyeonggi, Korea; **JCM**: Japan Collection of Micro-organisms, Saitama, Japan; **Forintek**, Forintek Canada Corporation Culture Collection.

일부 균주는 국내에서 시료 채집을 시도하여 진주, 사천 지역의 소나무 재선충병과 태안, 서천 지역의 리지나뿌리썩음병에 감염된 소나무 시료를 채취하였고 채취된 나무시료로부터 *Ophiostoma* 8종, *Leptographium* 계통 5종의 균을 분리 동정 하였다. 이에 따라 분리 종과 isolates 의 수를 늘였다 (표4-2).





그림 4-1. *Ophiostoma* 과 *Leptographium* 균이 분리된 채집한 소나무 뿌리와 줄기 시료의 모습. 목재 변색이 있음을 볼 수 있으며 내부 침입이 있음을 볼 수 있다.

표 4-2. 분리 수집된 *Ophiostoma*, *Lepgraphium* 균주 목록

균주	분리 지역	분리 주
<i>Leptographium koreanum</i>	포천	잣나무
<i>Leptographium pini-densiflorae</i>	포천	잣나무
<i>Leptographium procerum</i>	서천	소나무
<i>Leptographium sinoprocerum</i>	서천	소나무
<i>Leptographium</i> sp.	태안	소나무
<i>Ophiostoma breviasculum</i>	태안	소나무
<i>Ophiostoma floccosum</i>	태안	소나무
<i>Ophiostoma galeiforme like</i>	진주	소나무
<i>Ophiostoma ips</i>	사천, 진주, 서천, 태안, 포천	소나무
<i>Ophiostoma minus-like</i>	포천	잣나무
<i>Ophiostoma minutum-like</i>	진주	소나무
<i>Ophiostoma piceae</i>	태안	소나무
<i>Ophiostoma quercus</i>	태안	소나무
<i>Pesotum fragrans</i>	서천	소나무

1.1 *O. piceae* complex group 의 형태적 분석

채집하여 분리된 순서대로 균주 중 형태적으로 분류가 어려운 *Ophiostoma piceae* complex 균주에 대하여서는 자세한 현미경 관찰을 수행하여 형태적 특징을 조사하였다. 조사 자료에 의하면 그림4-2에서 나타난 바와 같이 같은 종이라도 *O. piceae* 는 분리주(isolate)에 따라서 상이한 균총 모습을 배지에서 나타낸다. 이러한 균총 모습은 느릅나무 마름병균인 *O. ulmi*의 경우에도 마찬가지로 분리주에 따라 상이한 균총 모습을 보이면서 *O. piceae* 와 구분이 어려운 정도로 유사한 균총 모습을 지니기에 매우 자세한 형태적 구분이 필요하고 분자적 구분이 필요함을 알 수 있다.

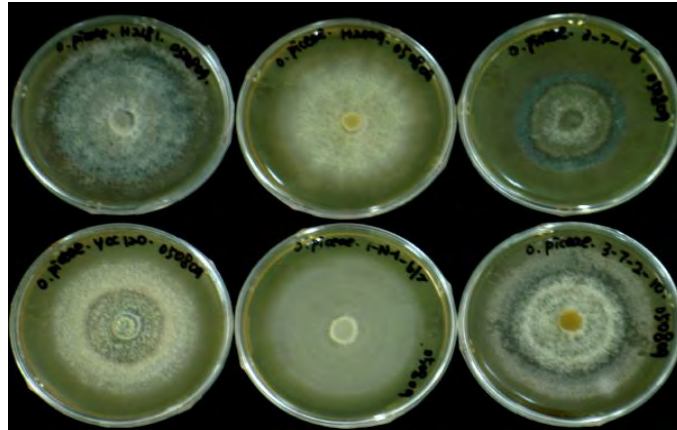


그림 4-2. 2% MEA의 동일한 배지에 키웠으나 서로 상이한 콜로니 형태 모습을 보이는 *O. piceae* 균주들. 1. *O. piceae* H2181(isolated from United Kingdom), 2. *O. piceae* H2009 (isolated from Austria), *O. piceae* 3-7-1-6 (isolated from Germany), 4. *O. piceae* ycc120 (isolated from Japan), 5. *O. piceae* 1-N-1-6/2 (isolated from Germany), 6. *O. piceae* 3-7-2-10 (isolated from Germany)

O. piceae complex 속에 속하는 종들이 모두 그림 4-3과 유사한 같은 균총 형태를 나타내므로 이 속에 속하는 대표적 종인 *O. piceae*, *O. quercus*, *O. floccosum*에 대하여 우선 광학 현미경 및 주사전자현미경 관찰을 통하여 그 형태적 특징을 비교 조사하여 그 결과를 그림 4-3~4-5 및 표4-3~4-5에 각각 나타내었다.

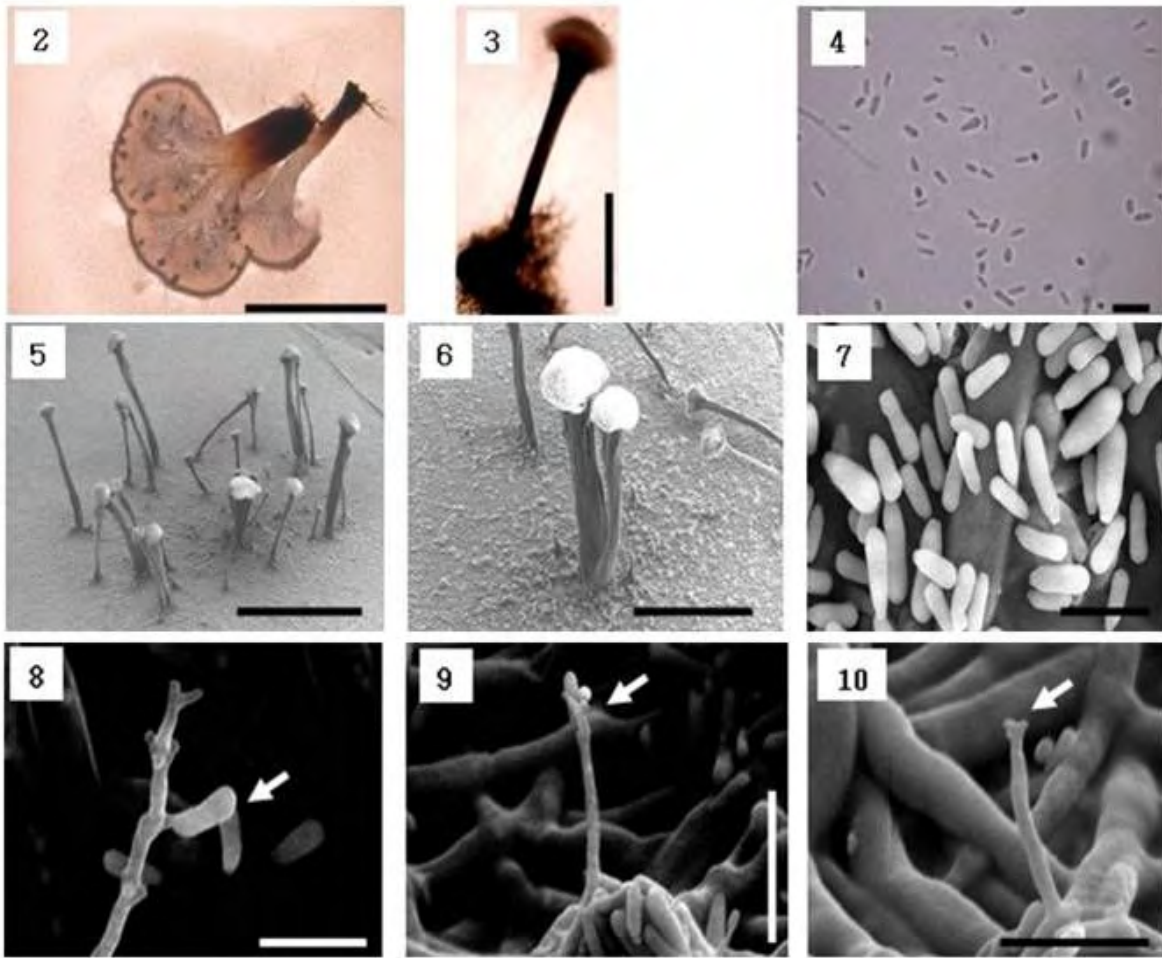


그림 4-3. *Ophiostoma piceae* 균의 형태적 특성. Macronematous and mononematous synnema with Pesotum-like anamorph(광학현미경 사진 2 and 3, 주사현미경 사진 5, and 6. Synnematosus conidia of *Sporothrix* synanamorph (광학현미경 사진 4, 7 (주사현미경 사진). Synanarmorphic conidiophores (광학현미경 사진 8-10. Various morphogenesis of *Sporothrix* anamorph (화살표 지시). Scale bars: 2= 500 μ m, 3= 200 μ m, 4= 5 μ m, 5= 1mm, 6= 500 μ m, 7= 5 μ m, 8= 5 μ m, 9 and 10= 10 μ m.

표 본 연구에서 분리한 *O. piceae* 균주와 알려진 type 균주 *O. piceae* H2009 균주(영국 기원, 참조균주)의 특성 비교

Characters	Species	
	<i>O. piceae</i> H2009	<i>O. piceae</i> (this study)
Colony color	whitish, ageing pale brownish	whitish, ageing pale brownish
Peritecia(min-average-max)	600-1015-1600 μ m	Not determined
Genus name of anamorph	<i>Pesotum/Sporothrix</i>	<i>Pesotum/Sporothrix</i>
Color of synnema stipe	Dark brown	Dark brown
Length(min-average-max)	470-1200-1500 μ m	500-1300-1600 μ m
Sexual behavior	heterothallic	Not determined
Growth temperature		
Optimum	22	22

Maximum Synnema conidial mass	≤32 White	≤32 White
Size of synnematosous conidia	5-15 x 1-5μm	1-15 x 1-5μm
Host	Various	Japanese black pine

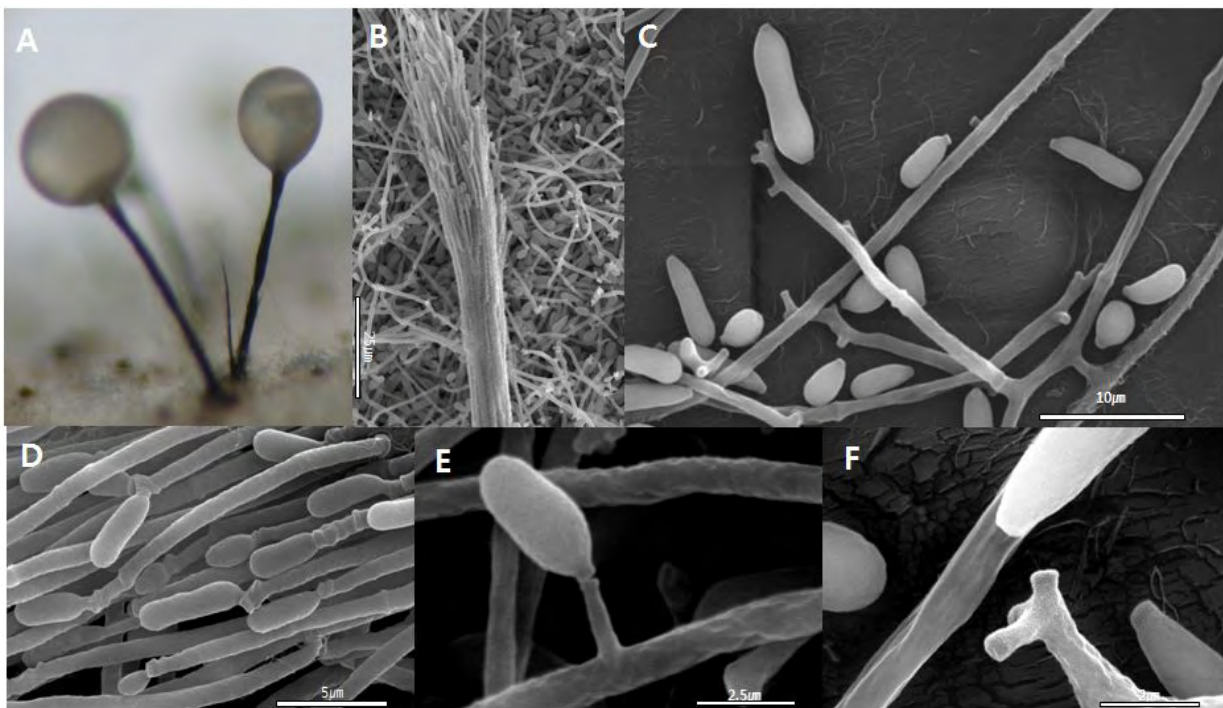


그림 4-4. *Ophiostoma quercus*의 형태적 모습. A : 실체현미경에서의 배지상에서 나온 synnema 모습, B : 주사전자현미경에서의 synnema 모습 (bar=25μm), C-D : 주사전자현미경에서의 분생자와 분생포자 형성 세포의 모습 (C:bar=10μm, D:bar=5μm), E : 주사전자현미경에서의 분생포자 형성 세포 모습 (bar=2.5μm), F : 주사전자현미경의 sporothrix형의 분생포자 형성 세포의 돌기 모습 (bar=2μm).

표 4-4. 본 연구에서 분리한 *O. quercus* 균주와 알려진 type 균주 *O. quercus* 균주(영국 기원, 참조균주)의 특성 비교

Characters	Species	
	<i>O. quercus</i>	<i>O. quercus</i> (this study)
Colony color	light to golden brown	light to golden brown
Peritecia(min-average-max)	1100-1515-1900	No detection
Genus name of anarmorph	<i>Pesotum/Sporothrix</i>	<i>Pesotum/Sporothrix</i>
Color of synnema stipe	Dark brown	Dark brown
Length (μm)	(130)350-500(600)	(127)354-510(598)
Shape of Conidia on Synnema	Cylindrical to Obovoid	Cylindrical to Obovoid
Size(μm)	(4.6-)2.6X1.7(-2.7)	(4.5-)2.5X1.5(-2.5)
Growth temperature($^{\circ}\text{C}$)		
Optimum	25	25
Maximum	≥ 32	≥ 32
Sexual behavior	heterothallic	No detection
Synnema conidial mass	White	White
Host	Oak and hardwood	Japanese black pine

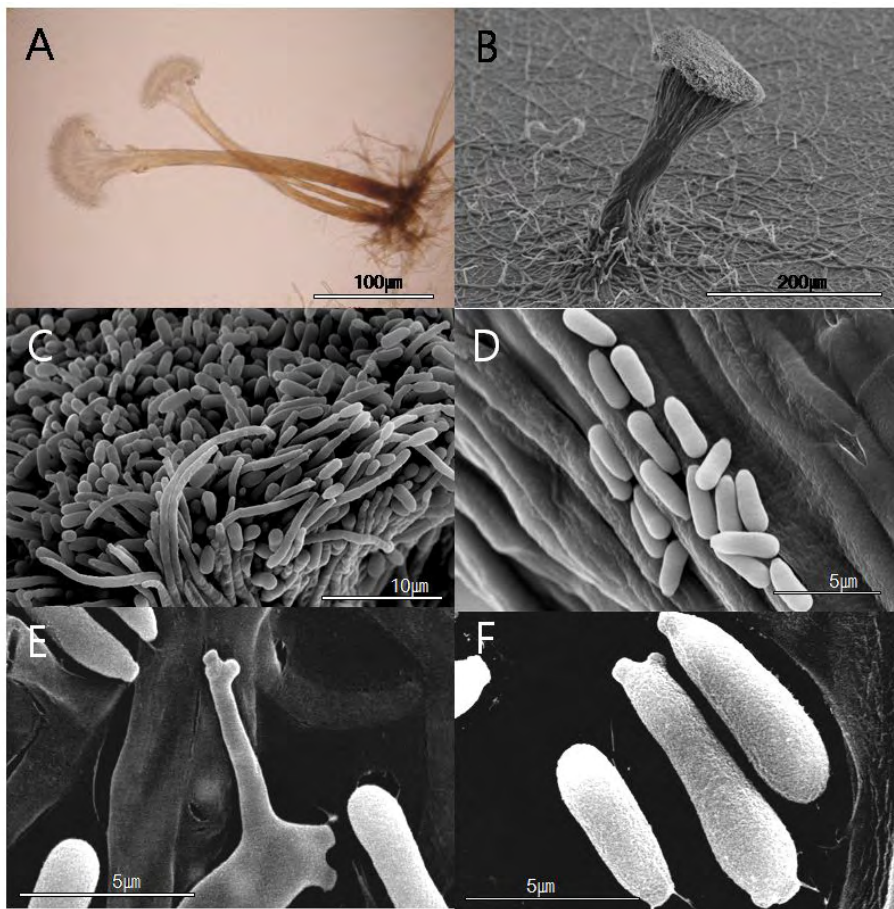


그림 4-5. *O. floccosum*의 형태적 특성. A: Light micrograph of synnemata. B: Scanning

electron micrograph of a synnema. C: conidiogenous cell. D: Conidia. E: Sporothrix synanamorph. F: Conidia. Scale bars: A=100 μ m; B=200 μ m; C=10 μ m; D-F=5 μ m. A: Light micrograph of synnemata. B: Scanning electron micrograph of a synnema. C: conidiogenous cell. D: Conidia. E: Sporothrix synanamorph. F: Conidia. Scale bars: A=100 μ m; B=200 μ m; C=10 μ m; D-F=5 μ m.

표 4-5. 본 연구에서 분리한 *O. floccosum* 균주와 알려진 type 균주 *O. piceae* 균주(영국 기원, 참조균주)의 특성 비교

Characters	<i>O. floccosum</i> ^a	<i>O. floccosum</i> (this study)
Perithecia		
Width of base (μ m)	155	No formation
Length of neck (μ m)	940-1600	
Ascospores		
Shape	kidney-shaped	No formation
Size (μ m)	5 × 1.7	
Synnemata		
Color	pale brown, red brown	pale brown, red brown
Length (μ m)	up to 300-500	300-400
Conidia on synnema		
Shape	cylindrical to ellipsoid	cylindrical to ellipsoid
Size (μ m)	3-5 × 1.5-2	3-4 × 1-2
Conidia on monomema		
Shape	ovoid, some elongate	ovoid
Size(μ m)	5-8 × 2-4	4-8 × 1.5-3

Opiostoma ips 종은 완전세대 외에도 불완전 세대가 Sporothrix, Pesotum, Hyalorhinocladiella 등 3 가지 형태의 불완전 세대의 모습을 지니며 특히 Pesotum 형태와 Sporothrix 형태는 느릅나무 마름병균과 매우 유사한 형태를 띠기 때문에 형태적 조사가 필요한 균주였다. 이에 따라 균학적 모습 조사하여 그림 4-6에 나타내었다.

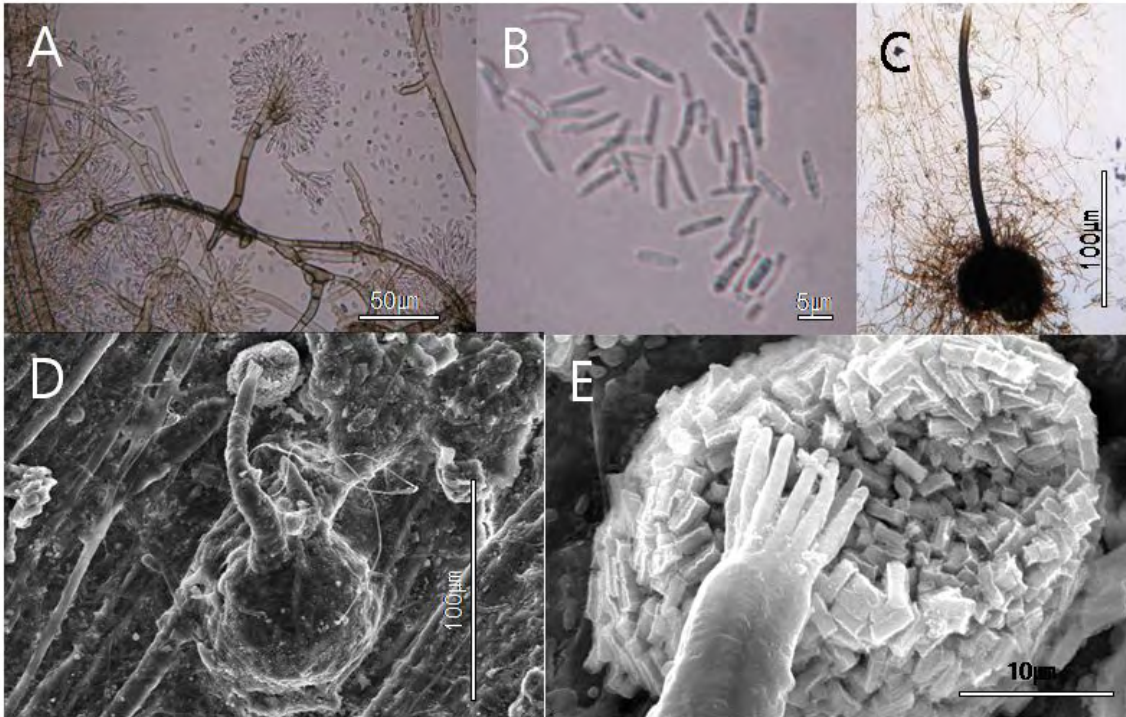


그림. 4-6. *Ophiostoma ips* 균의 형태적 특징. A: 불완전 세대의 분생자경과 포자 모습. B: 분생포자. C-D: 자낭구조. E: 자낭포자. Scale bars: A=50 μ m; B=5 μ m; C-D=100 μ m; E=10 μ m.

현재 이러한 결과를 마치고 최근 분양 수집된 *O. ulmi*, *O. novo-ulmi* subsp. *americana*에 대한 형태적 조사를 진행 중에 있다. 향후 *O. himal-ulmi*, *O. novo-ulmi* subsp. *novo-ulmi*의 균주 수집이 완료되면 이 또한 미세구조 수준에서의 형태적 특성을 조사하여 자료를 창출할 예정이다. 모든 수집 조사균주에 대한 형태조사가 완료되면 *O. piceae* complex 균주에 대한 전반적인 형태적 데이터가 완성되어 *O. ulmi* 검역에 필요한 대한 비교 자료가 완성될 수 있을 것으로 사료된다.

*Leptographium wagenri*에 대한 균주 수집은 국제적으로 소장균주가 매우 드문 대다가 *Grosmannia wagenri*로 명칭이 변경되면서 분류학적으로 근연관계에 있는 균주 수집을 추구하였다. 국내에 현재까지 *Grosmannia* 균류의 분리 보고가 없는 관계로 기존의 이름인 *Leptographium* 형태의 균주를 분리 조사하였다. 표 4-2에서 제시된 5종의 *Leptographium* 중 동정이 진행중인 *Leptographium* sp. 의 형태적 특징은 그림 4-7에 나타내었다. 이 자료는 향후 *Grosmannia wagenri* 균주의 수집이 완료되면 국내 종과 검역 대상 종의 비교를 하는데 기초 자료가 될 것이다.

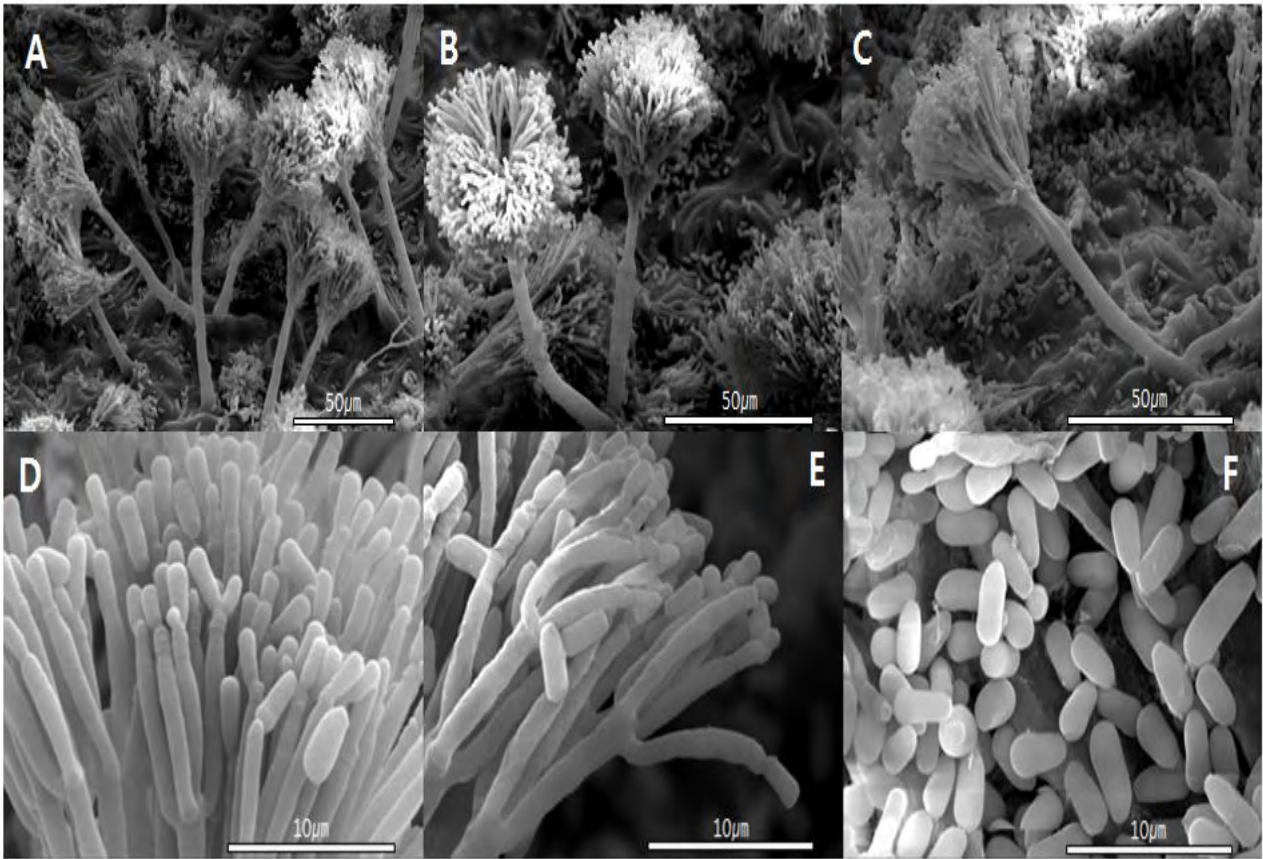


그림 4-7. *Leptographium* sp.의 형태적 모습. A-C : 주사전자현미경에서의 synnema 모습 (bar=50 μ m), D-E : 주사전자현미경에서의 분생자 모습 (bar=10 μ m), F : 주사전자현미경에서의 분생포자 모습 (bar=10 μ m).

1.2 *O. piceae* complex group 의 유전적 분석 및 마커 고안

GenBank 데이터베이스의 유전자 등록 정보와 보고된 연구 논문 자료를 검색하여 *Ophiostoma* 속과 *Ceratocystis* 속, 그리고 *Grosmannia* 속에 속하는 종들에 대한 계통분류학적 관계에 대한 사항을 조사한 결과 Beta-tubulin 유전자와 Translation elongation factor 1 α 유전자 상에서 종 간 변이가 있는 것으로 나타났다. 이에 따라 이들 속에 속하는 종들로부터 각각의 유전자를 얻기 위해 universal primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. Beta-tubulin 유전자는 T10과 BT12를 사용하였고, Translation elongation factor 1 α 유전자는 EF1-EF2를 사용하였다(Kim et al, 2003, Jacobs et al., 2004). 얻어진 PCR 산물은 T-easy vector에 클로닝하여 시퀀싱 하였고, 얻어진 염기서열은 constant 부위를 제외하였다. 그리고 종 특이적 유전자 마커를 얻기 위해서 Clustal W를 이용한 다중염기 서열 분석을 통해 균주별로 마커를 제작할 수 있었다(표 4-6).

표 4-6. *O. piceae*의 특이적 마커

Speceis	Target	Primers	Sequences	Size
<i>O. piceae</i>	TEF	PIE1	5'GTTCTGTCAGACGCTATGCTCGA3'	255bp
		PIE2	5'CGTGAGCTAGGTAGGGGAAGGA3'	
<i>O. quercus</i>	Beta-tubulin	OQE1	5'CAATCCTTAACGATCTTCTTCGAGAT3'	265bp
		OQE2	5'ACTGACGGTAGCAAAGAGAGGAGA3'	
<i>O. floccosum</i>	Beta-tubulin	Oflol	5' CCCCTCCTCCAAATTTAAGAGA3'	333bp
		Oflol2	5' TAGTTTCGTATATCAAACGCGTG3'	

제작된 마커는 다음과 같은 조성으로 PCR mixture를 만들었고, 마커를 만드는데 사용한 균주들의 genomic DNA를 사용하여 PCR을 수행하였다(표 4-7, 4-8). 또한 SYBR을 이용한 real-time PCR을 통해 각 마커의 민감성을 알아보았다. 다른 *O. piceae* complex group의 균주와 다른 종의 균주들과 같이 PCR을 수행한 결과 상당히 특이적으로 나타나는 것을 볼 수 있었다. *O. piceae*는 255bp의 밴드를 형성하였고, 1pg까지 피크가 형성하는 것을 볼 수 있었다(그림 4-8~4-10). *O. quercus*는 265bp 크기의 밴드가 생기는 것을 볼 수 있었고 민감성은 100fg까지 나타나는 것을 보았다(그림 4-11~4-13). *O. floccosum*의 경우 333bp의 산물을 얻을 수 있었고 민감성은 1pg 까지 나타났으나 melt 피크가 좋지 않은 것으로 보아 10pg까지 검출가능하다고 생각된다(그림 4-14, 4-15).

표 4-7. *O. piceae*, *O. quercus*, *O. floccosum* 검출을 위한 PCR mixture 조성

Components	Volume
2X free mix	10 μ l
PIE1 (10 pM)	1 μ l
PIE2 (10 pM)	1 μ l
template	1 μ l
D.W	To 20 μ l

표 4-8. *O. piceae*, *O. quercus*, *O. floccosum* 검출을 위한 PCR 조건

<i>O. piceae</i>		<i>O. quercus</i>		<i>O. floccosum</i>	
PCR Conditions	Cycles	PCR Conditions	Cycles	PCR Conditions	Cycles
95°C for 3 min	1	95°C for 3 min	1	95°C for 3 min	1
95°C for 30 sec		95°C for 30 sec		95°C for 30 sec	
54°C for 30 sec	30	56°C for 30 sec	30	56°C for 30 sec	30
72°C for 30 sec		72°C for 30 sec		72°C for 30 sec	
72°C for 5 min	1	72°C for 5 min	1	72°C for 5 min	1

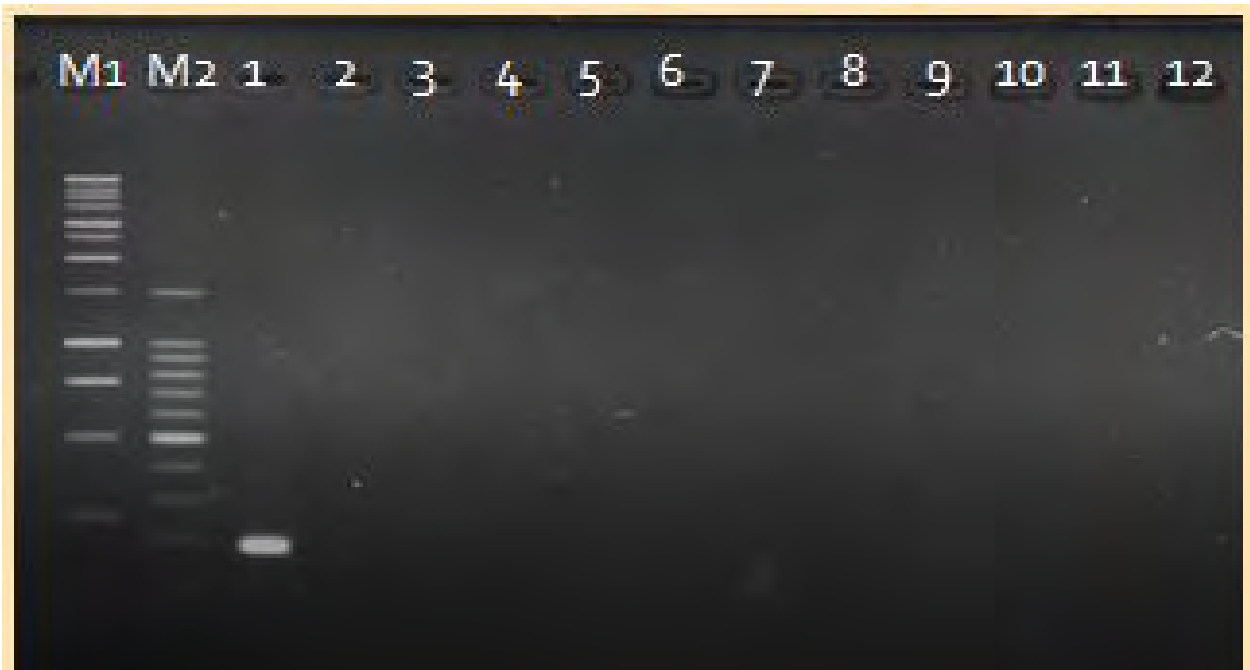


그림 4-8. *O. piceae* complex group내에서 *O. piceae* 검출 마커를 이용하여 *O. piceae* 검출. M1 : 1kb DNA marker, M2 : 100bp DNA marker, 1 : *O. piceae*, 2 : *O. brevisculum*, 3 : *O. flexuosum*, 4 : *O. subalpinum*, 5 : *O. canum*, 6 : *O. setosum*, 7 : *O. quercus*, 8 : *O. bacillisporum*, 9 : *O. tsotsi*, 10 : *O. himal-ulmi*, 11 : *O. novo-ulmi*, 12 : *O. ulmi*

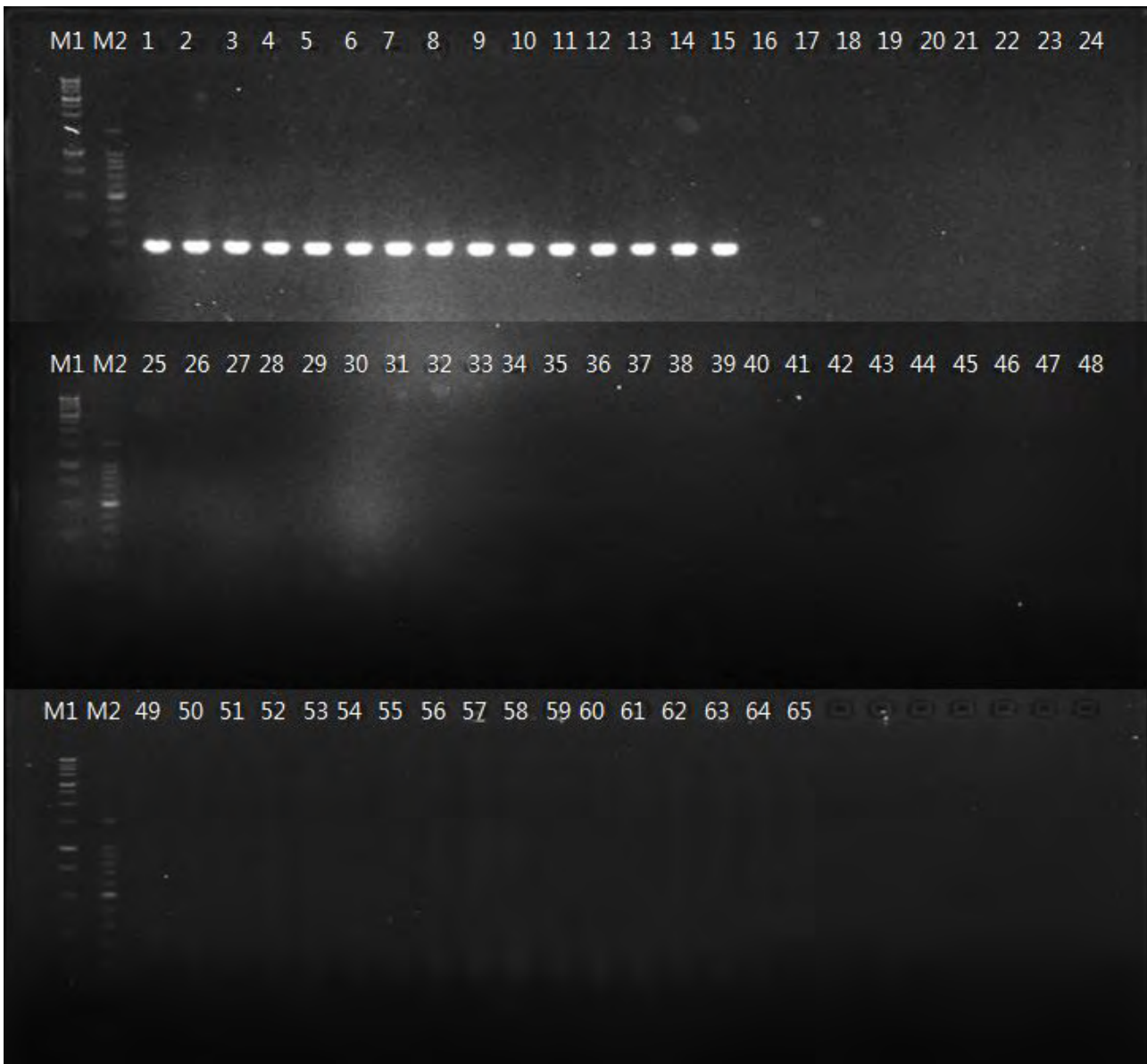


그림 4-9. Ophiostoma 균주 그룹과 다른 균류 내에서 *O. piceae* 검출 마커를 이용하여 *O. piceae* 검출. M1 : 1kb DNA marker, M2 : 100bp DNA marker, 1-15 : *O. piceae*, 16-28 : *O. quercus*, 29-30 : *O. brevisculum*, 31-32 : *O. cannum*, 33-34 : *O. flexusum*, 35 : *O. setosum*, 36 : *O. subalpinum*, 37 : *O. baciliosporum*, 38 : *O. tsotsi*, 39 : *O. himal-ulmi*, 40 : *O. novo-ulmi*, 41 : *O. ulmi*, 42-43 : *O. floccosum*, 44-45 : *O. minus*, 46 : *O. kryptum*, 47 : *O. tetropii*, 48-49 : *O. ips*, 50 : *O. bicolor*, 51 : *O. nigrocarpum*, 52 : *O. piliferum*, 53 : *O. botuliforme*, 54 : *O. longicollum*, 55 : *O. stenoceras*, 56 : *O. aureum*, 57 : *G. crassivaginata*, 58 : *O. americanum*, 59 : *O. larics*, 60 : *L. abietinum*, 61 : *L. terebrantis*, 62 : *Mucor* sp., 63 : *Aspergillus* sp., 64 : *Penicillium* sp., 65 : *Trichoderma* sp.

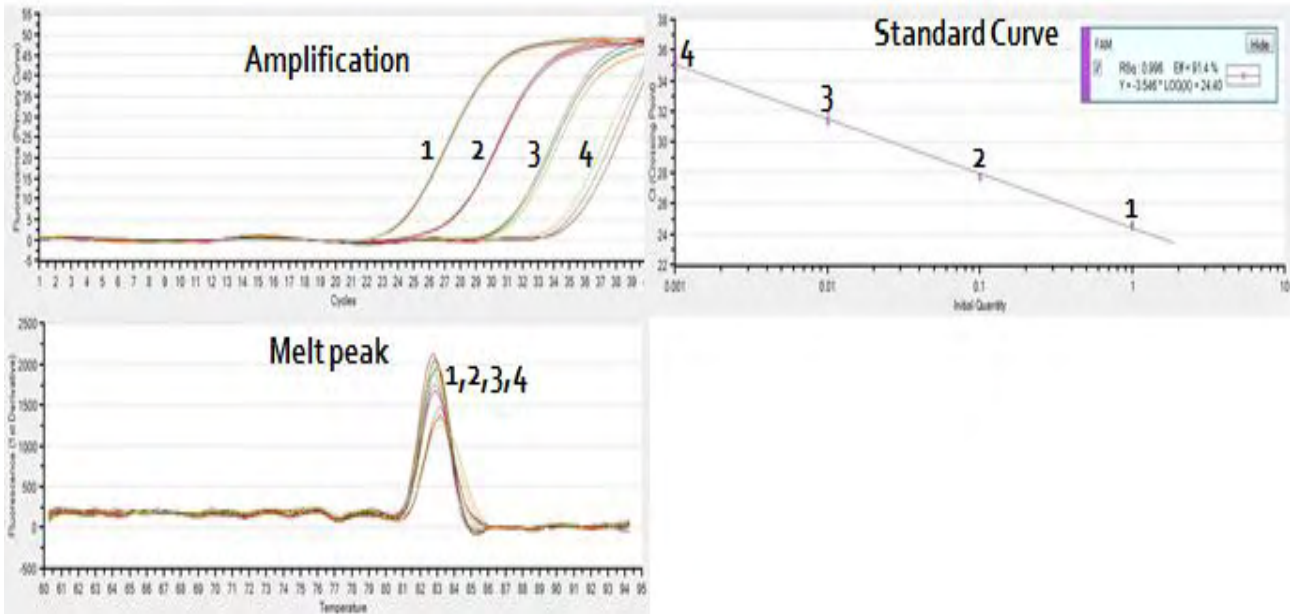


그림 4-10. SYBR green Real-time PCR을 이용한 *O. piceae* 마커 민감도 테스트 . DNA농도 1 : 1ng, 2 : 100pg, 3 : 10pg, 4 ; 1pg

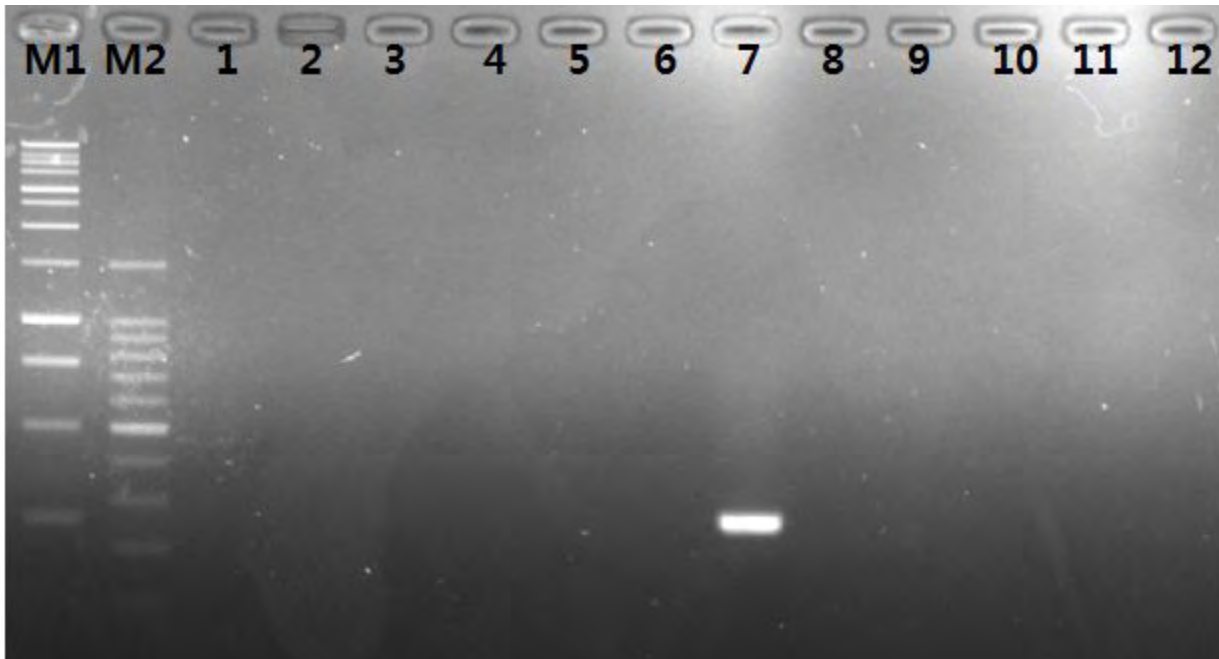


그림 4-11. *O. piceae* complex group내에서 *O. quercus* 검출 마커를 이용하여 *O. piceae* 검출 . M1 : 1kb DNA marker, M2 : 100bp DNA marker, 1 : *O. piceae*, 2 : *O. brevisculum*, 3 : *O. flexuosum*, 4 : *O. subalpinum*, 5 : *O. canum*, 6 : *O. setosum*, 7 : *O. quercus*, 8 : *O. bacillisporum*, 9 : *O. tsotsi*, 10 : *O. himal-ulmi*, 11 : *O. novo-ulmi*, 12 : *O. ulmi*

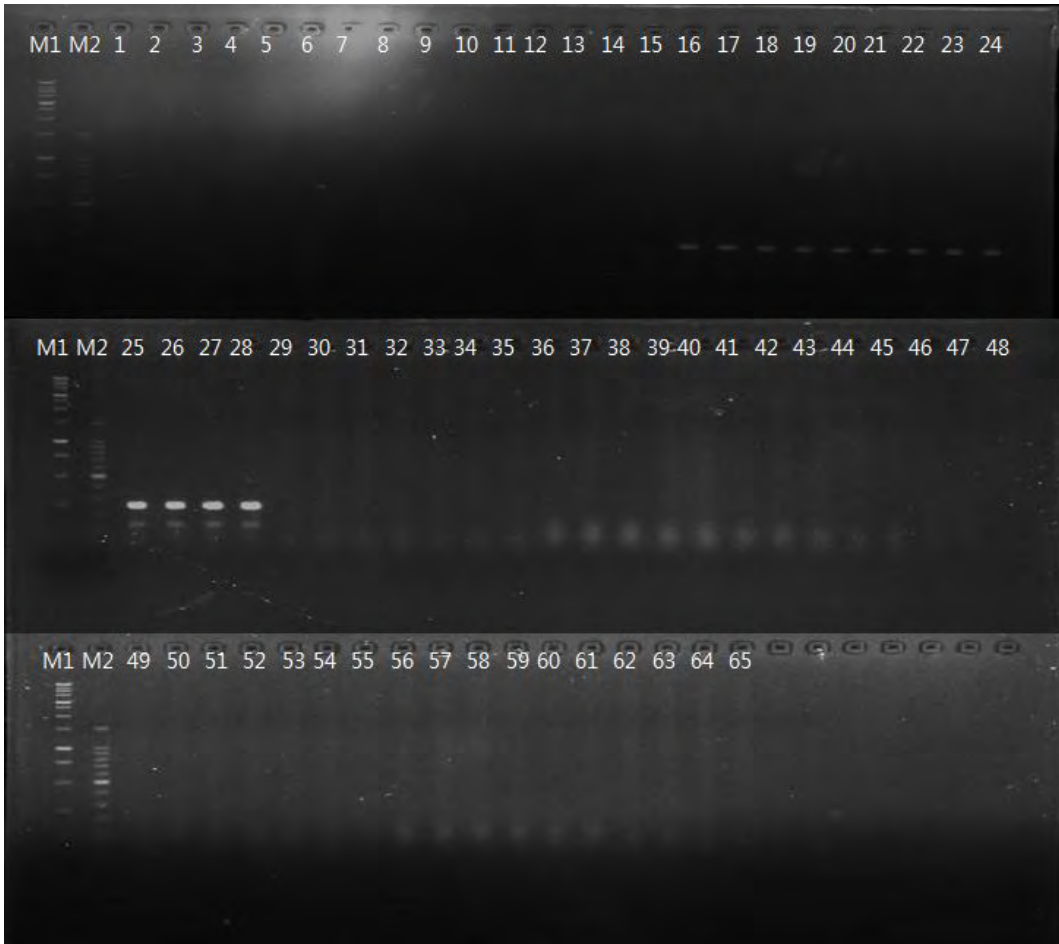


그림 4-12. Ophiostoma 균주 그룹과 다른 균류 내에서 *O. quercus* 검출 마커를 이용하여 *O. quercus* 검출. M1 : 1kb DNA marker, M2 : 100bp DNA marker, 1-15 : *O. piceae*, 16-28 : *O. quercus*, 29-30 : *O. brevisculum*, 31-32 : *O. cannum*, 33-34 : *O. flexusum*, 35 : *O. setosum*, 36 : *O. subalpinum*, 37 : *O. bacilispurum*, 38 : *O. tsotsi*, 39 : *O. himal-ulmi*, 40 : *O. novo-ulmi*, 41 : *O. ulmi*, 42-43 : *O. floccosum*, 44-45 : *O. minus*, 46 : *O. kryptum*, 47 : *O. tetropii*, 48-49 : *O. ips*, 50 : *O. bicolor*, 51 : *O. nigrocarpum*, 52 : *O. piliferum*, 53 : *O. botuliforme*, 54 : *O. longicollum*, 55 : *O. stenoceras*, 56 : *O. aureum*, 57 : *G. crassivaginata*, 58 : *O. americanum*, 59 : *O. larics*, 60 : *L. abietinum*, 61 : *L. terebrantis*, 62 : *Mucor* sp., 63 : *Aspergillus* sp., 64 : *Penicillium* sp., 65 : *Trichoderma* sp.

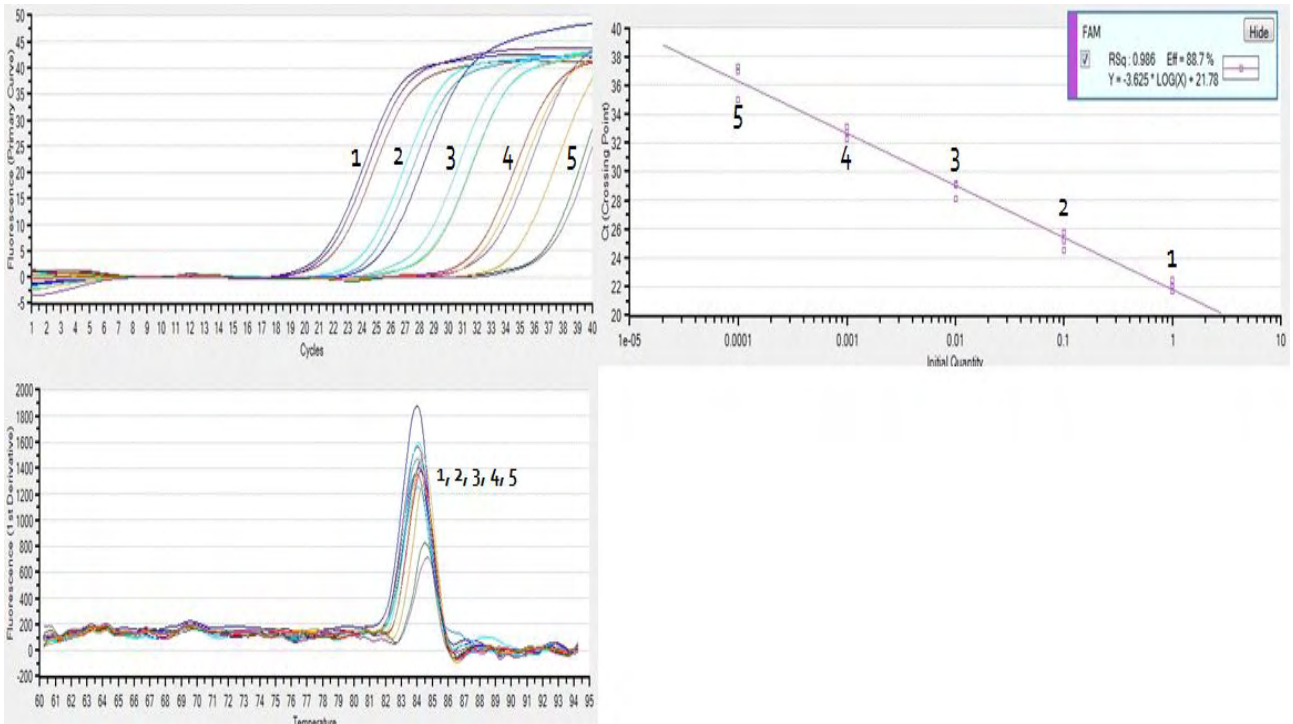


그림 4-13 SYBR green Real-time PCR을 이용한 *O. quercus* 마커 민감도 테스트. DNA 농도 (1 : 1ng, 2 : 100pg, 3 : 10pg, 4 : 1pg, 5 : 100fg).

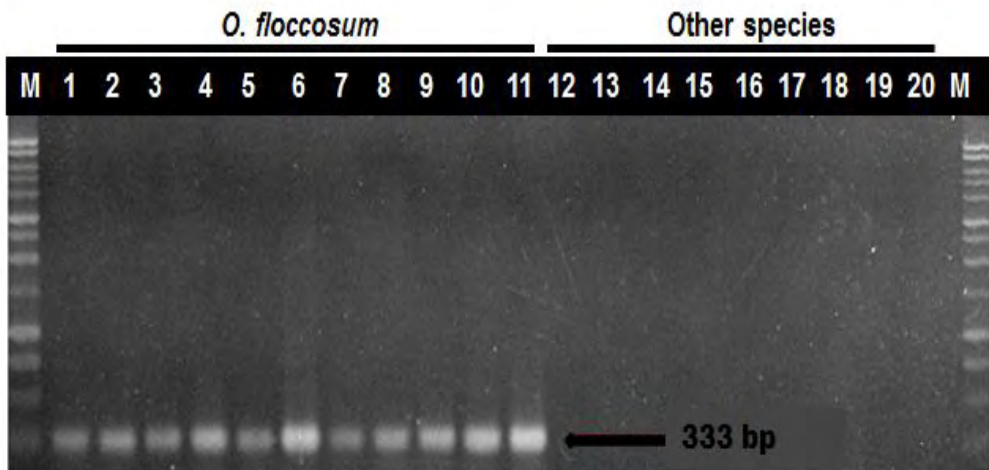


그림 4-14. *O. floccosum* 분자적 마커를 이용한 유전자 증폭. M : 1kb DNA Marker, 1-11 : *O. floccosum*, 12 : *O. piceae*, 13 : *O. quercus*, 14 : *O. canum*, 15 : *O. ips*, 16 : *O. setosum*, 17 : *O. minus*, 18 : *Leptographium terebrantis*, 19 : *Penicillium* sp., 20 : *Trichoderma* sp.

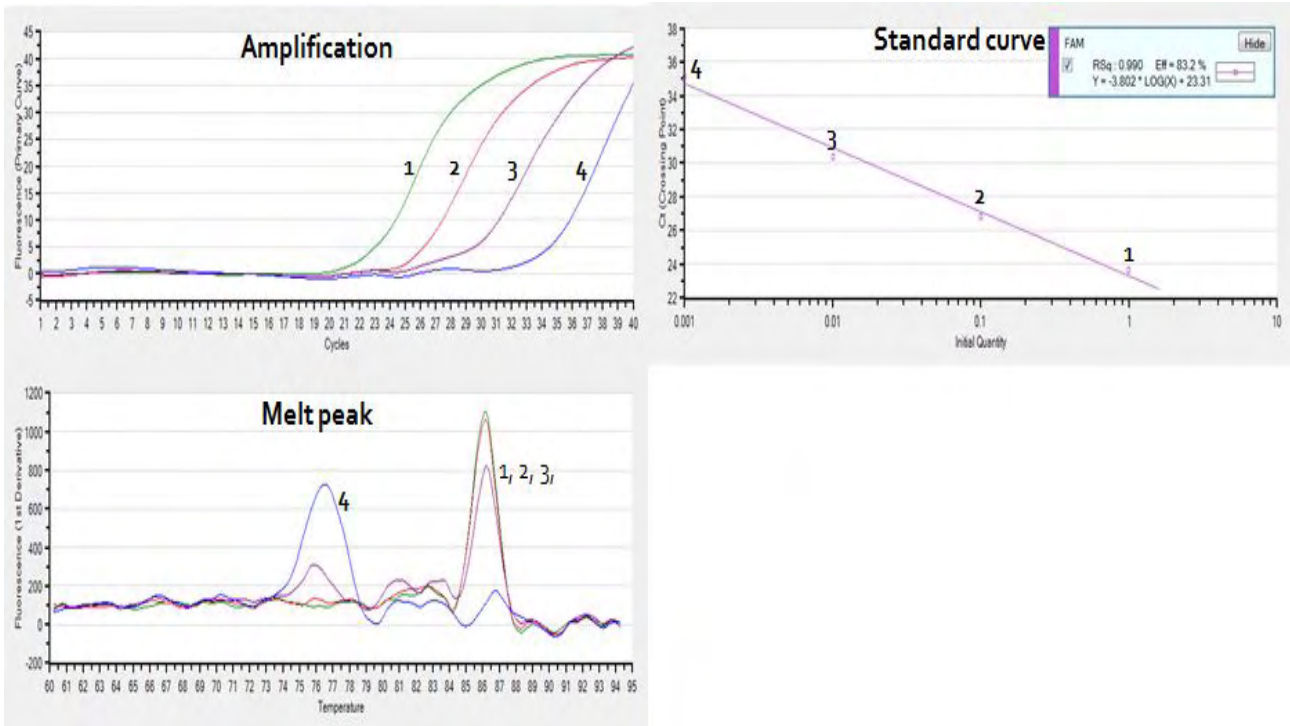


그림 4-15. SYBR green Real-time PCR을 이용한 *O. floccosum* 마커 민감도 테스트. DNA 농도 1 : 1ng, 2 : 100pg, 3 : 10pg, 4 : 1pg

1.3 *O. piceae*와 *O. quercus*균의 목재표면에서의 직접 검출 시험

마커의 특이성이 확인된 *O. piceae*와 *O. quercus*균을 대상으로 2010년 6월 검역관계자와의 협의 미팅에서 제시된 목재에서의 직접 검출 기술 가능성을 평가하였다. 제작된 마커가 목재 시료에서부터 특정 균을 동정할 수 있는가를 알아보기 위해 목적 균을 목재에 접종(그림 4-16A: *O. piceae*, 그림 4-15B: *O. quercus*) 한 후 DNA의 추출을 거치지 않고 곰팡이 포자를 직접 이용하여 동정을 실시하였다(그림 4-16; D,E). 또한 이들 균류가 섞여 있을 경우의 마커 DNA의 specificity를 알아보기 위해 목재상에 혼합 배양(그림 4-16C)을 한 후 두 종의 마커 프라이머를 한번에 이용하여 이들이 검출되는가를 살펴 본 결과 이들 마커가 변색된 목재에 이들 균이 혼합되어 있어도 이들이 확연히 검출되는 것을 확인 할 수 있었다(그림 4-16F). 이 2종은 소위 SIBLING SPECIES라고 하여 오래전부터 형태적 구분이 어려운 종으로 알려진바 본 분자마커를 이용한 구분은 본 연구에서 제작한 *O. piceae*와 *O. quercus* 마커가 실용적으로 활용 가능성을 제시한다.

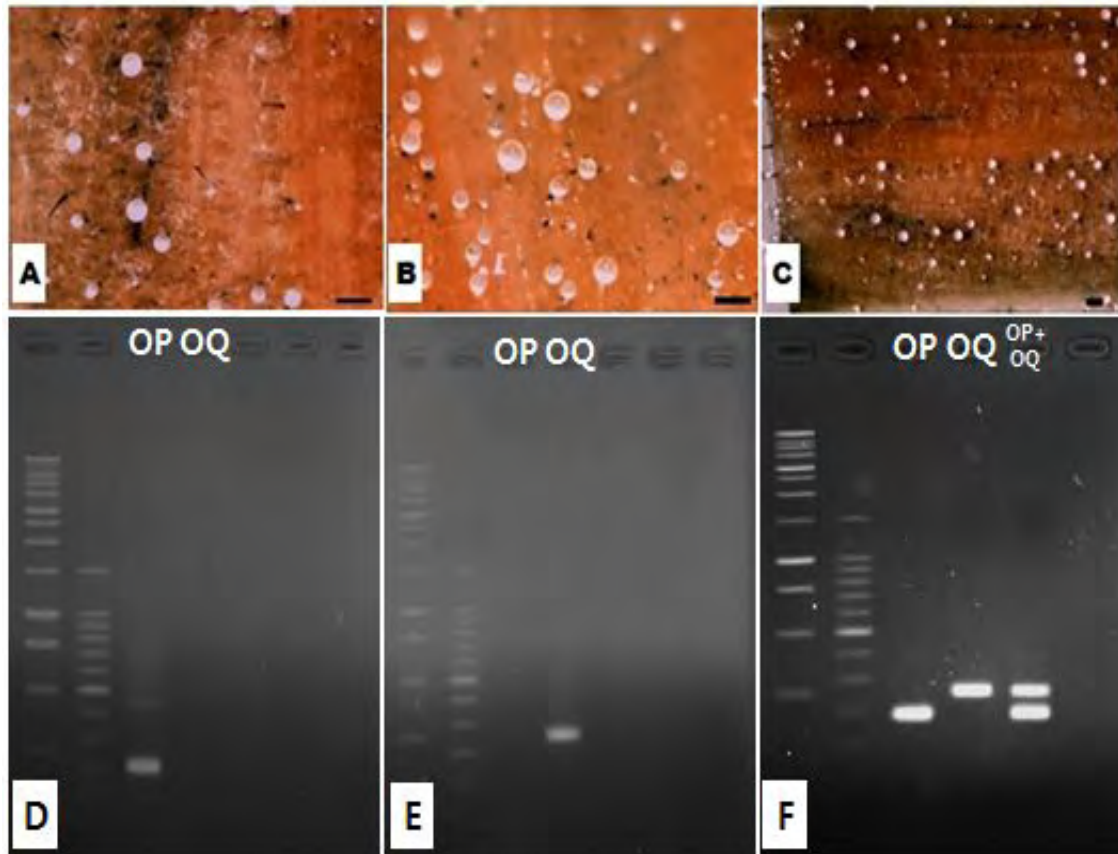


그림 4-16. 목재에 균을 접종한 모습과 목재로부터 바로 PCR을 한 전기영동 사진 A : *O. piceae*를 접종한 나무 모습, B : *O. quercus*를 접종한 나무 모습, C : *O. piceae* 와 *O. quercus*를 같이 접종한 나무 모습, D : A 목재에서 *O. piceae* 와 *O. quercus*의 특이적 마커를 이용한 PCR 산물, E : B 목재에서 *O. piceae* 와 *O. quercus*의 특이적 마커를 이용한 PCR 산물 F : C 목재에서 *O. piceae* 와 *O. quercus*의 특이적 마커를 이용한 PCR 산물 (OP: *O. piceae*, OQ: *O. quercus*)

2. *Ceratocystis umli*의 개칭 균류인 *Ophiostoma ulmi* 및 그 유사균에 대한 분자 마커 개발

이 균은 느릅나무 마름병(Dutch elm disease)원균으로서 1900년대 초부터 1970년 초기 까지 유럽과 북미에서 대유행 하였고 중앙아시아와 남서부에 이르기까지 널리 유행하여 막대한 느릅나무를 산림을 훼손 시킨 종이다. 이 곰팡이는 Bea Schwarz에 의해 1922년 네덜란드에서 처음 분리 되었으며 형태학적인 특징에 의해 *Graphium ulmi*로 명명 되었다. 1932년 Christina Buisman에 의해 유성세대가 밝혀짐으로 *Ceatostomella ulmi*로 다시 명명되었다가 Nannfeldt에 의해 *Ophiostoma* 속으로 다시 분류 되었다. 그 후, 다시 Moreau에 의해 또다시 *Ceratocystis ulmi*로 명명 됨. 그 후 Crane, Schokenecht, Hunt에 의해 *Ceratocystis*와 *Ophiostoma* 속 간의 무성세대의 형태학적 특징이 정립이 되면서 de Hoog와 Scheffer에 의해 *Ophiostoma ulmi*로 다시 표기되어 각 나라의 Culture centre에 보관 유지되어 왔다. 1940년에 북미와 유럽에 새로운 병원형의 느릅나무 마름병균인 *O. novo-ulmi*의 출현과 더불어 중앙아

시아 생태종인 *O. himal-ulmi* 의 발견되어 느릅나무 마름병균은 *O. ulmi* (원초적 유럽형), *O. novo-ulmi* (신규 유럽형, 북미형) *O. himal-ulmi* (중앙아시아형) 으로 세분 되었다. 또한 *O. novo-ulmi* (신규 유럽형, 북미형) 은 두 아종인 *O. novo-ulmi* subsp. *novo-ulmi* 와 *O. novo-ulmi* subsp. *americana* 이며 Brasier와 Kirk에 의해 보고되었다.

따라서 현행 국내 검역 규정에 명시된 *Ceratocystis ulmi* 는 *Ophiostoma ulmi* 로 개정되어 야하며 동시에 이 균은 *Ophiostoma ulmi*, *O. himal-ulmi*, *O. novo-ulmi* subsp. *novo-ulmi*, *O. novo-ulmi* subsp. *americana* 등으로 세분해서 관리되어야 한다.

더불어 1993년 미국 농무성은 캐나다로부터 원목수입을 하면서 *Ophiostoma ulmi*의 유입을 방지하고 확산을 저지하기 위하여 원목에 존재하는 *Ophiostoma* 균류에 대한 정보를 요구하였다. 그 배경에는 *O. ulmi*에 대한 유전학적인 연구 결과 분류학적으로 *O. piceae* complex 에 속하는 곰팡이 종과 *O. ulmi*간에 교잡가능성이 제기 되면서 *O. ulmi* 유사 균류와의 하이브리드(변이종) 출현으로 일어날 수 있는 커다란 새로운 생리형의 느릅나무병균의 확산과 자국의 산림을 보호하려는 조치였다 (C. Breuil 교수, 캐나다 브리티쉬 컬럼비아대학교, personal communication). *O. piceae* complex 에 속하는 균류는 분류학적으로 형태적 분류가 매우 어려워 국제적으로도 동정 전문가 희귀한 균류이다. 여기에 속하는 잘 알려진 종으로는 *Ophiostoma ulmi*, *O. himal-ulmi*, *O. novo-ulmi* subsp. *novo-ulmi*, *O. novo-ulmi* subsp. *americana* 등을 포함하여 목재변색균으로 피해를 주는 것으로 유명한 *O. piceae*, *O. quercus*, *O. floccosum*, *O. setosum* 등이 있다.

따라서 현행 검역 대상 곰팡이인 *Ceratocystis ulmi*를 관리하기 위해서는 *Ophiostoma ulmi*, *O. himal-ulmi*, *O. novo-ulmi* subsp. *novo-ulmi*, *O. novo-ulmi* subsp. *americana* 등을 포함하여 *O. piceae*, *O. quercus*, *O. floccosum*, *O. setosum* 등에 관한 분류, 동정, 진단이 반드시 이루어져야 한다. 그 중 *O. piceae*, *O. quercus*, *O. floccosum*는 이미 제작되었다.

실험에 사용된 균주들은 한국에서 분리 동정된 균주와 브리티쉬 컬럼비아 대학교 (UBC), 한국 농업미생물 보존 센터 (KACC)로부터 분양을 받았다 (표 4-9, 그림 4-17,18,19).

표 4-9. 수집된 *Ophiostoma ulmi*와 *O. novo-ulmi* 및 근연종 목록

Fungal species	Host	Country	Culture collection and collector
1 <i>Ophiostoma novo-ulmi</i>	-	-	KACC 41753
2 <i>O. ulmi</i>	-	-	KACC 40252
3 <i>O. floccosum</i>	Nut pine	Korea	KUC 2416
4 <i>O. quercus</i> H1042	Oak	UK	Brasier and Kirk
5 <i>O. setosum</i>	radiata pine	Korea	KACC 43420
6 <i>O. canum</i>	beetle of Tomicus minor	Austria	KACC 45590
7 <i>O. piceae</i> AU55.3	Lodgepole pine	Canada	A. Uzonovic
8 <i>Fusarium solani</i>	Potato	Denmark	KACC 45300
9 <i>Leptographium wingfieldii</i>	Scots pine	South africa	KACC 46209
10 <i>Grosmannia clavigera</i>	ponderosa pine	USA	KACC 46195
11 <i>Trichoderma</i> sp.	Elm tree	Korea	DUCC

KACC : Korea Agriculture Culture Collection, DUCC : Dankook University Culture Collection.

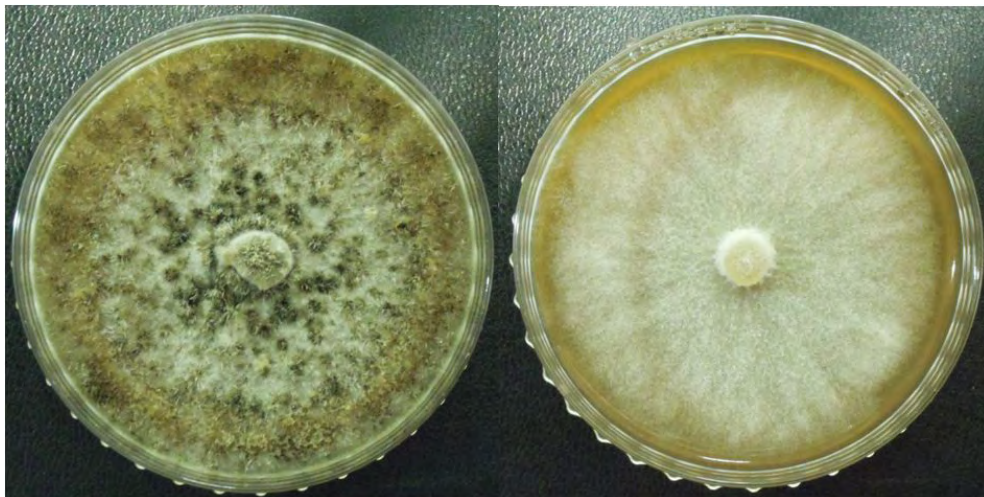


그림 4-17. MEA 배지에서 배양된 *Ophiostoma ulmi* (좌)와 *O. novo-ulmi* (우)의 콜로니.

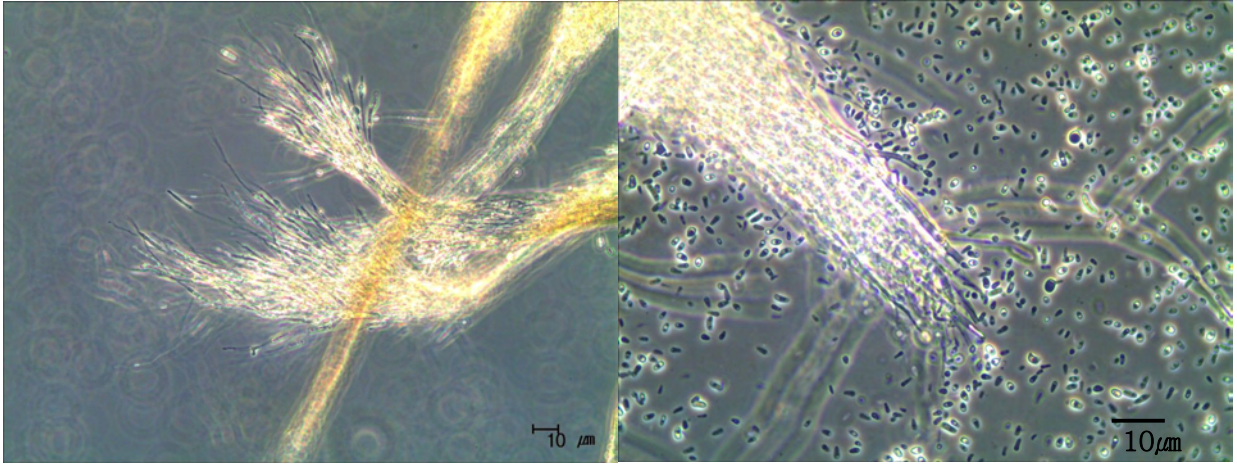


그림 4-18. *Ophiostoma ulmi*의 형태 관찰 scale bar=10um.

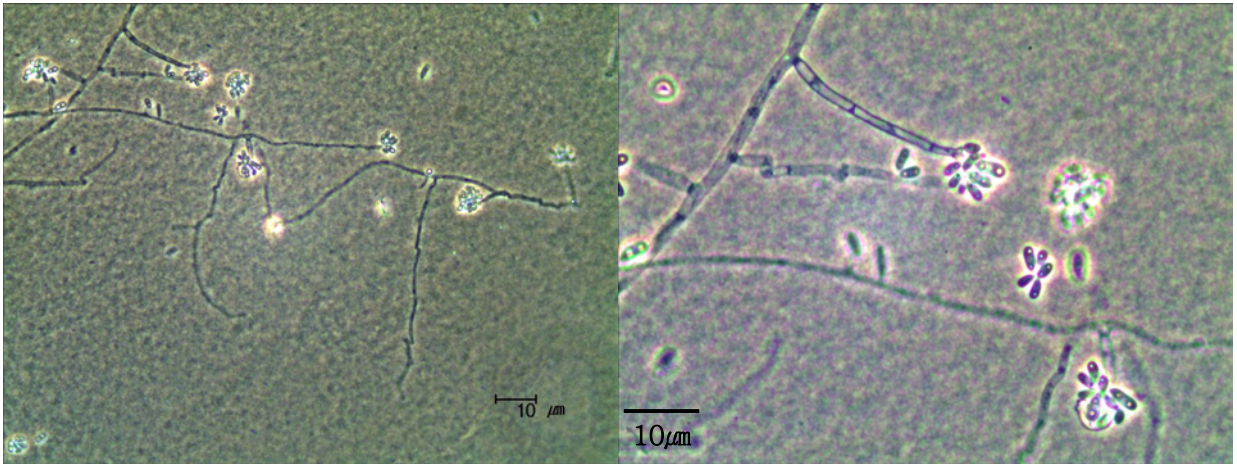


그림 4-19. *Ophiostoma novo-ulmi*의 형태 관찰 scale bar=10um.

유전자 분석을 위한 목적 유전자는 β -tubulin 유전자를 이용하였다. 위와 같은 방법을 수행하여 *O. ulmi*와 *O. novo-ulmi*의 종특이적 마커를 얻을 수 있었다 (표 4-10). 하지만 이들 두 종간의 β -tubulin 유전자 상의 변이가 거의 유사함을 알 수 있었다. 그러나 제작된 프라이머를 이용하여 *O. piceae* complex 그룹 내에서 *O. ulmi*와 *O. novo-ulmi*의 동정을 실시할 수 있는 것으로 확인 되었다 (그림 4-20). 얻어진 마커는 약 300bp의 산물을 얻을 수 있을 것으로 확인 되었다. 증폭 된 300bp의 DNA fragment에 Avr II를 처리하여 보았을 때 *O. ulmi*는 잘리지 않아 *O. novo-ulmi*와 구분 할 수 있었다 (그림 4-21). 검출 마커의 민감도 테스트를 해본 결과 일반 PCR의 경우 *O. ulmi*는 50 pg, *O. novo-ulmi*는 5 pg의 gDNA까지 검출이 가능하였다 (그림 4-22,23). Real-time PCR의 경우 *O. ulmi*와 *O. novo-ulmi* 모두 100 fg의 gDNA까지 검출이 가능하였다 (그림 4-24,25).

표 4-10. *O. piceae* complex 그룹의 β -tubulin 유전자 시퀀스 정보로부터 얻어진 *O. ulmi*와 *O. novo-ulmi*의 특이적 마커

Target	Primers	Sequences	Tm
β -tubulin	ULM 1F	5'-TGCTAGATCTATTCTTGACAGCGG-3' (24mer)	56.5°C
	ULM 2R	5'-AAAGTCAGTT TTGTGCAACGAGTATA-3' (26mer)	55.3°C

표 4-11. *O. ulmi*와 *O. novo-ulmi* 검출을 위한 PCR mixture 조성

Components	Volume
2X free mix	10 μ l
ULM-1F (10 pM)	1 μ l
ULM-2R (10 pM)	1 μ l
template	1 μ l
D.W	To 20 μ l

표 4-12. *O. ulmi*와 *O. novo-ulmi* 검출을 위한 PCR 조건

PCR Conditions	Cycles
95°C for 3 min	1
95°C for 30 sec	
52°C for 30 sec	30
72°C for 30 sec	
72°C for 5 min	1

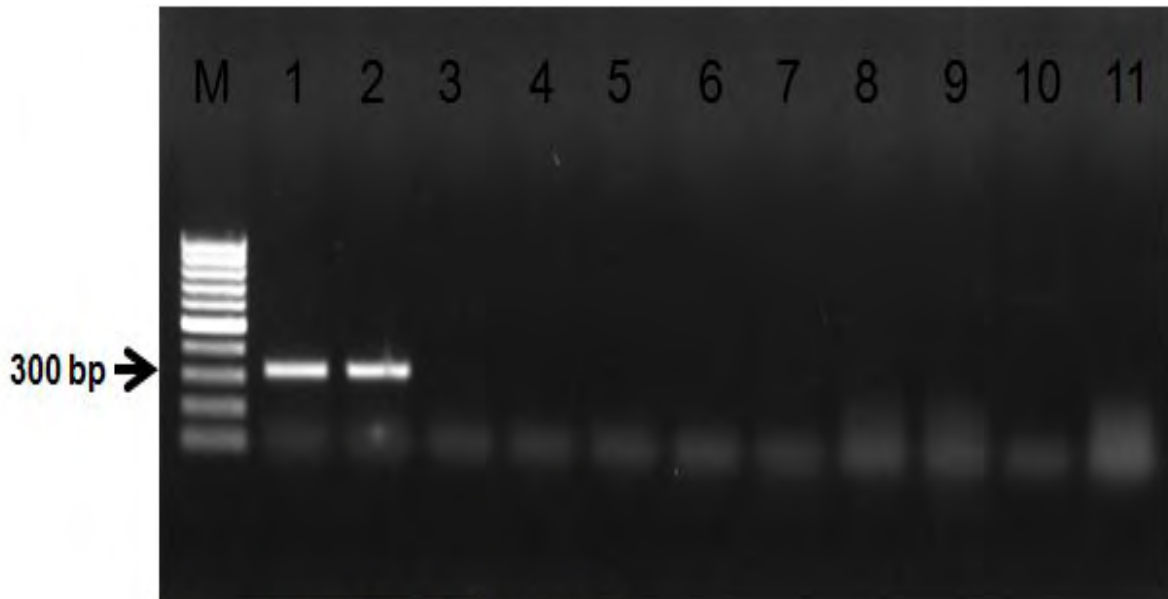


그림 4-20. *O. ulmi*와 *O. novo-ulmi* 검출 마커를 이용한 유전자 증폭. M : 100 bp ladder marker, 1 : *Ophiostoma novo-ulmi*, 2 : *O. ulmi*, 3 : *O. floccosum*, 4 : *O. quercus* H1042, 5 : *O. setosum*, 6 : *O. canum*, 7 : *O. piceae* AU55.3, 8 : *Fusarium solani*, 9 : *Leptographium wingfieldii*, 10 : *Grosmannia clavigera*, 11 : *Trichoderma* sp.

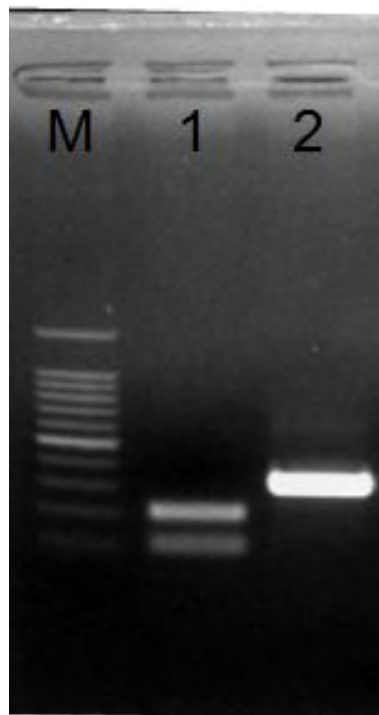


그림 4-21. *O. ulmi*와 *O. novo-ulmi* 의 구분을 위한 PCR 산물의 Dra I 처리 결과. M : 100 bp ladder marker, 1 : *Ophiostoma novo-ulmi*, 2 : *O. ulmi*.

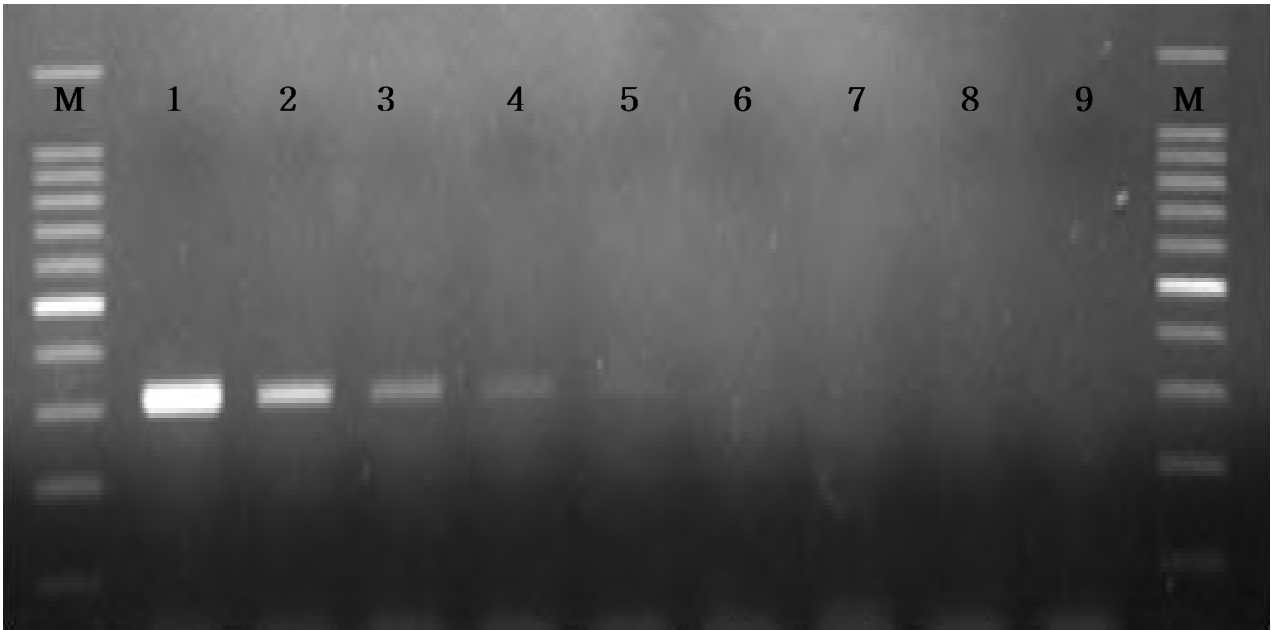


그림 4-22. *Ophiostoma ulmi* 종에 대한 검출 마커의 민감도. M : 100 bp ladder marker, 1 : 5 ng, 2 : 1 ng, 3 : 200 pg, 4 : 100 pg, 5 : 50 pg, 6 : 20 pg, 7 : 10 pg, 8 : 5 pg, 9 : 1 pg.

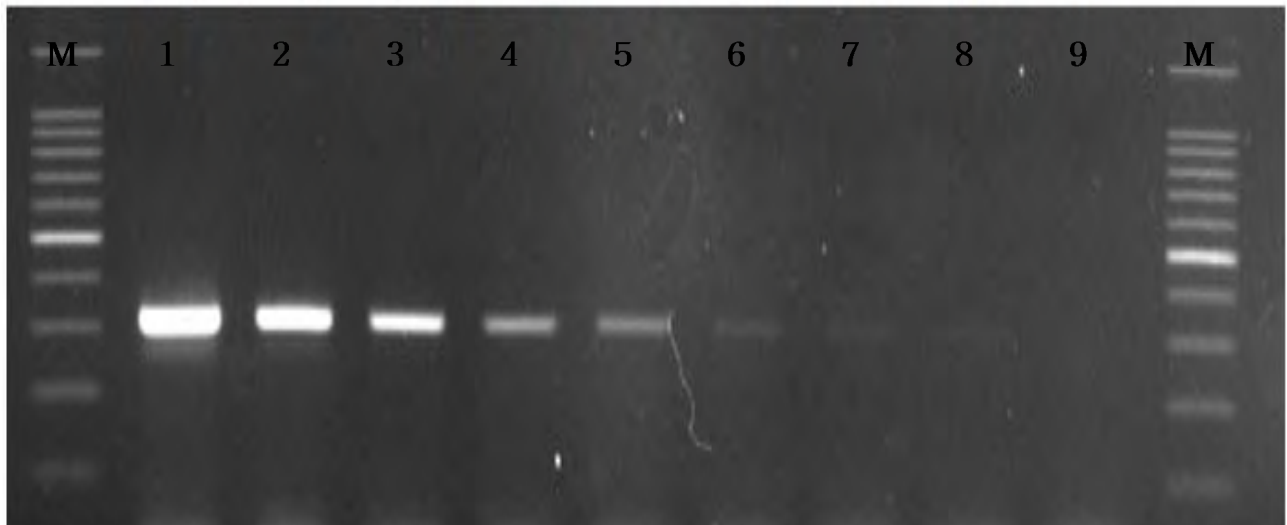


그림 4-23. *Ophiostoma novo-ulmi* 종에 대한 검출 마커의 민감도 (M : 100 bp ladder marker, 1 : 5 ng, 2 : 1 ng, 3 : 200 pg, 4 : 100 pg, 5 : 50 pg, 6 : 20 pg, 7 : 10 pg, 8 : 5 pg, 9 : 1 pg).

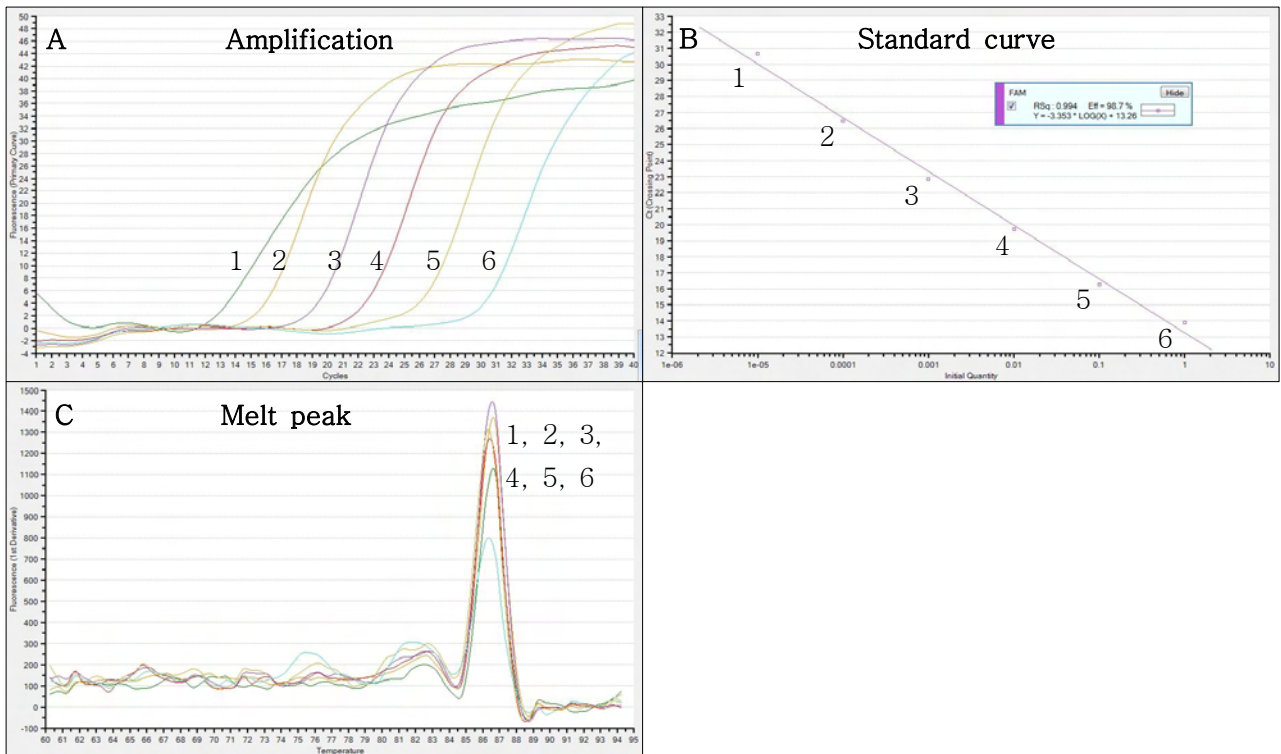


그림 4-24. SYBR green Real-time PCR을 이용한 *Ophiostoma ulmi* 검출 마커의 민감도 테스트 (A : amplification plot, B : Standard curve, C : Melt peak. 1 : 10 ng, 2 : 1 ng, 3 : 100 pg, 4 : 10 pg, 5 : 1 pg, 6 : 100 fg).

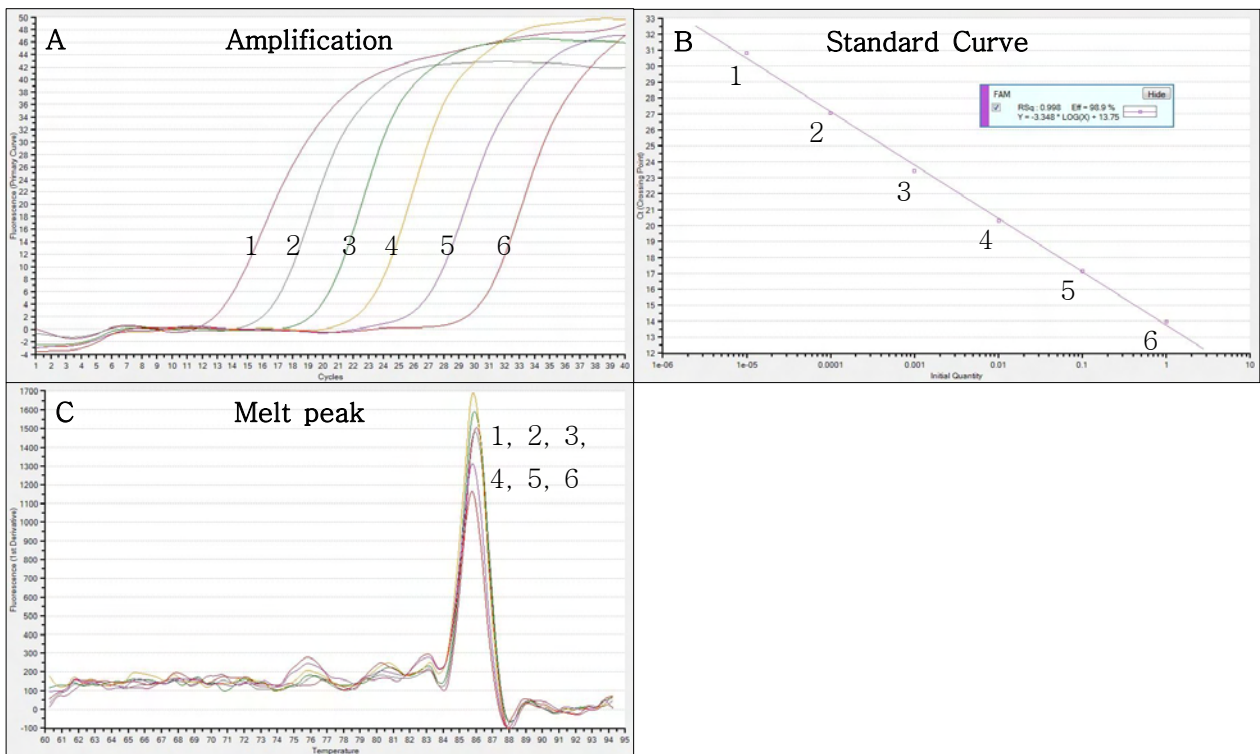


그림 4-25. SYBR green Real-time PCR을 이용한 *Ophiostoma novo-ulmi* 검출 마커의 민감도 테스트 (A : amplification plot, B : Standard curve, C : Melt peak. 1 : 10 ng, 2 : 1 ng, 3 : 100 pg, 4 : 10 pg, 5 : 1 pg, 6 : 100 fg).

3. *Ophiostoma wagenari*의 개칭 균류인 *Grosmannia wageneri* 및 그 유사균류 *Leptographium*에 대한 분자 마커 개발

이 균은 침엽수의 뿌리 썩음을 일으키는 수목병균이다. 이 균은 최근 까지 완전세대인 *Ophiostoma* 속에 속하는 균류의 불완전 세대의 한 형태로서 불완전균류로 여겨져 왔다. 2006년 *Ophiostoma* 속에 속하는 균류중 불완전 세대의 형태적 특성이 *Leptographium*-like 한 균들은 새로운 속인 *Grosmannia* 로 분류하는 체계로 바뀌게 되었다. 이에 따라 현행 검역규정에 있는 식물병원균 *Leptographium wagenari* 는 *Grosmannia wageneri* 로 재분류되어 관리가 필요한 실정이다.

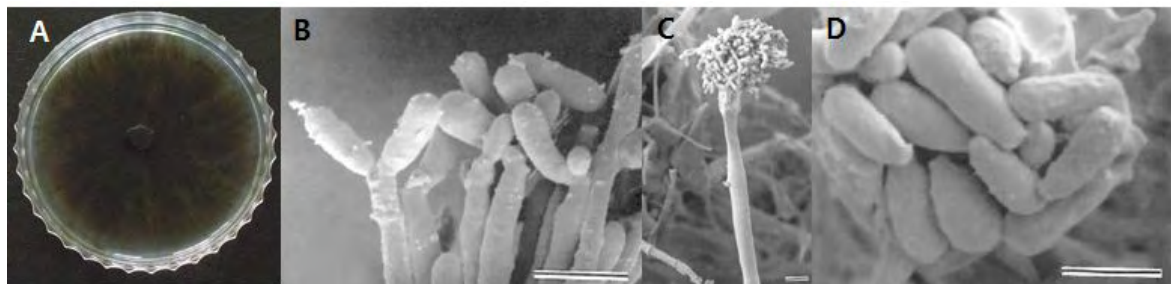


그림 4-26. *G. wageneri*의 형태적 모습 A : MEA에서 자란 모습, B-D : 주사 전자 현미경으로 관찰한 conidiophores 와 conidia 모습(Soure : Mycobank)(B : Scale bar=5 μ m, C : Scale bar=10 μ m, Scale bar=5 μ m)

앞서 사용하였던 연구 방법을 이용하여 *Grosmannia wageneri*에 적용을 시도 하였다. *Grosmannia* 종들의 beta-tubulin 유전자를 분석하였고 같은 방법으로 마커를 제작하였다(표 4-14). 제작된 마커를 이용하여 *G. wageneri*의 여러 균주와 다른 *Grosmannia* 균주들을 확인 하였고 특이성을 볼 수 있었다(그림 4-27,28). 민간성 시험에서는 1pg까지 PCR을 이용하여 검출되는 것을 확인 할 수 있었으나 1pg은 melt 피크가 다른 농도와는 달라 확실하게 검출되는 농도는 10pg이라 볼 수 있다(그림 4-29).

표. 수집된 *Grosmannia wageneri* 및 근연종 목록

	Fungal species	Host	Country	Culture collection and collector
1	<i>Leptographium wageneri</i>	lodgepole pine	USA	CBS 609.85
2	<i>Ophiostoma wageneri</i>	-	-	KUC2915
3	<i>L. wageneri</i> var. <i>pseudotsugae</i>	coastal Douglas fir	Canada	UAMH 4904
4	<i>L. wageneri</i> var. <i>pseudotsugae</i>	lodgepole pine	Canada	UAMH 5029
5	<i>L. wageneri</i> var. <i>pseudotsugae</i>	Pseudotsugamenzieii	Canada	UAMH 4905
6	<i>L. wageneri</i> var. <i>wageneri</i>	Pinyon Pine	USA	CBS 119492

7	<i>Grosmannia aurea</i>	killed by bark beetle sted with Ips	Canada	CBS 438.69
8	<i>G. aenigmatica</i>	typographus japonicus	Japan	CBS 504.96
9	<i>O. americanum</i> (= <i>G. americana</i>)	European larch	United states	CMW0495
10	<i>G. Clavigera</i>	mountain pine beetle	Canada	UAMH 11150
11	<i>O. crassivaginatium</i> (= <i>G. crassivaginata</i>)	-	-	KUC2906
12	<i>O. francke-grosmanniae</i> (= <i>G. francke-grosmanniae</i>)	gallery of Hylecoetus dermestoides in Quercus sp.	Germany	CBS 356.77
13	<i>O. laricis</i> (= <i>Grosmannia laricis</i>)	Larch	Japan	JCM9812

표 4-14. *G. wagneri*의 특이적 마커

Gene	name	sequence	size
Beta-tubulin	GWF	CACTGCAGCGTGGCCACACAAAT	270bp
	GWR	ACCGGGCTCCAGATCCACAAG	

표 4-15. *G. wagneri* 검출을 위한 PCR mixture 조성

Components	Volume
2X free mix	10 μ l
GWF (10 pM)	1 μ l
GWR (10 pM)	1 μ l
template	1 μ l
D.W	To 20 μ l

표 4-16. *G. wagneri* 검출을 위한 PCR 조건

PCR Conditions	Cycles
95°C for 3 min	1
95°C for 30 sec	30
56°C for 30 sec	
72°C for 30 sec	
72°C for 5 min	1



그림 4-27. *G. wagneri* 검출 마커를 이용한 유전자 증폭. M : 1kb marker, 1 : *Leptographium wagneri* (CBS 609.85), 2 : *Ophiostoma wagneri* (KUC2915), 3 : *Leptographium wagneri* var. *pseudotsugae* (UAMH 4904), 4 : *Leptographium wagneri*

var. pseudotsugae (UAMH 5029), 5 : *Leptographium wagneri var. pseudotsugae* (UAMH 4905), 6 : *Leptographium wagneri var. wagneri* (CBS 119492)



그림 4-28. *G. wagneri* 검출 마커를 이용한 유전자 증폭. M : 1kb marker, 1 : *L. wagneri* (CBS 609.85), 2 : *G. aurea* (CBS 438.69), 3 : *G. aenigmaticum* (CBS 504.96), 4 : *O. americanum*(=*G. americana*) (CMW0495), 5 : *G. Clavigera* (UAMH 11150), 6 : *O. crassivaginatatum*(=*G. crassivaginata*) (KUC2906), 7 : *O. francke-grosmanniae*(=*G. francke-grosmanniae*) (CBS 356.77), 8 : *O. laricis*(=*Grosmannia laricis*) (JCM9812), 9 : *O. piceae* (AU55-3), 10 : *O. quercus* (H1039), 11 : *O. ulmi* (UAMH 10442), 12 : *O. novo-ulmi* (UAMH 5030), 13 : *Ceratocystis fimbriata* (CBS1239), 14 : *Trichoderma* sp., 15 : *Penicillium* sp.

*Leptographium wingfieldii*는 국제적으로 검역우려가 있는 종으로 유럽지역에서 소나무좀 (*Tomicus piniperda*)에 의해 전파되는 균주로 소나무에 병을 일으키고 감염된 나무에 변색을 일으키는 주요 균주이다. Beta-tubulin을 이용하여 위와 같은 방법으로 마커를 제작하였다(표 4-18). 제작된 마커는 *L. wingfieldii* 균주들과 다른 균주를 이용하여 특이성을 관찰하였다. PCR 수행결과 *L. wingfieldii* 균주에서만 140bp 밴드를 형성하는 것을 볼 수 있었다(그림 4-31,32). real-time PCR을 이용한 민감성 시험에서는 10pg 까지 나타난 것을 볼 수 있었다(그림 4-33).

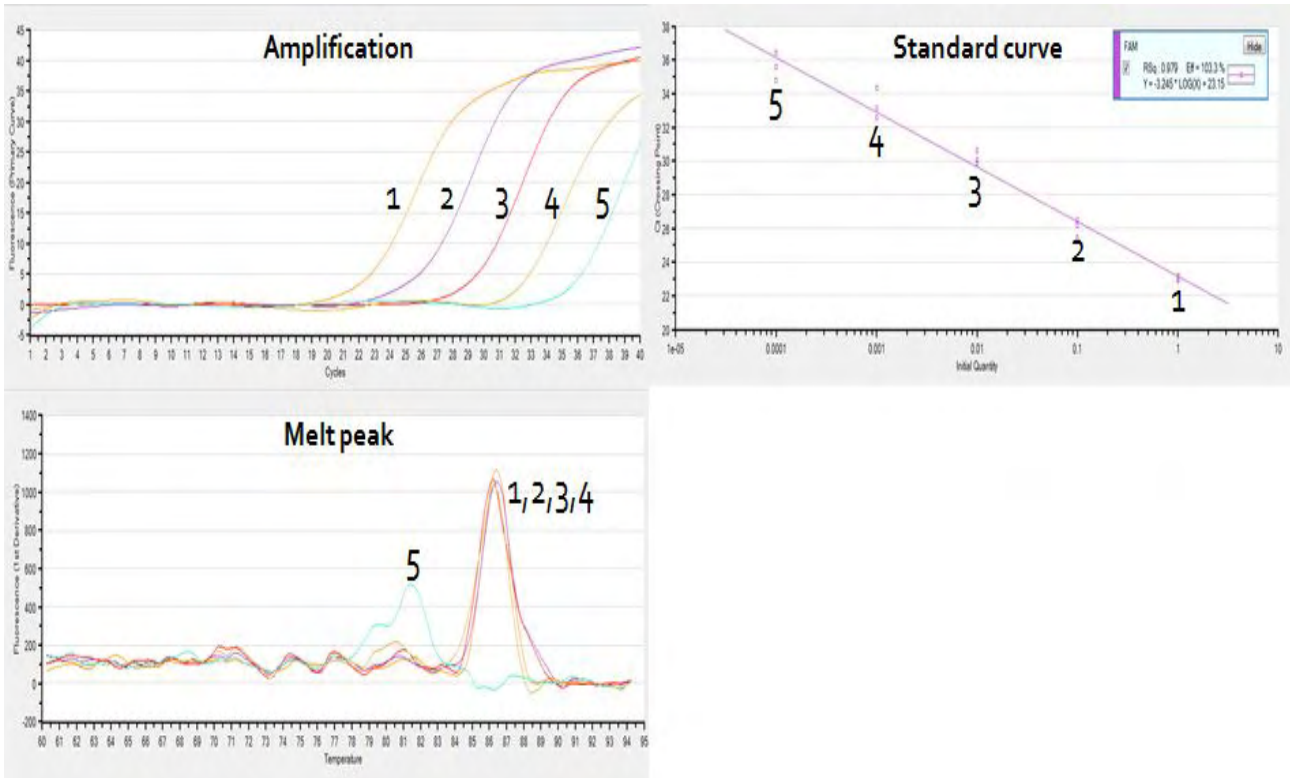


그림 4-29. SYBR green Real-time PCR을 이용한 *G. wagneri* 검출 마커의 민감도 테스트.
 1 : 10 ng, 2 : 1 ng, 3 : 100 pg, 4 : 10 pg, 5 : 1 pg

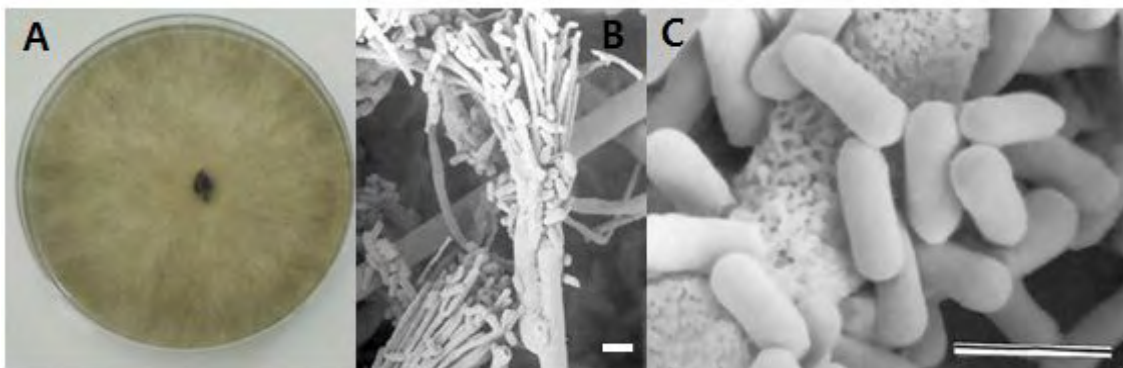


그림 30. *L. wingfieldii*의 형태적 모습 A : MEA에서 자란 모습, B,C : 주사 전자 현미경으로 관찰한 conidiophores 와 conidia 모습(Soure : Mycobank)(Scale bar=10 μ m)

표 4-17. 분양 받은 *L. wingfieldii* 목록

	Fungal species	Host	Country	Culture collection and collector
1	<i>Leptographium wingfieldii</i>	<i>Tomicus piniperda</i> on <i>Pinus sylvestris</i>	France	UAMH 10161
2	<i>L. wingfieldii</i>	wood of <i>Pinus brutia</i> <i>Tomicus piniperda</i> in	Greece	UAMH 10162
3	<i>L. wingfieldii</i>	xylem of <i>Pinus densiflora</i>	Japan	UAMH 10166
4	<i>L. wingfieldii</i>	<i>Pinus sylves</i>	Sweden	UAMH 10169
5	<i>L. wingfieldii</i>	<i>Pinus sylves</i>	Sweden	UAMH 10170
6	<i>L. wingfieldii</i>	<i>Tomicus piniperda</i>	Canada	UAMH 10235

표 4-18. *L. wingfieldii* 의 분자적 마커

Gene	name	sequence	size
Beta - tubulin	LWIF	5'ATGTTTTATTTGAGCTATAAATAACGCA3'	140bp
	LWIIR	5'ACACTCTTCCGAAACCGGAAACC3'	

표 4-19. *L. wingfieldii* 검출을 위한 PCR mixture 조성

Components	Volume
2X free mix	10 μ l
LWIF (10 pM)	1 μ l
LWIIR (10 pM)	1 μ l
template	1 μ l
D.W	To 20 μ l

표 4-20. *L. wingfieldii* 검출을 위한 PCR 조건

PCR Conditions	Cycles
95°C for 3 min	1
95°C for 30 sec	
55°C for 30 sec	30
72°C for 30 sec	
72°C for 5 min	1

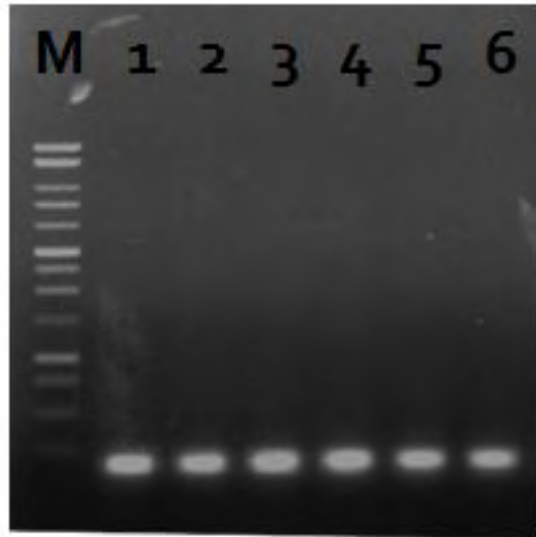


그림 4-31. *L. wingfieldii* 검출 마커를 이용한 유전자 증폭 M : 1kb DNA marker, 1 : *Leptographium wingfieldii* (UAMH 10161), 2 : *L. wingfieldii* (UAMH 10162), 3 : *L. wingfieldii* (UAMH 10166), 4 : *L. wingfieldii* (UAMH 10169), 5 : *L. wingfieldii* (UAMH 10170), 6 : *L. wingfieldii* (UAMH 10235)

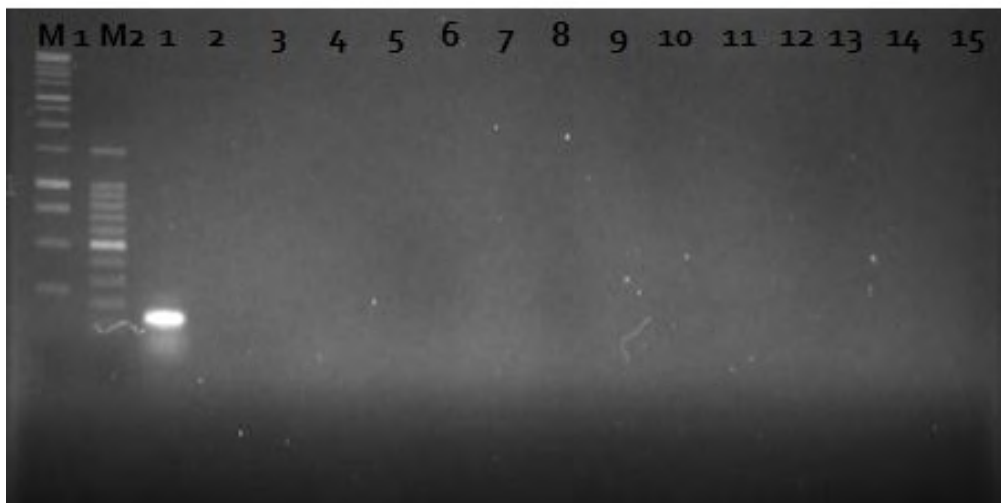


그림 4-32. *L. wingfieldii* 검출 마커를 이용한 유전자 증폭 (M1 : 1kb DNA marker, M2 : 100bp DNA marker, 1 : *Leptographium wingfieldii* (UAMH 10161), 2 : *Ophiostoma aureum* (ATCC 16936), 3 : *O. americanum* (KUC2903), 4 : *O. tetropii* (KUC2914), 5 : *O. piceae* (AU55.3), 6 : *O. quercus* (H1039), 7 : *O. ulmi* (UAMH 10442), 8 : *O. novo-ulmi* (UAMH 5030), 9 : *O. ips* (AU12465), 10 : *L. wageneri* (CBS 609.85), 11 : *G. Clavigera* (UAMH 11150), 12 : *Trichoderma* sp., 13 : *Penicillium* sp.).

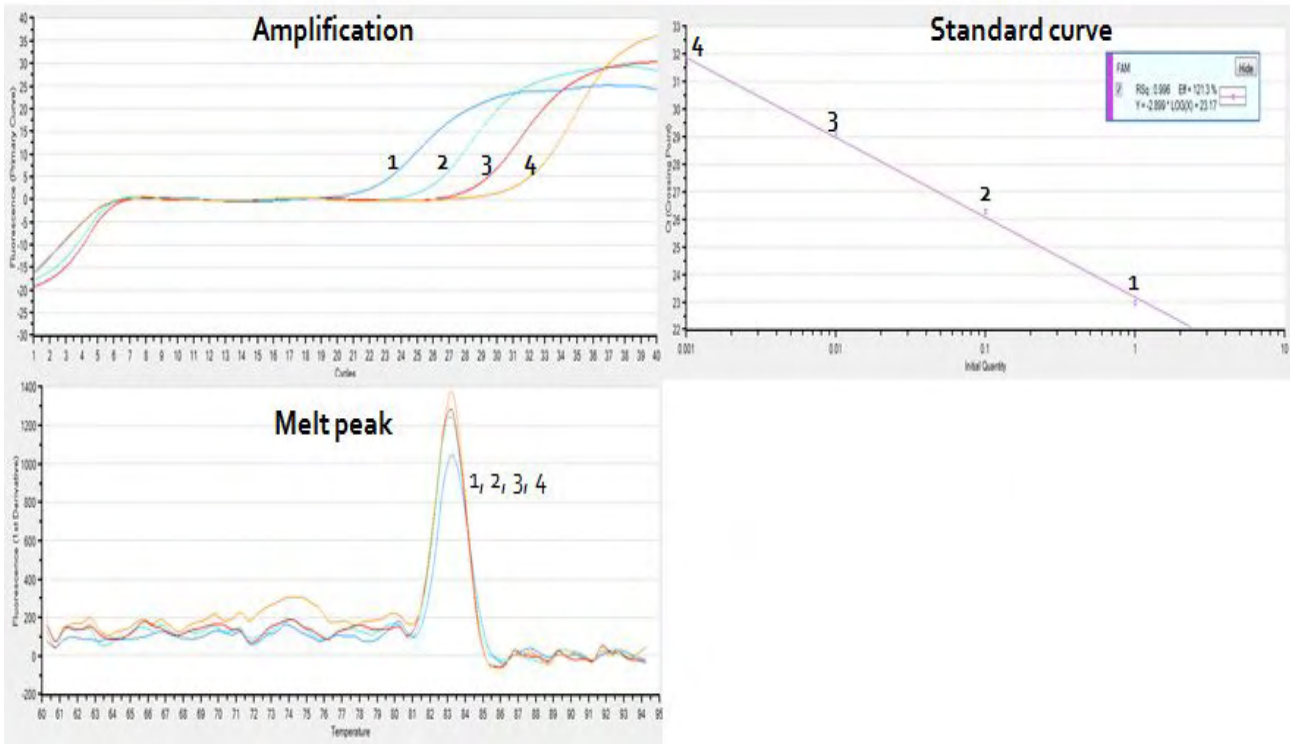


그림 4-33. SYBR green Real-time PCR을 이용한 *L. wingfieldii* 검출 마커의 민감도 테스트 (1 : 10 ng, 2 : 1 ng, 3 : 100 pg, 4 : 10 pg).

4. *Grosmannia wagenari* (Ophiostoma의 개칭, 불완전세대는 *Leptographium wagenari*) 유사 종 *Leptographium koreanum*, *Leptographium pinidensiflorae*, *Leptographium* sp. 대한 분석

검역 대상 종 *Grosmannia wagenari* 가 국내에 분포하지 않기 때문에 이 균의 목재에서의 동정 효율을 높이기 위해 이 병원균과 형태적으로 유사한 *Leptographium* 균류를 대상으로 기본 특성을 분석 후 나무에 접종하여 직접 검출 가능성을 분석하고자 하였다. 대상 유사균종으로는 국내에 서식하는 균으로서 알려진 *Leptographium koreanum*, *Leptographium pinidensiflorae*, *Leptographium* sp. 대상으로 실시하였다.

대상균주는 서천, 지역에서 흑송으로 채집한 시료로부터 분리하였다. 채집시료로부터 곰팡이 분리는 시료를 높이 5 cm, 지름 15 cm의 나무 디스크로부터 정으로 쪼개어 작은 나무 칩을 만들었다. 이 나무 칩을 5% 락스와 70% 에탄올에 1분씩 담가두어 표면 살균을 한 후, 배지 (PDA, MEA)에 올려놓고 20°C에서 배양하였다. 배양된 균주들은 배지상에서 자라는 형태와 현미경을 이용한 균주들의 형태적 특성을 참고로 순수분리를 하였다.

분리미생물 동정은 분자적 동정을 위해서는 rDNA 상에 존재하는 ITS1-5.8S-ITS2 rDNA 부위에 대한 PCR 증폭은 universal primer pairs인 ITS1-ITS4 (White *et al.*, 1990)를 사용하였고 종에 따라 분류를 증대하기 위하여 β -tubulin 유전자(O'donnell *et. al.*, 1997)증폭을 추가하였다. 증폭된 PCR 반응산물은 ABI PRISM 3700 DNA Sequencer (ABI, USA)를 이용하여 염

기서열을 분석하였다.. ITS rDNA와 beta-tubulin은 GenBank DNA database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)을 이용하여 확인하였다

1 형태적 특성

현미경 관찰과 β -tubulin 유전자를 이용한 동정 결과 *Leptographium*의 존재를 확인 할 수 있었다. 동정된 *Leptographium* 종들은 *Leptographium koreanum*, *Leptographium pinidensiflorae*, *Leptographium* sp. 이다. 이들 균주들은 MEA 배지에서 배양하였을 경우 다음과 같이 배지가 변색되는 것을 볼 수 있었다(그림 4-34).

2 생화학 특성

Leptographium 종들의 효소 활성 능력을 알아보기 위하여 각각의 기질이 들어간 배지에 균을 접종하여 관찰하였다. 이들의 분해능(투명환)을 관찰한 결과 D-cellobiose를 분해하는 β -glucosidase의 분해 능력을 볼 수 있었지만 다른 기질을 이용하는 능력을 볼 수 없었다(그림 4-35, 표 4-21).

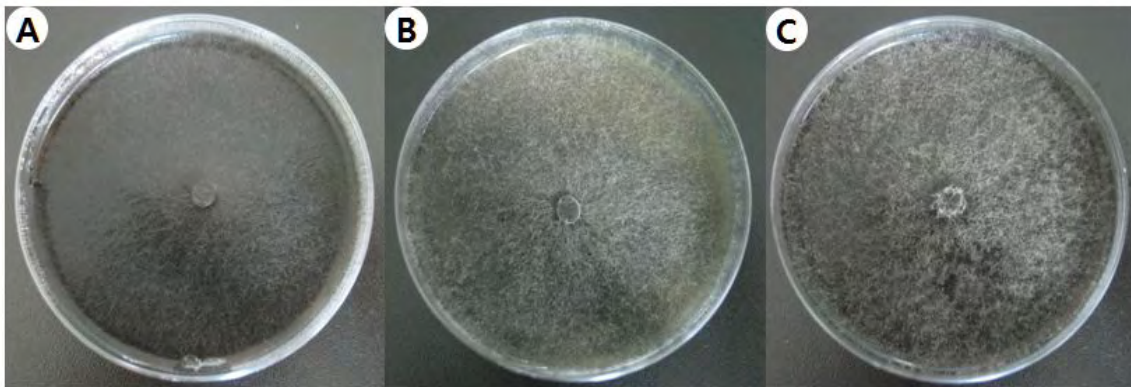


그림 4-34. 분리된 *Leptographium* 균주들의 MEA 배지 상에서의 모습 (A : *Leptographium koreanum*, B : *L. pinidensiflorae*, C : *Leptographium* sp.).

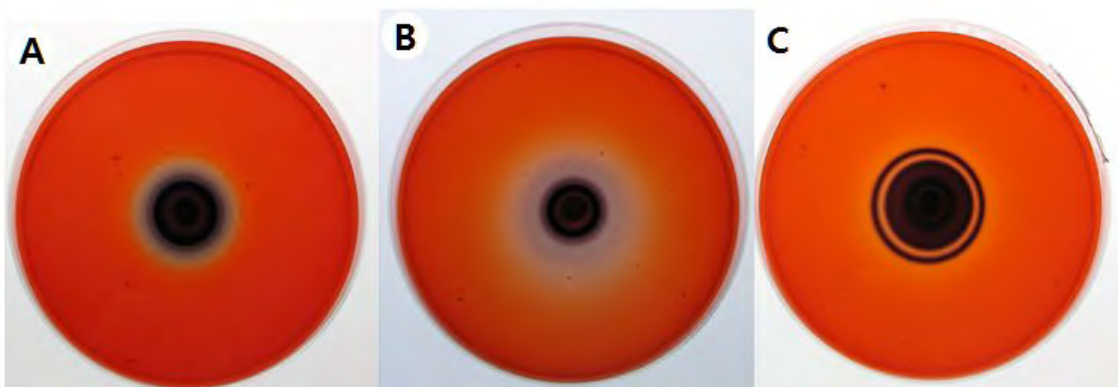


그림 35. *Leptographium* 종들의 β -glucosidase 분해 능력 모습 A : *Leptographium koreanum*, B : *L. pinidensiflorae*, C : *Leptographium* sp..

표 21. *Leptographium* 종들의 Extracellular enzyme 이용 능력 비교

	β -glucosidase	CM-cellulase	Xylanase	Pectinase	Protease
<i>L. koreanum</i>	+	-	-	-	-
<i>L. pinidensiflorae</i>	+	-	-	-	-
<i>Leptographium</i> sp.	+	-	-	-	-

+ : activity, - : none activity.

목재 침해 능력 조사

직경 10cm, 높이 50cm인 건전 해송 3군데에 2cm정도로 구멍을 뚫고, 그 곳에다가 미리 키워진 분리된 진균을 접종을 하였다. 접종부위에 오염이 되지 않게 막은 뒤 습식 처리를 하였다. 1달 간격으로 접종부위부터 내려가면서 나무를 잘라 주어 침입정도를 확인 했다.

건전 해송 목재에 3군데에 분리된 진균을 접종하여 나무에 어떤 변화가 생기는지 알아보았다. 그림30에 나타나듯이 접종 후 접종부위와 그 주위에 변색이 일어나는 것을 관찰할 수 있었고, *Leptographium koreanum*의 경우 시간이 지남에 따라 변색부위가 넓어지고 있는 것을 볼 수 있었다. 향 후 변색이 진행된 부분을 톱밥으로 만들어서 직접 genomic DNA를 추출하고 PCR을 수행하여 감염목의 균 존재 여부를 알 수 있는지 모의시험을 수행하고자 한다. 모의 시험이 성공적으로 진행된다면 목재로부터 균을 배양하지 않고도 marker primer를 이용한 PCR 방법을 사용하여 대상 균주를 검출 할 수 있는 기술을 확보 할 수 있을 것이다.

이를 위해 톱밥에서 효율적으로 곰팡이 DNA를 추출하는 방법을 수행하고 있다.

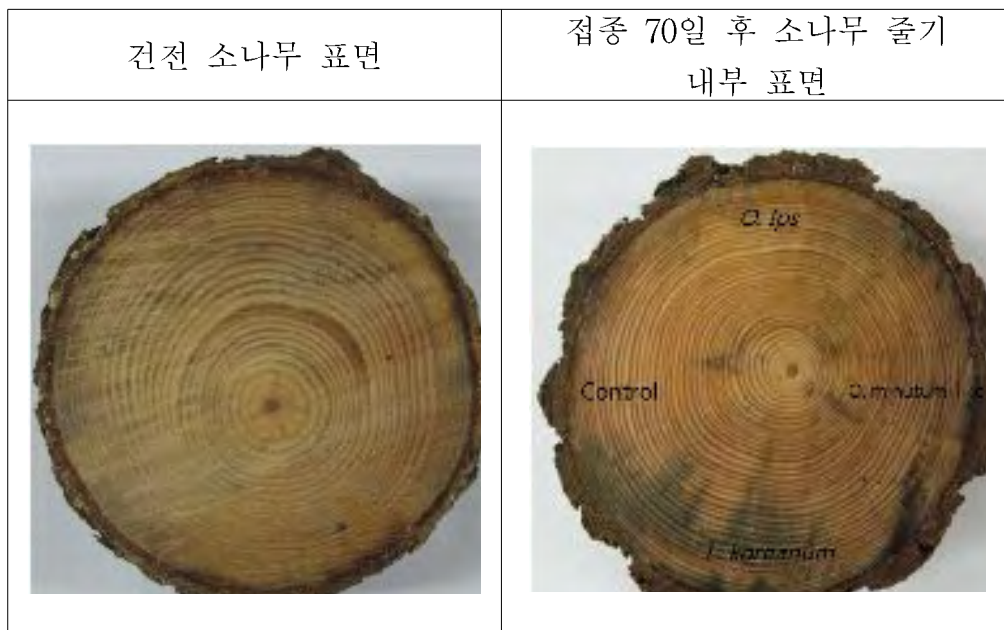


그림 4-36. *Ophiostoma ips*, *O. minutum*, *Leptographium koreanum*의 목재내부 침입능력 확인시험. *Leptographium koreanum* 이 깊이 침해하여 변색을 나타내고 있을 볼 수 있다. 이

는 향 후 변색 부분의 톱밥에서 균을 검정할 수 있는 시료로서의 가치를 평가하는 수단이 될 수 있다. 검정시간을 크게 단축할 수 있는지 평가하는 기반을 제공한다.

5. *Ceratocystis fimbriata* 에 대한 분자 마커 개발

*Ceratocystis*는 전 세계적으로 수목류에 시들음병을 일으키는데 각각의 종은 서로 다른 기주에 침입하고 서로 다른 지역에서 발생한다. *C. fagacearum*은 참나무 시들음병을 유발시키는 병원균으로 미국 북동부지역에서 발생하여 멀리 남부 텍사스까지 확대되었다. 처음에는 각각의 가지에서 발생하나 점차 나무 전체가 시들고 낙엽지며 결국 죽는다. 이 병은 곤충인 수액나무좀(sap beetle)에 의해 전파되고 이들 나무좀은 감염된 나무의 수피를 통하여 균사 및 포자덩어리를 부착하여 나오며, 다른 형태로는 상처를 통해 유출된 수액에 의해 병든 나무로부터 건전한 나무로 포자를 전파한다. 또한 병원균은 나무 사이에 형성되는 자연적인 뿌리접목에 의해서 병든 나무에서 인접한 나무로 전파된다. *Ceratocystis fimbriata*는 감자와 같은 주요 작물에 흑반병을 일으키고 망고 나무와 커피나무와 같은 과실 나무에 시들음병이나 동고병을 발생시키는 곰팡이다. 보고된 바로는 전 세계적으로 여러 작물과 나무에 병을 일으키는 균주로 알려져 있다. 이 균은 중남미지역에서는 카카오나무의 시들음병을 유발하고 암브로시나무좀(ambrosia beetle)과 자연적인 뿌리접목에 의해 전파되고 아프리카 지역에서는 유칼리나무의 시들음병의 원인이다. 유사 이름으로는 *Ceratostomella fimbriata*, *Endoconidiophora fimbriata*, *Ophiostoma fimbriatum*, *Sphaeronaema fimbriatum*가 존재하고 있다.

C. fimbriata 균주의 마커를 개발하기위해 *C. fimbriata*와 근연종을 분양을 받아 ITS 유전자를 이용하여 마커를 만들었다(표 4-23). 제작된 마커를 사용하여 *Ceratocystis* 균과 다른 종들을 검정한 결과 *C. fimbriata*만이 140bp에서 밴드가 형성되었다(그림 4-38). 민감성을 알아보는 실험에서는 DNA농도 10pg까지 내려가도 검출되는 것을 볼 수 있었다(그림 4-39).

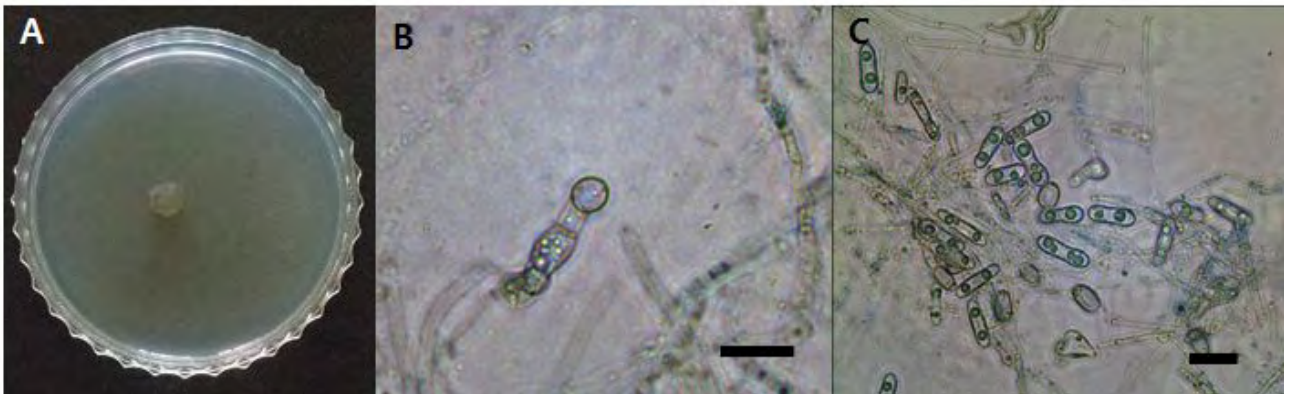


그림 4-37. MEA에서 자란 *C. fimbriata*의 모습(A)과 형태적 모습 관찰(B,C) (Scale bar=10 μ m)

표 4-22. *C. fimbriata*와 근연종 목록

	Fungal species	Host	Country	Culture collection and collector
1	<i>Ceratocystis fimbriata</i>	timber	USA	CBS 1239
2	<i>C. bhutanensis</i>	Picea	Bhutan	KACC46149
3	<i>C. laricicola</i>	Styria, Kindberg	Austria	KACC46153
4	<i>C. pinicola</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	UK	KACC46305
5	<i>C. polonica</i>	Picea abies	Norway	KACC46310
6	<i>C. radicicola</i>	-	USA	KACC46155
7	<i>C. resinifera</i>	Picea abies	Norway	KACC46156
8	<i>C. rufipennis</i>	infested with Dendroctonus rufipennis of Picea engelmannii	Canada	KACC46157
9	<i>C. variospora</i>	bleeding canker of Quercus robur	USA	KACC46158

표 4-23 *Ceratocystis fimbriata* 의 분자적 마커

Gene	name	sequence	size
ITS	CFF	GGGAGTTCCTTCTATAAGGTTTCT	140bp
	CFR	TATGCCACTCAGCAATGAAATCAAAT	

표 4-24. *C. fimbriata* 검출을 위한 PCR mixture 조성

Components	Volume
2X free mix	10 μ l
LWIF (10 pM)	1 μ l
LWIIR (10 pM)	1 μ l
template	1 μ l
D.W	To 20 μ l

표 4-25. *C. fimbriata* 검출을 위한 PCR 조건

PCR Conditions	Cycles
95°C for 3 min	1
95°C for 30 sec	30
55°C for 30 sec	
72°C for 30 sec	
72°C for 5 min	1



그림 4-38. *C. fimbriata* 검출 마커를 이용한 유전자 증폭 (M1 : 1kb marker, M2 : 100bp marker, 1 : *C. fimbriata* (CBS 1239), 2 : *C. bhutanensis* (KACC46149), 3 : *C. laricicola* (KACC46153), 4 : *C. pinicola* (KACC46305), 5 : *C. polonica* (KACC46310), 6 : *C. radiculicola* (KACC46155), 7 : *C. resinifera* (KACC46156), 8 : *C. rufipennis* (KACC46157), 9 : *C. variospora* (KACC46158), 10 : *Ophiostoma piceae* (AU55.3), 11 : *O. ips* (AU12456), 12 : *Grosmannia clavigera* (UAMH 11150), 13 : *Leptographium wingfieldii* (UAMH 10161), 14 : *Trichoderma* sp., 15 : *Penicillium* sp.)

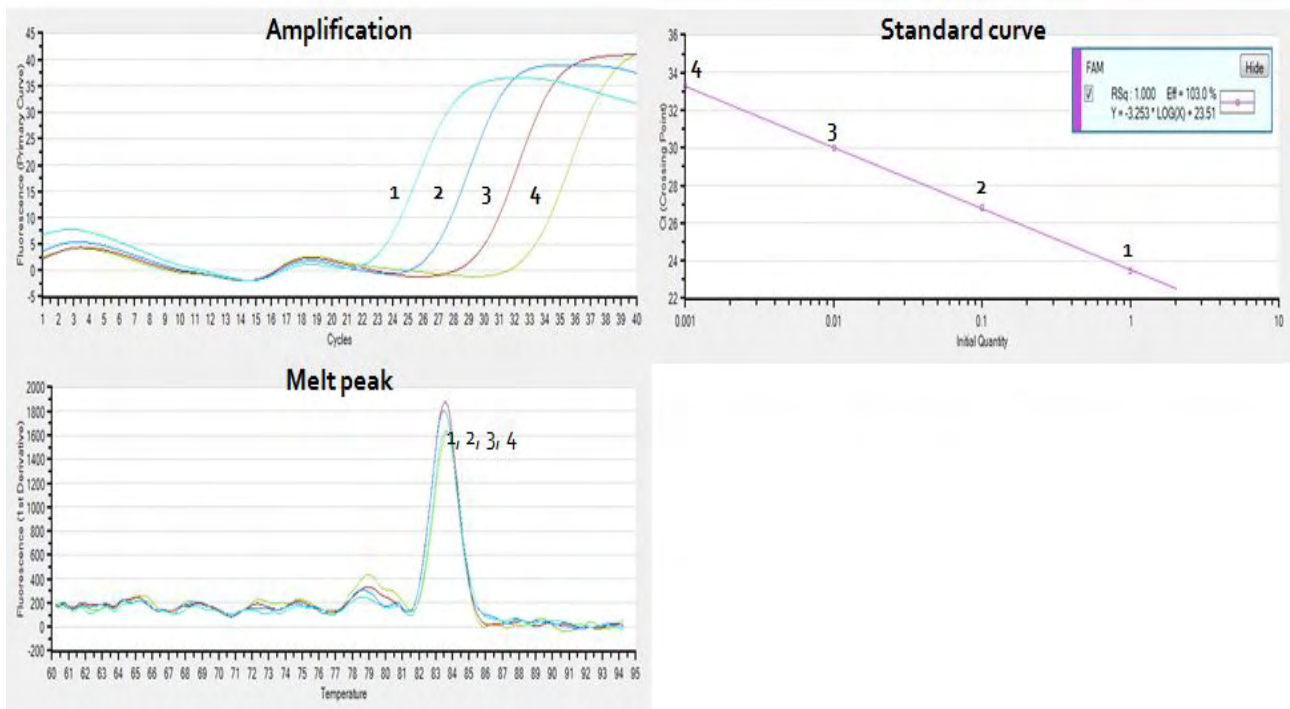


그림 4-39. SYBR green Real-time PCR을 이용한 *C. fimbriata* 검출 마커의 민감도 테스트. 1 : 10 ng, 2 : 1 ng, 3 : 100 pg, 4 : 10 pg.

6. *Mucor racemosus* 의 검출을 위한 분자마커 개발

자연계에 특히 토양 중에 널리 분포하며 대부분이 부생사물기생성(saprophytic)며 식품을 비롯한 각종 유기질에 잘 생육하고 발효공업에 중요하다. 균사는 잘 발달하고 기중균사는 모발과 같이 보이며 길이가 수 cm인 것도 있다. 균사는 백색이나 자실체가 성숙함에 따라 회백색 또는 회갈색이 된다. 포자낭병은 대부분 분지를 하며 그 끝에는 모두 포자낭을 형성한다. 포자낭은 구형이고 포자낭 막은 얇고 부드러워 딱딱해지지 않고 파열되기 쉽다. 유성생식은 접합포자에 의하나 무성 생식은 무성적인 포자낭 포자에 의한다. 털곰팡이속은 포자낭병의 분지상태, 포자낭병의 크기, 포자낭의 크기와 색, 포자낭 막의 특성, 중축 및 포자의 모양과 크기, 집락 및 접합포자의 특성, 기균사의 색과 길이 등을 근거로 종을 구별한다. 일반적으로 털곰팡이속은 포자낭병의 분지상태에 따라 포자낭병이 외대이며 전혀 분지하지 않는 monomucor 군과 포도가 모양으로 분지하는 racemomucor 군, 가곡상으로 분지하는 cymomucor 군의 3가지 유형으로 나뉜다. *Mucor*속 균류들은 기회 감염을 통한 인체 감염 및 식품의 부패를 일으키며 특히 과실, 과수목과 과수 묘목류에 썩음 병을 일으킨다.

*M. racemosus*는 *Botrytis racemosa*, *Spicularia racemosa*로도 불리고 *M. plumbeus*는 *Calyptromyces plumbeus*, *Circinomucor plumbeus*라고 명명되기도 한다.

마커 개발에 사용된 균주는 KACC로부터 분양을 받았고 (표 4-26, 그림 4-40), 종특이적 유전자 마커를 얻기 위해서 Clustal W를 이용한 다중염기 서열 분석을 통해 종특이적 마커를 얻을 수 있었다. MucorR-1F와 MucorR-1R은 *Mucor* spp.에서 *M. racemosus* f. *racemosus*와 *M. plumbeus*를 구별하기 위한 마커 프라이머이다 (표 4-27). 개발된 마커는 *Mucor* 속 내에서 *M. racemosus*와 *M. plumbeus*만을 특이적으로 증폭을 하였다 (그림 4-41). 증폭된 300bp의 DNA fragment에 제한효소 Dra I를 처리하여 보았을 때 두 종은 확연히 구별이 가는 것을 볼 수 있다 (그림 4-42). 민감성 시험에서는 *M. racemosus*와 *M. plumbeus* 모두 1pg 까지 검출되는 것을 확인 할 수 있었다(그림 4-43,44).

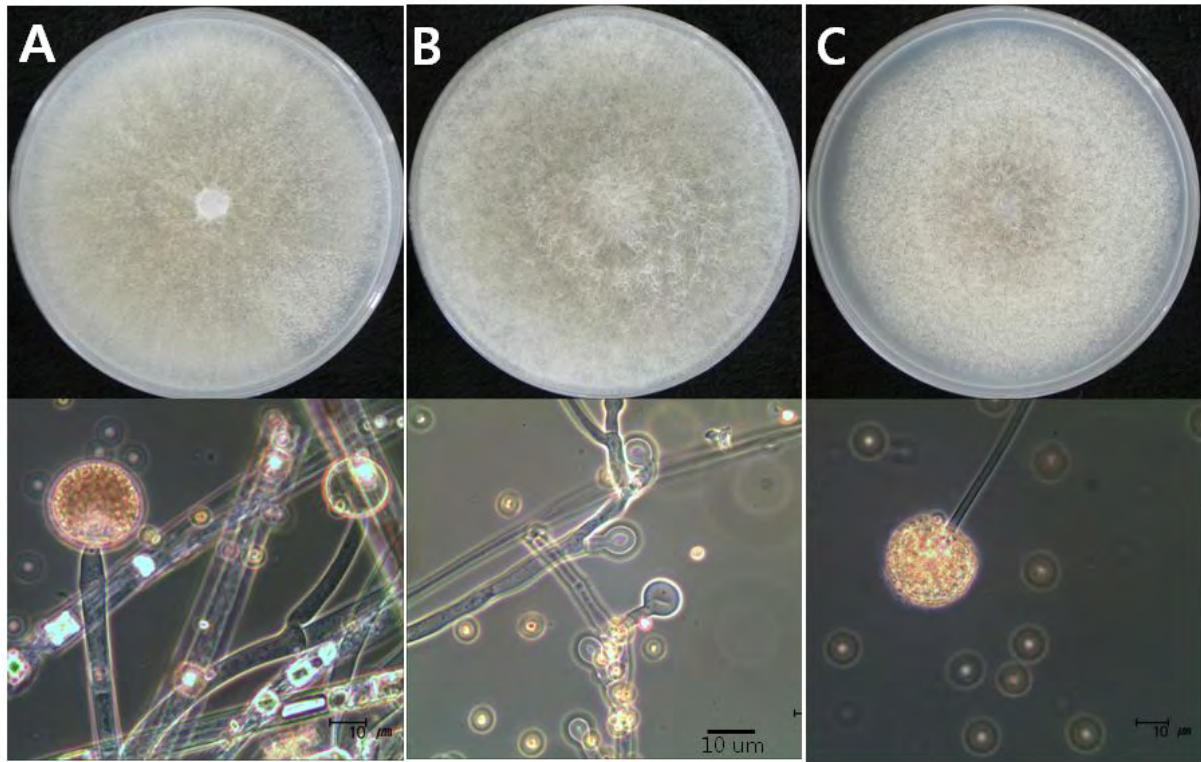


그림 40. PDA 배지에 배양된 *Mucor racemosus*의 콜로니 형태와 포자낭병. A : KACC 40269, B : KACC 41012, C : KACC 41332.

표 26. 수집된 *Mucor racemosus* 와 근연종 목록

	Fungal species	Host	Country	Culture collection
1	<i>Mucor racemosus f. racemosus</i>	Basel	Switzerland	KACC 41332
2	<i>Mucor racemosus f. racemosus</i>	Tomato	Korea	KACC 41012
3	<i>Mucor racemosus</i>	Meju	Korea	KACC 40269
4	<i>Mucor plumbeus</i>	Mushroom	Korea	KACC 40935
5	<i>Mucor plumbeus</i>	-	-	KACC 46307
6	<i>Mucor hiemalis</i>	-	-	KACC 40288
7	<i>Mucor hiemalis f. hiemalis</i>	-	USA	KACC 41330
8	<i>Mucor hiemalis f. silvaticus</i>	Soil	Germany	KACC 40260
9	<i>Mucor miehei</i>	-	-	KACC 40290
10	<i>Mucor circinelloides f. circinelloides</i>	-	-	KACC 41329
11	<i>Mucor circinelloides.</i>	Meju	Korea	KACC 40262
12	<i>Mucor circinelloides f. lusitanicus</i>	-	-	KACC 46231

표 27. *Mucor racemosus* 검출 마커

Target	Primers	Sequences	Tm
ID region	MucorR-1F	5'-TCTGTATAGATCTTGAAATCCCTG-3' (24 mer)	51.1 °C
	MucorR-1R	5'-GGACTTTTTTTGTCTAGTGTATCTGG-3' (25MER)	52.3 °C

표 28. *Mucor racemosus* 검출을 위한 PCR mixture 조성

Components	Volume
2X free mix	10 μ l
MucorR-1F (10 pM)	1 μ l
MucorR-1R (10 pM)	1 μ l
template	1 μ l
D.W	To 20 μ l

표 29. *Mucor racemosus* 검출을 위한 PCR 조건

PCR Conditions	Cycles
95°C for 3 min	1
95°C for 30 sec	
51°C for 30 sec	30
72°C for 30 sec	
72°C for 5 min	1

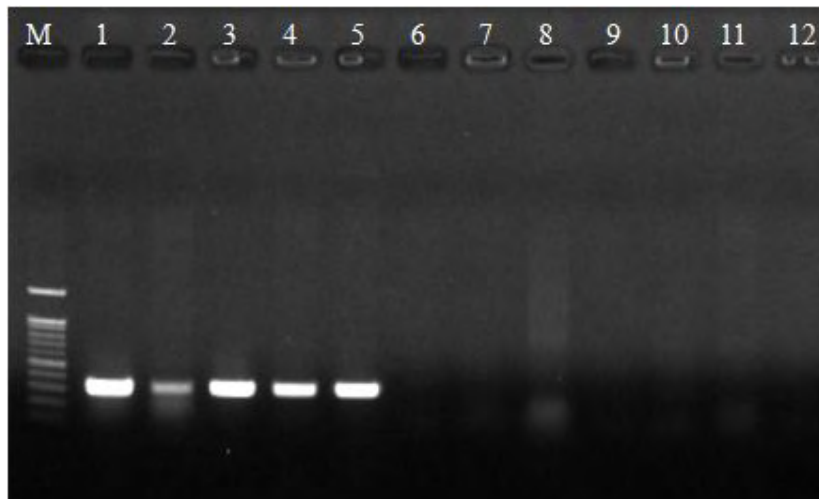


그림 4-41. *Mucor racemosus* 검출 마커를 이용한 유전자 증폭. M : 100 bp ladder marker, 1 : *Mucor racemosus* f. *racemosus* KACC41332, 2 : *Mucor racemosus* f. *racemosus* KACC41012, 3 *Mucor racemosus* KACC40269, 4 : *Mucor plumbeus* KACC40935, 5 : *Mucor plumbeus* KACC46307, 6 : *Mucor hiemalis* KACC 40288, 7 :

Mucor hiemalis f. *hiemalis* KACC 41330, 8 : *Mucor hiemalis* f. *silvaticus* KACC 40260, 9 : *Mucor miehei* KACC 40290, 10 : *Mucor circinelloides* f. *circinelloides* KACC 41329, 11 : *Mucor* sp. KACC 40262, 12 : *Mucor circinelloides* f. *lusitanicus* KACC 46231.

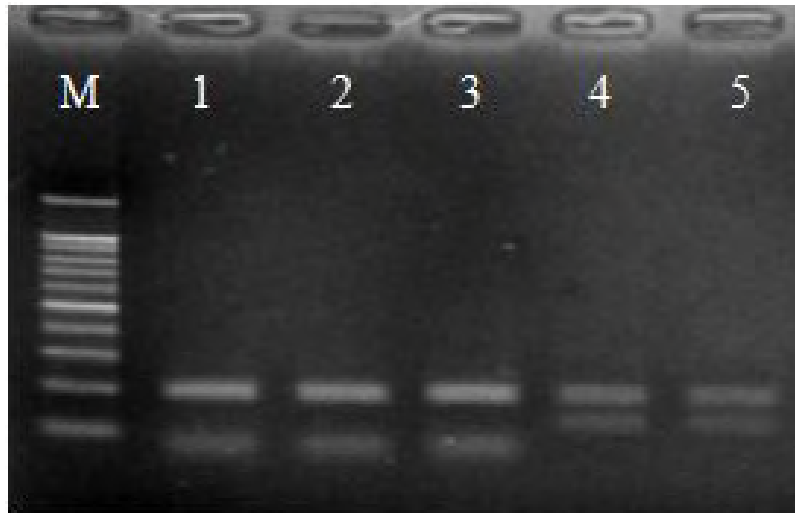


그림 4-42. *Mucor racemosus* 와 *M. plumbeus* 의 구분을 위한 PCR 산물의 Dra I 처리 결과. M : 100 bp ladder marker, 1 : *Mucor racemosus* f. *racemosus* KACC41332, 2 : *Mucor racemosus* f. *racemosus* KACC41012, 3 *Mucor racemosus* KACC40269, 4 : *Mucor plumbeus* KACC40935, 5 : *Mucor plumbeus* KACC46307.

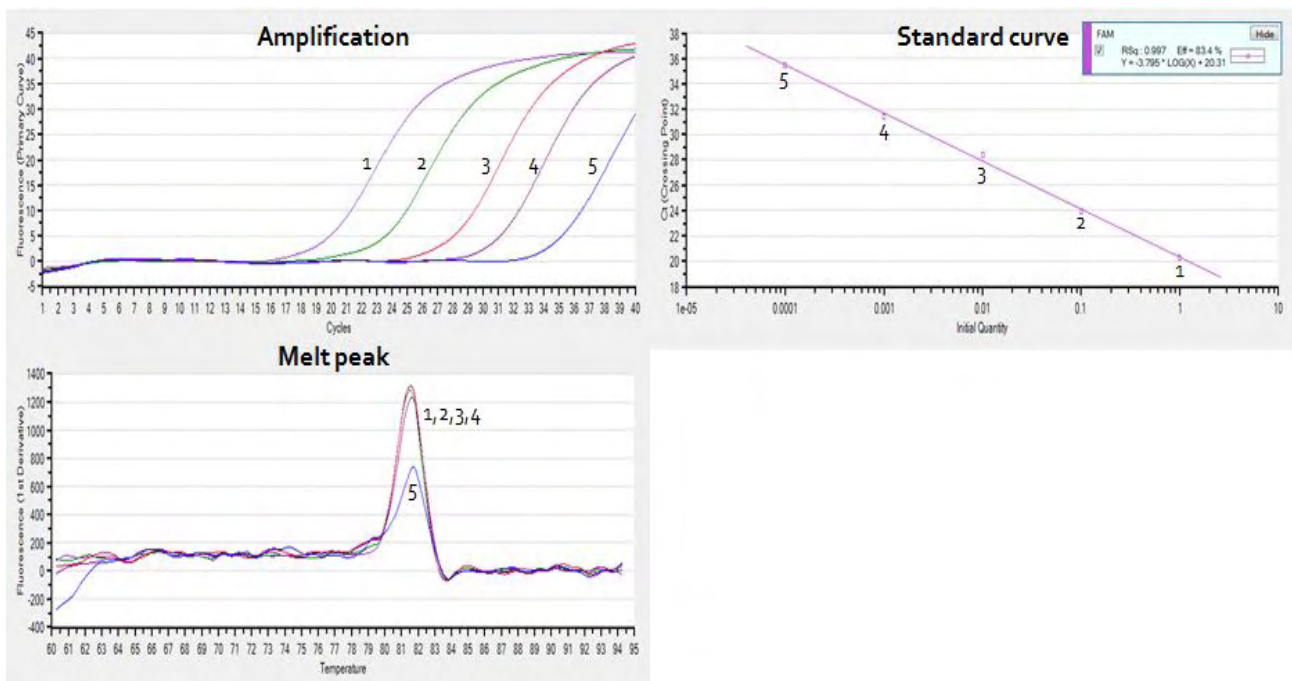


그림 4-43. SYBR green Real-time PCR을 이용한 *M. racemosus* 검출 마커의 민감도 테스트 (1 : 10 ng, 2 : 1 ng, 3 : 100 pg, 4 : 10 pg, 5 : 1 pg).

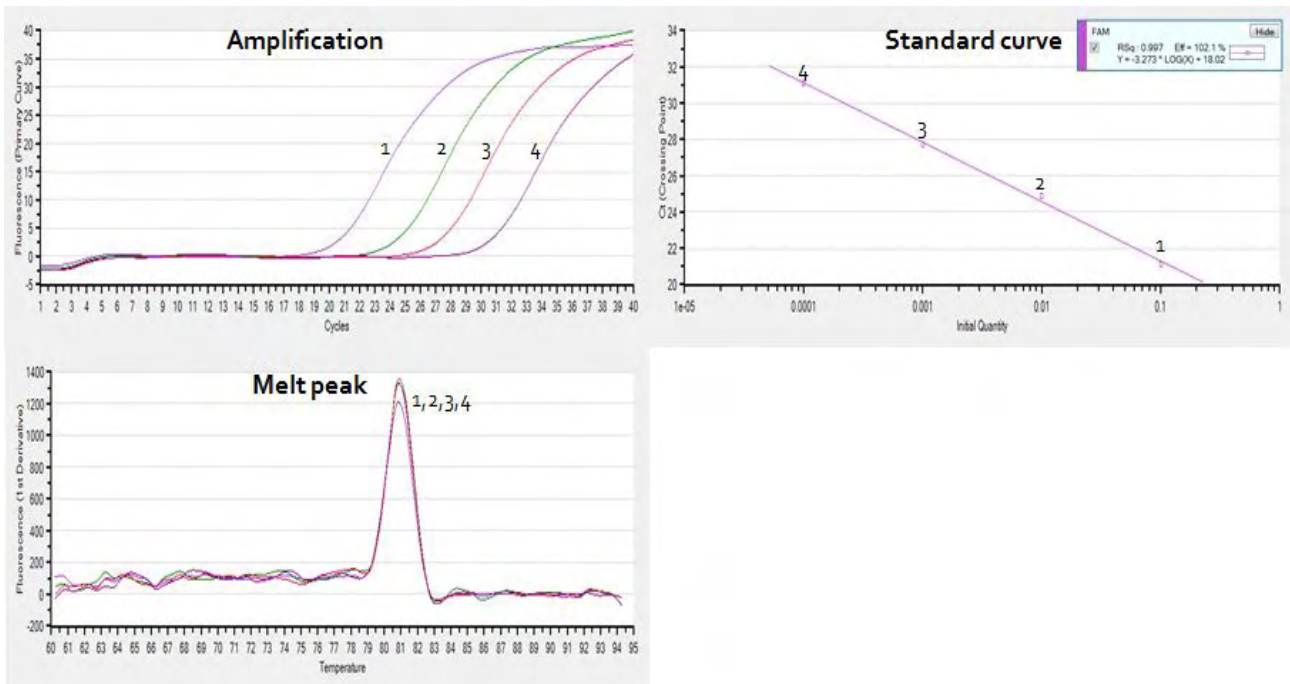


그림 4-44. SYBR green Real-time PCR을 이용한 *M. plumbeu* 검출 마커의 민감도 테스트 (1 : 10 ng, 2 : 100 pg, 3 : 10 pg, 4 : 1 pg).

7. *Phoma glomerata* 와 *P. exigua*의 검출을 위한 분자마커 개발

병자각균은 식물병원균으로서 작물에 피해를 주는 큰 분류군일 뿐만 아니라 산업적으로도 이용이 증가하고 있는 균류로서 그 중요성이 증가하고 있다. 병자각을 형성하는 식물병원균으로는 *Phyllosticta*, *Ascochyta*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Septoria* 등 다수의 속들이 포함되어 있다.

*Phoma*속은 약 2000종 이상이 보고되었고, 이들 중 부생균을 포함하여 식물병원균으로는 약 200종이 알려져 있다. Conidiomata는 병자각이고, 분생포자 발생은 phialidic이다. 분생포자는 투명하고, 단세포이거나 1~2개의 격막이 있고, 타원형, 원통형 혹은 방추형이다. 완전세대는 *Didymella*, *Mycosphaerella*, *Pilosa*, *Leptosphaeria*를 포함하고 있다. 속명은 Saccardo에 의해 명명되었고, 식물체 줄기에서 발생하는 투명한 단세포 분생포자를 갖는 병자각균으로 정의되었다. Wollenweber와 Hochapfel(1936) 및 Dennis(1946)는 균 분류 연구에 in vitro 특성을 도입하면서 Saccardo의 무성세대 속에 대한 기초를 마련했다. Boerema 등은 1960년대 초 *Phoma*속 특히, 식물병원균에 대한 광범위한 연구를 시작하여 *Phoma*와 *Ascochyta*속의 기준 종에 대하여 상세히 연구했고, 이후 생태적, 병리적 특성을 참고로 한 수많은 종들의 형태적, 배양적 특성이 상세히 연구되었다. Van der Aa(1978)는 *Phyllosticta*속들 중 약 50%는 *Phoma*속으로 재분류되어야한다고 주장하였다. Schneider(1979)는 *Phoma*와 유사속인 *Pyrenochaeta*속을 분생자과에 존재하는 강모가 아니라 분생포자형성세포의 특성으로 구분하였고, 강모가 존재하는 분생자과 때문에 *Pyrenochaeta* 속에 두었던 많은 종들은 *Phoma*속으로 재분류되었다. 따라서 고전적인 속의 기준은 in vitro 특성으로 다시 정해졌으며, *Coelomycetes*의 *Phoma*, *Phyllosticta*, *Ascochyta*, *Pyrenochaeta* 및 일부 다른 속의 개념들이 인정되었으나, 종 이하에서는 많은 과제가 남아 있다. Boerema 등은 종의 개념에 대한 1차적 기준으로서 기주나 기질이 아니라 생체 내외에서 안정한 형태적 특성과 배양특성을 연결하여 분류군을 정의하였다. 형태적 특성 중 병자각의 형태는 단지 종 내에서 절(Section)의 한계를 정하는 기준으로 사용될 수 있고, 강모의 존재유무, 병자각 벽의 해부학적 구조, 후막포자를 매우 중요한 분류학적 특성으로 사용했다. 병자각과 분생포자의 모양 및 크기 변이와 관련하여 배양특성은 종이나 종이하의 분류군을 정하는데 필수적이라는 것이 증명되었다. 대산산물은 특이적이며, 크리스탈 형성 또한 일부 종에서 특징적인 패턴으로 형성된다. NaOH 검정에 의한 색소형성은 신속동정에 유용한 기준이다. 기주기질과 병원성 또한 분류군을 구분하기 위해 어느 정도 사용될 수 있다. Boerema 등 (2004)은 약 200개의 *Phoma* 분류군을 정의하면서 *Phoma*속을 9개의 section 즉 *Phoma*, *Phyllostictiodes*, *Heterodera*, *Peyronellaea*, *Macrophoma*, *Pleospora*, *Plenodomus*, *Sclerophomella*, *Paraphoma*로 나누었다. 문헌 조사 결과 한국에서 20 종의 *Phoma*가 보고된 것으로 확인되었다 (표 4-30).

실험에 사용된 균주들은 한국 농업미생물 보존 센터 (KACC)로부터 분양을 받았다 (표 4-31). 유전자 분석을 위한 목적 유전자는 translation elongation factor 1- α 유전자를 이용하였다. 각 *Phoma* 종들과 근연종들은 bead extraction 방법을 통해 Genomic DNA를 추출

하였고 추출된 DNA는 translation elongation factor 1- α 유전자 증폭을 위한 주형으로 사용되었다. 사용된 프라이머는 알려진 EF1F와 EF1R 프라이머를 사용하여 약 900bp 크기의 PCR산물을 얻었으며 얻어진 PCR 산물의 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열을 이용하여 Clustal W를 이용한 다중염기 서열 분석을 통해 *P. glomerata* (표 4-32)와 *P. exigua*의 종특이적 마커를 얻을 수 있었다 (표 4-35). *P. glomerata* 검출 마커는 Phoma 속 내에서의 특이성을 보였고 (그림 4-48), 근연종과 부생균과의 실험에서도 특이성을 보였다 (그림 4-49). *P. glomerata* 검출 마커의 민감도 테스트를 해본 결과 일반 PCR의 경우 50 pg (그림 4-50), Real-time PCR의 경우 100 fg의 gDNA까지 검출이 가능하였다 (그림 4-51). *P. exigua*의 경우 Phoma 속 내에서의 특이성을 확인하였고 10pg 까지 검출되는 것을 볼 수 있었다(그림 4-52,53).

표 4-30. 한국에서 보고된 *Phoma* spp.

곰팡이 종	기주	병명
<i>P. abutilonis</i>	<i>Abutilon avicennae</i>	Die-back
<i>P. arachidicola</i>	<i>Arachis hypogea</i>	Web blotch
<i>P. asparagi</i>	<i>Asparagus officinalis</i>	Stem blight
<i>P. betae</i>	<i>Beta vulgaris</i> var. <i>saccarifera</i>	Leaf spot
<i>P. citricarpa</i> var. <i>mikan</i>	<i>Citrus unshiu</i>	Black spot
<i>P. destructiva</i>	<i>Capsicum annuum</i>	Leaf spot
<i>P. erratica</i>	<i>Citrus unshiu</i>	Black spot
<i>P. diospyri</i>	<i>Diospyros kaki</i> var. <i>domestica</i>	Die-back
<i>P. exigua</i>	<i>Erigeron annuus</i>	Leaf spot
	<i>Oenothera odorata</i>	
<i>P. lingam</i>	<i>Brassica campestris</i> ssp. <i>lekinenssis</i>	Black leg
	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	
<i>P. multirostrata</i>	<i>Callistephus chinensis</i>	Leaf spot
<i>P. panacis</i>	<i>Panax ginseng</i>	Stem rot
<i>P. panacicola</i>	<i>Panax ginseng</i>	Black rot
	<i>Chaemaecyparis pisifera</i> var. <i>squamosa</i>	Needle blight
	<i>Chamaecyparis obtusa</i>	Needle blight
<i>P. pilospora</i>	<i>Chamaecyparis pisifera</i>	Leaf blight
	<i>Malus pumila</i> var. <i>dulcissima</i>	Fruit spot
<i>P. pomorum</i>	<i>Malus pumila</i> var. <i>dulcissima</i>	Leaf & fruit spot
<i>P. sesami</i>	<i>Sesamum indicum</i>	Leaf spot
<i>P. sorghina</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	Leaf spot
<i>P. thujana</i>	<i>Thuja orientalis</i>	Needle blight
<i>P. yano-kubotae</i>	<i>Larix leptolepis</i>	Needle cast

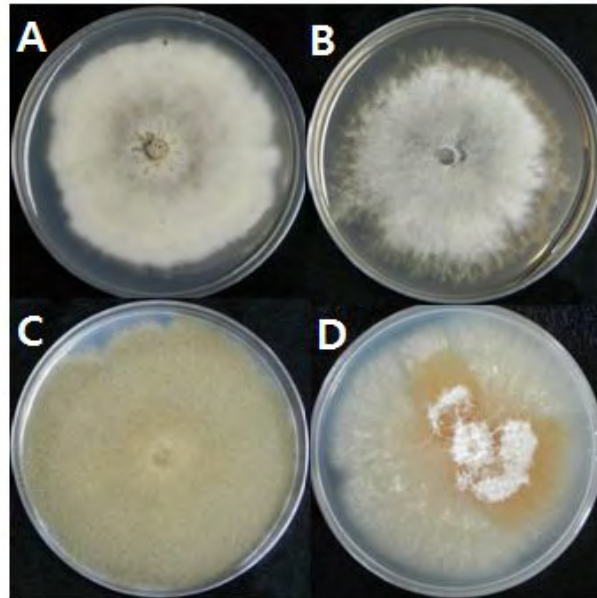


그림 4-45. PDA 배지에 배양된 *Phoma*의 콜로니 형태. A : KACC 45599, B : KACC 45220, C : KACC 45598, D : KACC 45597.

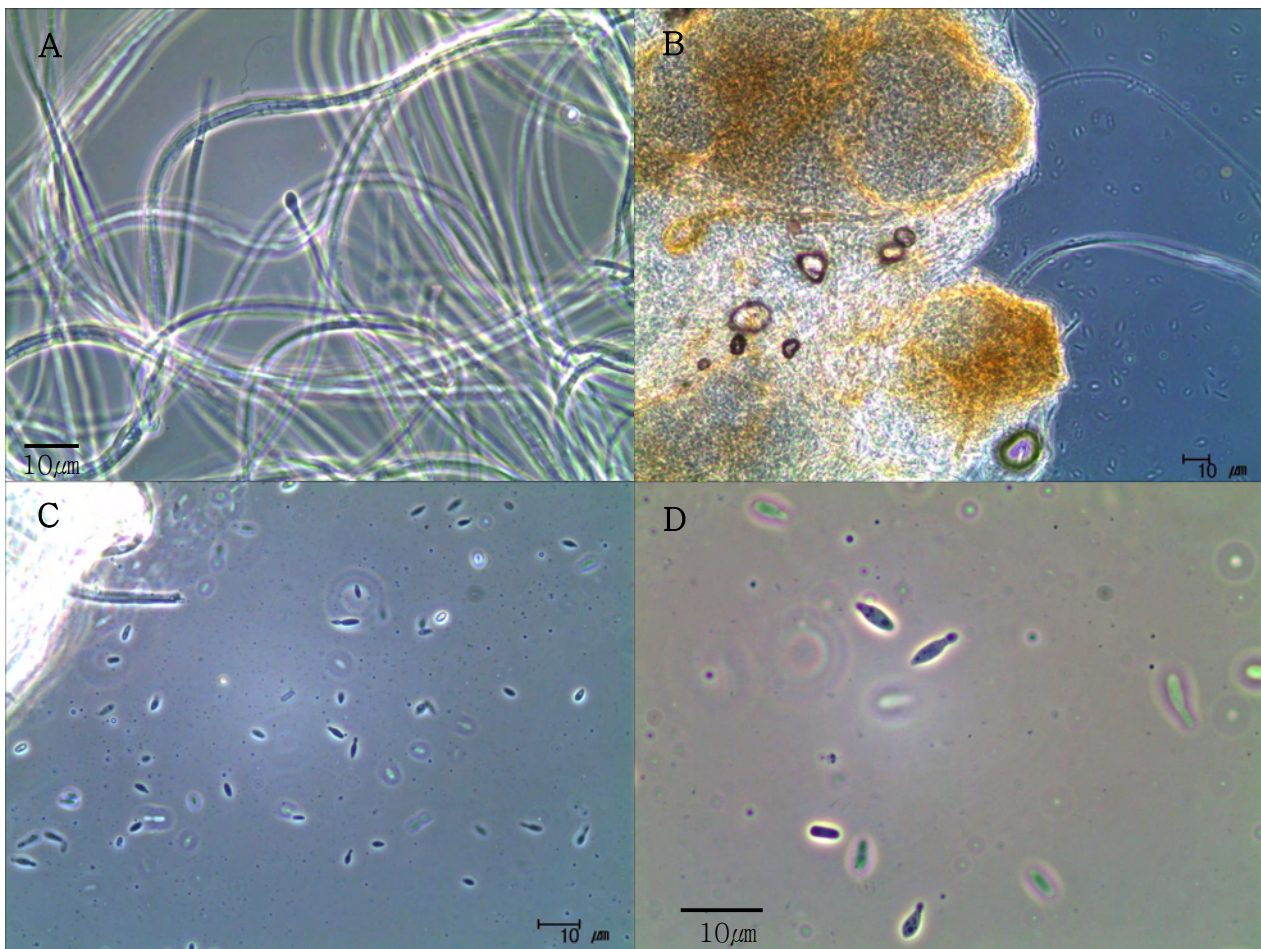


그림 4-46. *Phoma glomerata* KACC 45597의 형태 관찰 (A : Hyphae, B : Pycnidia, C and D : Conidia).

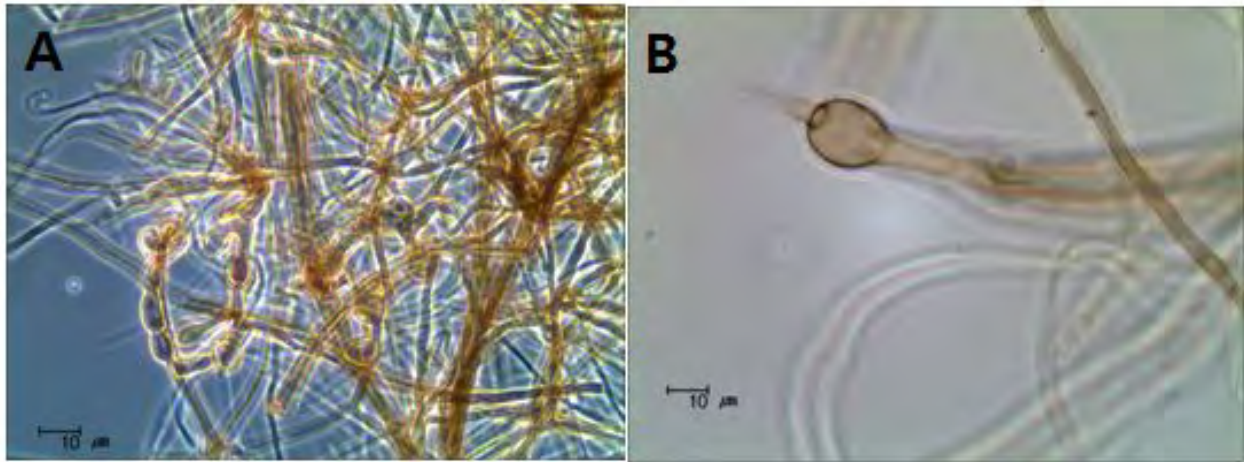


그림 4-47. *Phoma exigua* KACC 45598의 형태 관찰. A : Chlamydospores.

표 4-31. 수집된 *Phoma* 속과 근연종 목록

Fungal species	Host	Country	Culture collection
1 <i>Phoma exigua</i> var. <i>linicola</i>	Dahlia	Germany	KACC 45599
2 <i>Phoma exigus</i> var. <i>linicola</i>	Flax	-	KACC 45598
3 <i>Phoma loticola</i>	Lotus pedunculatus	Newzealand	KACC 45220
4 <i>Phoma macrostoma</i> var. <i>macrostoma</i>	European Larch	Germany	KACC 45222
5 <i>Phoma exigua</i>	-	Italy	KACC 45600
6 <i>Phoma glomerata</i>	Potato	Germany	KACC 45597
7 <i>Phomopsis</i> ,sp. 1	Acanthopanax	Korea	DUCC
8 <i>Phomopsis</i> ,sp. 10	Acanthopanax	Korea	DUCC
9 <i>Rhizopus stolonifer</i>	Jackfruit	Singapore	KACC 46292
10 <i>Colletotrichum capsici</i>	Lima bean	Maryland	KACC 46159
11 <i>Mucor racesmonas</i>	Basel	Switzerland	KACC 41332
12 <i>Mucor racesmonas</i>	Tomato	Korea	KACC 41012
13 <i>Phialophora cinerescens</i>	Red pine	Japan	MAFF425142
14 <i>Phialophora fastigiata</i>	Red pine	Japan	MAFF425144
15 <i>Phialophora malorum</i>	Red pine	Japan	MAFF425145
16 <i>Fusarium graminearum</i>	Wheat	USA	KACC 45294
17 <i>Fusarium solani</i>	Potato	Denmark	KACC 45300
18 <i>Trichoderma</i> sp. N138	Elm	Korea	DUCC
19 <i>Penicillium</i> sp. N17	Elm	Korea	DUCC

표 4-32. *Phoma glomerata* 검출 마커

Target	Primers	Sequences	Tm
Tef-1a	PhoGlo-1F	5'-TGCGCAATACTCTTGCTTCA-3'	54.3 °C
	PhoGlo-R	5'-AGCGATGTGATGTTGGATG-3'	51.0 °C

표 4-33. *Phoma glomerata* 검출을 위한 PCR mixture 조성

Components	Volume
2X free mix	10 μ l
PhoGlo-1F (10 pM)	1 μ l
PhoGlo-R (10 pM)	1 μ l
template	1 μ l
D.W	To 20 μ l

표 4-34. *Phoma glomerata* 검출을 위한 PCR 조건

PCR Conditions	Cycles
95°C for 3 min	1
95°C for 30 sec	
52°C for 30 sec	30
72°C for 30 sec	
72°C for 5 min	1

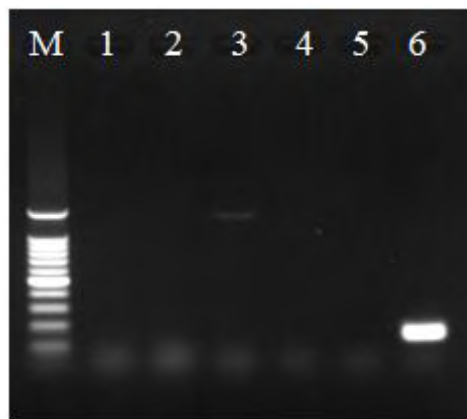


그림 4-48. *Phoma glomerata* 검출 마커의 *Phoma* 속 수준의 특이성 확인. M : 100 bp ladder marker, 1 : *Phoma exigua* var. *linicola* KACC 45598, 2 : *Phoma exigus* var. *linicola* KACC 45599, 3 : *Phoma loticola* KACC 45220, 4 : *Phoma macrostoma* var. *macrostoma* KACC 45222, 5 : *Phoma exigua* KACC 45600, 6 : *Phoma glomerata* KACC 45597.



그림 4-49. *Phoma glomerata* 검출 마커를 이용한 유전자 증폭. M : 100 bp ladder marker, 1 : *Phoma glomerata* KACC 45597, 2 : *Phoma exigua* var. *linicola* KACC 45599, 3 : *Phoma loticola* KACC 45220, 4 : *Phoma macrostoma* var. *macrostoma* KACC 45222, 5 : *Phoma exigua* KACC 45600, 6 : *Phoma exigua* var. *linicola* KACC 45598, 7 : *Phomopsis* sp. 1, 8 : *Phomopsis* sp. 10, 9 : *Rhizopus stolonifer* KACC 46292, 10 : *Colletotrichum capsici* KACC 46159, 11 : *M. racesmonas* KACC 41332, 12 : *M. racesmonas* KACC 41012, 13 : *Phialophora fastigiata* MAFF425144, 14 : *Fusarium graminearum* KACC 45294, 15 : *Fusarium solani* KACC 45300, 16 : *Trichoderma* sp. N138, 17 : *Penicillium* sp. N17.

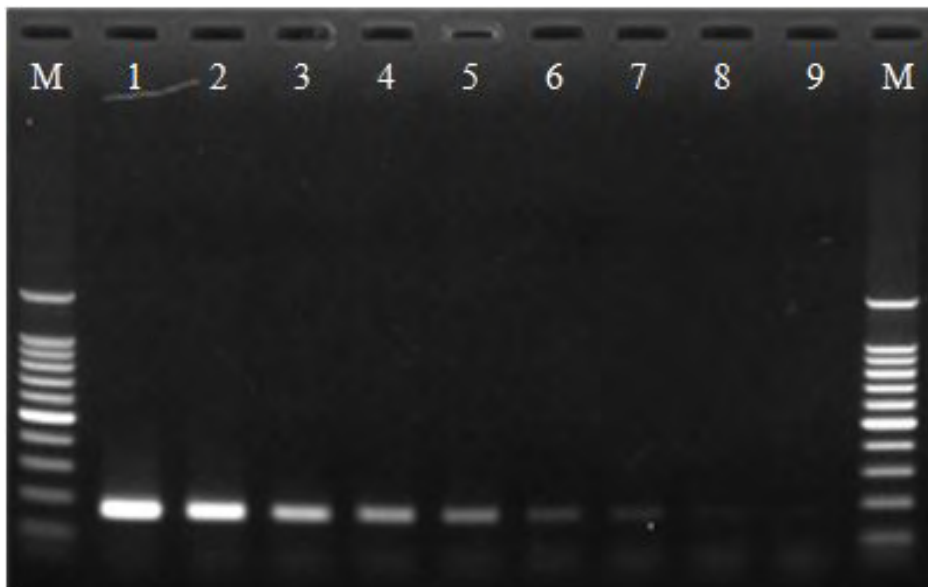


그림 4-50. *Phoma glomerata* 종에 대한 검출 마커의 민감도 (M : 100 bp ladder marker, 1 : 5 ng, 2 : 1 ng, 3 : 200 pg, 4 : 100 pg, 5 : 50 pg, 6 : 20 pg, 7 : 10 pg, 8 : 5 pg, 9 : 1 pg).

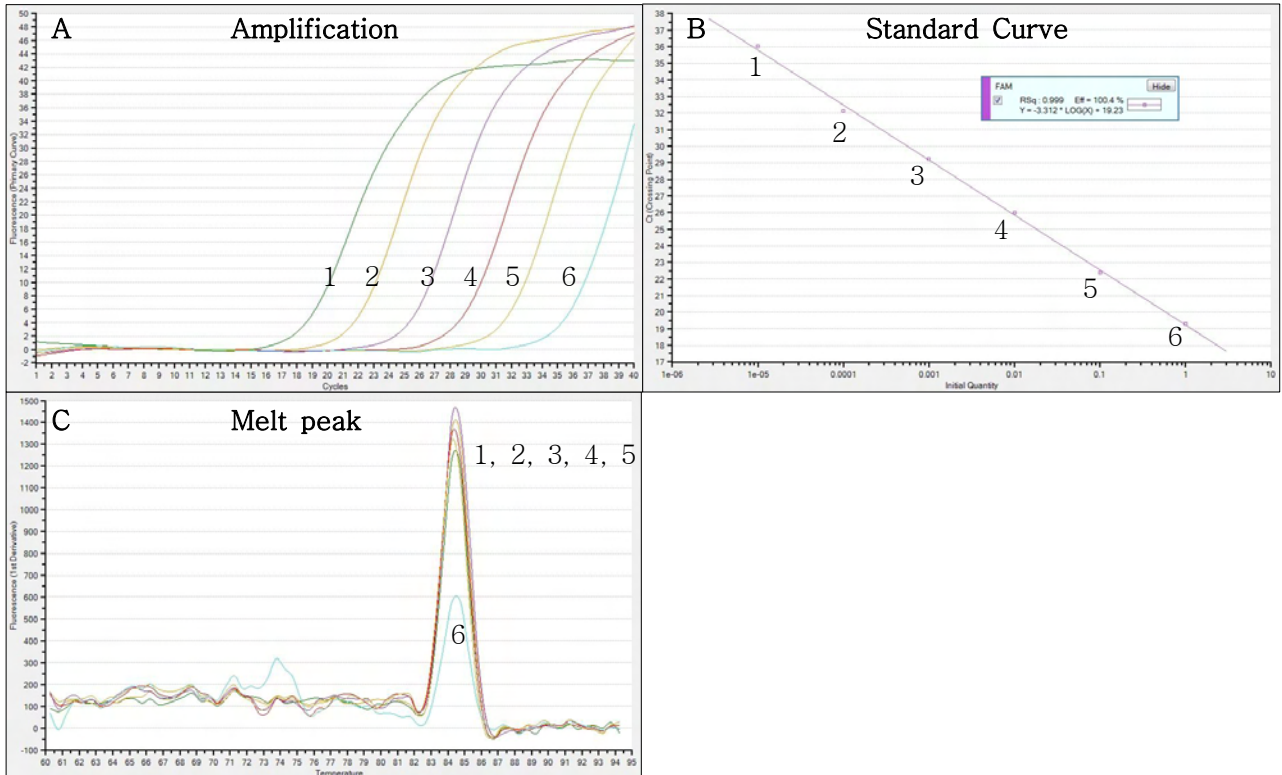


그림 4-51. SYBR green Real-time PCR을 이용한 *Phoma glomerata* 검출 마커의 민감도 테스트 (A : amplification plot, B : Standard curve, C : Melt peak. 1 : 10 ng, 2 : 1 ng, 3 : 100 pg, 4 : 10 pg, 5 : 1 pg, 6 : 100 fg).

표 4-35. *Phoma exigua* 검출 마커

Target	Primers	Sequences	Tm
Tef-1α	PhoExi-1F	5'-CATTTTCTTCCAGTGGCGAC-3'	54.3°C
	PhoExi-1R	5'-CCAGAGACGAAGTCCCAAGG-3'	55.7°C

표 4-36. *Phoma exigua* 검출을 위한 PCR mixture 조성

Components	Volume
2X free mix	10 μ l
PhoGlo-1F (10 pM)	1 μ l
PhoGlo-R (10 pM)	1 μ l
template	1 μ l
D.W	To 20 μ l

표 4-37. *Phoma exigua* 검출을 위한 PCR 조건

PCR Conditions	Cycles
95°C for 3 min	1
95°C for 30 sec	
54°C for 30 sec	30
72°C for 30 sec	
72°C for 5 min	1

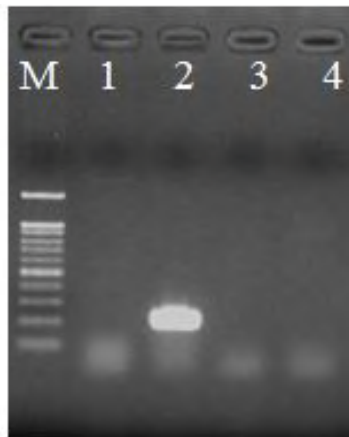


그림 4-52. *Phoma exigua* 검출 마커의 *Phoma* 속 수준의 특이성 확인 (M : 100 bp DNA ladder marker, 1 : *Phoma glomerata* KACC 45597, 2 : *Phoma exigus* var. *linicola* KACC 45598, 3 : *Phoma loticola* KACC 45220, 4 : *Phoma macrostoma* var. *macrostoma* KACC 45222).

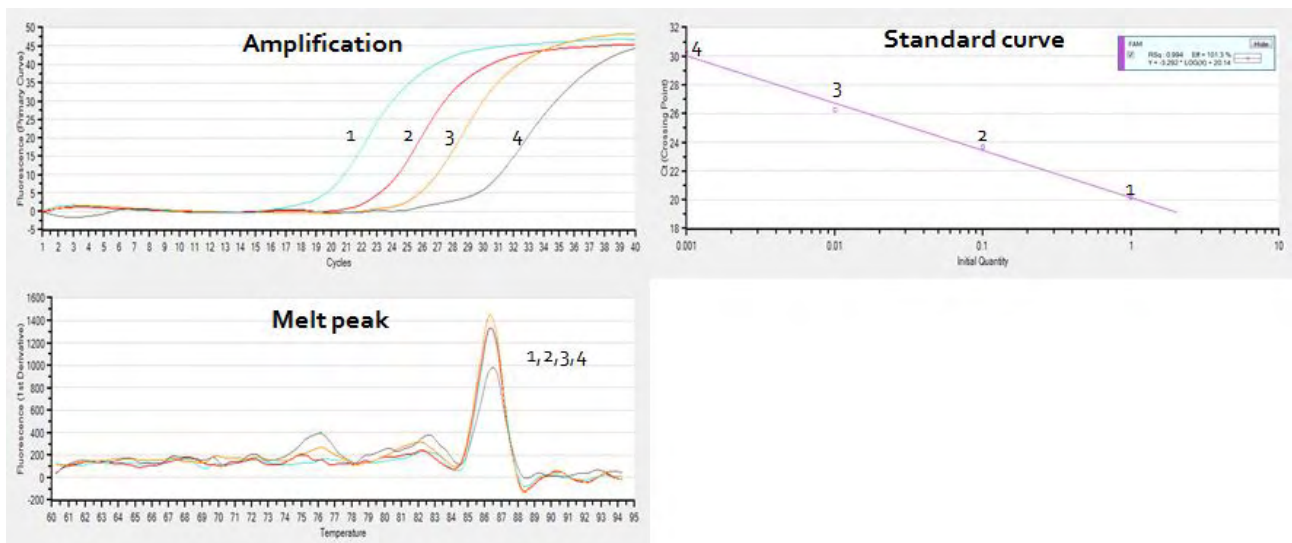


그림 4-53. SYBR green Real-time PCR을 이용한 *Phoma exigua* 검출 마커의 민감도 테스트 (A : amplification plot, B : Standard curve, C : Melt peak. 1 : 10 ng, 2 : 1 ng, 3 : 100 pg, 4 : 10 pg).

8. *Phomopsis obscurans* (Ellis & Everh.) Sutton 와 *P. sclerotioides* Van Kesteren의 검출을 위한 분자마커 개발

*Phomopsis*속은 60종 이상이 줄기, 과실 혹은 뿌리부패, 가지마름증상이나 잘록 증상 및 암종 병 등 다양한 형태의 병징을 나타내는 식물병원균일 뿐만 아니라, *P. letostromiformis*는 양에 lupinosis를 일으키는 동물병원균으로도 알려져 있다. Saccardo(1881)는 최초로 *Phomopsis*를 베타분생포자가 존재하고, Diaporthe 종의 정자기로서 *Phoma* 종과는 구분되는 *Phoma*종의 한 그룹으로서 정의했고, 이후 Nectria의 무성세대로 사용하였다. Höhnelt(1903)은 현재 *Phomopsis*속에 해당하는 *Myxolibertella*속을 명명하고, 3종을 기록하므로써 *Phomopsis*속에 대한 최초의 합법적 근거를 마련했다. Saccardo(1905)는 *Phomopsis*를 속으로 격상시키고, 2종을 기록했다. 1906년 그는 *Myxolibertella*속의 3종을 *Phomopsis*속으로 이전시켰다. Riedl 등(1981)은 *Phomopsis*속의 보존을 공식적으로 제안하였고, 1987년 독일에서 개최된 International Botanical Congress(IBC)에서 *Phomopsis*속이 인정되었다. 1906년부터 1935년까지 180종의 *Phomopsis*가 기록되었고, 1988년 Uecker는 전 세계적으로 산재된 모든 *Phomopsis*종들에 대한 목록을 작성하여 약 800종을 기록하였고, 이후에도 종수는 계속적으로 증가하여 왔다. Uecker(1988)는 180종에 대하여 *Phomopsis*와 완전세대인 *Diaporthe*속과의 관계를 기록하였으나 정확하지 않고, Kendrick(1976)은 135종을 기록하였으나 이들 중 절반은 문헌적 기록이 없으며, 단지 21종만이 기록되었다.

*Phomopsis obscurans*마커를 만들기 위해 CBS와 KACC에서 균주를 분양받았다(그림 4-54, 표 4-38). TEF-1a 유전자를 이용하여 마커를 위와 같은 방법으로 제작하였다(표 4-39). 제작된 마커를 이용하여 *Phomopsis* 균주와 다른 속의 균주를 안에서 특이성을 확인하였다(그림 4-55,56). DNA 농도에 따른 민감성을 보기 위해 real-time PCR을 수행하였고 10pg까지 피크가 올라오는 것을 볼 수 있었으나 melt 피크가 좋지 않아 100pg 에서는 잘 수행되나 10pg에서는 효율이 좋지 않을 것으로 사료된다(그림 4-57).

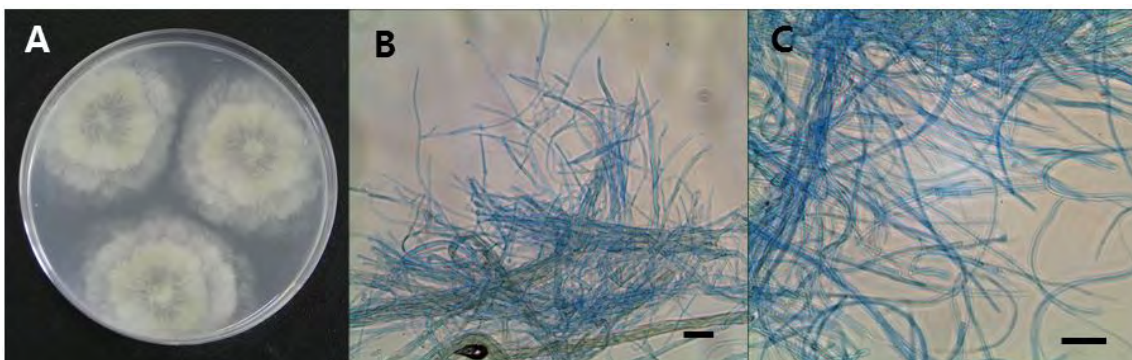


그림 4-54. *Phomopsis obscurans*의 배지상 모습(A) 과 형태적 모습(B,C)(scale bar=10 μ m)

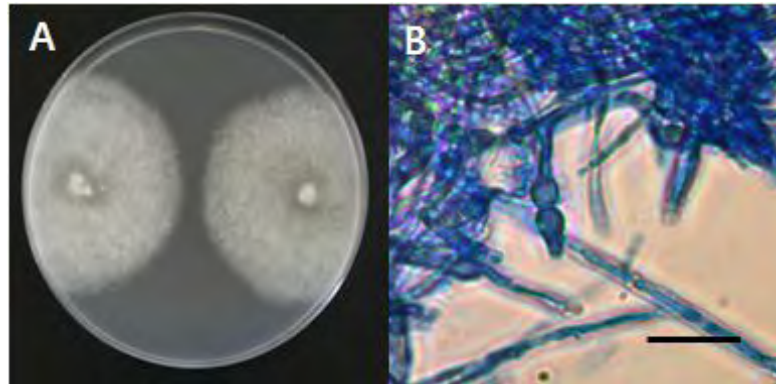


그림 4-55. *Phomopsis sclerotioides*의 배지상의 모습(A)과 형태적 모습(B)(scale bar=10 μ m)

표 4-38. 마커 개발을 위해 수집된 *Phomopsis* 속 균주

Fungal species	Country	Culture collection number
<i>Phomopsis obscurans</i>	USA	CBS 810.72
<i>Phomopsis obscurans</i>	South Africa	CBS 397.71
<i>Phomopsis sclerotioides</i>	Netherlands	CBS 710.76
<i>Phomopsis sclerotioides</i>	Netherlands	CBS 296.67
<i>Phomopsis amygdali</i>	Spain	CBS 115621
<i>Phomopsis controversa</i>	Scotland	CBS 250.38
<i>Phomopsis diospyri</i> Bongini	Korea	KACC 41009
<i>Phomopsis ipomoeae-batatas</i> Punith.	Korea	KACC 45680
<i>Phomopsis mali</i> Roberts	Korea	KACC 40839
<i>Phomopsis</i> sp.	Korea	KACC 40333
<i>Phomopsis</i> sp. 1	Korea	DUCC
<i>Phomopsis</i> sp. 10	Korea	DUCC

표 4-39. *P. obscurans* 의 분자적 마커

Gene	name	sequence	size
TEF	Pobscurans_TEF-F	GCACAATTTACATTCTAGTGCG	163bp
	Pobscurans_TEF-R	TCAGCAGCTATAGAATTGGATTAGC	

표 4-40. *P. obscurans* 검출을 위한 PCR mixture 조성

Components	Volume
2X free mix	10 μ l
Pobscurans_TEF-F (10 pM)	1 μ l
Pobscurans_TEF-R (10 pM)	1 μ l
template	1 μ l
D.W	To 20 μ l

표 4-41. *P. obscurans* 검출을 위한 PCR 조건

PCR Conditions	Cycles
95°C for 3 min	1
95°C for 30 sec	
54°C for 30 sec	30
72°C for 30 sec	
72°C for 5 min	1

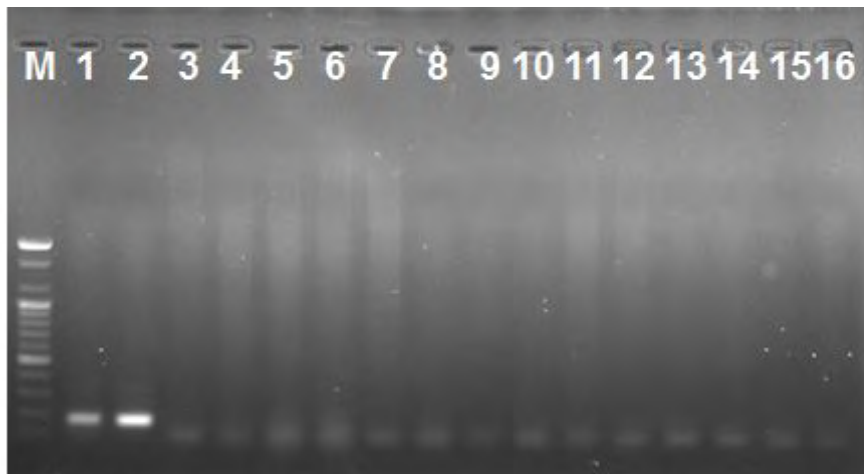


그림 4-55. *P. obscurans* 검출 마커의 특이성 확인 (M : 1kb DNA ladder marker, 1 : *P. obscurans* CBS397.71, 2 : *P. obscurans* CBS810.72, 3 : *P. sclerotoides* CBS710.76, 4 : *P. amygdali* CBS115621, 5 : *P. controversa* CBS250.38, 6 : *P. asphodelina* CBS759.95, 7 : *P. asteriscus* CBS344.86, 8 : *P. cacti* CBS365.97, 9 : *P. cotoneastri* CBS439.82, 10 : *P. glandicola* CBS1369, 11 : *P. microspora* CBS726.79, 12 : *P. phoenicicola* CBS161.64, 13 : *P. subordinaria* CBS742.84, 14 : *P. diospyri* KACC41009, 15 : *P. ipomoeae-batatas* KACC45680, 16 : *P. mali* KACC40839).

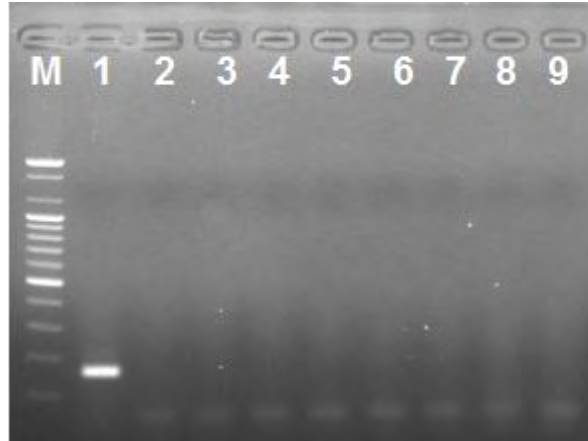


그림 4-56. *P. obscurans* 검출 마커의 특이성 확인 (M : 1kb DNA ladder marker, 1 : *P. obscurans* CBS810.72, 2 : *Phoma glomerata* KACC45597, 3 : *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* CBS4190, 4 : *F. solani* KACC45300, 5 : *R. stolonifer* KACC46292, 6 : *M. piriformis* CBS169.25, 7 : *C. capsici* KACC46159, 8: *Penicillium* sp. DUCC, 9: *Trichoderma* sp. DUCC).

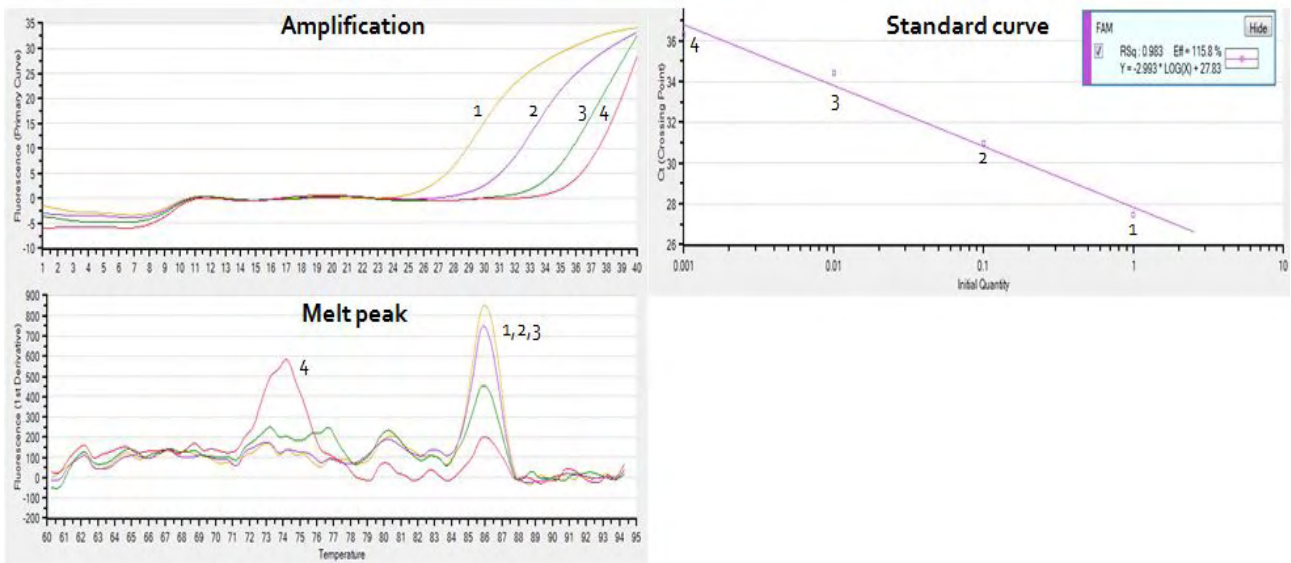


그림 4-57. SYBR green Real-time PCR을 이용한 *P. obscurans* 검출 마커의 민감도 테스트 (1 : 10 ng, 2 : 1 ng, 3 : 100 pg, 4 : 10 pg).

Phomopsis sclerotioides 마커 또한 TEF-1 α 유전자를 이용하여 마커를 위와 같은 방법으로 제작하였다(표 4-42). 제작된 마커를 이용하여 *Phomopsis* 균주와 다른 속의 균주를 안에서 특이성을 확인하였다(그림 4-58,59). DNA 농도에 따른 민감성을 보기 위해 real-time PCR을 수행하였고 1pg에서도 검출 가능한 것을 확인하였다(그림 4-60).

표 4-42. *P. clerotiioides* 의 분자적 마커

Gene	name	sequence	size
TEF	PscleTEF-1F	GTCCATGCCACACTCCA	312bp
	PscleTEF-1R	CTCCCCGACGCGATTCATCAGG	

표 4-43. *P. clerotiioides* 검출을 위한 PCR mixture 조성

Components	Volume
2X free mix	10 μ l
PscleTEF-1F(10 pM)	1 μ l
PscleTEF-1R (10 pM)	1 μ l
template	1 μ l
D.W	To 20 μ l

표 4-44. *P. clerotiioides* 검출을 위한 PCR 조건

PCR Conditions	Cycles
95°C for 3 min	1
95°C for 30 sec	30
65°C for 30 sec	
72°C for 30 sec	
72°C for 5 min	1

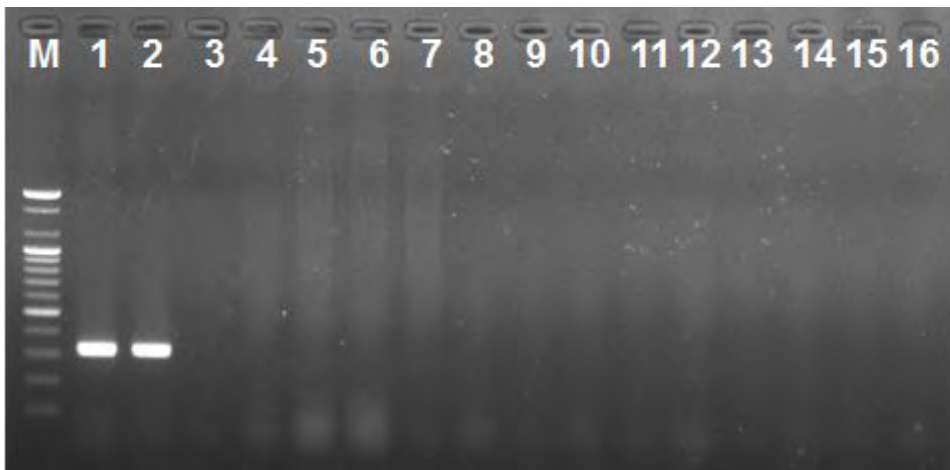


그림 4-58. *P. clerotiioides* 검출 마커의 특이성 확인 (M : 1kb DNA ladder marker, 1 : *P. obscurans* CBS397.71, 2 : *P. obscurans* CBS810.72, 3 : *P. sclerotiioides* CBS710.76, 4 : *P. amygdali* CBS115621, 5 : *P. controversa* CBS250.38, 6 : *P. asphodelina* CBS759.95, 7 : *P. asteriscus* CBS344.86, 8 : *P. cacti* CBS365.97, 9 : *P. cotoneastri* CBS439.82, 10 : *P. glandicola* CBS1369, 11 : *P. microspora* CBS726.79, 12 : *P. phoenicicola* CBS161.64, 13 : *P. subordinaria* CBS742.84, 14 : *P. diospyri* KACC41009, 15 : *P. ipomoeae-batatas* KACC45680, 16 : *P. mali* KACC40839).

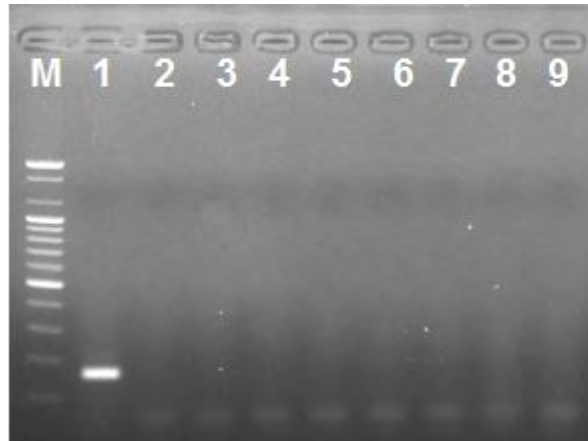


그림 4-59. *P. clerotoides* 검출 마커의 특이성 확인 (M : 1kb DNA ladder marker, 1 : *P. obscurans* CBS810.72, 2 : *Phoma glomerata* KACC45597, 3 : *F. oxysporum f.sp. lycopersici* CBS4190, 4 : *F. solani* KACC45300, 5 : *R. stolonifer* KACC46292, 6 : *M. piriformis* CBS169.25, 7 : *C. capsici* KACC46159, 8: *Penicillium* sp. DUCC, 9: *Trichoderma* sp. DUCC).

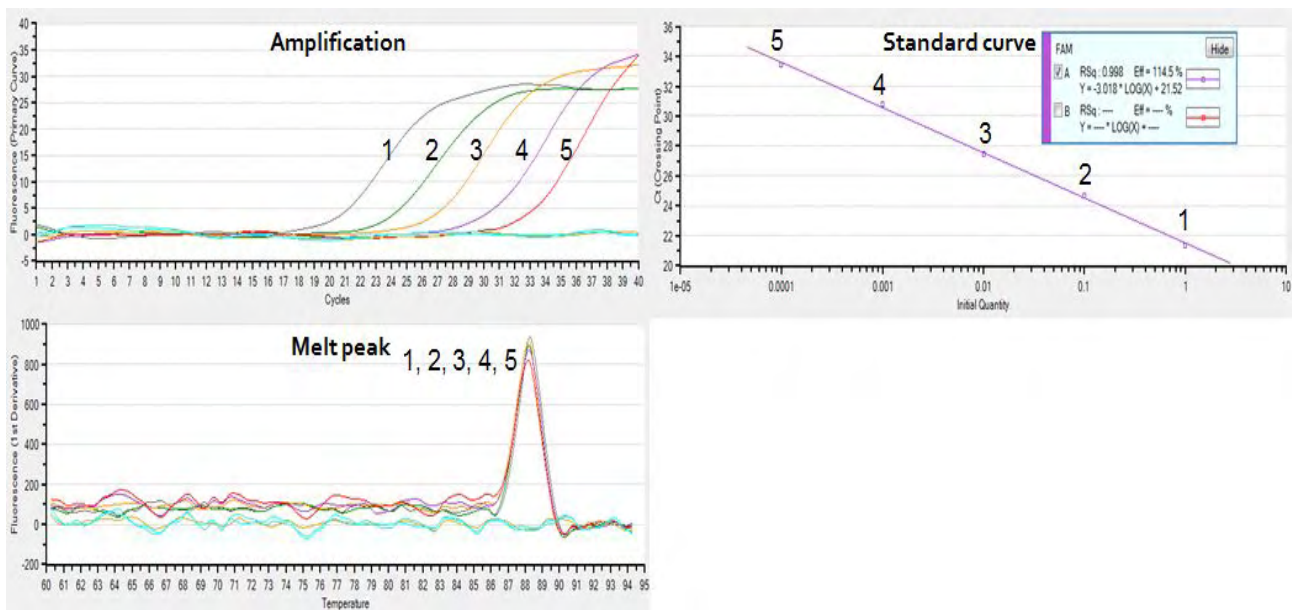


그림 4-60. SYBR green Real-time PCR을 이용한 *P. clerotoides* 검출 마커의 민감도 테스트. 1 : 10 ng, 2 : 1 ng, 3 : 100 pg, 4 : 10 pg, 5 : 1pg

9. *Botryosphaeria parva* 의 분자적 마커 제작

Botryosphaeria 균주들은 수목, 과수의 줄기에 마름병을 일으키거나 과실을 썩힌다. 병 발생 초기에는 병든 줄기에 붙어 있는 잎이 황색 및 적색으로 변한다. 병이 진전되면 잎이 담갈색으로 변하여 말라죽는다. 병에 걸린 줄기의 조직은 갈색 또는 황갈색으로 변하여 썩고, 표피의 내부는 갈색 내지 암갈색으로 변한다. 감염 초기에는 표피내부의 변색증상이 감염부위로부터 한쪽만 형성되고, 병 진전이 심한 경우에는 표피내부가 전체적으로 변색되어 썩는다. 큰 나무

의 잔가지에 병이 발생하면 벼은 줄기만 말라죽으나 어린 나무의 줄기 밑동에 발생하면 나무 전체가 말라죽는다. 병든 줄기의 표피조직 내에 위자낭각과 병자각을 형성하여 포자를 만들에 된다. 병원체는 월동 후 5-6월에 자낭포자와 분생포자를 바람에 날리어 나무의 줄기의 상처부 위 혹은 동해나 한발로 인한 피해부위로 침입하고 병을 이르킴다. 병원체의 감염은 특히 6-7월의 비가 많이 오는 시기에 많이 이루어진다. 국내에서는 *B. dothidea*에 의한 사과 겹무늬썩음병 피해 사례가 보고되고 있다. 사과 겹무늬썩음병은 과실, 가지에 주로 발생한다. 과실에는 처음 황갈색의 작은 반점이 생기고, 점차 확대되어 윤문상의 큰 병반이 형성되고, 심하면 물이 흐르고, 과일 전체가 부패, 낙과한다. 한편 흑갈색 또는 황갈색의 원형 반점이 형성, 진전이 매우 느리고 병반 주위에 적색의 테를 형성하기도 한다. 탄저병과 다른 점은 중앙에 까만 소흑점(병자각)이 형성되고, 과일을 쪼개보면 심부까지 부패하며, 병반이 함몰되지 않는 것이 특징이다. 가지에서는 사마귀형성(조피), 굵은가지의 윤문증상, 가지마름증상 등으로 나타나는데, 사마귀증상의 피해가 가장 크다.

Botryosphaeria parva 마커는 TEF-1a 유전자를 이용하여 마커를 위와 같은 방법으로 제작하였다(표 4-45). 제작된 마커를 이용하여 *Botryosphaeria* 균주와 다른 속의 균주를 안에서 특이성을 확인하였다(표 4-46, 그림 4-61~63). DNA 농도에 따른 민감성을 보기 위해 real-time PCR을 수행하였고 100fg 에서도 검출가능한 것을 확인하였다(그림 4-64).

표 4-45. *Botryosphaeria parva* 의 분자적 마커

Gene	name	sequence	size
TEF	PscleTEF-1F	GTCCATGCCACACACTCCA	312bp
	PscleTEF-1R	CTCCCCGACGCGATTCATCAGG	

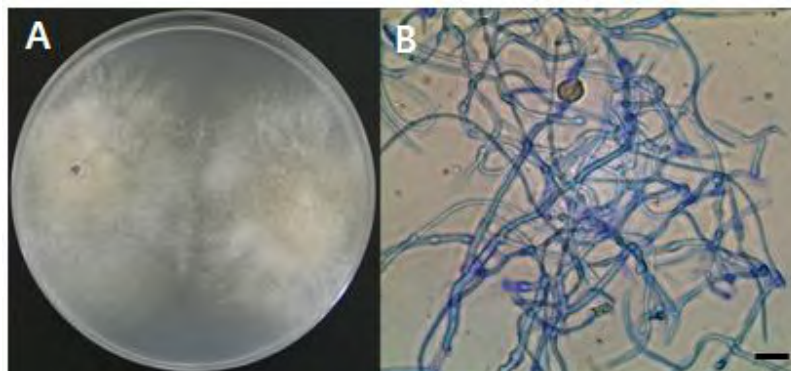


그림 4-61. *Botryosphaeria parva* 의 배지상 모습(A) 과 형태적 모습(B)(scale bar=10 μ m).

표 4-46. *Botryosphaeria parva* 와 근연종 목록

	Fungal species	Host	Country	Culture collection
1	<i>Botryosphaeria parva</i>	Quercus suber, twig canker	Italy	CBS119937
2	<i>B. parva</i>	-	South Africa	CBS118832
3	<i>B. quercuum</i>	bark and wood	Italy	CBS177.89
4	<i>B. rhodina</i>	Vine	Argentina	CBS110495
5	<i>B. corticola</i>	cankered branch	Spain	CBS112545
6	<i>B. dothidea</i>	Malus coronaria	Korea	KACC45481

표 4-47. *Botryosphaeria parva* 검출을 위한 PCR mixture 조성

Components	Volume
2X free mix	10 μ l
PscleTEF-1F(10 pM)	1 μ l
PscleTEF-1R (10 pM)	1 μ l
template	1 μ l
D.W	To 20 μ l

표 48. *Botryosphaeria parva* 검출을 위한 PCR 조건

PCR Conditions	Cycles
95°C for 3 min	1
95°C for 30 sec	
65°C for 30 sec	30
72°C for 30 sec	
72°C for 5 min	1

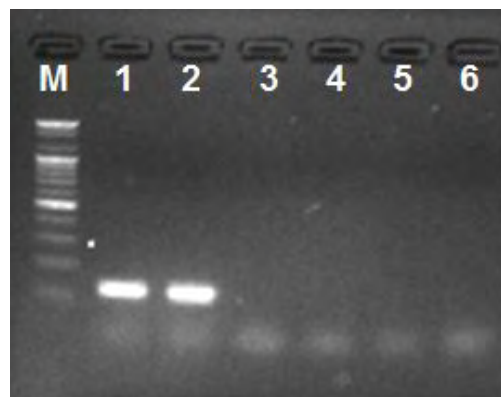


그림 4-62. *Botryosphaeria parva* 검출 마커의 특이성 확인 (M : 1kb DNA ladder marker, 1 : *B. parva* CBS119937, 2 : *B. parva* CBS118832, 3 : *B. quercuum* CBS177.89, 4 : *B. rhodina* CBS110495, 5 : *B. corticola* CBS112545, 6 : *B. dothidea* KACC45481).

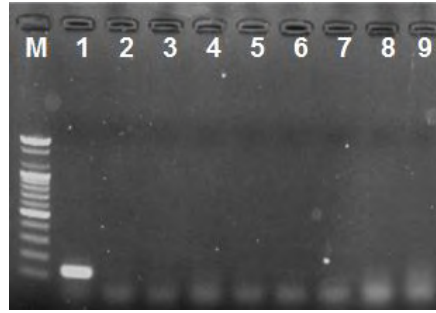


그림 4-63. *Botryosphaeria parva* 검출 마커의 특이성 확인 (M : 1kb DNA ladder marker, 1 : *B. parva* CBS119937, 2 : *F. oxysporum f.sp. lycopersici* CBS4190, 3 : *F. oxysporum f.sp. medicaginis* CBS179.29, 4 : *F. solani* KACC45300, 5 : *R. stolonifer* KACC46292, 6 : *M. piriformis* CBS169.25, 7 : *C. capsici* KACC46159, 8 : *Penicillium* sp. DUCC, 9 : *Trichoderma* sp. DUCC).

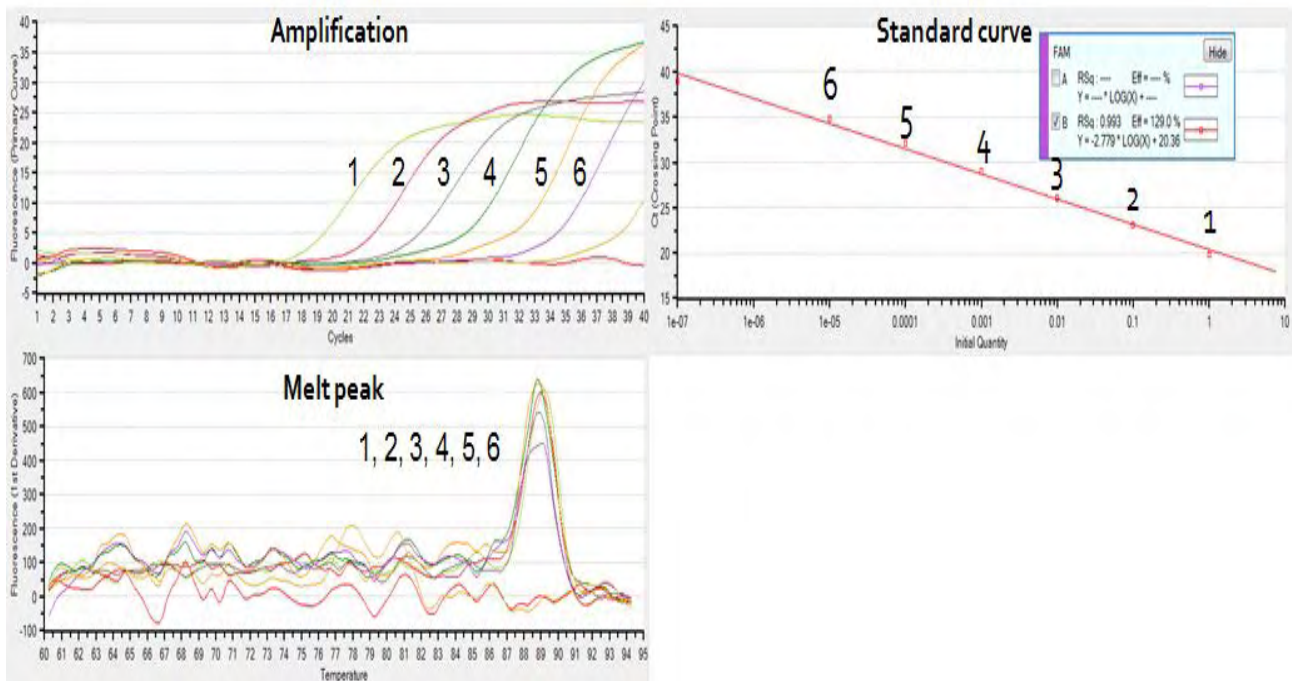


그림 4-64. SYBR green Real-time PCR을 이용한 *P. cleroioides* 검출 마커의 민감도 테스트 (1 : 10 ng, 2 : 1 ng, 3 : 100 pg, 4 : 10 pg, 5 : 1pg, 6 : 100fg).

10. *Septoria citri* 의 분자적 마커 개발

*Septoria*는 전 세계적으로 많은 작물에 가해하여 주로 점무늬병과 잎마름병을 일으킨다. 가장 일반적으로 심각한 병으로는 잎 밑 잎마름병을 비롯한 각종 화곡류 및 벼과 목초류의 잎마름병 그리고 셀러리, 토마토, 기타 채소류, 전작물, 관상식물의 각종 점무늬병 등이 있다. 채소류와 화훼류에서 점무늬 병반은 처음에는 작은 황색 점무늬로 시작하여 확대되고, 담갈색이나 황회색으로 변하며, 마지막으로 좁은 황색띠에 둘러싸인 암갈색으로 변한다. 이 점무늬는 기주나 병원균의 종류에 따라 거의 육안으로 볼 수 없는 것에서부터 직경 1~2cm 까지 다양하며, 드물

계 각각의 병반이 잎면적의 1/3에 이를 정도로 다양하다. 이 점무늬는 등근 윤곽을 가진 뚜렷한 가장자리를 가지거나 가장자리가 불분명한 불규칙한 형태를 가진다. 일부 기주에서는 2~3개의 점무늬가 있는 잎이 누렇게 변하면서 죽지만, 다른 기주에서는 수 많은 점무늬가 형성된 이후에 황변하고 결국 시들어 죽는다. 마침내는 낙엽이 지고 죽는다. 점무늬가 형성됨에 따라 작고 검은 점무늬 안에 점으로 나타난다. 화곡류와 벼과 목초류의 경우에 점무늬 병반은 연녹색 내지 황색 또는 갈색의 점무늬로 나타나는데, 처음에는 엽맥사이에 나타나지만 곧 색깔이 짙어지면서 급속히 확대되어 불규칙한 대형병반을 형성한다. 이 점무늬는 품종이나 습도조건에 따라 잎 전체를 덮기도 한다. 흔히 대형 병반에는 병원균의 분생포자각이 형성되는데, 분생포자각은 다소 많으며 작고 짙은색이며 병반 상에 점이 찍힌 것처럼 보인다. 발병에 적합한 날씨에는 병든 잎은 고사하고 병원균은 줄기를 침입하여 검은 괴저 병반을 형성하므로 식물체는 쇠약해져 죽고 때로 쓰러지기도 한다. 모든 *Septoria* 종은 감염과 심한 발병에는 다습상태가 요구되지만 넓은 온도에서 병을 일으킨다. *Septoria citri*는 오렌지, 감귤, 유자, 레몬 등에 발병하며 잎과 열매에 반점을 유발해 과실껍질에 손상을 줌으로서 외관을 흉하게 해 품질을 저하시킨다.

*Septoria citri*를 검출할 수 있는 마커를 만들기 위해 TEF-1a 유전자를 이용하려 제작하였다(표 4-49,50;그림 4-65). 제작된 마커는 *Septoria* 균주들과 다른 병원성 곰팡이를 이용하여 실험한 결과 *Septoria citri*만 검출되는 것을 볼 수 있었다(그림 4-66). 민감성 실험 결과 1pg 수준까지 검출되는 것으로 확인하였다(그림 4-67).

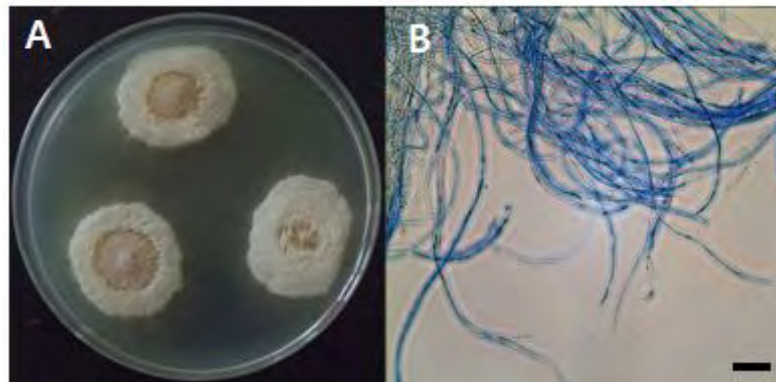


그림 4-65. *Septoria citri* 의 배지상 모습(A) 과 형태적 모습(B)(scale bar=10µm)

표 4-49. *Septoria* 속에 속하는 균주 목록

	Fungal species	Host	Country	Culture collection
1	<i>Septoria citri</i>	-	-	CBS315.37
2	<i>S. betulae</i> Pass.	Betula platyphylla	Korea	KACC43118
3	<i>S. ceridis</i> Fr.	leaf of Cercis siliquastrum	Argentina	KACC44497
4	<i>S. chrysanthemella</i>	Chrysanthemum morifolium	Korea	KACC43086
5	<i>S. pachyspora</i>	Zyathoxylum schinifolium	Korea	KACC42510
6	<i>S. rubi</i>	Rubus crataegifolius	Korea	KACC42366

표 4-50. *Septoria citri* 의 분자적 마커

Gene	name	sequence	size
TEF	Scitri-F	CTTTGGGCTTTTGCGGCTCC	152bp
	Scitri-R	ATGAACCAACATTGTCAGTGACCTTCTTC	

표 4-51. *Septoria citri* 검출을 위한 PCR mixture 조성

Components	Volume
2X free mix	10 μ l
Scitri-F (10 pM)	1 μ l
Scitri-R (10 pM)	1 μ l
template	1 μ l
D.W	To 20 μ l

표 4-52. *Septoria citri* 검출을 위한 PCR 조건

PCR Conditions	Cycles
95°C for 3 min	1
95°C for 30 sec	30
60°C for 30 sec	
72°C for 30 sec	
72°C for 5 min	1



그림 4-65. *Septoria citri* 검출 마커의 특이성 확인 (M : 1kb DNA ladder marker, 1 : *S. citri* CBS315.37, 2 : *S. betulae* Pass. KACC43118, 3 : *S. ceridis* Fr. KACC44497, 4 : *S. chrysanthemella* KACC43086, 5 : *S. pachyspora* KACC42510, 6 : *S. rubi* KACC42366, 7 : *C. gloeosporioides* KACC40690, 8 : *F. graminearum* KACC45292, 9 : *F. oxysporum* CBS4190, 10 : *F. solani* KACC45300, 11 : *M. racemosus* KACC40269, 12 : *Trichoderma* sp., 13 : *Penicillium* sp.).

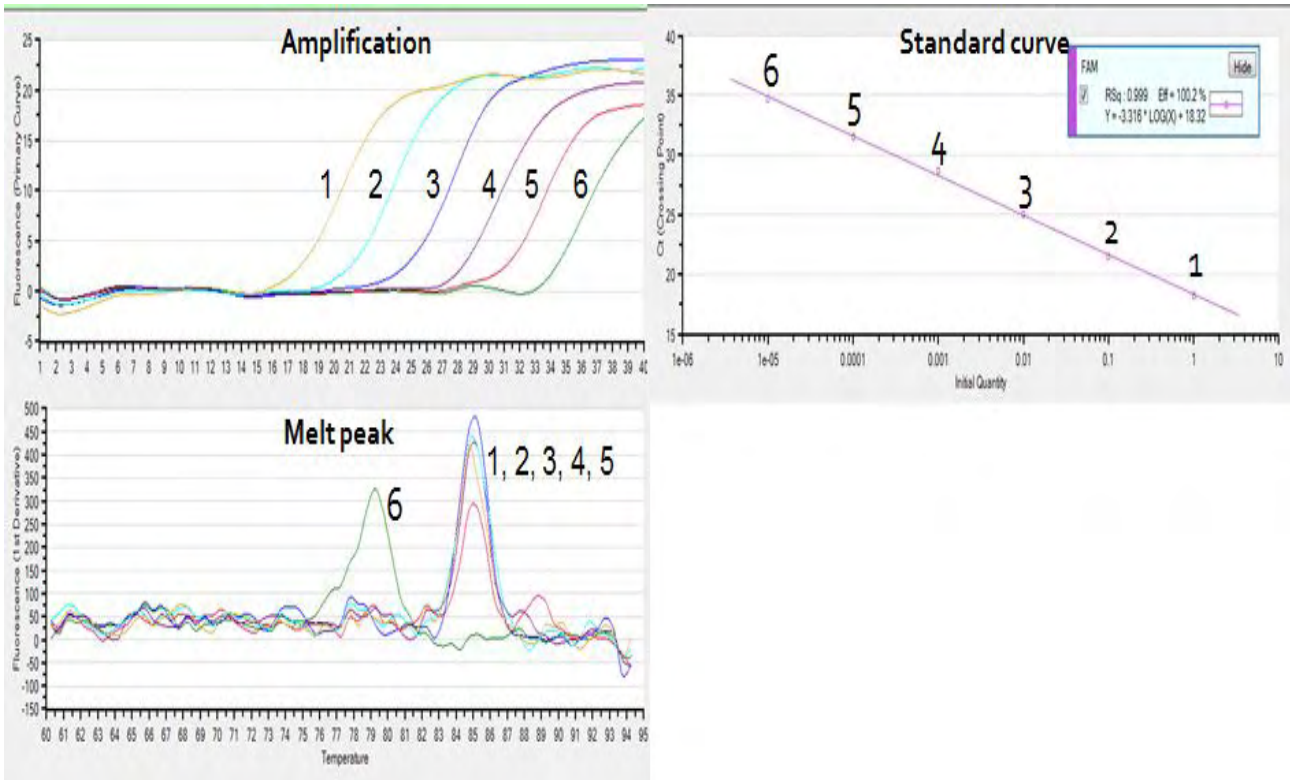


그림 4-66. SYBR green Real-time PCR을 이용한 *Septoria citri* 검출 마커의 민감도 테스트 (1 : 10 ng, 2 : 1 ng, 3 : 100 pg, 4 : 10 pg, 5 : 1pg, 6 : 100fg).

11. Phialopora 속에 대한 마커 개발

균학적 성장 변화 조사 대상 균의 일반적 내용

1915년 Medlar에 의하여 보고 된 *Phialopora* 속 균은 자낭균류에 속하는 무성세대이다. 이들은 토양과 식물 그리고 부패 식품에서 서식하는 등 자연계에 널리 분포하며 부생하는 암색분생(dematiaecous) 포자를 갖는 사상균이다.

이들 균들의 균학적 분류는 Schoz-Schwarz에 의하면 일반적으로 이들 균류는 것이 있는 점성 포자를 갖는 플라스크 모양의 경자를 통해 분류 할 수 있다. 그리고 최근 Gams에 의하면 이들 균류는 polyphyletic(다계적인) 균류이다. 이들의 균학적 특징은 격벽이 있는 균사, 포자의 형태, 경자(phialides)를 통해 형태학적 특성을 확인 할 수 있다. 그러나 무성세대인 *Phialopora* 는 몇 개의 유성세대 분류군을 갖는다. 그들의 유성세대는 다음과 같다 : *Mollisia*, *Capronia*, *Gaeumannomyces*, *Helotiales*, *Chaetosphaeria* 등이 알려져 있으며, 또한 *Phialophora* 유사 무성 세대를 갖는 *Cadopora* Conant, *Catenulifera* Hosoya, *Coryne* Nees, *Harpophora* W. Gams, *Lecythophora* Nannfeldt, *Margarinomyces* Laxa, *Phaeoacremonium* 등이 보고되었다. 이들의 무성세대인 *Phialopora* 속이 종들은 매우 복잡하며 알려지지 않은 종들을 많이 포함하고 있다. 따라서 현재 이들의 분류학적 위치는 명확하지 않았다. 따라서 이들의 형태학적 분류는 매우

어려운 상태이다. 이들 균류의 병리학적 성상으로는 인체감염 및 식물체를 감염 시킨다. 인체 감염을 일으키는 주요 종으로는 *P. verrucosa* 대표적이다.

그리고 식물에 관련하여 알려진 종들로는 *P. cinerescens*(Wollenweb.) van beyma, *P. malorum*(M. N. Kidd & Beaumont) McColloch, *P. gregata*(Allington & Chamberlain) W. Gams, *P. malorum*, *P. parasitica* 등이 있으며, 현재 식물 검역상 관리를 요구하는 종들이다 (국립 식물 검역원: 관리병해충 목록) 이들 중 특히 본 연구 목적과 관련 과수 및 수목류 검역 대상 주요 목적 대상 균주인 *P. parasitica*, *P. malorum* 과수류의 묘목과 과실에 피해를 주는 주요 병원균이다. *P. parasitica* 는 포도나무의 잎 및 도관 마름병을 일으키는 주요 균이다. 뿐만 아니라 인간의 진균성 흑색종을 일으키는 것으로 알려져 있다. 그리고 *P. malorum* 의 경우는 저장 사과와 배의 과실 썩음 병을 일으키는 주요균 이다. 이들은 특히 동고병 발생 과수의 조직과 나무껍질 및 토양 등에 부생한다.

Phialophora 속 균류의 수집

대상균주들은 일본 국립농업생물과학 연구소 유전 자원관리부(Genetic Resources Management Section, National Institute of Agrobiological Sciences) 로부터 제공받았다(표 4-53, 그림 4-67). 현재 검역 관리 대상 균종인 *Phialophora gregata*, *Phialophora cinerescens*, *Phialophora malorum*를 포함한 8균주를 확보하였다. 그러나 *P. parasitica* 균주는 국제적으로 소재를 찾고자 조사를 수행하였으나 균주를 보유하고 있는 기관이 없어 실험을 위해 사용 할 수 없는 실정이었다.

표 4-53. 확보한 *Phialophora* 속 균류

곰팡이 종	분리 지역	분리 기주
<i>Phialophora verrucosa</i>	일본	밀
<i>Phialophora gregata</i> f. sp. <i>adzukicola</i>	일본	콩
<i>Phialophora atrovirens</i>	일본	해송
<i>Phialophora cinerescens</i>	일본	적송
<i>Phialophora fastigiata</i>	일본	적송
<i>Phialophora fastigiata</i> CBS 100584		
<i>Phialophora malorum</i>	일본	적송

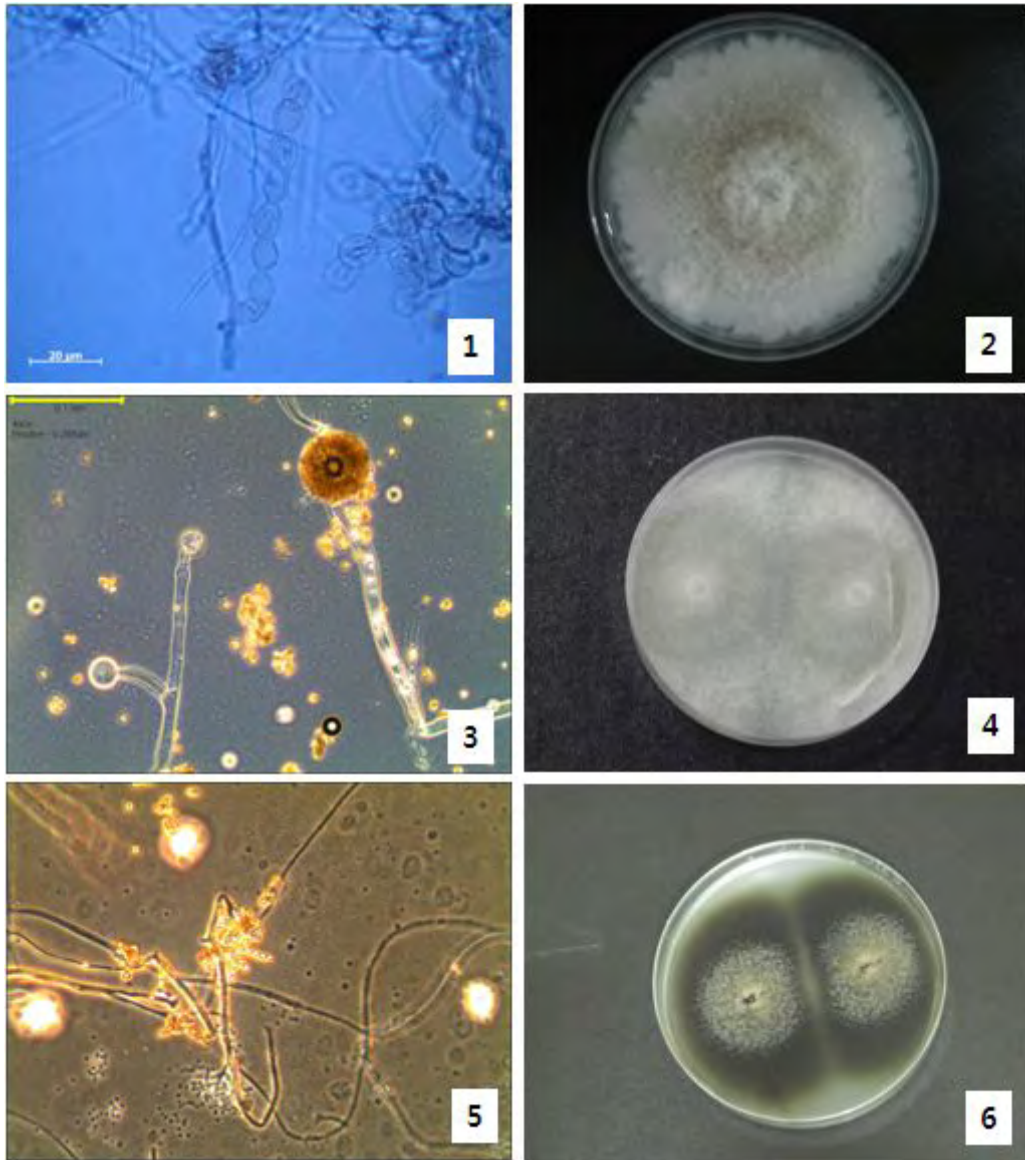


그림 4-67. 대상 균류의 일반적인 형태와 배지상에서 자란 일반적인 모습 (1-2: *Monilinia* sp., 3-4: *Mucor* sp., 5-6: *Phialophora* sp.).

확보된 *Phialophora* 균주들로부터 ITS rDNA를 PCR 증폭하여 유전자 염기서열을 분석하였다 (그림 4-68). 얻어진 염기서열은 알려진 다른 *Phialophora* 종들의 ITS 유전자 염기서열(표 4-54)과 비교하여 계통도 분석을 수행하였다 (그림 4-69). 그림에서 보듯이 검역 관리 중인 *P. gregata*, *P. cinerescens*, *P. fastigiata*, *P. malorum*.은 계통도상으로는 분지가 되었으나 근연 종 하고 염기서열상으로 매우 유사하여 종 특이적 마커를 만들기에는 *P. malorum*. 종만이 가능하였다. 이에 따라 *P. malorum*. 종 특이적 마커인 PMIF-PM2R primer의 특이성을 검정 하였으나 특이적으로 검출되지 못하였다. 이에 따라 다른 유전자인 small subunit와 large subunit, 그리고 TEF유전자를 증폭하여 각각 마커제작을 시도해 보았으나 *Phialophora gregata*, *Phialophora cinerescens*, *Phialophora malorum*의 특이적인 마커를 제작할 수 없었다.

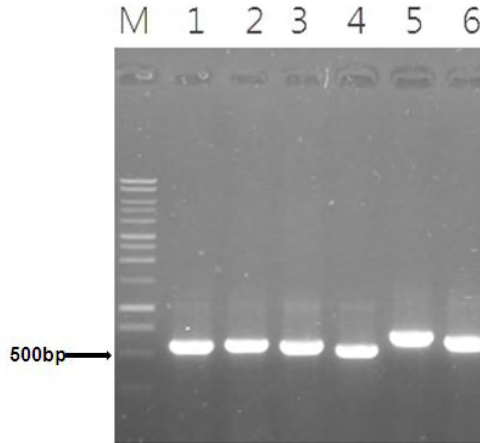


그림 4-68. 분양 받은 균들의 Genomic DNA로부터 증폭된 ITS rDNA 의 전기영동 결과 (Lane M: marker lane 1:*Phialophora verrucosa*, lane 2: *P. gregata*, lane 3:*P. atrovirens*, lane 4:*P. cinerescens*, lane 5:*P. fastigiata*, lane 6:*P. malorum*).

이러한 결과에 대한 해석으로는 현재 데이터베이스에 등록되어 있는 유전자 염기서열의 균주와 본 연구에 사용한 균주의 유전자 염기서열 사이에 차이가 존재하여 Primer 가 작동하지 않았을 가능성이 있다. 이는 아직 까지 국제적으로 대상 균주가 극히 적은 바 아직 종내 변이가 어느 정도 인지 판단할 수 없는 어려움이 존재한다. 앞으로 더 많은 균주를 확보해서 해결해야 할 사항이다.

또 다른 해석은 분류학상의 오류에 기인할 수 있다. Phoma 균의 분류는 계속해서 기주에 근거한 형태적 분류가 대부분인바 분류학적 논란이 많이 존재하였다. 국제적으로도 이 균에 대한 전문가가 드물어 데이터베이스에 올라 있는 균주의 동정이 잘못 되어 있을 수 있다. 이는 최근에 여러 유전자를 대상으로 염기서열을 분석하고 계통도를 분석한 결과 기존의 Phoma 속 에 속하는 종들이 몇 개의 다른 속에 속하는 종으로 보고되었기 때문이다. 우리나라에 균주가 없어서 일본에서 분양 받은 균주와 데이터베이스에 존재하는 균주간의 종 판정은 이 또한 앞으로 더 많은 균주를 확보해서 해결해야 할 사항이다.

지금은 *Phialophora*를 분리하는데 이용한 다른 유전자들이 있는지 찾아보고 있는 중이고 과제가 끝나더라도 마커를 제작할 수 있는 유전자가 있으면 마커를 제작하여 시도해 볼 계획 이다.

표 4-54. GenBank 데이터 베이스에 등록된 *Phialophora* 속 종들과 유전자 등록번호

곰팡이 종	유전자 등록번호	유전자
<i>Phialophora japonica</i>	AB190383	ITS rDNA
<i>P. olivacea</i>	AY249079	"
<i>P. sessilis</i>	AB190386	"
<i>P. oxyspora</i>	AY249077	"
<i>P. atrovirens</i>	AB190387	"
<i>P. bubakii</i>	AB190388	"
<i>P. dancoi</i>	AB190868	"
<i>P. foetens</i>	AB190389	"
<i>P. cinerescens</i>	AB190390	"
<i>P. reptans</i>	AB190869	"
<i>P. chrysanthemi</i>	AB190391	"
<i>P. clavispora</i>	AB190394	"
<i>P. geniculata</i>	AB190395	"
<i>P. hyalina</i>	GU727563	"
<i>P. asciculata</i>	AB190399	"
<i>P. luteoviridis</i>	AB190378	"
<i>P. lignicola</i>	AY618677	"
<i>P. intermedia</i>	AB190401	"
<i>P. calyciformis</i>	HQ115660	"
<i>P. mustea</i>	AB190379	"
<i>P. brunnescens</i>	AB190870	"
<i>P. cyanescens</i>	EU514699	"
<i>P. cyclaminis</i>	GU981737	"

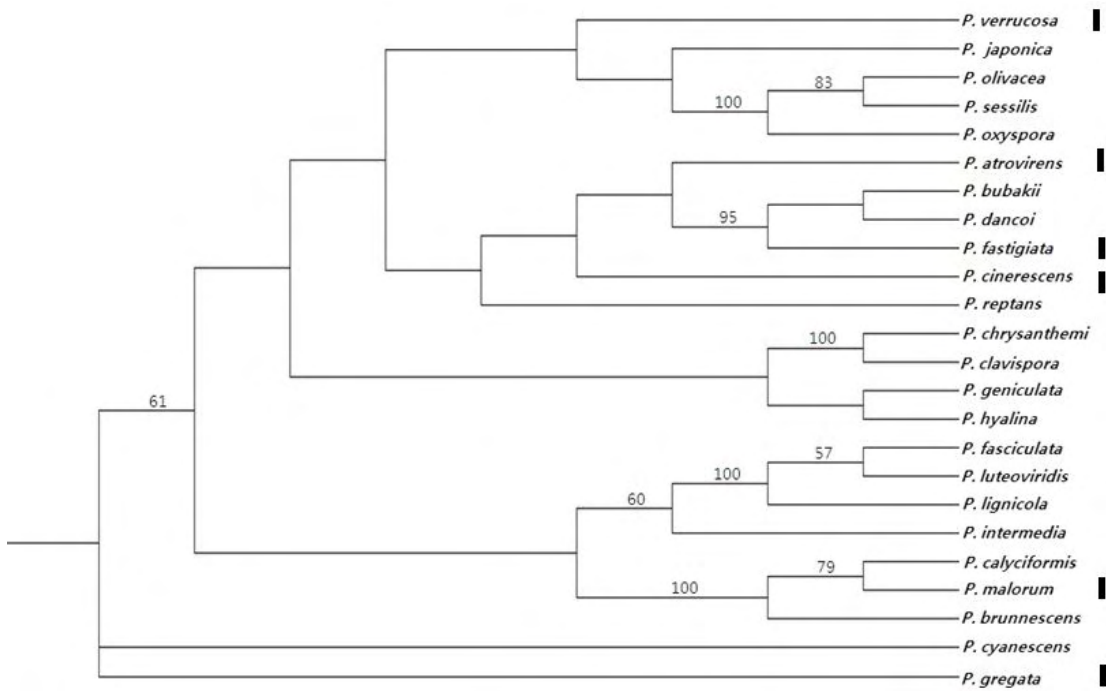


그림 4-69. ITS rDNA 유전자 염기서열 분석에 근거한 *Phialophora* 속에 속하는 주요 종간의 계통유전적 관계 (■ : 본 연구에서 사용된 균종 임).

```

Fc CTCGAAGAAGTTCGGT----CCTGAACTCCACCCTTGAATAAATTACC-TTTGTTGCTTT 55
Eg CTCGAAGAAGCTCGGT----CCTGAACTCCACCCTTGAATAAATTACC-TTTGTTGCTTT 55
Fa CTCGCGCA-----CAGGT--AACCCTTGAATAACATACC-TTCGTTGCTTT 43
Ef CTCGCGGATGTGAGCAATACCTAGGT--CACCCCTTGAATAAATTACC-CTTGTGCTTT 57
Fv CTC---CAGGCCGAC---CTCCAC--CCCTTTGTTTACCTTGCTGCATGTTGCTTT 50
Em CTACCGGA-----CCCAGAC---GCGAGGAGTA--TACTACGCGTAGAGCC 42
**          PMIF          * * * * *

Fc GGCAGGCC-GCC--TCGTG-CCAGC----GGCT-TTG-----GCTGTTG----AGTGCC 96
Eg GCGCGGCC-GCC--TCGCG-CCAGC----GGCT-TCG-----GCTGTTG----CGTGCC 96
Fa GCGCGGCC-GCCC-TCGTGGCCAGC----GGCC-TCG-----GCTGCTG----CGCGCC 86
Ef GCGCGGCC-GCCCTCGGGCCAGC----GGCT-TCG-----GCTGCTG----CGCGCC 101
Fv GCGCGACCCGTC--TCACGACCGCCCTGGGACCGCGAGAGGTGCCCTGGGCCCGTGTG 108
Em GACAGGCA-----CCGCC-----ACT-----GATTTTA-----GAGGC 70
* * * * *          * * * * *

Fc TGCCAGAGGACCAC---AACTCTTGTITTTTA--GTG----ATGCTGAGT-----ACTA 141
Eg CGCCAGAGGACCAC---AACTCTTGTITTTTA--GTG----ATGCTGAGT-----ACTA 141
Fa CGCCGAGGACCAC---AACTCTTGTITTTTA--GTG----ATGCTGAGT-----ACTA 131
Ef CGCCAGAGGACCAC---AACTCTTGTITTTTA--GTG----ATGCTGAGT-----ACTA 146
Fv CGCCGATAGCCAACCTAAACTCTTGAATGAATCGTGTITTTATGCTGAGTCTATTGATTA 168
Em CGC---GGAACCGC--GAACCCCAATACCAA--GCGA---AGGCTTGAGT-----GGTTA 115
* * * * *          * * * * *

Fc TAT-AATAGTTAAAACITTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA 200
Eg TAT-AATAGTTAAAACITTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA 200
Fa TAT-AATAGTTAAAACITTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA 190
Ef TAT-AATAGTTAAAACITTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA 205
Fv AATCAAAAGCAAAAACITTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA 228
Em TA-----ATGACGCTCGA--ACAGGCAT----GCCCT----TCG-----GAATAC- 150
* * * * *          * * * * *

Fc GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA-GTGAATCATCGAATCTTTGAACG 259
Eg GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA-GTGAATCATCGAATCTTTGAACG 259
Fa GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA-GTGAATCATCGAATCTTTGAACG 249
Ef GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA-GTGAATCATCGAATCTTTGAACG 264
Fv GCGAAATGCGATAAGTAATGCGAATTGCAGAATTCCCGTGAGTCATCGAATCTTTGAACG 288
Em -CAAAGGGCG-----CAATGTGCGTTCAAAGATTTCG-ATGATTCACTGAATTCTGCAATT 203
* * * * *          * * * * *

Fc CACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTATAACCACTC 319
Eg CACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTATAACCACTC 319
Fa CACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTATAACCACTC 309
Ef CACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTATAACCACTC 324
Fv CACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTATACCCCTC 348
Em CACATTAC---TTATCGCATTTC-----GC-TGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGA 254
*****          * * * * *

Fc AAGCTCA-CGCTTG--GTATTGG--GGTTCGCGGTTCCG-----CGGCCCT---AAAA 365
Eg AAGCTCT-CGCTTG--GTATTGG--GGTTCGCGGTTCCG-----CGGCCCT---AAAA 365
Fa AAGCTCT-CGCTTG--GTATTGG--GGTTCGCGGTTCCG-----CGGCCCT---AAAG 355
Ef AAGCTT-CGCTTG--GTATTGG--GGTTCGCGGTTCCG-----CGGCCCT---AAAA 370
Fv AAGCCCCGTGCTTG--GTGTTGGACGGATTTTGGTTCGTGTAACAACGGGCCCTCCTAAG 406
Em GATCCCGTTGTTGAAAGTTTAACTATTATATAGTACT-----CAGACATCACTAAA 307
* * * * *          * * * * *          PM2R

```

그림 4-70. ITS rDNA 염기서열 정렬을 통한 관리 대상균주 *P. malorum*의 종 특이적 마커 PMIF-PM2R의 유전상 위치.

제 5 절 주요 검역대상 식물 병원성 세균의 진단기법 및 진단용 표 준시료개발

1. 사과 Blister Spot 병원균 *Pseudomonas syringae* pv. *papulans*의 PCR 검출법

사과나무(*Malus domestica* Borkh.)는 국내 과수 중 생산량이 가장 많은 과수로, 국내의 전 과수 재배면적의 약 19%에 해당하는 31,167 ha를 차지하고 있으며, 생산량은 전 과실 생산량의 약 15%에 해당하는 379,541톤이 생산되고 있다. 사과는 국가별로 생산량을 보았을 때 중국, 미국, 터키, 이탈리아, 폴란드, 인도, 프랑스 등의 순으로 많이 생산되고 있는데(FAO, 2010), 이 중 미국, 이탈리아, 프랑스, 영국, 캐나다, 독일의 6개국에서 blister spot이 보고되었다(Rose, 1916; Lacey와 Dowson, 1931; Dhanvantari, 1977; Burr와 Hurwitz, 1979; Bazzi와 Calzolari, 1983; Kerkoud 등, 2000; Moltmann, 2000). 현재까지 국내에서는 이 병이 보고된 바 없으며 blister spot 병원균인 *Pseudomonas syringae* pv. *papulans*는 검역대상 병원균으로 지정되어 있다.

사과의 blister spot은 1916년 미국 미주리 주에서 처음 보고되었으며, 병원균은 *P. syringae* pv. *papulans*이다(Rose, 1916; Dhanvantari, 1977). 이 병의 병징은 사과 과실 표면에 작은 반점으로 나타나는데, 과실이 성숙해지면서 반점은 1-5 mm 크기의 갈색 돌기로 변한다(Burr, 1982; Bazzi와 Calzolari, 1983; Kerkoud 등, 2000; Vanneste와 Yu, 2006). 또한 병원균은 잎을 시들게 하고 잎 주맥에 괴사 증상을 유도한다(Bonn와 Bedford, 1986). 20개 이상의 사과 품종이 이 병원균에 대해 감수성으로 알려져 있으며, 주로 'Mutsu(睦奥)' 품종에서 큰 문제가 되고 있다(Burr와 Hurwitz, 1979, 1981; Burr, 1982). 병원균은 과실의 부패를 유발하진 않으나 2차 부생균의 감염으로 부패가 일어날 수 있으며, 특히 과실에서의 반점 형성은 사과의 외관 품질을 떨어뜨려 경제적인 손실을 유발할 수 있다(Burr, 1982; Ellis와 Madden, 2000).

우리나라는 사과를 주로 대만에서 수입하고 있으며 매년 국내의 사과 수입량은 점점 증가하는 추세이다(관세청, 2011). 국내에 아직 보고되지 않은 blister spot 병원균이 국내로 도입되는 것을 막기 위해서는 사과나무 묘목 및 과실 수입 시 이 병원균에 대한 빠르고 정확한 검역검사가 필수적이다. 특히 blister spot은 사과나무 잎에는 반점이 나타나지 않고 가지에도 궤양 증상을 일으키지 않는 것으로 보고되어(Burr, 1982), 사과나무 묘목을 수입 시 가지에서 병원균을 검출할 수 있는 검출법이 필요하다.

*P. syringae*는 50개 이상의 pathovar들을 포함하고 또한 DNA 상동성에 기반을 둔 genomospecies로 분류할 수 있다(Garden 등, 1999; Marques 등, 2008). Pathovar 또는 genomospecies에 속하는 *P. syringae*의 균주들을 동정하기 위해서 polymerase chain reaction (PCR)과 같은 방법이 많이 연구되어 왔다(Musa 등, 2001; Kerkoud 등, 2002; Koh와 Nou, 2002; Kong 등, 2004; Vanneste 등, 2009). PCR은 다양한 분야에서 빠르고 정확하게 미생물을 동정하고 검출하는 방법으로서 널리 이용되고 있고(Kerkoud 등, 2002), 특히 매우 유사한 균을 구별할 수 있는 효과적인 방법이다. 지금까지 *P. syringae* pv. *papulans*를 검출하기 위해 hrpL 유전자의 DNA 서열을 기반으로 제작한 프라이머가 보고되었다(Kerkoud 등, 2002). 그러나 이 프라이머는 *P. syringae* pv. *atrofaciens* ICMP 4394에서도 양성 반응

을 나타내는 것으로 보고되어 *P. syringae* pv. *papulans*에 대한 특이성이 제한적이다 (Vanneste 등, 2009). 또한 지금까지 pathovar 또는 genomospecies에 속하는 *P. syringae*의 균주들을 동정하기 위해 PCR 방법이 많이 연구되어 왔으나, 사과나무 blister spot 병원균인 *P. syringae* pv. *papulans*를 특이적으로 검출하는 PCR 방법은 많이 보고되지 않았다.

P. syringae pv. *papulans*의 특이적 프라이머를 제작하기 위해 기존에 보고된 *P. syringae* pv. *papulans*의 유전자 서열을 조사하였다. NCBI GenBank database(NCBI, National Center for Biotechnology Information, USA)에서 조사한 결과, *P. syringae* pv. *papulans*의 유전자는 AvrPto1, gyrB, hrpL, rpoB, rpoD 유전자가 알려져 있으며, 총 10개의 염기서열이 보고되었다. 이 유전자들은 몇몇의 *P. syringae* pathovar들도 가지고 있는 유전자들이므로, 이를 이용하여 *P. syringae* pv. *papulans*만을 검출하는 프라이머를 제작하기에는 어려움이 있었다. 최근 *P. syringae* pv. *tomato* DC3000과 *P. syringae* pv. *syringae* B728a의 게놈 염기서열을 분석하는 데 next generation sequencing(NGS, 차세대 염기서열 분석)이 사용되었다(Buell 등, 2003; Reinhardt 등, 2009; Farrer 등, 2009). NGS는 게놈 염기서열 분석 방법 중 하나로, 좀 더 넓은 범위의 DNA 염기서열 정보를 해독하는 데 유용하다는 장점이 있다(O'Brien 등, 2009). 본 연구에서는 *P. syringae* pv. *papulans*의 특이적 프라이머를 제작할 수 있는 염기서열을 얻기 위해 NGS를 의뢰하였다.

기존의 PCR 방법은 DNA의 정량적 검출에는 유용하지 않고, PCR을 수행한 후 gel 전기영동, UV visualization과 같은 증폭산물 분석이 필요하며 거짓양성(false positive)이 나타날 수 있다는 한계가 있다. 이와 달리, 실시간 PCR(Real-time PCR)은 타겟사이즈 DNA를 빠르고 정확하게 정량적인 검출이 가능하다(Gervasi와 Scortichini, 2009). 또한 식물 조직에서 병원균을 검출하는 데에도 유용하게 사용되고 있다(Palacio-Bielsa 등, 2009).

본 연구에서는 사과 및 사과나무 묘목의 수출입을 위한 검역에 사용할 수 있는 blister spot 병원균인 *P. syringae* pv. *papulans*를 효과적으로 검출할 수 있는 PCR과 TaqMan PCR 방법을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 수집

본 연구에서는 *P. syringae* pv. *papulans* 총 10균주를 수집하여 사용하였다. 각각 미국과 캐나다에서 분리한 균주들이며, 농림수산물검역검사본부의 수입금지품 수입허가 절차에 따라 4균주는 BCCM/LMG(The Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms /Collection of the Laboratorium voor Microbiologie en Microbiele Genetica, Belgium)에서, 나머지 6균주는 ICMP(International Collection of Micro-organisms from Plants, New Zealand)에서 분양을 받아 본 연구에 사용하였다(Table 5-1). 또한 비교균주로 *P. syringae* pathovar 30균주, 다른 종의 *Pseudomonas*속 4균주를 수집하였고, *Acidovorax*, *Clavibacter*, *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Ralstonia*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Xanthomonas*속에 속하는 대표적인 식물병원세균 16균주를 수집하여 사용하였다(Table 5-2). 모든 균주들은 Glycerol 15%를 첨가한 nutrient broth(NB; Laboratorios Conda, Spain) 배지에 현탁하여 -80°C 의 초저온 냉동고에 보관하였다.

Table 5-1. List of *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* strains used in this study

Strain	Number ^a	Host	Origin	Year ^c
<i>P. syringae</i> pv. <i>papulans</i>	ICMP 4041	Malus domestica	USA	nk
	ICMP 4045	Malus domestica	Canada	1974
	ICMP 4046	Malus domestica	Canada	1974
	ICMP 4047	Malus domestica	Canada	1973
	ICMP 4049	Malus domestica	USA	nk
	ICMP 4986	Malus domestica	USA	nk
	LMG 5076	Malus domestica	Canada	1973
	LMG 5077	Malus domestica	USA	nk
	LMG 5571b	Malus sylvestris	Canada	1968
	LMG 5670	Malus domestica	Canada	1968

a ICMP, International Collection of Micro-organisms from Plants, Landcare Research, New Zealand; LMG, Collection of the Laboratorium voor Microbiologie en Microbiele Genetica, Ghent University, Belgium.

b This strain was analyzed by NGS.

c nk, not known.

Table 5-2. List of *Pseudomonas syringae* pathovars, *Pseudomonas* spp. strains and other plant pathogenic bacterial strains used in this study

Strain	Number ^a	Host ^b	Origin ^b	Year ^b
<i>Acidovorax</i>				
<i>avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	NCPPB 1011	<i>Zea mays</i>	USA	1958
<i>Clavibacter</i>				
<i>michiganensis</i> subsp. <i>insidiosus</i>	NCPPB 1020	<i>Medicago sativa</i>	Canada	nk
subsp. <i>michiganensis</i>	NCPPB 1064	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Italy	1961
subsp. <i>sepedonicus</i>	NCPPB 2137	<i>Solanum tuberosum</i>	Canada	nk
<i>Erwinia</i>				
<i>amylovora</i>	CNUPBL 354	<i>Fragaria grandiflora</i>	Korea	2011
<i>pyrifoliae</i>	Ep 16	nk	Japan	nk
<i>Pectobacterium</i>				
<i>carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	NCPPB 312	<i>Solanum tuberosum</i>	Denmark	nk
<i>Pseudomonas</i>				
<i>coronafaciens</i>	ICMP 3113	<i>Avena sativa</i>	United Kingdom	1958
<i>savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	NCPPB 1134	<i>Glycine javanica</i>	Zimbabwe	1961
pv. <i>phaseolicola</i>	KACC 10575	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Poland	nk
pv. <i>savastanoi</i>	NCPPB 639	<i>Olea europaea</i>	Yugoslavia	nk
<i>syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	KACC 10582	<i>Actinidia chinensis</i>	Korea	1999
pv. <i>antirrhini</i>	ICMP 4303	<i>Antirrhinum majus</i>	United Kingdom	1965
pv. <i>aptata</i>	DSM 50252	<i>Beta vulgaris</i>	nk	nk
pv. <i>atrofaciens</i>	ICMP 4394	<i>Triticum aestivum</i>	New Zealand	1968
pv. <i>berberridis</i>	NCPPB 2724	<i>Berberis</i> sp.	New Zealand	1972
pv. <i>ciccaronei</i>	NCPPB 2355	<i>Ceratonia siliqua</i>	nk	1969
pv. <i>delphhunii</i>	ICMP 529	<i>Delphinium</i> sp.	New Zealand	1957
pv. <i>dysoxyli</i>	ICMP 545	<i>Dysoxylum spectabile</i>	New Zealand	1949
pv. <i>eriobotryae</i>	NCPPB 2331	<i>Eriobotrya japonica</i>	United Kingdom	1970
pv. <i>garcae</i>	ICMP 4323	<i>Coffea arabica</i>	Brazil	nk
pv. <i>helianthi</i>	NCPPB 1229	<i>Helianthus annuus</i>	Zambia	1962
pv. <i>japonica</i>	ICMP 6305	<i>Hordeum vulgare</i>	Japan	1951
pv. <i>lachrymans</i>	ATCC 11965	<i>Cucumis sativus</i>	nk	nk
pv. <i>lapsa</i>	ATCC 10859	<i>Triticum aestivum</i>	nk	1978

Table 5-2. (continued)

Strain	Number ^a	Host ^b	Origin ^b	Year ^b
<i>Pseudomonas</i>				
<i>syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	ICMP 3935	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis cauliflora</i>	New Zealand	1965
pv. <i>mellea</i>	ICMP 5711	<i>Nicotiana tabacum</i>	Japan	1968
pv. <i>mori</i>	ICMP 4331	<i>Morus alba</i>	Hungary	1958
pv. <i>morsprunorum</i>	ICMP 5795	<i>Prunus domestica</i>	nk	nk
pv. <i>myricae</i>	ICMP 7118	<i>Myrica rubra</i>	Japan	1978
pv. <i>panici</i>	NCPPB 1498	<i>Panicum</i> sp.	nk	nk
pv. <i>passiflorae</i>	NCPPB 1386	<i>Passiflora edulis</i>	New Zealand	1962
pv. <i>persicae</i>	NCPPB 2757	<i>Prunus persica</i>	France	1975
pv. <i>pisi</i>	ICMP 4433	<i>Pisum sativum</i>	Canada	1946
pv. <i>ribicola</i>	NCPPB 963	<i>Ribes aureum</i>	nk	nk
pv. <i>sesami</i>	NCPPB 1016	<i>Sesamum indicum</i>	Yugoslavia	nk
pv. <i>syringae</i>	NCPPB 388	<i>Oryza sativa</i>	Hungary	nk
pv. <i>tabaci</i>	ICMP 2835	<i>Nicotiana tabacum</i>	Hungary	1959
pv. <i>tagetis</i>	ICMP 4091	<i>Tagetes erecta</i>	Zimbabwe	1972
pv. <i>tomato</i>	NCPPB 2683	<i>Lycopersicon esculentum</i>	New Zealand	1972
pv. <i>ulmi</i>	NCPPB 632	<i>Ulmus</i> sp.	Yugoslavia	1958
<i>Ralstonia</i>				
<i>solanacearum</i>	NCPPB 339	<i>Solanum tuberosum</i>	Israel	nk
<i>Rhizobium</i>				
<i>radiobacter</i>	DSM 30205	<i>Malus</i> sp.	nk	1972
<i>rhizogenens</i>	ATCC 11325	<i>Malus domestica</i>	nk	nk
<i>rubi</i>	NCPPB 1854	<i>Rubus ursinus</i> var. <i>loganobaccus</i>	USA	1942
<i>vitis</i>	NCPPB 3554	<i>Vitis vinifera</i>	Australia	1977
<i>Rhodococcus</i>				
<i>fascians</i>	LMG 3601	<i>Lilium speciosum</i> cv. <i>Rubrum</i>	Belgium	nk
<i>Xanthomonas</i>				
<i>axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	KCTC 2856	nk	Japan	nk
<i>campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	KACC 11157	<i>Capsicum annuum</i>	Korea	1999
<i>oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	KACC 10331	<i>Oryza sativa</i>	Korea	nk

a ATCC, American Type Culture Collection, USA; CFBP, French Collection of Plant associated bacteria, France; CNUPBL, Chungbuk National University Plant Bacteriology and molecular genetics Lab., Rep. of Korea; DSM, DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Germany; ICMP, International Collection of Micro-organisms from Plants, Landcare Research, New Zealand; KACC, Korean Agricultural Culture Collection, Rural Development Administration, Rep. of Korea; KCTC, Korean Collection for Type Culture, Rep. of Korea; LMG, Collection of the Laboratorium voor Microbiologie en Microbiële Genetica, Ghent University, Belgium; NCPPB, National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, United Kingdom.

b nk, not known.

Next Generation Sequencing (NGS) 분석

P. syringae pv. *papulans*는 NCBI GenBank database에 알려져 있는 유전자 서열 정보가 많지 않으며, 또한 알려진 유전자들이 다른 *P. syringae* pathovar들도 가지고 있는 유전자들이기 때문에 이를 이용하여 *P. syringae* pv. *papulans*만을 검출하는 프라이머를 제작하기에는 어려움이 있었다. 따라서 *P. syringae* pv. *papulans*를 검출하는 특이적인 프라이머를 제작하기 위해 솔젠트(SolGent Co., Korea)에 의뢰하여 NGS를 이용한 *P. syringae* pv. *papulans* LMG 5571의 draft genome sequencing을 분석하였다.

프라이머 및 TaqMan probe 제작

P. syringae pv. *papulans*를 검출하는 특이적인 프라이머를 제작하기 위해 NGS를 통해 얻은 *P. syringae* pv. *papulans* LMG 5571의 contig들과 ORF들을 각각 NCBI에서 BLASTN하여 알려진 유전자들과의 상동성이 80% 이하이고 길이가 600 bp 이상인 ORF를 선발하고, 선발된 ORF 내부서열에서 Primer3(v. 0.4.0) 프로그램으로 PCR 프라이머들을 제작하였다. 제작된 프라이머들의 증폭서열을 NCBI에서 BLASTN을 통해 알려진 유전자와의 상동성을 다시 확인하였고, 이 중 *P. syringae* pv. *papulans*에 대한 특이성이 확인된 프라이머를 최종 선발하였다.

P. syringae pv. *papulans*에 대한 특이성이 확인된 프라이머의 PCR 증폭산물 내부서열을 이용하여 Primer3(v. 0.4.0) 프로그램으로 100-150 bp 크기의 DNA가 증폭되도록 nested 프라이머들을 제작하였다. 제작된 nested 프라이머들은 NCBI에서 BLASTN을 통해 알려진 유전자와의 상동성을 다시 확인하여 최종 선발하였다.

P. syringae pv. *papulans*에 대한 nested 프라이머의 특이성을 확인한 후 nested 프라이머의 증폭서열 내부의 염기서열에서 GC의 비율을 고려하고, NCBI BLASTN을 통해 *P. syringae* pv. *papulans*에 대해 가장 특이적인 20 bp의 염기서열을 선택하였다. 선택된 서열의 5말단에는 형광물질로 FAM을 붙이고, 3말단에는 quencher 물질로 TAMRA를 붙여 TaqMan probe를 제작하였다. 실험에 사용한 모든 프라이머 및 probe는 바이오니아(Bioneer Co., Korea)와 네오프로브(NeoProbe Co., Korea)에 의뢰하여 합성하였다.

PCR 조건 및 TaqMan PCR 조건

PCR 조건은 95°C에서 5분간 initial denaturation 과정을 거친 후 총 35회로, 95°C에서 30초(denaturation), 58°C에서 30초(annealing), 72°C에서 30초(extension)의 과정을 거쳐 final extension으로 72°C에서 10분간 수행하였다. PCR은 Takara Ex Taq PCR Kit(Takara Co., Japan)와 프라이머(10 pM/μl), 그리고 1 μl의 template DNA를 사용하여 최종 반응액의 부피를 25 μl로 조정하였다. PCR 기기는 T Gradient Thermal Cycler(Biometra Co., Germany)를 이용하여 수행하였다. 모든 PCR 증폭산물은 2 μl씩 사용하여 2.0% agarose gel에 90 V로 90분간 전기영동하여 결과를 확인하였다.

TaqMan PCR 조건은 95°C에서 30초간 initial denaturation 과정을 거친 후 총 40회로 95°C에서 5초(denaturation), 58°C에서 20초간(annealing/extension) 과정을 거쳤다. TaqMan PCR은 Premix Ex Taq (probe qPCR) Kit(Takara Co., Japan)와 nested 프라이머(10 pM/μl) 1 μl, Pap-taqman probe(10 pM/μl) 1 μl, 그리고 2 μl의 template DNA를 사용하여 최종 반응액의 부피를 25 μl로 조정하였다. TaqMan PCR은 Smart Cycler™

system(Takara Co., Japan) 기기를 이용하여 수행하였다.

사과나무 가지 추출액 조제

본 연구에서는 사과나무 묘목이 수입되어 들어오는 경우를 고려해 세균 현탁액에 침지한 사과나무 가지 추출액의 DNA를 사용하여 PCR을 수행한 후 병원균이 검출되는지를 확인하고자 하였다. 가지 적용법은 기존에 보고된 Loreti 등(2008)의 방법을 수정하여 적용하였다. 사과나무(cv. Huji, 8년생)의 가지를 5 cm 정도로 자른 다음(약 3.5~4.5 g), 95% ethanol에 소독하였다. 사과나무 가지를 인공접종하기 위해 *P. syringae* pv. *papulans* LMG 5571을 27°C에서 48시간 NA 배지에 배양하였고, 배양액을 분광광도계로 OD600에서 0.1(108 cfu/ml)을 맞추어 이를 10배 희석법으로 101 cfu/ml까지 희석하여 현탁액을 준비하였다. 50 ml centrifuge tube에 자른 가지를 각각 넣고 준비된 현탁액을 밀도별로 35 ml씩 넣어 150 rpm으로 2시간 동안 진탕배양하였다. 그런 다음 클린벤치에서 가지를 꺼내어 filter paper로 물기를 제거한 후 5분간 건조시킨 다음 20°C에서 7일간 습식처리하였다. 습식처리한 가지의 양쪽 부분 1 cm 정도를 표피부분은 제거하고 목질부가 나올 때까지 얇게 벗겨내어 벗겨낸 조직들(약 0.2-0.5 g)을 0.85% saline buffer 4 ml에 섞어 200 rpm에서 5분간 진탕배양하였다. 거즈로 필터링 후 완성된 추출액은 12000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 GeneAll Exgene™ Cell SV mini Kit(GeneAll Biotechnology Co., Korea)로 DNA를 분리하여 PCR을 수행하였다. DNA는 PCR 수행 시 1 µl, TaqMan PCR 수행 시 2 µl를 사용하였고, PCR 증폭산물은 2 µl를 사용하여 2.0% agarose gel에 90 V로 90분간 전기영동하여 결과를 확인하였다.

결과

Pseudomonas syringae pv. *papulans*의 특이적 프라이머 선발

프라이머를 제작하기 위해 NGS를 통해 *P. syringae* pv. *papulans* LMG 5571의 draft genome sequence를 분석하였다. 총 1299개의 contig를 얻었으며, 이 중 BLAST Hit가 가능한 ORF는 총 5704개였다. 각각의 ORF들을 BLASTN한 결과, 알려져 있는 유전자 정보와의 상동성이 80% 이하인 ORF들로 만들어진 프라이머 세트의 수는 총 14개였다(Table 5-3). 이 중 PCR 수행을 통해 contig 291번(6813 bp) 내부에 존재하는 ORF 3420번(948 bp)의 염기서열로 PCR 프라이머 Pap-F와 Pap-R를 선발하였다. ORF 3420번의 염기서열로 BLASTN한 결과, *Nakamurella multipartita* DSM 44233의 complete genome과 41 bp가 일치하는 것으로 나타났다. *N. multipartita*는 하수정화용 진흙(activated sludge)에서 분리된 그람양성 세균으로 1996년 일본에서 Yoshimi 등이 분리한 균으로 알려져 있다(Yoshimi 등, 1996; Tao 등, 2004). 프라이머 Pap-F/Pap-R의 증폭서열(483 bp)의 BLASTN 결과 역시 *N. multipartita* DSM 44233의 complete genome과 41 bp가 일치하는 것으로 나타났다.

Table 5-3. List of primers used in this study

Primers	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
Pap	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
Pap01	TGGTCAATCATCTGGTCTCG	ATCGAGCAGCGACAGGTAGT
Pap02	CTGAAGATCGGTGTGGTCAG	TCTGTTCGATCAGCTTGTGG
Pap03	GAAGTGCGTGAACTGTTGGA	GTGTTCTGTTGTCGCGATGT
Pap04	CGCAAGGTCGATGTAGAACC	TCTTCGACGAGCTTGAAGTG
Pap05	TGATCCACTACCCGTTTCGAT	CACGCTCTGGTTTTTTCAGGT
Pap06	GGCCCTTAATTTTCGAAGAGC	ATCAACAAGCGGCTCTTTTC
Pap07	TCGAGCCTTTTCTCTTCAA	CAAACGGTCCATCAACTGTG
Pap08	AATCCAGCGAGGAGAAAAGC	TGACGACCGACCACATAGAA
Pap09	CCATGACCTGGAAAGAGGAC	AACATCGATCCGGTCATTTC
Pap10	GTTGCGATCAGCACTTTTCA	ACCTGAACCTCGCATTCAAC
Pap-ne	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
Pap04-1-ne	TATCCGCCGTCATTTTCTC	CATCACCTTCGGTCAGCAC
Pap04-2-ne	ACCCAGGCTGAATATCATCG	GAGAAAATGACGGCGGATA

제작된 PCR 프라이머의 특이성을 확인하기 위해 *P. syringae* pv. *papulans* 10균주와 다른 *Pseudomonas*속 34균주, 그리고 대표 식물병원세균 16균주의 DNA를 분리하여 PCR을 수행하였다. *P. syringae* pv. *papulans* 10균주의 DNA와 PCR 프라이머를 사용하여 PCR을 수행한 결과, *P. syringae* pv. *papulans* 10균주의 DNA로부터 모두 483 bp로 증폭된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5-1). 또한 *P. syringae* pv. *papulans* 이외의 다른 *Pseudomonas*속 34균주와 대표 식물병원세균 16균주의 DNA에서는 동일한 타겟사이즈가 증폭되지 않는 것을 확인하였다(Fig. 5-2, 5-3).

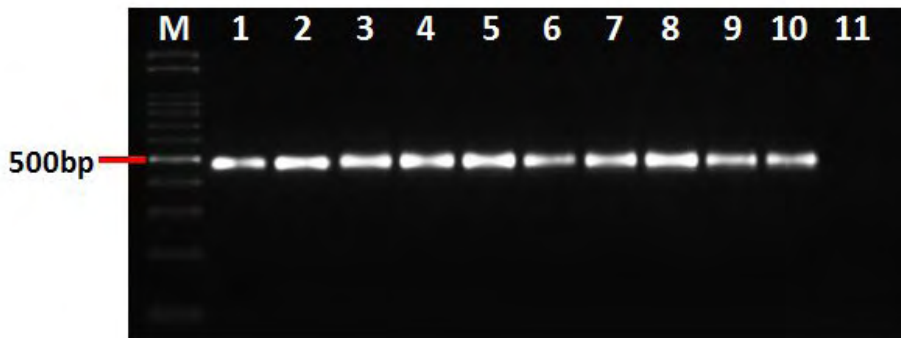


Fig. 5-1. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Pap-F/Pap-R and bacterial DNA of *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* strains. Lanes 1-10, *P. syringae* pv. *papulans* ICMP 4041, ICMP 4045, ICMP 4046, ICMP 4047, ICMP 4049, ICMP 4986, LMG 5076, LMG 5077, LMG 5571, LMG 5670; lane 11, water as a negative control.

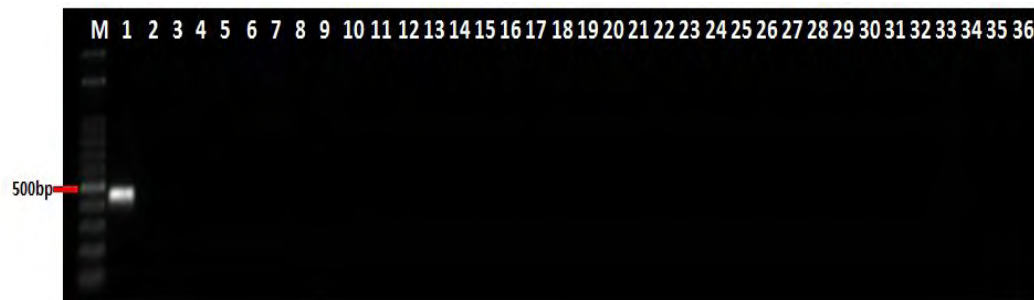


Fig. 5-2. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Pap-F/Pap-R and total DNA of *Pseudomonas syringae* pathovars and *Pseudomonas* spp. Lane 2, *P. coronafaciens* ICMP 3113; lanes 4-5, *P. savastanoi* pvs. *glycinea* NCPPB 1134, *phaseolicola* KACC 10575, *savastanoi* NCPPB 639; lanes 6-35, *P. syringae* pvs. *actinidiae* KACC 10582, *antirrhini* ICMP 4303, *aptata* DSM 50252, *atrofaciens* ICMP 4394, *berberidis* NCPPB 2724, *ciccaronei* NCPPB 2355, *delphinii* ICMP 529, *dysoxyli* ICMP 545, *eriototryae* NCPPB 2331, *garcae* ICMP 4323, *helianthi* NCPPB 1229, *japonica* ICMP 6305, *lachrymans* ATCC 11965, *lapsa* ATCC 10859, *maculicola* ICMP 3935, *mellea* ICMP 5711, *mori* ICMP 4331, *morsprunorum* ICMP 5795, *myricae* ICMP 7118, *panici* NCPPB 1498, *passiflorae* NCPPB 1386, *persicae* NCPPB 2757, *pisi* ICMP 4433, *ribicola* NCPPB 963, *sesami* NCPPB 1016, *syringae* NCPPB 388, *tabaci* ICMP 2835, *tagetis* ICMP 4091, *tomato* NCPPB 2683, *ulmi* NCPPB 632; lane 1, *P. syringae* pv. *papulans* LMG 5571 as a positive control; lane 36, water as negative control.

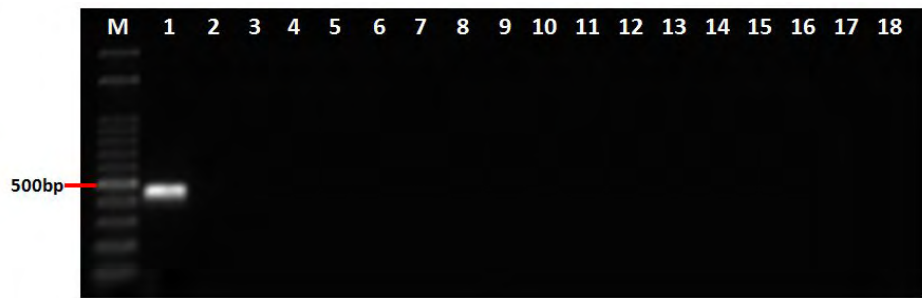


Fig. 5-3. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Pap-F/Pap-R and total DNA of plant pathogenic bacteria. Lane 2, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* NCPPB 1011; lanes 4-5, *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* NCPPB 1020, *michiganensis* NCPPB 1064, *sepedonicus* NCPPB 2137; lanes 6-7, *Erwinia amylovora* CNUPBL 354, *E. pyrifoliae* Ep 16; lane 8, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* NCPPB 312; lane 9, *Ralstonia solanacearum* NCPPB 339; lanes 10-13, *Rhizobium radiobacter* DSM 30205, *R. rhizogenens* ATCC 11325, *R. rubi* NCPPB 1854, *R. vitis* NCPPB 3554; lane 14, *Rhodococcus fascians* LMG 3601; lanes 15-17, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* KCTC 2856, *X. campestris* pv. *vesicatoria* KACC 11157, *X. oryzae* pv. *oryzae* KACC 10331; lane 1, *P. syringae* pv. *papulans* LMG 5571 as a positive control; lane 18, water as a negative control.

PCR 프라이머 Pap-F/Pap-R에 의해 *P. syringae* pv. *papulans*로부터 증폭되는 내부서열에서 제작된 nested 프라이머 Pap-ne-F와 Pap-ne-R의 특이성을 확인하기 위해 이전 PCR 조건과 동일하게 PCR을 수행하였다. 모든 *P. syringae* pv. *papulans* 10균주로부터 예상했던 142 bp의 DNA가 증폭되었다(Fig. 5-4). 다른 *Pseudomonas*속 34균주와 대표 식물병원세균 16균주의 DNA로부터는 예상한 크기의 DNA가 증폭되지 않았다(Figs. 5-5, 5-6). 따라서 nested 프라이머 Pap-ne-F/Pap-ne-R은 대상균주인 *P. syringae* pv. *papulans*에 대한 특이성이 있음을 확인하였다.

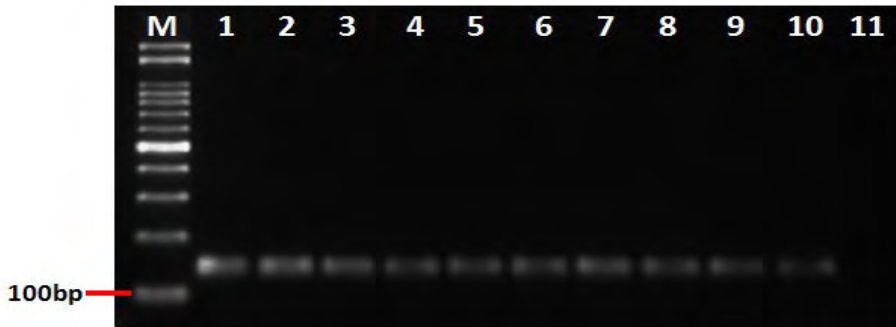


Fig. 5-4. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Pap-ne-F/Pap-ne-R and bacterial DNA of *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* strains. Lanes 1-10, *P. syringae* pv. *papulans* ICMP 4041, ICMP 4045, ICMP 4046, ICMP 4047, ICMP 4049, ICMP 4986, LMG 5076, LMG 5077, LMG 5571, LMG 5670; lane 11, water as a negative control.

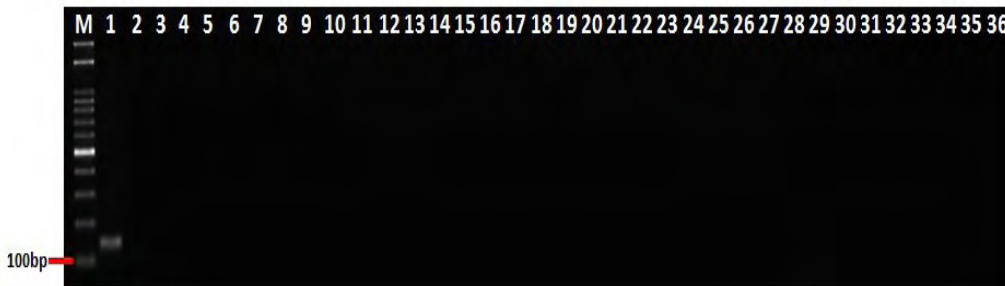


Fig. 5-5. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Pap-ne-F/Pap-ne-R and total DNA of *Pseudomonas syringae* pathovars and *Pseudomonas* spp. Lane 2, *P. coronafaciens* ICMP 3113; lanes 4-5, *P. savastanoi* pvs. *glycinea* NCPPB 1134, *phaseolicola* KACC 10575, *savastanoi* NCPPB 639; lanes 6-35, *P. syringae* pvs. *actinidiae* KACC 10582, *antirrhini* ICMP 4303, *aptata* DSM 50252, *atrofaciens* ICMP 4394, *berberidis* NCPPB 2724, *ciccaronei* NCPPB 2355, *delphinii* ICMP 529, *dysoxylis* ICMP 545, *eriobotryae* NCPPB 2331, *garcae* ICMP 4323, *helianthi* NCPPB 1229, *japonica* ICMP 6305, *lachrymans* ATCC 11965, *lapsa* ATCC 10859, *maculicola* ICMP 3935, *mellea* ICMP 5711, *mori* ICMP 4331, *morsprunorum* ICMP 5795, *myricae* ICMP 7118, *panici* NCPPB 1498, *passiflorae* NCPPB 1386, *persicae* NCPPB 2757, *pisi* ICMP 4433, *ribicola* NCPPB 963, *sesami* NCPPB 1016, *syringae*

NCPPB 388, *tabaci* ICMP 2835, *tagetis* ICMP 4091, *tomato* NCPPB 2683, *ulmi* NCPPB 632; lane 1, *P. syringae* pv. *papulans* LMG 5571 as a positive control; lane 36, water as negative control.

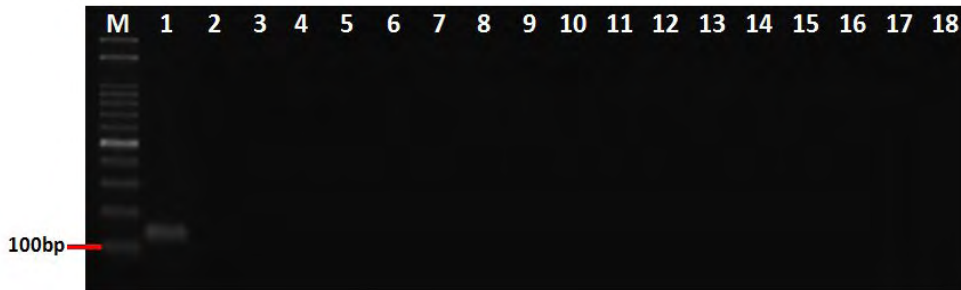


Fig. 5-6. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Pap-ne-F/Pap-ne-R and total DNA of plant pathogenic bacteria. Lane 2, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* NCPPB 1011; lanes 4-5, *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* NCPPB 1020, *michiganensis* NCPPB 1064, *sepedonicus* NCPPB 2137; lanes 6-7, *Erwinia amylovora* CNUPBL 354, *E. pyrifoliae* Ep 16; lane 8, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* NCPPB 312; lane 9, *Ralstonia solanacearum* NCPPB 339; lanes 10-13, *Rhizobium radiobacter* DSM 30205, *R. rhizogenens* ATCC 11325, *R. rubi* NCPPB 1854, *R. vitis* NCPPB 3554; lane 14, *Rhodococcus fascians* LMG 3601; lanes 15-17, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* KCTC 2856, *X. campestris* pv. *vesicatoria* KACC 11157, *X. oryzae* pv. *oryzae* KACC 10331; lane 1, *P. syringae* pv. *papulans* LMG 5571 as a positive control; lane 18, water as a negative control.

Pseudomonas syringae pv. *papulans*의 TaqMan PCR 방법 개발

P. syringae pv. *papulans*를 빠르고 정확하게 검출하기 위해서 실시간 PCR 방법 중 가장 민감한 검출법 중 하나인 TaqMan PCR을 수행하였다. 프라이머는 타겟사이즈가 142 bp 인 nested 프라이머 Pap-ne-F/Pap-ne-R를 사용하였다. TaqMan PCR의 검출 민감도를 확인하기 위해서 *P. syringae* pv. *papulans* LMG 5571의 DNA 양을 10 ng부터 10배씩 희석하여 1 pg까지 PCR을 수행한 결과 1 pg까지 검출이 가능하였고, Ct 값을 이용하여 정량값을 환산하였을 때에 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg DNA의 Ct 값은 각각 20.5, 23.8, 27.0, 31.2, 35.2로, $r^2=0.996$ 으로써 *P. syringae* pv. *papulans*의 정량적 검출에 적합한 것으로 확인되었다(Fig. 5-7).

P. syringae pv. *papulans* DNA의 정량적 검출이 가능함을 확인한 Pap-taqman probe와 nested 프라이머 Pap-ne-F/Pap-ne-R을 이용하여 TaqMan PCR의 특이성을 확인하였다. *P. syringae* pv. *papulans* LMG 5571의 10 ng부터 1 pg까지의 Ct 값을 Standard 값으로 사용하였고 나머지 *P. syringae* pv. *papulans* 9균주의 10 ng DNA로 TaqMan PCR을 수행한 결과, *P. syringae* pv. *papulans* LMG 5571의 10 ng DNA와 1 ng DNA의 Ct 값이 각각 20.6과 24.1이었는데, 다른 9균주의 DNA 모두 그 사이에서 Ct 값이 나타나는 것을 확인할 수 있었다(Table 5-4).

비교균주로 *Pseudomonas*속 34균주와 대표 식물병원세균 16균주의 10 ng DNA를 사용하여 Pap-taqman probe와 nested 프라이머의 TaqMan PCR에서의 특이성을 확인하였다. *P. syringae* pv. *papulans* LMG 5571의 10 ng DNA의 Ct 값은 20.7이었으며 다른 *Pseudomonas*속 균주들과 대표 식물병원세균들의 10 ng DNA Ct 값은 모두 30 이상에서 나타났다(Fig. 5-8, Table 5-5). 또한 이는 *P. syringae* pv. *papulans* LMG 5571의 1 pg DNA의 Ct 값인 33.3보다도 높은 수치를 보였다. DNA가 10 ng이면 가장 높은 농도의 DNA이므로 매우 높은 농도의 DNA에서도 *P. syringae* pv. *papulans*와 다른 병원세균들과의 구별은 30-35 cycles 범위 내에서 가능하였다.

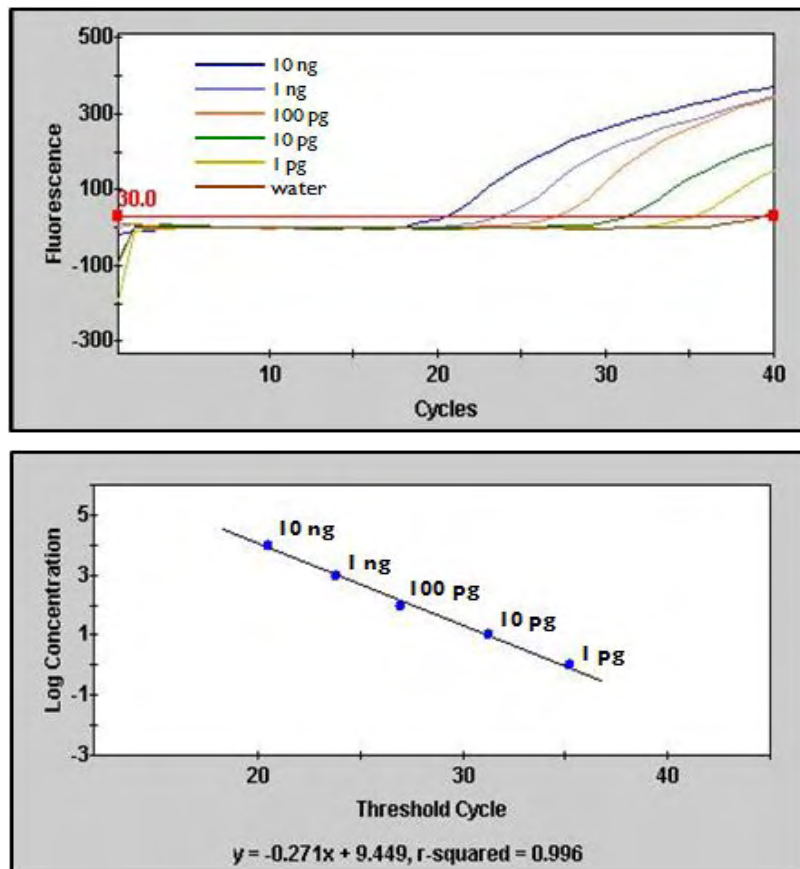


Fig. 5-7. Linear regression generated by ten-fold dilution of DNA of *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* LMG 5571 and the threshold cycle values as detected by the TaqMan PCR assays with primer Pap-ne-F/ Pap-ne-R and Pap-taqman probe. (A), Real-time amplification curve and (B), the linear regression curve.

Table 5-4. The Ct values of strains of *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* obtained by the TaqMan PCR assays

Samples	DNA Conc.	Ct ^a
<i>P. syringae</i> pv. <i>papulans</i> LMG 5571 (STD)	10 ng	20.6
<i>P. syringae</i> pv. <i>papulans</i> LMG 5571 (STD)	1 ng	24.1
<i>P. syringae</i> pv. <i>papulans</i> LMG 5571 (STD)	100 pg	27.6
<i>P. syringae</i> pv. <i>papulans</i> LMG 5571 (STD)	10 pg	30.9
<i>P. syringae</i> pv. <i>papulans</i> LMG 5571 (STD)	1 pg	35.1
<i>P. syringae</i> pv. <i>papulans</i> ICMP 4041	10 ng	20.8
<i>P. syringae</i> pv. <i>papulans</i> ICMP 4045	10 ng	20.9
<i>P. syringae</i> pv. <i>papulans</i> ICMP 4046	10 ng	21.1
<i>P. syringae</i> pv. <i>papulans</i> ICMP 4047	10 ng	19.5
<i>P. syringae</i> pv. <i>papulans</i> ICMP 4049	10 ng	21.1
<i>P. syringae</i> pv. <i>papulans</i> ICMP 4986	10 ng	19.6
<i>P. syringae</i> pv. <i>papulans</i> LMG 5076	10 ng	21.2
<i>P. syringae</i> pv. <i>papulans</i> LMG 5077	10 ng	23.4
<i>P. syringae</i> pv. <i>papulans</i> LMG 5670	10 ng	20.9
water	-	nd

a nd, not detected.

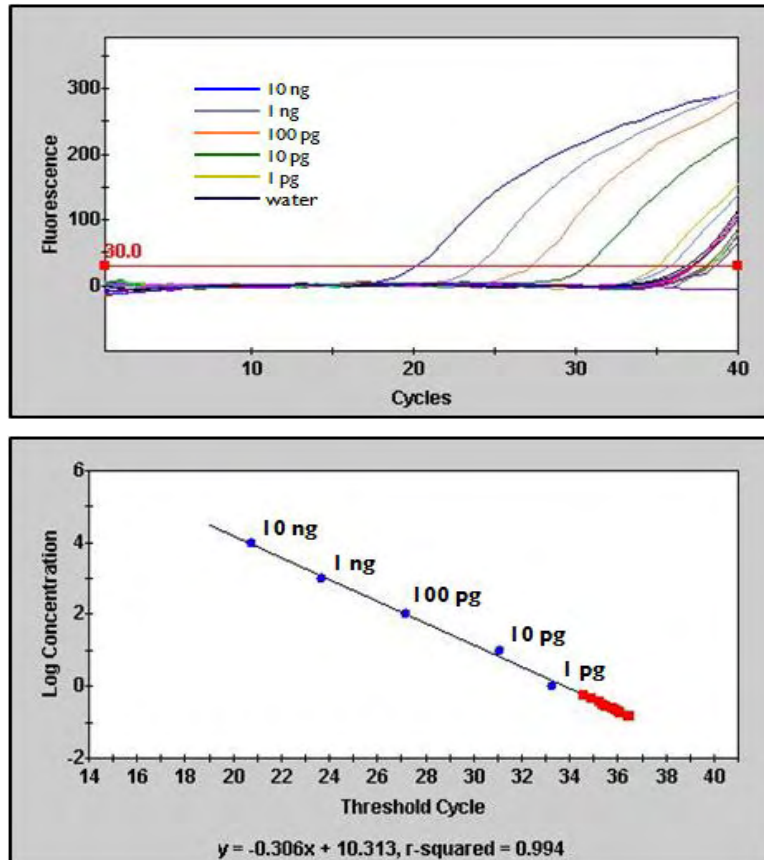


Fig. 5-8. Results of the TaqMan PCR assays which were carried out with primers Pap-ne-F/Pap-ne-R, Pap-taqman probe and DNA of the non-target bacteria. (A), Real-time amplification curve and (B), the linear regression curve of standard DNAs (blue dot) and the threshold cycle values of *Pseudomonas* spp. and other plant pathogenic bacterial strains (red dot).

Table 5-5. The Ct values of *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* LMG 5571, the non-target strains of *Pseudomonas* spp. and the plant pathogenic bacteria which were obtained by the TaqMan PCR assays

Sample	DNA Conc.	Ct
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>papulans</i> LMG 5571 (STD)	10 ng	20.7
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>papulans</i> LMG 5571 (STD)	1 ng	23.7
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>papulans</i> LMG 5571 (STD)	100 pg	27.2
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>papulans</i> LMG 5571 (STD)	10 pg	30.6
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>papulans</i> LMG 5571 (STD)	1 pg	33.3
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	10 ng	37.5
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>insidiosus</i>	10 ng	38.2
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	10 ng	37.2
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	10 ng	37.5
<i>Erwinia amylovora</i>	10 ng	36.3
<i>Erwinia pyrifoliae</i>	10 ng	37.0
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	10 ng	35.5
<i>Pseudomonas coronafaciens</i>	10 ng	36.3
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycenea</i>	10 ng	36.2
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	10 ng	35.9
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	10 ng	37.7
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	10 ng	35.5
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>antirrhini</i>	10 ng	34.6
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i>	10 ng	36.5
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	10 ng	35.9
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>berberidis</i>	10 ng	36.1
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>ciccaronei</i>	10 ng	34.9
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>delphhinii</i>	10 ng	36.5
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>dysoxylis</i>	10 ng	35.4
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>eriobotryae</i>	10 ng	36.0
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>	10 ng	35.8
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>helianthi</i>	10 ng	38.0

Table 5-5. (continued)

Sample	DNA Conc.	Ct ^a
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>japonica</i>	10 ng	37.3
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	10 ng	38.1
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lapsa</i>	10 ng	35.8
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	10 ng	38.3
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mellea</i>	10 ng	37.2
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mori</i>	10 ng	36.8
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i>	10 ng	38.2
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>myricae</i>	10 ng	38.5
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>panici</i>	10 ng	nd
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>passiflorae</i>	10 ng	37.2
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>persicae</i>	10 ng	37.9
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lisi</i>	10 ng	35.0
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>ribicola</i>	10 ng	36.5
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>sesami</i>	10 ng	37.0
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	10 ng	37.1
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	10 ng	35.3
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tagetis</i>	10 ng	37.0
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	10 ng	36.5
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>ulmi</i>	10 ng	36.8
<i>Rhizobium radiobacter</i>	10 ng	36.8
<i>Rhizobium rhizogenens</i>	10 ng	38.4
<i>Rhizobium rubi</i>	10 ng	36.8
<i>Rhizobium vitis</i>	10 ng	37.8
<i>Rhodococcus fascians</i>	10 ng	35.4
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	10 ng	36.9
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	10 ng	36.8
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	10 ng	37.0
water	-	nd

a nd, not detected.

인공접종한 사과나무 가지 추출액을 이용한 *Pseudomonas syringae* pv. *papulans*의 PCR 검출

인공접종한 사과나무의 가지에서 추출액을 얻어 DNA를 분리한 후 PCR을 수행하여 *P. syringae* pv. *papulans*의 검출여부를 확인하였다. PCR 프라이머 Pap-F/Pap-R을 사용하여 PCR을 수행한 결과, 무처리구에서는 검출되지 않았으며 처리구에서는 인공접종 밀도 $10^8 \sim 10^1$ cfu/ml의 처리구까지 검출이 가능하였다(Fig. 5-9).

동일한 추출액 DNA의 정량성을 확인하고자 TaqMan PCR을 수행하였다. Nested 프

라이머 Pap-ne-F/Pap-ne-R과 Pap-taqman probe를 사용하여 TaqMan PCR을 수행한 결과, 무처리구에서는 Ct 값이 나타나지 않아 검출되지 않았으며 처리구에서는 인공접종 밀도 108~101 cfu/ml의 추출액 DNA의 Ct 값의 범위가 19.9~24.9로 검출이 가능하였다(Fig. 5-10, Table 5-6).

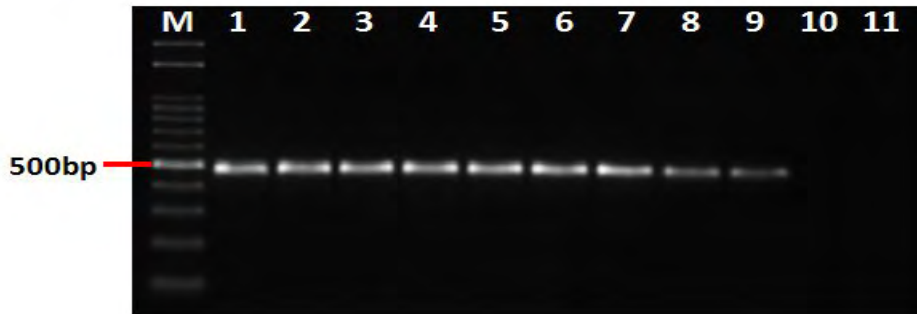


Fig. 5-9. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Pap-ne-F/Pap-ne-R and twig extracts of artificially inoculated apple twigs with *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* LMG 5571. Extracts of twigs inoculated with cell suspension, lanes 2-9, 108 cfu/ml, 107 cfu/ml, 106 cfu/ml, 105 cfu/ml, 104 cfu/ml, 103 cfu/ml, 102 cfu/ml, 101 cfu/ml; lane 10, extract of twig with water treatment; lane 1, *P. syringae* pv. *papulans* LMG 5571 as a positive control; lane 12, water as a negative control.

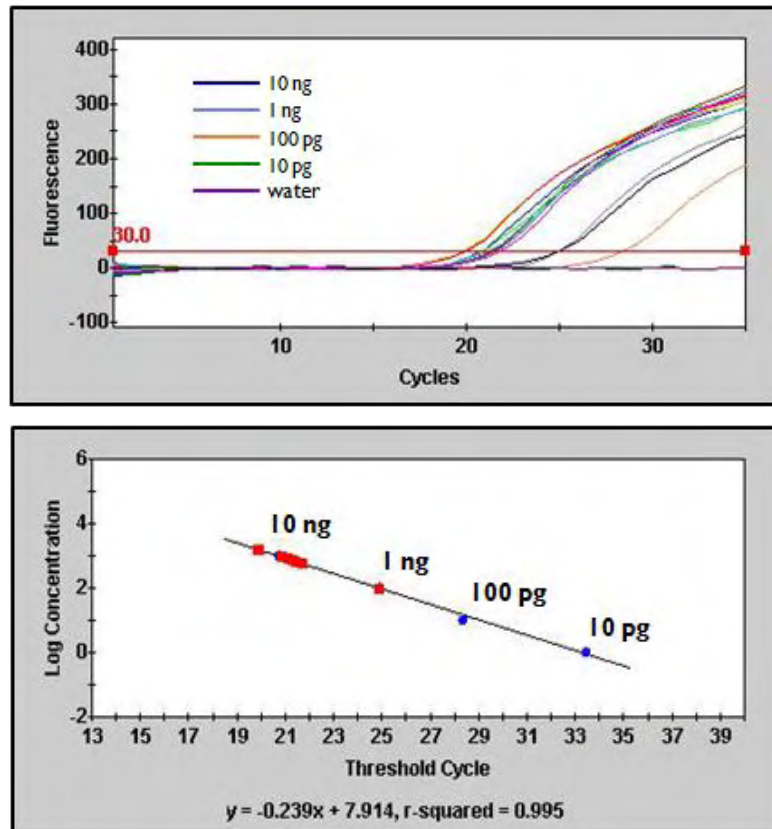


Fig. 5-10. Results of the TaqMan PCR assays which were carried out with primers Pap-ne-F/Pap-ne-R, Pap-taqman probe and twig extracts of artificially inoculated

apple twigs with *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* LMG 5571. (A), Real-time amplification curve and (B), the linear regression curve of standard DNAs (blue dot) and the threshold cycle values of twig extracts (red dot).

Table 5-6. The Ct values of twig extracts of artificially inoculated apple twigs with *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* LMG 5571 obtained by the TaqMan PCR assays

Samples	DNA Conc.	Ct ^a
<i>P. syringae</i> pv. <i>papulans</i> LMG 5571 (STD)	10 ng	20.7
<i>P. syringae</i> pv. <i>papulans</i> LMG 5571 (STD)	1 ng	24.9
<i>P. syringae</i> pv. <i>papulans</i> LMG 5571 (STD)	100 pg	28.4
<i>P. syringae</i> pv. <i>papulans</i> LMG 5571 (STD)	10 pg	33.5
twig extract artificially inoculated 10 ⁸ cfu/ml	-	19.9
twig extract artificially inoculated 10 ⁷ cfu/ml	-	21.3
twig extract artificially inoculated 10 ⁶ cfu/ml	-	20.0
twig extract artificially inoculated 10 ⁵ cfu/ml	-	20.9
twig extract artificially inoculated 10 ⁴ cfu/ml	-	21.1
twig extract artificially inoculated 10 ³ cfu/ml	-	21.5
twig extract artificially inoculated 10 ² cfu/ml	-	21.7
twig extract artificially inoculated 10 ¹ cfu/ml	-	24.9
twig extract with water treatment (control)	-	nd
water	-	nd

a nd, not detected.

고 찰

본 연구에서는 사과 Blister spot을 일으키는 식물검역대상균인 *P. syringae* pv. *papulans*의 효과적인 PCR 검출법을 개발하고, 인공접종한 사과나무 묘목의 가치를 이용하여 식물검역을 위한 적용가능성을 확인하였다. 지금까지 *P. syringae* pv. *papulans*를 검출하기 위한 다양한 검출법들이 연구되어 왔으나(Burr와 Katz, 1982; Jones 등, 1991; Kerkoud 등, 2002), *P. syringae*의 많은 pathovar 중 하나인 *P. syringae* pv. *papulans*만을 정확하게 검출할 수 있는 PCR 방법은 아직까지 보고되지 않았다. 본 연구의 초기에 기존에 보고된 방법의 유효성을 검증하기 위하여 Kerkoud 등(2002)에 의해 제작된 hrpL 유전자의 DNA 서열을 기반으로 한 프라이머 Pap1/Pap2와 *Pseudomonas*속 34균주의 DNA를 사용하여 PCR을 수행한 결과, *P. syringae* pv. *japonica* ICMP 6305 DNA에서 타겟사이즈와 동일한 크기의 DNA 242 bp가 증폭되었으며, *P. syringae* pv. *maculicola* ICMP 3935를 제외하고 사용한 다른 모든 *Pseudomonas*속 균주에서 동일한 크기의 DNA가 약하게 증폭되는 것을 확인하였다. 따라서 Kerkoud 등(2002)의 PCR 프라이머 및 PCR 방법은 *P. syringae* pv. *papulans*를 특이적으로 검출하는 데 문제가 있었다.

식물에 병을 일으키는 *Pseudomonas*속에는 많은 종이 있으며, 그 중에서도 *P. syringae*는 분류학적으로 종으로 구별되지 않지만 기주가 다른 50개 이상의 pathovar를 가지

고 있다(Garden 등, 1999; Marques 등, 2008). 따라서 상대적으로 *P. syringae* pathovar 균주 간 전체 게놈 염기서열 사이에는 큰 차이가 없을 것으로 예상된다. 본 연구에서 목표하는 *P. syringae* pv. *papulans*의 특이적 PCR 검출법에 필요한 프라이머를 얻기 위해서는 다른 *Pseudomonas*속 균주와 *P. syringae* pathovar의 염기서열과는 구별되는 *P. syringae* pv. *papulans*의 특이적 염기서열이 필요하다. *P. syringae* pv. *papulans*는 다른 식물병원균 *P. syringae* pathovar에 비해 많은 연구가 이루어지지 않은 그룹이며, NCBI GenBank database에 보고된 유전자 서열 정보도 많지 않다. *P. syringae* pv. *papulans*의 특이적 프라이머를 제작을 위한 유전자 염기서열 정보를 얻기 위해 NGS를 통해 *P. syringae* pv. *papulans* LMG 5571의 draft genome sequence를 분석하였다. 이를 통해 총 1299개의 contig와 5704개의 ORF를 얻었으며, 각각의 ORF들을 BLASTN을 통해 후보 프라이머를 제작하고, PCR를 통해 제작한 프라이머의 *P. syringae* pv. *papulans*에 대한 특이성을 확인하여 ORF 3420의 내부서열로 PCR 프라이머 Pap-F와 Pap-R을 선발하였다. 그리고 프라이머 Pap-F/Pap-R의 증폭산물 내부서열을 이용하여 nested 프라이머 Pap-ne-F와 Pap-ne-R를 얻었다. 이들 프라이머를 얻은 ORF 3420을 NCBI GenBank database에서 BLASTN했을 때 의미있는 상동성을 보인 유전자는 없었다. 가장 높은 상동성을 보인 염기서열은 *Nakamurella multipartita* DSM 44233의 게놈 염기서열로, 41 bp가 서로 일치하였다. 따라서 본 연구에서 제작한 프라이머 Pap-F/Pap-R와 Pap-ne-F/Pap-ne-R는 *P. syringae* pv. *papulans*에 높은 특이성을 유지할 것으로 기대된다.

PCR 방법 중 실시간 PCR(Real-time PCR)은 PCR 산물의 gel 전기영동 단계를 생략할 수 있어 PCR 결과를 빠르게 알 수 있을 뿐만 아니라 목표하는 대상을 정량적으로 검출할 수 있는 우수한 방법이다. TaqMan PCR은 PCR 증폭산물의 내부에 probe를 붙여서 그 부위가 정확하게 증폭되어야만 증폭신호가 나타나며, PCR 방법의 문제점 중 하나인 거짓양성을 줄이는 장점이 있다(Gervasi와 Scortichini, 2009). 본 연구에서는 nested 프라이머 Pap-ne-F/Pap-ne-R의 증폭산물 내부서열에서 *P. syringae* pv. *papulans*에 가장 특이적인 20 bp의 염기서열을 선택하여 Pap-taqman probe를 제작하였고, TaqMan PCR을 수행하였다. TaqMan PCR은 대상 DNA의 농도의존적인 증폭을 보였으며($r^2=0.996$), 검출대상인 *P. syringae* pv. *papulans*의 모든 사용균주는 검출 양성 범위의 Ct값을 주었고, 목표하지 않은 세균은 모두 검출음성 범위의 Ct값을 주어, 본 연구에서 개발한 TaqMan PCR 방법이 *P. syringae* pv. *papulans*의 검출에 사용할 수 있음을 보여주었다.

P. syringae pv. *papulans* LMG 5571을 10^8 cfu/ml부터 10배 희석법으로 희석하여 세균 현탁액을 이용한 direct PCR을 수행한 결과, 10^8 부터 10^6 cfu/ml까지 검출이 가능하였다. 마찬가지로 TaqMan PCR을 수행한 결과, 10^8 부터 10^6 cfu/ml까지 양성 범위의 Ct 값을 나타내었다. 이 결과는 감염된 사과나무 묘목 및 과실에서 분리한 조직에서 세균의 밀도가 10^6 cfu/ml 이상 분포되어있을 때 direct PCR과 TaqMan PCR 방법으로 검출이 가능하다는 것을 보여주었다.

사과나무 가지에서 대상세균의 검출 여부를 확인하기 위해 기존에 보고된 Maes 등 (1996)의 방법을 수정하여 사과나무(cv. Fuji) 가지에 *P. syringae* pv. *papulans* LMG 5571을 인공접종하여 추출액을 얻고 DNA를 분리한 후 PCR을 수행한 결과, 인공접종 밀도가 10^8 부터 10^1 cfu/ml까지인 추출액의 DNA 모두 검출이 가능하였다. TaqMan PCR을 수행한 결과, 인공접종 밀도가 10^8 부터 10^1 cfu/ml까지의 추출액 DNA 모두 대상균주의 10 ng부터 1 ng까

지의 DNA Ct 값의 범위 내에서 증폭되었다. 이 결과는 본 연구에서 개발한 PCR과 TaqMan PCR 방법을 사과나무 가지로부터 *P. syringae* pv. *papulans*를 검출하는데 적용할 수 있음을 보여준 결과이다.

본 연구에서 제작된 프라이머들과 개발된 PCR 방법들은 사과의 blister spot을 일으키는 식물검역대상균인 *P. syringae* pv. *papulans*를 빠르고 정확하게 검출 및 동정하는 데 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

2. 귀리의 Halo Blight 병원균 *Pseudomonas coronafaciens*의 PCR 검출법

귀리(*Avena sativa* L.)는 세계에서 여덟번째로 생산량이 많은 곡류로서 주로 러시아, 캐나다, 미국북부, 폴란드 등에서 많이 재배되고 세계 총 생산량은 1,962만톤에 달한다(FAO, 2010). 우리나라는 1960년대에 강원도와 북한 지방에서 1,192 ha가 재배되었으나 현재는 재배면적이 많지 않다. 하지만 최근 국내에서는 보리 수매가 감소하고 있으며 이를 대체할 수 있는 고소득 작목으로 귀리가 주목받고 있다. 통계자료를 분석해보았을 때 귀리는 2007년부터 5년간 약 3882톤이 호주, 캐나다, 미국 등에서 꾸준히 수입되고 있다.

Halo blight 병은 비교적 낮은 온도의 습한 지역에서 주로 발생하며, 발병이 적합한 환경조건에서 귀리 생산량에 막대한 손실을 일으킨다(Martens 등, 1984). 이 병은 귀리의 잎에 주로 발생하며, 병징은 줄기와 잎집 등에서도 발견된다. 병 발생 초기에는 둥근 반점이 생기고, 병이 진전되면서 점차 병반이 합쳐지고 갈색으로 변하며, 낮은 온도와 습한 환경에서는 식물을 고사시킨다(Martens 등, 1984; Harder와 Haber, 1992; Wallwork, 1992). 전 세계적으로 귀리의 Halo blight 병은 호주와 미국, 캐나다, 멕시코, 영국 등에서 발생하여 경제적인 손실을 발생시켰다.

Halo blight 병의 병원균인 *Pseudomonas coronafaciens*는 그람음성세균으로서 1920년 Elliott에 의해서 최초로 분리되어 *Bacterium coronafaciens*로 보고되었으며, 그 이후 Schaad와 Cunfer(1979)에 의해 *P. coronafaciens*로 재명명되었다(syn. *P. syringae* pv. *coronafaciens* (Elliott 1920; Young 등, 1978). 이 병원균은 식물체의 잔해나, 토양 또는 종자에 남아 다른 식물로 병을 전파시키며(Martens 등, 1984), 이 병의 방제를 위해서는 환경조건을 조절하는 것 뿐만 아니라 병원균이 없는 무병종자를 이용하는 것이 매우 중요하다(Collins, 2010). 이 병원균은 우리나라에서 보고되지 않았으며, 현재 식물검역의 대상병원균으로 관리되고 있다(농림수산검역검사본부, 2012). 우리나라에서 귀리는 대부분 종자로 수입되고 있는데, 종자로부터 *P. coronafaciens*의 효과적인 검출법이 보고되어 있지 않다.

Walcott(2003)는 종자전염 병원균을 종자에서 검출하고자 할 때 선택배지를 이용하는 방법과 효소항체검정법(ELISA), seedling grow-out, PCR, real-time PCR, DNA chip(microarray) 방법 등 여러 가지 방법들을 제시하고 있다. 이 방법들 중에서 선택배지를 사용한 검출방법과 감염된 종자를 재배하여 관찰하는 seedling grow-out 방법은 많은 시간과 노력이 필요하며, 효소항체를 이용한 ELISA는 거짓양성반응 때문에 검출 정확도가 낮아지는 단점이 있다. 그러나 PCR방법은 ELISA보다 검출 민감도가 최소 100배 이상 높으며, 검출시간을 절약할 수 있다는 장점이 있다(조 등, 2010). 또한 real-time PCR은 일반 PCR보다 시간을 더 단축시킬 수 있으며, 민감도와 정확성을 높일 수 있는 방법 중에 하나이다. 특히 TaqMan PCR은 probe를 제작하여 증폭하는 염기서열의 특이성을 높이고, 정량적으로 검출이

가능한 장점을 가진 매우 우수한 방법이다(Bella 등, 2008). 또한 DNA chip을 제작하여 병원균을 검출하는 microarray도 정확성을 높이는 방법 중에 하나이다(Walcott, 2003).

*P. coronafaciens*의 효과적인 검출을 위한 연구는 많지 않으며, *P. coronafaciens*와 관련된 논문은 대부분이 *Pseudomonas* 속 또는 *P. syringae* pathovar 수준의 특징을 구분하여 분류체계를 확립하고자 한 논문이다(Batra와 Willis, 2005; Parkinson 등, 2011). *P. coronafaciens*는 *P. syringae* pathovar 균주들이 백화 증상을 유도하는 독소 중에 하나인 tabtoxin을 가지고 있는 것으로 보고하였다(Lydon와 Patterson, 2001; Bender, 1999). 이들 연구에서 사용된 PCR방법은 독소 유전자를 확인하고자 한 연구였으며, 이 연구에서 개발된 프라이머는 *P. coronafaciens* 이외에 *P. syringae*에 속하는 다른 균주도 검출하였다.

Pseudomonas 속과 *P. syringae* pathovar 수준의 분류체계는 아직도 연구가 많이 되고 있으며, 이 그룹에 속한 많은 균주들이 다시 분류되기도 한다(Gardan 등, 1999; Barta와 Willis, 2005; Marques 등, 2008). 그만큼 균주 간의 차이가 미묘하며 동일한 유전자를 가지고 있는 경우가 많기 때문에 *P. coronafaciens*를 특이적으로 검출하기 위해서는 일반적으로 *Pseudomonas* 속과 *P. syringae* pathovar에 속하는 다른 균주들이 가지고 있지 않은 아주 특이적인 유전자 정보를 이용해 PCR방법을 개발해야 한다. 하지만 *P. coronafaciens*에서 염기서열이 밝혀져 유전자은행에 등록된 유전자는 *gyrB*와 *rpoD*뿐으로 현재까지 밝혀진 유전자와 염기서열이 많지 않기 때문에 *P. coronafaciens* 특이적 프라이머 제작에 필요한 정보는 매우 부족하다. DNA 염기서열 정보의 해독을 위해 개발된 차세대 염기서열 분석(NGS, Next Generation Sequencing)방법은 2004년 인간게놈프로젝트(Human Genome project, HGP)의 종결 선언 이후 개발되었으며, 대용량 염기서열 정보를 이전 방법들에 비해 훨씬 신속하고 저렴한 비용으로 분석할 수 있게 되었다(Margulies 등, 2005). 따라서 본 연구에서는 *P. coronafaciens*를 구분할 수 있는 특이적 프라이머 개발을 위해서 *P. coronafaciens*의 NGS 분석을 수행하였다.

본 연구에서는 국내로 수입되는 귀리 종자로부터 대상병원세균의 신속하고 정확한 PCR검출법을 개발하고자 하였다. *P. coronafaciens*만을 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머를 개발하여 프라이머의 특이성을 확인하였다. 또한, DNA 추출 없이 종자로부터 얻은 추출액을 바로 *P. coronafaciens*의 검출에 사용하여 시간과 비용을 절약할 수 있는 방법을 확립하였다.

재료 및 방법

균주 수집

본 연구에는 총 13균주의 *P. coronafaciens*를 사용하였고, 이 균주들은 캐나다, 일본, 영국, 짐바브웨, 케냐, 독일, 뉴질랜드 7개의 나라로부터 분리된 균주로서 이 중에서 11균주는 농림수산검역검사본부의 금지품국가수입허가 절차를 거쳐 LMG(Belgian Co-ordinated Collection of Micro-organism, Gent, Belgium, BCCM)에서 분양받았다. 나머지 2균주는 농촌진흥청의 농업유전자원센터 미생물은행(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)에서 분양 받아 연구에 사용하였다(Table 5-7). 또한 대표적인 식물병원세균에 속하는 그람 음성균인 *Acidovorax*, *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Xanthomona*속의 13균주와 그람 양성균인 *Clavibacter*속 3균주 그리고 *P. syringae* pathovar 30균주, *P.*

savastanoi pathovar 3균주를 수집하여 본 연구에 사용하였다(Table 5-8). 사용된 모든 균주들은 Nutrient Broth(NB; Laboratorios conda, Spain)배지에 글리세롤 15%를 첨가한 용액에 현탁하여 -70℃에 보관하며 사용하였다.

Table 5-7. Strains of *Pseudomonas coronafaciens* used in this study

Strain ^a	Host	Origin	Year
KACC 12133	unknown	unknown	unknown
KACC 13262	unknown	unknown	unknown
LMG 2170	<i>Bromus</i> sp.	Canada	1962
LMG 5030	<i>Lolium multiflorum</i>	Japan	1967
LMG 5060 ^b	<i>Avena sativa</i>	United Kingdom	1958
LMG 5061	<i>Secale cereale</i>	Canada	1962
LMG 5081	<i>Avena sativa</i>	Zimbabwe	1971
LMG 5380	<i>Avena sativa</i>	Kenya	1970
LMG 5449	<i>Avena sativa</i>	Germany	1959
LMG 5452	<i>Avena sativa</i>	New Zealand	1969
LMG 5536	<i>Avena sativa</i>	United Kingdom	1965
LMG 13190	<i>Avena sativa</i>	unknown	unknown
LMG 2330	unknown	unknown	1966

a KACC, Korean Agricultural Culture Collection; LMG, Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms(BCCM).

b This strains was used for genome sequencing by NGS.

Table 5–8. List of *Pseudomonas syringae* pathovars, *Pseudomonas savastanoi* pathovars and other plant–pathogenic bacterial strains used in this study

Strain	Number ^a	Host	Origin ^b	Year ^b
<i>P. syringae</i> pathovars				
pv. <i>actinidiae</i>	KACC 10582	<i>Actinidiachinensis</i>	Korea	1999
pv. <i>antirrhini</i>	ICMP 4303	<i>Antirrhinummajus</i>	UK	1965
pv. <i>aptata</i>	DSM 50252	<i>Beta vulgaris</i>	nk	nk
pv. <i>atrofaciens</i>	ICMP 4394	<i>Triticum aestivum</i>	New Zealand	1968
pv. <i>berberidis</i>	NCPBP 2724	<i>Berberis</i> sp.	New Zealand	1972
pv. <i>ciccaronei</i>	NCPBP 2355	<i>Ceratonia siliqua</i>	nk	1969
pv. <i>delphinii</i>	ICMP 529	<i>Delphinium</i> sp.	New Zealand	1957
pv. <i>dysoxylis</i>	ICMP 545	<i>Dysoxylum spectabile</i>	New Zealand	1949
pv. <i>eriobotryae</i>	NCPBP 2331	<i>Eriobotrya japonica</i>	UK	1970
pv. <i>helianthi</i>	NCPBP 1229	<i>Helianthus annuus</i>	Zambia	1962
pv. <i>japonica</i>	ICMP 6305	<i>Hordeum vulgare</i>	Japan	1951
pv. <i>lachrymans</i>	ATCC 11965	<i>Cucumis sativus</i>	nk	nk
pv. <i>lapsa</i>	ATCC 10859	<i>Triticum aestivum</i>	nk	1978
pv. <i>maculicola</i>	ICMP 3935	<i>Brassicaoleracea</i> var. <i>botrytiscauliflora</i>	New Zealand	1965
pv. <i>mellea</i>	ICMP 5711	<i>Nicotiana tabacum</i>	Japan	1968
pv. <i>mori</i>	ICMP 4331	<i>Morus alba</i>	Hungary	1958
pv. <i>morsprunorum</i>	ICMP 5795	<i>Prunus domestica</i>	nk	nk
pv. <i>myricae</i>	ICMP 7118	<i>Myrica rubra</i>	Japan	1978
pv. <i>panici</i>	NCPBP 1498	<i>Panicum</i> sp.	nk	nk
pv. <i>papulans</i>	ICMP 4040	<i>Malus domestica</i>	USA	nk
pv. <i>passiflorae</i>	NCPBP 1386	<i>Passiflora edulis</i>	New Zealand	1962
pv. <i>persicae</i>	NCPBP 2761	<i>Prunus persica</i>	France	1975
pv. <i>pisi</i>	ICMP 4433	<i>Pisum sativum</i>	Canada	1946
pv. <i>ribicola</i>	NCPBP 963	<i>Ribes aureum</i>	nk	nk
pv. <i>sesami</i>	NCPBP 1016	<i>Sesamum indicum</i>	Yugoslavia	nk
pv. <i>syringae</i>	NCPBP 388	<i>Oryza sativa</i>	Hungary	nk
pv. <i>tabaci</i>	ICMP 2835	<i>Nicotiana tabacum</i>	Hungary	1959
pv. <i>tagetis</i>	ICMP 4091	<i>Tagetes erecta</i>	Zimbabwe	1972
pv. <i>tomato</i>	NCPBP 2683	<i>Lycopersicon esculentum</i>	New Zealand	1972
pv. <i>ulmi</i>	NCPBP 632	<i>Ulmus</i> sp.	Yugoslavia	1958
<i>P. savastanoi</i> pathovars				
pv. <i>glycinea</i>	NCPBP 1134	<i>Glycine javanica</i>	Zimbabwe	1961
pv. <i>phaseolicola</i>	KACC 10575	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Poland	nk
pv. <i>savastanoi</i>	NCPBP 639	<i>Olea europaea</i>	Yugoslavia	nk

Table 5-8. Continued

Strain	Number ^a	Host	Origin ^b	Year ^b
<i>Acidovorax</i>				
<i>avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	NCPPB 1011	<i>Zea mays</i>	USA	1958
<i>Clavibacter</i> spp.				
<i>michiganensis</i> subsp. <i>insidiosus</i>	NCPPB 1020	<i>Medicago sativa</i>	Canada	nk
<i>michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	NCPPB 1064	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Italy	1961
<i>michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	NCPPB 2137	<i>Solanum tuberosum</i>	Canada	nk
<i>Erwinia</i>				
<i>amylovora</i>	CNUPBL 354	<i>Fragaria grandiflora</i>	Korea	2011
<i>pyrifoliae</i>	Ep16	nk	Japan	nk
<i>Pectobacterium</i>				
<i>carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	NCPPB 312	<i>Solanum tuberosum</i>	Denmark	nk
<i>Ralstonia</i>				
<i>solanacearum</i>	NCPPB 339	<i>Solanum tuberosum</i>	Israel	nk
<i>Rhizobium</i>				
<i>radiobacter</i>	DSM 30205	<i>Malus</i> sp.	nk	1972
<i>rhizogenes</i>	ATCC 11325	<i>Malus domestica</i>	nk	nk
<i>rubi</i>	NCPPB 1854	<i>Rubus ursinus</i> var. <i>loganobaccus</i>	USA	1942
<i>vitis</i>	NCPPB 3554	<i>Vitis vinifera</i>	Australia	1977
<i>Rhodococcus</i>				
<i>fascians</i>	LMG 3601	<i>Lillium speciosum</i> cv. <i>Rubrum</i>	Belgium	nk
<i>Xanthomonas</i>				
<i>campestris</i> pv. <i>campestris</i>	KACC 10377	nk	Japan	nk
<i>campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	KACC 11157	<i>Capsicum annuum</i>	Korea	1999
<i>oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	KACC 10331	<i>Oryza sativa</i>	Korea	nk

a ATCC, American Type Culture Collection; CNUPBL, Chungbuk National University Plant Bacteriology Laboratory; DSM, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ); ICMP, International Collection of Microorganisms from Plant; KACC, Korean Agricultural Culture Collection; LMG, Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms(BCCM); NCPPB, National Collection of Plant Pathogenic Bacteria.

b nk : Not known.

NGS(Next Generation Sequencing) 분석

대상병원균을 특이적으로 검출하는 PCR 프라이머 제작을 위한 염기서열 정보를 얻고자, NGS를 실시하여 대상균주의 게놈 전체염기서열(draft- genome sequence)을 얻었다. NGS 분석은 *P. coronafaciens* LMG 5060을 사용하였으며, 솔젠트(SolGent co., Korea)에 의뢰하여 실시하였다. 솔젠트의 생물정보팀이 실시한 NGS에 의해 얻어진 *P. coronafaciens* LMG 5060 게놈 염기서열 단편은 contig로 모아지고, 각 contig에서 ORF는 Prodigal, Glimmer,

GeneMark의 3가지 프로그램을 이용하여 정리하였다. 이 외에도 GO(Gene Ontology), COG(Category of Gene ontology)의 각각의 방법으로 단백질을 분류하였고, RNAmmer와 tRNAscan-SE, Pfam으로 ORF의 단백질 서열과 기존에 알려진 서열들을 비교하였다.

PCR 프라이머 및 TaqMan probe 제작

대상병원균을 검출할 수 있는 특이적인 프라이머를 제작하기 위하여 NGS 분석을 통해 얻은 contig와 ORF의 정보를 이용하여 PCR 프라이머를 디자인할 대상 ORF를 선정하였다. contig안의 ORF는 길이가 600 bp 이상인 것을 선별하였고, 선별된 ORF의 염기서열을 미국 국립생물정보센터 (National Center for Biotechnology Information, NCBI)의 유전자은행에 있는 염기서열과 BLASTN 분석을 통해 유전자은행에 있는 식물병원세균 또는 다른 일반 세균의 유전자와 비교하여 homology가 낮은 ORF만을 선정하였다. 이렇게 얻은 ORF의 염기서열로부터 Primer3Plus 프로그램을 이용하여 PCR 프라이머를 디자인하였고, 얻어진 프라이머 염기서열을 다시 NCBI 유전자은행에서 BLASTN 분석으로 유사한 염기서열이 없음을 확인한 후 프라이머를 제작하였다.

PCR을 통해 *P. coronafaciens*의 특이성이 확인된 프라이머의 PCR 증폭산물 내부 염기서열로부터 nested 프라이머를 디자인하였다. Nested 프라이머의 디자인은 PCR 프라이머 디자인에 사용한 Primer3Plus 프로그램을 사용하였으며, 선정된 프라이머 염기서열은 NCBI 유전자은행에서 BLASTN 분석을 통해 그 특이성을 확인한 후 프라이머를 제작하였다.

실시간 PCR을 이용한 검출법을 개발하기 위하여 nested 프라이머 증폭서열 내부의 염기서열로부터 TaqMan probe를 제작하였다. PCR을 통해 특이성이 확인된 nested 프라이머를 선별한 뒤, 이 nested 프라이머에 의해 증폭된 증폭산물의 내부 염기서열에서 GC 비율이 40-60%가 되는 20개의 염기서열을 선정하였다. 선정된 probe 염기서열을 NCBI 유전자은행에서 BLASTN을 통해 염기서열의 특이성을 확인하였다. Probe의 3말단에는 quencher로 TAMRA를 붙이고 5말단에는 FAM을 형광물질로 붙여 TaqMan probe를 제작하였다. 본 연구에서 사용된 모든 프라이머의 합성은 솔젠트(SolGent co., Korea)에 의뢰하였다.

PCR 조건

PCR을 실시하기 위하여 제작된 forward와 reverse 프라이머의 농도를 10 pM/μl로 조정하였고, 분리된 genomic DNA는 10 ng/ml로 조정하여 실험에 사용하였다. PCR 반응은 준비된 프라이머 2 μl, 주형 DNA 1 μl와 Takara Ex-Taq PCR kit(Takara Co., Japan)를 사용하여 최종 반응액을 25 μl로 하였다. PCR 조건은 95°C에서 10분간 초기 denaturation 과정을 거친 후, 95°C에서 30초(denaturation), 60°C에서 30초(annealing), 72°C에서 30초(extension)간의 반응을 35회 실시하였고, 최종 extension 과정으로 72°C에서 7분간 반응시켰다. PCR은 Thermal Cycler Dice TP600(Takara Co., Japan)을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 증폭산물은 2.0% agarose gel에 90 V로 90분간 전기영동하여 결과를 확인하였다. PCR 프라이머 증폭산물의 내부서열로 제작된 nested PCR 프라이머의 특이성 확인은 PCR 프라이머를 이용한 PCR 수행 방법과 동일하게 실시하였다.

TaqMan PCR은 제작된 TaqMan probe를 10 pM/μl로 희석하였고, genomic DNA 10 ng/ml을 준비하여 실시하였다. TaqMan PCR을 수행을 위하여 nested 프라이머(forward와 reverse 프라이머 혼합) 1 μl(10 pM/μl)와 TaqMan probe 1 μl(10 pM/μl)를 사용하였고, 주

형 DNA 2 μ l와 Premix Ex Taq(Probe qPCR) kit(Takara Co., Japan)를 사용하여 최종 반응액을 25 μ l로 조정하였다. TaqMan PCR 조건은 95°C에서 30초간 initial denaturation 과정을 거친 후, 95°C에서 5초(denaturation), 60°C에서 20초(annealing/ extension)간의 반응을 40회 실시하였다. PCR은 Smart Cycler™ system (Takara Co., Japan)을 이용하여 수행하였다.

종자로부터 검출

본 연구에서 개발한 PCR방법의 귀리 종자로부터 *P. coronafaciens*의 검출에 적용가능성을 확인하기 위하여 귀리 종자에 *P. coronafaciens*를 인공 접종하고, 이 종자로부터 종자 추출액을 조제하여 PCR 반응에 사용하였다. 귀리종자에 접종하기 위해 *P. coronafaciens* LMG 5060을 NA 배지에 26~28°C에서 약 48시간 배양한 뒤, 배양한 *P. coronafaciens*를 멸균수에 현탁하였다. 분광광도계(Hitachi, U-2800A, Japan)를 이용하여 세균 밀도를 1.0×10^8 cfu/ml로 조정하였고, 10배 희석법으로 1.0×10^0 cfu/ml까지 희석하여 현탁액을 준비하였다. 귀리종자는 삼한품종을 이용하였으며, 종자 12 g을 준비된 세균 현탁액 45 ml에 넣고 24시간 동안 상온에서 120 rpm으로 진탕 배양하였다. 세균 현탁액에서 꺼낸 종자는 클린벤치에서 20시간 이상 건조시켰다. 종자로부터 추출액을 얻는 방법은 Maes 등(1996)이 기술한 방법을 참고로 하여 실시하였다. 건조된 종자 12 g에 saline buffer(0.85% NaCl)에 tween 20 한방울의 1/10을 첨가한 용액 12 ml에 담가 5 분간 200 rpm으로 진탕배양하였다. 진탕배양 후 얻은 종자 추출액은 95°C에서 7분간 열처리 후, PCR에 사용하였다.

Direct PCR 조건은 DNA를 이용한 PCR과 동일한 방법과 조건으로 수행하였다. 종자 추출액은 일반 PCR 수행시 3 μ l, TaqMan PCR 수행시 2 μ l를 사용하여 *P. coronafaciens* 검출을 위한 PCR을 실시하였다.

결과

*Pseudomonas coronafaciens*의 특이적 프라이머 선발

*P. coronafaciens*를 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머를 개발하기 위해 NGS 결과를 분석하였다. NGS를 통해 *P. coronafaciens* LMG 5060 DNA로부터 총 2028개의 contig를 얻었으며 각 ORF의 상동성 검색을 통해 36개의 프라이머를 제작하였다(Table 5-9). 이들 프라이머를 가지고 PCR 수행을 하여 *P. coronafaciens*에 특이성이 있는 contig 7번의 7번째 ORF로부터 제작한 Pc-12-F/Pc-12-R를 최종 프라이머로 선택하였다. 최종 선발된 Pc-12-F/Pc-12-R 프라이머를 얻은 7번 contig의 7번 ORF의 염기서열을 NCBI 유전자은행에서 BLASTN을 한 결과, 이 염기서열과 의미있는 유사한 염기서열을 가진 유전자는 없었다. 따라서 이 ORF는 지금까지 알려진 식물병원세균을 포함한 다른 생물체의 유전자의 염기서열과는 다른 것으로 판단한다.

Pc-12-F/Pc-12-R의 *P. coronafaciens*에 대한 특이성을 확인하고자 각 7개의 국가에서 분리된 *P. coronafaciens* 13균주의 DNA를 분리하여 PCR을 수행하였다. PCR 결과를 통해 *P. coronafaciens* 13균주에서 모두 500 bp 분자량 마커와 유사한 크기의 DNA가 증폭되었다(Fig. 5-11). Pc-12-F/ Pc-12-R로 증폭되는 예상 DNA 크기가 498 bp이므로 이 증폭

DNA가 Pc-12-F/Pc-12-R에 의해 증폭된 DNA로 판단된다. Negative control로 사용한 물에서는 어떤 DNA 밴드도 증폭되지 않았다.

Table 5-9. Primers used in this study

Primer	Forward(5'-3')	Reverse(5'-3')
Pc-01	GCTGTTCCAGGACTTCTACA	TCATAATCAGCCAGTTCGTT
Pc-02	GGGAGACGTCGAGAAATACT	AGCTGTTTGCCGAGGTAG
Pc-03	CGAAGGTGTCAGTTGTGACT	GGCACAAAATTGTTGTCTA
Pc-04-512	AGCCTGCTTTACAGCCTTGA	TCGGAAAAGTCCGTGGATAC
Pc-04-480	TCTGAAAACACCTGGAAAGC	GTCCGTGGATACACTCTTGC
Pc-04-432	TCTGCCGGTAATCGCTACCT	TTCGACTTGACCGCTCTGAA
Pc-04	GCGTTACTTGAGTGCTGTTT	TAACCTGTACCCTAGCACCA
Pc-05	GTGACCCGAGTACAACCTGA	CCTTGCACCTGCATAATTCTC
Pc-06-578	ATATCTGGCATTACGGGATT	ATTCCGAGTTTTTGGATGAT
Pc-07-542	ATCAGAACGGGTGGTAGAAT	AAGCCAAAATCTTTCAAACC
Pc-08-488	TGCAAATGAATCGACAGAAA	ATAATGCGATTTTCAGCTTCG
Pc-09-451	ACGCTGATCCTCAATTCCAC	CGGTCAACCAATCCGATAAG
Pc-10-448	GATGCCCTACTGGCTGGATA	GTAGGTGTCCGGGTCACACT
Pc-11-403	CAGAACTGGATCATGCTGCT	ACACACTGAAGGCAGCAAAG
Pc-12	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
Pc-14-407	GCAACCGATGTTCCATTACC	AGAGGAAGGGGATGATGCTT
Pc-14-448	AGAGACTGGCTATTCGATGG	GTAACGGATGAACGTTGTGA
Pc-15-422	GGCAGAGTGGAGTAGCTTTC	CCTCAGTTTCCGTATGTTCC
Pc-16-453	AGTCGTTCGATGCAGTGAGTG	CGCCGAGAGAGAATTTTCAG
Pc-17-403	CAGATCACCGCTGTTAGCAA	CCGAGATTTTCAGCAGAGTCC
Pc-18-511	TTTATAACCGGCTCCACAGG	TGATGACTTCGCTGACCAAG
Pc-19-436	AGCTGACTACGGCATCGACT	ACGGTCTTCTTCAAGGCTGA
Pc-20-491	TCGATGCAGGATGAGTTCAG	TCCCCTGTGACACGTACAAA
Pc-21-335	ACGACGGTAACGTCAAGGAC	TACGCCGAATCTGGAATCTC
Pc-22-525	CAGCCAAAGTCTCGGATCTA	CCAAAACCTCTGTGACCAAC
Pc-04-ne-155	TCTGAAAACACCTGGAAAGC	TTACCGGCAGAGTCACAAC
Pc-04-ne-138	TCTGAAAACACCTGGAAAGC	ACTGACACCTTCGAAATCCA
Pc-04-ne-134	ACAAGCTTTTCACGCTGGAG	GCCATAAGGCTGATCGTAGC
Pc-04-ne-214	AGCATTTCAACGCCATCTTC	TCGGAAAAGTCCGTGGATAC
Pc-04-ne-166	CGTGTGCTCTCCGAGTCAGGC	CGTTCGACTTGACCGCTCTGAA
Pc-04-ne-140	CTACCTGGTCAGCGAAGCCTAT	CTTCGAAGATGGCGTTGAAAT
Pc-04-ne-183	GGCAAGAGTGTATCCACGGACT	CAGGCCATAAGGCTGATCGTAG
Pc-12-ne	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
Pc-12-ne-167	AATGCACCACATGGAACGAG	CACGACGTGAACCTGACCAT
Pc-12-ne-174	GAGTATCGATCAGGGGCAAA	TCGACACTGTGGGAAATCAG
Pc-12-ne-146	GGTATCGATTGGCTGGAAAA	TCGACACTGTGGGAAATCAG

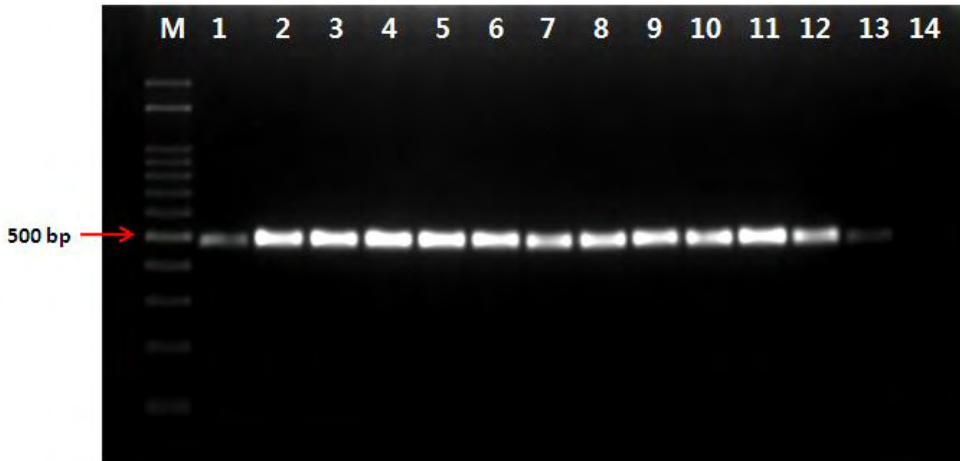


Fig. 5-11. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Pc-12-F/Pc-12-R and bacterial DNA of *Pseudomonas coronafaciens* strains. Lanes 1~13, *P. coronafaciens* LMG 5060, KACC 13262, KACC 12133, LMG 2170, LMG 5030, LMG 5061, LMG 5081, LMG 5380, LMG 5449, LMG 5452, LMG 5536, LMG 13190, LMG 2330; lane 14, water as a negative control.

Pc-12-F/Pc-12-R의 특이성을 확인하기 위해 *P. syringae* pathovar에 속하는 30균주와 *P. savastanoi* pathovar 3균주의 DNA를 이용하여 PCR을 실시한 결과, positive control로 사용한 *P. coronafaciens* LMG 5060 DNA로부터는 498 bp DNA가 증폭되었지만 다른 모든 *Pseudomonas* 속 균주에서는 증폭되지 않았다(Fig. 5-12). 이 결과는 Pc-12-F/Pc-12-R 프라이머가 *P. coronafaciens*와 매우 유사한 다른 *P. syringae* pathovar와 또 다른 *P. savastanoi* pathovar 균주로부터 DNA를 증폭시키지 않으므로 *P. coronafaciens*에 대해 특이성이 있음을 보여주었다. 또한 다른 식물병원세균 속에 속하는 대표적인 세균의 DNA를 이용하여 Pc-12-F/Pc-12-R의 특이성을 확인하였다. 그 결과, positive control로 사용한 *P. coronafaciens* LMG 5060 DNA로부터만 목표 크기의 DNA가 증폭되었다(Fig. 5-13).

PCR 프라이머의 증폭 내부서열에서 제작된 nested 프라이머의 특이성을 확인하기 위하여 PCR과 동일한 방법과 동일한 균주를 사용하여 실험을 수행하였다. Nested 프라이머를 이용한 PCR에 의해 *P. coronafaciens*의 모든 13균주 DNA로부터 예상하는 증폭산물의 크기인 258 bp와 유사한 크기의 DNA가 증폭되었다(Fig. 5-14). *P. coronafaciens*의 DNA 대신 물을 첨가한 PCR에서는 어떤 DNA 밴드도 나타나지 않았다. Nested 프라이머의 특이성을 확인하기 위해 *P. syringae* pathovar 30균주와 *P. savastanoi* pathovar 3균주 DNA를 이용한 PCR 결과, *P. syringae* pv. *lapsa* DNA의 PCR에서 아주 희미한 타겟사이즈 밴드가 관찰되었으며(Fig. 5-15), 식물병원세균 16균주의 DNA를 이용한 PCR에서는 어떤 DNA 밴드도 나타나지 않았다(Fig. 5-16).

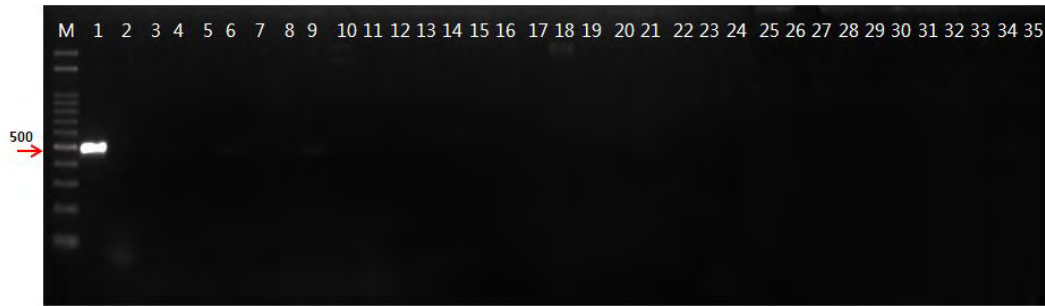


Fig. 5-12. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Pc-12-F/Pc-12-R and total DNA of *Pseudomonas syringae* pvs. and *Pseudomonas savastanoi* pvs. Lanes 2~31, *P. syringae* pvs. *actinidiae* KACC 10582, *antirrhini* ICMP 4303, *aptata* DSM 50252, *atrofaciens* ICMP 4394, *berberidis* NCPPB 2724, *ciccaronei* NCPPB 2355, *delphinii* ICMP 529, *dysoxylis* ICMP 545, *eriobotyae* NCPPB 2331, *helianthi* NCPPB 1229, *japonica* ICMP 6305, *lachrymans* ATCC 11965, *lapsa* ATCC 10859, *maculicola* ICMP 3935, *mellea* ICMP 5711, *mori* ICMP 4331, *morsprunorum* ICMP 5795, *myricae* ICMP 7118, *panici* NCPPB 1498, *papulans* ICMP 4040, *passiflorae* NCPPB 1386, *persicae* NCPPB 2761, *pisi* ICMP 4433, *ribicola* NCPPB 963, *sesami* NCPPB 1016, *syringae* NCPPB 388, *tabaci* ICMP 2835, *tagetis* ICMP 4091, *tomato* NCPPB 2683, *ulmi* NCPPB 632; lanes 32~34, *P. savastanoi* pvs. *glycinea* NCPPB 1134, *pahseolicola* KACC 10575, and *savastanoi* NCPPB 639; lane 1, *P. coronafaciens* LMG 5060 as a positive control; lane 35, water as a negative control.

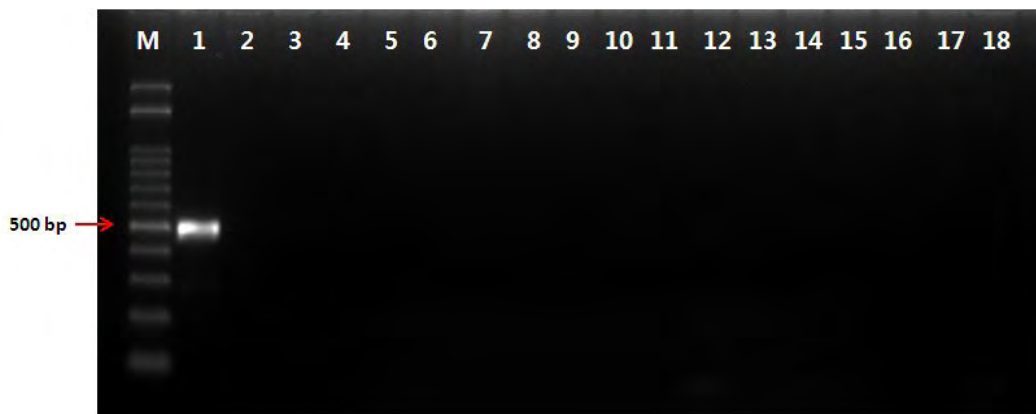


Fig. 5-13. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Pc-12-F/Pc-12-R and total DNA of plant-pathogenic bacteria. Lane 2, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* NCPPB 1011; lane 3~5, *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* NCPPB 1020, *michiganensis* NCPPB 1064, *sepedonicus* NCPPB 2137; lane 6~7, *Erwinia amylovora* CNUPBL 354, *E. pyrifoliae* Ep 16; lane 8, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, NCPPB 312; lane 9~12, *Rhizobium radiobacter* DSM 30205, *R. rhizogenes* ATCC 11325, *R. rubi* NCPPB 1854, *R. vitis* NCPPB 3554; lane 13, *Rhodococcus fascians* LMG 3601, lane 14, *Ralstonia solanacearum* NCPPB 339, lane 15~16, *Xanthomonas campestris* pvs. *campestris* KACC 10377, *vesicatoria* KACC 11157; lane 17, *X. oryzae* pv. *oryzae* KACC 10331; lane 1, *P. coronafaciens* LMG 5060, as a positive control; lane 18, water as a negative control.

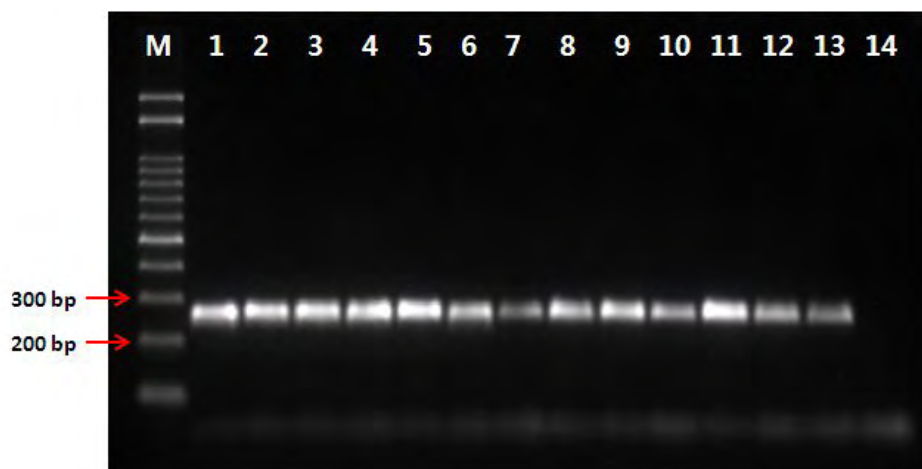


Fig. 5-14. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Pc-12-ne-F/Pc-12-ne-R and bacterial DNA of *Pseudomonas coronafaciens* strains. Lanes 1~13, *P. coronafaciens* LMG 5060, KACC 13262, KACC 12133, LMG 2170, LMG 5030, LMG 5061, LMG 5081, LMG 5380, LMG 5449, LMG 5452, LMG 5536, LMG 13190, LMG 2330; lane 14, water as a negative control.

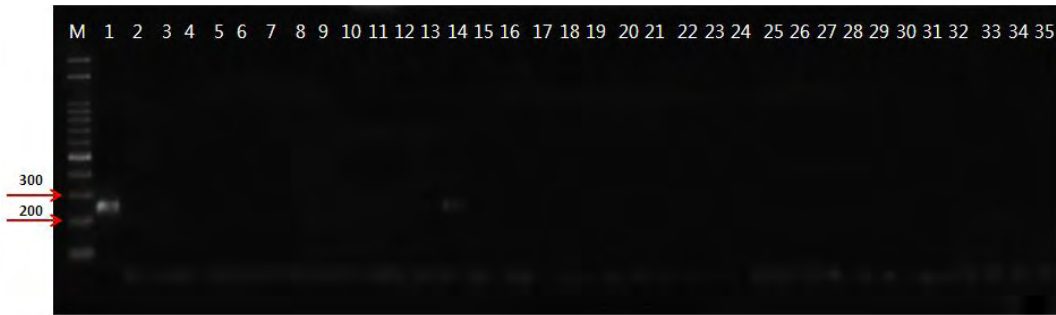


Fig. 5-15. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Pc-12-ne-F/Pc-12-ne-R and total DNA of *Pseudomonas syringae* pvs. and *Pseudomonas savastanoi* pvs. Lanes 2~31, *P. syringae* pvs. *actinidiae* KACC 10582, *antirrhini* ICMP 4303, *aptata* DSM 50252, *atrofaciens* ICMP 4394, *berberidis* NCPPB 2724, *ciccaronei* NCPPB 2355, *delphinii* ICMP 529, *dysoxyli* ICMP 545, *erobotyae* NCPPB 2331, *helianthi* NCPPB 1229, *japonica* ICMP 6305, *lachrymans* ATCC 11965, *lapsa* ATCC 10859, *maculicola* ICMP 3935, *mellea* ICMP 5711, *mori* ICMP 4331, *morsprunorum* ICMP 5795, *myricae* ICMP 7118, *panici* NCPPB 1498, *papulans* ICMP 4040, *passiflorae* NCPPB 1386, *persicae* NCPPB 2761, *psi* ICMP 4433, *ribicola* NCPPB 963, *sesami* NCPPB 1016, *syringae* NCPPB 388, *tabaci* ICMP 2835, *tagetis* ICMP 4091, *tomato* NCPPB 2683, *ulmi* NCPPB 632; lane 32~34, *P. savastanoi* pvs. *glycinea* NCPPB 1134, *pahseolicola* KACC 10575, *savastanoi* NCPPB 639; lane 1, *P. coronafaciens* LMG 5060 as a positive control; lane 35, water as a negative control.

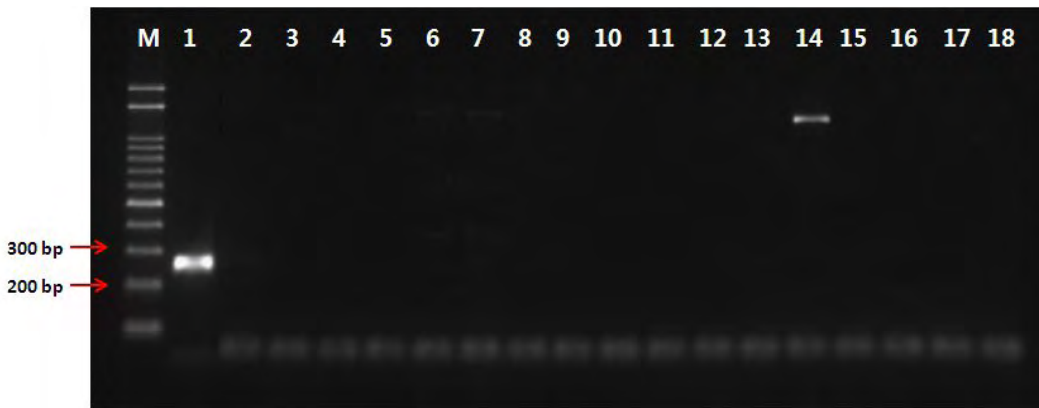


Fig. 5-16. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Pc-12-ne-F/Pc-12-ne-R and total DNA of plant-pathogenic bacteria. Lane 2, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* NCPPB 1011, lane 3~5, *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* NCPPB 1020, *michiganensis* NCPPB 1064, *sepedonicus* NCPPB 2137; lane 6~7, *Erwinia amylovora* CNUPBL 354, *E. pyrifoliae* Ep 16; lane 8, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, NCPPB 312; lane 9~12, *Rhizobium radiobacter* DSM 30205, *R. rhizogenes* ATCC 11325, *R. rubi* NCPPB 1854, *R. vitis* NCPPB 3554; lane 13, *Rhodococcus fascians* LMG 3601; lane 14, *Ralstonia solanacearum* NCPPB 339; lane 15~16, *Xanthomonas campestris* pvs. *campestris* KACC 10377, *vesicatoria* KACC 11157; lane 17, *X. oryzae* pv. *oryzae* KACC 10331; lane 1, *P. coronafaciens* LMG 5060, as a positive control; lane 18, water as a negative control.

***Pseudomonas coronafaciens* 특이적 검출을 위한 TaqMan PCR법 개발**

*P. coronafaciens*의 정량적 검출을 위하여 TaqMan probe를 이용한 실시간 정량 PCR인 TaqMan PCR법을 개발하였다. Pc-taqman을 이용한 TaqMan PCR의 대상세균의 검출 정량성을 확인하기 위하여 *P. coronafaciens* LMG 5060의 DNA를 10배 희석법으로 희석한 10^7 ~ 10^4 pg 농도의 DNA로 PCR를 실시한 결과 사용한 DNA 농도에 비례한 Ct 값을 얻을 수 있었다(Fig. 5-17). 사용한 DNA의 농도와 TaqMan PCR Ct 값 사이의 r^2 이 0.994로 나타났다. 이 결과는 Pc-taqman probe를 이용한 TaqMan PCR은 검출대상세균의 DNA 농도, 10^7 ~ 10^4 pg 범위에서 정량적 검출이 가능함을 의미한다.

*P. coronafaciens*의 DNA를 정량적으로 검출이 가능함을 확인한 TaqMan probe, Pc-taqman과 nested 프라이머, Pc-12-ne-F/Pc-12-ne-R를 이용하여 TaqMan PCR의 *P. coronafaciens* 균주들에 대한 특이성을 확인하였다. TaqMan PCR의 Ct 값은 기준으로 설정한 표준값보다 작은 값을 가질수록 검출반응이 높은 것으로 볼 수 있는데, 이번 실험에서 표준값으로 사용한 *P. coronafaciens* LMG 5060의 DNA 10,000 pg, 1,000 pg, 100 pg, 10 pg의 Ct 값은 각각 22.7, 27.2, 30.7, 33.4이었으며, *P. coronafaciens* 12균주들의 Ct 값은 22.4~28.6의 범위였다(Fig. 5-18, Table 5-10). 반면에 비교 균주로 사용한 *P. syringae*

pathovar 30균주와 *P. savastanoi* pathovar 3균주, 주요 식물병원세균 16균주의 DNA 10 ng(=10,000 pg)으로 실시한 TaqMan PCR 결과, *P. syringae* pathovar 4균주를 제외하고 Ct 값을 얻을 수 없었으며, Ct 값을 가진 4균주 또한 *P. coronafaciens* DNA 10 pg의 Ct 값인 33.4보다 높은 37.3(*P. syringae* pv. *berberidis*), 38.4(*P. s* pv. *delphinii*), 39.6(*P. s* pv. *helianthi*), 38.7(*P. s* pv. *mellea*)이었다(Table 5-11, Table 5-12). 따라서 검출대상인 *P. coronafaciens* 10 pg의 Ct 값인 33.4를 검출여부를 결정할 기준 값으로 보면 *P. coronafaciens* 13균주는 모두 양성으로 그리고 비교균주로 사용한 *P. syringae* pathovar 30균주와 *P. savastanoi* pathovar 3균주, 주요 식물병원세균 16균주는 모두 음성으로 판정할 수 있다. 여기서 사용한 *P. coronafaciens* DNA 10 pg은 다른 균주의 사용한 DNA 10 ng의 1000배이다. 이상의 결과는 Pc-taqman과 nested 프라이머, Pc-12-ne-F/ Pc-12-ne-R를 이용한 TaqMan PCR은 *P. coronafaciens* 균주에 대한 검출 특이성이 충분함을 의미한다.

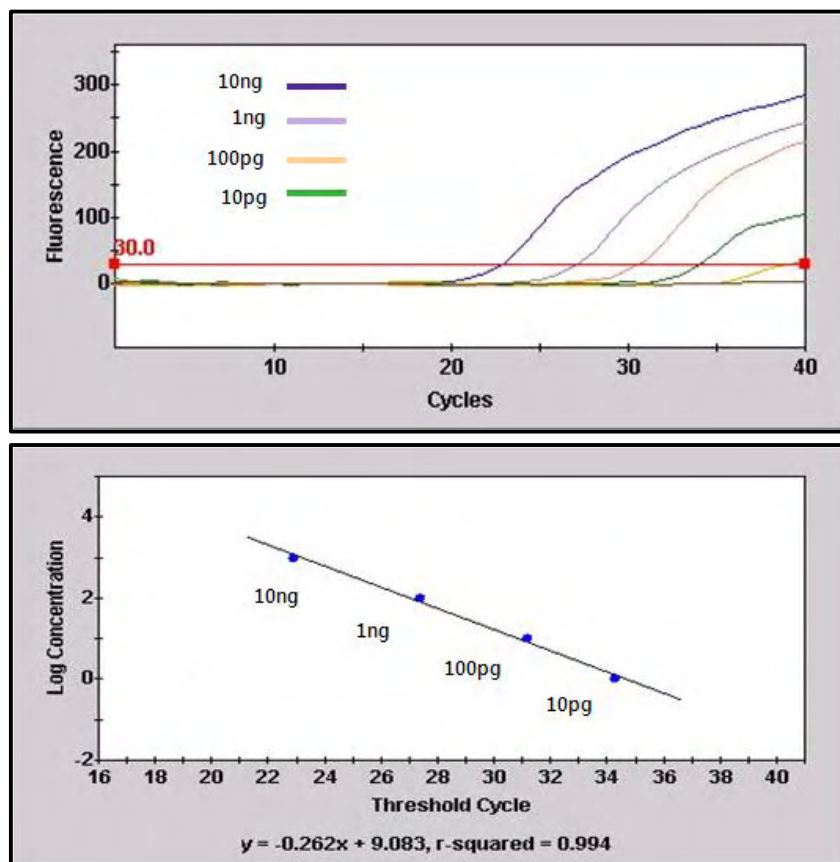


Fig. 5-17. Linear regression generated by ten-fold dilution of DNA of *Pseudomonas coronafaciens* LMG 5060 and the threshold cycle values as detected by the TaqMan real-time PCR with primer Pc-12-ne-F/ Pc-12-ne-R and Pc-taqman. (A), real-time PCR amplification curve and (B), the linear regression curve.

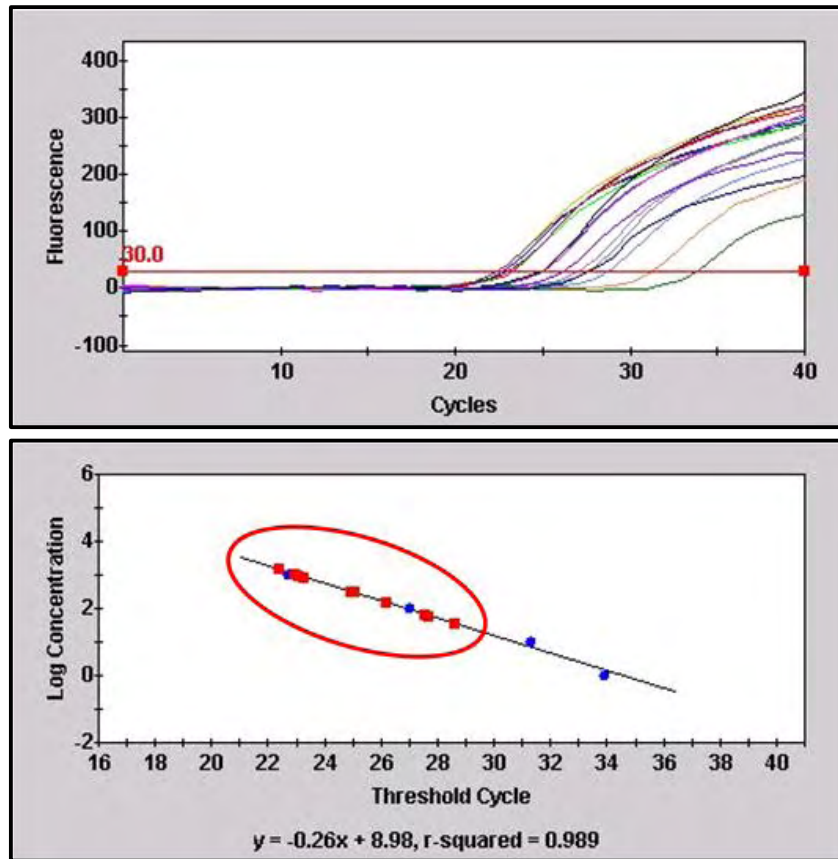


Fig. 5-18. Specificity of the TaqMan real-time PCR for the detection of *Pseudomonas coronafaciens*. The TaqMan PCR assays were carried out with primer Pc-12-ne-F/Pc-12-ne-R, Pc-taqman and 10 ng of *P. coronafaciens* LMG 5060, KACC 13262, KACC 12133, LMG 2170, LMG 5030, LMG 5061, LMG 5081, LMG 5380, LMG 5449, LMG 5452, LMG 5536, LMG 13190, and LMG 2330. (A), real-time PCR amplification curves and (B), the linear regression curve of standard DNAs (blue dot) and the threshold cycle values of *P. coronafaciens* strains (red dot).

Table 5-10. The Ct values of *Pseudomonas coronafaciens* strains with TaqMan PCR assays

Sample ^a			Ct ^b
<i>P. coronafaciens</i>	LMG 5060	10,000 pg (STD)	22.7
<i>P. coronafaciens</i>	LMG 5060	1,000 pg (STD)	27.2
<i>P. coronafaciens</i>	LMG 5060	100 pg (STD)	30.7
<i>P. coronafaciens</i>	LMG 5060	10 pg (STD)	33.4
<i>P. coronafaciens</i>	KACC 12133	10 ng	22.4
<i>P. coronafaciens</i>	KACC 13262	10 ng	22.4
<i>P. coronafaciens</i>	LMG 2170	10 ng	23.3
<i>P. coronafaciens</i>	LMG 5030	10 ng	23.1
<i>P. coronafaciens</i>	LMG 5061	10 ng	28.6
<i>P. coronafaciens</i>	LMG 5081	10 ng	25.0
<i>P. coronafaciens</i>	LMG 5380	10 ng	25.1
<i>P. coronafaciens</i>	LMG 5449	10 ng	25.0
<i>P. coronafaciens</i>	LMG 5452	10 ng	27.6
<i>P. coronafaciens</i>	LMG 5536	10 ng	23.0
<i>P. coronafaciens</i>	LMG 13190	10 ng	26.2
<i>P. coronafaciens</i>	LMG 2330	10 ng	27.7
water			ND

a Standard

samples were diluted serial 10-fold DNA.

b ND: Not detected.

Table 5-11. The Ct values of *Pseudomonas syringae* pathovars and *Pseudomonas savastanoi* pathovars obtained by TaqMan PCR assays

Sample	Ct ^a
<i>P. syringae</i> pathovars	
<i>pv. actinidiae</i>	ND
<i>pv. antirrhini</i>	ND
<i>pv. aptata</i>	ND
<i>pv. atrofaciens</i>	ND
<i>pv. berberidis</i>	37.3
<i>pv. ciccaronei</i>	ND
<i>pv. delphinii</i>	38.4
<i>pv. dysoxylis</i>	ND
<i>pv. eriobotryae</i>	ND
<i>pv. helianthi</i>	39.6
<i>pv. japonica</i>	ND
<i>pv. lachrymans</i>	ND
<i>pv. lapsa</i>	ND
<i>pv. maculicola</i>	ND
<i>pv. mellea</i>	38.7
<i>pv. mori</i>	ND
<i>pv. morsprunorum</i>	ND
<i>pv. myricae</i>	ND
<i>pv. panici</i>	ND
<i>pv. papulans</i>	ND
<i>pv. passiflorae</i>	ND
<i>pv. persicae</i>	ND
<i>pv. pisi</i>	ND
<i>pv. ribicola</i>	ND
<i>pv. sesami</i>	ND
<i>pv. syringae</i>	ND
<i>pv. tabaci</i>	ND
<i>pv. tagetis</i>	ND
<i>pv. tomato</i>	ND
<i>pv. ulmi</i>	ND
<i>P. savastanoi</i> pathovars	
<i>pv. glycinea</i>	ND
<i>pv. phaseolicola</i>	ND
<i>pv. savastanoi</i>	ND

a ND: Not detected.

Table 5-12. The Ct values of plant-pathogenic bacterial strains obtained by TaqMan PCR assays

Sample	Ct ^a
<i>Acidovorax</i> sp.	ND
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>insidiosus</i>	ND
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	ND
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	ND
<i>Erwinia amylovora</i>	ND
<i>Erwinia pyrifoliae</i>	ND
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	ND
<i>Rhodococcus fascians</i>	ND
<i>Rhizobium vitis</i>	ND
<i>Rhizobium radiobacter</i>	ND
<i>Rhizobium rhizogenes</i>	ND
<i>Rhizobium rubi</i>	ND
<i>Ralstonia solanacearum</i>	ND
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	ND
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	ND
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	ND

a ND: Not detected

종자 추출액을 이용한 *Pseudomonas coronafaciens*의 PCR 검출

인공 접종한 귀리종자로부터 추출액을 얻어 PCR 검출에 사용하였다. 세균 현탁액을 108 cfu/ml에서 100 cfu/ml의 밀도로 접종하고 건조한 후, 이 종자로부터 얻은 종자 추출액을 사용하여 PCR을 실시하였을 때 10⁸~10⁶ cfu/ml의 현탁액을 접종했던 종자의 추출액까지 타겟 사이즈의 DNA 밴드를 얻을 수 있었다(Fig. 5-19). 동일한 종자 추출액을 이용하여 TaqMan PCR을 실시하였을 때 10⁸~10⁷ cfu/ml로 인공 접종한 종자추출액의 Ct 값이 29.1~32.4로 나타났다. *P. coronafaciens* DNA 10 pg의 Ct 값인 33.4을 검출가부를 결정한 기준 값으로 적용했을 때 10⁸~10⁷ cfu/ml로 인공 접종한 종자까지 검출 가능함을 나타낸다(Fig 5-20, Table 5-13).

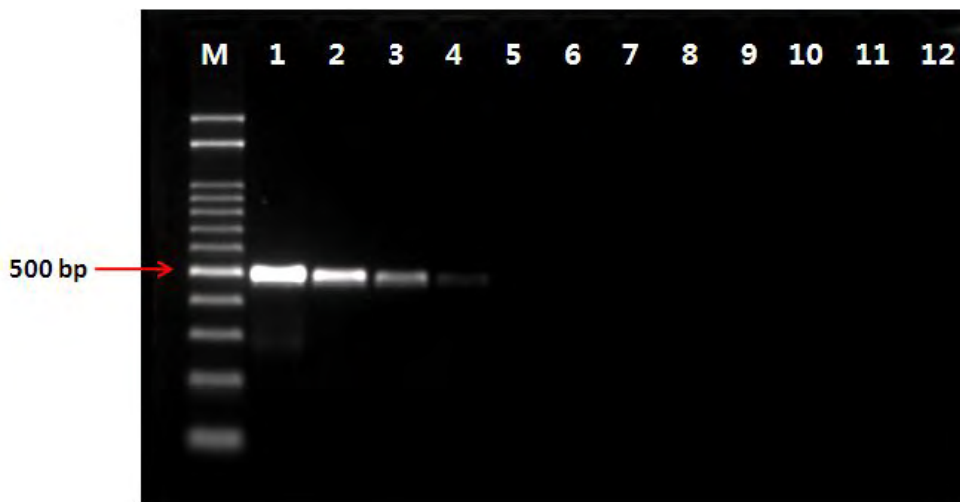


Fig. 5-19. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Pc-12-F/Pc-12-R and 3 ul of seed extract of artificially inoculated seeds with *Pseudomonas coronafaciens* LMG 5060. Extract of seeds inoculated with cell suspension, lane 2~10, 10^8 cfu/ml, 10^7 cfu/ml, 10^6 cfu/ml, 10^5 cfu/ml, 10^4 cfu/ml, 10^3 cfu/ml, 10^2 cfu/ml, 10^1 cfu/ml, 10^0 cfu/ml; lane 11, with just water; lane 1, *P. coronafaciens* LMG 5060, as a positive control; lane 12, water as a negative control.

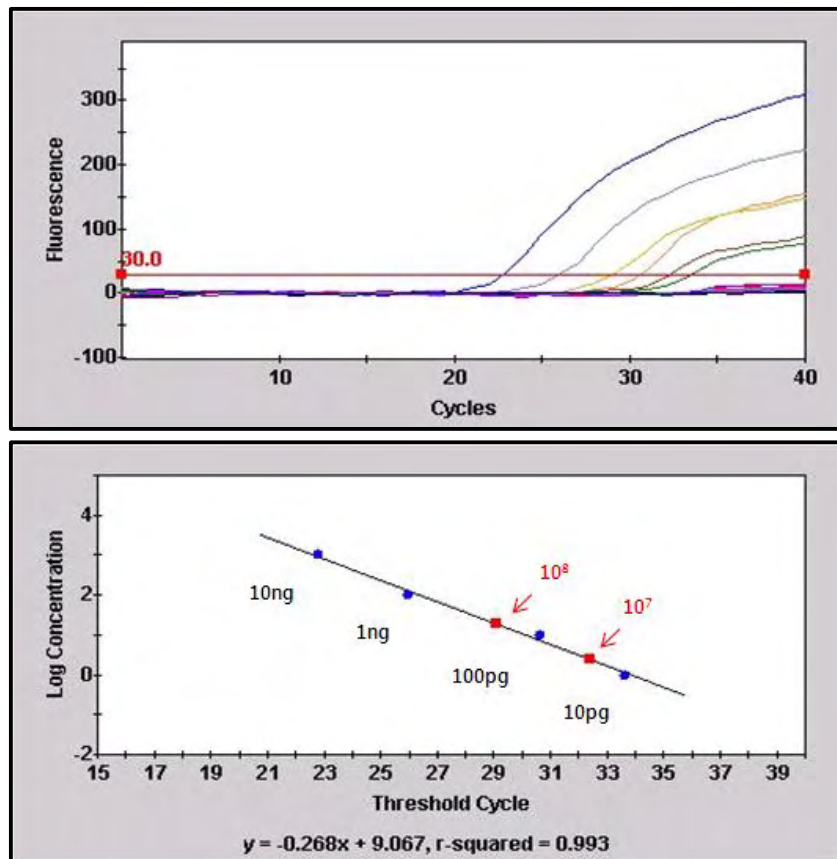


Fig. 5-20. Detection of *Pseudomonas coronafaciens* from the oats seed extract. The TaqMan real-time PCR assays were carried out with primer Pc-12-ne-F/Pc-12-ne-R, Pc-taqman and 2 ul of oats seed extract. The seed extracts were prepared from the oats seeds inoculated artificially with *P. coronafaciens* LMG 5060. (A), real-time PCR amplification curve and (B), the linear regression curve of standard DNAs (blue dot) and the threshold cycle values of the seed extracts (red dot).

Table 5-13. The Ct values of the seed extracts from the artificially inoculated seeds with TaqMan PCR assays

Sample ^a	Ct ^b
<i>P. coronafaciens</i> LMG 5060 10,000 pg (STD)	22.8
<i>P. coronafaciens</i> LMG 5060 1,000 pg (STD)	26.0
<i>P. coronafaciens</i> LMG 5060 100 pg (STD)	30.6
<i>P. coronafaciens</i> LMG 5060 10 pg (STD)	33.6
Seed extract inoculated (10 ⁸ cfu/ml)	29.1
Seed extract inoculated (10 ⁷ cfu/ml)	32.4
Seed extract inoculated (10 ⁶ cfu/ml)	ND
Seed extract inoculated (10 ⁵ cfu/ml)	ND
Seed extract inoculated (10 ⁴ cfu/ml)	ND
Seed extract inoculated (10 ³ cfu/ml)	ND
Seed extract inoculated (10 ² cfu/ml)	ND
Seed extract inoculated (10 ¹ cfu/ml)	ND
Seed extract inoculated (10 ⁰ cfu/ml)	ND
Seed extract inoculated (water)	ND
water	ND

a Indicates bacterial cell density used for seed inoculation artificially.

b ND: Not detected.

고 찰

본 연구에서는 지금까지 보고되지 않았던 *P. coronafaciens*를 검출하는 PCR 방법을 개발하였다. *P. coronafaciens*는 주요한 귀리 재배지역에서 경제적 피해를 유발하는 Halo blight 병을 일으키는 병원균으로, 지금까지 국내에서 Halo blight 병의 발병이 보고되지 않았으며, 따라서 *P. coronafaciens*는 검역대상세균으로서 관리되고 있다. 이 병원균의 국내 도입을 막기 위한 검역을 위해서는 다양한 시료로부터 효과적인 세균 검출법이 필요하지만, 매우 우수한 세균 검출법중 하나인 PCR 검출법이 이 병원세균에 대해서는 아직 보고된 바 없다.

본 연구에서는 이 병원균이 일으키는 Halo blight 병이 발생하는 7개국에서 분리된 13개의 *P. coronafaciens*를 사용하였다. 또한 *Pseudomonas*와 *P. syringae* pathovar는 형태적으로나 생리학적, 분자생물학적으로 아주 유사한 특징을 가지기 때문에 *P. syringae*에 속하는 식물병원세균들과의 대조를 통해 대상균주만 특이적으로 검출할 수 있는 PCR 방법이 필요하다. 따라서 *P. coronafaciens* PCR 검출법 개발을 위해서는 *Pseudomonas* 속 또는 *P. syringae*와 구별되는 특이적인 염기서열을 찾는 것이 매우 중요하다. 하지만 *P. coronafaciens*는 현재까지 유전자은행에 보고된 유전자 정보가 많지 않다. 본 연구에서는 대

상세균의 유전자 염기서열 정보를 얻어 특이적 프라이머를 제작하기 위해 *P. coronafaciens* LMG 5060의 NGS 분석을 통하여 draft- genome sequence를 얻었다. 이 분석으로 총 2028개의 contig와 8201개의 ORF를 얻었으며 각각의 ORF를 BLASTN을 통해 가장 상동성이 낮거나 알려진 유전자 중에 유사한 정보가 없는 유전자의 염기서열을 이용하여 프라이머를 제작하였다. 제작된 36개의 프라이머를 *P. coronafaciens*에 대한 특이성을 PCR을 통해 검증하여 Pc-12-F/Pc-12-R와 nested 프라이머인 Pc-12-ne-F/Pc-12-ne-R를 선별하였다.

또한 프라이머와 프라이머 증폭서열을 유전자은행에서 BLASTN을 통해 확인한 결과, 그와 유사한 상동성을 지닌 염기서열을 가진 유전자가 없는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서 개발된 Pc-12-F/Pc-12-R와 Pc-12-ne-F/Pc-12-ne-R는 *P. coronafaciens*에 대하여 높은 특이성을 보여주어 검출의 우수성을 확인하였다.

현재까지 알려진 식물병원세균의 검출을 위한 다양한 방법이 연구되어 왔다(Mohan와 Schaad, 1987; Van Vuurde 등, 1991; Webster 등, 1983; Cuppels 등, 1990; Schaad, 1982; Schaad 등, 1995). 다양한 세균 검출법 중 하나인 PCR 검출법은 특정 유전자를 선택적으로 검출하기 때문에 아주 민감한 방법이며 병원균의 배양 없이 DNA를 이용한 검출이 가능하여 검출시간을 줄일 수 있는 장점이 있다(Zaccardelli 등, 2005; Molouba 등, 2001). 그러나 한편 PCR은 증폭된 산물을 전기영동 및 DNA 밴드의 염색하기 위한 시간이 소비되며 PCR 증폭산물을 DNA 마커를 이용해 추측할 뿐 정확한 사이즈를 알 수 없는 한계도 가지고 있다(Ginzinger, 2002). 실시간 정량 PCR은 PCR 결과를 확인하기 위해 PCR 산물의 전기영동을 할 필요가 없으며 원하는 대상을 정량적으로 검출할 수 있는 장점을 가졌다(Schena 등, 2004; Finetti-Sialer와 Ciancio, 2005; Schaad와 Frederick, 2002). 특히 실시간 정량 PCR 중에 하나인 TaqMan PCR은 증폭산물 내부에 probe를 붙여 그 부위가 정확하게 증폭되어야만 형광을 발현할 수 있도록 제작되어 PCR의 거짓양성반응을 줄일 수 있는 병원균 검출에 아주 우수한 방법이다(Finetti-Sialer와 Ciancio, 2005; Fanelli 등, 2007; Bella 등, 2008). 본 연구에서 제작된 nested 프라이머 Pc-12-ne-F/Pc-12-ne-R의 증폭산물 내부서열에서 *P. coronafaciens*에 대해 가장 특이적인 20 bp의 염기서열을 선택하여 TaqMan probe를 제작하였다. TaqMan probe, Pc-taqman은 *P. coronafaciens* LMG 5060의 농도에 따라 정량적으로 검출이 되는 것을 확인하였고($r^2=0.994$), 나머지 12개의 대상균주에서도 검출양성 범위의 Ct 값을 보여주었다. 하지만 다른 식물병원세균들은 모두 검출음성 범위의 Ct 값을 가져 이번 연구를 통해 개발된 TaqMan PCR 방법이 *P. coronafaciens*만 정량적으로 검출이 가능함을 나타내었다.

*P. coronafaciens*는 종자 전염균으로서 직접 귀리 종자로부터 대상세균의 검출을 적용하고자 하였다. 본 연구에서 개발한 PCR 방법을 인공 접종한 귀리 종자의 종자 추출액으로 PCR을 실시하였으며, 종자 추출액은 Maes 등 (1996)의 방법을 참고하여 추출하였다. PCR 결과, 108-106 cfu/ml의 밀도로 접종된 종자 추출액까지 대상세균의 검출이 가능하였다. TaqMan PCR을 수행하여 108-107 cfu/ml의 밀도까지 검출 범위내의 Ct 값을 얻었다. 몇몇의 식물종자는 DNA 분리 없이 PCR을 실시하였을 때 PCR 억제제를 가지고 있다고 알려져 있다(Prosen 등, 1993). 하지만 최근에 보고된 종자 전염 병원균의 검출에 관한 논문에서는 PCR을 이용하여 병원세균에 오염된 종자를 DNA의 분리 없이 병원균의 검출이 가능하다고 보고하였다(홍 등, 2007; 이와 강, 2009). 본 연구에서는 종자 추출액으로 직접 PCR과 TaqMan PCR을 실시하여 DNA 분리 없이도 억제제의 방해 없이 *P. coronafaciens*의 검출이 가능함을

보여 주었다.

본 연구에서 개발한 PCR 프라이머, nested PCR 프라이머 그리고 TaqMan probe를 이용한 PCR 방법들은 모두 검출대상인 *P. coronafaciens*에 높은 특이성을 보여 주었다. 따라서 *P. coronafaciens*를 귀리 종자로부터 빠르고 정확하게 검출하는 데 효과적으로 활용 가능할 것으로 판단되며, 대상세균에 대한 높은 특이성은 대상세균의 검출 외에 대상세균의 동정에도 매우 우수한 도구로 사용될 것으로 기대된다.

3. 호두의 Walnut Blight 병원균 *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*의 PCR 검출법

Xanthomonas arboricola pv. *juglandis*는 호두에서 walnut blight을 일으키는 병원균이다. 19세기에 처음 이 병이 보고되었으며(Ferraris, 1927), 호두 재배지역에서 널리 확산되었다. 이 병은 주로 페르시아 호두(Persian, English, walnut)에서 주요한 병으로 보고되고 있다(Pierce, 1901). 이 병원균은 호두의 나뭇가지, 꽃봉오리, 잎자루, 꽃대, 수꽃과 암꽃의 꽃차례에서 피사를 일으키며, 새 조직은 더 감염되기 쉽다(Belisario 등, 1997). 감염된 꽃은 쪼그라들며, 잎은 노란 할로(halo)를 띄는 암갈색의 반점이 생기다가 점점 심해지면 피사가 일어나게 된다(Ninot 등, 2002).

X. arboricola pathovar들은 주로 과수에서 병을 일으키고, 유럽에서 새로운 병을 일으키고 있는 주요한 병원균들이다(Boudon 등, 2005; Hajri 등, 2010; Janse, 2010; Rademaker 등, 2005; Scortichini와 Rossi, 2003; Vauterin 등, 1995). 이 중 가장 밀접하게 연관되어 있다고 보고된 3개의 pathovar인 pruni, corylina, juglandis는 경제적으로도 매우 중요하다(Janse, 2010; Scortichini와 Rossi, 2003; Vauterin 등, 1995). *X. arboricola* pv. *juglandis*는 현재 국내에는 보고된 바가 없어 검역대상 병원균으로 지정되어 있으며(농림수산검역검사본부, 2012), 본 연구에서는 *X. arboricola* pv. *juglandis*를 특이적으로 검출하는 PCR 방법을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

본 연구에 사용한 *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*는 총 14균주 (Table 5-14)이며, 비교균주로는 *X. arboricola* pathovars 10균주, *Xanthomonas*속 11균주, 대표 식물병원세균 22균주이다 (Table 5-15). *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* 특이적 DNA 염기서열을 얻기 위하여 *X. arboricola* pv. *juglandis* NCPBP 1447의 genome sequencing을 NGS로 분석하였고, NGS로 얻어진 draft genome sequence의 분석결과 총 390개의 contig와 4553개의 ORF를 얻었다. 각 ORF의 염기서열 상동성을 유전자 은행의 알려진 염기서열과 비교하여 상동성이 낮은 ORF로부터 총 45 sets의 프라이머를 제작하여 각 프라이머의 *X. arboricola* pv. *juglandis*에 대한 특이성을 확인하였다 (Table 5-16). PCR 조건은 95°C 30초, 62°C 30초 72°C 30초 조건으로 35회 증폭 후 72°C 10분간 최종 증폭하였다.

Table 5–14. List of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* strains used in this study

Strain	Number ^a	Host	Origin	Year ^c
<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	Aus 76583	<i>Juglans regia</i>	Australia	nk
	CRAFRU 1	<i>Juglans regia</i> cv. Malizia	Italy	2008
	CRAFRU 23	<i>Juglans regia</i> cv. Sorrento	Italy	2008
	CRAFRU 60	<i>Juglans regia</i> cv. Kaman1	Turkey	2008
	CRAFRU 63	<i>Juglans regia</i> cv. Srem	Italy	2008
	CRAFRU 71	<i>Juglans regia</i> cv. Tisa	Italy	2008
	DSM 1049	<i>Juglans regia</i>	United States	nk
	INIA 394	<i>Juglans regia</i>	Portugal	1994
	NCPPB 362	<i>Juglans regia</i>	United Kingdom	1995
	NCPPB 411	<i>Juglans regia</i>	New Zealand	1956
	NCPPB 412	<i>Juglans regia</i>	New Zealand	1956
	NCPPB 1447 ^b	<i>Juglans regia</i>	Romania	1962
	PD 130	<i>Juglans regia</i>	The Netherlands	1978
	PD 157	<i>Juglans regia</i>	The Netherlands	1987

^a CRAFRU, Culture Collection of C.R.A.–Centro di Ricerca per la Frutticoltura, Italy; DAR, Australian Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Rydalmere, Australia; DSM, DSMZ–Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Germany; INIA, Culture Collection of Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Portugal; NCPPB, National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, UK; PD, Plantenziektenkundige Dienst, The Netherlands.

^b This strain was analyzed by NGS.

^c nk, not known.

Table 5–15. List of *Xanthomonas arboricola* pathovars, *Xanthomonas* spp. strains and other plant pathogenic bacterial strains used in this study

Strain	Number ^a	Host ^b	Origin ^b	Year ^b
<i>Acidovorax</i>				
<i>avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	NCPPB 1011	<i>Zea mays</i>	USA	1958
<i>Clavibacter</i>				
<i>michiganensis</i> subsp. <i>insidiosus</i>	NCPPB 1020	<i>Medicago sativa</i>	Canada	nk
subsp. <i>michiganensis</i>	NCPPB 1064	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Italy	1961
subsp. <i>sepedonicus</i>	NCPPB 2137	<i>Solanum tuberosum</i>	Canada	nk
<i>Erwinia</i>				
<i>amylovora</i>	CNUPBL 354	<i>Fragaria grandiflora</i>	Korea	2011
<i>pyrifoliae</i>	Ep 16	nk	Japan	nk
<i>Pectobacterium</i>				
<i>carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	NCPPB 312	<i>Solanum tuberosum</i>	Denmark	nk
<i>Pseudomonas</i>				
<i>coronafaciens</i>	ICMP 3113	<i>Avena sativa</i>	United Kingdom	1958
<i>savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	NCPPB 1134	<i>Glycine javanica</i>	Zimbabwe	1961
pv. <i>phaseolicola</i>	KACC 10575	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Poland	nk
<i>syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	ICMP 4394	<i>Triticum aestivum</i>	New Zealand	1968
pv. <i>papulans</i>	NCPPB 2847	<i>Malus sylvestris</i>	Canada	1968
pv. <i>persicae</i>	NCPPB 2757	<i>Prunus persica</i>	France	1975
pv. <i>syringae</i>	NCPPB 388	<i>Oryza sativa</i>	Hungary	nk
pv. <i>tabaci</i>	ICMP 2835	<i>Nicotiana tabacum</i>	Hungary	1959
pv. <i>tomato</i>	NCPPB 2683	<i>Lycopersicon esculentum</i>	New Zealand	1972
<i>Ralstonia</i>				
<i>solanacearum</i>	NCPPB 339	<i>Solanum tuberosum</i>	Israel	nk
<i>Rhizobium</i>				
<i>radiobacter</i>	DSM 30205	<i>Malus</i> sp.	nk	1972
<i>rhizogenens</i>	ATCC 11325	<i>Malus domestica</i>	nk	nk
<i>rubi</i>	NCPPB 1854	<i>Rubus ursinus</i> var. <i>loganobaccus</i>	USA	1942
<i>vitis</i>	NCPPB 3554	<i>Vitis vinifera</i>	Australia	1977
<i>Rhodococcus</i>				
<i>fascians</i>	LMG 3601	<i>Lilium speciosum</i> cv. <i>Rubrum</i>	Belgium	nk
<i>Xanthomonas</i>				
<i>arboricola</i> pv. <i>celebensis</i>	DSM 50853	<i>Musa acuminata</i>	New Zealand	1960
pv. <i>corylina</i>	DSM 50854	<i>Corylus maxima</i>	USA	1939
pv. <i>fragariae</i>	CNUPBL 1733	<i>Fragaria ananassa</i>	Korea	2011
	LMG 19145	<i>Fragaria ananassa</i>	Italy	nk
	LMG 19146	<i>Fragaria</i> sp.	France	1986
pv. <i>poinsetticola</i>	ICMP 6274	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	New Zealand	1972
pv. <i>populi</i>	CFBP 3123	<i>Populus canadensis</i> cv. <i>Robusta</i>	The Netherlands	1979
	ICMP 9371	<i>Populus generosa</i>	New Zealand	1986
pv. <i>pruni</i>	X74	nk	USA	nk
	X78	nk	USA	nk
<i>axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	KCTC 2856	nk	Japan	nk

Table 5-15. (continued)

Strain	Number ^a	Host ^b	Origin ^b	Year ^b
<i>Xanthomonas</i>				
<i>axonopodis</i> pv. <i>dieffenbachiae</i>	KACC 10460	nk	Korea	nk
pv. <i>glycines</i>	KACC 11147	nk	Korea	2001
pv. <i>malvacearum</i>	DSM 1220	nk	Germany	nk
pv. <i>phaseoli</i>	ATCC 9563	<i>Phaseolus vulgaris</i>	USA	nk
<i>campestris</i> pv. <i>amoraciae</i>	NCPPB 1930	<i>Armoracia lapathifolia</i>	New Zealand	1939
pv. <i>campestris</i>	KACC 10377	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Korea	nk
pv. <i>vesicatoria</i>	KACC 11157	<i>Capsicum annuum</i>	Korea	1999
<i>cucurbitae</i>	ICMP 2309	<i>Cucurbita maxima</i>	New Zealand	1968
<i>fragariae</i>	NCPPB 1469	<i>Fragaria chiloensis</i> var. <i>ananassa</i>	USA	1962
<i>oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	KACC 10331	<i>Oryza sativa</i>	Korea	nk

^a ATCC, American Type Culture Collection, USA; CFBP, French Collection of Plant associated bacteria, France; CNUPBL, Chungbuk National University Plant Bacteriology and molecular genetics Lab., Rep. of Korea; DSM, DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Germany; ICMP, International Collection of Micro-organisms from Plants, Landcare Research, New Zealand; KACC, Korean Agricultural Culture Collection, Rural Development Administration, Rep. of Korea; KCTC, Korean Collection for Type Culture, Rep. of Korea; LMG, Collection of the Laboratorium voor Microbiologie en Microbiele Genetica, Ghent University, Belgium; NCPPB, National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, United Kingdom.

^b nk, not known.

Table 5-16. List of primers used in this study

Primers	Forward	Reverse
Xaj	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
Xaj-ne	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
Xaj01	CACCACCCAGGTCACCAC	GAGTTGGGTGAGCACATCG
Xaj02	CAATGCCATGTTTCTGATCG	TTATGTGTAACGCCGTCTCG
Xaj03	ACAGACCACCGTTCAGCAG	GTCGTTGACCATCGACAGG
Xaj04	CTGGTTCACGCATAACGATG	CACTCCCCATTCTCAAGGAA
Xaj05	CTGTGGCAAATTGATCATCG	GGCATGGGGTAGATCAACTG
Xaj06	GTTTCGTGTTTCTGGTGCTGA	GTACGCCGACACTCAACAAG
Xaj07	TGGGATCGAACTGGACGATA	GTGTGCGCATCCATGTCTT
Xaj08	GATCGTCGAAGTCGAGAACG	GTGTCATTGAGCGCACTACC
Xaj09	ACCTGATGACGTCCAAGAGC	GTGCCGTACAGATCCTGCTT
Xaj10	GCATCTATCCCACCAACGAT	CGGAGAGTTTCAGCAGGAAG
Xaj11	CTTGTTGACGCTGGGAAAAG	CACCAGCACGCTGTAGATTG
Xaj12	GCGTAAGCAGATCGAGAAGG	CTGCTGCAGTTCTTCCTGTG
Xaj14-1	CATCAGTGAAGGCGTATTTCC	CGATCAGAGCCTGCTTCTTC
Xaj14-2	GTCCCTCGTCCACCAATCATC	CGGAGTAGAACGTGCTCTTG
Xaj14-3	CCAGGAAGGCCAGAAAGATT	GCAGCAGGGAATGGTAGTCA
Xaj14	ATACTTAGGCGACGCGAATG	TAGAAAATTCCCAGCCGTCA
Xaj15	GCGAGGGTAACTTCATGCTC	ACATTGGGGAAGGTCATCAG
Xaj16	GACATCATCGACCTGTGGTG	GATGGATATGCCCGCAGAC
Xaj17	ATACCGGGCAAAGACCATTT	CCCAGGATCATCGAAGAGAA
Xaj18	ACACCGGCAAGAAAGTATGG	AGTAGATGCCGCTCTTCTGC
Xaj19	GCGATGTCGATTTCCGTTAT	GATGGCCACTTCCATCTTGT
Xaj20	GTGATGCTGATCAACCTGGA	CGCAATACTTGGGCTGGTAG
Xaj21	CATCGCATCGACCACAAC	ACAGCTGGTTGACAGTCACG
Xaj22	GGCGTTTCTGCTCTACATGG	CCCATTCCAGCAACAGATAGA
Xaj23	CGTCAACCATATCGACACCA	CGCGAGTTTGTGATGATTT
Xaj24	GGGAGGTGCTCGTGTACTT	AGAGCGGAAAACCAGACGAT
Xaj25	AGACCTGGTGCCTTACATCC	GGAGTACCAGCCTTCCGATT
Xaj26	GACAGCACTGCGACAAAGAA	TCGATTCAAGTGCGTATGGA
Xaj27	TTATACGGTGTACGGCACCA	ACGCACCTGACGGTAGTTTT
Xaj28	TGAAAGTGACCAAGGCACAG	CCATCATGTCCAGGTTGCT
Xaj29	CAAGGTGTTTCGTCAACAACG	GCCAGATAGGTACGGGTGAA
Xaj30	AGATCGGCATCCTGATCAAC	CGATCGAAACCAACCAGTG
Xaj30-1	CTACTCGCGCTCAATGTCAC	CCTGCACATACACACCCTTG
Xaj30-2	CGGCATCCTGATCAACAAC	CATAGACGCTCATGCCGAAT
Xaj31	AGCACGCTATTTGGTTACGC	TCCATCAGTTCGACACGGTA
Xaj02-ne	CAACACCGAGATGCAAGAGA	AGCGACACCAACGGAGATAA
Xaj14-ne01	TCGTAGTACCCCACGAGCTG	GGAAGTGTTCGGGCAGGTAG
Xaj14-ne02	CGTAGTACCCCACGAGCTGA	GTGGACGAGGACAGGAACTG
Xaj14-ne03	AGCACTGCCGAGGTCAAG	GTAATCGTCCGGTGGGATGAT
Xaj14-ne04	CCAGGAAGGCCAGAAAGATT	GATGATTGGTGGACGAGGAC
Xaj14-ne05	CGCATTTTCATGCAGATCA	GCTCGTGGGGTACTACGAAA
Xaj14-2-ne	ATTCGTGCTCGAAGTGCTG	AACTTGAGCGGCTTCAACAG
Xaj14-4-ne	CGAACAGTTCCTGTCTCGT	CGTCGCTGATGTTGTTGAAG

결과

제작된 PCR 프라이머의 특이성을 확인하기 위해 *X. arboricola* pv. *juglandis* 14균주와 다른 *Xanthomonas*속 21균주, 그리고 대표 식물병원세균 22균주의 DNA를 분리하여 PCR을 수행하였다. *X. arboricola* pv. *juglandis* 14균주의 DNA와 PCR 프라이머를 사용하여 PCR을 수행한 결과, *X. arboricola* pv. *juglandis* 14균주의 DNA로부터 모두 481 bp와 181 bp로 증폭된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5-21, 5-24). 또한 *X. arboricola* pv. *juglandis* 14균주 이외의 다른 *Xanthomonas*속 21균주와 대표 식물병원세균 22균주의 DNA에서는 동일한 타겟 사이즈가 증폭되지 않는 것을 확인하였다(Fig. 5-22, 5-23, 5-25, 5-26).

본 연구에서 얻은 최종 프라이머인 Xaj-F/Xaj-R(증폭서열 481 bp)와 Xaj-ne-F/Xaj-ne-R(증폭서열 181 bp)는 contig 75번(22082 bp) 내부에 존재하는 ORF 2584번(951 bp)의 염기서열로부터 얻었다. ORF 2584번의 염기서열로 BLASTN한 결과, *Sphingobium chlorophenolicum* L-1균주의 염색체 2의 complete sequence와 36 bp가 일치하는 것으로 나타났다. *S. chlorophenolicum*는 프로테오박테리아(proteobacteria)의 일종으로, 독성이 있는 pesticide pentachlorophenol(PCP)을 광물화시킬 수 있는 세균으로 알려져 있다(Copley 등, 2011). 프라이머 Xaj-F/Xaj-R의 증폭서열과 Xaj-ne-F/Xaj-ne-R의 증폭서열을 BLASTN 한 결과에서는 일치하는 유전자 서열이 없는 것으로 나타났다.

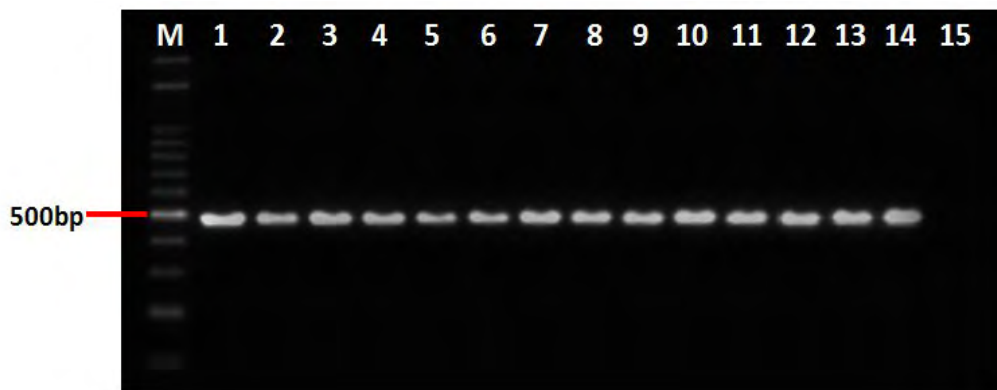


Fig. 5-21. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Xaj-F/Xaj-R and bacterial DNA of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* strains. Lanes 1-14, *X. arboricola* pv. *juglandis* Aus 76583, CRAFRU 1, CRAFRU 23, CRAFRU 60, CRAFRU 63, CRAFRU 71, DSM 1049, INIA 394, NCPPB 362, NCPPB 411, NCPPB 412, NCPPB 1447, PD 130, PD 157; lane 15, water as a negative control.

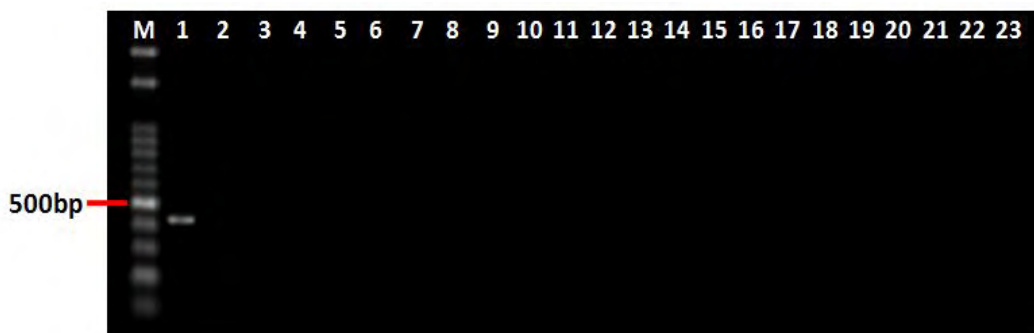


Fig. 5-22. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Xaj-F/Xaj-R and total DNA of *Xanthomonas arboricola* pathovars and *Xanthomonas* spp. Lanes 2-11, *X. arboricola* pvs. *celebensis* DSM 50853, *corylina* DSM 50854, *fragariae* CUNPBL 1773, LMG 19145, LMG 19146, *poinsetticola* ICMP 6274, *populi* CFBP 3123, ICMP 9371, *pruni* X74, X78; lanes 12-16, *X. axonopodis* pvs. *citri* KCTC 2856, *dieffenbachiae* KACC 10460, *glycines* KACC 11147, *malvacearum* DSM 1220, *phaseoli* ATCC 9563; lanes 17-19, *X. campestris* pvs. *armoraciae* NCPPB 1930, *campestris* KACC 10377, *vesicatoria* KACC 11157; lane 20, *X. cucurbitae* ICMP 2309; lane 21, *X. fragariae* NCPPB 1469; lane 22, *X. oryzae* pv. *oryzae* KACC 10331; lane 1, *X. arboricola* pv. *juglandis* NCPPB 1447 as a positive control; lane 23, water as negative control.

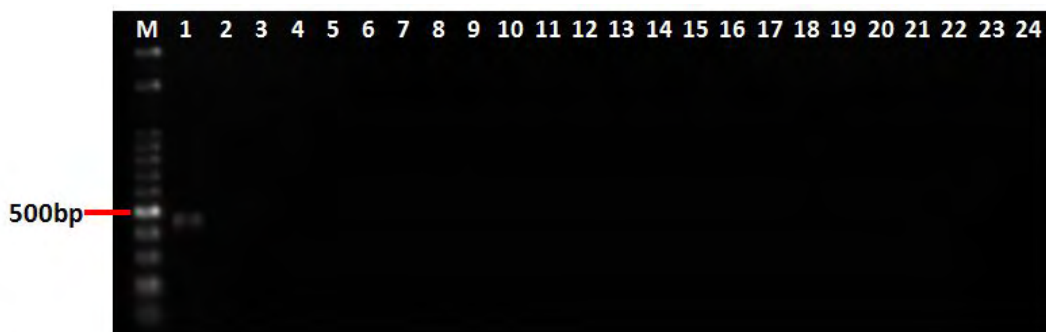


Fig. 5-23. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Xaj-F/Xaj-R and total DNA of plant pathogenic bacteria. Lane 2, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* NCPPB 1011; lanes 4-5, *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* NCPPB 1020, *michiganensis* NCPPB 1064, *sepedonicus* NCPPB 2137; lanes 6-7, *Erwinia amylovora* CNUPBL 354, *E. pyrifoliae* Ep 16; lane 8, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* NCPPB 312; lane 9, *Pseudomonas coronafaciens* ICMP 3113; lanes 10-11, *P. savastanoi* pv. *glycines* NCPPB 1134, *phaseolicola* KACC 10575; lanes 12-17, *P. syringae* pvs. *atrofaciens* ICMP 4394, *syringae* NCPPB 388, *papulans* NCPPB 2847, *persicae* CFBP 1569, *tabaci* ICMP 2835, *tomato* NCPPB 2683; lane 18, *Ralstonia solanacearum* NCPPB 339; lanes 19-22, *Rhizobium radiobacter* DSM 30205, *R. rhizogenens* ATCC 11325, *R. rubi* NCPPB 1854, *R. vitis* NCPPB 3554; lane 23, *Rhodococcus fascians* LMG 3601; lane 1, *X. arboricola* pv. *juglandis* NCPPB 1447

as a positive control; lane 24, water as a negative control.

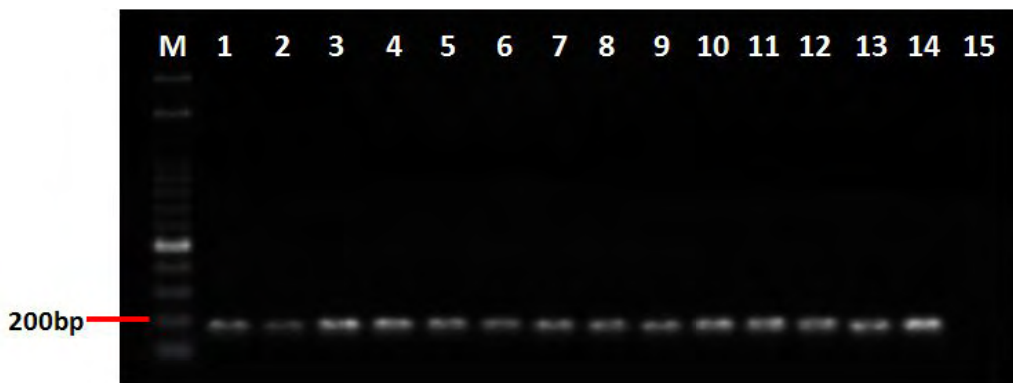


Fig. 5-24. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Xaj-ne-F/Xaj-ne-R and bacterial DNA of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* strains. Lanes 1-14, *X. arboricola* pv. *juglandis* Aus 76583, CRAFRU 1, CRAFRU 23, CRAFRU 60, CRAFRU 63, CRAFRU 71, DSM 1049, INIA 394, NCPPB 362, NCPPB 411, NCPPB 412, NCPPB 1447, PD 130, PD 157; lane 15, water as a negative control.

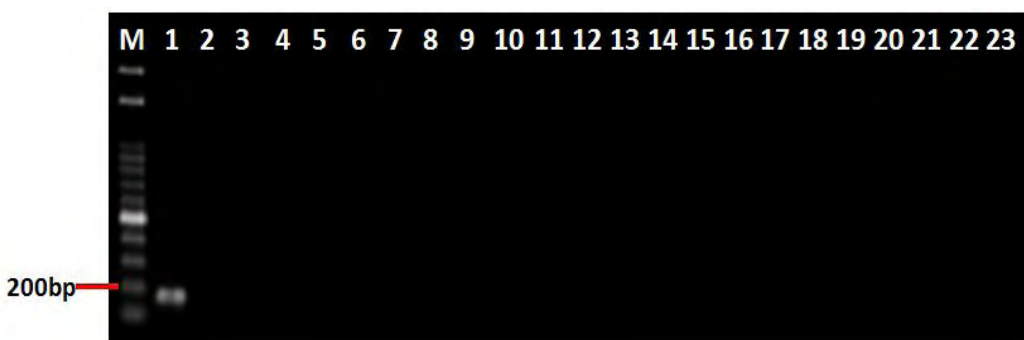


Fig. 5-25. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Xaj-ne-F/Xaj-ne-R and total DNA of *Xanthomonas arboricola* pathovars and *Xanthomonas* spp. Lanes 2-11, *X. arboricola* pvs. *celebensis* DSM 50853, *corylina* DSM 50854, *fragariae* CUNPBL 1773, LMG 19145, LMG 19146, *poinsetticola* ICMP 6274, *populi* CFBP 3123, ICMP 9371, *pruni* X74, X78; lanes 12-16, *X. axonopodis* pvs. *citri* KCTC 2856, *dieffenbachiae* KACC 10460, *glycines* KACC 11147, *malvacearum* DSM 1220, *phaseoli* ATCC 9563; lanes 17-19, *X. campestris* pvs. *armoraciae* NCPPB 1930, *campestris* KACC 10377, *vesicatoria* KACC 11157; lane 20, *X. cucurbitae* ICMP 2309; lane 21, *X. fragariae* NCPPB 1469; lane 22, *X. oryzae* pv. *oryzae* KACC 10331; lane 1, *X. arboricola* pv. *juglandis* NCPPB 1447 as a positive control; lane 23, water as negative control.

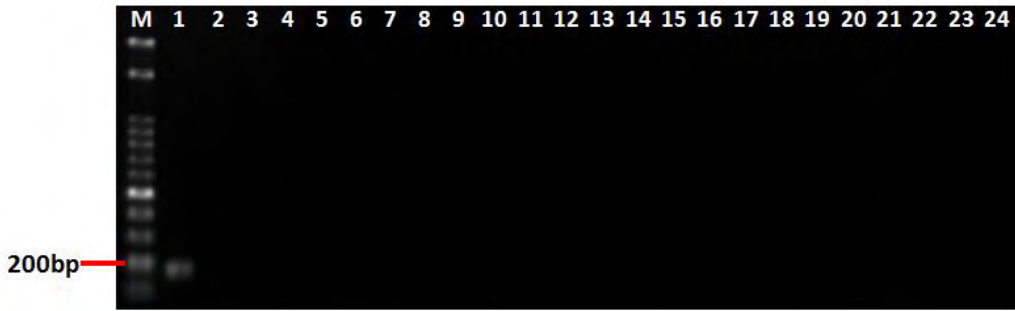


Fig. 5-26. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Xaj-ne-F/Xaj-ne-R and total DNA of plant pathogenic bacteria. Lane 2, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* NCPPB 1011; lanes 4-5, *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* NCPPB 1020, *michiganensis* NCPPB 1064, *sepedonicus* NCPPB 2137; lanes 6-7, *Erwinia amylovora* CNUPBL 354, *E. pyrifoliae* Ep 16; lane 8, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* NCPPB 312; lane 9, *Pseudomonas coronafaciens* ICMP 3113; lanes 10-11, *P. savastanoi* pv. *glycines* NCPPB 1134, *phaseolicola* KACC 10575; lanes 12-17, *P. syringae* pvs. *atrofaciens* ICMP 4394, *syringae* NCPPB 388, *papulans* NCPPB 2847, *persicae* CFBP 1569, *tabaci* ICMP 2835, *tomato* NCPPB 2683; lane 18, *Ralstonia solanacearum* NCPPB 339; lanes 19-22, *Rhizobium radiobacter* DSM 30205, *R. rhizogenens* ATCC 11325, *R. rubi* NCPPB 1854, *R. vitis* NCPPB 3554; lane 23, *Rhodococcus fascians* LMG 3601; lane 1, *X. arboricola* pv. *juglandis* NCPPB 1447 as a positive control; lane 24, water as a negative control.

X. arboricola pv. *juglandis*를 밀도별로 희석하여 현탁액을 이용한 PCR을 수행하였다. *X. arboricola* pv. *juglandis* NCPPB 1447의 세균 현탁액을 사용하여 direct PCR을 수행한 결과, 10^8 , 10^7 , 10^6 cfu/ml의 현탁액에서만 타겟사이즈 481 bp가 증폭되었다(Fig. 5-27).

인공접종한 호두나무의 가지에서 추출액을 얻어 DNA를 분리한 후 PCR을 수행하여 *X. arboricola* pv. *juglandis*의 검출여부를 확인하였다. PCR 프라이머 Xaj-F/Xaj-R을 사용하여 PCR을 수행한 결과, 무처리구에서는 검출되지 않았으며 처리구에서는 인공접종 밀도 $10^8 \sim 10^4$ cfu/ml의 처리구까지 검출이 가능하였다(Fig. 5-28).

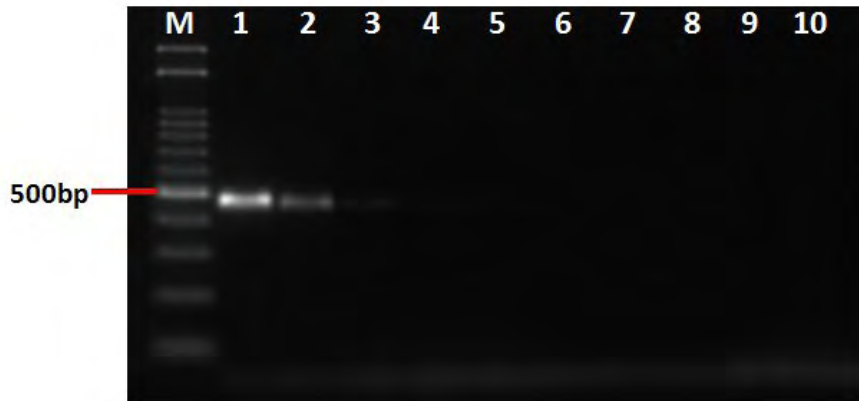


Fig. 5-27. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Xaj-F/Xaj-R and cell suspensions of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* NCPPB 1447. Cell suspensions, lanes 1-9, 10^8 cfu/ml, 10^7 cfu/ml, 10^6 cfu/ml, 10^5 cfu/ml, 10^4 cfu/ml, 10^3 cfu/ml, 10^2 cfu/ml, 10^1 cfu/ml, 1 cfu/ml; lane 10, water as a negative control.

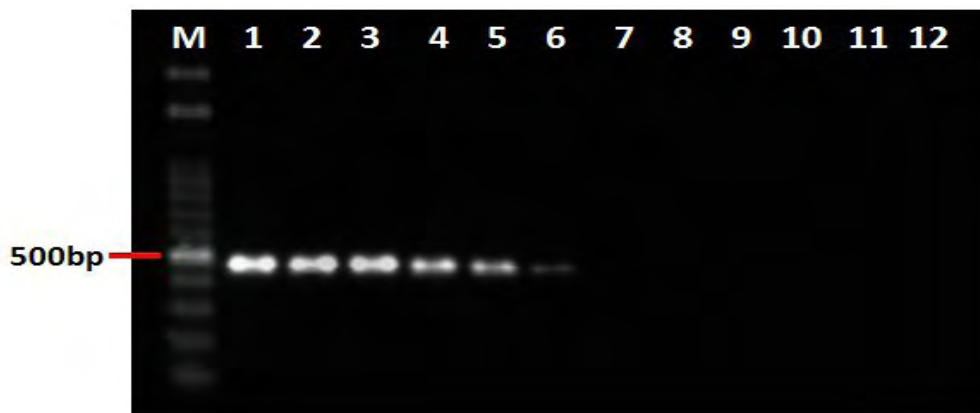


Fig. 5-28. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Xaj-ne-F/Xaj-ne-R and twig extracts of artificially inoculated walnut twigs with *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* NCPPB 1447. Extracts of twigs inoculated with cell suspension, lanes 2-10, 10^8 cfu/ml, 10^7 cfu/ml, 10^6 cfu/ml, 10^5 cfu/ml, 10^4 cfu/ml, 10^3 cfu/ml, 10^2 cfu/ml, 10^1 cfu/ml, 1 cfu/ml; lane 11, extract of twig with water treatment; lane 1, *X. arboricola* pv. *juglandis* NCPPB 1447 as a positive control; lane 12, water as a negative control.

4-4. 복숭아 bacterial dieback 병원균 *Pseudomonas syringae* pv. *persicae*의 PCR 검출법

Pseudomonas syringae pv. *persicae*는 복숭아(peach), 승도복숭아(nectarine) 그리고 자두(Japanese plum)에서만 특이적으로 bacterial dieback를 일으키는 병원균이다 (Vigouroux, 1967; Young, 1987, 1988). 이 병원균은 1967년 프랑스에서 복숭아와 승도복숭아에 병을 일으켜 처음 보고되었으며(Vigouroux, 1967), 현재까지 국내에서는 이 병이 보고된 바가 없어 *P. syringae* pv. *persicae*는 검역대상 병원균으로 지정되어 있다(농림수산검역검사본부, 2012).

복숭아와 승도복숭아에서 이 병원균은 잎과 과일에 반점을 나타나게 하고, 줄기에 마름을 일으킨다(OEPP/EPPO, 2005; Vigouroux, 1970; Young, 1988). 자두에서는 주로 줄기 마름을 유발하며 가끔 줄기가 고사하고 잎에 반점이 생기기도 한다(Young, 1995). 병이 심해지면 나무 전체가 고사하기도 한다(Barzic과 Eric, 1996). 본 연구에서는 *P. syringae* pv. *persicae*를 특이적으로 검출하는 PCR 방법을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

본 연구에 사용한 *Pseudomonas syringae* pv. *persicae*는 총 14균주 (Table 5-17)이며, 비교균주로는 *P. syringae* pathovars 30균주, *Pseudomonas*속 4균주, 대표식물병원세균 16균주이었다(Table 5-18). *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* 특이적 DNA 염기서열을 얻기 위하여 *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* CFBP 1569의 genome sequencing을 NGS로 분석하였고, NGS로 얻어진 draft genome sequence의 분석결과 총 1799개의 contig와 7890개의 ORF를 얻었다. 각 ORF의 염기서열 상동성을 유전자 은행의 알려진 염기서열과 비교하여 상동성이 낮은 ORF로부터 총 65 sets의 프라이머를 제작하여 각 프라이머의 *P. syringae* pv. *persicae*에 대한 특이성을 확인하였다 (Table 5-19). PCR 조건은 95℃ 30초, 60℃ 30초 72℃ 30초 조건으로 35회 증폭 후 72℃ 10분간 최종 증폭하였다.

Table 5–17. List of *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* strains used in this study

Strain	Number ^a	Host	Origin	Year ^c
<i>P. syringae</i> pv. <i>persicae</i>	CFBP 1569 ^b	<i>Prunus persica</i>	France	1969
	CFBP 1572	<i>Prunus persica</i>	France	nk
	NCPPB 2076	<i>Prunus cerasifera</i>	United Kingdom	1966
	NCPPB 2077	<i>Prunus cerasifera</i>	United Kingdom	1966
	NCPPB 3686	<i>Prunus salicina</i>	New Zealand	1980
	ICMP 2126	<i>Prunus salicina</i>	New Zealand	1967
	ICMP 3980	<i>Prunus persica</i>	France	1968
	ICMP 5786	<i>Prunus persica</i> var. <i>nucipersica</i>	New Zealand	1977
	ICMP 7090	<i>Prunus salicina</i>	New Zealand	1980
	ICMP 7092	<i>Prunus salicina</i>	New Zealand	1980
	ICMP 7096	<i>Prunus persica</i>	New Zealand	1980
	ICMP 8783	<i>Prunus persica</i> var. <i>nucipersica</i>	New Zealand	1984
	ICMP 12391	<i>Prunus persica</i>	France	nk
	ICMP 12392	<i>Prunus persica</i>	France	nk

^a CFBP, French Collection of Plant associated bacteria, France; ICMP, International Collection of Micro-organisms from Plants, Landcare Research, New Zealand; NCPPB, National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, UK.

^b This strain was analyzed by NGS.

^c nk, not known.

Table 5–18. List of *Pseudomonas syringae* pathovars, *Pseudomonas* spp. strains and other plant pathogenic bacterial strains used in this study

Strain	Number ^a	Host ^b	Origin ^b	Year ^b
<i>Acidovorax</i>				
<i>avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	NCPBP 1011	<i>Zea mays</i>	USA	1958
<i>Clavibacter</i>				
<i>michiganensis</i> subsp. <i>insidiosus</i>	NCPBP 1020	<i>Medicago sativa</i>	Canada	nk
subsp. <i>michiganensis</i>	NCPBP 1064	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Italy	1961
subsp. <i>sepedonicus</i>	NCPBP 2137	<i>Solanum tuberosum</i>	Canada	nk
<i>Erwinia</i>				
<i>amylovora</i>	CNUPBL 354	<i>Fragaria grandiflora</i>	Korea	2011
<i>pyrifoliae</i>	Ep 16	nk	Japan	nk
<i>Pectobacterium</i>				
<i>carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	NCPBP 312	<i>Solanum tuberosum</i>	Denmark	nk
<i>Pseudomonas</i>				
<i>coronafaciens</i>	ICMP 3113	<i>Avena sativa</i>	United Kingdom	1958
<i>savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	NCPBP 1134	<i>Glycine javanica</i>	Zimbabwe	1961
pv. <i>phaseolicola</i>	KACC 10575	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Poland	nk
pv. <i>savastanoi</i>	NCPBP 639	<i>Olea europaea</i>	Yugoslavia	nk
<i>syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	KACC 10582	<i>Actinidia chinensis</i>	Korea	1999
pv. <i>antirrhini</i>	ICMP 4303	<i>Antirrhinum majus</i>	United Kingdom	1965
pv. <i>aptata</i>	DSM 50252	<i>Beta vulgaris</i>	nk	nk
pv. <i>atrofaciens</i>	ICMP 4394	<i>Triticum aestivum</i>	New Zealand	1968
pv. <i>berberidis</i>	NCPBP 2724	<i>Berberis</i> sp.	New Zealand	1972
pv. <i>ciccaronei</i>	NCPBP 2355	<i>Ceratonia siliqua</i>	nk	1969
pv. <i>delphinii</i>	ICMP 529	<i>Delphinium</i> sp.	New Zealand	1957
pv. <i>dysoxyli</i>	ICMP 545	<i>Dysoxylum spectabile</i>	New Zealand	1949
pv. <i>eriobotryae</i>	NCPBP 2331	<i>Eriobotrya japonica</i>	United Kingdom	1970
pv. <i>garcae</i>	ICMP 4323	<i>Coffea arabica</i>	Brazil	nk
pv. <i>helianthi</i>	NCPBP 1229	<i>Helianthus annuus</i>	Zambia	1962
pv. <i>japonica</i>	ICMP 6305	<i>Hordeum vulgare</i>	Japan	1951
pv. <i>lachrymans</i>	ATCC 11965	<i>Cucumis sativus</i>	nk	nk
pv. <i>lapsa</i>	ATCC 10859	<i>Triticum aestivum</i>	nk	1978

Table 5-18. (continued from preceding page)

Strain	Number ^a	Host ^b	Origin ^b	Year ^b
<i>Pseudomonas</i>				
<i>syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	ICMP 3935	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytiscauliflora</i>	New Zealand	1965
pv. <i>mellea</i>	ICMP 5711	<i>Nicotiana tabacum</i>	Japan	1968
pv. <i>mori</i>	ICMP 4331	<i>Morus alba</i>	Hungary	1958
pv. <i>morsprunorum</i>	ICMP 5795	<i>Prunus domestica</i>	nk	nk
pv. <i>myricae</i>	ICMP 7118	<i>Myrica rubra</i>	Japan	1978
pv. <i>panici</i>	NCPBP 1498	<i>Panicum</i> sp.	nk	nk
pv. <i>papulans</i>	NCPBP 2847	<i>Malus sylvestris</i>	Canada	1968
pv. <i>passiflorae</i>	NCPBP 1386	<i>Passiflora edulis</i>	New Zealand	1962
pv. <i>pisi</i>	ICMP 4433	<i>Pisum sativum</i>	Canada	1946
pv. <i>ribicola</i>	NCPBP 963	<i>Ribes aureum</i>	nk	nk
pv. <i>sesami</i>	NCPBP 1016	<i>Sesamum indicum</i>	Yugoslavia	nk
pv. <i>syringae</i>	NCPBP 388	<i>Oryza sativa</i>	Hungary	nk
pv. <i>tabaci</i>	ICMP 2835	<i>Nicotiana tabacum</i>	Hungary	1959
pv. <i>tagetis</i>	ICMP 4091	<i>Tagetes erecta</i>	Zimbabwe	1972
pv. <i>tomato</i>	NCPBP 2683	<i>Lycopersicon esculentum</i>	New Zealand	1972
pv. <i>ulmi</i>	NCPBP 632	<i>Ulmus</i> sp.	Yugoslavia	1958
<i>Ralstonia</i>				
<i>solanacearum</i>	NCPBP 339	<i>Solanum tuberosum</i>	Israel	nk
<i>Rhizobium</i>				
<i>radiobacter</i>	DSM 30205	<i>Malus</i> sp.	nk	1972
<i>rhizogenens</i>	ATCC 11325	<i>Malus domestica</i>	nk	nk
<i>rubi</i>	NCPBP 1854	<i>Rubus ursinus</i> var. <i>loganobaccus</i>	USA	1942
<i>vitis</i>	NCPBP 3554	<i>Vitis vinifera</i>	Australia	1977
<i>Rhodococcus</i>				
<i>fascians</i>	LMG 3601	<i>Lilium speciosum</i> cv. <i>Rubrum</i>	Belgium	nk
<i>Xanthomonas</i>				
<i>axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	KCTC 2856	nk	Japan	nk
<i>campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	KACC 11157	<i>Capsicum annum</i>	Korea	1999
<i>oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	KACC 10331	<i>Oryza sativa</i>	Korea	nk

^a ATCC, American Type Culture Collection, USA; CFBP, French Collection of Plant associated bacteria, France; CNUPBL, Chungbuk National University Plant Bacteriology and molecular genetics Lab., Rep. of Korea; DSM, DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Germany; ICMP, International Collection of Micro-organisms from Plants, Landcare Research, New Zealand; KACC, Korean Agricultural Culture Collection, Rural Development Administration, Rep. of Korea; KCTC, Korean Collection for Type Culture, Rep. of Korea; LMG, Collection of the Laboratorium voor Microbiologie en Microbiele Genetica, Ghent University, Belgium; NCPBP, National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, United Kingdom.

^b nk, not known.

Table 5-19. List of primers used in this study

Primers	Forward	Reverse
Per	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
Per-ne	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
Per01	CGCGTCAATGGACAGAGTATT	CCGGAACAAAGCCATACATC
Per02	CCTGATACTGACTGCGCTGA	TCTGTGTTTGGCGAGTATGC
Per03	AATTTGAACCCTGACGTTGC	TTACCTGAACACCCCGTCTC
Per04	CCGGGTAGGTATGGAAGGTT	GCATTGTTATTGAGCGCAGA
Per05	GGATACGGAACGTGCTTCAT	CAAGCGAGACTGTTTGTCCA
Per06	CGCACCATTCTGTTAAGGTTT	AACCACGGAACACATCATCA
Per07	ACGCAGAGGTTGCAGCTTAC	AGCTCCACGCATACGTTTAC
Per08	CGCACTAGCAGCAGCCTTAT	GAAACACCATTACCCGCAGT
Per09	TGTCCTCCTGCAGGTAATAGG	TACGACAGGTCCGCTCTAA
Per10	GCCATTAAAGACACCGCATT	GGAAATTTTCAGCCAGGTCA
Per11	GGTAGAGCTTGTTTCGCAAGG	GCTATCGAGTAGCCGCATTTC
Per12	GACTACATGCCCCATTTGCT	GCCTACCTCGCTAATCATGC
Per13	ACTCCAGAAAGCCCAGTCCT	ACATCGAAGCCCTGAAAGAA
Per14	TAGCAGAGACTTGCGCAGAA	ATTGGTCGTCTTCGTCTTCG
Per15	CGCCGAGGTTGAGTCACTAT	TTGTGACAAGGGCATATCCA
Per16	GCTGTCAATTCCTGCAATCA	TGCGACAACCTTCGTCAGACT
Per17-1	GGTCACACGACTGATTTTCG	GATGTCCATCCCAGTTCCAG
Per17-2	CACACTTCCAGGATGCGTCT	GGCTTGTTCTCGGCATAGAG
Per17-3	GGGACTTGCACCAAGAGGTA	GCTGTCCCTTGAATTCTTCC
Per17-4	ACAGTCGCCGCTATTACTGC	TTCAGGCCCTGCGTTATCAG
Per17-5	CGGAAGACTACGTCCTGCAA	AGGCAACTTCTATGGCCTCA
Per17-6	AGATCCACGTCACGCATCTT	TCGCGAGGAATAAACTGGTC
Per17-7	GGTCACACGACTGATTTTCG	CAGCGTTTCTGCCACAGTTA
Per17-8	TATCGAAGATGCTGCCACTG	GAAGTGTGCACCGTACGAAA
Per18	GAAAGGCGCACTGTTTCTC	GTCAGGTGCGCTGTAAGTCA
Per19	AGGATGCCATCGTAAAAACG	AGGCGGTTAGCCTTACCAAT
Per20	TCTGGTGGTTGAGCTGTCTG	TTACGCTCCCACAAGGTTTC
Per21	GTGAAGGCTTTCTGGCTGAC	CTGGCTTGTTTCTCCAGAG
Per22	CTTCGATCGATGATGGGTCT	TAGATGACCGGCAGGTAAGG
Per23	GGCAATGCAATTTACGACCT	GGCCTTGCTTGAAATGTGT
Per24	TGCTGAGCTACACACCCAAG	CTCTACGTTGGCCAATCCAT
Per25	GGCTTTGTTACGCAGAAAGG	CGCTGGTGACTGGTGTTTTA
Per26	CGATCGTATCCTCGAGCTTC	TTCAGCAGGGTTGATTTTCC
Per27	ACCAGTACTTGCCCTGGATG	CTTCCTGAACCCAGGATGAT
Per28	CGGTGACATTCAGTGGTTCA	CCTTATGGCGCAAGATCAGT
Per29	ACGAACACGAGGGAGACATT	GTGGGCTCGTTCTTCTGTGTC
Per30	TAGCGACCCAGATGCGTAAT	AGTACCCCAAGCATTGGACAC
Per31	TGCAGGAGTACCACGTCATC	GGCCTTCAAATAGGGGTGT
Per32	CAAGGACTGGATCGAAATGG	GTTAGCGATACCGTCCCAAC
Per33	AAGCCTTCGTCTGCTGGTAA	TAAAGCGGTGAGACCAAACC
Per34	AAATCATCGCTGCTGCCTAT	TGTAATCGCGAGTGTCTGAAG
Per35	CGCGACCGTTCAGGATAATA	TAAAAACGCCCCACGTTAAG
Per36	CCGTATCTGCCAGAAAAAGC	CTTCAACCTGCCCAACTGTC
Per37	TTGGAACGCGCAGTTCTACT	GGAAATCGCTGCTTTAATCG
Per38	AATTCATCGACCGAACCATC	TCATCACCGCAGTGTCTAGC
Per39	CTTCCAGGCACAGGAAAAAC	GGGCAGAAATCGGTTAACAA
Per40	CCTTTTTGATCCGCTCTTTG	GGCATCAAGCCAAAATCAGT
Per41	TCCCATCTTTTCCGTAGTGC	TGGGCAACCTATCAATAGCC

Table 5-19. (continued from preceding page)

Primers	Forward	Reverse
Per17-ne01	CCCCAGCGATTTACAATGAC	AGGCAACTTCTATGGCCTCA
Per17-ne02	GGAAGTGGGATGGACATCAG	CACTTTGTATGGGGCTTCGT
Per17-ne03	TATCGAAGATGCTGCCACTG	TGTGACCACATTGACCGTTT
Per17-ne04	GGCCATAGAAAGTTGCCTGTC	GGCTTGTCTCGGCATAGAG
Per17-ne05	GAATTC AAGGGACAGCATCG	GACGCAATAGCAGTGTGGA
Per17-ne06	CGTGATCCATGACGACAAAAG	TCGCGAGGAATAAACTGGTC
Per17-ne07	GGGACTTGCACCAAGAGGTA	GCAGTAATAGCGGCGACTGT
Per17-1-ne	CCTGCAAGAAGGAAATCGAC	GAAGTGTGCACCGTACGAAA
Per17-2-ne	GGAAGTGGGATGGACATCAG	CACTTTGTATGGGGCTTCGT
Per17-4-ne	CCCCAGCGATTTACAATGAC	AGGCAACTTCTATGGCCTCA
Per17-4-ne	GGAAGTGGGATGGACATCAG	CACTTTGTATGGGGCTTCGT
Per17-5-ne	ACGTGATCCATGACGACAAA	ATATCCCATTTCCTCGAGTT
Per17-6-ne	AGGCTGGAAACGGTCAATGT	CGCTCTACCTCTTGGTGCAA
Per17-7-ne	CGGAAGACTACGTCCTGCAA	GGAAGTGTGCACCGTACGAA
Per17-8-ne	CCGCAGTCGTAGCTGAAAAA	TGACCACATTGACCGTTTCC

결과

제작된 PCR 프라이머의 특이성을 확인하기 위해 *P. syringae* pv. *persicae* 14균주와 다른 *Pseudomonas*속 34균주, 그리고 대표 식물병원세균 16균주의 DNA를 분리하여 PCR을 수행하였다. *P. syringae* pv. *persicae* 14균주의 DNA와 PCR 프라이머를 사용하여 PCR을 수행한 결과, *P. syringae* pv. *persicae* 14균주의 DNA로부터 모두 485 bp와 166 bp로 증폭된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5-29, 5-32). *P. syringae* pv. *persicae* 14균주 이외의 다른 *Pseudomonas*속 34균주와 대표 식물병원세균 16균주의 DNA를 사용하여 PCR을 수행한 결과, 프라이머 Per-F/Per-R를 사용하여 PCR을 수행하였을 때에는 *P. syringae* pvs. *delphinii* ICMP 529, *lapsa* ATCC 10859, *ulmi* NCPPB 632에서만 동일한 타겟사이즈가 소량 증폭되었고(Fig. 5-30), 프라이머 Per-ne-F/Per-ne-R를 사용하여 PCR을 수행하였을 때에는 *P. savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 639와 *P. syringae* pv. *mellea* ICMP 5711 이외에 몇 개의 다른 *P. syringae* pathovar들의 DNA에서 타겟사이즈의 DNA가 약하게 증폭되었다(Fig. 5-33). 그러나 식물병원세균 16균주의 DNA에서는 타겟사이즈가 증폭되지 않았다(Fig. 5-31, 5-34).

P. syringae pv. *persicae* 에 대한 특이적 프라이머를 찾기 위해서 NGS를 통한 draft genome sequence를 얻고 다른 알려진 유전자와 상동성이 낮은 ORF에서 65 set의 프라이머를 제작하여 특이성을 찾았지만 완벽하게 *P. syringae* pv. *persicae*에서만 특이적 DNA를 증폭하는 프라이머는 찾지 못하였고, 지금까지는 Per-F/R와 Per-ne-F/R가 가장 우수한 프라이머로 나타났다.

최종 프라이머 선별된 프라이머인 Per-F/R와 Per-ne-F/R는 contig 64번(11354 bp) 내부에 존재하는 ORF 3번(1062 bp)의 염기서열에서 제작하였다. ORF 3번의 염기서열로 BLASTN한 결과, 일치하는 유전자 서열이 없는 것으로 나타났다. 마찬가지로 프라이머 Per-F/Per-R의 증폭서열(485 bp)과 Per-ne-F/Per-ne-R의 증폭서열(166 bp)의 BLASTN 결과에서도 일치하는 유전자 서열이 없는 것으로 나타났다.

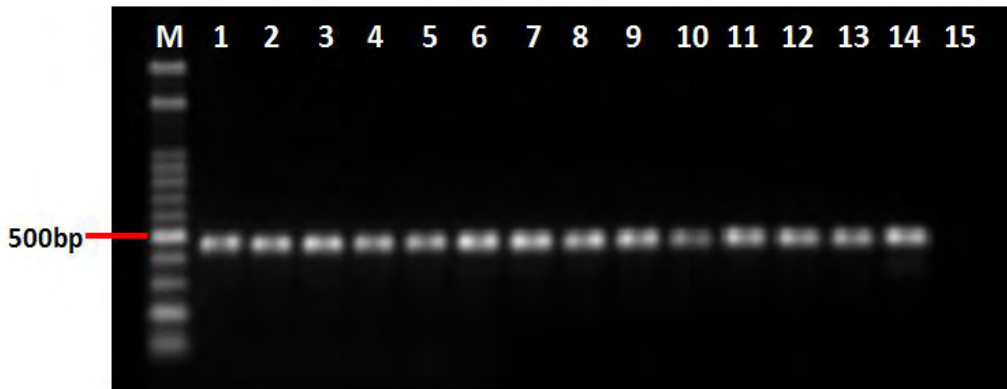


Fig. 5-29. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Per-F/Per-R and bacterial DNA of *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* strains. Lanes 1-14, *P. syringae* pv. *persicae* CFBP 1569, CFBP 1572, NCPPB 2076, NCPPB 2077, NCPPB 3686, ICMP 2126, ICMP 3980, ICMP 5786, ICMP 7090, ICMP 7092, ICMP 7096, ICMP 8783, ICMP 12391, ICMP 12392; lane 15, water as a negative control.



Fig. 5-30. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Per-F/Per-R and total DNA of *Pseudomonas syringae* pathovars and *Pseudomonas* spp. Lane 2, *P. coronafaciens* ICMP 3113; lanes 4-5, *P. savastanoi* pvs. *glycinea* NCPPB 1134, *phaseolicola* KACC 10575, *savastanoi* NCPPB 639; lanes 6-35, *P. syringae* pvs. *actinidiae* KACC 10582, *antirrhini* ICMP 4303, *aptata* DSM 50252, *atrofaciens* ICMP 4394, *berberidis* NCPPB 2724, *ciccaronei* NCPPB 2355, *delphinii* ICMP 529, *dysoxyli* ICMP 545, *eriobotryae* NCPPB 2331, *garcae* ICMP 4323, *helianthi* NCPPB 1229, *japonica* ICMP 6305, *lachrymans* ATCC 11965, *lapsa* ATCC 10859, *maculicola* ICMP 3935, *mellea* ICMP 5711, *mori* ICMP 4331, *morsprunorum* ICMP 5795, *myricae* ICMP 7118, *panici* NCPPB 1498, *papulans* NCPPB 2847, *passiflorae* NCPPB 1386, *pisi* ICMP 4433, *ribicola* NCPPB 963, *sesami* NCPPB 1016, *syringae* NCPPB 388, *tabaci* ICMP 2835, *tagetis* ICMP 4091, *tomato* NCPPB 2683, *ulmi* NCPPB 632; lane 1, *P. syringae* pv. *persicae* CFBP 1569 as a positive control; lane 36, water as negative control.

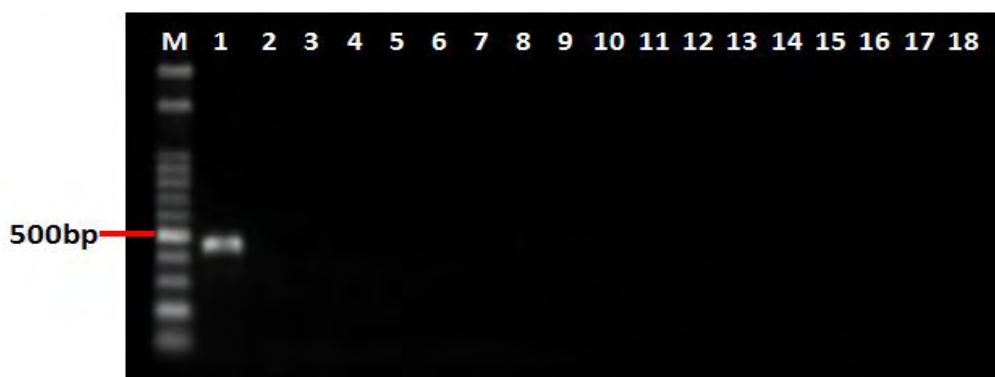


Fig. 5-31. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Per-F/Per-R and total DNA of plant pathogenic bacteria. Lane 2, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* NCPPB 1011; lanes 4-5, *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* NCPPB 1020, *michiganensis* NCPPB 1064, *sepedonicus* NCPPB 2137; lanes 6-7, *Erwinia amylovora* CNUPBL 354, *E. pyrifoliae* Ep 16; lane 8, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* NCPPB 312; lane 9, *Ralstonia solanacearum* NCPPB 339; lanes 10-13, *Rhizobium radiobacter* DSM 30205, *R. rhizogenens* ATCC 11325, *R. rubi* NCPPB 1854, *R. vitis* NCPPB 3554; lane 14, *Rhodococcus fascians* LMG 3601; lanes 15-17, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* KCTC 2856, *X. campestris* pv. *vesicatoria* KACC 11157, *X. oryzae* pv. *oryzae* KACC 10331; lane 1, *P. syringae* pv. *persicae* CFBP 1569 as a positive control; lane 18, water as a negative control.



Fig. 5-32. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Per-ne-F/Per-ne-R and bacterial DNA of *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* strains. Lanes 1-14, *P. syringae* pv. *persicae* CFBP 1569, CFBP 1572, NCPPB 2076, NCPPB 2077, NCPPB 3686, ICMP 2126, ICMP 3980, ICMP 5786, ICMP 7090, ICMP 7092, ICMP 7096, ICMP 8783, ICMP 12391, ICMP 12392; lane 15, water as a negative

control.



Fig. 5-33. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Per-ne-F/Per-ne-R and total DNA of *Pseudomonas syringae* pathovars and *Pseudomonas* spp. Lane 2, *P. coronafaciens* ICMP 3113; lanes 4-5, *P. savastanoi* pvs. *glycinea* NCPPB 1134, *phaseolicola* KACC 10575, *savastanoi* NCPPB 639; lanes 6-35, *P. syringae* pvs. *actinidiae* KACC 10582, *antirrhini* ICMP 4303, *aptata* DSM 50252, *atrofaciens* ICMP 4394, *berberidis* NCPPB 2724, *ciccaronei* NCPPB 2355, *delphinii* ICMP 529, *dysoxylis* ICMP 545, *eribotryae* NCPPB 2331, *garcae* ICMP 4323, *helianthi* NCPPB 1229, *japonica* ICMP 6305, *lachrymans* ATCC 11965, *lapsa* ATCC 10859, *maculicola* ICMP 3935, *mellea* ICMP 5711, *mori* ICMP 4331, *morsprunorum* ICMP 5795, *myricae* ICMP 7118, *panici* NCPPB 1498, *papulans* NCPPB 2847, *passiflorae* NCPPB 1386, *pisi* ICMP 4433, *ribicola* NCPPB 963, *sesami* NCPPB 1016, *syringae* NCPPB 388, *tabaci* ICMP 2835, *tagetis* ICMP 4091, *tomato* NCPPB 2683, *ulmi* NCPPB 632; lane 1, *P. syringae* pv. *persicae* CFBP 1569 as a positive control; lane 36, water as negative control.

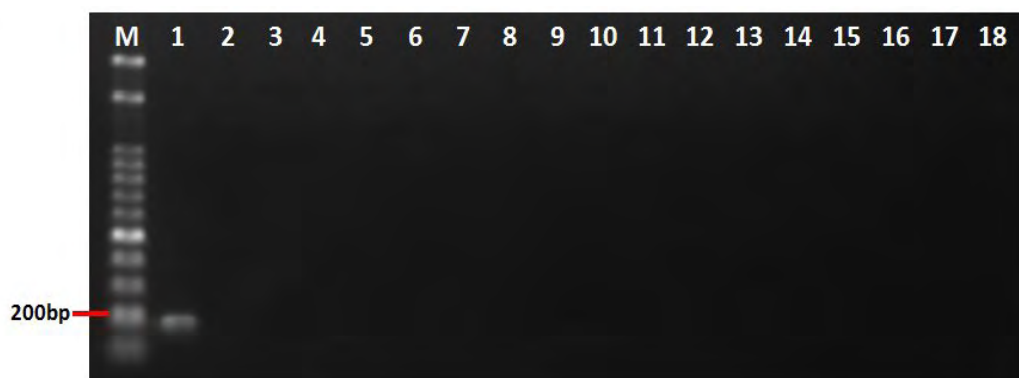


Fig. 5-34. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Per-ne-F/Per-ne-R and total DNA of plant pathogenic bacteria. Lane 2, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* NCPPB 1011; lanes 4-5, *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* NCPPB 1020, *michiganensis* NCPPB 1064, *sepedonicus* NCPPB 2137; lanes 6-7, *Erwinia amylovora* CNUPBL 354, *E. pyrifoliae* Ep 16; lane 8, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* NCPPB 312; lane 9, *Ralstonia solanacearum* NCPPB 339; lanes 10-13, *Rhizobium radiobacter* DSM 30205, *R. rhizogenens* ATCC 11325, *R. rubi* NCPPB 1854, *R. vitis* NCPPB 3554; lane 14,

Rhodococcus fascians LMG 3601; lanes 15-17, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* KCTC 2856, *X. campestris* pv. *vesicatoria* KACC 11157, *X. oryzae* pv. *oryzae* KACC 10331; lane 1, *P. syringae* pv. *persicae* CFBP 1569 as a positive control; lane 18, water as a negative control.

5. 맥류 Basal Glume Rot 병원균 *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*의 PCR 검출법

Pseudomonas syringae pv. *atrofaciens*는 주로 밀, 보리 등의 맥류에 Basal Glume Rot을 일으켜 경제적인 손실을 일으키며(Bradbury, 1986), 중앙유럽과 동유럽에서 발병정도가 심하다(Al-Sallami, F. et al., 1997; Bazzi, C. et al., 1997; Toben, H. et al., 1990; Von Kietzel et al., 1997). 유럽 이외에도 남아프리카, 북아메리카, 오스트레일리아, 뉴질랜드 등 전 세계적으로 발병된 보고가 있으나(Bradbury, 1986), 국내에서는 아직 발병 보고가 없어 식물검역 대상세균으로 지정되어 관리되고 있다. 하지만 현재까지 *P. syringae* pv. *atrofaciens*를 검출 가능한 방법들이 제시되어 있지 않아 그에 대한 검출법 개발이 시급한 실정이다. 본 연구에서는 *P. syringae* pv. *atrofaciens*를 특이적으로 검출하는 PCR 방법을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

본 연구에 사용한 *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*는 총 9균주 (Table 5-20)이며, 비교균주로는 *P. syringae* pathovars 30균주, *Pseudomonas*속 4균주, 대표식물병원세균 16균주이었다(Table 5-21). *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* 특이적 DNA 염기서열을 얻기 위하여 *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* LMG 5095의 genome sequencing을 NGS로 분석하였고, NGS로 얻어진 draft genome sequence의 분석결과 총 1038개의 contig와 7500개의 ORF를 얻었다. 각 ORF의 염기서열 상동성을 유전자 은행의 알려진 염기서열과 비교하여 상동성이 낮은 ORF로부터 총 86 sets의 프라이머를 제작하여 각 프라이머의 *P. syringae* pv. *persicae*에 대한 특이성을 확인하였다 (Table 5-22). PCR 조건은 94°C 30초, 60°C 또는 62°C 30초 72°C 30초 조건으로 30회 증폭 후 72°C 10분간 최종 증폭하였다.

Table 5-20. Strains of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* used in this study

Strain ^a	Host	Origin	Isolated by
LMG 5001	Triticum aestivum (Aestivum Group), glume rot		E. smith
LMG 5095 ^b	Triticum aestivum (Aestivum Group), leaf	New Zealand	J. Wilkie
LMG 5534	Triticum aestivum (Aestivum Group)		D. Dye
LMG 5535	Triticum aestivum (Aestivum Group)	New Zealand	D. Dye
LMG 5647	Panicum miliaceum	Australia	A. Hayward
ICMP 1913	Triticum aestivum (as <i>Triticum aestivum</i> L.)	New Zealand	D. W. Dye
ICMP 5016	Hordeum vulgare (as <i>Hordeum vulgare</i> L.)	Canada	NCPPB
ICMP 9389	Triticum aestivum (part: grain)	Bulgaria	V. I. Vassilev
ICMP 9394	Triticum aestivum	USSR	V. I. Vassilev

^aLMG, Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms(BCCM); ICMP, International Collection of Microorganisms from Plant.

^b This strains was used for genome sequencing by NGS.

Table 5-21. List of *Pseudomonas syringae* pathovars and other plant-pathogenic bacterial strains used in this study

Strain	Number ^a	Host	Origin ^b	Year ^b
<i>P. syringae</i> pathovars				
pv. <i>actinidiae</i>	KACC 10582	<i>Actinidiachinensis</i>	Korea	1999
pv. <i>antirrhini</i>	ICMP 4303	<i>Antirrhinummajus</i>	UK	1965
pv. <i>aptata</i>	DSM 50252	<i>Beta vulgaris</i>	nk	nk
pv. <i>atrofaciens</i>	ICMP 4394	<i>Triticum aestivum</i>	New Zealand	1968
pv. <i>berberidis</i>	NCPPB 2724	<i>Berberis</i> sp.	New Zealand	1972
pv. <i>ciccaronei</i>	NCPPB 2355	<i>Cerantonis siliqua</i>	nk	1969
pv. <i>coronagaciens</i>	LMG 2170	<i>Bromus</i> sp.	Canada	1962
pv. <i>delphinii</i>	ICMP 529	<i>Delphinium</i> sp.	New Zealand	1957
pv. <i>dysoxyli</i>	ICMP 545	<i>Dysoxylum spectabile</i>	New Zealand	1949
pv. <i>eriobotryae</i>	NCPPB 2331	<i>Eriobotrya japonica</i>	UK	1970
pv. <i>garcae</i>	LMG 5064	<i>Coffea arabica</i>	Brazil	nk
pv. <i>helianthi</i>	NCPPB 1229	<i>Helianthus annuus</i>	Zambia	1962
pv. <i>japonica</i>	ICMP 6305	<i>Hordeum vulgare</i>	Japan	1951
pv. <i>lachrymans</i>	ATCC 11965	<i>Cucumis sativus</i>	nk	nk
pv. <i>lapsa</i>	ATCC 10859	<i>Triticum aestivum</i>	nk	1978
pv. <i>maculicola</i>	ICMP 3935	<i>Brassicaoleracea</i> var. <i>botrytiscauliflower</i>	New Zealand	1965
pv. <i>mellea</i>	ICMP 5711	<i>Nicotiana tabacum</i>	Japan	1968
pv. <i>mori</i>	ICMP 4331	<i>Morus alba</i>	Hungary	1958
pv. <i>morsprunorum</i>	ICMP 5795	<i>Prunus domestica</i>	nk	nk
pv. <i>myricae</i>	ICMP 7118	<i>Myrica rubra</i>	Japan	1978
pv. <i>panici</i>	NCPPB 1498	<i>Panicum</i> sp.	nk	nk
pv. <i>papulans</i>	ICMP 4040	<i>Malus domestica</i>	USA	nk
pv. <i>passiflorae</i>	NCPPB 1386	<i>Passiflora edulis</i>	New Zealand	1962
pv. <i>persicae</i>	NCPPB 2761	<i>Prunus persica</i>	France	1975
pv. <i>pisi</i>	ICMP 4433	<i>Pisum sativum</i>	Canada	1946
pv. <i>ribicola</i>	NCPPB 963	<i>Ribes aureum</i>	nk	nk
pv. <i>sesami</i>	NCPPB 1016	<i>Sesamum indicum</i>	Yugoslavia	nk
pv. <i>syringae</i>	NCPPB 388	<i>Oryza sativa</i>	Hungary	nk
pv. <i>tabaci</i>	ICMP 2835	<i>Nicotiana tabacum</i>	Hungary	1959
pv. <i>tagetis</i>	ICMP 4091	<i>Tagetes erecta</i>	Zimbabwe	1972
pv. <i>tomato</i>	NCPPB 2683	<i>Lycopersicon esculentum</i>	New Zealand	1972
pv. <i>ulmi</i>	NCPPB 632	<i>Ulmus</i> sp.	Yugoslavia	1958
<i>P. savastanoi</i> pathovars				
pv. <i>glycinea</i>	NCPPB 1134	<i>Glycine javanica</i>	Zimbabwe	1961
pv. <i>phaseolicola</i>	KACC 10575	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Poland	nk
pv. <i>savastanoi</i>	NCPPB 639	<i>Olea europaea</i>	Yugoslavia	nk

Table 5-21. Continued

Strain	Number ^a	Host	Origin ^b	Year ^b
<i>Acidovorax</i>				
<i>avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	NCPBP 1011	<i>Zea mays</i>	USA	1958
<i>Clavibacter</i> spp.				
<i>michiganensis</i> subsp. <i>insidiosus</i>	NCPBP 1020	<i>Medicago sativa</i>	Canada	nk
<i>michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	NCPBP 1064	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Italy	1961
<i>michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	NCPBP 2137	<i>Solanum tuberosum</i>	Canada	nk
<i>Erwinia</i>				
<i>amylovora</i>	CNUPBL 354	<i>Fragaria grandiflora</i>	Korea	2011
<i>pyrifoliae</i>	Ep16	nk	Japan	nk
<i>Pectobacterium</i>				
<i>carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	NCPBP 312	<i>Solanum tuberosum</i>	Denmark	nk
<i>Ralstonia</i>				
<i>solanacearum</i>	NCPBP 339	<i>Solanum tuberosum</i>	Israel	nk
<i>Rhizobium</i>				
<i>radiobacter</i>	DSM 30205	<i>Malus</i> sp.	nk	1972
<i>rhizogenes</i>	ATCC 11325	<i>Malus domestica</i>	nk	nk
<i>rubi</i>	NCPBP 1854	<i>Rubus ursinus</i> var. <i>loganobaccus</i>	USA	1942
<i>vitis</i>	NCPBP 3554	<i>Vitis vinifera</i>	Australia	1977
<i>Rhodococcus</i>				
<i>fascians</i>	LMG 3601	<i>Lillium speciosum</i> cv. <i>Rubrum</i>	Belgium	nk
<i>Xanthomonas</i>				
<i>campestris</i> pv. <i>campestris</i>	KACC 10377	nk	Japan	nk
<i>campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	KACC 11157	<i>Capsicum annum</i>	Korea	1999
<i>oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	KACC 10331	<i>Oryza sativa</i>	Korea	nk

^a ATCC, American Type Culture Collection; CNUPBL, Chungbuk National University Plant Bacteriology Laboratory; DSM, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ); ICMP, International Collection of Microorganisms from Plant; KACC, Korean Agricultural Culture Collection; LMG, Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms(BCCM); NCPBP, National Collection of Plant Pathogenic Bacteria.

^b nk : Not known.

Table 5-22. Primers used in this study

Primer	Forward(5'-3')	Reverse(5'-3')
Psa-42-477	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
Psa-42-ne-333	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
Psa-01-468	CTGCTGCGAAGGAAAATCTC	CTGCGCCTGCTACATTGATA
Psa-02-435	TGCAACGTCTCCTGAGTCAA	TTTCGCGTGTTAATGGATCA
Psa-04-468	AGTGGGAGGCTTGGATACCT	TATCCGCATGTCTGGCTGTA
Psa-04-487	ACTTTGGAGCAGATCGCAGT	GCTCGATAAAGTTCGTCTTCG
Psa-05-419	ATTACCTGCCGATTCACTGG	TTCTTCTTCACTGGGCGACT
Psa-06-544	CTCGCATCCTGTTGCTCTAT	CTCTCTCGACCTCGTACCAA
Psa-07-481	CTAACACCAGCCAAACAACC	GCTGATTGAATAGCCTGCAT
Psa-08-362	AGCAATTGTTATGCGGAACC	TCCTGTATGTGCCAATCCAA
Psa-09-492	GCGTTTCAACGCTATCAAGA	CAGCACGTAGCCTTTTTTCAA
Psa-09A-430	ATAGAGAGCCGCAGCCACTG	GTTTCGCTTGAGGGATGTGG
Psa-10-438	CGTGAATGGAGTTGCATCAG	TACGGTGTACGCAATGCTTC
Psa-11-465	AGGTCCATGCTCCTTTTCCT	ACCCATAATCTTGGCAGCAC
Psa-12-418	GAATCCGCAGGATTACGAGA	TGGAGAGAGCTGGGATAGGA
Psa-14-477	ATGGTCCCAACCATCATCAA	GGCATATGCTGCAAGTGGAT
Psa-14-462	CGCTCTGGATGTATGCTGAA	CTTGCCAGCCATTAACCAAT
Psa-15-461	GACCCGGATGTTGACTACAC	ATTTAGACGCTGAACGCATC
Psa-16-505	ATGGAGGTGTGCTTGAAGAG	AACTCGAGGGGACTTTCACT
Psa-17-427	TCATTCTGGGTATTGCCACT	AATGTAATGTCCTCGCGTTC
Psa-18-494	TCAGGTTTTCCAGCTGTCTC	CGCGAACCTTGTCATGACT
Psa-19-415	ATGGATGGCTATCAGCTTTG	GGATATTGCTACGCAGGCTA
Psa-20-482	CTTAACCTTGACCGTGTGG	ACCTCATCAGTGAACCCGTA
Psa-21-400	AGTCGGTGCAAGTAGTCTGG	AGGGTCGGCTCGTCTATATC
Psa-22-458	ATCGCGCTGATAAAAGTGCT	TAGATCCGCTCAAGCAACCT
Psa-24-475	TGGAGCGGCATTCAATACTC	CGTTAGGAACTGGGTCCACA
Psa-24-453	CTACCTACCGCAACATCTGG	AATCCATAGTGAACGCAACG
Psa-24A-201	TCTCTCCCAAGGCGATGATT	TGCGGTAGGTAGCGTTCTCA
Psa-24B-208	CCGGATGCCATCTGTTCAT	TGGGCTGGAAGAACTCTACG
Psa-24C-302	GACGCTTGCGTCAGTTTCTG	AATCATCGCCTTGGGAGAGA
Psa-24D-388	ACCAAGCGTTTCTGGTCACT	GAATTCTGGCAGTTGGCTTC
Psa-25-446	TCACTTCAGTGCCTTCAAGC	TGACCTCACGGTCTCATTA
Psa-26-368	GGTCATCTGCGGAGGCTATC	GCCGGTATCTGGACTCTTCG
Psa-27-426	CGGATTACACGAAAGGCAAT	GGCCCACAGGAAGTTCAATA
Psa-28-514	TTGACGGAGTGCTGAGACCT	CTTTCGAAGGCTTGCAACTG
Psa-28A-475	TCATCCCTCCGAACTCATTG	TTCGATTTGATCGTTCGCTCT
Psa-28B-290	GCTATGACCCTGGACATTTG	CAGCCAGATTTGATTTGAT
Psa-29-400	GATCGTGTGTTGTCGTGTTGG	CAGGTATTTCGCCGTTGAGAT
Psa-30-500	GATGGAGGAGTGGTTCCTGA	GAAGCTCAAGGTCTCGGTTG
Psa-31-563	GCAACGAGTACGGGATCATT	GGGAACCGGGTGATAAATCT

Table 5-22. Continued

Primer	Forward(5'-3')	Reverse(5'-3')
Psa-31A-534	CAGTCTGGCCTACTGGAGAA	TGGTGAATCGTATTGACGTG
Psa-31B-398	CCAGGACATCAAAAACCGAGT	CTCGGGCAGCTAACCAGTAG
Psa-32-422	GGGATGAACAGCACAATCCT	GGTGTCCAATCTACGCGTTT
Psa-34-430	AGGCGAAGTCGTTTACGAGA	ACAGAAGGCCTCAACGAGAA
Psa-34-357	CCGTCTCGTGAATGGATCTT	TATGCCGCACTCAGATAACG
Psa-35-491	ACAACACCCCTCGAATTACGC	GTTCAGATGCTCAGCCATGA
Psa-36-455	TTCTATCCGCTGGGTACTGG	ACACCGTGATGTTGGAGTGA
Psa-37-243	GCGTCGGGTGATGATAAGAT	ACCTTCACCAAACCTCGATGG
Psa-38-473	GGTGTGAGCAGCAGCTCATA	CCTTTTCGAGCGAGGTGTAG
Psa-39-490	CGTGCTATCCGCAAGATAAA	CAAGCTCTTGCAACTTGCTC
Psa-40-570	GAGCTTTCTGCCAGGTACAC	CAGGTGGTAATCAACGCTCT
Psa-41-399	TGAGCAGCTTAGGCAAGAGG	ACGCAACGTTGGTCATTAGG
Psa-42-ne-199	AGCCACTCTCGGAGGTCTTT	TTATCCAGCAGTGCGTCAAG
Psa-42-ne-295	CACTCACTACGACCGTCTCA	GCCATACCAATGATCGAAAC
Psa-42-ne-200	GCCACTCTCGGAGGTCTTTA	ATTTATCCAGCAGTGCGTCA
Psa-42-ne-163	ACTCACTACGACCGTCTCAA	AGCGGAGTGATTTATCCAG
Psa-44-486	GTTCAACAGCGTCACTGCAT	AATGCCAGCAATACCAGGTC
Psa-44-320	GCAACGTTGAACCTGATTTG	CGTGAACCAACTGCTGAAAA
Psa-45-496	TCAGGAGTTGTTGCAACCTG	TGTTGCAATCAGGTCAGAGC
Psa-46-467	GTTAGGCACCCAAAGTTCCA	CATTGGCTACGACTTGCTGA
Psa-47-412	AAAGGAGGGCTCACTAAGGA	TATACCCCTTCACTCCACCA
Psa-48-438	CTCGATTGGGAACATGAGTC	AACAAGGCGTCATGACTAGC
Psa-49-441	GGCAAGAAGTGGGAGAAGAT	CTTGGTGAAAGTCGGTGAAC
Psa-50-408	GTGGGTATTTGCGGTTACTG	CTGGGAACAATGAACTGAGG
Psa-51-705	CTGTGGAGTTGCCATAATC	GATGAGCACTGATGCCTTCT
Psa-51-ne-127	CGGTAGCACCACAAGAGTTT	GCCGCTACGTAAGCTAGTTG
Psa-52-391	CTGTGGAGTTGCCATAATC	GCCGCTACGTAAGCTAGTTG
Psa-54-517	AGCGATGAGCATTCTCTGTAG	CTGCGTATCAGCGGACTTAT
Psa-54-503	CTTCTCAAAGACGCCATTA	AGAAACATAACCCCTGCGATG
Psa-55-532	TTCTCGACAGTACCTGCACA	CGTGAATTCTGGCAAGCTAT
Psa-56-474	AATATGCCTTGAGCGAACTG	TCCAGCCACTTCTTGTTTC
Psa-56-ne-133	GATAACGCACAGTCGGAAC	AGCGACTGAGAATGTCCATC
Psa-57-413	CCAAGTTAATCGGCACAGAC	TGGGGTGTCAATTTACGTCTT
Psa-58-399	TATAGGTTACGCTCGGTTGC	TCACCCGTCAATACCAAATC
Psa-58-ne-207	GCAATTAACCGTCCGCTATT	CACGTCCCTTGTCAGTTACCC
Psa-59-484	CAAGGCCATCATCGATATTC	GTGAAGCTCAAGGTTGAGGA
Psa-60-463	CCTGTTACTGGGCTACGATG	GGCACTGAAACAATCGAACT
psa-61-271	AGAACGCTGATGATGTGGAT	CAGTCGATGGCCTCTATGAC
Psa-62-446	GCGATAGCAAACGATCAACT	GTCAGGCTTATAGCGGTGAA
Psa-64-432	ACAACGAGGCGATTCTGTAG	TGAGGGTTATCCAGGAACAA

Table 5-22. Continued

Primer	Forward(5'-3')	Reverse(5'-3')
Psa-64-ne-201	TCGCCTCTGCAAGTATTACC	ATGCAAATCGTTCAGTGTT
Psa-64-ne-153	CGTATTGATGCGGAACTCTC	ATGCAAATCGTTCAGTGTT
Psa-64-391	CCACTCAGAAAGACGCTGAT	ATGTAGGTGTTACGCTGGT
Psa-65-380	AACTGTTTCCTCCTGTGCTG	AGCGTCCTCAATGCTGTTAC
Psa-65-ne-203	ACTCAAGGTTGCGGATGAT	GCACGTGCATATGCTGAGTA
Psa-65-ne-214	GTGGTCGAAACACTCAAGGT	GCACGTGCATATGCTGAGTA
Psa-65-ne-199	GTGGTCGAAACACTCAAGGT	GAGTATTGGCCTGCTCCAG
Psa-66-468	GACTTGTAGAGCAGCCGAAG	CAGCACGCTTGACGTTAATA
Psa-66-ne-242	ACTCTGTGCGAGACTTGTC	CAGCACCAAAAGTACGAAGG
Psa-66-ne-193	GGTGTACGGATCTGCTTAG	CAGCACCAAAAGTACGAAGG
Psa-67-438	AAAGACGCTGAGCACGATAC	CTGACATGGGTTTCCATAGC
Psa-68-473	CTCTATATCAGCCCGCTCAA	GTGTAACCGGTACCTGAAC
Psa-69-438	GGATATGCACGATGACCTTC	GCAAAGCACTGTTGGATACC
Psa-70-362	GACGTCACCGAGTTCAAAGT	GCATGAAGCTCATCCAGATT
Psa-71-361	CATAAGGGAGCGAGGTTCTT	AGAATACTCAGTGCCGACCA

결과

제작된 PCR 프라이머의 특이성을 확인하기 위해 *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9 균주와 다른 *Pseudomonas*속 34균주, 그리고 대표 식물병원세균 16균주의 DNA를 분리하여 PCR을 수행하였다. *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9 균주의 DNA와 PCR 프라이머를 사용하여 PCR을 수행한 결과, *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9 균주의 DNA로부터 모두 477 bp (Psa-42-477 프라이머)와 333 bp (Psa-42-ne-333)로 증폭된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5-35, 5-38). *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9 균주 이외의 다른 *Pseudomonas*속 34균주와 대표 식물병원세균 16균주의 DNA를 사용하여 PCR을 수행한 결과, 프라이머 Psa-42-477를 사용하여 PCR을 수행하였을 때에는 *P. syringae* pv. *japonica* ICMP 6305 와 *P. syringae* pv. *panici* NCPPB 1498에서 동일한 타겟사이즈 DNA가 증폭되었고, *P. syringae* pv. *ciccaronei* NCPPB 2355와 *P. syringae* pv. *mellea* ICMP 5711에서 약하게 동일한 크기의 DNA가 증폭되었다(Fig. 5-36), 프라이머 Psa-42-ne-333를 사용하여 PCR을 수행하였을 때에는 *P. syringae* pv. *japonica* ICMP 6305 와 *P. syringae* pv. *panici* NCPPB 1498에서 뚜렷하게 동일한 크기의 DNA가 증폭되었고, *P. syringae* pv. *pisi* ICMP 4433에서 약한 DNA 밴드가 나타났다(Fig. 5-39). 그러나 2 프라이머 모두 다른 식물병원 세균으로부터는 다른 DNA를 증폭하지는 않았다((Fig. 5-37, Fig. 5-40).

P. syringae pv. *atrofaciens*에 대한 특이적 프라이머를 찾기 위해서 NGS를 통한 draft genome sequence을 얻고 다른 알려진 유전자와 상동성이 낮은 ORF에서 86 set의 프라이머를 제작하여 특이성을 찾았지만 완벽하게 *P. syringae* pv. *atrofaciens*에서만 특이적 DNA를 증폭하는 프라이머는 찾지 못하였고, 지금까지는 Psa-42-477와 Psa-42-ne-333가 가장 우수한 프라이머로 나타났다.

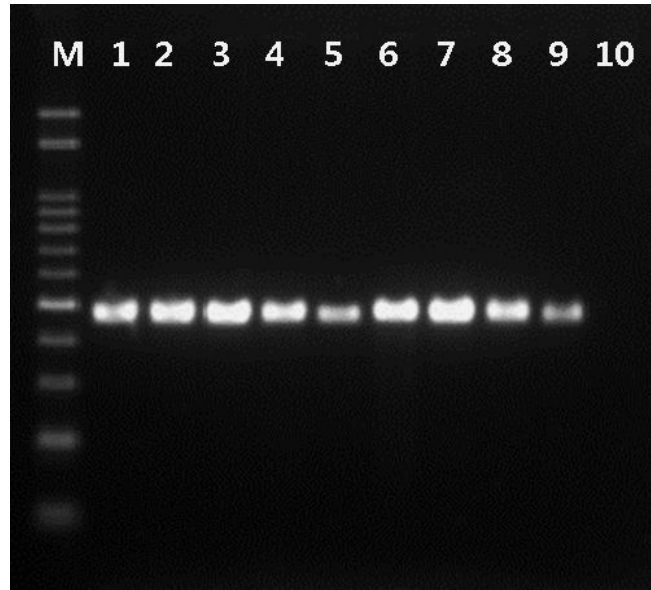


Fig. 5-35. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Psa-42-477F/Psa-42-477R and bacterial DNA of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* strains. Lanes 1~9, *P. syringae* pv. *atrofaciens* LMG 5095, LMG 5534, LMG 5647, LMG 5001, LMG 5535, ICMP 1913, ICMP 5016, ICMP 9389, ICMP 9394; lane 10, water as a negative control.



Fig. 5-36. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Psa-42-477F/Psa-42-477R and total DNA of *Pseudomonas syringae* pvs. and *Pseudomonas savastanoi* pvs. Lanes 2~32, *P. syringae* pvs. *actinidiae* KACC 10582, *antirrhini* ICMP 4303, *aptata* DSM 50252, *berberidis* NCPPB 2724, *ciccaronei* NCPPB 2355, *coronaefaciens* LMG 2170, *delphinii* ICMP 529, *dysoxyli* ICMP 545, *erobotyae* NCPPB 2331, *garcae* LMG 5064, *helianthi* NCPPB 1229, *japonica* ICMP 6305, *lachrymans* ATCC 11965, *lapsa* ATCC 10859, *maculicola* ICMP 3935, *mellea* ICMP 5711, *mori* ICMP 4331, *morsprunorum* ICMP 5795, *myricae* ICMP 7118, *panici* NCPPB 1498, *papulans* ICMP 4040, *passiflorae* NCPPB 1386, *persicae* NCPPB 2761, *pisi* ICMP 4433, *ribicola* NCPPB 963, *sesami* NCPPB 1016, *syringae* NCPPB 388, *tabaci* ICMP 2835, *tagetis* ICMP 4091, *tomato* NCPPB 2683, *ulmi* NCPPB 632; lanes 33~35, *P. savastanoi* pvs. *glycinea* NCPPB 1134, *pahseolicola* KACC 10575, and *savastanoi* NCPPB 639; lane 1, *P. syringae* pv. *atrofaciens* LMG 5095 as a positive control; lane 36, water as a negative control.

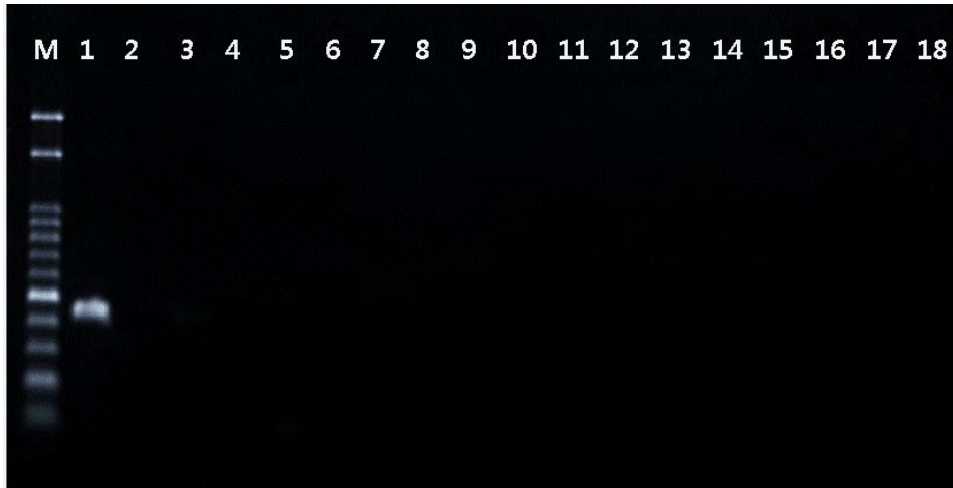


Fig. 5-37. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Psa-42-477F/Psa-42-477R and total DNA of plant- pathogenic bacteria. Lane 2, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* NCPPB 1011; lane 3~5, *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* NCPPB 1020, *michiganensis* NCPPB 1064, *sepedonicus* NCPPB 2137; lane 6~7, *Erwinia amylovora* CNUPBL 354, *E. pyrifoliae* Ep 16; lane 8, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, NCPPB 312; lane 9~12, *Rhizobium radiobacter* DSM 30205, *R. rhizogenes* ATCC 11325, *R. rubi* NCPPB 1854, *R. vitis* NCPPB 3554; lane 13, *Rhodococcus fascians* LMG 3601, lane 14, *Ralstonia solanacearum* NCPPB 339, lane 15~16, *Xanthomonas campestris* pvs. *campestris* KACC 10377, *vesicatoria* KACC 11157; lane 17, *X. oryzae* pv. *oryzae* KACC 10331; lane 1, *P. syringae* pv. *atofaciens* LMG 5095, as a positive control; lane 18, water as a negative control.

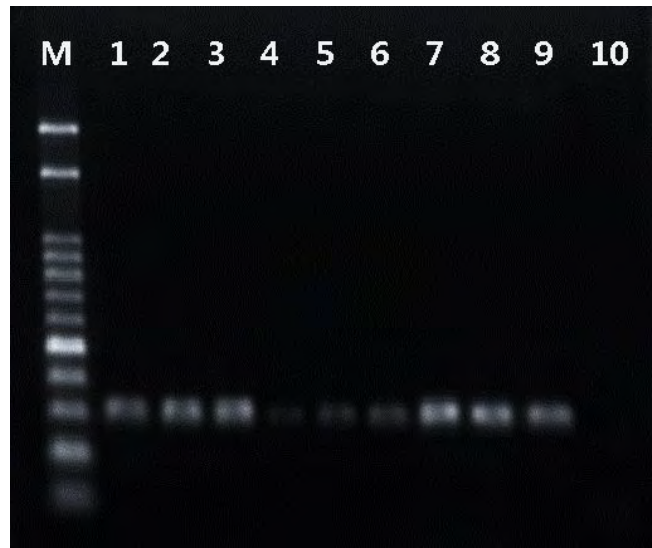


Fig. 5-38. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Psa-42-ne-333F/Psa-42-ne-333R and bacterial DNA of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* strains. Lanes 1~9, *P. syringae* pv. *atrofaciens* LMG 5095, LMG 5534, LMG 5647, LMG 5001, LMG 5535, ICMP 1913, ICMP 5016, ICMP 9389, ICMP 9394; lane 10, water as a negative control.



Fig. 5-39. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Psa-42-ne-333F/Psa-42-ne-333R and total DNA of *Pseudomonas syringae* pvs. and *Pseudomonas savastanoi* pvs. Lanes 2~32, *P. syringae* pvs. *actinidiae* KACC 10582, *antirrhini* ICMP 4303, *aptata* DSM 50252, *berberidis* NCPPB 2724, *ciccaronei* NCPPB 2355, *coronaefaciens* LMG 2170, *delphinii* ICMP 529, *dysoxyli* ICMP 545, *erobotyae* NCPPB 2331, *garcae* LMG 5064, *helianthi* NCPPB 1229, *japonica* ICMP 6305, *lachrymans* ATCC 11965, *lapsa* ATCC 10859, *maculicola* ICMP 3935, *mellea* ICMP 5711, *mori* ICMP 4331, *morsprunorum* ICMP 5795, *myricae* ICMP 7118, *panici* NCPPB 1498, *papulans* ICMP 4040, *passiflorae* NCPPB 1386, *persicae* NCPPB 2761, *pisi* ICMP 4433, *ribicola* NCPPB 963, *sesami* NCPPB 1016, *syringae* NCPPB 388, *tabaci* ICMP 2835, *tagetis* ICMP 4091, *tomato* NCPPB 2683, *ulmi* NCPPB 632; lanes 33~35, *P. savastanoi* pvs. *glycinea* NCPPB 1134, *pahseolicola* KACC 10575, and *savastanoi* NCPPB 639; lane 1, *P. syringae* pv. *atrofaciens* LMG 5095 as a positive control; lane 36, water as a negative control.

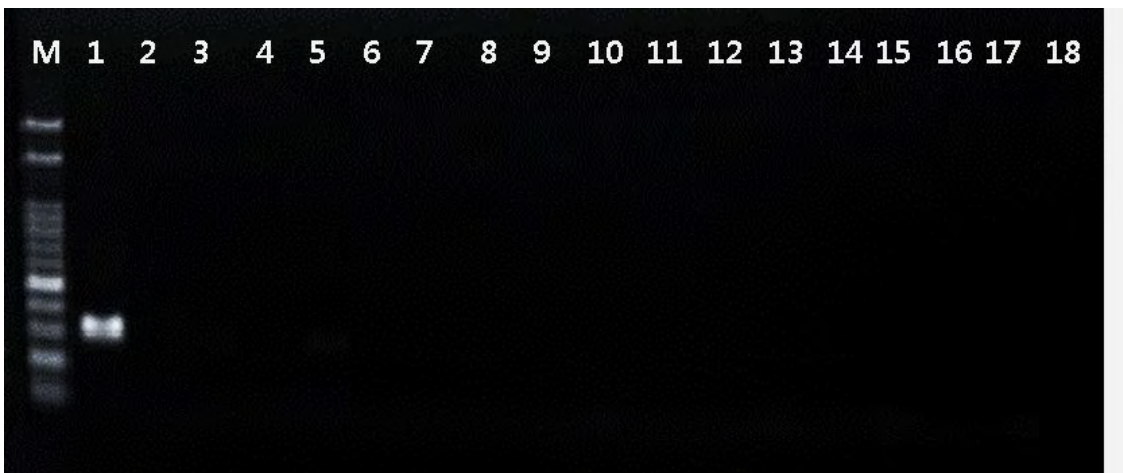


Fig. 5-40. Gel electrophoresis of the polymerase chain reaction products formed with primer Psa-42-ne-333F/Psa-42-ne-333R and total DNA of plant- pathogenic bacteria. Lane 2, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* NCPPB 1011; lane 3~5, *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* NCPPB 1020, *michiganensis* NCPPB 1064, *sepedonicus* NCPPB 2137; lane 6~7, *Erwinia amylovora* CNUPBL 354, *E. pyrifoliae* Ep 16; lane 8, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, NCPPB 312; lane 9~12, *Rhizobium radiobacter* DSM 30205, *R. rhizogenes* ATCC 11325, *R. rubi* NCPPB 1854, *R. vitis* NCPPB 3554; lane 13, *Rhodococcus fascians* LMG 3601, lane 14, *Ralstonia solanacearum* NCPPB 339, lane 15~16, *Xanthomonas campestris* pvs. *campestris* KACC 10377, *vesicatoria* KACC 11157; lane 17, *X. oryzae* pv. *oryzae* KACC 10331; lane 1, *P. syringae* pv. *atrofaciens* LMG 5095, as a positive control; lane 18, water as a negative control.

제 6 절 식물검역용 바이러스 진단용 ELISA Kit 개발

1. *Little cherry virus* (LChV) 검역용 바이러스 진단 키트 개발

가. 연구개발수행 내용

(1) *Little cherry* 바이러스 외피단백질 합성

Little cherry virus (LChV) 바이러스 외피단백질 유전자를 미국 국립 보건원 (NIH) 유전자은행을 이용하여 염기서열을 조사하였다. 이 염기서열을 생물정보 프로그램을 이용하여 각각의 바이러스 유전자에 존재하는 제한효소의 종류와 위치를 분석하였다. 이를 토대로 유전자 재조합에 필요한 제한효소 *HindIII*와 *BamHI*를 LChV 바이러스 외피단백질 유전자 처음과 말단에 삽입 하였고, 제작된 플라스미드를 대장균에서 재조합 단백질로 발현을 유도할 시, LChV 바이러스 외피 단백질만 발현시키기 위하여, 유전자 말단에 정지 코돈을 삽입하여 플라스미드를 디자인 하였다(Fig. 6-1). 디자인 된 염기서열을 미국의 유전자 합성 회사인 GenScript (www.genscript.com)에 의뢰하여, 대장균에서 단백질 발현이 용이하게 최적화 시켜 주문·제작 하였으며, 이때 제작된 LChV 외피단백질 유전자는 Genscript 사에 의해서 pUC57 플라스미드에 삽입되도록 하였다. 이를 pUC57-LChV라 하였다(Jelkmann et al., 1997).

(2) 재조합 *Little cherry virus* 바이러스 외피단백질 발현을 위한 pGEX4T-1 플라스미드의 클로닝

pUC57-RSNV 플라스미드에 제한효소 *HindIII*첨가 시켜, 37°C에서 1 시간 처리한 후, 페놀/클로로폼/아이소 아밀 알코올을 처리 하여 정제하였다. 정제 후, Klenow 효소를 이용하여 평활 말단을 만들었고, *BamHI*을 37°C에서 1 시간 처리한 후, 1% 아가로스젤에 핵산 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후, LChV 바이러스 외피단백질 유전자를 아가로스젤상에서 확인 한 후, 아가로스젤로부터 LChV 바이러스 외피단백질 유전자를 잘라 내었다. 잘라낸 아가로스젤은 Qiagen 젤 용출 키트(Cat. No. 28704. USA)를 이용하여 외피단백질 유전자를 아가로스젤로부터 분리·정제 하였다. 정제된 LChV 바이러스 외피단백질 유전자를 PNK를 처리하여 말단에 인산기를 첨가 시켰다. pGEX 4T-1 플라스미드는 먼저 *XhoI*으로 37°C에서 1 시간 처리하고, 페놀/클로로폼/아이소 아밀 알코올을 처리 하여 정제하였다. 정제 후, Klenow 효소를 이용하여 평활 말단을 만든 후, *BamHI*을 37°C에서 1 시간 처리하였다. 페놀/클로로폼/아이소 아밀 알코올을 처리 하여 정제한 후, CIP 효소를 반응하여, 말단의 인산기를 제거 하였다. 제작된 pGEX 4T-1과 LChV를 섞고, T4 DNA 연결효소 (Cat. No. 2011A, TAKARA, Japan)를 첨가 하여 클로닝을 실시하였다(Vitushkina et al., 1997). 클로닝은 14°C에서 1hr 동안 반응시킨 후, 전기(Bio-Rad, USA)를 이용하여DH10b/r 대장균 숙주에 형질전환 시켰다. 이를 pGEX 4T-1/LChV라 명명 하였다(Fig. 6-2).

(3) IPTG를 이용한 pGEX 4T-1/LChV 바이러스 재조합 외피 단백질 과발현 유도 및 정제.

pGEX 4T-1/LChV 플라스미드를 재조합 단백질 발현 숙주인 대장균 BL21 (DE3)에 전기를 이용하여 형질전환 시켜 얻은 대장균을 항생제 암피실린이 50µg/ml이 함유되어 LB 액체

배지에 접종하였다. 접종한 pGEX 4T-1/LChV BL21 (DE3) 균주를 37°C에서 하루 동안 전 배양을 실시한 후, 같은 항생제가 함유되어 있는 LB 액체 배지(1 L)에 최종 농도가 1%가 되게 본 배양을 실시하였다. 본 배양 후 pGEX 4T-1/LChV BL21 (DE3) 균주가 OD₆₀₀에서 흡광도가 0.6~0.8 사이가 되도록 배양 시킨 후, IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, Promega, Cat. No. V3951, USA)를 최종농도 1mM이 되게끔 첨가 시켰다. IPTG 첨가 후, 17°C, 250 rpm으로 3일간 더 배양 시켜, 재조합 단백질 발현 숙주가 재조합 LChV 바이러스 외피 단백질을 최대한 과발현 할 수 있도록 유도 하였다¹¹.

IPTG를 이용하여 과발현을 유도한 pGEX 4T-1/LChV BL21 (DE3) 균주를 8,000 rpm에서 22분간 원심 시켜 대장균 세포를 농축 하였고, 농축 후 수세 완충액 (50mM Tris (pH 8.0), 100mM NaCl)로 부유시켰다. 부유시킨 후, 같은 조건에서 원심 하여 pGEX 4T-1/LChV BL21 (DE3) 균주를 수세 완충액으로 수세 하였다. 수세된 pGEX 4T-1/LChV BL21 (DE3) 균주는 수세 완충액 35ml에 다시 부유 시키고, 세포 파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄 하였다. 세포 파쇄는 Amplitude 40%, pulse on 2 초, pulse off 2 초, 4°C에서 5 분간 파쇄한 후, 12,000 rpm에서 연속으로 2번 원심 분리하여 상층액과 침전물을 완전히 분리하였다. 분리된 상층액은 Ni이 결합되어 있는 아가로스젤 GST 레진을 이용하여 정제를 실시하였다. 정제는 우선 컬럼에 GST 레진을 충전 시킨 후, GST 레진 용적의 10배 이상의 수세 완충액으로 수세를 실시하였다. 수세 후, glutathion을 5, 10, 15, 20 그리고 33 mM로 순차적으로 첨가하여 재조합 LChV 바이러스 외피 단백질을 순차적으로 용출 시켰다. 용출된 단백질을 트롬빈에 반응시켜, 다시 GST 컬럼에 통과 후, GST와 재조합 LChV 바이러스 외피 단백질을 분리하였고, 분리된 단백질은 12% SDS-PAGE 겔에서 일차원 단백질 전기영동을 실시하여 원하는 단백질의 발현 및 정제가 되었는지를 확인 하였다(Fig. 6-3).

(4) 재조합 LChV 바이러스 외피 단백질을 이용한 복클론 항체 제작.

1mg의 재조합 LChV 외피 단백질과 Freund's complete adjuvant (FCA, Cat. No. F5881, Sigma, USA)를 혼합하여 emulsifying 주사기로 emulsion을 만들었다. Emulsion이 된 용액을 토끼의 등 쪽 근육에 주사하였다. 1차 접종 2주와 4주 후에 같은 량의 재조합 LChV 바이러스 외피 단백질과 동일한 부피의 Freund's incomplete adjuvant (FIA, Cat. No. F5506, Sigma, USA)를 섞어 emulsion을 만들고 토끼에 같은 방법으로 주사하였다. 주사한지 4-5일 후 토끼의 귀에서 피를 뽑아 항체가 생산되었는지 Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay (ELISA)로 확인하였다. 3차 접종한지 2주 후에 재조합 LChV 바이러스 외피 단백질만 동일량을 토끼의 등 쪽 피부에 주사하여 final booster를 실시하였다. 최종 면역 4-5일 후 심장에서 채혈하고 3000 rpm, 15분간 원심분리하여 혈청만을 분리하여 사용하였다.

(5) 재조합 LChV 바이러스 외피 단백질을 이용한 단클론 항체 제작

생후 6주된 암컷 Balb/c 쥐에 재조합 LChV 바이러스 외피 단백질 50μg을 Freund's complete adjuvant와 섞어 emulsion을 만들어 복강에 면역하였다. 면역 2주 후에 동일 량의 재조합 LChV 바이러스 외피 단백질을 Freund's incomplete adjuvant와 섞어 emulsion을 만들어 추가 면역하고, 다시 2주 후에 같은 양으로 LChV 바이러스 외피 단백질만 이용하여 3차 면역을 하였다. 3차 면역 3-4일 후 쥐의 피를 뽑아 항체가 만들어졌는지를 ELISA로 확인한 다음 세포융합 3일 전에 다시 한번 final booster를 실시하였다. 세포융합에 사용한 골수종은 쥐의

myeloma 세포로 8-azaguanine에 대한 내성을 가지고 면역 글로불린을 생산하지 못하는 P3X63Ag8.V653 세포를 사용하였다. 세포융합을 위하여 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 8-azaguanine (Cat. No. A5284, Sigma, USA), 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Cat. No. F2442, Sigma, USA), 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 gentamycin (Cat. No. G1522, Sigma, USA)이 들어간 RPMI-1640 (Cat. No. R8758, Sigma, USA) 배지를 2-4일에 한번 씩 새로운 배지로 갈아주며 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 세포 융합 18시간 전에 10% FBS, gentamycin(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 함유된 RPMI-1640 배지에서 배양하고 RPMI-1640으로 3회 세척한 후, 세포 수를 2x10⁷cells/ml로 조정하여 사용하였다. 최종면역 후 3일이 경과된 Balb/c 쥐로부터 비장을 적출한 뒤 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Cat. No. D5796, Sigma, USA)에 담긴 상태에서 비장조직을 파쇄하여 비장세포를 분리하였다. 비장 세포액을 실온에서 15분간 방치시켜 비장의 결합조직을 가라앉히고 상등액을 시험관으로 옮겨 담는다. 여기에 2 ml의 Fetal Bovine Serum (FBS)을 첨가하여 1200rpm에서 5분간 원심분리 하여 비장 세포액 내의 혈소판을 제거하였다. DMEM으로 1회 세척하고 비장 세포액에 Red Blood Cell lysing buffer (RBC lysing buffer, Cat. No. R7757, Sigma, USA)를 처리하여 적혈구를 용혈시켜 백혈구 성분을 분리하였다. 비장세포를 RPMI-1640으로 3회 세척하고 세포 수를 1x10⁸cells/ml로 조정하여 사용하였다. 위에서 준비한 골수종 세포(P3X63Ag8.V653) 2x10⁷개와 비장세포 1x10⁸개를 혼합한 후 DMEM으로 2회 세척하였다. 혼합 세포 침전물을 37°C로 보온하면서 1 ml의 polyethylene glycol 1500 (Cat. No. 10783 641, Roche, USA)을 1분간 점적하여 세포를 융합시켰다. 여기에 37°C의 DMEM 1 ml을 1분에 걸쳐 첨가하고 다시 DMEM 15 ml을 5분에 걸쳐 첨가하면서 현탁한다. 원심분리 후 20% FBS, gentamycin(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 함유된 DMEM 배지로 세포를 현탁하고 96 well plate (Cat. No. CLS3879, Corning, USA)에 well당 50 μl 씩 분주하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 세포융합 후 1, 3, 5 및 7일에 20% FBS, gentamycin(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), HAT(50 μM hypoxanthine, 0.4 μM aminopterin, 16 μM thymidine, Cat. No. 21060, Gibco, USA)가 포함된 DMEM 배지를 well당 50 μl 씩 첨가하고, 9일째에 150 μl 의 배지를 10% FBS, gentamycin(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), HT(50 μM hypoxanthine, 16 μM thymidine, Cat. No. 11067 030, Gibco, USA)가 포함된 DMEM 배지로 갈아주면서 13일째까지 융합된 세포를 증식시켰다. 이때 세포의 증식 양상을 역위상차 현미경으로 관찰하였다. 세포를 융합시킨 후 10-13일 사이에 세포가 well 바닥의 1/3이상 증식하면 배양 상등액에 항체가 생산되었는지를 ELISA로 조사하였다. 항체를 생산하는 세포를 24 well plate에 옮겨 배양하고, 항체 역가가 계속 유지되면서 세포의 증식이 활발한 hybridoma cell을 선택하여 cloning을 실시하였다. 세포를 DMEM으로 희석하여 10 ~ 30 cells/ml의 농도가 되도록 조절한 후 원심분리하였다. 10% FBS, gentamycin(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), HT(50 μM hypoxanthine, 16 μM thymidine)이 포함된 DMEM 배지로 현탁한 후 well당 100 μl 씩 분주하여 배양하였다. 배양 5일째에 역위상차 현미경으로 1개의 세포 군락이 형성된 well을 선택하였다. ELISA에서 항체의 역가가 높고 웨스턴 블롯에서 특이 band가 확인된 hybrid cell을 최종 선택하여 증식시켰다.

(6) Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

항체의 반응 특이성을 조사하기 위하여 다음과 같이 효소면역측정법을 실시하였다. 수용성 항원은 96-well polystyrene microplate (Costar, Serocluster 96well EIA/RIA plate, flat bottom, Cat. No. 3590)에 0.05 M carbonate 완충액(pH 9.6)을 가하여 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 항원을 희석하여 well당 100 μl 씩 첨가하고 4°C에서 밤새 부착시켰다. 여기에 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.3)-0.05% Tween20으로 세 번 세척하고 3% BSA를 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 로 첨가하

여 37°C에서 3시간 동안 처리하였다. 이를 다시 PBS-Tween20 용액으로 세척하고 검색할 배양액이나 희석한 혈청을 100 μ l/well로 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 항원-항체 반응을 진행시켰다. PBS-Tween20으로 세 번 세척하고 1:7,000으로 희석된 peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG antibody(토끼의 경우 1:5,000으로 희석된 peroxidase-linked anti-rabbit IgG)를 100 μ l/well로 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS-Tween20 용액으로 5회 세척하고 발색제가 첨가된 기질용액을 100 μ l/well로 첨가하였다. 기질용액은 0.1 M phosphate-citrate완충액(PCB) 10 ml에 30% 과산화수소 20 μ l와 ortho-phenylene diamine 5 mg을 넣어 만들었다. 실온에서 5분간 효소반응을 유지시킨 후 2 N 황산용액 50 μ l를 첨가하여 효소반응을 중단시킨 후 발색반응의 정도를 Microplate Reader (Bio-Rad, Model 550)로 490 nm에서 측정하였다.

(7) 웨스턴 블롯 분석.

토끼에서 얻은 복클론 항체와 융합세포에서 얻어진 단클론 항체의 특이성을 확인하기 위하여 웨스턴블롯을 실시하였다. 분리 정제한 재조합 LChV 바이러스 외피 단백질을 95°C에서 5분간 변성 시키고, 12% 폴리 아크릴 아마이드젤에 전기영동한 후 단백질을 PVDF 막으로 옮겼다. 5% skim milk를 포함한 TBST (10 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20)에 넣고 실온에서 1시간 반응시켰다. 여기에 1% skim milk가 들어있는 TBST에 복클론 항체와 단클론 항체를 7,000 ~ 10,000배 희석하여 1차 항체로 사용하였다. 한 시간 동안 반응시킨 후 TBST로 10분간 3회 세척하고 HRP conjugated Goat anti-Rabbit IgG Polyclonal Antibody 또는 HRP conjugated Goat anti-Mouse IgG Polyclonal Antibody (Cat. No. W402, promega, USA)를 7,000배 희석하여 2차 항체로 사용하였다. 1시간이 지나면 TBST로 10분간 5회 세척하고 ECL kit 및 NBT, BCIP로 발색하였다.

나. 결과

(1) *Little cherry virus* (LChV) 바이러스 외피 단백질 발현을 위한 pGEX 4T-1 플라스미드의 클로닝.

재조합 LChV 바이러스 외피 단백질을 대장균을 이용하여 발현을 유도하기 위해서, genscript사에서 합성되어 제작된 pUC57-LChV 플라스미드를 추출하였다. 추출된 플라스미드 DNA를 제한효소인 *HindIII*과 *BamHI*로 처리 하여 잘려진 LChV 유전자를 아가로스젤에서 추출·정제 하였으며, modification 시킨 pGEX 4T-1 플라스미드 DNA와 반응 시켜, T4 DNA ligase로 연결시켜, pGEX 4T-1/LChV 클론을 획득하였다(Fig. 6-2).

(2) 재조합 LChV 바이러스 외피 단백질 발현.

pGEX 4T-1/LChV 플라스미드 DNA를 재조합 단백질 발현 대장균 숙주인 BL21 (DE3)에 전기를 이용하여 형질전환 시킨 후, IPTG를 이용하여 LChV 바이러스 외피 단백질을 과발현 유도를 실시하였다. 과발현 유도 후, 세포의 상층액과 침전물에서 LChV 바이러스 외피 단백질의 발현 유무를 일차원 단백질 전기영동을 통하여 조사하였다. 그 결과, 재조합 LChV 바이러스 외피 단백질은 대장균 시스템에서 수용성 단백질로 과발현 되는 것을 알 수 있었으며, 수용성 단백질을 정제 할 수 있었다. GST 컬럼을 이용하여 정제를 실시한 결과, 5 mM glutathion 용액에서 용출됨을 알 수 있었다(Fig. 6-3A). 용출된 재조합 LChV 바이러스 외피 단백질을 트롬빈을 이용하여 GST와 완전히 분리하여 항체를 제작하기 위한 항원으로 이용

하였다(Fig. 6-3B).

(3) 재조합 LChV 바이러스 외피 단백질에 대한 복클론 항체의 특이성.

GST 컬럼으로 정제한 재조합 LChV 바이러스 외피 단백을 이용하여 복클론항체를 제작하였다. 500 mM에서 용출된 재조합 LChV 단백질을 면역 보조 물질과 함께 토끼의 근육내에 주사 후, 토끼로부터 복클론 항체를 분리하였다. 제작된 복클론 항체의 특이성을 조사하기 위해서 웨스턴 블롯을 실시 하였다(Fig. 6-4). 그 결과 Fig. 6-4에서 보듯이, 정제된 재조합 LChV 바이러스 외피 단백질에서는 LChV 복클론 항체에 대해서 면역 반응을 보였다.

(4) 재조합 LChV 바이러스 외피 단백질 복클론 항체의 역가 측정.

재조합 LChV 바이러스 외피 단백질에 대항하는 복클론 항체의 역가를 측정하기 위해서, 복클론 항체를 계단 희석하여 효소면역 측정법을 이용하여 조사 하였으며(Fig. 6-5), 재조합 LChV 바이러스 외피 단백질을 계단 희석하여 LChV 복클론 항체의 민감도를 효소 면역 측정법과 웨스턴 블롯 방법으로 측정하였다(Fig. 6-6). 그 결과, 재조합 LChV 바이러스 외피 단백질에 대한 복클론 항체는 10,000배 희석 항체에서도 면역 반응을 나타내는 것을 알 수 있었고 (Fig. 6-5), 재조합 LChV 바이러스 외피 단백질에 대한 민감도는 10,000배 희석 복클론 항체의 농도에서, 효소면역측정법에서는 10 ng/ml 농도까지(Fig. 6-6A), 웨스턴 블롯 방법에서는 0.5 ng/ml 까지 검출이 가능한 것을 알 수 있었다(Fig. 6-6B).

(5) 재조합 LChV 바이러스 외피 단백질에 대한 단클론 항체의 특이성 및 역가 조사.

재조합 LChV 바이러스 외피 단백질에 대항하는 단클론 항체의 특이성을 조사하기 위해서 웨스턴 블롯을 실시하였다. 그 결과 Fig. 6-7에서 보듯이, 재조합 LChV 바이러스 외피 단백질의 단클론 항체에 대한 면역 반응은 일어나지 않았다.

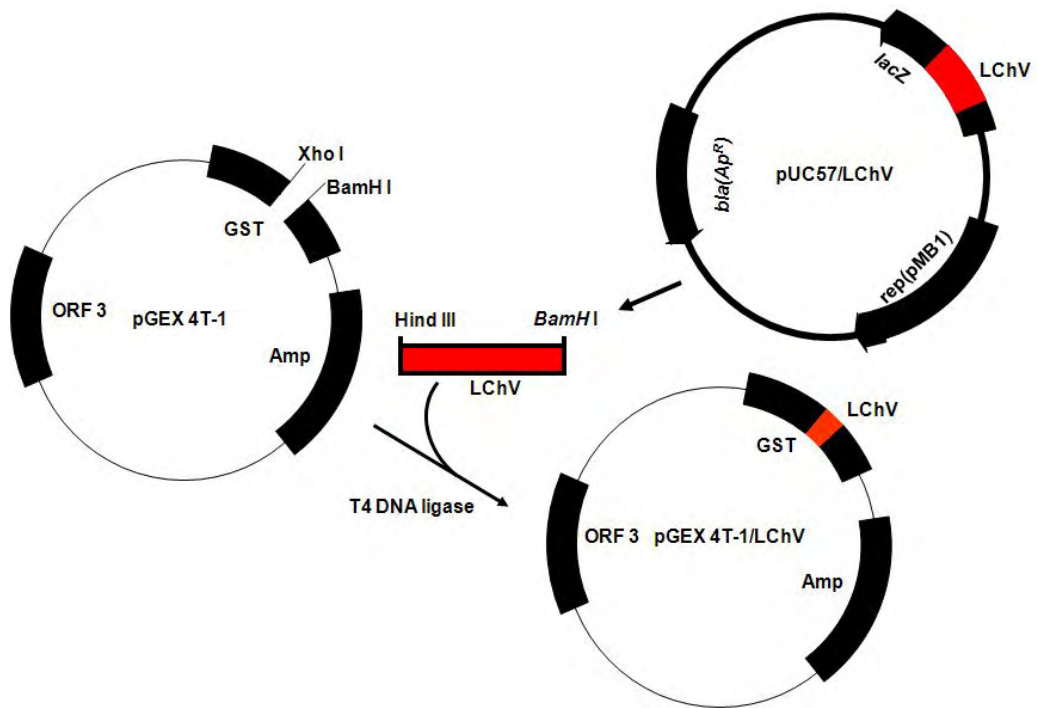


Fig. 6-1. 대장균을 이용한 재조합 LChV 바이러스 외피 단백질 발현 모식도

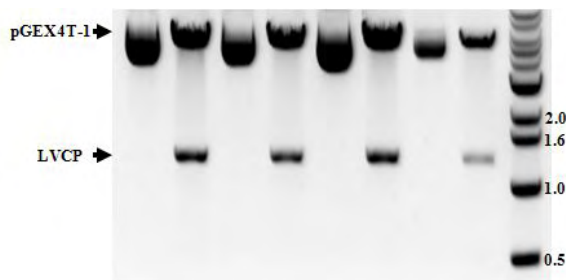


Fig. 6-2. pGEX 4T-1/LChV 클론 아가로스 젤 전기영동.

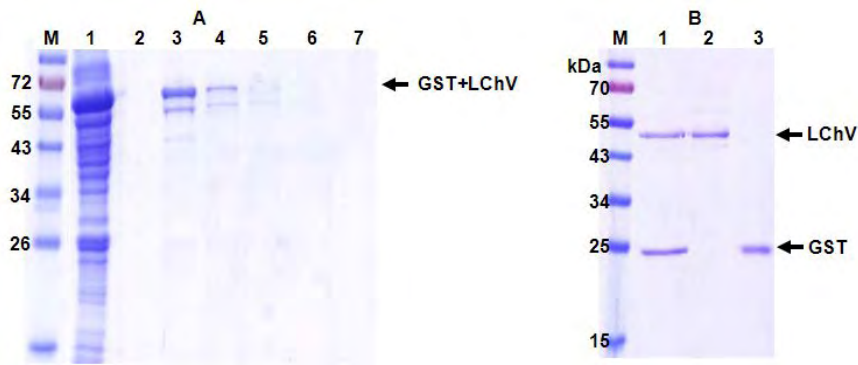


Fig. 6-3. GST 레진을 이용한 pGEX 4T-1/LChV 재조합 단백질 정제.

A : GST 레진을 이용한 pGEX 4T-1/LChV 정제.

M : 단백질 사이즈 마커, 1 : Flow through, 2 : 수세, 3 - 7 : 5, 10, 15, 20 그리고 33 mM glutathion 용출액.

B : glutathion을 이용하여 정제한 LChV의 트립신 처리

M : 단백질 사이즈 마커, 1 : GST + LChV, 2 : LChV, 3 : GST.

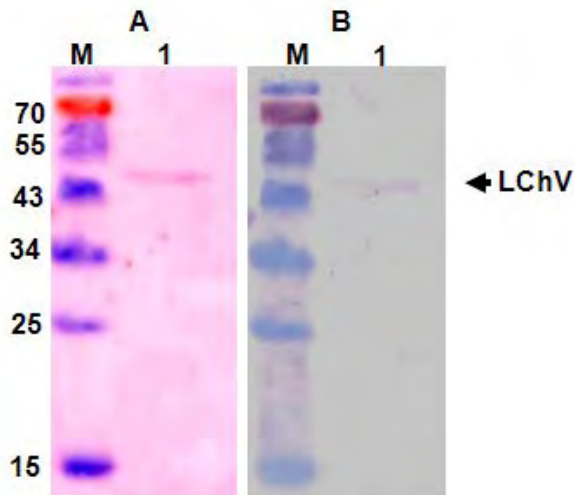


Fig. 6-4. 복클론 항체를 이용한 재조합 LChV 바이러스 외피 단백질의 웨스턴 블롯.

A : Ponceau-S 염색. B : 웨스턴 블롯

M : 단백질 size marker, 1 : 정제 LChV 단백질.

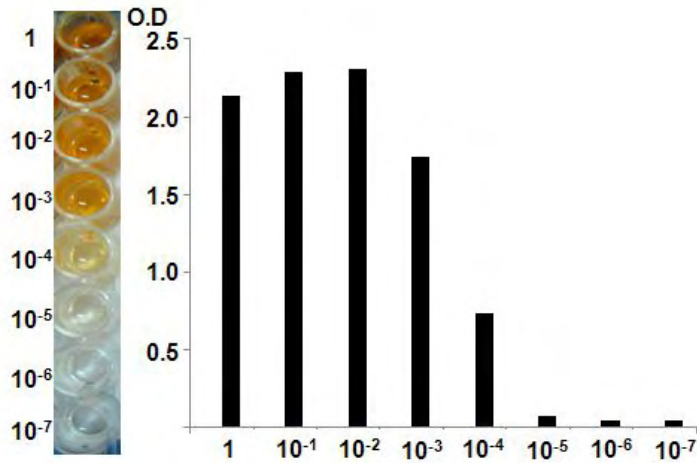


Fig. 6-5. 계단 희석 효소면역 측정법(ELISA)에 의한 복클론 항체 역가 측정.

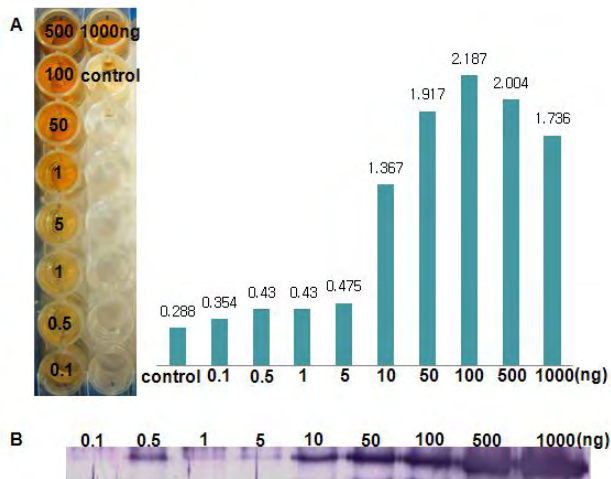


Fig. 6-6. 재조합 LChV 항원의 농도에 따른 복클론 항체의 역가 측정.

A : 효소면역학적 방법을 통한 역가 측정.

B : 웨스턴 블롯을 통한 역가 측정.

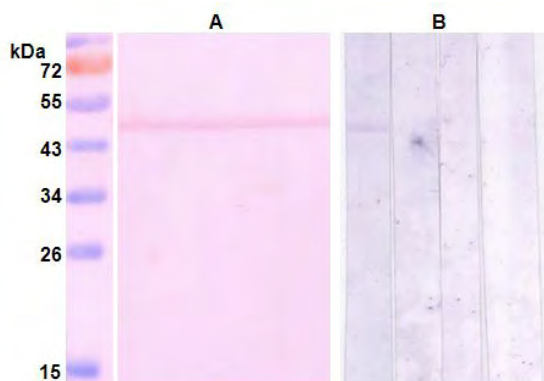


Fig. 6-7. 재조합 LChV 바이러스 외피 단백질에 대한 단클론 항체 특이성 측정.

A : Ponceau-S 염색.

B : 정제된 재조합 LChV 바이러스 외피 단백질 웨스턴 블롯.

다. 고찰

Little cherry virus (LChV) 바이러스 검역용 진단 키트를 개발하기 위해서, LChV의 외피 단백질에 대한 항체를 제작하고자 하였다. 그러나, 원인 바이러스를 국내에서 구할 수 있는 방법이 원천적으로 봉쇄되어 있어, 대장균을 이용한 재조합 단백질을 이용하기로 결정하였다. LChV 바이러스 외피 단백질 유전자를 미국립보건원의 유전자 은행에서 조사하여, 미국의 펩타이드 합성 회사에 의뢰하여, 대장균에서 발현이 원활히 되도록 최적화 시켜 제작 의뢰를 하였으며(Fig. 6-1), 제작된 재조합 LChV 유전자를 이용하여 대장균에서 단백질 발현을 유도하였다. 그 결과, pET21a(+), pET15b 등의 플라스미드에서는 재조합 LChV 바이러스 외피 단백질의 단백질 발현을 유도할 수 없었으며(data not shown), pGEX 4T-1(Fig. 6-2)에서 재조합 LChV 바이러스 외피 단백질을 발현 및 정제가 가능하였다(Fig. 6-3). 이는, 각각의 재조합 단백질 유도 플라스미드의 특성에 의한 것으로 pBR322 origin이 이 재조합 LChV 바이러스 외피 단백질 발현에 적합 한 것으로 사료된다.

대장균에서 분리 및 정제한 재조합 LChV 바이러스 외피 단백질을 이용하여, 토끼와 마우스를 통하여 각각 복클론 항체 및 단클론 항체를 제작하였다. 그 결과, 재조합 LChV 바이러스 외피 단백질은 토끼에서는 면역 반응을 나타냈지만(Fig. 6-5, 6), 마우스에는 면역 반응을 전혀 나타내지 않는 것으로 나타났다(Fig. 6-7). 이는 항체를 만들기 위한 실험동물의 유전적인 차이에 의한 것으로 추측이 된다.

제작된 복클론 항체를 이용하여 검역용 진단 키트를 제작하기 위해서 실시한 항체의 특성 및 역가 측정에서는, 10,000배 희석한 복클론 항체에서도 재조합 LChV 바이러스 외피 단백질 이 면역 반응을 보였으며(Fig. 6-5), 이 농도의 복클론 항체에서 재조합 LChV 바이러스 외피 단백질을 효소면역측정법에서는 50 ng/ml 까지(Fig. 6-6A), 웨스턴 블롯법에서는 10 ng/ml 까지 면역 반응이 일어남을 알 수 있었다(Fig. 6-6B)

본 실험에서는, 유전자 합성을 이용하여 대장균에서의 재조합 단백질 발현 및 정제를 통해서 검역용 항체를 제작하는 것에 관한 연구로서, 특정 바이러스 외피 단백질을 구할 수 없을 때 재조합 단백질을 이용해서 접근하는 것일 가장 적합한 방법일 것으로 사료되며, 우리가 아는 국내에서 처음으로 제작된 *Little cherry* 바이러스 검역용 항체라는 것에 의의가 있다고 판단된다.

2. *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) 검역용 바이러스 진단 키트 개발

가. 연구개발수행 내용

(1) *Tomato infectious chlorosis* 바이러스 외피단백질 합성

Tomato infectious chlorosis virus (TICV) 바이러스 외피단백질 유전자를 미국 국립 보건원 (NIH) 유전자은행을 이용하여 염기서열을 조사하였다. 이 염기서열을 생물정보 프로그램을 이용하여 각각의 바이러스 유전자에 존재하는 제한효소의 종류와 위치를 분석하였다. 이를 토대로 유전자 재조합에 필요한 제한효소 *HindIII*와 *BamHI*를 TICV 바이러스 외피단백질 유전자 처음과 말단에 삽입 하였고, 제작된 플라스미드를 대장균에서 재조합 단백질로 발현을 유도할 시, TICV 바이러스 외피 단백질만 발현시키기 위하여, 유전자 말단에 정지 코돈을 삽입 하여 플라스미드를 디자인 하였다. 디자인 된 염기서열을 미국의 유전자 합성 회사인 GenScript (www.genscript.com)에 의뢰하여, 대장균에서 단백질 발현이 용이하게 최적화 시켜

주문·제작하였으며, 이때 제작된 TICV 외피단백질 유전자는 Genscript 사에 의해서 pUC57 플라스미드에 삽입되도록 하였다. 이를 pUC57-TICV라 하였다(Tzanetakis et al., 2008).

(2) 재조합 *Tomato infectious chlorosis* 바이러스 외피단백질 발현을 위한 pET21a(+) 및 pGEX4T-1 플라스미드의 클로닝

pUC57-TICV 플라스미드에 제한효소 *Hind*III첨가 시켜, 37°C에서 1 시간 처리한 후, 페놀/클로로포름/아이소 아밀 알코올을 처리 하여 정제하였다. 정제 후, Klenow 효소를 이용하여 평활 말단을 만들었고, *Bam*HI을 37°C에서 1 시간 처리한 후, 1% 아가로스젤에 핵산 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후, TICV 바이러스 외피단백질 유전자를 아가로스젤상에서 확인 한 후, 아가로스젤로부터 TICV 바이러스 외피단백질 유전자를 잘라 내었다. 잘라낸 아가로스젤은 Qiagen 젤 용출 키트(Cat. No. 28704. USA)를 이용하여 외피단백질 유전자를 아가로스젤로부터 분리·정제 하였다. 정제된 TICV 바이러스 외피단백질 유전자를 PNK를 처리하여 말단에 인산기를 첨가 시켰다. pET21a(+) 및 pGEX 4T-1 플라스미드는 먼저 *Xho*I으로 37°C에서 1 시간 처리하고, 페놀/클로로포름/아이소 아밀 알코올을 처리 하여 정제하였다. 정제 후, Klenow 효소를 이용하여 평활 말단을 만든 후, *Bam*HI을 37°C에서 1 시간 처리하였다. 페놀/클로로포름/아이소 아밀 알코올을 처리 하여 정제한 후, CIP 효소를 반응하여, 말단의 인산기를 제거 하였다. 제작된 pET21a(+) 및 pGEX 4T-1과 TICV를 섞고, T4 DNA 연결효소 (Cat. No. 2011A, TAKARA, Japan)를 첨가 하여 클로닝을 실시하였다. 클로닝은 14°C에서 1hr 동안 반응시킨 후, 전기(Bio-Rad, USA)를 이용하여DH10b/r 대장균 숙주에 형질전환 시켰다(Wintermantel et al., 2005). 이를 pET21a(+)-TICV 및 pGEX 4T-1/TICV라 명명 하였다.

(3) IPTG을 이용한 pET21a(+)-TICV 및 pGEX 4T-1/TICV 바이러스 재조합 외피 단백질 과발현 유도 및 정제.

pGEX 4T-1/TICV 플라스미드를 재조합 단백질 발현 숙주인 대장균 BL21 (DE3)에 전기를 이용하여 형질전환 시켜 얻은 대장균을 항생제 암피실린이 50µg/ml이 함유되어 LB 액체 배지에 접종하였다. 접종한 pGEX 4T-1/TICV BL21 (DE3) 균주를 37°C에서 하루 동안 전 배양을 실시한 후, 같은 항생제가 함유되어 있는 LB 액체 배지(1 L)에 최종 농도가 1%가 되게 본 배양을 실시하였다. 본 배양 후 pGEX 4T-1/TICV BL21 (DE3) 균주가 OD₆₀₀에서 흡광도가 0.6~0.8 사이가 되도록 배양 시킨 후, IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, Promega, Cat. No. V3951, USA)를 최종농도 1mM이 되게끔 첨가 시켰다. IPTG 첨가 후, 17°C, 250 rpm으로 3일간 더 배양 시켜, 재조합 단백질 발현 숙주가 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질을 최대한 과발현 할 수 있도록 유도 하였다(Lozano et al., 2006).

IPTG를 이용하여 과발현을 유도한 pGEX 4T-1/TICV BL21 (DE3) 균주를 8,000 rpm에서 22분간 원심 시켜 대장균 세포를 농축 하였고, 농축 후 수세 완충액 (50mM Tris (pH 8.0), 100mM NaCl)로 부유시켰다. 부유시킨 후, 같은 조건에서 원심 하여 pGEX 4T-1/TICV BL21 (DE3) 균주를 수세 완충액으로 수세 하였다. 수세된 pGEX 4T-1/TICV BL21 (DE3) 균주는 수세 완충액 35ml에 다시 부유 시키고, 세포 파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄 하였다. 세포 파쇄는 Amplitude 40%, pulse on 2 초, pulse off 2 초, 4°C에서 5 분간 파쇄한 후, 12,000 rpm에서 연속으로 2번 원심 분리하여 상층액과 침전물을 완전히 분리하였다. 분리된 상층액은 Ni이 결합되어 있는 아가로스젤 GST 레진을 이용하여 정제를 실시하였다. 정제는 우선 컬럼

에 GST 레진을 충전 시킨 후, GST 레진 용적의 10배 이상의 수세 완충액으로 수세를 실시하였다. 수세 후, glutathion을 5, 10, 15, 20 그리고 33 mM로 순차적으로 첨가하여 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질을 순차적으로 용출 시켰다. 용출된 단백질을 트롬빈에 반응시켜, 다시 GST 컬럼에 통과 후, GST와 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질을 분리하였고, 분리된 단백질은 12% SDS-PAGE 겔에서 일차원 단백질 전기영동을 실시하여 원하는 단백질의 발현 및 정제가 되었는지를 확인 하였다.

(4) 단백질 전기 영동 겔로부터 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질 추출.

IPTG에 의해서 침전물에 과발현 된 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질을 단백질 전기 영동 겔로부터 추출을 실시하였다. 12% 단백질 전기 영동 겔에 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질 침전물을 전기영동을 실시 한 후, 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질 분획을 단백질 전기영동 겔로부터 깨끗하게 잘라 내었다. 잘라낸 단백질 전기영동 겔을 단백질 정제 수세액으로 깨끗히 3회 수세를 실시 한 후, KOMABIOTECH사의 PAG protein elution kit (Cat. No. K33010, Korea) 지침대로 겔로부터 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질을 추출하였다.

(5) 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질을 이용한 복클론 항체 제작.

1mg의 재조합 TICV 외피 단백질과 Freund's complete adjuvant (FCA, Cat. No. F5881, Sigma, USA)를 혼합하여 emulsifying 주사기로 emulsion을 만들었다. Emulsion이 된 용액을 토끼의 등 쪽 근육에 주사하였다. 1차 접종 2주와 4주 후에 같은 량의 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질과 동일한 부피의 Freund's incomplete adjuvant (FIA, Cat. No. F5506, Sigma, USA)를 섞어 emulsion을 만들고 토끼에 같은 방법으로 주사하였다. 주사한지 4-5일 후 토끼의 귀에서 피를 뽑아 항체가 생산되었는지 Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay (ELISA)로 확인하였다. 3차 접종한지 2주 후에 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질만 동일량을 토끼의 등 쪽 피하에 주사하여 final booster를 실시하였다. 최종 면역 4-5일 후 심장에서 채혈하고 3000 rpm, 15분간 원심분리하여 혈청만을 분리하여 사용하였다.

(6) 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질을 이용한 단클론 항체 제작

생후 6주된 암컷 Balb/c 쥐에 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질 50 μ g을 Freund's complete adjuvant와 섞어 emulsion을 만들어 복강에 면역하였다. 면역 2주 후에 동일 량의 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질을 Freund's incomplete adjuvant와 섞어 emulsion을 만들어 추가 면역하고, 다시 2주 후에 같은 양으로 TICV 바이러스 외피 단백질만 이용하여 3차 면역을 하였다. 3차 면역 3-4일 후 쥐의 피를 뽑아 항체가 만들어졌는지를 ELISA로 확인한 다음 세포융합 3일 전에 다시 한번 final booster를 실시하였다. 세포융합에 사용한 골수종은 쥐의 myeloma 세포로 8-azaguanine에 대한 내성을 가지고 면역 글로블린을 생산하지 못하는 P3X63Ag8.V653 세포를 사용하였다. 세포융합을 위하여 20 μ g/ml 농도의 8-azaguanine (Cat. No. A5284, Sigma, USA), 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Cat. No. F2442, Sigma, USA), 50 μ g/ml 농도의 gentamycin (Cat. No. G1522, Sigma, USA)이 들어간 RPMI-1640 (Cat. No. R8758, Sigma, USA) 배지를 2-4일에 한번 씩 새로운 배지로 갈아주며 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 배양하였다. 세포 융합 18시간 전에 10% FBS, gentamycin(50 μ g/ml)이 함유된 RPMI-1640 배지에서 배양하고 RPMI-1640으로 3회 세척한 후, 세포 수를 2x10⁷cells/ml로 조정하여 사용하였다. 최종면역 후 3일이 경과된 Balb/c 쥐로부터 비장을 적출한 뒤 Dulbecco's Modified

Eagle's Medium (DMEM, Cat. No. D5796, Sigma, USA)에 담긴 상태에서 비장조직을 파쇄하여 비장세포를 분리하였다. 비장 세포액을 실온에서 15분간 방치시켜 비장의 결합조직을 가라앉히고 상등액을 시험관으로 옮겨 담는다. 여기에 2 ml의 Fetal Bovine Serum (FBS)을 첨가하여 1200rpm에서 5분간 원심분리 하여 비장 세포액 내의 혈소판을 제거하였다. DMEM으로 1회 세척하고 비장 세포액에 Red Blood Cell lysing buffer (RBC lysing buffer, Cat. No. R7757, Sigma, USA)를 처리하여 적혈구를 용혈시켜 백혈구 성분을 분리하였다. 비장세포를 RPMI-1640으로 3회 세척하고 세포 수를 1×10^8 cells/ml로 조정하여 사용하였다. 위에서 준비한 골수종 세포(P3X63Ag8.V653) 2×10^7 개와 비장세포 1×10^8 개를 혼합한 후 DMEM으로 2회 세척하였다. 혼합 세포 침전물을 37°C로 보온하면서 1 ml의 polyethylene glycol 1500 (Cat. No. 10783 641, Roche, USA)을 1분간 점적하여 세포를 융합시켰다. 여기에 37°C의 DMEM 1 ml을 1분에 걸쳐 첨가하고 다시 DMEM 15 ml을 5분에 걸쳐 첨가하면서 현탁한다. 원심분리 후 20% FBS, gentamycin(50 μ g/ml)이 함유된 DMEM 배지로 세포를 현탁하고 96 well plate (Cat. No. CLS3879, Corning, USA)에 well당 50 μ l씩 분주하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 세포융합 후 1, 3, 5 및 7일에 20% FBS, gentamycin(50 μ g/ml), HAT(50 μ M hypoxanthine, 0.4 μ M aminopterin, 16 μ M thymidine, Cat. No. 21060, Gibco, USA)가 포함된 DMEM 배지를 well당 50 μ l씩 첨가하고, 9일째에 150 μ l의 배지를 10% FBS, gentamycin(50 μ g/ml), HT(50 μ M hypoxanthine, 16 μ M thymidine, Cat. No. 11067 030, Gibco, USA)가 포함된 DMEM 배지로 갈아주면서 13일째까지 융합된 세포를 증식시켰다. 이때 세포의 증식 양상을 역위상차 현미경으로 관찰하였다. 세포를 융합시킨 후 10-13일 사이에 세포가 well 바닥의 1/3이상 증식하면 배양 상등액에 항체가 생산되었는지를 ELISA로 조사하였다. 항체를 생산하는 세포를 24 well plate에 옮겨 배양하고, 항체 역가가 계속 유지되면서 세포의 증식이 활발한 hybridoma cell을 선택하여 cloning을 실시하였다. 세포를 DMEM으로 희석하여 10 ~ 30 cells/ml의 농도가 되도록 조절한 후 원심분리하였다. 10% FBS, gentamycin(50 μ g/ml), HT(50 μ M hypoxanthine, 16 μ M thymidine)이 포함된 DMEM 배지로 현탁한 후 well당 100 μ l씩 분주하여 배양하였다. 배양 5일째에 역위상차 현미경으로 1개의 세포 군락이 형성된 well을 선택하였다. ELISA에서 항체의 역가가 높고 웨스턴 블롯에서 특이 band가 확인된 hybrid cell을 최종 선택하여 증식시켰다.

(6) 웨스턴 블롯 분석.

토끼에서 얻은 복클론 항체와 융합세포에서 얻어진 단클론 항체의 특이성을 확인하기 위하여 웨스턴블롯을 실시하였다. 분리 정제한 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질을 95°C에서 5분간 변성 시키고, 12% 폴리 아크릴 아마이드젤에 전기영동한 후 단백질을 PVDF 막으로 옮겼다. 5% skim milk를 포함한 TBST (10 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20)에 넣고 실온에서 1시간 반응시켰다. 여기에 1% skim milk가 들어있는 TBST에 복클론 항체와 단클론 항체를 7,000 ~ 10,000배 희석하여 1차 항체로 사용하였다. 한 시간 동안 반응시킨 후 TBST로 10분간 3회 세척하고 HRP conjugated Goat anti-Rabbit IgG Polyclonal Antibody 또는 HRP conjugated Goat anti-Mouse IgG Polyclonal Antibody (Cat. No. W402, promega, USA)를 7,000배 희석하여 2차 항체로 사용하였다. 1시간이 지나면 TBST로 10분간 5회 세척하고 ECL kit 및 NBT, BCIP로 발색하였다.

나. 결과

(1) *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) 바이러스 외피 단백질 발현을 위한 pGEX

4T-1 플라스미드의 클로닝.

재조합 TICV 바이러스 외피 단백질을 대장균을 이용하여 발현을 유도하기 위해서, genscript사에서 합성되어 제작된 pUC57-TICV 플라스미드를 추출하였다(Fig. 6-8). 추출된 플라스미드 DNA를 제한효소인 *HindIII*과 *BamHI*로 처리 하여 잘려진 TICV 유전자를 아가로스겔에서 추출·정제 하였으며, modification 시킨 pGEX 4T-1 플라스미드 DNA와 반응 시켜, T4 DNA ligase로 연결시켜, pET21a(+)-TICV 클론 및 pGEX 4T-1/TICV 클론을 획득하였다(Fig. 6-9).

(2) 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질 발현.

pET21a(+)-TICV 플라스미드 및 pGEX 4T-1/TICV 플라스미드 DNA를 재조합 단백질 발현 대장균 숙주인 BL21 (DE3)에 전기를 이용하여 형질전환 시킨 후, IPTG를 이용하여 TICV 바이러스 외피 단백질을 과발현 유도를 실시하였다. 과발현 유도 후, 세포의 상층액과 침전물에서 TICV 바이러스 외피 단백질의 발현 유무를 일차원 단백질 전기영동을 통하여 조사하였다. 그 결과, 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질은 대장균 시스템에서 수용성 단백질로 과발현이 전혀 일어나지 않았으며, 침전물에서 과발현이 일어났다(Fig. 6-10).

(3) 단백질 전기영동 젤로부터 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질 추출.

pET21a(+)-TICV 플라스미드 및 pGEX 4T-1/TICV 플라스미드 DNA를 재조합 단백질 발현을 대장균에서 유도 하였을 시, 대장균 시스템에서 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질은 오직 침전물에서 과발현 되었다(Fig. 10). 항체를 제작하기 위한 항원을 얻기 위해서, 단백질 전기영동 젤로부터 단백질을 추출할 수 있는 키트를 이용하여 젤로부터 직접 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질을 키트의 지침서대로 추출 하였다. 그 결과, 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질을 젤로부터 추출할 수 있었다(Fig. 6-11)

(4) 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질에 대한 복클론 항체의 특이성.

단백질 전기영동 젤로부터 직접 추출한 재조합 TICV 바이러스 외피 단백을 이용하여 복클론항체를 제작하였다. 추출된 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질을 농축하여 면역 보조 물질과 함께 토끼의 근육내에 주사 후, 토끼로부터 복클론 항체를 분리하였다. 제작된 복클론 항체의 특이성을 조사하기 위해서 웨스턴 블롯을 실시 하였다. 그 결과 Fig. 6-5에서 보듯이, 추출한 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질에서는 TICV 복클론 항체에 대해서 면역 반응을 보였다(Fig. 6-12).

(5) 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질에 대한 단클론 항체의 특이성.

단백질 전기영동 젤로부터 직접 추출한 재조합 TICV 바이러스 외피 단백을 이용하여 제작한 단클론 항체의 특이성을 조사하기 위해서 웨스턴 블롯을 실시하였다. 그 결과 Fig. 6-6에서 보듯이, 추출한 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질에서는 TICV 단클론 항체에 대해서 면역 반응을 보이는 클론 4개를 획득하였다(Fig. 6-13).

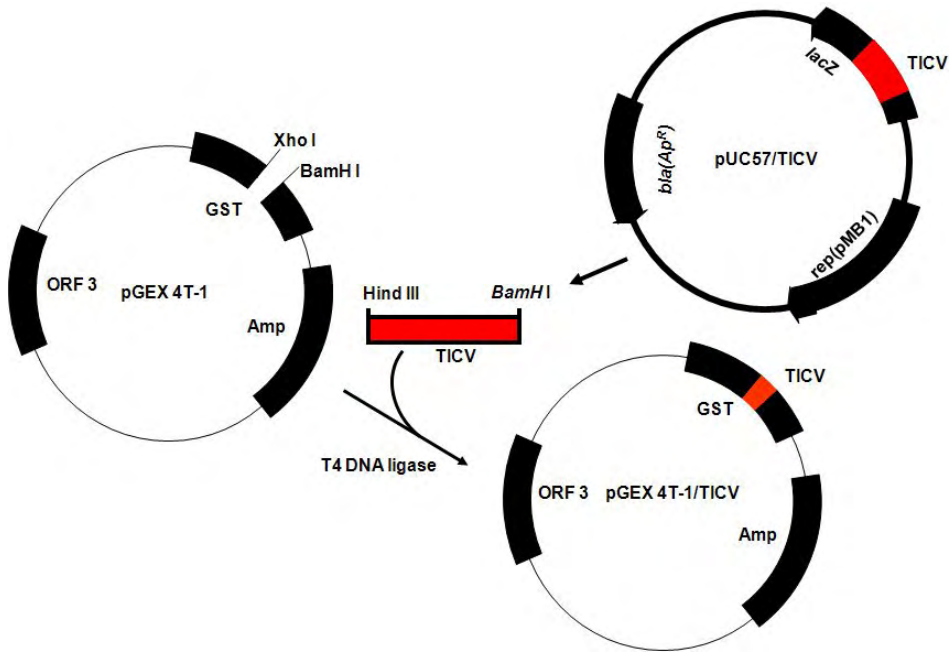


Fig. 6-8. 대장균을 이용한 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질 발현 모식도

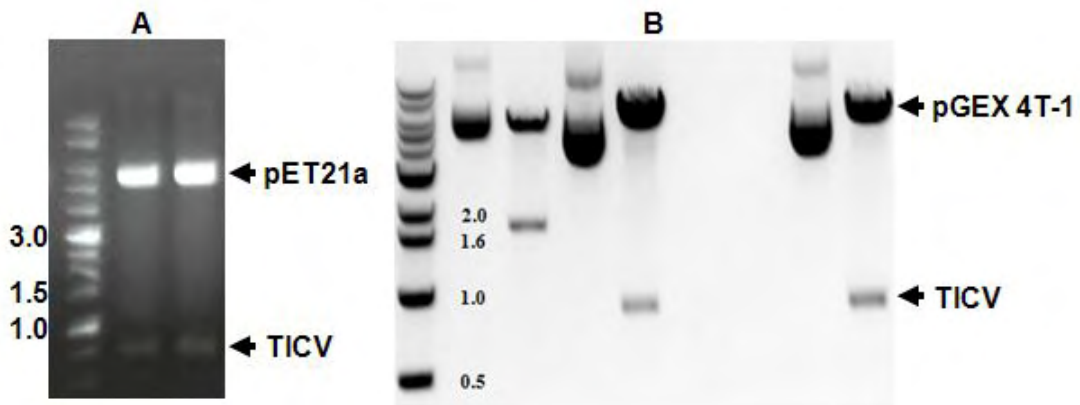


Fig. 6-9. pET21a(+)-TICV 및 pGEX 4T-1/TICV 클론 아가로스 젤 전기영동.

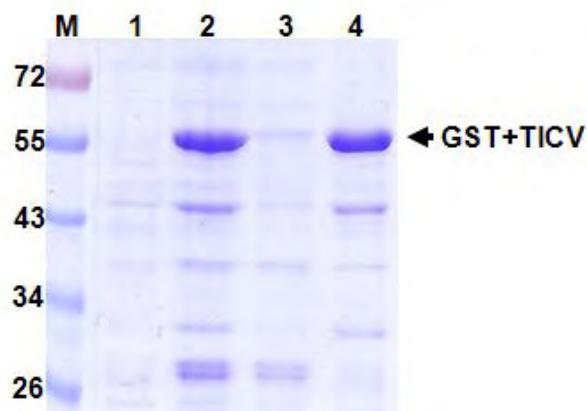


Fig. 6-10. GST 레진을 이용한 pGEX 4T-1/TICV 재조합 단백질 정제.

M : 단백질 사이즈 마커, 1 : IPTG 과발현 전, 2 : IPTG 과발현 후, 3 : IPTG 과발현 후 상층액, 4 : IPTG 과발현 후 침전물

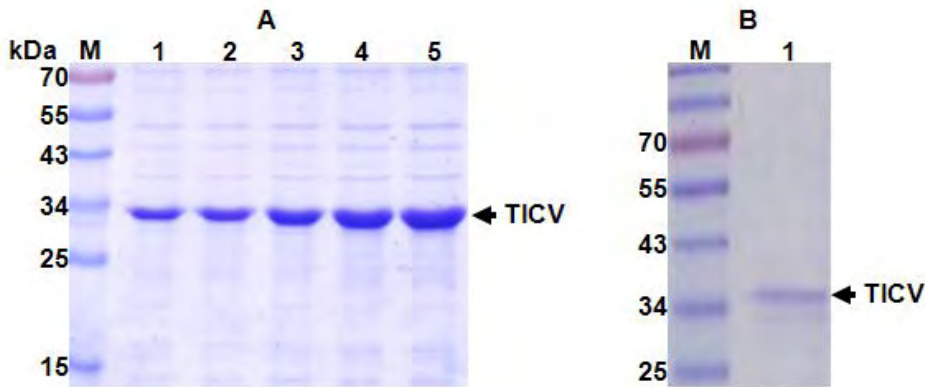


Fig. 6-11. GST 레진을 이용한 pET21a(+)/TICV 재조합 단백질 전기영동.
 A : 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질 침전물 전기영동.
 M : 단백질 사이즈 마커, 1 - 5 : 1, 2, 3, 4 그리고 5 μ l TICV 침전물.
 B : 단백질 전기영동 젤로부터 KOMABIOTECH PAG 용출 키트를 이용한 TICV 추출
 M : M : 단백질 사이즈 마커, 1 : TICV 침전물로부터 TICV 추출.

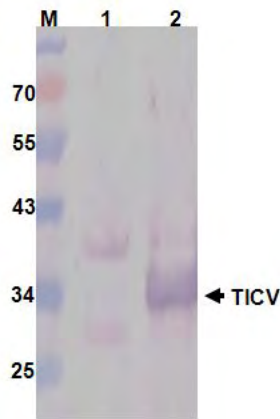


Fig. 6-12. 복클론 항체를 이용한 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질의 웨스턴 블롯.
 M : 단백질 사이즈 마커, 1 : pET21a(+)-TICV 과발현 전, 2 : pET21a(+)-TICV 과발현 후.

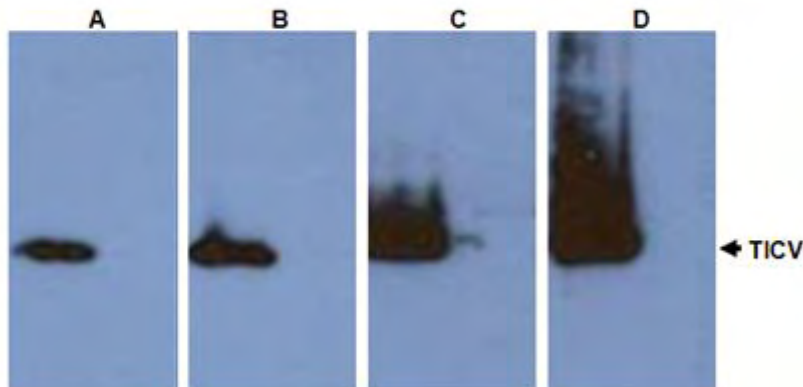


Fig. 6-13. 단클론 항체를 이용한 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질의 웨스턴 블롯.
 A : 11번 클론, B : 25번 클론, C : 67번 클론, D : 82번 클론

다. 고찰

Tomato infectious chlorosis virus (TICV) 바이러스 검역용 진단 키트를 개발하기 위해서, TICV의 외피 단백질을 위한 항체를 제작하고자 하였다. 그러나, 원인 바이러스를 국내에서 구할 수 있는 방법이 원천적으로 봉쇄되어 있어, 대장균을 이용한 재조합 단백질을 이용하기로 결정하였다. TICV 바이러스 외피 단백질 유전자를 미국립보건원의 유전자 은행에서 조사하여, 미국의 펩타이드 합성 회사에 의뢰하여, 대장균에서 발현이 원활히 되도록 최적화 시켜 제작 의뢰를 하였으며(Fig. 6-1), 제작된 재조합 TICV 유전자를 이용하여 대장균에서 단백질 발현을 유도 하였다. 그 결과, pET21a(+) 및 pGEX 4T-1(Fig. 9)에서 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질을 발현 및 정제가 되었지만 수용성 단백질로 과발현은 되지 않았고, 비수용성 단백질로 발현이 되었다(Fig. 6-10). 이는, 대장균 시스템에서의 이 바이러스의 재조합 외피 단백질이 수용성으로 되지 않는 구조로 만들어 진거라 사료된다.

대장균에서 수용성 단백질로 발현이 되지 않아, 단백질 전기영동 겔로부터(Fig. 6-11A), 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질을 직접 추출하였다(Fig. 6-11B). 추출된 단백질을 이용하여, 토끼와 마우스를 통하여 각각 복클론 항체 및 단클론 항체를 제작하였다. 그 결과, 재조합 TICV 바이러스 외피 단백질은 토끼에서 복클론 항체를(Fig. 6-12), 마우스에서 단클론 항체가(Fig. 6-13) 만들어 지는 것을 알 수 있었다. 그러나, 이미 단백질 전기영동 겔에서 바이러스 외피 단백질의 3차 구조는 갖출 수 없는 환경이기에 1차 구조의 단백질만 분리가 된다. 이런 경우, 입체 항체는 만들어 지지 않으며, 평면 항체만 만들어 지는 단점이 있을 수 있다.

제작된 단클론 및 복클론 항체를 이용하여 검역용 진단 키트에 이용하기 위해서, 항체의 역할을 측정 해야 되지만, 침전물에 들어 있는 항원을 추출할 수 있는 방법이 마땅치 않아 단클론 및 복클론 항체의 역할은 이후, 바이러스에 감염되어 있는 토마토로부터 직접 바이러스를 추출해서 알아보아야 할 것으로 사료된다.

본 실험에서는, 유전자 합성을 이용하여 대장균에서의 재조합 단백질 발현 및 정제를 통해서 검역용 항체를 제작하는 것에 관한 연구로서, 특정 바이러스 외피 단백질을 구할 수 없을 때 재조합 단백질을 이용해서 접근하는 것일 가장 적합한 방법일 것으로 사료되며, 우리가 아는 국내에서 처음으로 제작된 *Tomato infectious chlorosis* 바이러스 항체라는 것에 의의가 있다고 판단된다.

3. *Rice Stripe Necrosis Virus* (RSNV) 검역용 바이러스 진단 키트 개발

가. 연구개발수행 내용

(1) *Rice Stripe Necrosis* 바이러스 외피단백질 합성

Rice Stripe Necrosis Virus (RSNV) 바이러스 외피단백질 유전자를 미국 국립 보건원 (NIH) 유전자은행을 이용하여 염기서열을 조사하였다. 이 염기서열을 생물정보 프로그램을 이용하여 각각의 바이러스 유전자에 존재하는 제한효소의 종류와 위치를 분석하였다. 이를 토대로 유전자 재조합에 필요한 제한효소 *NdeI*과 *BamHI*를 RSNV 바이러스 외피단백질 유전자 처음과 말단에 삽입 하였고, 제작된 플라스미드를 대장균에서 재조합 단백질로 발현을 유도할 시, RSNV 바이러스 외피 단백질만 발현시키기 위하여, 유전자 말단에 정지 코돈을 삽입하여 플라스미드를 디자인 하였다. 디자인 된 염기서열을 미국의 유전자 합성 회사인 GenScript (www.genscript.com)에 의뢰하여, 대장균에서 단백질 발현이 용이하게 최적화 시켜 주문·제작

하였으며, 이때 제작된 RSNV 외피단백질 유전자는 Genscript 사에 의해서 pUC57 플라스미드에 삽입되도록 하였다. 이를 pUC57-RSNV라 하였다(Lozano et al., 2009).

(2) 재조합 *Rice Stripe Necrosis* 바이러스 외피단백질 발현을 위한 pET15b 플라스미드의 클로닝

pUC57-RSNV 플라스미드에 제한효소 *NdeI*와 *BamHI*를 첨가 시켜, 37°C에서 1 시간 처리한 후, 1% 아가로스젤에 핵산 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후, RSNV 바이러스 외피단백질 유전자를 아가로스젤상에서 확인 한 후, 아가로스젤로부터 RSNV 바이러스 외피단백질 유전자를 잘라 내었다. 잘라낸 아가로스젤은 Qiagen 젤 용출 키트(Cat. No. 28704, USA)를 이용하여 외피단백질 유전자를 아가로스젤로부터 분리·정제 하였다. 정제된 RSNV 바이러스 외피단백질 유전자를 *NdeI* 및 *BamHI*으로 처리한 pET15b 플라스미드에 클로닝을 실시하였다. 클로닝은 *NdeI* 및 *BamHI*로 처리한 pET15b와 아가로스젤에서 분리한 RSNV 바이러스 외피단백질 유전자를 섞고, T4 DNA 연결효소 (Cat. No. 2011A, TAKARA, Japan)를 첨가 하였다. 이 첨가물을 14°C에서 1hr 동안 반응시킨 후, 전기(Bio-Rad, USA)를 이용하여 DH10b/r 대장균 숙주에 형질전환 시켰다(Satoh et al., 2010). 형질전환된 세포를 50µg/ml 암피실린이 들어 있는 LB 고체 배지에 접종하여 37°C에서 16시간 동안 배양한 후, 자라나는 집락을 같은 항생제가 들어 있는 LB 액체 배지(3ml)에 접종하였다. 액체 배지에서 키운 대장균으로부터 플라스미드 DNA를 추출하여 같은 제한효소인 *NdeI*와 *BamHI*로 처리하여 클로닝이 정확하게 된 콜로니를 획득할 수 있었으며, 이를 pET15b-RSNV라 명명 하였다(Fig. 6-14).

(3) IPTG를 이용한 pET15b-RSNV 바이러스 재조합 외피 단백질 과발현 유도

pET15b-RSNV 플라스미드를 재조합 단백질 발현 숙주인 대장균 BL21 (DE3)에 전기를 이용하여 형질전환 시켜 얻은 대장균을 항생제 암피실린이 50µg/ml이 함유되어 LB 액체 배지에 접종하였다. 접종한 pET15b-RSNV BL21 (DE3) 균주를 37°C에서 하루 동안 전 배양을 실시한 후, 같은 항생제가 함유되어 있는 LB 액체 배지(1 L)에 최종 농도가 1%가 되게 분 배양을 실시하였다. 분 배양 후 pET15b-RSNV BL21 (DE3) 균주가 OD₆₀₀에서 흡광도가 0.6~0.8 사이가 되도록 배양 시킨 후, IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, Promega, Cat. No. V3951, USA)를 최종농도 1mM이 되게끔 첨가 시켰다. IPTG 첨가 후, 17°C, 250 rpm으로 3일간 더 배양 시켜, 재조합 단백질 발현 숙주가 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질을 최대한 과발현 할 수 있도록 유도 하였다(Hibino et al., 1996).

(4) 재조합 RSNV 외피 단백질 발현 및 정제.

IPTG를 이용하여 과발현을 유도한 pET15b-RSNV BL21 (DE3) 균주를 8,000 rpm에서 22분간 원침 시켜 대장균 세포를 농축 하였고, 농축 후 수세 완충액 (50mM Tris (pH 8.0), 100mM NaCl)로 부유시켰다. 부유시킨 후, 같은 조건에서 원침 하여 pET15b-RSNV BL21 (DE3) 균주를 수세 완충액으로 수세 하였다. 수세된 pET15b-RSNV BL21 (DE3) 균주는 수세 완충액 35ml에 다시 부유 시키고, 세포 파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄 하였다. 세포 파쇄는 Amplitude 40%, pulse on 2 초, pulse off 2 초, 4°C에서 5 분간 파쇄한 후, 12,000 rpm에서 연속으로 2번 원심 분리하여 상층액과 침전물을 완전히 분리하였다. 분리된 상층액은 Ni이 결합되어 있는 아가로스젤 Ni-NTA 레진(invitrogen, Cat. No. 46-0019, USA)을 이용하여 정제를

실시하였다. 정제는 우선 컬럼에 Ni-NTA 레진을 충전 시킨 후, Ni-NTA 레진 용적의 10배 이상의 수세 완충액으로 수세를 실시하였다. 수세 후, 이미다졸 농도를 40, 80, 160, 320 그리고 500 mM로 순차적으로 첨가하여 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질을 순차적으로 용출시켰다. 용출된 단백질은 12% SDS-PAGE 겔에서 일차원 단백질 전기영동을 실시하여 원하는 단백질의 발현 및 정제가 되었는지를 확인 하였다.

(5) 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질을 이용한 복클론 항체 제작.

1mg의 재조합 RSNV 외피 단백질과 Freund's complete adjuvant (FCA, Cat. No. F5881, Sigma, USA)를 혼합하여 emulsifying 주사기로 emulsion을 만들었다. Emulsion이 된 용액을 토끼의 등 쪽 근육에 주사하였다. 1차 접종 2주와 4주 후에 같은 량의 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질과 동일한 부피의 Freund's incomplete adjuvant (FIA, Cat. No. F5506, Sigma, USA)를 섞어 emulsion을 만들고 토끼에 같은 방법으로 주사하였다. 주사한지 4-5일 후 토끼의 귀에서 피를 뽑아 항체가 생산되었는지 Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay (ELISA)로 확인하였다. 3차 접종한지 2주 후에 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질만 동일 량을 토끼의 등 쪽 피하에 주사하여 final booster를 실시하였다. 최종 면역 4-5일 후 심장에서 채혈하고 3000 rpm, 15분간 원심분리하여 혈청만을 분리하여 사용하였다.

(6) 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질을 이용한 단클론 항체 제작

생후 6주된 암컷 Balb/c 쥐에 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질 50 μ g을 Freund's complete adjuvant와 섞어 emulsion을 만들어 복강에 면역하였다. 면역 2주 후에 동일 량의 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질을 Freund's incomplete adjuvant와 섞어 emulsion을 만들어 추가 면역하고, 다시 2주 후에 같은 양으로 RSNV 바이러스 외피 단백질만 이용하여 3차 면역을 하였다. 3차 면역 3-4일 후 쥐의 피를 뽑아 항체가 만들어졌는지를 ELISA로 확인한 다음 세포융합 3일 전에 다시 한번 final booster를 실시하였다. 세포융합에 사용한 골수종은 쥐의 myeloma 세포로 8-azaguanine에 대한 내성을 가지고 면역 글로불린을 생산하지 못하는 P3X63Ag8.V653 세포를 사용하였다. 세포융합을 위하여 20 μ g/ml 농도의 8-azaguanine (Cat. No. A5284, Sigma, USA), 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Cat. No. F2442, Sigma, USA), 50 μ g/ml 농도의 gentamycin (Cat. No. G1522, Sigma, USA)이 들어간 RPMI-1640 (Cat. No. R8758, Sigma, USA) 배지를 2-4일에 한번 씩 새로운 배지로 갈아주며 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 배양하였다. 세포 융합 18시간 전에 10% FBS, gentamycin(50 μ g/ml)이 함유된 RPMI-1640 배지에서 배양하고 RPMI-1640으로 3회 세척한 후, 세포 수를 2x10⁷cells/ml로 조정하여 사용하였다. 최종면역 후 3일이 경과된 Balb/c 쥐로부터 비장을 적출한 뒤 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Cat. No. D5796, Sigma, USA)에 담근 상태에서 비장조직을 파쇄하여 비장세포를 분리하였다. 비장 세포액을 실온에서 15분간 방치시켜 비장의 결합조직을 가라앉히고 상등액을 시험관으로 옮겨 담는다. 여기에 2 ml의 Fetal Bovine Serum (FBS)을 첨가하여 1200rpm에서 5분간 원심분리 하여 비장 세포액 내의 혈소판을 제거하였다. DMEM으로 1회 세척하고 비장 세포액에 Red Blood Cell lysing buffer (RBC lysing buffer, Cat. No. R7757, Sigma, USA)를 처리하여 적혈구를 용혈시켜 백혈구 성분을 분리하였다. 비장세포를 RPMI-1640으로 3회 세척하고 세포 수를 1x10⁸cells/ml로 조정하여 사용하였다. 위에서 준비한 골수종 세포(P3X63Ag8.V653) 2x10⁷개와 비장세포 1x10⁸개를 혼합한 후 DMEM으로 2회 세척하였다. 혼합 세포 침전물을 37 $^{\circ}$ C로 보온하면서 1 ml의 polyethylene glycol 1500 (Cat. No. 10

783 641, Roche, USA)을 1분간 점적하여 세포를 융합시켰다. 여기에 37°C의 DMEM 1 ml을 1분에 걸쳐 첨가하고 다시 DMEM 15 ml을 5분에 걸쳐 첨가하면서 현탁한다. 원심분리 후 20% FBS, gentamycin(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 함유된 DMEM 배지로 세포를 현탁하고 96 well plate (Cat. No. CLS3879, Corning, USA)에 well당 50 μl 씩 분주하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 세포융합 후 1, 3, 5 및 7일에 20% FBS, gentamycin(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), HAT(50 μM hypoxanthine, 0.4 μM aminopterin, 16 μM thymidine, Cat. No. 21060, Gibco, USA)가 포함된 DMEM 배지를 well당 50 μl 씩 첨가하고, 9일째에 150 μl 의 배지를 10% FBS, gentamycin(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), HT(50 μM hypoxanthine, 16 μM thymidine, Cat. No. 11067 030, Gibco, USA)가 포함된 DMEM 배지로 갈아주면서 13일째까지 융합된 세포를 증식시켰다. 이때 세포의 증식 양상을 역위상차 현미경으로 관찰하였다. 세포를 융합시킨 후 10-13일 사이에 세포가 well 바닥의 1/3이상 증식하면 배양 상등액에 항체가 생산되었는지를 ELISA로 조사하였다. 항체를 생산하는 세포를 24 well plate에 옮겨 배양하고, 항체 역가가 계속 유지되면서 세포의 증식이 활발한 hybridoma cell을 선택하여 cloning을 실시하였다. 세포를 DMEM으로 희석하여 10 ~ 30 cells/ml의 농도가 되도록 조절한 후 원심분리하였다. 10% FBS, gentamycin(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), HT(50 μM hypoxanthine, 16 μM thymidine)이 포함된 DMEM 배지로 현탁한 후 well당 100 μl 씩 분주하여 배양하였다. 배양 5일째에 역위상차 현미경으로 1개의 세포 군락이 형성된 well을 선택하였다. ELISA에서 항체의 역가가 높고 웨스턴 블롯에서 특이 band가 확인된 hybrid cell을 최종 선택하여 증식시켰다.

(7) Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

항체의 반응 특이성을 조사하기 위하여 다음과 같이 효소면역측정법을 실시하였다. 수용성 항원은 96-well polystyrene microplate (Costar, Serocluster 96well EIA/RIA plate, flat bottom, Cat. No. 3590)에 0.05 M carbonate 완충액(pH 9.6)을 가하여 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 항원을 희석하여 well당 100 μl 씩 첨가하고 4°C에서 밤새 부착시켰다. 여기에 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.3)-0.05% Tween20으로 세 번 세척하고 3% BSA를 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 로 첨가하여 37°C에서 3시간 동안 처리하였다. 이를 다시 PBS-Tween20 용액으로 세척하고 검색할 배양액이나 희석한 혈청을 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 로 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 항원-항체 반응을 진행시켰다. PBS-Tween20으로 세 번 세척하고 1:7,000으로 희석된 peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG antibody(토끼의 경우 1:5,000으로 희석된 peroxides-linked anti-rabbit IgG)를 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 로 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS-Tween20 용액으로 5회 세척하고 발색제가 첨가된 기질용액을 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 로 첨가하였다. 기질용액은 0.1 M phosphate-citrate완충액(PCB) 10 ml에 30% 과산화수소 20 μl 와 ortho-phenylene diamine 5 mg을 넣어 만들었다. 실온에서 5분간 효소반응을 유지시킨 후 2 N 황산용액 50 μl 를 첨가하여 효소반응을 중단시킨 후 발색반응의 정도를 Microplate Reader (Bio-Rad, Model 550)로 490 nm에서 측정하였다.

(8) 웨스턴 블롯 분석.

토끼에서 얻은 복클론 항체와 융합세포에서 얻어진 단클론 항체의 특이성을 확인하기 위하여 웨스턴블롯을 실시하였다. 분리 정제한 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질을 95°C에서 5분간 변성 시키고, 12% 폴리 아크릴 아마이드젤에 전기영동한 후 단백질을 PVDF 막으로 옮겼다. 5% skim milk를 포함한 TBST (10 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20)에 넣고 실온에서 1시간 반응시켰다. 여기에 1% skim milk가 들어있는 TBST에 복클론 항체와

단클론 항체를 7,000 ~ 10,000배 희석하여 1차 항체로 사용하였다. 한 시간 동안 반응시킨 후 TBST로 10분간 3회 세척하고 HRP conjugated Goat anti-Rabbit IgG Polyclonal Antibody 또는 HRP conjugated Goat anti-Mouse IgG Polyclonal Antibody (Cat. No. W402, promega, USA)를 7,000배 희석하여 2차 항체로 사용하였다. 1시간이 지나면 TBST로 10분간 5회 세척하고 ECL kit 및 NBT, BCIP로 발색하였다.

(9) RSNV 바이러스 RT-PCR 진단용 프라이머 개발 및 PCR용 양성 균주 제작.

RSNV 바이러스 외피 단백질 유전자를 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머를 제작하여, Genscript사에서 생합성한 pUC57-RSNV 플라스미드를 대상으로 PCR을 실시한다. 프라이머 제작시 genscript사에서 합성된 RSNV 유전자와 RSNV 바이러스의 유전자 사이에서의 상동성을 가지는 부위가 중첩되게 만든 다음, 나머지 프라이머를 RSNV 바이러스의 유전자에 일치하도록 제작하였다(정방향이 5'-ATGTCTGCCGTGCGAACAGC-3', 역방향은 5'-CTGGACGGTCGTGAACCCA-3'). 제작된 프라이머를 이용하여 pUC57-RSNV 플라스미드를 주형 DNA로 하여 94°C에서 30초, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분으로 총 35회 실시하였다.

2. 결과

(1) *Rice Stripe Necrosis Virus* (RSNV) 바이러스 외피 단백질 발현을 위한 pET15b 플라스미드의 클로닝.

재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질을 대장균을 이용하여 발현을 유도하기 위해서, genscript사에서 합성되어 제작된 pUC57-RSNV 플라스미드를 추출하였다. 추출된 플라스미드 DNA를 제한효소인 *NdeI*과 *BamHI*로 처리한 결과, RSNV 바이러스 외피 단백질 유전자 크기 (561 bp)가 정확하게 나타남을 알 수 있었다(Fig. 15A). 제한효소에 의해 잘려진 RSNV 유전자를 아가로스젤에서 추출·정제 후(Fig. 6-15B), 같은 제한효소로 반응한 pET15b 플라스미드 DNA와 반응 시켜, T4 DNA ligase로 연결시켜, pET15b-RSNV 클론을 획득하였다(Fig. 6-15C).

(2) 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질 발현.

pET15b-RSNV 플라스미드 DNA를 재조합 단백질 발현 대장균 숙주인 BL21 (DE3)에 전기를 이용하여 형질전환 시킨 후, IPTG를 이용하여 RSNV 바이러스 외피 단백질을 과발현 유도를 실시하였다. 과발현 유도 후, 세포의 상층액과 침전물에서 RSNV 바이러스 외피 단백질의 발현 유무를 일차원 단백질 전기영동을 통하여 조사하였다. 그 결과, 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질은 대장균 시스템에서 수용성 단백질로 과발현 되는 것을 알 수 있었으며, 수용성 단백질을 정제 할 수 있었다. Ni-NTA 컬럼을 이용하여 정제를 실시한 결과, 80 mM 이미다졸 용액에서 용출되기 시작하여 500 mM 이미다졸 용액까지 용출됨을 알 수 있었다(Fig. 6-16).

(3) 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질에 대한 복클론 항체의 특이성.

Ni-NTA 컬럼으로 정제한 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백을 이용하여 복클론항체를 제작하였다. 500 mM에서 용출된 재조합 RSNV 단백질을 면역 보조 물질과 함께 토끼의 근육 내에 주사 후, 토끼로부터 복클론 항체를 분리하였다. 제작된 복클론 항체의 특이성을 조사하기 위해서 웨스턴 블롯을 실시 하였다(Fig. 6-17). 그 결과 Fig. 6-17의 1번 레인에서 보듯

이, pET15b 플라스미드만 있는 대장균 BL21 (DE3) 균주의 전체 단백질에서는 RSNV의 복클론 항체에 대한 어떠한 면역 반응도 일어나지 않았다. 그러나 Fig. 6-17의 2, 3번 레인에서 보이듯이, pET15b-RSNV 플라스미드가 들어 있는 BL21 (DE3)와 정제된 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질에서는 RSNV 복클론 항체에 대해서 강한 면역 반응을 보인다. 이는, 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질에 대한 복클론 항체가 그 어떠한 대장균 유래 단백질과 면역 반응을 하지 않는 것을 나타내며, 또한 재조합 RSNV 단백질에 대해서만 면역 반응을 나타내는 것을 알 수 있다.

(4) 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질 복클론 항체의 역가 측정.

재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질에 대항하는 복클론 항체의 역가를 측정하기 위해서, 복클론 항체를 계단 희석하여 효소면역 측정법을 이용하여 조사 하였으며(Fig. 6-18), 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질을 계단 희석하여 RSNV 복클론 항체의 민감도를 효소 면역 측정법과 웨스턴 블롯 방법으로 측정하였다(Fig. 6-19). 그 결과, 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질에 대한 복클론 항체는 10,000배 희석 항체에서도 강력한 면역 반응을 나타내는 것을 알 수 있었고(Fig. 6-18), 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질에 대한 민감도는 10,000배 희석 복클론 항체의 농도에서, 효소면역측정법에서는 10 µg/ml 농도까지(Fig. 6-19A), 웨스턴 블롯 방법에서는 0.2 µg/ml 까지 검출이 가능한 것을 알 수 있었다(Fig. 6-19B).

(5) 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질에 대한 단클론 항체의 특이성 및 역가 조사.

재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질에 대항하는 단클론 항체의 특이성을 조사하기 위해서 웨스턴 블롯을 실시하였다(Fig. 6-20A). 그 결과 Fig. 20A의 1번 레인에서 보듯이, pET15b 플라스미드만 있는 대장균 BL21 (DE3) 균주의 전체 단백질에서는 RSNV의 단클론 항체에 대한 어떠한 면역 반응도 일어나지 않았다. 그러나 Fig. 20A의 2번 레인에서 보이듯이, pET15b-RSNV 플라스미드가 들어 있는 BL21 (DE3)에서는 RSNV 복클론 항체에 대해서 강한 면역 반응을 보인다. 이는, 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질에 대한 복클론 항체가 그 어떠한 대장균 유래 단백질과 면역 반응을 하지 않는 것을 나타내며, 또한 재조합 RSNV 단백질에 대해서만 면역 반응을 나타내는 것을 알 수 있다. 또한, 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질에 대항하는 단클론 항체의 민감도는, 0.1 µg/ml 까지 검출이 가능한 것을 알 수 있었다(Fig. 6-20B).

(6) RSNV 바이러스 외피 단백질 유전자 검출을 위한 역전사효소-중합효소연쇄반응을 프라이머 개발 및 양성 균주 제작.

역전사효소-중합효소연쇄반응을 이용한 RSNV 바이러스 검출용 진단법을 개발하기 위하여, 합성된 pUC57-RSNV 플라스미드 DNA를 이용하여 RSNV 바이러스 검출 양성 균주를 제작 하였다. 이 특이 프라이머를 이용하여 pUC57-RSNV 플라스미드 DNA를 주형으로 하여 역전사효소-중합효소연쇄반응을 수행한 결과, 정확한 크기의 중합효소연쇄반응 산물을 획득 할 수 있었다(Fig. 6-21A). PCR 산물을 pGEM-T 벡터에 클로닝하여(Fig. 6-21B) 염기서열을 분석한 결과, 제작된 특이 프라이머가 RSNV 바이러스 외피 단백질 유전자에 정확하게 일치하는 것을 알 수 있었다(Fig. 6-21C).

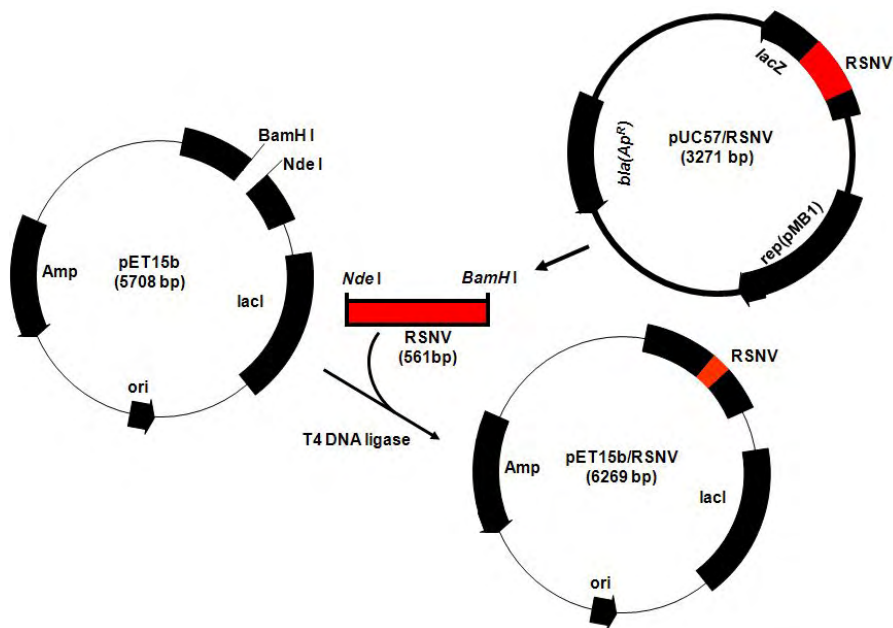


Fig. 6-14. 대장균을 이용한 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질 발현 모식도.

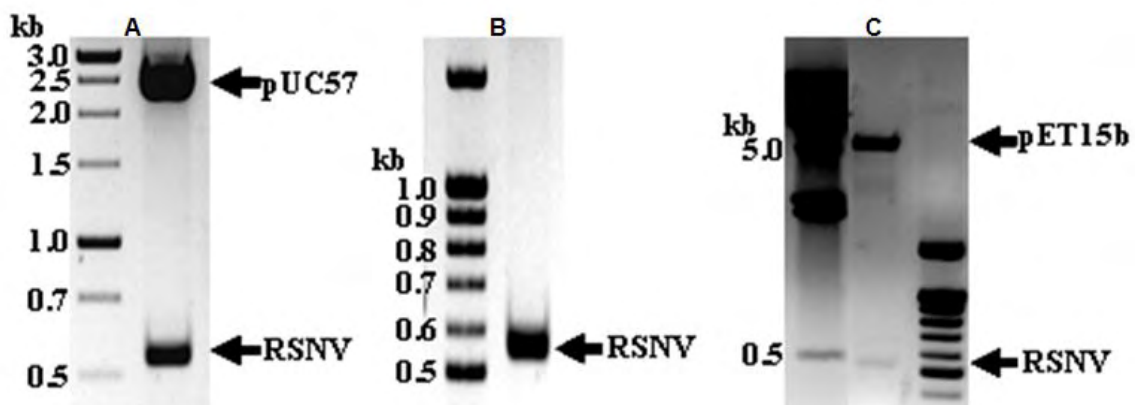


Fig. 6-15. RSNV 바이러스 외피 단백질 유전자의 1% 아가로스젤 전기영동. A : pUC57-RSNV 클론, B : RSNV 분리 및 정제, C : pET15b-RSNV 클론.

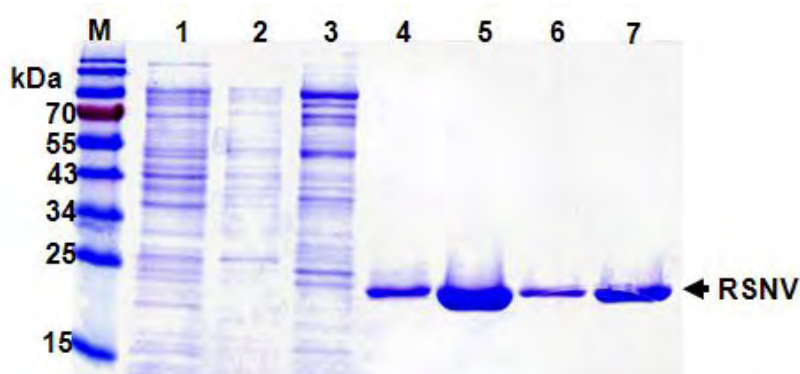


Fig. 6-16. 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질 12% 일차원 단백질 전기영동. M : 단백질 size marker, 1 : Flow through, 2 : 수세, 3 - 7 : 40, 80, 160, 320 그리고 500 mM 이미다졸 용출액.

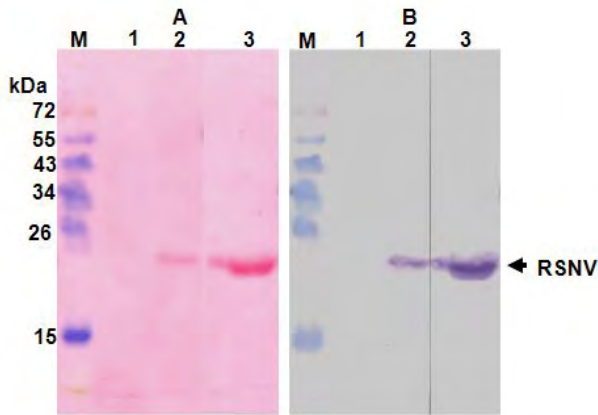


Fig. 6-17. 복클론 항체를 이용한 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질의 웨스턴 블롯.

A : Ponceau-S 염색. B : 웨스턴 블롯

M : 단백질 size marker, 1 : IPTG 과발현 유도 전, 2 : IPTG 과발현 유도 후, 3 : 정제 RSNV 단백질.

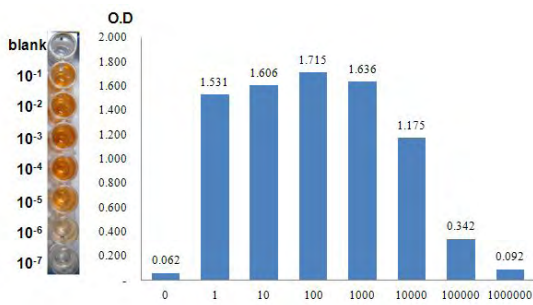


Fig. 6-18. 계단 희석 효소면역 측정법(ELISA)에 의한 복클론 항체 역가 측정.

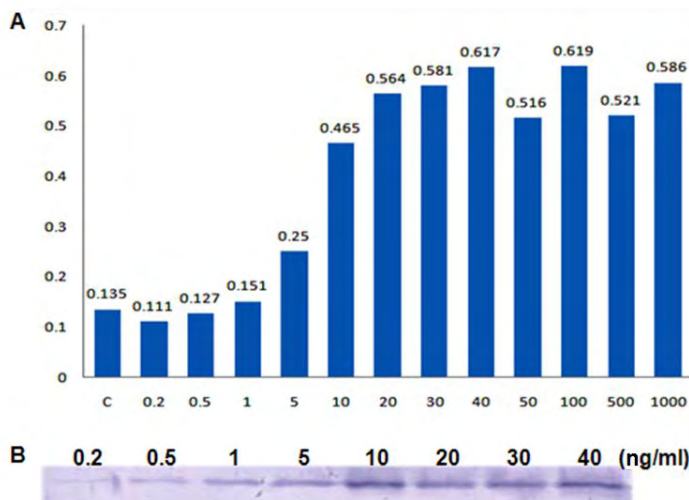


Fig. 6-19. 재조합 RSNV 항원의 농도에 따른 복클론 항체의 역가 측정.

A : 효소면역학적 방법을 통한 역가 측정.

B : 웨스턴 블롯을 통한 역가 측정.

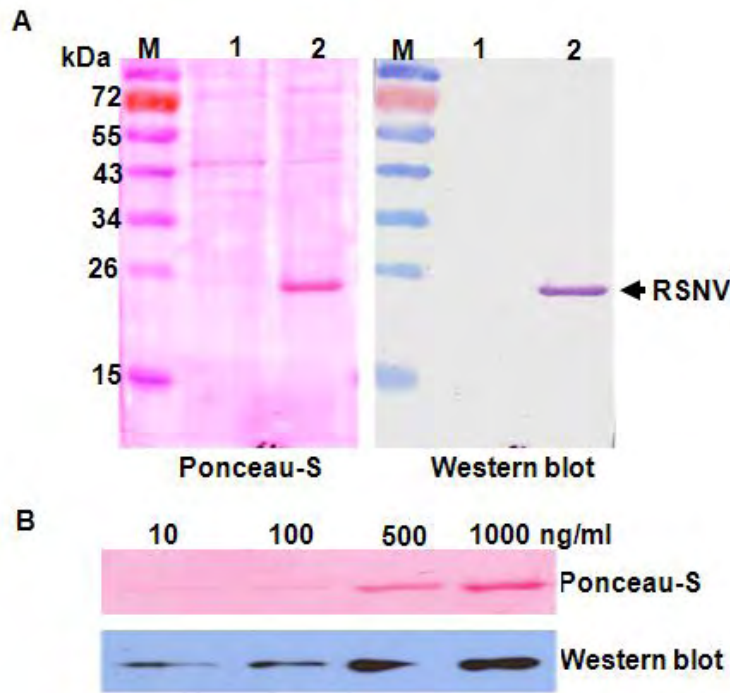


Fig. 6-20. 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질에 대한 단클론 항체 특이성 및 역가 측정.

A : 대장균 전체 단백질에 대한 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질 웨스턴 블롯

M : 단백질 size marker, 1 : pET15b/BL21 (DE3) IPTG 과발현, 2 : pET15b-RSNV/BL21 (DE3) IPTG 과발현.

B : 정제한 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질 웨스턴 블롯.

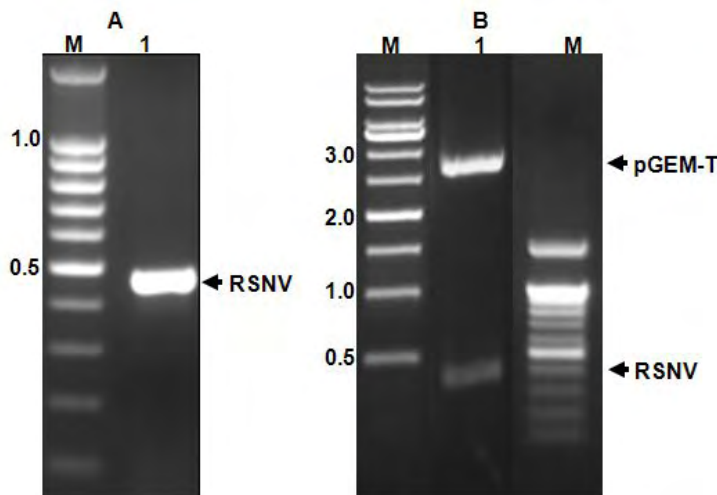


Fig. 6-21. RSNV 바이러스 역전사효소-중합연쇄반응 진단용 프라이머 개발 및 PCR용 양성 균주 제작.

A : RSNV RT-PCR 생성물, B : pGEM-T/RSNV 플라스미드

M : DNA 사이즈 마커, 1 : 특이 프라이머를 이용한 역전사효소-중합연쇄반응 산물.

다. 고찰

Rice Stripe Necrosis Virus (RSNV) 바이러스 검역용 진단 키트를 개발하기 위해서, RSNV의 외피 단백질에 대한 항체를 제작하고자 하였다. 그러나, 원인 바이러스를 국내에서 구할 수 있는 방법이 원천적으로 봉쇄되어 있어, 대장균을 이용한 재조합 단백질을 이용하기로 결정하였다. RSNV 바이러스 외피 단백질 유전자를 미국립보건원의 유전자 은행에서 조사하여, 미국의 펩타이드 합성 회사에 의뢰하여, 대장균에서 발현이 원활히 되도록 최적화 시켜 제작 의뢰를 하였으며(Fig. 6-1), 제작된 재조합 RSNV 유전자를 이용하여 대장균에서 단백질 발현을 유도 하였다. 그 결과, pET15b 플라스미드에(Fig. 6-15)서 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질을 발현 및 정제가 가능하였다(Fig. 6-16).

대장균에서 분리 및 정제한 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질을 이용하여, 토끼와 마우스를 통하여 각각 복클론 항체 및 단클론 항체를 제작하였다. 그 결과, 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질은 토끼(Fig. 6-18, 19)와 마우스에서 면역 반응이 나타났다 (Fig. 6-20).

제작된 복클론 항체를 이용하여 검역용 진단 키트를 제작하기 위해서 실시한 항체의 특성 및 역가 측정에서는, 10,000배 희석한 복클론 항체에서도 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질이 면역 반응을 보였으며(Fig. 6-18), 이 농도의 복클론 항체에서 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질을 효소면역측정법에서는 20 ng/ml 까지(Fig. 6-19A), 웨스턴 블롯법에서는 1 ng/ml 까지 면역반응이 일어남을 알 수 있었다(Fig. 6-19B). 또한 단클론 항체에 대한 특성 및 역가 측정 웨스턴 블롯에서는 100 ng/ml 까지 면역반응이 일어남을 알 수 있었다(Fig. 6-20).

제작된 합성 RSNV 유전자로부터 이 바이러스를 PCR 법으로 진단할 수 있는 프라이머 및 양성 균주를 제작하기 위해서, 바이러스 유전자와 합성 유전자의 중첩되는 부위에 바이러스 유전자를 삽입하여 프라이머를 제작하였고, 제작된 프라이머를 이용하여 합성 유전자로부터 PCR을 실시한 결과, 이 바이러스를 진단할 수 있는 특이 프라이머 및 PCR 실시시 양성 대조균을 제작할 수 있었다(Fig. 6-21)

본 실험에서는, 유전자 합성을 이용하여 대장균에서의 재조합 단백질 발현 및 정제를 통해서 검역용 항체를 제작하는 것에 관한 연구로서, 특정 바이러스 외피 단백질을 구할 수 없을때 재조합 단백질을 이용해서 접근하는 것일 가장 적합한 방법일 것으로 사료되며, 우리가 아는한 국내에서 처음으로 제작된 *Rice Stripe Necrosis* 바이러스 검역용 항체라는 것에 의의가 있다고 판단된다.

4. *Indian Citrus RingSpot Virus* (ICRSV) 검역용 바이러스 진단 키트 개발

가. 연구개발수행 내용

(1) *Indian Citrus RingSpot* 바이러스 외피단백질 합성

Indian Citrus RingSpot Virus (ICRSV) 바이러스 외피단백질 유전자를 미국 국립 보건원 (NIH) 유전자은행을 이용하여 염기서열을 조사하였다. 이 염기서열을 생물정보 프로그램을 이용하여 각각의 바이러스 유전자에 존재하는 제한효소의 종류와 위치를 분석하였다. 이를 토대로 유전자 재조합에 필요한 제한효소 *NdeI*과 *BamHI*를 ICRSV 바이러스 외피단백질 유전자 처음과 말단에 삽입 하였고, 제작된 플라스미드를 대장균에서 재조합 단백질로 발현을 유도할 시, ICRSV 바이러스 외피 단백질만 발현시키기 위하여, 유전자 말단에 정지 코돈을 삽입하여

플라즈미드를 디자인 하였다. 디자인 된 염기서열을 미국의 유전자 합성 회사인 GenScript (www.genscript.com)에 의뢰하여, 대장균에서 단백질 발현이 용이하게 최적화 시켜 주문·제작 하였으며, 이때 제작된 ICRSV 외피단백질 유전자는 Genscript 사에 의해서 pUC57 플라즈미드에 삽입되도록 하였다. 이를 pUC57-ICRSV라 하였다(Rustici et al., 2002).

(2) 재조합 *Indian Citrus RingSpot* 바이러스 외피단백질 발현을 위한 pET15b 플라즈미드의 클로닝

pUC57-ICRSV 플라즈미드에 제한효소 *NdeI*와 *BamHI*을 첨가 시켜, 37°C에서 1 시간 처리한 후, 1% 아가로스젤에 핵산 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후, ICRSV 바이러스 외피 단백질 유전자를 아가로스젤상에서 확인 한 후, 아가로스젤로부터 ICRSV 바이러스 외피 단백질 유전자를 잘라 내었다. 잘라낸 아가로스젤은 Qiagen 젤 용출 키트(Cat. No. 28704, USA)를 이용하여 외피단백질 유전자를 아가로스젤로부터 분리·정제 하였다. 정제된 ICRSV 바이러스 외피단백질 유전자를 *NdeI* 및 *BamHI*으로 처리한 pET15b 플라즈미드에 클로닝을 실시하였다. 클로닝은 *NdeI* 및 *BamHI*로 처리한 pET15b와 아가로스젤에서 분리한 ICRSV 바이러스 외피 단백질 유전자를 섞고, T4 DNA 연결효소 (Cat. No. 2011A, TAKARA, Japan)를 첨가 하였다. 이 첨가물을 14°C에서 1hr 동안 반응시킨 후, 전기(Bio-Rad, USA)를 이용하여 DH10b/r 대장균 숙주에 형질전환 시켰다. 형질전환된 세포를 50µg/ml 암피실린이 들어 있는 LB 고체 배지에 접종하여 37°C에서 16시간 동안 배양한 후, 자라나는 집락을 같은 항생제가 들어 있는 LB 액체 배지(3ml)에 접종하였다. 액체 배지에서 키운 대장균으로부터 플라즈미드 DNA를 추출하여 같은 제한효소인 *NdeI*와 *BamHI*로 처리하여 클로닝이 정확하게 된 콜로니를 획득할 수 있었으며, 이를 pET15b-ICRSV라 명명 하였다(Fig. 6-22).

(3) IPTG을 이용한 pET15b-ICRSV 바이러스 재조합 외피 단백질 과발현 유도

pET15b-ICRSV 플라즈미드를 재조합 단백질 발현 숙주인 대장균 BL21 (DE3)에 전기를 이용하여 형질전환 시켜 얻은 대장균을 항생제 암피실린이 50µg/ml이 함유되어 LB 액체 배지에 접종하였다. 접종한 pET15b-ICRSV BL21 (DE3) 균주를 37°C에서 하루 동안 전 배양을 실시한 후, 같은 항생제가 함유되어 있는 LB 액체 배지(1 L)에 최종 농도가 1%가 되게 본 배양을 실시하였다. 본 배양 후 pET15b-ICRSV BL21 (DE3) 균주가 OD₆₀₀에서 흡광도가 0.6~0.8 사이가 되도록 배양 시킨 후, IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, Promega, Cat. No. V3951, USA)를 최종농도 1mM이 되게끔 첨가 시켰다. IPTG 첨가 후, 17°C, 250 rpm으로 3일간 더 배양 시켜, 재조합 단백질 발현 숙주가 재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질을 최대한 과발현 할 수 있도록 유도 하였다.

(4) 재조합 ICRSV 외피 단백질 발현 및 정제.

IPTG를 이용하여 과발현을 유도한 pET15b-ICRSV BL21 (DE3) 균주를 8,000 rpm에서 22분간 원침 시켜 대장균 세포를 농축 하였고, 농축 후 수세 완충액 (50mM Tris (pH 8.0), 100mM NaCl)로 부유시켰다. 부유시킨 후, 같은 조건에서 원침 하여 pET15b-ICRSV BL21 (DE3) 균주를 수세 완충액으로 수세 하였다. 수세된 pET15b-ICRSV BL21 (DE3) 균주는 수세 완충액 35ml에 다시 부유 시키고, 세포 파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄 하였다. 세포 파쇄는 Amplitude 40%, pulse on 2 초, pulse off 2 초, 4°C에서 5 분간 파쇄한 후, 12,000 rpm에서 연

속으로 2번 원심 분리하여 상층액과 침전물을 완전히 분리하였다. 분리된 상층액은 Ni이 결합되어 있는 아가로스젤 Ni-NTA 레진(invitrogen, Cat. No. 46-0019, USA)을 이용하여 정제를 실시하였다. 정제는 우선 컬럼에 Ni-NTA 레진을 충전 시킨 후, Ni-NTA 레진 용적의 10배 이상의 수세 완충액으로 수세를 실시하였다. 수세 후, 이미다졸 농도를 40, 80, 160, 320 그리고 500 mM로 순차적으로 첨가하여 재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질을 순차적으로 용출시켰다. 용출된 단백질은 12% SDS-PAGE 겔에서 일차원 단백질 전기영동을 실시하여 원하는 단백질의 발현 및 정제가 되었는지를 확인 하였다.

(5) 재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질을 이용한 복클론 항체 제작.

1mg의 재조합 ICRSV 외피 단백질과 Freund's complete adjuvant (FCA, Cat. No. F5881, Sigma, USA)를 혼합하여 emulsifying 주사기로 emulsion을 만들었다. Emulsion이 된 용액을 토끼의 등 쪽 근육에 주사하였다. 1차 접종 2주와 4주 후에 같은 량의 재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질과 동일한 부피의 Freund's incomplete adjuvant (FIA, Cat. No. F5506, Sigma, USA)를 섞어 emulsion을 만들고 토끼에 같은 방법으로 주사하였다. 주사한지 4-5일 후 토끼의 귀에서 피를 뽑아 항체가 생산되었는지 Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay (ELISA)로 확인하였다. 3차 접종한지 2주 후에 재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질만 동일 량을 토끼의 등 쪽 피하에 주사하여 final booster를 실시하였다. 최종 면역 4-5일 후 심장에서 채혈하고 3000 rpm, 15분간 원심분리하여 혈청만을 분리하여 사용하였다.

(6) 재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질을 이용한 단클론 항체 제작

생후 6주된 암컷 Balb/c 쥐에 재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질 50 μ g을 Freund's complete adjuvant와 섞어 emulsion을 만들어 복강에 면역하였다. 면역 2주 후에 동일 량의 재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질을 Freund's incomplete adjuvant와 섞어 emulsion을 만들어 추가 면역하고, 다시 2주 후에 같은 양으로 ICRSV 바이러스 외피 단백질만 이용하여 3차 면역을 하였다. 3차 면역 3-4일 후 쥐의 피를 뽑아 항체가 만들어졌는지를 ELISA로 확인한 다음 세포융합 3일 전에 다시 한번 final booster를 실시하였다. 세포융합에 사용한 골수종은 쥐의 myeloma 세포로 8-azaguanine에 대한 내성을 가지고 면역 글로블린을 생산하지 못하는 P3X63Ag8.V653 세포를 사용하였다. 세포융합을 위하여 20 μ g/ml 농도의 8-azaguanine (Cat. No. A5284, Sigma, USA), 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Cat. No. F2442, Sigma, USA), 50 μ g/ml 농도의 gentamycin (Cat. No. G1522, Sigma, USA)이 들어간 RPMI-1640 (Cat. No. R8758, Sigma, USA) 배지를 2-4일에 한번 씩 새로운 배지로 갈아주며 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 배양하였다. 세포 융합 18시간 전에 10% FBS, gentamycin(50 μ g/ml)이 함유된 RPMI-1640 배지에서 배양하고 RPMI-1640으로 3회 세척한 후, 세포 수를 2x10⁷cells/ml로 조정하여 사용하였다. 최종면역 후 3일이 경과된 Balb/c 쥐로부터 비장을 적출한 뒤 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Cat. No. D5796, Sigma, USA)에 담근 상태에서 비장조직을 파쇄하여 비장세포를 분리하였다. 비장 세포액을 실온에서 15분간 방치시켜 비장의 결합조직을 가라앉히고 상등액을 시험관으로 옮겨 담는다. 여기에 2 ml의 Fetal Bovine Serum (FBS)을 첨가하여 1200rpm에서 5분간 원심분리 하여 비장 세포액 내의 혈소판을 제거하였다. DMEM으로 1회 세척하고 비장 세포액에 Red Blood Cell lysing buffer (RBC lysing buffer, Cat. No. R7757, Sigma, USA)를 처리하여 적혈구를 용혈시켜 백혈구 성분을 분리하였다. 비장세포를 RPMI-1640으로 3회 세척하고 세포 수를 1x10⁸cells/ml로 조정하여 사용하였다. 위에서 준비한

골수종 세포(P3X63Ag8.V653) 2×10^7 개와 비장세포 1×10^8 개를 혼합한 후 DMEM으로 2회 세척하였다. 혼합 세포 침전물을 37°C 로 보온하면서 1 ml의 polyethylene glycol 1500 (Cat. No. 10783 641, Roche, USA)을 1분간 점적하여 세포를 융합시켰다. 여기에 37°C 의 DMEM 1 ml을 1분에 걸쳐 첨가하고 다시 DMEM 15 ml을 5분에 걸쳐 첨가하면서 현탁한다. 원심분리 후 20% FBS, gentamycin($50 \mu\text{g}/\text{ml}$)이 함유된 DMEM 배지로 세포를 현탁하고 96 well plate (Cat. No. CLS3879, Corning, USA)에 well당 $50 \mu\text{l}$ 씩 분주하여 37°C , 5% CO_2 에서 배양하였다. 세포융합 후 1, 3, 5 및 7일에 20% FBS, gentamycin($50 \mu\text{g}/\text{ml}$), HAT($50 \mu\text{M}$ hypoxanthine, $0.4 \mu\text{M}$ aminopterin, $16 \mu\text{M}$ thymidine, Cat. No. 21060, Gibco, USA)가 포함된 DMEM 배지를 well당 $50 \mu\text{l}$ 씩 첨가하고, 9일째에 $150 \mu\text{l}$ 의 배지를 10% FBS, gentamycin($50 \mu\text{g}/\text{ml}$), HT($50 \mu\text{M}$ hypoxanthine, $16 \mu\text{M}$ thymidine, Cat. No. 11067 030, Gibco, USA)가 포함된 DMEM 배지로 갈아주면서 13일째까지 융합된 세포를 증식시켰다. 이때 세포의 증식 양상을 역위상차 현미경으로 관찰하였다. 세포를 융합시킨 후 10-13일 사이에 세포가 well 바닥의 1/3이상 증식하면 배양 상등액에 항체가 생산되었는지를 ELISA로 조사하였다. 항체를 생산하는 세포를 24 well plate에 옮겨 배양하고, 항체 역가가 계속 유지되면서 세포의 증식이 활발한 hybridoma cell을 선택하여 cloning을 실시하였다. 세포를 DMEM으로 희석하여 $10 \sim 30 \text{ cells}/\text{ml}$ 의 농도가 되도록 조절한 후 원심분리하였다. 10% FBS, gentamycin($50 \mu\text{g}/\text{ml}$), HT($50 \mu\text{M}$ hypoxanthine, $16 \mu\text{M}$ thymidine)이 포함된 DMEM 배지로 현탁한 후 well당 $100 \mu\text{l}$ 씩 분주하여 배양하였다. 배양 5일째에 역위상차 현미경으로 1개의 세포 군락이 형성된 well을 선택하였다. ELISA에서 항체의 역가가 높고 웨스턴 블롯에서 특이 band가 확인된 hybrid cell을 최종 선택하여 증식시켰다.

(7) Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

항체의 반응 특이성을 조사하기 위하여 다음과 같이 효소면역측정법을 실시하였다. 수용성 항원은 96-well polystyrene microplate (Costar, Serocluster 96well EIA/RIA plate, flat bottom, Cat. No. 3590)에 0.05 M carbonate 완충액(pH 9.6)을 가하여 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 항원을 희석하여 well당 $100 \mu\text{l}$ 씩 첨가하고 4°C 에서 밤새 부착시켰다. 여기에 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.3)-0.05% Tween20으로 세 번 세척하고 3% BSA를 $100 \mu\text{l}/\text{well}$ 로 첨가하여 37°C 에서 3시간 동안 처리하였다. 이를 다시 PBS-Tween20 용액으로 세척하고 검색할 배양액이나 희석한 혈청을 $100 \mu\text{l}/\text{well}$ 로 첨가하고 37°C 에서 1시간 동안 항원-항체 반응을 진행시켰다. PBS-Tween20으로 세 번 세척하고 1:7,000으로 희석된 peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG antibody(토끼의 경우 1:5,000으로 희석된 peroxides-linked anti-rabbit IgG)를 $100 \mu\text{l}/\text{well}$ 로 첨가하여 37°C 에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS-Tween20 용액으로 5회 세척하고 발색제가 첨가된 기질용액을 $100 \mu\text{l}/\text{well}$ 로 첨가하였다. 기질용액은 0.1 M phosphate-citrate완충액(PCB) 10 ml에 30% 과산화수소 $20 \mu\text{l}$ 와 ortho-phenylene diamine 5 mg을 넣어 만들었다. 실온에서 5분간 효소반응을 유지시킨 후 2 N 황산용액 $50 \mu\text{l}$ 를 첨가하여 효소반응을 중단시킨 후 발색반응의 정도를 Microplate Reader (Bio-Rad, Model 550)로 490 nm에서 측정하였다.

(8) 웨스턴 블롯 분석.

토끼에서 얻은 복클론 항체와 융합세포에서 얻어진 단클론 항체의 특이성을 확인하기 위하여 웨스턴블롯을 실시하였다. 분리 정제한 재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질을 95°C 에서 5분간 변성 시키고, 12% 폴리 아크릴 아마이드젤에 전기영동한 후 단백질을 PVDF 막으

로 옮겼다. 5% skim milk를 포함한 TBST (10 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20)에 넣고 실온에서 1시간 반응시켰다. 여기에 1% skim milk가 들어있는 TBST에 복클론 항체와 단클론 항체를 7,000 ~ 10,000배 희석하여 1차 항체로 사용하였다. 한 시간 동안 반응시킨 후 TBST로 10분간 3회 세척하고 HRP conjugated Goat anti-Rabbit IgG Polyclonal Antibody 또는 HRP conjugated Goat anti-Mouse IgG Polyclonal Antibody (Cat. No. W402, promega, USA)를 7,000배 희석하여 2차 항체로 사용하였다. 1시간이 지나면 TBST로 10분간 5회 세척하고 ECL kit 및 NBT, BCIP로 발색하였다.

(9) ICRSV 바이러스 RT-PCR 진단용 프라이머 개발 및 PCR용 양성 균주 제작.

RSNV 바이러스 외피 단백질 유전자를 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머를 제작하여, Genscript사에서 생합성한 pUC57-RSNV 플라스미드를 대상으로 PCR을 실시한다. 프라이머 제작시 genscript사에서 합성된 RSNV 유전자와 RSNV 바이러스의 유전자 사이에서의 상동성을 가지는 부위가 중첩되게 만든 다음, 나머지 프라이머를 RSNV 바이러스의 유전자에 일치하도록 제작하였다(정방향이 5'-GCGAACGAAGACCTCAATCCAGTGG-3', 역방향은 5'-CGGCCTTTGGTGAAGGCAAC-3'). 제작된 프라이머를 이용하여 pUC57-RSNV 플라스미드를 주형 DNA로 하여 94°C에서 30초, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분으로 총 35회 실시하였다.

나. 결과

(1) *Indian Citrus RingSpot Virus* (ICRSV) 바이러스 외피 단백질 발현을 위한 pET15b 플라스미드의 클로닝.

재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질을 대장균을 이용하여 발현을 유도하기 위해서, genscript사에서 합성되어 제작된 pUC57-ICRSV 플라스미드를 추출하였다. 추출된 플라스미드 DNA를 제한효소인 *NdeI*과 *BamHI*로 처리한 결과, ICRSV 바이러스 외피 단백질 유전자 크기 (561 bp)가 정확하게 나타남을 알 수 있었다(Fig. 6-23A). 제한효소에 의해 잘려진 ICRSV 유전자를 아가로스젤에서 추출·정제 후(Fig. 6-23B), 같은 제한효소로 반응한 pET15b 플라스미드 DNA와 반응 시켜, T4 DNA ligase로 연결시켜, pET15b-ICRSV 클론을 획득하였다(Fig. 6-23C).

(2) 재조합 RSNV 바이러스 외피 단백질 발현.

pET15b-ICRSV 플라스미드 DNA를 재조합 단백질 발현 대장균 숙주인 BL21 (DE3)에 전기를 이용하여 형질전환 시킨 후, IPTG를 이용하여 ICRSV 바이러스 외피 단백질을 과발현 유도를 실시하였다. 과발현 유도 후, 세포의 상층액과 침전물에서 ICRSV 바이러스 외피 단백질의 발현 유무를 일차원 단백질 전기영동을 통하여 조사하였다. 그 결과, 재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질은 대장균 시스템에서 수용성 단백질로 과발현 되는 것을 알 수 있었으며, 수용성 단백질을 정제 할 수 있었다. Ni-NTA 컬럼을 이용하여 정제를 실시한 결과, 80 mM 이미다졸 용액에서 용출되기 시작하여 500 mM 이미다졸 용액까지 용출됨을 알 수 있었다(Fig. 6-24).

(3) 재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질에 대한 복클론 항체의 특이성.

Ni-NTA 컬럼으로 정제한 재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백을 이용하여 복클론항체를 제작하였다. 500 mM에서 용출된 재조합 ICRSV 단백질을 면역 보조 물질과 함께 토끼의

근육내에 주사 후, 토끼로부터 복클론 항체를 분리하였다. 제작된 복클론 항체의 특이성을 조사하기 위해서 웨스턴 블롯을 실시 하였다(Fig. 6-25). 그 결과 Fig. 6-4의 1번 레인에서 보듯이, pET15b 플라스미드만 있는 대장균 BL21 (DE3) 균주의 전체 단백질에서는 ICRSV의 복클론 항체에 대한 어떠한 면역 반응도 일어나지 않았다. 그러나 Fig. 6-25의 2, 3번 레인에서 보이듯이, pET15b-ICRSV 플라스미드가 들어 있는 BL21 (DE3)와 정제된 재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질에서는 ICRSV 복클론 항체에 대해서 강한 면역 반응을 보인다. 이는, 재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질에 대한 복클론 항체가 그 어떠한 대장균 유래 단백질과 면역 반응을 하지 않는 것을 나타내며, 또한 재조합 ICRSV 단백질에 대해서만 면역 반응을 나타내는 것을 알 수 있다.

(4) 재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질 복클론 항체의 역가 측정.

재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질에 대항하는 복클론 항체의 역가를 측정하기 위해서, 복클론 항체를 계단 희석하여 효소면역 측정법을 이용하여 조사 하였으며(Fig. 6-26), 재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질을 계단 희석하여 ICRSV 복클론 항체의 민감도를 효소 면역 측정법과 웨스턴 블롯 방법으로 측정하였다(Fig. 6-27). 그 결과, 재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질에 대한 복클론 항체는 10,000배 희석 항체에서도 강력한 면역 반응을 나타내는 것을 알 수 있었고(Fig. 6-27), 재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질에 대한 민감도는 10,000 배 희석 복클론 항체의 농도에서, 효소면역측정법에서는 10 µg/ml 농도까지(Fig. 6-27A), 웨스턴 블롯 방법에서는 0.2 µg/ml 까지 검출이 가능한 것을 알 수 있었다(Fig. 6-27B).

(5) 재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질에 대한 단클론 항체의 특이성 및 역가 조사.

재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질에 대항하는 단클론 항체의 특이성을 조사하기 위해서 웨스턴 블롯을 실시하였다(Fig. 6-28A). 그 결과 Fig. 6-28A의 1번 레인에서 보듯이, pET15b 플라스미드만 있는 대장균 BL21 (DE3) 균주의 전체 단백질에서는 ICRSV의 단클론 항체에 대한 어떠한 면역 반응도 일어나지 않았다. 그러나 Fig. 6-28A의 2번 레인에서 보이듯이, pET15b-ICRSV 플라스미드가 들어 있는 BL21 (DE3)에서는 ICRSV 복클론 항체에 대해서 강한 면역 반응을 보인다. 이는, 재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질에 대한 복클론 항체가 그 어떠한 대장균 유래 단백질과 면역 반응을 하지 않는 것을 나타내며, 또한 재조합 ICRSV 단백질에 대해서만 면역 반응을 나타내는 것을 알 수 있다. 또한, 재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질에 대항하는 단클론 항체의 민감도는, 0.1 µg/ml 까지 검출이 가능한 것을 알 수 있었다(Fig. 6-28B).

(6) ICRSV 바이러스 외피 단백질 유전자 검출을 위한 역전사효소-중합효소연쇄반응을 프라이머 개발 및 양성 균주 제작.

역전사효소-중합연쇄반응을 이용한 ICRSV 바이러스 검출용 진단법을 개발하기 위하여, 합성된 pUC57-ICRSV 플라스미드 DNA를 이용하여 ICRSV 바이러스 검출 양성 균주를 제작 하였다. 이 특이 프라이머를 이용하여 pUC57-ICRSV 플라스미드 DNA를 주형으로 하여 역전사효소-중합효소연쇄반응을 수행한 결과, 정확한 크기의 중합효소연쇄반응 산물을 획득 할 수 있었다(Fig. 6-29A). PCR 산물을 pGEM-T 벡터에 클로닝하여(Fig. 6-29B) 염기서열을 분석한 결과, 제작된 특이 프라이머가 ICRSV 바이러스 외피 단백질 유전자에 정확하게 일

치하는 것을 알 수 있었다(Fig. 6-29C).

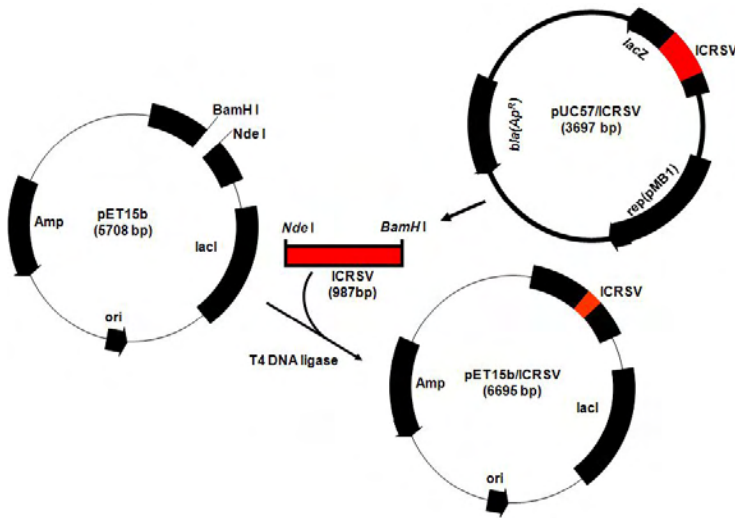


Fig. 6-22. 대장균을 이용한 재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질 발현 모식도.

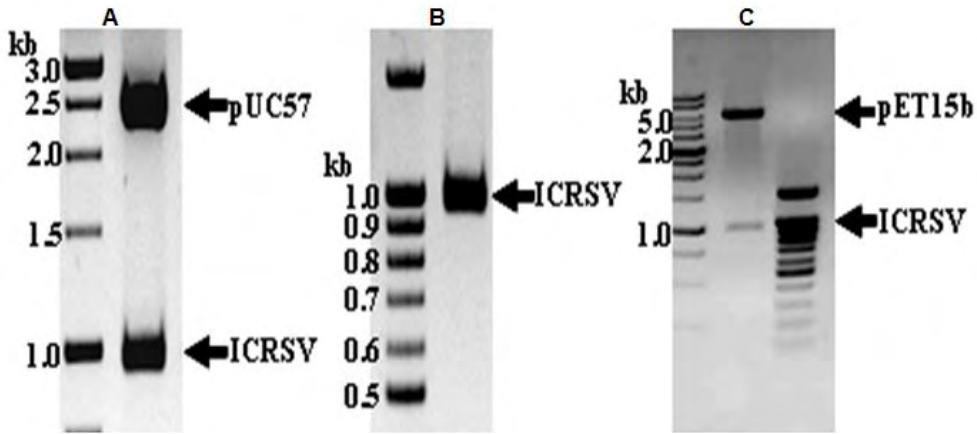


Fig. 6-23. ICRSV 바이러스 외피 단백질 유전자의 1% 아가로스젤 전기영동.
A : pUC57-ICRSV 클론, B : ICRSV 분리 및 정제, C : pET15b-ICRSV 클론.

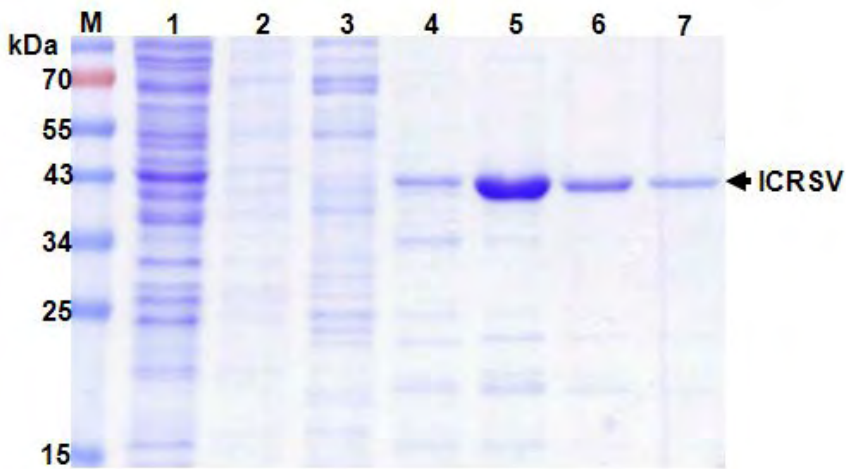


Fig. 6-24. 재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질 12% 일차원 단백질 전기영동.
M : 단백질 size marker, 1 : Flow through, 2 : 수세, 3 - 7 : 40, 80, 160, 320 그리고 500 mM 이미다졸 용출액.

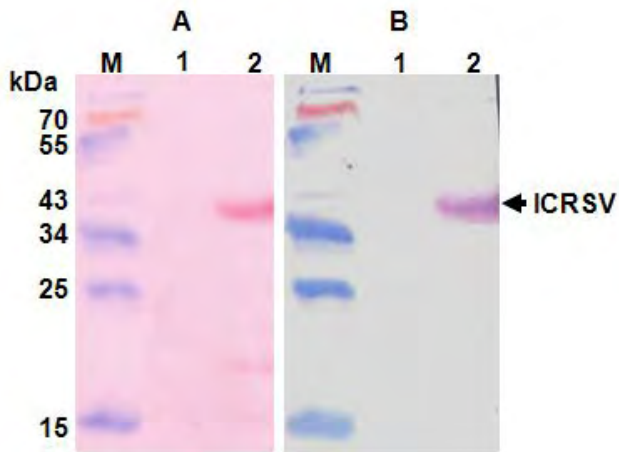


Fig. 6-25. 복클론 항체를 이용한 재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질의 웨스턴 블롯.
 A : Ponceau-S 염색. B : 웨스턴 블롯
 M : 단백질 size marker, 1 : IPTG 과발현 유도 전, 2 : IPTG 과발현 유도 후.

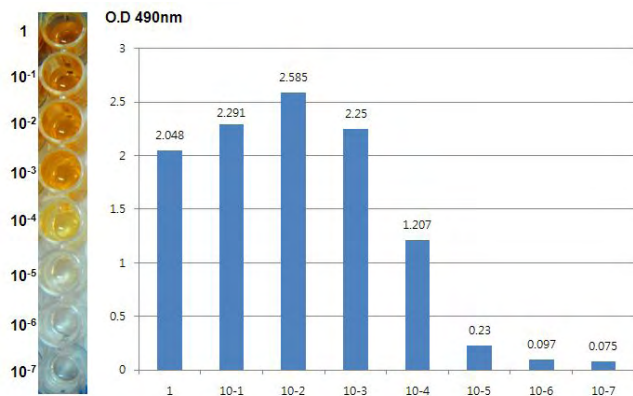


Fig. 6-26. 계단 희석 효소면역 측정법(ELISA)에 의한 복클론 항체 역가 측정.

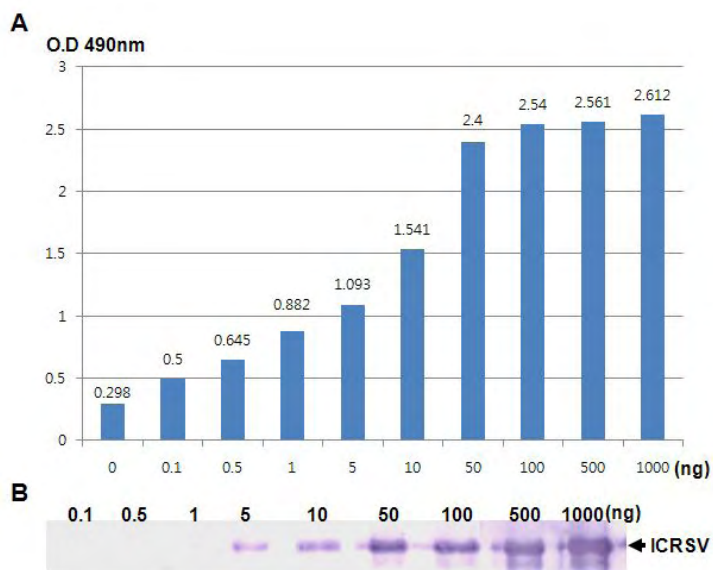


Fig. 6-27. 재조합 ICRSV 항원의 농도에 따른 복클론 항체의 역가 측정.
 A : 효소면역학적 방법을 통한 역가 측정; B : 웨스턴 블롯을 통한 역가 측정.

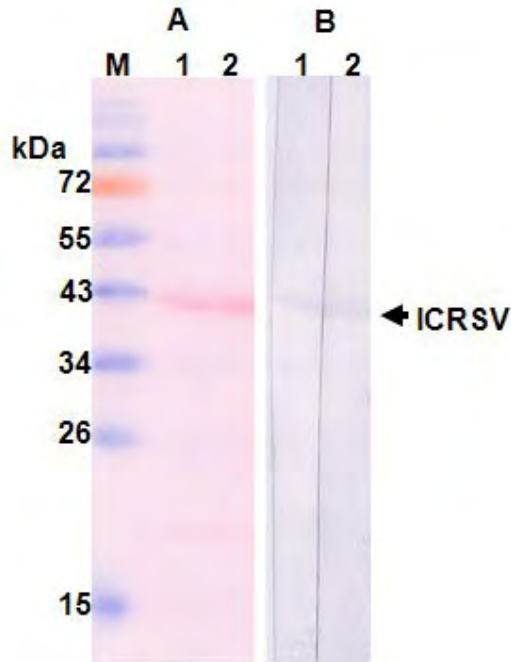


Fig. 6-28. 재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질에 대한 단클론 항체 웨스턴 블롯
 A : Ponceau-S 염색, B : 웨스턴 블롯
 M : 단백질 size marker, 1 - 2 : 정제 재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질.

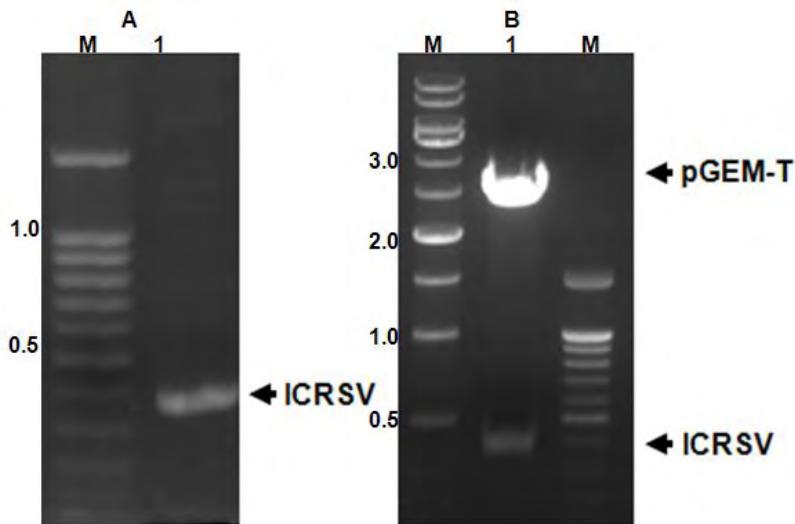


Fig. 6-29. ICRSV 바이러스 역전사효소-중합연쇄반응 진단용 프라이머 개발 및 PCR용 양성 균주 제작.
 A : ICRSV RT-PCR 생성물, B : pGEM-T/ICRSV 플라스미드
 M : DNA 사이즈 마커, 1 : 특이 프라이머를 이용한 역전사효소-중합연쇄반응 산물.

다. 고찰

Indian Citrus RingSpot Virus (ICRSV) 바이러스 검역용 진단 키트를 개발하기 위해서, ICRSV의 외피 단백질에 대한 항체를 제작하고자 하였다. 그러나, 원인 바이러스를 국내에서 구할 수 있는 방법이 원천적으로 봉쇄되어 있어, 대장균을 이용한 재조합 단백질을 이용하기로 결정하였다. ICRSV 바이러스 외피 단백질 유전자를 미국립보건원의 유전자 은행에서 조사하여, 미국의 펩타이드 합성 회사에 의뢰하여, 대장균에서 발현이 원활히 되도록 최적화 시켜 제작 의뢰를 하였으며(Fig. 6-22), 제작된 재조합 ICRSV 유전자를 이용하여 대장균에서 단백질 발현을 유도 하였다. 그 결과, pET15b 플라스미드에(Fig. 6-23)서 재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질을 발현 및 정제가 가능하였다(Fig. 6-24).

대장균에서 분리 및 정제한 재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질을 이용하여, 토끼와 마우스를 통하여 각각 복클론 항체 및 단클론 항체를 제작하였다. 그 결과, 재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질은 복클론 항체에(Fig. 6-23, 27) 강한 면역 반응을 보였으나, 마우스에서 제작한 단클론에서는 면역 반응이 약하게 나타났다 (Fig. 6-28). 이는, 항체를 제작하기 위해서 면역 시킨 항원이 마우스에서는 T 림프구를 이용하지 않는 T 림프구 독립 항원일거라 사료된다.

제작된 복클론 항체를 이용하여 검역용 진단 키트를 제작하기 위해서 실시한 항체의 특성 및 역가 측정에서는, 10,000배 희석한 복클론 항체에서도 재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질이 면역 반응을 보였으며(Fig. 6-26), 이 농도의 복클론 항체에서 재조합 ICRSV 바이러스 외피 단백질을 효소면역측정법에서는 5 ng/ml 까지(Fig. 6-27A), 웨스턴 블롯법에서는 5 ng/ml 까지 면역반응이 일어남을 알 수 있었다(Fig. 6-27B).

제작된 합성 ICRSV 유전자로부터 이 바이러스를 PCR 법으로 진단할 수 있는 프라이머 및 양성 균주를 제작하기 위해서, 바이러스 유전자와 합성 유전자의 중첩되는 부위에 바이러스 유전자를 삽입하여 프라이머를 제작하였고, 제작된 프라이머를 이용하여 합성 유전자로부터 PCR을 실시한 결과, 이 바이러스를 진단할 수 있는 특이 프라이머 및 PCR 실시시 양성 대조 균을 제작할 수 있었다(Fig. 6-29).

본 실험에서는, 유전자 합성을 이용하여 대장균에서의 재조합 단백질 발현 및 정제를 통해서 검역용 항체를 제작하는 것에 관한 연구로서, 특정 바이러스 외피 단백질을 구할 수 없을 때 재조합 단백질을 이용해서 접근하는 것일 가장 적합한 방법일 것으로 사료되며, 우리가 아는 국내에서 처음으로 제작된 *Indian Citrus RingSpot* 바이러스 검역용 항체라는 것에 의의가 있다고 판단된다.

5. *Eggplant mottled crinkle virus* (EMCV) 검역용 바이러스 진단 키트 개발

가. 연구개발수행 내용

(1) *Eggplant mottled crinkle* 바이러스 외피단백질 합성

Eggplant mottled crinkle virus (EMCV) 바이러스 외피단백질 유전자를 미국 국립 보건원 (NIH) 유전자은행을 이용하여 염기서열을 조사하였다. 이 염기서열을 생물정보 프로그램을 이용하여 각각의 바이러스 유전자에 존재하는 제한효소의 종류와 위치를 분석하였다. 이를 토대로 유전자 재조합에 필요한 제한효소 *NdeI*과 *BamHI*를 EMCV 바이러스 외피단백질 유전자 처음과 말단에 삽입 하였고, 제작된 플라스미드를 대장균에서 재조합 단백질로 발현을 유도

할 시, EMCV 바이러스 외피 단백질만 발현시키기 위하여, 유전자 말단에 정지 코돈을 삽입하여 플라즈미드를 디자인 하였다. 디자인 된 염기서열을 미국의 유전자 합성 회사인 GenScript (www.genscript.com)에 의뢰하여, 대장균에서 단백질 발현이 용이하게 최적화 시켜 주문·제작 하였으며, 이때 제작된 EMCV 외피단백질 유전자는 Genscript 사에 의해서 pUC57 플라즈미드에 삽입되도록 하였다. 이를 pUC57-EMCV라 하였다(Koenig et al., 2004).

(2) 재조합 *Eggplant mottled crinkle* 바이러스 외피단백질 발현을 위한 pET15b 플라즈미드의 클로닝

pUC57-EMCV 플라즈미드에 제한효소 *NdeI*와 *BamHI*을 첨가 시켜, 37°C에서 1 시간 처리한 후, 1% 아가로스젤에 핵산 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후, EMCV 바이러스 외피 단백질 유전자를 아가로스젤상에서 확인 한 후, 아가로스젤로부터 EMCV 바이러스 외피단백질 유전자를 잘라 내었다. 잘라낸 아가로스젤은 Qiagen 젤 용출 키트(Cat. No. 28704, USA)를 이용하여 외피단백질 유전자를 아가로스젤로부터 분리·정제 하였다. 정제된 EMCV 바이러스 외피단백질 유전자를 *NdeI* 및 *BamHI*으로 처리한 pET15b 플라즈미드에 클로닝을 실시하였다¹⁵. 클로닝은 *NdeI* 및 *BamHI*로 처리한 pET15b와 아가로스젤에서 분리한 EMCV 바이러스 외피 단백질 유전자를 섞고, T4 DNA 연결효소 (Cat. No. 2011A, TAKARA, Japan)를 첨가 하였다. 이 첨가물을 14°C에서 1hr 동안 반응시킨 후, 전기(Bio-Rad, USA)를 이용하여 DH10b/r 대장균 숙주에 형질전환 시켰다. 형질전환된 세포를 50µg/ml 암피실린이 들어 있는 LB 고체 배지에 접종하여 37°C에서 16시간 동안 배양한 후, 자라나는 집락을 같은 항생제가 들어 있는 LB 액체 배지(3ml)에 접종하였다. 액체 배지에서 키운 대장균으로부터 플라즈미드 DNA를 추출하여 같은 제한효소인 *NdeI*와 *BamHI*로 처리하여 클로닝이 정확하게 된 콜로니를 획득할 수 있었으며, 이를 pET15b-EMCV라 명명 하였다(Fig. 6-30).

(3) IPTG을 이용한 pET15b-EMCV 바이러스 재조합 외피 단백질 과발현 유도

pET15b-EMCV 플라즈미드를 재조합 단백질 발현 숙주인 대장균 BL21 (DE3)에 전기를 이용하여 형질전환 시켜 얻은 대장균을 항생제 암피실린이 50µg/ml이 함유되어 LB 액체 배지에 접종하였다. 접종한 pET15b-EMCV BL21 (DE3) 균주를 37°C에서 하루 동안 전 배양을 실시한 후, 같은 항생제가 함유되어 있는 LB 액체 배지(1 L)에 최종 농도가 1%가 되게 본 배양을 실시하였다. 본 배양 후 pET15b-EMCV BL21 (DE3) 균주가 OD₆₀₀에서 흡광도가 0.6~0.8 사이가 되도록 배양 시킨 후, IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, Promega, Cat. No. V3951, USA)를 최종농도 1mM이 되게끔 첨가 시켰다. IPTG 첨가 후, 17°C, 250 rpm으로 3일간 더 배양 시켜, 재조합 단백질 발현 숙주가 재조합 EMCV 바이러스 외피 단백질을 최대한 과발현 할 수 있도록 유도 하였다.

(4) 재조합 EMCV 외피 단백질 발현 및 정제.

IPTG를 이용하여 과발현을 유도한 pET15b-EMCV BL21 (DE3) 균주를 8,000 rpm에서 22분간 원침 시켜 대장균 세포를 농축 하였고, 농축 후 수세 완충액 (50mM Tris (pH 8.0), 100mM NaCl)로 부유시켰다. 부유시킨 후, 같은 조건에서 원침 하여 pET15b-EMCV BL21 (DE3) 균주를 수세 완충액으로 수세 하였다. 수세된 pET15b-EMCV BL21 (DE3) 균주는 수세 완충액 35ml에 다시 부유 시키고, 세포 파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄 하였다. 세포 파쇄는

Amplitude 40%, pulse on 2 초, pulse off 2 초, 4°C에서 5 분간 파쇄한 후, 12,000 rpm에서 연속으로 2번 원심 분리하여 상층액과 침전물을 완전히 분리하였다. 분리된 상층액은 Ni이 결합되어 있는 아가로스젤 Ni-NTA 레진(invitrogen, Cat. No. 46-0019, USA)을 이용하여 정제를 실시하였다. 정제는 우선 컬럼에 Ni-NTA 레진을 충전 시킨 후, Ni-NTA 레진 용적의 10배 이상의 수세 완충액으로 수세를 실시하였다. 수세 후, 이미다졸 농도를 40, 80, 160, 320 그리고 500 mM로 순차적으로 첨가하여 재조합 EMCV 바이러스 외피 단백질을 순차적으로 용출시켰다. 용출된 단백질은 12% SDS-PAGE 겔에서 일차원 단백질 전기영동을 실시하여 원하는 단백질의 발현 및 정제가 되었는지를 확인 하였다.

(5) EMCV 바이러스 RT-PCR 진단용 프라이머 개발 및 PCR용 양성 균주 제작.

EMCV 바이러스 외피 단백질 유전자를 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머를 제작하여, Genscript사에서 생합성한 pUC57-EMCV 플라스미드를 대상으로 PCR을 실시한다. 프라이머 제작시 genscript사에서 합성된 EMCV 유전자와 EMCV 바이러스의 유전자 사이에서의 상동성을 가지는 부위가 중첩되게 만든 다음, 나머지 프라이머를 EMCV 바이러스의 유전자에 일치하도록 제작하였다(정방향이 5'-CAAGCTTGCATGCAGGCC-3', 역방향은 5'-TGAATTTCGAGCTCGGTACCTC-3'). 제작된 프라이머를 이용하여 pUC57-EMCV 플라스미드를 주형 DNA로 하여 RT-PCR을 실시 하였다.

나. 결과

(1) *Eggplant mottled crinkle virus* (EMCV) 바이러스 외피 단백질 발현을 위한 pET15b 플라스미드의 클로닝.

재조합 EMCV 바이러스 외피 단백질을 대장균을 이용하여 발현을 유도하기 위해서, genscript사에서 합성되어 제작된 pUC57-EMCV 플라스미드를 추출하였다. 추출된 플라스미드 DNA를 제한효소인 *NdeI*과 *BamHI*로 처리한 결과, EMCV 바이러스 외피 단백질 유전자 크기 (792 bp)가 정확하게 나타남을 알 수 있었다(Fig. 6-31A). 제한효소에 의해 잘려진 EMCV 유전자를 아가로스젤에서 추출·정제 후(Fig. 6-31B), 같은 제한효소로 반응한 pET15b 플라스미드 DNA와 반응 시켜, T4 DNA ligase로 연결시켜, pET15b-EMCV 클론을 획득하였다(Fig. 6-31C).

(2) 재조합 EMCV 외피 단백질 발현

pET15b-EMCV 플라스미드 DNA를 재조합 단백질 발현 대장균 숙주인 BL21 (DE3)에 전기를 이용하여 형질전환 시킨 후, IPTG를 이용하여 EMCV 바이러스 외피 단백질을 과발현 유도를 실시 하였다. 과발현 유도 후, 세포의 상층액과 침전물에서 EMCV 바이러스 외피 단백질의 발현 유무를 일차원 단백질 전기영동을 통하여 조사하였다. 그 결과, 재조합 EMCV 바이러스 외피 단백질은 대장균 시스템에서 전혀 재조합 단백질로서 발현이 되지 않음을 알 수 있었다(Fig. 6-32).

(3) EMCV 바이러스 외피 단백질 유전자 검출을 위한 RT-PCR 프라이머 개발 및 양성 균주 제작.

대장균 시스템을 이용한 재조합 EMCV 바이러스 외피 단백질 발현이 대장균에서는 전

혀 되지 않았다. 따라서, RT-PCR을 이용한 EMCV 바이러스 검출용 진단법을 이용하기 위하여, 합성된 pUC57-EMCV 플라스미드 DNA를 이용하여 특이 프라이머 개발 및 양성 균주를 제작 하였다. 합성된 EMCV 바이러스 외피 단백질 유전자와 EMCV 바이러스 외피 유전자를 중첩시키고, EMCV 바이러스 외피 단백질을 연결한 특이 프라이머를 제작하였다. 이 특이 프라이머를 이용하여 pUC57-EMCV 플라스미드 DNA를 주형으로 하여 RT-PCR을 수행한 결과, 정확한 크기의 PCR 산물을 획득 할 수 있었다(Fig. 6-33). PCR 산물을 pGEM-T 벡터에 클로닝하여 염기서열을 분석한 결과, 제작된 특이 프라이머가 EMCV 바이러스 외피 단백질 유전자에 정확하게 일치하는 것을 알 수 있었다(Fig. 6-34).

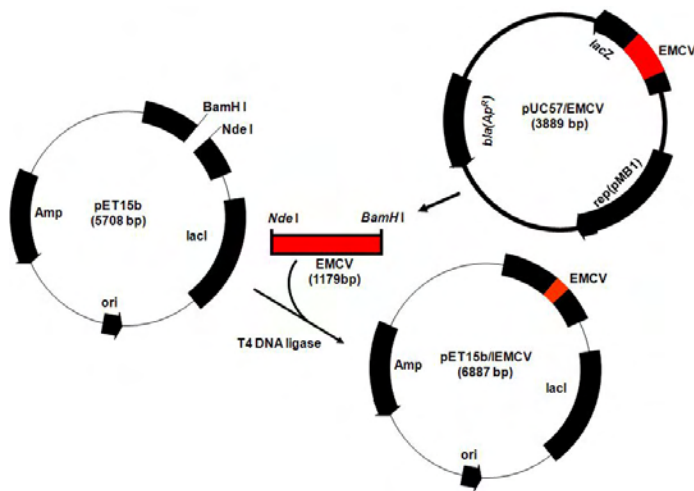


Fig. 6-30. 대장균을 이용한 재조합 EMCV 바이러스 외피 단백질 발현 모식도.

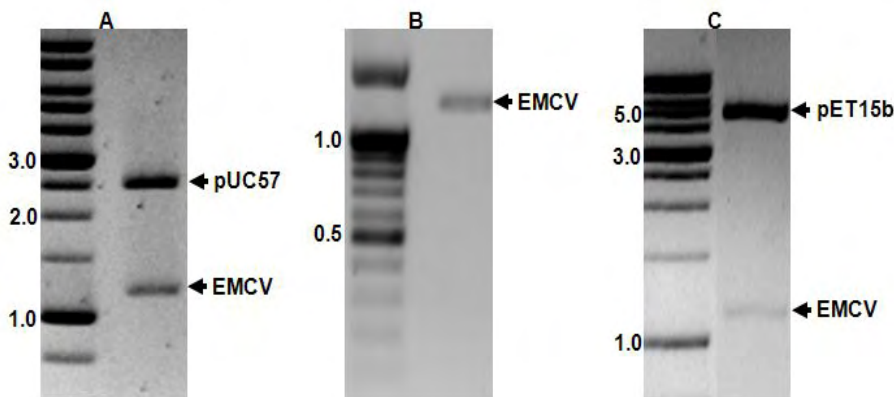


Fig. 6-31. EMCV 바이러스 외피 단백질 유전자의 1% 아가로스젤 전기영동. A : pUC57-EMCV 클론, B : EMCV 분리 및 정제, C : pET15b-EMCV 클론.

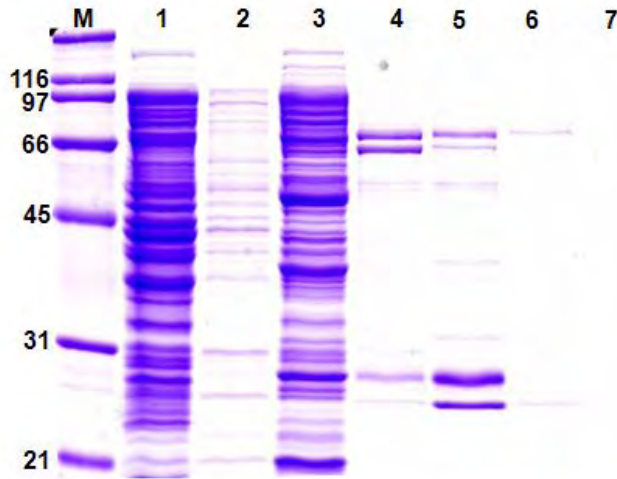


Fig. 6-32. 재조합 EMCV 바이러스 외피 단백질 12% 일차원 단백질 전기영동.

M : 단백질 size marker, 1 : Flow through, 2 : 수세, 3 - 7 : 40, 80, 160, 320 그리고 500 mM 이미다졸 용출액.

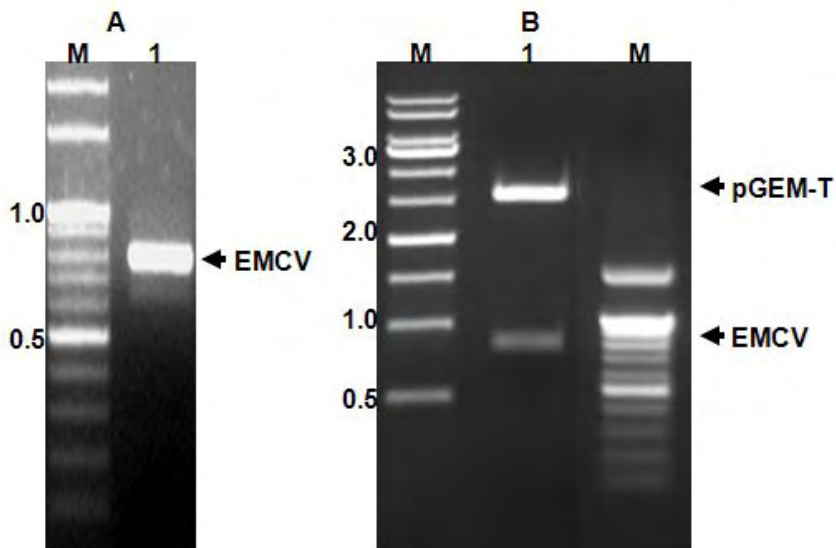


Fig. 6-33. EMCV 바이러스 역전사효소-중합연쇄반응 진단용 프라이머 개발 및 PCR용 양성 균주 제작.

A : EMCV RT-PCR 생성물, B : pGEM-T/EMCV 플라스미드

M : DNA 사이즈 마커, 1 : 특이 프라이머를 이용한 역전사효소-중합연쇄반응 산물.

다. 고찰

Eggplant mottled crinkle virus (EMCV) 바이러스 검역용 진단 키트를 개발하기 위해서, EMCV의 외피 단백질에 대한 항체를 제작하고자 하였다. 그러나, 원인 바이러스를 국내에서 구할 수 있는 방법이 원천적으로 봉쇄되어 있어, 대장균을 이용한 재조합 단백질을 이용하기로 결정하였다. EMCV 바이러스 외피 단백질 유전자를 미국립보건원의 유전자 은행에서 조사하여, 미국의 펩타이드 합성 회사에 의뢰하여, 대장균에서 발현이 원활히 되도록 최적화 시켜 제작 의뢰를 하였으며(Fig. 6-30), 제작된 재조합 EMCV 유전자를 재조합 단백질 발현 대장균에서 단백질 발현을 유도 하기 위하여 클로닝을 실시하였다. 먼저, 대장균에서 재조합 단백질 발

현 플라스미드로 이용되는 pET15b 플라스미드에(Fig. 6-31) 제작된 EMCV 유전자를 클로닝을 실시하였고(Fig. 6-31), 대장균에서 재조합 단백질 발현 숙주로 사용되고 있는 BL21 (DE3)에 형질전환 시킨 후, IPTG를 이용하여 재조합 EMCV 바이러스 외피 단백질을 대장균에서 발현을 유도하였다(Fig. 6-32). 그 결과, *Eggplant mottled crinkle virus* (EMCV) 바이러스 외피 단백질은 대장균 시스템에서 재조합 단백질로 전혀 발현이 되지 않았다(Fig. 6-32). 이는 대장균에서 EMCV 유전자가 유전자로서 전혀 작동하지 않는 것이라 사료된다.

대장균에서 재조합 EMCV 바이러스 외피 단백질이 전혀 발현되지 않아, 단백질을 이용한 항체 제작을 할 수 없었으므로, PCR을 통한 검역 키트를 제작 하였다. 먼저, 합성된 EMCV 바이러스 유전자와 미국립 보건원에서 조사한 EMCV 바이러스 유전자의 중첩되는 부위를 찾아, 원래의 EMCV 바이러스 외피 단백질 유전자를 첨가시켜 특이 프라이머를 합성하였다. 합성된 프라이머를 이용하여, 제작한 EMCV 플라스미드 DNA에서 PCR을 수행한 결과, EMCV 바이러스 외피 단백질 유전자를 특이적으로 검출 되었다(Fig. 6-33).

본 실험에서는, *Eggplant mottled crinkle* 바이러스(EMCV) 외피 단백질 유전자를 특이적으로 증폭할 수 있는 특이 프라이머를 제작 및 PCR 수행시 양성 대조군으로 사용할 수 있는 양성 균주의 개발에 관한 것으로, 우리가 아는한 국내에서 처음으로 제작된 *Eggplant mottled crinkle* 바이러스 검역용 특이 프라이머라는 것에 의의가 있다고 판단된다.

6. *Citrus leprosis virus C* (CiLV) 검역용 바이러스 진단 키트 개발

가. 연구개발수행 내용

(1) *Citrus leprosis* 바이러스 외피단백질 합성

Citrus leprosis virus C (CiLV) 바이러스 외피단백질 유전자를 미국 국립 보건원 (NIH) 유전자은행을 이용하여 염기서열을 조사하였다. 이 염기서열을 생물정보 프로그램을 이용하여 각각의 바이러스 유전자에 존재하는 제한효소의 종류와 위치를 분석하였다. 이를 토대로 유전자 재조합에 필요한 제한효소 *NdeI*과 *BamHI*를 CiLV 바이러스 외피단백질 유전자 처음과 말단에 삽입 하였고, 제작된 플라스미드를 대장균에서 재조합 단백질로 발현을 유도할 시, CiLV 바이러스 외피 단백질만 발현시키기 위하여, 유전자 말단에 정지 코돈을 삽입하여 플라스미드를 디자인 하였다. 디자인 된 염기서열을 미국의 유전자 합성 회사인 GenScript (www.genscript.com)에 의뢰하여, 대장균에서 단백질 발현이 용이하게 최적화 시켜 주문·제작 하였으며, 이때 제작된 CiLV 외피단백질 유전자는 Genscript 사에 의해서 pUC57 플라스미드에 삽입되도록 하였다. 이를 pUC57-CiLV라 하였다(Local-Fabris et al., 2006).

(2) 재조합 *Citrus leprosis* 바이러스 외피단백질 발현을 위한 pET15b 플라스미드의 클로닝

pUC57-CiLV 플라스미드에 제한효소 *NdeI*와 *BamHI*를 첨가 시켜, 37°C에서 1 시간 처리한 후, 1% 아가로스젤에 핵산 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후, CiLV 바이러스 외피단백질 유전자를 아가로스젤상에서 확인 한 후, 아가로스젤로부터 CiLV 바이러스 외피단백질 유전자를 잘라 내었다. 잘라낸 아가로스젤은 Qiagen 젤 용출 키트(Cat. No. 28704. USA)를 이용하여 외피단백질 유전자를 아가로스젤로부터 분리·정제 하였다. 정제된 CiLV 바이러스 외피단백질 유전자를 *NdeI* 및 *BamHI*로 처리한 pET15b 플라스미드에 클로닝을 실시하였다¹³. 클로닝은 *NdeI* 및 *BamHI*로 처리한 pET15b와 아가로스젤에서 분리한 CiLV 바이러스 외피 단

백질 유전자를 섞고, T4 DNA 연결효소 (Cat. No. 2011A, TAKARA, Japan)를 첨가 하였다. 이 첨가물을 14°C에서 1hr 동안 반응시킨 후, 전기(Bio-Rad, USA)를 이용하여 DH10b/r 대장균 숙주에 형질전환 시켰다. 형질전환된 세포를 50µg/ml 암피실린이 들어 있는 LB 고체 배지에 접종하여 37°C에서 16시간 동안 배양한 후, 자라나는 집락을 같은 항생제가 들어 있는 LB 액체 배지(3ml)에 접종하였다. 액체 배지에서 키운 대장균으로부터 플라즈미드 DNA를 추출하여 같은 제한효소인 *NdeI*와 *BamHI*로 처리하여 클로닝이 정확하게 된 콜로니를 획득할 수 있었으며, 이를 pET15b-CiLV라 명명 하였다(Fig. 6-34).

(3) IPTG을 이용한 pET15b-CiLV 바이러스 재조합 외피 단백질 과발현 유도

pET15b-CiLV 플라즈미드를 재조합 단백질 발현 숙주인 대장균 BL21 (DE3)에 전기를 이용하여 형질전환 시켜 얻은 대장균을 항생제 암피실린이 50µg/ml이 함유되어 LB 액체 배지에 접종하였다. 접종한 pET15b-CiLV BL21 (DE3) 균주를 37°C에서 하루 동안 전 배양을 실시한 후, 같은 항생제가 함유되어 있는 LB 액체 배지(1 L)에 최종 농도가 1%가 되게 본 배양을 실시하였다. 본 배양 후 pET15b-CiLV BL21 (DE3) 균주가 OD₆₀₀에서 흡광도가 0.6~0.8 사이가 되도록 배양 시킨 후, IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, Promega, Cat. No. V3951, USA)를 최종농도 1mM이 되게끔 첨가 시켰다. IPTG 첨가 후, 17°C, 250 rpm으로 3일간 더 배양 시켜, 재조합 단백질 발현 숙주가 재조합 CiLV 바이러스 외피 단백질을 최대한 과발현 할 수 있도록 유도 하였다.

(4) 재조합 CiLV 외피 단백질 발현 및 정제.

IPTG를 이용하여 과발현을 유도한 pET15b-CiLV BL21 (DE3) 균주를 8,000 rpm에서 22분간 원심 시켜 대장균 세포를 농축 하였고, 농축 후 수세 완충액 (50mM Tris (pH 8.0), 100mM NaCl)로 부유시켰다. 부유시킨 후, 같은 조건에서 원심 하여 pET15b-CiLV BL21 (DE3) 균주를 수세 완충액으로 수세 하였다. 수세된 pET15b-CiLV BL21 (DE3) 균주는 수세 완충액 35ml에 다시 부유 시키고, 세포 파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄 하였다. 세포 파쇄는 Amplitude 40%, pulse on 2 초, pulse off 2 초, 4°C에서 5 분간 파쇄한 후, 12,000 rpm에서 연속으로 2번 원심 분리하여 상층액과 침전물을 완전히 분리하였다. 분리된 상층액은 Ni이 결합되어 있는 아가로스젤 Ni-NTA 레진(invitrogen, Cat. No. 46-0019, USA)을 이용하여 정제를 실시하였다. 정제는 우선 컬럼에 Ni-NTA 레진을 충전 시킨 후, Ni-NTA 레진 용적의 10배 이상의 수세 완충액으로 수세를 실시하였다. 수세 후, 이미다졸 농도를 40, 80, 160, 320 그리고 500 mM로 순차적으로 첨가하여 재조합 CiLV 바이러스 외피 단백질을 순차적으로 용출 시켰다. 용출된 단백질은 12% SDS-PAGE 겔에서 일차원 단백질 전기영동을 실시하여 원하는 단백질의 발현 및 정제가 되었는지를 확인 하였다.

(5) CiLV 바이러스 RT-PCR 진단용 프라이머 개발 및 PCR용 양성 균주 제작.

CiLV 바이러스 외피 단백질 유전자를 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머를 제작하여, Genscript사에서 생합성한 pUC57-CiLV 플라즈미드를 대상으로 PCR을 실시한다. 프라이머 제작시 genscript사에서 합성된 CiLV 유전자와 CiLV 바이러스의 유전자 사이에서의 상동성을 가지는 부위가 중첩되게 만든 다음, 나머지 프라이머를 CiLV 바이러스의 유전자에 일치하도록 제작하였다(정방향은 5'-GTCAGCGCGCCCTCAGCAACTGCA-3', 역방향은 5'

-AAGTTGTGCCTCTGCATAGTCAGA-3'). 제작된 프라이머를 이용하여 pUC57-CiLV 플라스미드를 주형 DNA로 하여 94°C에서 30초, 58°C에서 1분, 72°C에서 1분으로 총 35회 실시하였다(Kubo et al., 2011). RT-PCR을 실시 한 후, 중합효소연쇄반응 산물을 pGEM-T easy 플라스미드에 삽입하여, CiLV 중합효소연쇄반응 양성 균주를 제작하였다.

나. 결과

(1) *Citrus leprosis* (CiLV) 바이러스 외피 단백질 발현을 위한 pET15b 플라스미드의 클로닝.

재조합 CiLV 바이러스 외피 단백질을 대장균을 이용하여 발현을 유도하기 위해서, genscript사에서 합성되어 제작된 pUC57-CiLV 플라스미드를 추출하였다. 추출된 플라스미드 DNA를 제한효소인 *NdeI*과 *BamHI*로 처리한 결과, CiLV 바이러스 외피 단백질 유전자 크기 (792 bp)가 정확하게 나타남을 알 수 있었다(Fig. 6-35A). 제한효소에 의해 잘려진 CiLV 유전자를 아가로스젤에서 추출·정제 후(Fig. 6-35B), 같은 제한효소로 반응한 pET15b 플라스미드 DNA와 반응 시켜, T4 DNA ligase로 연결시켜, pET15b-CiLV 클론을 획득하였다(Fig. 6-35C).

(2) 재조합 CiLV 외피 단백질 발현

pET15b-CiLV 플라스미드 DNA를 재조합 단백질 발현 대장균 숙주인 BL21 (DE3)에 전기를 이용하여 형질전환 시킨 후, IPTG를 이용하여 CiLV 바이러스 외피 단백질을 과발현 유도를 실시 하였다. 과발현 유도 후, 세포의 상층액과 침전물에서 CiLV 바이러스 외피 단백질의 발현 유무를 일차원 단백질 전기영동을 통하여 조사하였다. 그 결과, 재조합 CiLV 바이러스 외피 단백질은 대장균 시스템에서 전혀 재조합 단백질로서 발현이 되지 않음을 알 수 있었다(Fig. 6-36).

(3) CiLV 바이러스 외피 단백질 유전자 검출을 위한 RT-PCR 프라이머 개발 및 양성 균주 제작.

대장균 시스템을 이용한 재조합 CiLV 바이러스 외피 단백질 발현이 대장균에서는 전혀 되지 않았다. 따라서, RT-PCR을 이용한 CiLV 바이러스 검출용 진단법을 이용하기 위하여, 합성된 pUC57-CiLV 플라스미드 DNA를 이용하여 특이 프라이머 개발 및 양성 균주를 제작 하였다. 합성된 CiLV 바이러스 외피 단백질 유전자와 CiLV 바이러스 외피 유전자를 중첩시키고, CiLV 바이러스 외피 단백질을 연결한 특이 프라이머를 제작하였다. 이 특이 프라이머를 이용하여 pUC57-CiLV 플라스미드 DNA를 주형으로 하여 RT-PCR을 수행한 결과, 정확한 크기의 PCR 산물을 획득 할 수 있었다(Fig. 6-37).

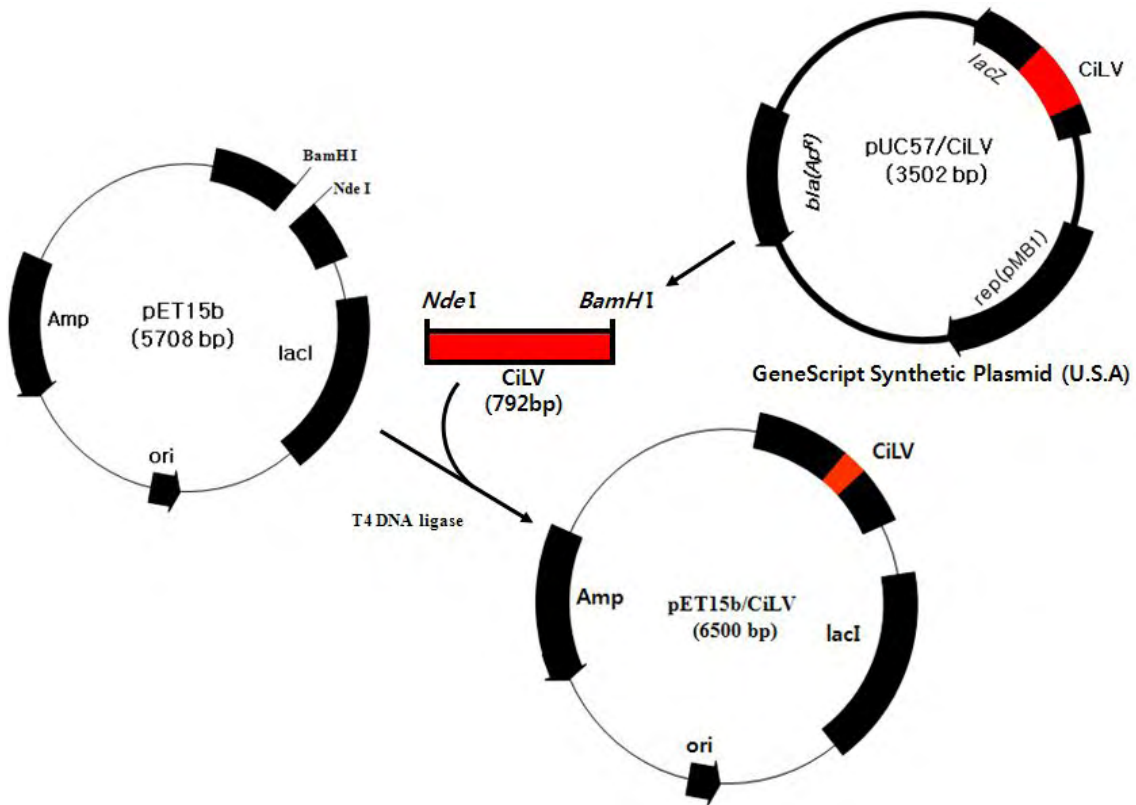


Fig. 6-34. 대장균을 이용한 재조합 CiLV 바이러스 외피 단백질 발현 모식도.

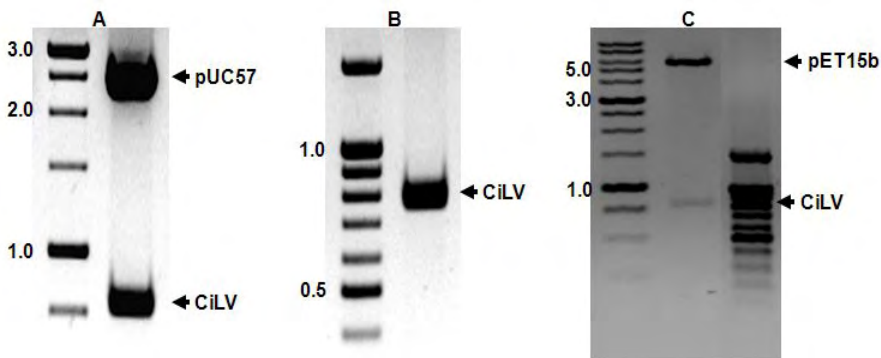


Fig. 6-35. CiLV 바이러스 외피 단백질 유전자의 1% 아가로스겔 전기영동.
A : pUC57-CiLV 클론, B : CiLV 분리 및 정제, C : pET15b-CiLV 클론.

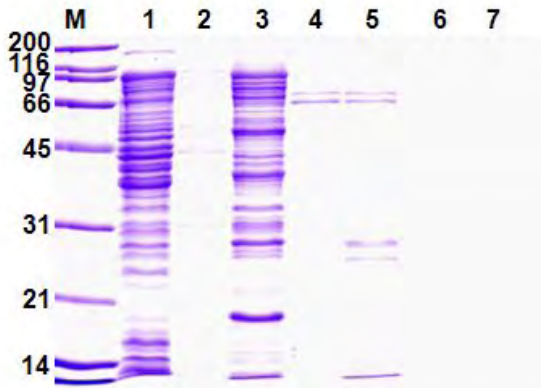


Fig. 6-36. 재조합 CiLV 바이러스 외피 단백질의 12% SDS-PAGE 단백질 전기영동.
 M : 단백질 size marker, 1 : Flow through, 2 : 수세, 3-7 : 40, 80, 160, 320 and 500 mM 이
 미다졸 용출액.

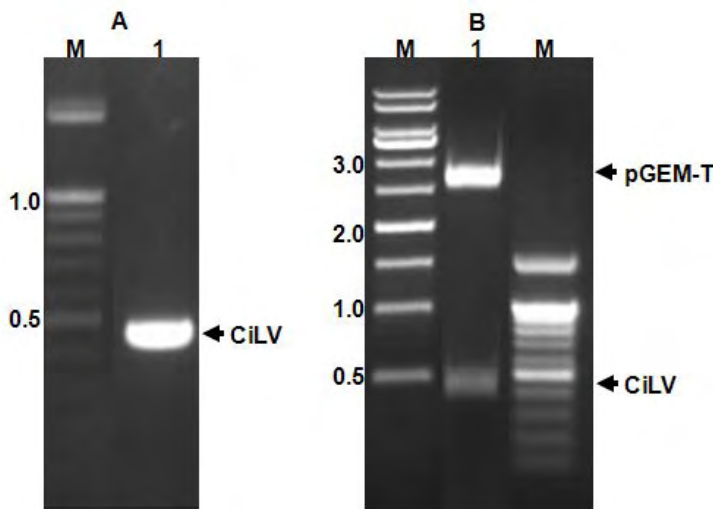


Fig. 6-37. CiLV 바이러스 역전사효소-중합연쇄반응 진단용 프라이머 개발 및 PCR용 양성
 균주 제작.
 A : CiLV RT-PCR 생성물, B : pGEM-T/CiLV 플라스미드
 M : DNA 사이즈 마커, 1 : 특이 프라이머를 이용한 역전사효소-중합연쇄반응 산물.

다. 고찰

Citrus leprosis virus (CiLV) 바이러스 검역용 진단 키트를 개발하기 위해서, CiLV의 외
 피 단백질에 대한 항체를 제작하고자 하였다. 그러나, 원인 바이러스를 국내에서 구할 수 있는
 방법이 원천적으로 봉쇄되어 있어, 대장균을 이용한 재조합 단백질을 이용하기로 결정하였다.
 CiLV 바이러스 외피 단백질 유전자를 미국립보건원의 유전자 은행에서 조사하여, 미국의 펩타
 이드 합성 회사에 의뢰하여, 대장균에서 발현이 원활히 되도록 최적화 시켜 제작 의뢰를 하였
 으며(Fig. 6-34), 제작된 재조합 CiLV 유전자를 재조합 단백질 발현 대장균에서 단백질 발현
 을 유도 하기 위하여 클로닝을 실시하였다. 먼저, 대장균에서 재조합 단백질 발현 플라스미드
 로 이용되는 pET15b 플라스미드에(Fig. 6-35) 제작된 CiLV 유전자를 클로닝을 실시하였고

(Fig. 6-35), 대장균에서 재조합 단백질 발현 숙주로 사용되고 있는 BL21 (DE3)에 형질전환시킨 후, IPTG을 이용하여 재조합 CiLV 바이러스 외피 단백질을 대장균에서 발현을 유도하였다(Fig. 6-36). 그 결과, *Citrus leprosis virus* (CiLV) 바이러스 외피 단백질은 대장균 시스템에서 재조합 단백질로 전혀 발현이 되지 않았다(Fig. 6-36). 이는 대장균에서 CiLV 유전자가 유전자로서 전혀 작동하지 않는 것이라 사료된다.

대장균에서 재조합 CiLV 바이러스 외피 단백질이 전혀 발현되지 않아, 단백질을 이용한 항체 제작을 할 수 없었으므로, PCR을 통한 검역 키트를 제작 하였다. 먼저, 합성된 CiLV 바이러스 유전자와 미국립 보건원에서 조사한 CiLV 바이러스 유전자의 중첩되는 부위를 찾아, 원래의 CiLV 바이러스 외피 단백질 유전자를 첨가시켜 특이 프라이머를 합성하였다. 합성된 프라이머를 이용하여, 제작한 CiLV 플라스미드 DNA에서 PCR을 수행한 결과, CiLV 바이러스 외피 단백질 유전자를 특이적으로 검출 되었다(Fig. 6-37).

본 실험에서는, *Citrus leprosis* 바이러스(CiLV) 외피 단백질 유전자를 특이적으로 증폭할 수 있는 특이 프라이머를 제작 및 PCR 수행시 양성 대조군으로 사용할 수 있는 양성 균주의 개발에 관한 것으로, 우리가 아는한 국내에서 처음으로 제작된 *Citrus leprosis* 바이러스 검역용 특이 프라이머라는 것에 의의가 있다고 판단된다.

7. *Fragaria Chiloensis Latent virus* (FCILV) 검역용 바이러스 진단 키트 개발

가. 연구개발수행 내용

(1) *Fragaria Chiloensis Latent virus* 바이러스 외피 단백질 합성

Fragaria Chiloensis Latent virus (FCILV) 바이러스 외피단백질 유전자를 미국 국립 보건원 (NIH) 유전자은행을 이용하여 염기서열을 조사하였다. 이 염기서열을 생물정보 프로그램을 이용하여 각각의 바이러스 유전자에 존재하는 제한효소의 종류와 위치를 분석하였다. 이를 토대로 유전자 재조합에 필요한 제한효소 *NdeI*과 *BamHI*를 FCILV 바이러스 외피단백질 유전자 처음과 말단에 삽입 하였고, 제작된 플라스미드를 대장균에서 재조합 단백질로 발현을 유도할 시, FCILV 바이러스 외피 단백질만 발현시키기 위하여, 유전자 말단에 정지 코돈을 삽입하여 플라스미드를 디자인 하였다. 디자인 된 염기서열을 미국의 유전자 합성 회사인 GenScript (www.genscript.com)에 의뢰하여, 대장균에서 단백질 발현이 용이하게 최적화 시켜 주문·제작하였으며, 이때 제작된 FCILV 외피단백질 유전자는 Genscript 사에 의해서 pUC57 플라스미드에 삽입되도록 하였다. 이를 pUC57-FCILV라 하였다.

(2) 재조합 *Fragaria Chiloensis Latent* 바이러스 외피단백질 발현을 위한 pET15b 플라스미드의 클로닝

pUC57-FCILV 플라스미드에 제한효소 *NdeI*와 *BamHI*를 첨가 시켜, 37°C에서 1 시간 처리한 후, 1% 아가로스젤에 핵산 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후, FCILV 바이러스 외피 단백질 유전자를 아가로스젤상에서 확인 한 후, 아가로스젤로부터 FCILV 바이러스 외피단백질 유전자를 잘라 내었다. 잘라낸 아가로스젤은 Qiagen 젤 용출 키트(Cat. No. 28704. USA)를 이용하여 외피단백질 유전자를 아가로스젤로부터 분리·정제 하였다. 정제된 FCILV 바이러스 외피단백질 유전자를 *NdeI* 및 *BamHI*으로 처리한 pET15b 플라스미드에 클로닝을 실시하였다¹⁹. 클로닝은 *NdeI* 및 *BamHI*로 처리한 pET15b와 아가로스젤에서 분리한 FCILV 바이러스 외

피 단백질 유전자를 섞고, T4 DNA 연결효소 (Cat. No. 2011A, TAKARA, Japan)를 첨가 하였다. 이 첨가물을 14°C에서 1hr 동안 반응시킨 후, 전기(Bio-Rad, USA)를 이용하여 DH10b/r 대장균 숙주에 형질전환 시켰다. 형질전환된 세포를 50µg/ml 암피실린이 들어 있는 LB 고체 배지에 접종하여 37°C에서 16시간 동안 배양한 후, 자라나는 집락을 같은 항생제가 들어 있는 LB 액체 배지(3ml)에 접종하였다. 액체 배지에서 키운 대장균으로부터 플라스미드 DNA를 추출하여 같은 제한효소인 *NdeI*와 *BamHI*로 처리하여 클로닝이 정확하게 된 콜로니를 획득할 수 있었으며, 이를 pET15b-FCILV라 명명 하였다(Fig. 6-38).

3) IPTG을 이용한 pET15b-FCILV 바이러스 재조합 외피 단백질 과발현 유도

pET15b-FCILV 플라스미드를 재조합 단백질 발현 숙주인 대장균 BL21 (DE3)에 전기를 이용하여 형질전환 시켜 얻은 대장균을 항생제 암피실린이 50µg/ml이 함유되어 LB 액체 배지에 접종하였다. 접종한 pET15b-FCILV BL21 (DE3) 균주를 37°C에서 하루 동안 전 배양을 실시한 후, 같은 항생제가 함유되어 있는 LB 액체 배지(1 L)에 최종 농도가 1%가 되게 본 배양을 실시하였다. 본 배양 후 pET15b-FCILV BL21 (DE3) 균주가 OD₆₀₀에서 흡광도가 0.6~0.8 사이가 되도록 배양 시킨 후, IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, Promega, Cat. No. V3951, USA)를 최종농도 1mM이 되게끔 첨가 시켰다. IPTG 첨가 후, 17°C, 250 rpm으로 3일간 더 배양 시켜, 재조합 단백질 발현 숙주가 재조합 FCILV 바이러스 외피 단백질을 최대한 과발현 할 수 있도록 유도 하였다.

(4) 재조합 FCILV 외피 단백질 발현 및 정제.

IPTG를 이용하여 과발현을 유도한 pET15b-FCILV BL21 (DE3) 균주를 8,000 rpm에서 22분간 원심 시켜 대장균 세포를 농축 하였고, 농축 후 수세 완충액 (50mM Tris (pH 8.0), 100mM NaCl)로 부유시켰다. 부유시킨 후, 같은 조건에서 원심 하여 pET15b-FCILV BL21 (DE3) 균주를 수세 완충액으로 수세 하였다. 수세된 pET15b-FCILV BL21 (DE3) 균주는 수세 완충액 35ml에 다시 부유 시키고, 세포 파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄 하였다. 세포 파쇄는 Amplitude 40%, pulse on 2 초, pulse off 2 초, 4°C에서 5 분간 파쇄한 후, 12,000 rpm에서 연속으로 2번 원심 분리하여 상층액과 침전물을 완전히 분리하였다. 분리된 상층액은 Ni이 결합되어 있는 아가로스젤 Ni-NTA 레진(invitrogen, Cat. No. 46-0019, USA)을 이용하여 정제를 실시하였다. 정제는 우선 컬럼에 Ni-NTA 레진을 충전 시킨 후, Ni-NTA 레진 용적의 10배 이상의 수세 완충액으로 수세를 실시하였다. 수세 후, 이미다졸 농도를 40, 80, 160, 320 그리고 500 mM로 순차적으로 첨가하여 재조합 FCILV 바이러스 외피 단백질을 순차적으로 용출 시켰다. 용출된 단백질은 12% SDS-PAGE 겔에서 일차원 단백질 전기영동을 실시하여 원하는 단백질의 발현 및 정제가 되었는지를 확인 하였다.

(5) FCILV 바이러스 RT-PCR 진단용 프라이머 개발 및 PCR용 양성 균주 제작.

FCILV 바이러스 외피 단백질 유전자를 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머를 제작하여, Genscript사에서 생합성한 pUC57-FCILV 플라스미드를 대상으로 PCR을 실시한다. 프라이머 제작시 genscript사에서 합성된 FCILV 유전자와 FCILV 바이러스의 유전자 사이의 상동성을 가지는 부위가 중첩되게 만든 다음, 나머지 프라이머를 FCILV 바이러스의 유전자에 일치하도록 제작하였다(정방향이 5'-AGGCGCTGGAACCTATTGGGGTTT-3', 역방향은 5'

-GATTAGTAGGTGCTAGGAACTGCA-3'). 제작된 프라이머를 이용하여 pUC57-FCILV 플라스미드를 주형 DNA로 하여 94°C에서 30초, 58°C에서 1분, 72°C에서 1분으로 총 35회 실시하였다. RT-PCR을 실시 한 후, 중합효소연쇄반응 산물을 pGEM-T easy 플라스미드에 삽입하여, FCILV 중합효소연쇄반응 양성 균주를 제작하였다.

나. 결과

(1) *Fragaria Chiloensis Latent* (FCILV) 바이러스 외피 단백질 발현을 위한 pET15b 플라스미드의 클로닝.

재조합 FCILV 바이러스 외피 단백질을 대장균을 이용하여 발현을 유도하기 위해서, genscript사에서 합성되어 제작된 pUC57-FCILV 플라스미드를 추출하였다. 추출된 플라스미드 DNA를 제한효소인 *NdeI*과 *BamHI*로 처리한 결과, FCILV 바이러스 외피 단백질 유전자 크기 (654 bp)가 정확하게 나타남을 알 수 있었다(Fig. 6-39A). 제한효소에 의해 잘려진 FCILV 유전자를 아가로스젤에서 추출·정제 후(Fig. 6-39B), 같은 제한효소로 반응한 pET15b 플라스미드 DNA와 반응 시켜, T4 DNA ligase로 연결시켜, pET15b-FCILV 클론을 획득하였다(Fig. 6-39C).

(2) 재조합 FCILV 외피 단백질 발현

pET15b-FCILV 플라스미드 DNA를 재조합 단백질 발현 대장균 숙주인 BL21 (DE3)에 전기를 이용하여 형질전환 시킨 후, IPTG를 이용하여 FCILV 바이러스 외피 단백질을 과발현 유도를 실시 하였다. 과발현 유도 후, 세포의 상층액과 침전물에서 FCILV 바이러스 외피 단백질의 발현 유무를 일차원 단백질 전기영동을 통하여 조사하였다. 그 결과, 재조합 FCILV 바이러스 외피 단백질은 대장균 시스템에서 전혀 재조합 단백질로서 발현이 되지 않음을 알 수 있었다(Fig. 6-40).

3) FCILV 바이러스 외피 단백질 유전자 검출을 위한 RT-PCR 프라이머 개발 및 양성 균주 제작.

대장균 시스템을 이용한 재조합 FCILV 바이러스 외피 단백질 발현이 대장균에서는 전혀 되지 않았다. 따라서, RT-PCR을 이용한 FCILV 바이러스 검출용 진단법을 이용하기 위하여, 합성된 pUC57-FCILV 플라스미드 DNA를 이용하여 특이 프라이머 개발 및 양성 균주를 제작 하였다. 합성된 FCILV 바이러스 외피 단백질 유전자와 FCILV 바이러스 외피 유전자를 중첩시키고, FCILV 바이러스 외피 단백질을 연결한 특이 프라이머를 제작하였다. 이 특이 프라이머를 이용하여 pUC57-FCILV 플라스미드 DNA를 주형으로 하여 RT-PCR을 수행한 결과, 정확한 크기의 PCR 산물을 획득 할 수 있었다(Fig. 6-41). PCR 산물을 pGEM-T 벡터에 클로닝하여 염기서열을 분석한 결과, 제작된 특이 프라이머가 FCILV 바이러스 외피 단백질 유전자에 정확하게 일치하는 것을 알 수 있었다.

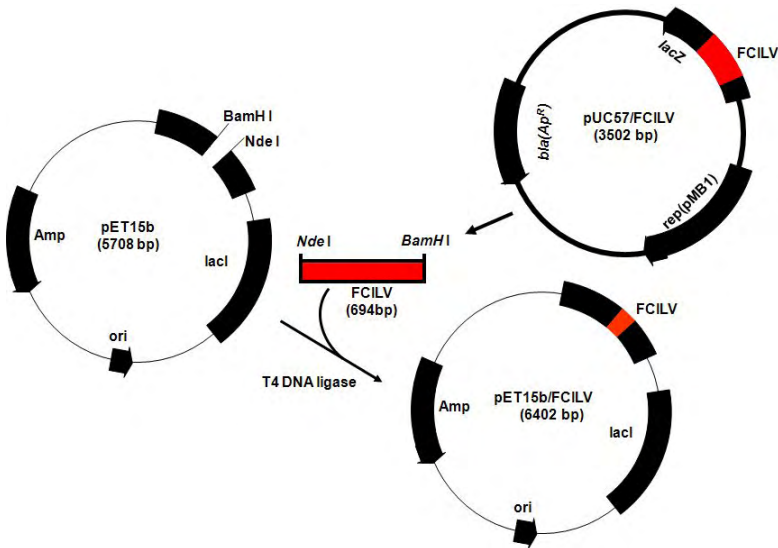


Fig. 6-38. 대장균을 이용한 재조합 FCILV 바이러스 외피 단백질 발현 모식도.

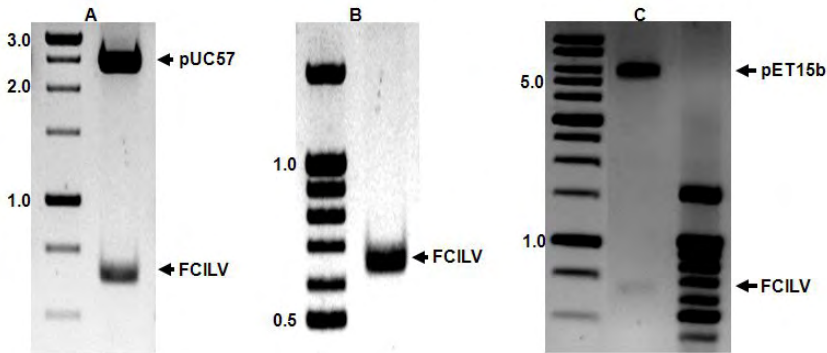


Fig. 6-39. FCILV 바이러스 외피 단백질 유전자의 1% 아가로스젤 전기영동.
A : pUC57-FCILV 클론, B : FCILV 분리 및 정제, C : pET15b-FCILV 클론.

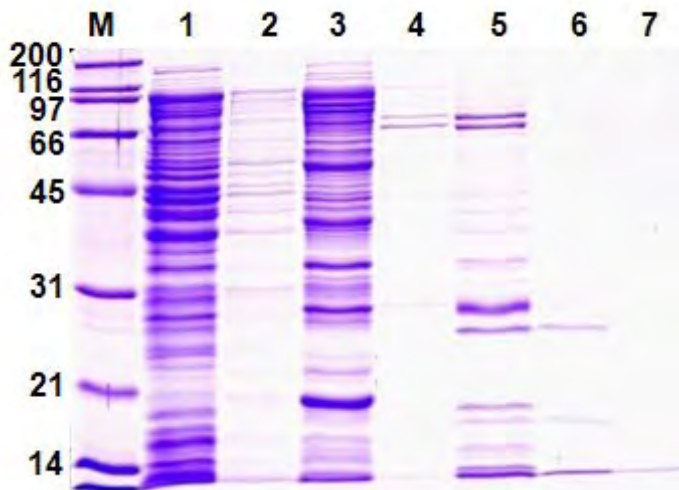


Fig. 6-40. 재조합 FCILV 바이러스 외피 단백질의 12% SDS-PAGE 단백질 전기영동.
M : 단백질 size marker, 1 : Flow through, 2 : 수세, 3-7 : 40, 80, 160, 320 and 500 mM 이 미다졸 용출액.

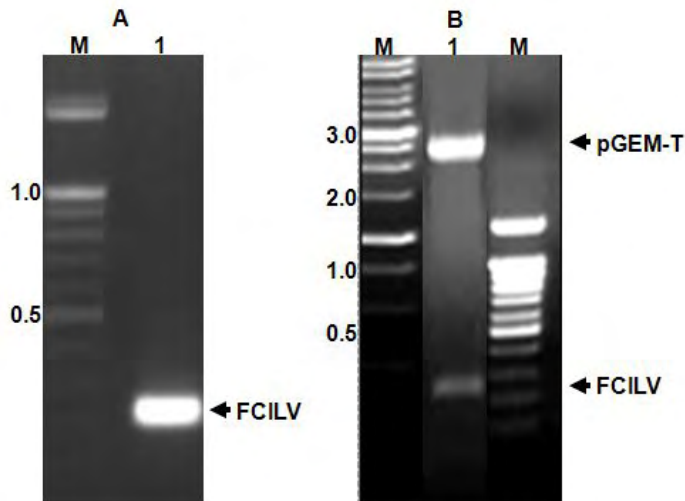


Fig. 6-41. FCILV 바이러스 역전사효소-중합연쇄반응 진단용 프라이머 개발 및 PCR용 양성 균주 제작.

A : FCILV RT-PCR 생성물, B : pGEM-T/FCILV 플라스미드

M : DNA 사이즈 마커, 1 : 특이 프라이머를 이용한 역전사효소-중합연쇄반응 산물.

다. 고찰

Fragaria Chiloensis Latent (FCILV) 바이러스 검역용 진단 키트를 개발하기 위해서, FCILV의 외피 단백질에 대한 항체를 제작하고자 하였다. 그러나, 원인 바이러스를 국내에서 구할 수 있는 방법이 원천적으로 봉쇄되어 있어, 대장균을 이용한 재조합 단백질을 이용하기로 결정하였다. FCILV 바이러스 외피 단백질 유전자를 미국립보건원의 유전자 은행에서 조사하여, 미국의 펩타이드 합성 회사에 의뢰하여, 대장균에서 발현이 원활히 되도록 최적화 시켜 제작 의뢰를 하였으며(Fig. 6-38), 제작된 재조합 FCILV 유전자를 재조합 단백질 발현 대장균에서 단백질 발현을 유도 하기 위하여 클로닝을 실시하였다. 먼저, 대장균에서 재조합 단백질 발현 플라스미드로 이용되는 pET15b 플라스미드에(Fig. 6-39) 제작된 FCILV 유전자를 클로닝을 실시하였고(Fig. 6-39), 대장균에서 재조합 단백질 발현 숙주로 사용되고 있는 BL21 (DE3)에 형질전환 시킨 후, IPTG를 이용하여 재조합 FCILV 바이러스 외피 단백질을 대장균에서 발현을 유도하였다(Fig. 6-40). 그 결과, *Fragaria Chiloensis Latent* (FCILV) 바이러스 외피 단백질은 대장균 시스템에서 재조합 단백질로 전혀 발현이 되지 않았다(Fig. 6-40). 이는 대장균에서 FCILV 유전자가 유전자로서 전혀 작동하지 않는 것이라 사료된다.

대장균에서 재조합 FCILV 바이러스 외피 단백질이 전혀 발현되지 않아, 단백질을 이용한 항체 제작을 할 수 없었으므로, PCR을 통한 검역 키트를 제작 하였다. 먼저, 합성된 FCILV 바이러스 유전자와 미국립 보건원에서 조사한 FCILV 바이러스 유전자의 중첩되는 부위를 찾아, 원래의 FCILV 바이러스 외피 단백질 유전자를 첨가시켜 특이 프라이머를 합성하였다. 합성된 프라이머를 이용하여, 제작한 FCILV 플라스미드 DNA에서 PCR을 수행한 결과, FCILV 바이러스 외피 단백질 유전자를 특이적으로 검출 되었다(Fig. 6-41).

본 실험에서는, *Fragaria Chiloensis Latent* 바이러스(CiLV) 외피 단백질 유전자를 특이적으로 증폭할 수 있는 특이 프라이머를 제작 및 PCR 수행시 양성 대조균으로 사용할 수 있는 양성 균주의 개발에 관한 것으로, 우리가 아는한 국내에서 처음으로 제작된 *Fragaria*

Chiloensis Latent 바이러스 검역용 특이 프라이머라는 것에 의의가 있다고 판단된다.

8. *Strawberry pallidosis*-associated virus (SPaV) 검역용 바이러스 진단 키트 개발

가. 연구개발수행 내용

(1) *Strawberry pallidosis*-associated virus 바이러스 외피 단백질 합성

Strawberry pallidosis-associated virus (SPaV) 바이러스 외피 단백질 유전자를 미국 국립 보건원 (NIH) Gene Bank를 이용하여 염기서열을 조사하였다. 이 염기서열을 DNASTAR 프로그램을 이용하여 각각의 바이러스 유전자의 제한효소 종류와 위치를 분석하였고, 이를 토대로 유전자 재조합에 필요한 제한효소 *NdeI*과 *BamHI* 위치를 SPaV 외피 단백질 유전자 처음과 말단에 삽입 하였다. 대장균에서 단백질 발현을 유도할 시, 외피단백질만 단백질로 발현 시키기 위하여, 유전자 말단에 정지 코돈을 삽입하였다. 디자인 된 염기서열을 미국의 유전자 합성 회사인 GenScript (www.genscript.com)에 대장균에서 단백질 발현이 용이하게 최적화 시켜 주문·제작하였으며, 이때 제작된 CiLV 외피단백질 유전자는 Genscript 사에 의해서 pUC57 플라스미드에 삽입되도록 하였다. 이를 pUC57-SPaV라 하였다(Tzanetakis et al., 2004).

(2) 재조합 *Strawberry pallidosis*-associated 바이러스 외피 단백질 발현을 위한 pET15b 플라스미드의 클로닝.

pUC57-SPaV 플라스미드에 제한효소 *NdeI*와 *BamHI*를 첨가 시켜, 37°C에서 1 시간 처리한 후, 1% 아가로스 겔에 핵산 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후, SPaV 바이러스 외피 단백질 유전자의 크기를 아가로스겔상에서 확인 한 후, 아가로스 겔로부터 SPaV 바이러스 외피 단백질 유전자 부위를 잘라 내었다. 잘라낸 겔은 Qiagen gel elution kit (Cat. 28704, USA)를 이용하여 외피단백질 유전자를 아가로스 겔로부터 분리·정제 하였다. 정제된 SPaV 바이러스 외피단백질 유전자를 *NdeI* 및 *BamHI*으로 처리한 pET15b 플라스미드에 클로닝을 실시하였다. 클로닝은 *NdeI* 및 *BamHI*로 처리한 pET15b와 아가로스겔에서 분리한 SPaV 바이러스 외피 단백질 유전자를 섞고, T4 DNA ligase (TaKaRa, Cat.2011A, Japan)를 첨가 하였다. 이 첨가물을 14°C에서 1hr 동안 반응시킨 후, DH10b/r에 전기를 이용한 형질전환을 실시하였다. 형질전환을 실시한 대장균을 50µg/ml 암피실린이 들어 있는 LB 고체 배지에 접종하여 37°C에서 16시간 동안 배양한 후, 자라나는 집락을 같은 항생제가 들어 있는 LB 액체 배지(3ml)에 접종 하였다. 액체 배지에서 키운 대장균으로부터 플라스미드 DNA를 추출하여 같은 제한효소인 *NdeI*와 *BamHI*로 처리하여 클로닝이 정확하게 된 대장균을 획득할 수 있었으며, 이를 pET15b-SPaV라 명명 하였다(Fig. 6-42).

(3) IPTG을 이용한 pET15b-SPaV 바이러스 재조합 외피 단백질 과발현 유도.

pET15b-SPaV 플라스미드를 재조합 단백질 발현 숙주인 대장균 BL21 (DE3)에 전기를 이용하여 형질전환 시켜 얻은 대장균을 항생제 암피실린이 50µg/ml이 함유되어 LB 액체 배지에 접종하였다. 접종한 pET15b-SPaV BL21 (DE3) 균주를 37°C에서 하루 동안 전 배양을 실시한 후, 같은 항생제가 함유되어 있는 LB 액체 배지(1 L)에 최종 농도가 1%가 되게끔 본 배양을 실시하였다. 본 배양 후 pET15b-SPaV BL21 (DE3) 균주가 OD₆₀₀에서 흡광도가 0.6~0.8

사이카 되도록 배양 시킨 후, IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, Promega, Cat. No. V3951, USA)를 최종농도 1mM이 되게끔 첨가 시켰다. IPTG 첨가 후, 17°C, 250 rpm으로 3일간 더 배양 시켜, 재조합 단백질 발현 숙주가 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질을 최대한 과발현 할 수 있도록 유도 하였다.

(4) 재조합 SPaV 외피 단백질 발현 및 정제.

IPTG를 이용하여 과발현을 유도한 pET15b-SPaV BL21 (DE3) 균주를 8,000 rpm에서 22분간 원심 시켜 대장균 세포를 농축 하였고, 농축 후 수세 완충액 (50mM Tris (pH 8.0), 100mM NaCl)로 부유시켰다. 부유시킨 후, 같은 조건에서 원심 하여 pET15b-SPaV BL21 (DE3) 균주를 수세 완충액으로 수세 하였다. 수세된 pET15b-SPaV BL21 (DE3) 균주는 수세 완충액 35ml에 다시 부유 시키고, 세포 파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄 하였다. 세포 파쇄는 Amplitude 40%, pulse on 2 초, pulse off 2 초, 4°C에서 5 분간 파쇄한 후, 12,000 rpm에서 연속으로 2번 원심 분리하여 상층액과 침전물을 완전히 분리하였다. 분리된 상층액은 Ni이 결합되어 있는 아가로스젤 Ni-NTA 레진(invitrogen, Cat. No. 46-0019, USA)을 이용하여 정제를 실시하였다. 정제는 우선 컬럼에 Ni-NTA 레진을 충전 시킨 후, Ni-NTA 레진 용적의 10배 이상의 수세 완충액으로 수세를 실시하였다. 수세 후, 이미다졸 농도를 40, 80, 160, 320 그리고 500 mM로 순차적으로 첨가하여 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질을 순차적으로 용출 시켰다. 용출된 단백질은 12% SDS-PAGE 겔에서 일차원 단백질 전기영동을 실시하여 원하는 단백질의 발현 및 정제가 되었는지를 확인 하였다.

(5) 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질을 이용한 복클론 항체 제작.

1mg의 재조합 SPaV 외피 단백질과 Freund's complete adjuvant (FCA, Cat. No. F5881, Sigma, USA)를 혼합하여 emulsifying 주사기로 emulsion을 만들었다. Emulsion이 된 용액을 토끼의 등 쪽 근육에 주사하였다. 1차 접종 2주와 4주 후에 같은 량의 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질과 동일한 부피의 Freund's incomplete adjuvant (FIA, Cat. No. F5506, Sigma, USA)를 섞어 emulsion을 만들고 토끼에 같은 방법으로 주사하였다. 주사한지 4-5일 후 토끼의 귀에서 피를 뽑아 항체가 생산되었는지 Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay (ELISA)로 확인하였다. 3차 접종한지 2주 후에 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질만 동일량을 토끼의 등 쪽 피하에 주사하여 final booster를 실시하였다. 최종 면역 4-5일 후 심장에서 채혈하고 3000 rpm, 15분간 원심분리하여 혈청만을 분리하여 사용하였다.

(6) 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질을 이용한 단클론 항체 제작

생후 6주된 암컷 Balb/c 쥐에 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질 50 μ g을 Freund's complete adjuvant와 섞어 emulsion을 만들어 복강에 면역하였다. 면역 2주 후에 동일 량의 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질을 Freund's incomplete adjuvant와 섞어 emulsion을 만들어 추가 면역하고, 다시 2주 후에 같은 양으로 SPaV 바이러스 외피 단백질만 이용하여 3차 면역을 하였다. 3차 면역 3-4일 후 쥐의 피를 뽑아 항체가 만들어졌는지를 ELISA로 확인한 다음 세포융합 3일 전에 다시 한번 final booster를 실시하였다. 세포융합에 사용한 골수종은 쥐의 myeloma 세포로 8-azaguanine에 대한 내성을 가지고 면역 글로불린을 생산하지 못하는 P3X63Ag8.V653 세포를 사용하였다. 세포융합을 위하여 20 μ g/ml 농도의 8-azaguanine (Cat.

No. A5284, Sigma, USA), 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Cat. No. F2442, Sigma, USA), 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 gentamycin (Cat. No. G1522, Sigma, USA)이 들어간 RPMI-1640 (Cat. No. R8758, Sigma, USA) 배지를 2-4일에 한번 씩 새로운 배지로 갈아주며 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 세포 융합 18시간 전에 10% FBS, gentamycin(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 함유된 RPMI-1640 배지에서 배양하고 RPMI-1640으로 3회 세척한 후, 세포 수를 2×10^7 cells/ml로 조정하여 사용하였다. 최종면역 후 3일이 경과된 Balb/c 쥐로부터 비장을 적출한 뒤 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, Cat. No. D5796, Sigma, USA)에 담긴 상태에서 비장조직을 파쇄하여 비장세포를 분리하였다. 비장 세포액을 실온에서 15분간 방치시켜 비장의 결합조직을 가라앉히고 상등액을 시험관으로 옮겨 담는다. 여기에 2 ml의 Fetal Bovine Serum (FBS)을 첨가하여 1200rpm에서 5분간 원심분리 하여 비장 세포액 내의 혈소판을 제거하였다. DMEM으로 1회 세척하고 비장 세포액에 Red Blood Cell lysing buffer (RBC lysing buffer, Cat. No. R7757, Sigma, USA)를 처리하여 적혈구를 용혈시켜 백혈구 성분을 분리하였다. 비장세포를 RPMI-1640으로 3회 세척하고 세포 수를 1×10^8 cells/ml로 조정하여 사용하였다. 위에서 준비한 골수종 세포(P3X63Ag8.V653) 2×10^7 개와 비장세포 1×10^8 개를 혼합한 후 DMEM으로 2회 세척하였다. 혼합 세포 침전물을 37°C로 보온하면서 1 ml의 polyethylene glycol 1500 (Cat. No. 10783 641, Roche, USA)을 1분간 점적하여 세포를 융합시켰다. 여기에 37°C의 DMEM 1 ml을 1분에 걸쳐 첨가하고 다시 DMEM 15 ml을 5분에 걸쳐 첨가하면서 현탁한다. 원심분리 후 20% FBS, gentamycin(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 함유된 DMEM 배지로 세포를 현탁하고 96 well plate (Cat. No. CLS3879, Corning, USA)에 well당 50 μl 씩 분주하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 세포융합 후 1, 3, 5 및 7일에 20% FBS, gentamycin(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), HAT(50 μM hypoxanthine, 0.4 μM aminopterin, 16 μM thymidine, Cat. No. 21060, Gibco, USA)가 포함된 DMEM 배지를 well당 50 μl 씩 첨가하고, 9일째에 150 μl 의 배지를 10% FBS, gentamycin(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), HT(50 μM hypoxanthine, 16 μM thymidine, Cat. No. 11067 030, Gibco, USA)가 포함된 DMEM 배지로 갈아주면서 13일째까지 융합된 세포를 증식시켰다. 이때 세포의 증식 양상을 역위상차 현미경으로 관찰하였다. 세포를 융합시킨 후 10-13일 사이에 세포가 well 바닥의 1/3이상 증식하면 배양 상등액에 항체가 생산되었는지를 ELISA로 조사하였다. 항체를 생산하는 세포를 24 well plate에 옮겨 배양하고, 항체 역가가 계속 유지되면서 세포의 증식이 활발한 hybridoma cell을 선택하여 cloning을 실시하였다. 세포를 DMEM으로 희석하여 10 ~ 30 cells/ml의 농도가 되도록 조절한 후 원심분리하였다. 10% FBS, gentamycin(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), HT(50 μM hypoxanthine, 16 μM thymidine)이 포함된 DMEM 배지로 현탁한 후 well당 100 μl 씩 분주하여 배양하였다. 배양 5일째에 역위상차 현미경으로 1개의 세포 군락이 형성된 well을 선택하였다. ELISA에서 항체의 역가가 높고 western blot에서 특이 band가 확인된 hybrid cell을 최종 선택하여 증식시켰다.

(7) Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

항체의 반응 특이성을 조사하기 위하여 다음과 같이 효소면역측정법을 실시하였다. 수용성 항원은 96-well polystyrene microplate (Costar, Serocluster 96well EIA/RIA plate, flat bottom, Cat. No. 3590)에 0.05 M carbonate 완충액(pH 9.6)을 가하여 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 항원을 희석하여 well당 100 μl 씩 첨가하고 4°C에서 밤새 부착시켰다. 여기에 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.3)-0.05% Tween20으로 세 번 세척하고 3% BSA를 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 로 첨가하여 37°C에서 3시간 동안 처리하였다. 이를 다시 PBS-Tween20 용액으로 세척하고 검색할 배양액이나 희석한 혈청을 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 로 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 항원-항체 반응을 진행

시켰다. PBS-Tween20으로 세 번 세척하고 1:7,000으로 희석된 peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG antibody(토끼의 경우 1:5,000으로 희석된 peroxides-linked anti-rabbit IgG)를 100 μ l/well로 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS-Tween20 용액으로 5회 세척하고 발색제가 첨가된 기질용액을 100 μ l/well로 첨가하였다. 기질용액은 0.1 M phosphate-citrate완충액(PCB) 10 ml에 30% 과산화수소 20 μ l와 ortho-phenylene diamine 5 mg을 넣어 만들었다. 실온에서 5분간 효소반응을 유지시킨 후 2 N 황산용액 50 μ l를 첨가하여 효소반응을 중단시킨 후 발색반응의 정도를 Microplate Reader (Bio-Rad, Model 550)로 490 nm에서 측정하였다.

(8) 웨스턴 블롯 분석.

토끼에서 얻은 복클론 항체와 융합세포에서 얻어진 단클론 항체의 특이성을 확인하기 위하여 웨스턴블롯을 실시하였다. 분리 정제한 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질을 95°C에서 5분간 변성 시키고, 12% 폴리 아크릴 아마이드젤에 전기영동한 후 단백질을 PVDF 막으로 옮겼다. 5% skim milk를 포함한 TBST (10 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20)에 넣고 실온에서 1시간 반응시켰다. 여기에 1% skim milk가 들어있는 TBST에 복클론 항체와 단클론 항체를 7,000 ~ 10,000배 희석하여 1차 항체로 사용하였다. 한 시간 동안 반응시킨 후 TBST로 10분간 3회 세척하고 HRP conjugated Goat anti-Rabbit IgG Polyclonal Antibody 또는 HRP conjugated Goat anti-Mouse IgG Polyclonal Antibody (Cat. No. W402, promega, USA)를 7,000배 희석하여 2차 항체로 사용하였다. 1시간이 지나면 TBST로 10분간 5회 세척하고 ECL kit 및 NBT, BCIP로 발색하였다.

(9) SPaV 바이러스 역전사효소-중합연쇄반응 진단용 프라이머 개발 및 PCR용 양성 균주 제작.

SPaV 바이러스 외피 단백질 유전자를 중합효소연쇄반응으로 증폭할 수 있는 양성균주를 제작하기 위하여, genscript사에서 합성된 SPaV 유전자와 SPaV 바이러스의 유전자 사이에서의 상동성을 보이는 부분을 중첩 시키고, 나머지 프라이머 서열들은 SPaV 바이러스의 유전자와 일치하도록 제작 하였다(정방향이 5'-AATGAAGAATTTGATGAGGG-3', 역방향은 5'-TCTGAGATATTGGTTTCGCA-3'). 제작된 프라이머를 이용하여 pUC57-SPaV 플라스미드를 주형 DNA로 하여 RT-PCR을 실시 한 후, 중합효소연쇄반응 산물을 pGEM-T easy 플라스미드에 삽입하여, SPaV 중합효소연쇄반응 양성 균주를 제작하였다.

나. 결과

(1) *Strawberry pallidosis*-associated Virus (SPaV) 바이러스 외피 단백질 발현을 위한 pET15b 플라스미드의 클로닝.

재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질을 대장균을 이용하여 발현을 유도하기 위해서, genscript사에서 합성되어 제작된 pUC57-SPaV 플라스미드를 추출하였다. 추출된 플라스미드 DNA를 제한효소인 *NdeI*과 *BamHI*로 처리한 결과, SPaV 바이러스 외피 단백질 유전자 크기 (747 bp)가 정확하게 나타남을 알 수 있었다(Fig. 6-43A). 제한효소에 의해 잘려진 FCILV 유전자를 아가로스젤에서 추출·정제 후(Fig. 6-43B), 같은 제한효소로 반응한 pET15b 플라스미드 DNA와 반응 시켜, T4 DNA ligase로 연결시켜, pET15b-SPaV 클론을 획득하였다(Fig. 6-43C).

(2) 재조합 SPaV 외피 단백질 발현.

pET15b-SPaV 플라스미드 DNA를 재조합 단백질 발현 대장균 숙주인 BL21 (DE3)에 전기를 이용하여 형질전환 시킨 후, IPTG를 이용하여 SPaV 바이러스 외피 단백질을 과발현 유도를 실시하였다. 과발현 유도 후, 세포의 상층액과 침전물에서 SPaV 바이러스 외피 단백질의 발현 유무를 일차원 단백질 전기영동을 통하여 조사하였다. 그 결과, 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질은 대장균 시스템에서 수용성 단백질로 과발현 되는 것을 알 수 있었다 (Fig. 6-44A). Ni-NTA 컬럼을 이용하여 정제를 실시한 결과, 80 mM 이미다졸 용액에서 용출되기 시작하여 320 mM 이미다졸 용액까지 용출 됨을 알 수 있었다. 특히, 320 nM 에서는 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질만 용출됨을 알 수 있다(Fig. 6-44B).

(3) 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질에 대한 복클론 항체의 특이성.

Ni-NTA 컬럼으로 정제한 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백을 이용하여 복클론항체를 제작하였다. 320 mM에서 용출된 재조합 SPaV 단백질을 면역 보조 물질과 함께 토끼의 근육 내에 주사 후, 토끼로부터 복클론 항체를 분리하였다. 제작된 복클론 항체의 특이성을 조사하기 위해서 웨스턴 블롯을 실시 하였다(Fig. 6-45). 그 결과 Fig. 6-45의 1번 레인에서 보듯이, pET15b 플라스미드만 있는 대장균 BL21 (DE3) 균주의 전체 단백질에서는 SPaV의 복클론 항체에 대한 어떠한 면역 반응도 일어나지 않았다. 그러나 Fig. 6-45의 2번 레인에서 보이듯이, pET15b-SPaV 플라스미드가 들어 있는 BL21 (DE3)에서는 SPaV 복클론 항체에 대해서 강한 면역 반응을 보인다. 이는, 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질에 대한 복클론 항체가 그 어떠한 대장균 유래 단백질과 면역 반응을 하지 않는 것을 나타내며, 또한 재조합 SPaV 단백질에 대해서만 면역 반응을 나타내는 것을 알 수 있다.

(4) 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질 복클론 항체의 역가 측정.

재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질에 대항하는 복클론 항체의 역가를 측정하기 위해서, 복클론 항체를 계단 희석하여 효소면역 측정법을 이용하여 조사 하였으며(Fig. 6-46), 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질을 계단 희석하여 SPaV 복클론 항체의 민감도를 효소 면역 측정법과 웨스턴 블롯 방법으로 측정하였다(Fig. 6-47). 그 결과, 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질에 대한 복클론 항체는 10,000배 희석 항체에서도 강력한 면역 반응을 나타내는 것을 알 수 있었고(Fig. 6-46), 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질에 대한 민감도는 10,000배 희석 복클론 항체의 농도에서, 효소면역측정법에서는 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지(Fig. 6-47A), 웨스턴 블롯 방법에서는 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 까지 검출이 가능한 것을 알 수 있었다(Fig. 6-47B).

(5) 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질에 대한 단클론 항체의 특이성 및 역가 조사.

재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질에 대항하는 단클론 항체의 특이성을 조사하기 위해서 웨스턴 블롯을 실시하였다(Fig. 6-48A). 그 결과 Fig. 6-48A의 1번 레인에서 보듯이, pET15b 플라스미드만 있는 대장균 BL21 (DE3) 균주의 전체 단백질에서는 SPaV의 단클론 항체에 대한 어떠한 면역 반응도 일어나지 않았다. 그러나 Fig. 6-48A의 2번 레인에서 보이듯이, pET15b-SPaV 플라스미드가 들어 있는 BL21 (DE3)에서는 SPaV 복클론 항체에 대해서 강한 면역 반응을 보인다. 이는, 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질에 대한 복클론 항체가 그 어떠한 대장균 유래 단백질과 면역 반응을 하지 않는 것을 나타내며, 또한 재조합 SPaV

단백질에 대해서만 면역 반응을 나타내는 것을 알 수 있다. 또한, 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질에 대항하는 단클론 항체의 민감도는, 0.1 µg/ml 까지 검출이 가능한 것을 알 수 있었다(Fig. 6-48B).

(6) SPaV 바이러스 외피 단백질 유전자 검출을 위한 역전사효소-중합효소연쇄반응을 프라이머 개발 및 양성 균주 제작.

역전사효소-중합연쇄반응을 이용한 SPaV 바이러스 검출용 진단법을 개발하기 위하여, 합성된 pUC57-SPaV 플라스미드 DNA를 이용하여 SPaV 바이러스 검출 양성 균주를 제작 하였다. 이 특이 프라이머를 이용하여 pUC57-SPaV 플라스미드 DNA를 주형으로 하여 역전사효소-중합효소연쇄반응을 수행한 결과, 정확한 크기의 중합효소연쇄반응 산물을 획득 할 수 있었다(Fig. 6-49A). PCR 산물을 pGEM-T 벡터에 클로닝하여(Fig. 6-49B) 염기서열을 분석한 결과, 제작된 특이 프라이머가 SPaV 바이러스 외피 단백질 유전자에 정확하게 일치하는 것을 알 수 있었다(Fig. 6-49C).

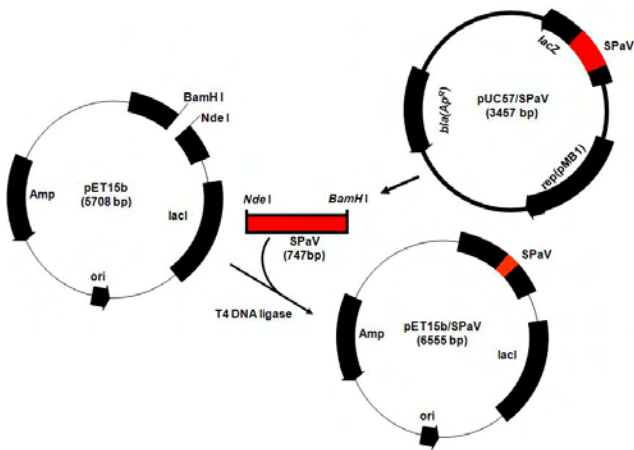


Fig. 6-42. 대장균을 이용한 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질 발현 모식도.

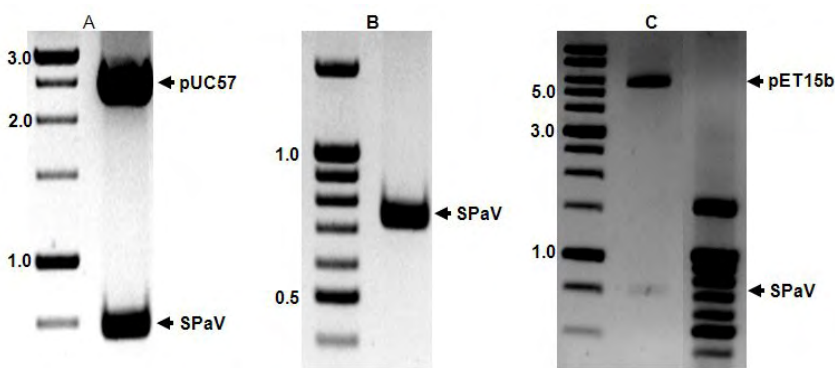


Fig. 6-43. SPaV 바이러스 외피 단백질 유전자의 1% 아가로스젤 전기영동. A : pUC57-SPaV 클론, B : SPaV 분리 및 정제, C : pET15b-SPaV 클론.

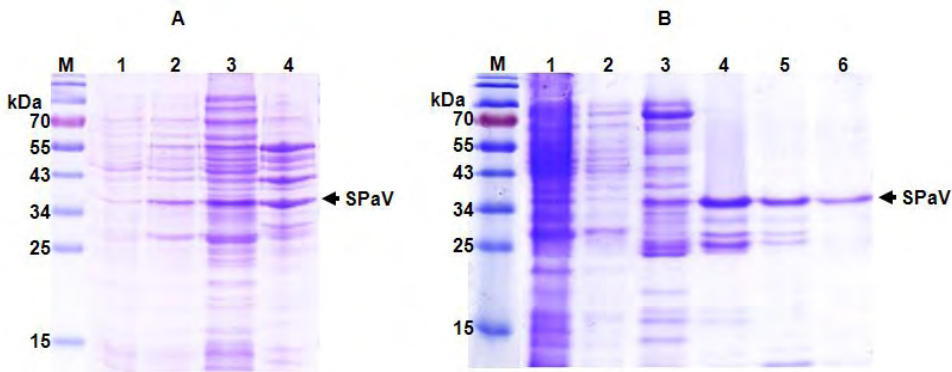


Fig. 6-44. 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질 12% 일차원 단백질 전기영동.

A. 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질 IPTG 과발현 전·후

M : 단백질 size marker, 1 : IPTG 과발현 전, 2 : IPTG 과발현 후, 3 : IPTG 과발현 후 상등액, 4 : IPTG 과발현 후 침전물.

B. Ni-NTA 컬럼을 이용한 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질 정제.

M : 단백질 size marker, 1 : Flow through, 2 : 수세, 3 - 6 : 40, 80, 160 그리고 320 mM 이 미다졸 용출액.

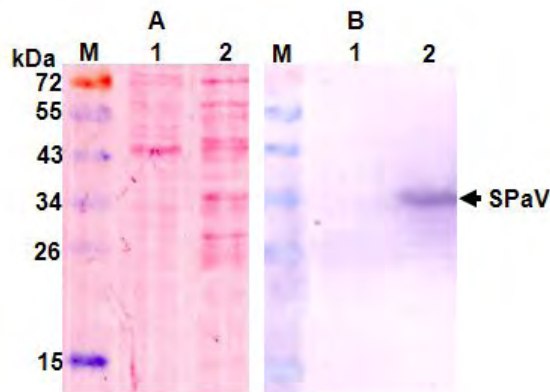


Fig. 6-45. 복클론 항체를 이용한 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질의 웨스턴 블롯.

A : Ponceau-S 염색. B : 웨스턴 블롯

M : 단백질 size marker, 1 : IPTG 과발현 유도 전, 2 : IPTG 과발현 유도 후.

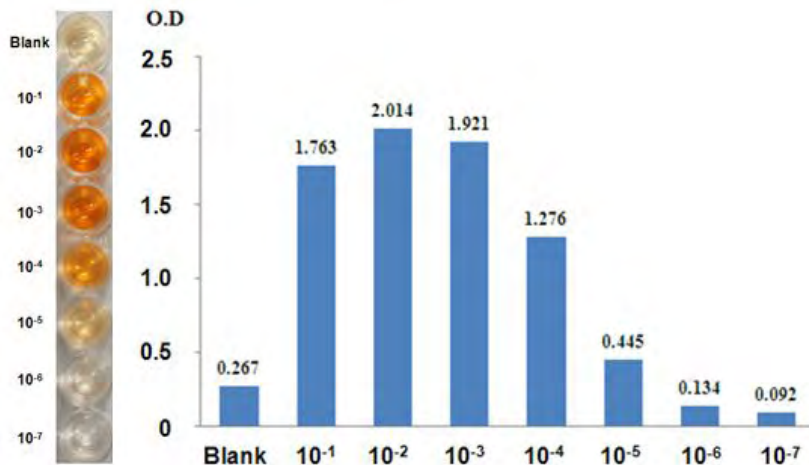


Fig. 6-46. 계단 희석 효소면역 측정법(ELISA)에 의한 복클론 항체 역가 측정.

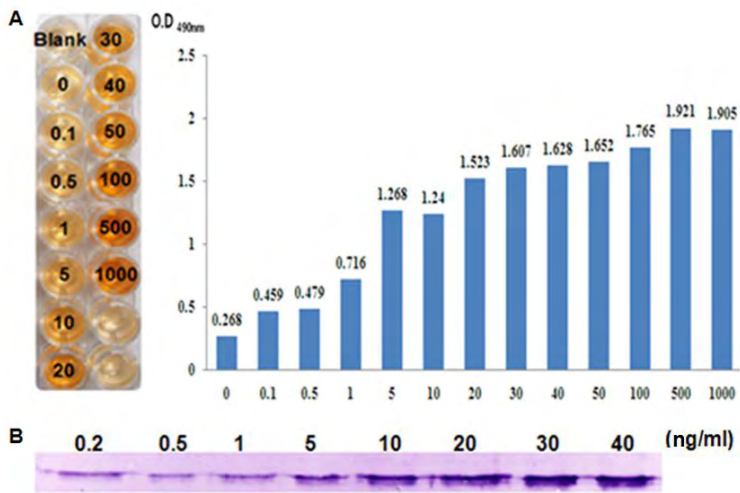


Fig. 6-47. 재조합 SPaV 항원의 농도에 따른 복클론 항체의 역가 측정.

A : 효소면역학적 방법을 통한 역가 측정.

B : 웨스턴 블롯을 통한 역가 측정.

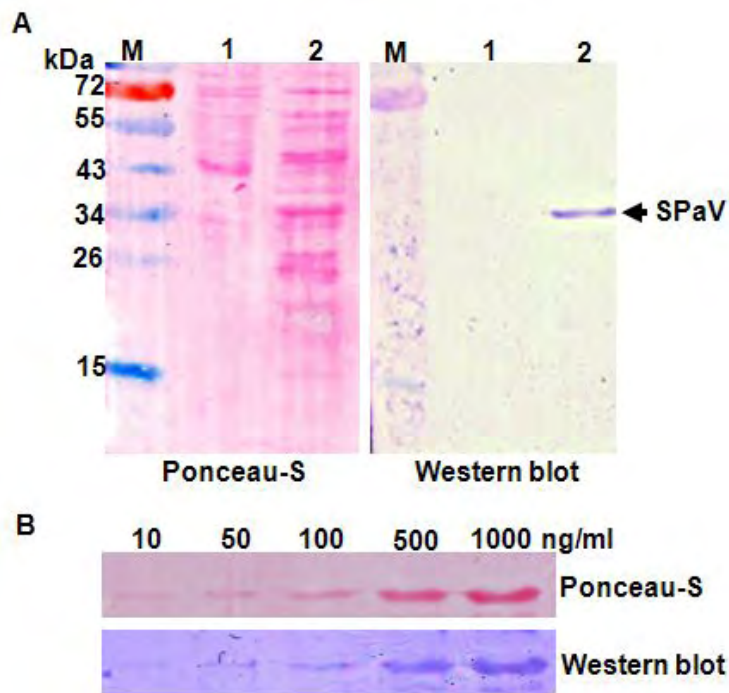


Fig. 6-48. 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질에 대한 단클론 항체 특이성 및 역가 측정.

A : 대장균 전체 단백질에 대한 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질 웨스턴 블롯

M : 단백질 size marker, 1 : pET15b/BL21 (DE3) IPTG 과발현, 2 : pET15b-SPaV/BL21 (DE3) IPTG 과발현.

B : 정제된 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질 웨스턴 블롯.

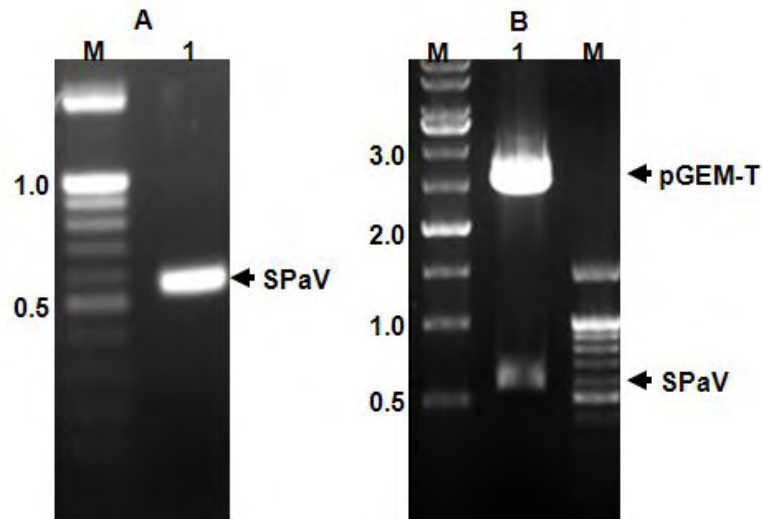


Fig. 6-49. SPaV 바이러스 역전사효소-중합연쇄반응 진단용 프라이머 개발 및 PCR용 양성 균주 제작.

A : SPaV RT-PCR 생성물, B : pGEM-T/SPaV 플라스미드

M : DNA 사이즈 마커, 1 : 특이 프라이머를 이용한 역전사효소-중합연쇄반응 산물.

다. 고찰

Strawberry pallidosis-associated Virus (SPaV) 바이러스 검역용 진단 키트를 개발하기 위해서, SPaV의 외피 단백질에 대한 항체를 제작하고자 하였다. 그러나, 원인 바이러스를 국내에서 구할 수 있는 방법이 원천적으로 봉쇄되어 있어, 대장균을 이용한 재조합 단백질을 이용하기로 결정하였다. SPaV 바이러스 외피 단백질 유전자를 미국립보건원의 유전자 은행에서 조사하여, 미국의 펩타이드 합성 회사에 의뢰하여, 대장균에서 발현이 원활히 되도록 최적화 시켜 제작 의뢰를 하였으며(Fig. 6-42), 제작된 재조합 SPaV 유전자를 이용하여 대장균에서 단백질 발현을 유도 하였다. 그 결과, pET15b 플라스미드에(Fig. 6-43)서 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질을 발현 및 정제가 가능하였다(Fig. 6-44).

대장균에서 분리 및 정제한 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질을 이용하여, 토끼와 마우스를 통하여 각각 복클론 항체 및 단클론 항체를 제작하였다. 그 결과, 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질은 복클론 항체에(Fig. 6-46, 47) 면역 반응을 보였으며, 특히 대장균 유래 단백질에 대해서는 면역 반응을 보이지 않았다(Fig. 6-45). 또한 마우스에서 제작한 단클론 항체에 대해서도 면역 반응이 뚜렷하게 나타났다 (Fig. 6-48).

제작된 복클론 항체를 이용하여 검역용 진단 키트를 제작하기 위해서 실시한 항체의 특성 및 역가 측정에서는, 10,000배 희석한 복클론 항체에서도 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질이 면역 반응을 보였으며(Fig. 6-46), 이 농도의 복클론 항체에서 재조합 SPaV 바이러스 외피 단백질을 효소면역측정법에서는 5 ng/ml 까지(Fig. 6-47A), 웨스턴 블롯법에서는 0.2 ng/ml 까지 면역반응이 일어남을 알 수 있었다(Fig. 6-47B).

제작된 합성 SPaV 유전자로부터 이 바이러스를 PCR 법으로 진단할 수 있는 프라이머 및 양성 균주를 제작하기 위해서, 바이러스 유전자와 합성 유전자의 중첩되는 부위에 바이러스

유전자를 삽입하여 프라이머를 제작하였고, 제작된 프라이머를 이용하여 합성 유전자로부터 PCR을 실시한 결과, 이 바이러스를 진단할 수 있는 특이 프라이머 및 PCR 실시 시 양성 대조군을 제작할 수 있었다(Fig. 6-49)

본 실험에서는, 유전자 합성을 이용하여 대장균에서의 재조합 단백질 발현 및 정제를 통해서 검역용 항체를 제작하는 것에 관한 연구로서, 특정 바이러스 외피 단백질을 구할 수 없을 때 재조합 단백질을 이용해서 접근하는 것일 가장 적합한 방법일 것으로 사료되며, 우리가 아는 한 국내에서 처음으로 제작된 *Strawberry pallidosis*-associated 바이러스 검역용 항체라는 것에 의의가 있다고 판단된다.

9. *Tobacco leaf curl virus*(TLCV) 검역용 바이러스 진단 키트 개발

가. 연구개발수행 내용

(1) *Tobacco leaf curl* 바이러스 외피단백질 합성

Tobacco leaf curl (TLCV) 바이러스 외피단백질 유전자를 미국 국립 보건원 (NIH) 유전자은행을 이용하여 염기서열을 조사하였다. 이 염기서열을 생물정보 프로그램을 이용하여 각각의 바이러스 유전자에 존재하는 제한효소의 종류와 위치를 분석하였다. 이를 토대로 유전자 재조합에 필요한 제한효소 *NdeI*과 *BamHI*를 TLCV 바이러스 외피단백질 유전자 처음과 말단에 삽입 하였고, 제작된 플라스미드를 대장균에서 재조합 단백질로 발현을 유도할 시, TLCV 바이러스 외피 단백질만 발현시키기 위하여, 유전자 말단에 정지 코돈을 삽입하여 플라스미드를 디자인 하였다. 디자인 된 염기서열을 미국의 유전자 합성 회사인 GenScript (www.genscript.com)에 의뢰하여, 대장균에서 단백질 발현이 용이하게 최적화 시켜 주문·제작 하였으며, 이때 제작된 TLCV 외피단백질 유전자는 Genscript 사에 의해서 pUC57 플라스미드에 삽입되도록 하였다. 이를 pUC57-TLCV라 하였다(Paximadis et al, 2001).

(2) 재조합 *Tobacco leaf curl* 바이러스 외피단백질 발현을 위한 pET15b 플라스미드의 클로닝

pUC57-TLCV 플라스미드에 제한효소 *NdeI*와 *BamHI*를 첨가 시켜, 37°C에서 1 시간 처리한 후, 1% 아가로스젤에 핵산 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후, TLCV 바이러스 외피단백질 유전자를 아가로스젤상에서 확인 한 후, 아가로스젤로부터 TLCV 바이러스 외피단백질 유전자를 잘라 내었다. 잘라낸 아가로스젤은 Qiagen 젤 용출 키트(Cat. No. 28704, USA)를 이용하여 외피단백질 유전자를 아가로스젤로부터 분리·정제 하였다. 정제된 TLCV 바이러스 외피단백질 유전자를 *NdeI* 및 *BamHI*으로 처리한 pET15b 플라스미드에 클로닝을 실시하였다. 클로닝은 *NdeI* 및 *BamHI*로 처리한 pET15b와 아가로스젤에서 분리한 TLCV 바이러스 외피단백질 유전자를 섞고, T4 DNA 연결효소 (Cat. No. 2011A, TAKARA, Japan)를 첨가 하였다. 이 첨가물을 14°C에서 1hr 동안 반응시킨 후, 전기(Bio-Rad, USA)를 이용하여 DH10b/r 대장균 숙주에 형질전환 시켰다². 형질전환된 세포를 50µg/ml 암피실린이 들어 있는 LB 고체 배지에 접종하여 37°C에서 16시간 동안 배양한 후, 자라나는 집락을 같은 항생제가 들어 있는 LB 액체 배지(3ml)에 접종하였다. 액체 배지에서 키운 대장균으로부터 플라스미드 DNA를 추출하여 같은 제한효소인 *NdeI*와 *BamHI*로 처리하여 클로닝이 정확하게 된 콜로니를 획득할 수 있었으며, 이를 pET15b-TLCV라 명명 하였다(Fig. 6-50).

(3) IPTG을 이용한 pET15b-TLCV 바이러스 재조합 외피 단백질 과발현 유도

pET15b-TLCV 플라스미드를 재조합 단백질 발현 숙주인 대장균 BL21 (DE3)에 전기를 이용하여 형질전환 시켜 얻은 대장균을 항생제 암피실린이 50 μ g/ml이 함유되어 LB 액체 배지에 접종하였다. 접종한 pET15b-TLCV BL21 (DE3) 균주를 37 $^{\circ}$ C에서 하루 동안 전 배양을 실시한 후, 같은 항생제가 함유되어 있는 LB 액체 배지(1 L)에 최종 농도가 1%가 되게 본 배양을 실시하였다. 본 배양 후 pET15b-TLCV BL21 (DE3) 균주가 OD₆₀₀에서 흡광도가 0.6~0.8 사이가 되도록 배양 시킨 후, IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, Promega, Cat. No. V3951, USA)를 최종농도 1mM이 되게끔 첨가 시켰다. IPTG 첨가 후, 17 $^{\circ}$ C, 250 rpm으로 3일간 더 배양 시켜, 재조합 단백질 발현 숙주가 재조합 TLCV 바이러스 외피 단백질을 최대한 과발현 할 수 있도록 유도 하였다(Satoh et al., 2010).

(4) 재조합 TLCV 외피 단백질 발현 및 정제.

IPTG를 이용하여 과발현을 유도한 pET15b-TLCV BL21 (DE3) 균주를 8,000 rpm에서 22분간 원심 시켜 대장균 세포를 농축 하였고, 농축 후 수세 완충액 (50mM Tris (pH 8.0), 100mM NaCl)로 부유시켰다. 부유시킨 후, 같은 조건에서 원심 하여 pET15b-TLCV BL21 (DE3) 균주를 수세 완충액으로 수세 하였다. 수세된 pET15b-TLCV BL21 (DE3) 균주는 수세 완충액 35ml에 다시 부유 시키고, 세포 파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄 하였다. 세포 파쇄는 Amplitude 40%, pulse on 2 초, pulse off 2 초, 4 $^{\circ}$ C에서 5 분간 파쇄한 후, 12,000 rpm에서 연속으로 2번 원심 분리하여 상층액과 침전물을 완전히 분리하였다. 분리된 상층액은 Ni이 결합되어 있는 아가로스젤 Ni-NTA 레진(invitrogen, Cat. No. 46-0019, USA)을 이용하여 정제를 실시하였다. 정제는 우선 컬럼에 Ni-NTA 레진을 충전 시킨 후, Ni-NTA 레진 용적의 10배 이상의 수세 완충액으로 수세를 실시하였다. 수세 후, 이미다졸 농도를 40, 80, 160, 320 그리고 500 mM로 순차적으로 첨가하여 재조합 TLCV 바이러스 외피 단백질을 순차적으로 용출 시켰다. 용출된 단백질은 12% SDS-PAGE 젤에서 일차원 단백질 전기영동을 실시하여 원하는 단백질의 발현 및 정제가 되었는지를 확인 하였다.

(5) TLCV 바이러스 RT-PCR 진단용 프라이머 개발 및 PCR용 양성 균주 제작.

TLCV 바이러스 외피 단백질 유전자를 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머를 제작하여, Genscript사에서 생합성한 pUC57-TLCV 플라스미드를 대상으로 PCR을 실시한다. 프라이머 제작시 genscript사에서 합성된 TLCV 유전자와 TLCV 바이러스의 유전자 사이의 상동성을 가지는 부위가 중첩되게 만든 다음, 나머지 프라이머를 TLCV 바이러스의 유전자에 일치하도록 제작하였다(정방향인 5'-TGGCAAGCGTTTCTGTGTCAAATC-3', 역방향은 5'-AGTAGCAGTGCTAGGTTTCATTATC-3'). 제작된 프라이머를 이용하여 pUC57-TLCV 플라스미드를 주형 DNA로 하여 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 58 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분으로 총 35회 실시하였다. RT-PCR을 실시 한 후, 중합효소연쇄반응 산물을 pGEM-T easy 플라스미드에 삽입하여, TLCV 중합효소연쇄반응 양성 균주를 제작하였다.

나. 결과

(1) *Tobacco leaf curl* (TLCV) 바이러스 외피 단백질 발현을 위한 pET15b 플라스미드의

클로닝

재조합 TLCV 바이러스 외피 단백질을 대장균을 이용하여 발현을 유도하기 위해서, genscript사에서 합성되어 제작된 pUC57-TLCV 플라스미드를 추출하였다. 추출된 플라스미드 DNA를 제한효소인 *NdeI*과 *BamHI*로 처리한 결과, TLCV 바이러스 외피 단백질 유전자 크기 (792 bp)가 정확하게 나타남을 알 수 있었다(Fig. 6-51A). 제한효소에 의해 잘려진 TLCV 유전자를 아가로스겔에서 추출·정제 후(Fig. 6-51B), 같은 제한효소로 반응한 pET15b 플라스미드 DNA와 반응 시켜, T4 DNA ligase로 연결시켜, pET15b-TLCV 클론을 획득하였다(Fig. 6-51C).

(2) 재조합 TLCV 외피 단백질 발현

pET15b-TLCV 플라스미드 DNA를 재조합 단백질 발현 대장균 숙주인 BL21 (DE3)에 전기를 이용하여 형질전환 시킨 후, IPTG를 이용하여 TLCV 바이러스 외피 단백질을 과발현 유도를 실시 하였다. 과발현 유도 후, 세포의 상층액과 침전물에서 TLCV 바이러스 외피 단백질의 발현 유무를 일차원 단백질 전기영동을 통하여 조사하였다. 그 결과, 재조합 TLCV 바이러스 외피 단백질은 대장균 시스템에서 전혀 재조합 단백질로서 발현이 되지 않음을 알 수 있었다(Fig. 6-52).

(3) TLCV 바이러스 외피 단백질 유전자 검출을 위한 RT-PCR 프라이머 개발 및 양성 균주 제작

대장균 시스템을 이용한 재조합 TLCV 바이러스 외피 단백질 발현이 대장균에서는 전혀 되지 않았다. 따라서, RT-PCR을 이용한 TLCV 바이러스 검출용 진단법을 이용하기 위하여, 합성된 pUC57-TLCV 플라스미드 DNA를 이용하여 특이 프라이머 개발 및 양성 균주를 제작 하였다. 합성된 TLCV 바이러스 외피 단백질 유전자와 TLCV 바이러스 외피 유전자를 중첩시키고, TLCV 바이러스 외피 단백질을 연결한 특이 프라이머를 제작하였다. 이 특이 프라이머를 이용하여 pUC57-TLCV 플라스미드 DNA를 주형으로 하여 RT-PCR을 수행한 결과, 정확한 크기의 PCR 산물을 획득 할 수 있었다(Fig. 6-53).

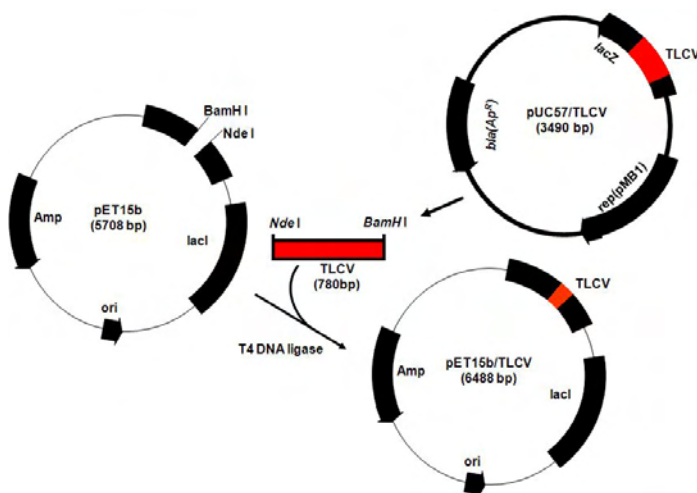


Fig. 6-50. 대장균을 이용한 재조합 TLCV 바이러스 외피 단백질 발현 모식도.

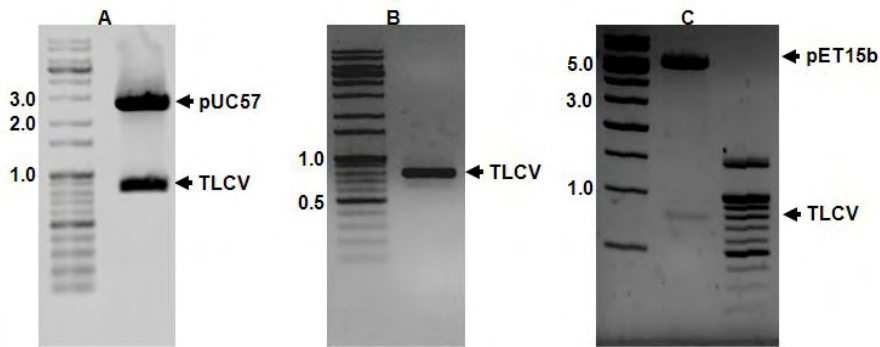


Fig. 6-51. TLCV 바이러스 외피 단백질 유전자의 1% 아가로스젤 전기영동.
 A : pUC57-TLCV 클론, B : TLCV 분리 및 정제, C : pET15b-TLCV 클론.

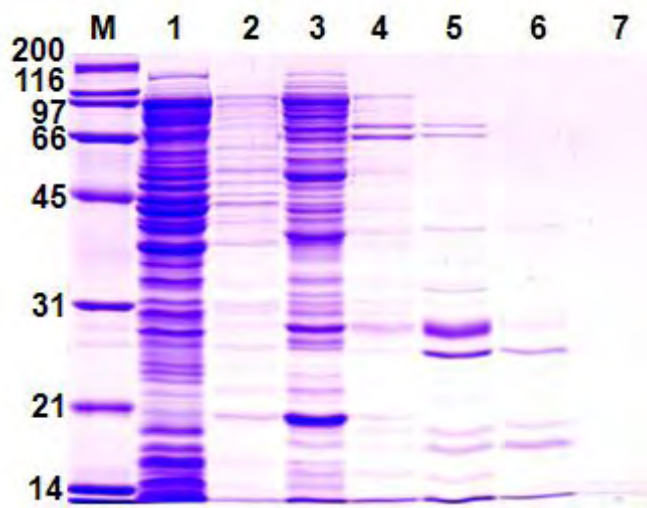


Fig. 6-52. 재조합 TLCV 바이러스 외피 단백질의 12% SDS-PAGE 단백질 전기영동.
 M : 단백질 size marker, 1 : Flow through, 2 : 수세, 3-7 : 40, 80, 160, 320 and 500 mM 이
 미다졸 용출액.

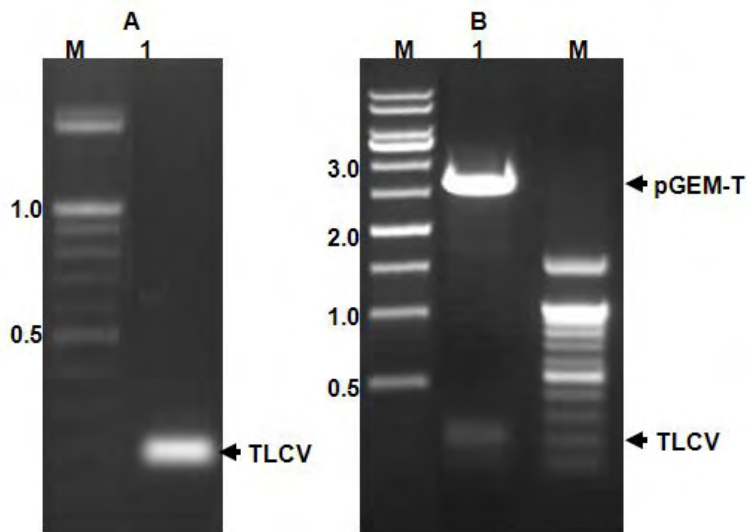


Fig. 6-53. TLCV 바이러스 역전사효소-중합연쇄반응 진단용 프라이머 개발 및 PCR용 양성 균주 제작.

A : TLCV RT-PCR 생성물, B : pGEM-T/TLCV 플라스미드

M : DNA 사이즈 마커, 1 : 특이 프라이머를 이용한 역전사효소-중합연쇄반응 산물.

다. 고찰

Tobacco leaf curl virus (TLCV) 바이러스 검역용 진단 키트를 개발하기 위해서, TLCV의 외피 단백질에 대한 항체를 제작하고자 하였다. 그러나, 원인 바이러스를 국내에서 구할 수 있는 방법이 원천적으로 봉쇄되어 있어, 대장균을 이용한 재조합 단백질을 이용하기로 결정하였다. TLCV 바이러스 외피 단백질 유전자를 미국립보건원의 유전자 은행에서 조사하여, 미국의 펩타이드 합성 회사에 의뢰하여, 대장균에서 발현이 원활히 되도록 최적화 시켜 제작 의뢰를 하였으며(Fig. 6-50), 제작된 재조합 TLCV 유전자를 재조합 단백질 발현 대장균에서 단백질 발현을 유도 하기 위하여 클로닝을 실시하였다. 먼저, 대장균에서 재조합 단백질 발현 플라스미드로 이용되는 pET15b 플라스미드에(Fig. 6-51) 제작된 TLCV 유전자를 클로닝을 실시하였고(Fig. 6-51), 대장균에서 재조합 단백질 발현 숙주로 사용되고 있는 BL21 (DE3)에 형질 전환 시킨 후, IPTG를 이용하여 재조합 TLCV 바이러스 외피 단백질을 대장균에서 발현을 유도하였다(Fig. 6-52). 그 결과, *Tobacco leaf curl virus* (TLCV) 바이러스 외피 단백질은 대장균 시스템에서 재조합 단백질로 전혀 발현이 되지 않았다(Fig. 6-52). 이는 대장균에서 TLCV 유전자가 유전자로서 전혀 작동하지 않는 것이라 사료된다.

대장균에서 재조합 TLCV 바이러스 외피 단백질이 전혀 발현되지 않아, 단백질을 이용한 항체 제작을 할 수 없었으므로, PCR을 통한 검역 키트를 제작 하였다. 먼저, 합성된 TLCV 바이러스 유전자와 미국립 보건원에서 조사한 TLCV 바이러스 유전자의 중첩되는 부위를 찾아, 원래의 TLCV 바이러스 외피 단백질 유전자를 첨가시켜 특이 프라이머를 합성하였다. 합성된 프라이머를 이용하여, 제작한 TLCV 플라스미드 DNA에서 PCR을 수행한 결과, TLCV 바이러스 외피 단백질 유전자를 특이적으로 검출 되었다(Fig. 6-53).

본 실험에서는, *Tobacco leaf curl* 바이러스(TLCV) 외피 단백질 유전자를 특이적으로 증폭할 수 있는 특이 프라이머를 제작 및 PCR 수행시 양성 대조균으로 사용할 수 있는 양성 균

주의 개발에 관한 것으로, 우리가 아는 한 국내에서 처음으로 제작된 *Fragaria Chiloensis Latent* 바이러스 검역용 특이 프라이머라는 것에 의의가 있다고 판단된다.

10. *Cucurbit yellow stunting disorder virus*(CYSDV) 검역용 바이러스 진단 키트 개발

가. 연구개발수행 내용

(1) *Cucurbit yellow stunting disorder* 바이러스 외피단백질 합성

Cucurbit yellow stunting disorder (CYSDV) 바이러스 외피단백질 유전자를 미국 국립보건원 (NIH) 유전자은행을 이용하여 염기서열을 조사하였다. 이 염기서열을 생물정보 프로그램을 이용하여 각각의 바이러스 유전자에 존재하는 제한효소의 종류와 위치를 분석하였다. 이를 토대로 유전자 재조합에 필요한 제한효소 *NdeI*과 *BamHI*를 CYSDV 바이러스 외피단백질 유전자 처음과 말단에 삽입 하였고, 제작된 플라스미드를 대장균에서 재조합 단백질로 발현을 유도할 시, CYSDV 바이러스 외피 단백질만 발현시키기 위하여, 유전자 말단에 정지 코돈을 삽입하여 플라스미드를 디자인 하였다. 디자인 된 염기서열을 미국의 유전자 합성 회사인 GenScript (www.genscript.com)에 의뢰하여, 대장균에서 단백질 발현이 용이하게 최적화 시켜 주문·제작하였으며, 이때 제작된 CYSDV 외피단백질 유전자는 Genscript 사에 의해서 pUC57 플라스미드에 삽입되도록 하였다. 이를 pUC57-CYSDV라 하였다(Aguilar et al., 2003).

(2) 재조합 *Cucurbit yellow stunting disorder* 바이러스 외피단백질 발현을 위한 pET15b 플라스미드의 클로닝

pUC57-CYSDV 플라스미드에 제한효소 *NdeI*와 *BamHI*를 첨가 시켜, 37°C에서 1 시간 처리한 후, 1% 아가로스젤에 핵산 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후, CYSDV 바이러스 외피단백질 유전자를 아가로스젤상에서 확인 한 후, 아가로스젤로부터 CYSDV 바이러스 외피단백질 유전자를 잘라 내었다. 잘라낸 아가로스젤은 Qiagen 젤 용출 키트(Cat. No. 28704. USA)를 이용하여 외피단백질 유전자를 아가로스젤로부터 분리·정제 하였다. 정제된 CYSDV 바이러스 외피단백질 유전자를 *NdeI* 및 *BamHI*으로 처리한 pET15b 플라스미드에 클로닝을 실시하였다. 클로닝은 *NdeI* 및 *BamHI*로 처리한 pET15b와 아가로스젤에서 분리한 CYSDV 바이러스 외피 단백질 유전자를 섞고, T4 DNA 연결효소 (Cat. No. 2011A, TAKARA, Japan)를 첨가 하였다. 이 첨가물을 14°C에서 1hr 동안 반응시킨 후, 전기(Bio-Rad, USA)를 이용하여 DH10b/r 대장균 숙주에 형질전환 시켰다. 형질전환된 세포를 50µg/ml 암피실린이 들어 있는 LB 고체 배지에 접종하여 37°C에서 16시간 동안 배양한 후, 자라나는 집락을 같은 항생제가 들어 있는 LB 액체 배지(3ml)에 접종하였다. 액체 배지에서 키운 대장균으로부터 플라스미드 DNA를 추출하여 같은 제한효소인 *NdeI*와 *BamHI*로 처리하여 클로닝이 정확하게 된 콜로니를 획득할 수 있었으며, 이를 pET15b-CYSDV라 명명 하였다(Fig. 6-54).

(3) IPTG을 이용한 pET15b-CYSDV 바이러스 재조합 외피 단백질 과발현 유도

pET15b-CYSDV 플라스미드를 재조합 단백질 발현 숙주인 대장균 BL21 (DE3)에 전기를 이용하여 형질전환 시켜 얻은 대장균을 항생제 암피실린이 50µg/ml이 함유되어 LB 액체 배지에 접종하였다. 접종한 pET15b-CYSDV BL21 (DE3) 균주를 37°C에서 하루 동안 전 배양을 실시한 후, 같은 항생제가 함유되어 있는 LB 액체 배지(1 L)에 최종 농도가 1%가 되게 분

배양을 실시하였다. 본 배양 후 pET15b-CYSDV BL21 (DE3) 균주가 OD₆₀₀에서 흡광도가 0.6~0.8 사이가 되도록 배양 시킨 후, IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, Promega, Cat. No. V3951, USA)를 최종농도 1mM이 되게끔 첨가 시켰다. IPTG 첨가 후, 17°C, 250 rpm으로 3일간 더 배양 시켜, 재조합 단백질 발현 숙주가 재조합 CYSDV 바이러스 외피 단백질을 최대한 과발현 할 수 있도록 유도 하였다(Rubio et al., 2001).

(4) 재조합 CYSDV 외피 단백질 발현 및 정제.

IPTG를 이용하여 과발현을 유도한 pET15b-CYSDV BL21 (DE3) 균주를 8,000 rpm에서 22분간 원침 시켜 대장균 세포를 농축 하였고, 농축 후 수세 완충액 (50mM Tris (pH 8.0), 100mM NaCl)로 부유시켰다. 부유시킨 후, 같은 조건에서 원침 하여 pET15b-CYSDV BL21 (DE3) 균주를 수세 완충액으로 수세 하였다. 수세된 pET15b-CYSDV BL21 (DE3) 균주는 수세 완충액 35ml에 다시 부유 시키고, 세포 파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄 하였다. 세포 파쇄는 Amplitude 40%, pulse on 2 초, pulse off 2 초, 4°C에서 5 분간 파쇄한 후, 12,000 rpm에서 연속으로 2번 원심 분리하여 상층액과 침전물을 완전히 분리하였다. 분리된 상층액은 Ni이 결합되어 있는 아가로스젤 Ni-NTA 레진(invitrogen, Cat. No. 46-0019, USA)을 이용하여 정제를 실시하였다. 정제는 우선 컬럼에 Ni-NTA 레진을 충전 시킨 후, Ni-NTA 레진 용적의 10 배 이상의 수세 완충액으로 수세를 실시하였다. 수세 후, 이미다졸 농도를 40, 80, 160, 320 그리고 500 mM로 순차적으로 첨가하여 재조합 CYSDV 바이러스 외피 단백질을 순차적으로 용출 시켰다. 용출된 단백질은 12% SDS-PAGE 겔에서 일차원 단백질 전기영동을 실시하여 원하는 단백질의 발현 및 정제가 되었는지를 확인 하였다.

(5) 재조합 CYSDV 바이러스 외피 단백질을 이용한 복클론 항체 제작.

1mg의 재조합 CYSDV 외피 단백질과 Freund's complete adjuvant (FCA, Cat. No. F5881, Sigma, USA)를 혼합하여 emulsifying 주사기로 emulsion을 만들었다. Emulsion이 된 용액을 토끼의 등 쪽 근육에 주사하였다.

(6) 재조합 CYSDV 바이러스 외피 단백질을 이용한 단클론 항체 제작

생후 6주된 암컷 Balb/c 쥐에 재조합 CYSDV 바이러스 외피 단백질 50μg을 Freund's complete adjuvant와 섞어 emulsion을 만들어 복강에 면역하였다. 면역 2주 후에 동일 량의 재조합 CYSDV 바이러스 외피 단백질을 Freund's incomplete adjuvant와 섞어 emulsion을 만들어 추가 면역하고, 다시 2주 후에 같은 양으로 CYSDV 바이러스 외피 단백질만 이용하여 3차 면역을 하였다.

(7) CYSDV 바이러스 역전사효소-중합연쇄반응 진단용 프라이머 개발 및 PCR용 양성 균주 제작.

CYSDV 바이러스 외피 단백질 유전자를 중합효소연쇄반응으로 증폭할 수 있는 양성균주를 제작하기 위하여, genscript사에서 합성된 CYSDV 유전자와 CYSDV 바이러스의 유전자 사이에서의 상동성을 보이는 부분을 중첩 시키고, 나머지 프라이머 서열들은 CYSDV 바이러스의 유전자와 일치하도록 제작 하였다(정방향은 5'-GAAAGATATCGATGGTGATAACAA-3', 역방향은 5'-TTTTCAAAGCCTGGCATTTCATCA-3'). 제작된 프라이머를 이용하여

pUC57-CYSDV 플라스미드를 주형 DNA로 하여 94°C에서 30초, 58°C에서 1분, 72°C에서 1분으로 총 35회 실시하였다. RT-PCR을 실시한 후(Gil-Salas et al., 2007), 중합효소연쇄반응 산물을 pGEM-T easy 플라스미드에 삽입하여, CYSDV 중합효소연쇄반응 양성 균주를 제작하였다.

나. 결과

(1) *Cucurbit yellow stunting disorder* (CYSDV) 바이러스 외피 단백질 발현을 위한 pET15b 플라스미드의 클로닝

재조합 CYSDV 바이러스 외피 단백질을 대장균을 이용하여 발현을 유도하기 위해서, genscript사에서 합성되어 제작된 pUC57-TLCV 플라스미드를 추출하였다. 추출된 플라스미드 DNA를 제한효소인 *NdeI*과 *BamHI*로 처리한 결과, CYSDV 바이러스 외피 단백질 유전자 크기(804 bp)가 정확하게 나타남을 알 수 있었다(Fig. 6-55A). 제한효소에 의해 잘려진 TLCV 유전자를 아가로스겔에서 추출·정제 후(Fig. 6-55B), 같은 제한효소로 반응한 pET15b 플라스미드 DNA와 반응시켜, T4 DNA ligase로 연결시켜, pET15b-TLCV 클론을 획득하였다(Fig. 6-55C).

(2) 재조합 CYSDV 외피 단백질 발현.

pET15b-CYSDV 플라스미드 DNA를 재조합 단백질 발현 대장균 숙주인 BL21 (DE3)에 전기를 이용하여 형질전환 시킨 후, IPTG를 이용하여 CYSDV 바이러스 외피 단백질을 과발현 유도를 실시하였다. 과발현 유도 후, 세포의 상층액과 침전물에서 CYSDV 바이러스 외피 단백질의 발현 유무를 일차원 단백질 전기영동을 통하여 조사하였다. 그 결과, 재조합CYSDV 바이러스 외피 단백질은 대장균 시스템에서 수용성 단백질로 과발현 되는 것을 알 수 있었다(Fig. 6-56A). Ni-NTA 컬럼을 이용하여 정제를 실시한 결과, 80 mM 이미다졸 용액에서 용출되기 시작하여 320 mM 이미다졸 용액까지 용출됨을 알 수 있었다. 특히, 320 mM에서는 재조합 CYSDV 바이러스 외피 단백질만 용출됨을 알 수 있다(Fig. 6-56B).

(3) CYSDV 바이러스 외피 단백질 유전자 검출을 위한 RT-PCR 프라이머 개발 및 양성 균주 제작

대장균 시스템을 이용한 재조합 CYSDV 바이러스 외피 단백질 발현이 대장균에서는 전혀 되지 않았다. 따라서, RT-PCR을 이용한 CYSDV 바이러스 검출용 진단법을 이용하기 위하여, 합성된 pUC57-CYSDV 플라스미드 DNA를 이용하여 특이 프라이머 개발 및 양성 균주를 제작 하였다. 합성된 CYSDV 바이러스 외피 단백질 유전자와 CYSDV 바이러스 외피 유전자를 중첩시키고, CYSDV 바이러스 외피 단백질을 연결한 특이 프라이머를 제작하였다. 이 특이 프라이머를 이용하여 pUC57-CYSDV 플라스미드 DNA를 주형으로 하여 RT-PCR을 수행한 결과, 정확한 크기의 PCR 산물을 획득 할 수 있었다(Fig. 6-57).

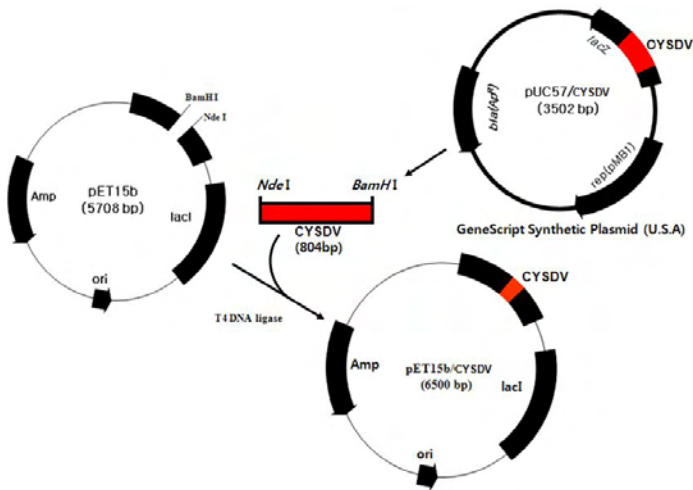


Fig. 6-54. 대장균을 이용한 재조합 CYSDV 바이러스 외피 단백질 발현 모식도.

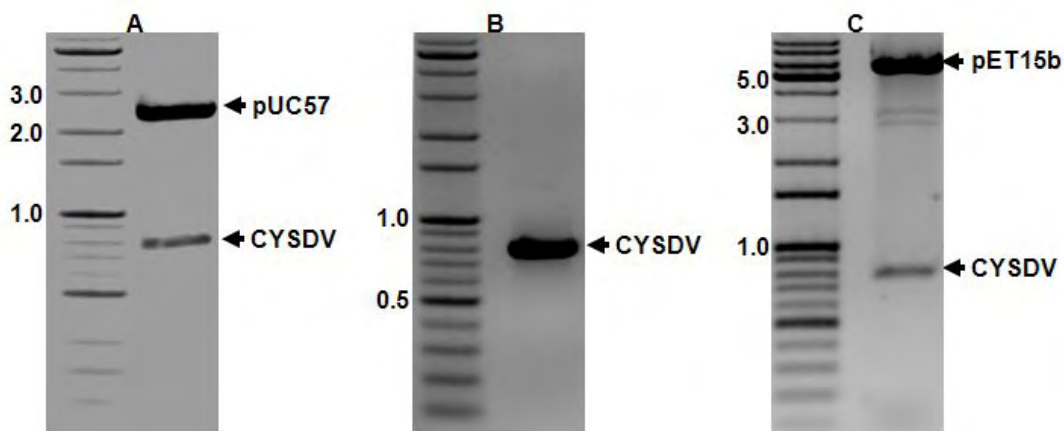


Fig. 6-55. CYSDV 바이러스 외피 단백질 유전자의 1% 아가로스젤 전기영동.
A : pUC57-CYSDV 클론, B : CYSDV 분리 및 정제, C : pET15b-CYSDV 클론.

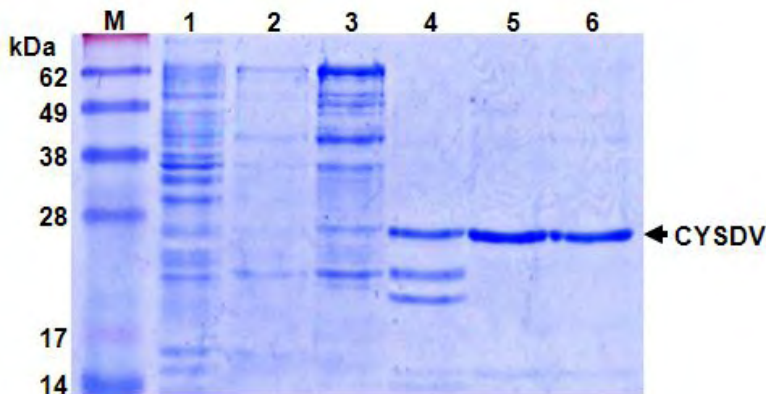


Fig. 6-56. 재조합 CYSDV 바이러스 외피 단백질 12% 일차원 단백질 전기영동.
M : 단백질 size marker, 1 : Flow through, 2 : 수세, 3 - 6 : 40, 80, 160 그리고 320 mM 이
미다졸 용출액.

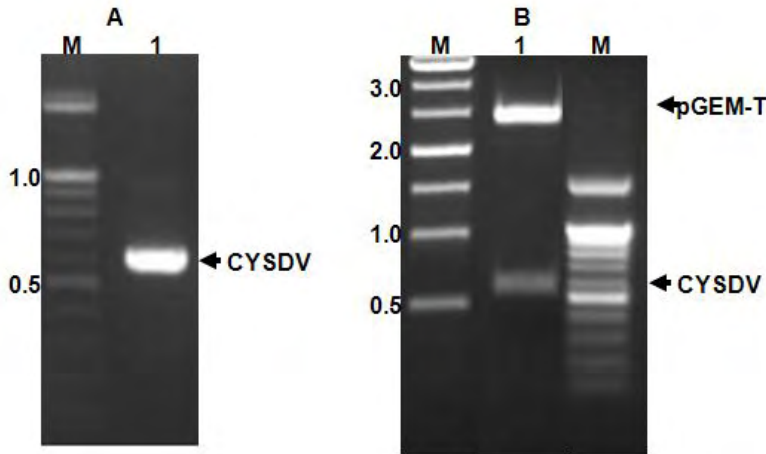


Fig. 6-57. CYSDV 바이러스 역전사효소-중합연쇄반응 진단용 프라이머 개발 및 PCR용 양성 균주 제작.

A : CYSDV RT-PCR 생성물, B : pGEM-T/CYSDV 플라스미드

M : DNA 사이즈 마커, 1 : 특이 프라이머를 이용한 역전사효소-중합연쇄반응 산물.

다. 고찰

Cucurbit yellow stunting disorder (CYSDV) 바이러스 검역용 진단 키트를 개발하기 위해서, CYSDV의 외피 단백질에 대한 항체를 제작하고자 하였다. 그러나, 원인 바이러스를 국내에서 구할 수 있는 방법이 원천적으로 봉쇄되어 있어, 대장균을 이용한 재조합 단백질을 이용하기로 결정하였다. CYSDV 바이러스 외피 단백질 유전자를 미국립보건원의 유전자 은행에서 조사하여, 미국의 펩타이드 합성 회사에 의뢰하여, 대장균에서 발현이 원활히 되도록 최적화 시켜 제작 의뢰를 하였으며(Fig. 6-42), 제작된 재조합 CYSDV 유전자를 이용하여 대장균에서 단백질 발현을 유도 하였다. 그 결과, pET15b 플라스미드에(Fig. 6-54)서 재조합 CYSDV 바이러스 외피 단백질을 발현 및 정제가 가능하였다(Fig. 6-56).

대장균에서 분리 및 정제한 재조합 CYSDV 바이러스 외피 단백질을 이용하여, 토끼와 마우스를 통하여 각각 복클론 항체 및 단클론 항체를 제작하기 위한 실험을 진행하였으나 실험도중 토끼 및 마우스가 모두 사망하여 복클론 및 단클론 항체를 제작할 수 없었다. 따라서 본 실험실에서는 단 복클론 및 단클론 항체를 제작하기 위한 실험을 다시 진행중이다.

제작된 합성 CYSDV 유전자로부터 이 바이러스를 PCR 법으로 진단할 수 있는 프라이머 및 양성 균주를 제작하기 위해서, 바이러스 유전자와 합성 유전자의 중첩되는 부위에 바이러스 유전자를 삽입하여 프라이머를 제작하였고, 제작된 프라이머를 이용하여 합성 유전자로부터 PCR을 실시한 결과, 이 바이러스를 진단할 수 있는 특이 프라이머 및 PCR 실시 시 양성 대조균을 제작할 수 있었다(Fig. 6-57)

본 실험에서는, *Cucurbit yellow stunting disorder* 바이러스(TLCV) 외피 단백질 유전자를 특이적으로 증폭할 수 있는 특이 프라이머를 제작 및 PCR 수행 시 양성 대조균으로 사용할 수 있는 양성 균주의 개발에 관한 것으로, 우리가 아는 한 국내에서 처음으로 제작된 *Cucurbit yellow stunting disorder* 바이러스 검역용 특이 프라이머라는 것에 의의가 있다고 판단된다.

12. 결론

식물검역소에서 관리병충해로 지정한 병충해 중 바이러스 및 바이로이드 병은 105종이 된다(표. 6-2, 3). 검역 시 ELISA kit를 사용하거나 바이러스 유전자에서 유래한 특이 primer를 사용하여 바이러스 검역을 수행하고 있다. 그러나 이러한 분자생물학적 기법을 사용하여 정밀 진단을 할 수 있는 ELISA kit나 PCR용 특이 primer가 개발된 대상 바이러스는 75종 밖에 되지 않는다(표. 6-2, 3). ELISA kit는 검역현장에서 많은 sample을 동시에 검사할 수 있는 비교적 간단한 바이러스 검출방법이다. 우리나라의 검역소에서는 기산이나 바이원 회사를 통하여 구입하여 쓰고 있다. 이에 본 연구에서는 바이러스 정밀진단법이 아직 개발되지 않은 30종의 바이러스를 대상으로 하여 1차적으로 ELISA kit를 개발하려고 하였다. ELISA kit는 바이러스 단백질에 반응하는 항체를 만들어 이용하는 방법이다. 그러므로 대량의 바이러스 단백질을 얻어야 토끼나 마우스에서 이 단백질을 접종하여 항체를 생산할 수 있다. 보통 순수분리 한 바이러스 입자를 토끼에 주사하여 복클론 항체를 만들고, 마우스에 접종하여 마우스 비장세포와 형질종세포(cancer cell)의 hybrid 세포를 만들어 단클론 항체를 생산한다. 그러나 아쉽게도 이들 검역대상 바이러스는 국내에서 보고되거나 도입된 적이 없어 대상시료를 얻는데 문제가 생긴다. 그 해결책으로 바이러스의 유전체에서 표피단백질(coat protein) 유전자를 이용하여 단백질을 *E. coli*에서 translation 시켜 다량의 단백질을 얻을 수밖에 없었다.

아직 ELISA kit나 PCR용 특이 primer가 개발되지 않은 바이러스 30종 중 유전체 sequence가 보고된 10종의 바이러스를 대상으로 *E. coli* system에서 표피단백질을 발현시켜 이를 항원으로 사용하여 토끼와 마우스에서 항체를 얻으려고 하였다.

대상바이러스 10종 중 EMCV, CiLV, FCILV, TLCV 4종은 *E. coli* system에서 표피단백질 유전자 expression이 되지 않았다. 그리하여 표피단백질 유전자가 *E. coli* system에서 expression 가능한 LchV, TICP, RSNV, ICRSV, SPaV, CYSDV를 대상으로 ELISA kit를 합성하기로 하였다. 이들 바이러스들도 마우스 system에서 단클론 항체를 합성하였으나 모두 역가가 낮아 ELISA kit 제조용으로는 적당하지 않았다. 그러므로 이들 6종의 ELISA kit는 토끼에서 합성한 복클론 항체로 만들기로 하였다. TICV의 경우 만들어진 복클론 항체의 역가가 떨어져 새로 만들고 있으며, CYSDV의 경우 3회 항원 boosting 후 토끼가 감기에 걸려 죽어버려 새로운 토끼에서 항체를 합성하기 위하여 재접종 하고 있다.

현장에서 사용할 수 있는 ELISA kit를 합성하기 위해서는 이병식물조직에서 바이러스를 검출할 수 있도록 하는 현장실험이 필요하다. 그러나 우리나라에서는 이병식물조직을 얻을 수가 없어 ELISA 항원 항체 반응의 비율 등 kit의 adjustment 실험을 수행할 수 없는 것이 문제이다. 그 대안으로 식물검역의 현장에서 시료와 항체 비율을 임의로 정하여 ELISA test를 할 수밖에 없을 것이다.

ELISA kit사용이 아직은 준비가 완전히 되지 않아 그 대안으로 바이러스 표피단백질 유전자의 sequence를 이용하여 PCR용 특이 primer를 개발하였다. 이때 PCR 온도는 우리나라 식물검역소에서 PCR 검정 때 사용하는 온도인 55℃로 맞추었다. 이 또한 식물조직이나 종자에서 바이러스가 detection될 수 있는 조건들을 맞추어야 하겠지만 이 primer를 이용하여 RT-PCR을 수행한다면 이들 바이러스를 검출할 수 있으리라 생각된다.

본연구에서 개발한 진단법에 대한 요약은 표. 6-4에서 볼 수 있다.

표. 6-4. 본연구에서 개발한 진단법

바이러스	복클론 항체	단클론 항체	ELI SA	Prim er	정방향 sequence
					역방향 sequence
<i>Little cherry virus</i> (LChV)	O	X	O	X	
<i>Tomato infectious chlorosis virus</i> (TICV)	O	X	X	X	
<i>Rice Stripe Necrosis Virus</i> (RSNV)	O	O	O	O	5'-ATGTCTGCCGTGCGAACAGC-3'
					5'-CTGGACGGTTCGTGAACCCA-3'
<i>Indian Citrus RingSpot Virus</i> (ICRSV)	O	O	O	O	5'-GCGAACGAAGACCTCAATCCAGTGG-3'
					5'-CGGCCTTTGGTGAAGGCAAC-3'
<i>Eggplant mottled crinkle virus</i> (EMCV)	X	X	X	O	5'-CAAGCTTGCATGCAGGCC-3'
					<i>E. coli</i> 에서 유전자 발현 안됨
<i>Citrus leprosis virus C</i> (CiLV)	X	X	X	O	5'-GTCAGCGCGCCCTCAGCAACTGCA-3'
					<i>E. coli</i> 에서 유전자 발현 안됨
<i>Fragaria Chiloensis Latent virus RNA</i> 3 (FCILV)	X	X	X	O	5'-AGGCGCTGGAACCTATTGGGGTTT-3'
					<i>E. coli</i> 에서 유전자 발현 안됨
Strawberry pallidosis-associate d virus RNA 2 (SPaV)	O	O	O	O	5'-AATGAAGAATTTGATGAGGG-3'
					5'-TCTGAGATATTGGTTTCGCA-3'
<i>Tobacco leaf curl virus</i> (TLCV)	X	X	X	O	5'-TGGCAAGCGTTTCTGTGTCAAATC-3'
					<i>E. coli</i> 에서 유전자 발현 안됨
<i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i> (CYSDV)	X	X	X	O	5'-GAAAGATATCGATGGTGATAACAA-3'
					실험 중 동물 사망

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연차별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도

구분	연도	연구개발의 목표		달성도	연구개발의 내용
1차년도	2009-2010	제1세부	○ RT-PCR 기법을 이용한 주요 검역대상 식물바이러스의 진단기법 및 표준시료개발(각 5종)	100	1. 검역대상 식물바이러스(금지 및 관리급 바이러스) 및 기후변화에 따른 돌발발생 가능 바이러스들을 분양, 수집하여 증식시키고 순수분리 또는 부분적으로 순화함 2. 대상 바이러스의 게놈 염기서열을 이용한 프라이머 설계 및 프라이머 선별 (5종) 3. 증폭된 DNA 절편들의 염기서열 분석, 확인 및 양성대조구(clone) 확보 4. PCR 검사결과 검증용 nested-PCR 검사법 개발(5종) 5. 프라이머들의 현장 효율성 검증
		제2세부	○ PRD, PCG, PDB의 데이터 베이스 설계 및 구축을 통해 검역 관련 기초 자료 정보를 수집하고 관리하는 시스템 구축	100	1. PRD를 설계하고 관련된 병원균 정보를 저장하고, 검색 기능을 추가한다. 2. PGD 개발을 위해 기 운영되는 CFGP와의 연동 시스템을 구축하고, 기초 웹 기반의 Interface를 구축한다. 3. PDB 데이터 베이스를 구축한다.
		제1협동	○ 검역대상 주요 곰팡이의 균사체 및 게놈 DNA 확보 및 형태적, 생리·생화학적 특성 분석 ○ 분자표지마커 개발 가능 유전자의 증폭 및 cloning ○ 검역 대상 곰팡이의 특이적 검출을 위한 PCR primer 조합의 선별 및 특이성 검정 ○ 검역대상 곰팡이의 발생 현황 모니터링 및 분류학적 검토	100	1. 곡류, 채소, 화훼류에 주로 발생하는 검역대상 곰팡이병원체 중 <i>Fusarium/Gibberella/Nectria</i> 속 검역 곰팡이(<i>F. culmorum</i> , <i>G. cyanogena</i> , 등 5종)의 종 수집·보관 2. 수집 곰팡이의 균학적 특성을 조사함. 3. 검역 곰팡이의 균학적/병리학적 특성에 맞는 분자표지마커 유전자를 증폭하여 cloning 함. 4. 검역곰팡이의 속 내 또는 종 내 특이적PCR 검출을 위한 특이 primer 의 제작과 수집 곰팡이 및 유사 비검역 곰팡이 종을 대상으로 primer 의 특이성을 검정함.
		제2협동	○ <i>Ophiostoma</i> , <i>Ceratocystic</i> , <i>Diplodia</i> 속의 진단기술 개발	100	1. <i>Ophiostoma</i> , <i>Ceratocystic</i> , <i>Diplodia</i> 속의 균사체 및 게놈 DNA 확보 - <i>Ceratocystis fagacearum</i> 등 5종 2. 수집 곰팡이의 형태적, 생리·생화학적 특성 분석 3. 분자표지마커 개발 가능 유전자의 증폭 및 cloning 4. 수집 곰팡이의 계통분류학적 분석 5. 검역 대상 곰팡이의 특이적 검출을 위한 특이 primer 의 선별 및 특이성 검정 6. 국내외 문헌 검색으로 검역대상 곰팡이의 발생 현황 모니터링 및 분류학적 검토
		제3협동	○ 분자생물학 및 생화학적 기법을 이용한 <i>Erwinia</i> 속 세균의 진단기법 및 표준시료개발	100	1. <i>Erwinia amylovora</i> 등 5종 세균의 PRA datasheet 구축(형태적특성, 유입가능성등 평가) 2. 유전자분석 기법(ERIC, BOX-PCR, 16S, ITS, groELgene, plasmid profiles, pathogenicity genes분석 등)을 이용한 주요 검역대상 식물병원성 세균의 진단기법 및 표준시료개발연구개발
제4협동	○ 식물바이러스 진단용 ELISA Kit 개발(2종)	100	1. 첨단 검사법 미개발 식물병 바이러스의 복클론 항체를 이용한 ELISA Kit 개발 (2종) - La France disease virus 등		

구분	연도	연구개발의 목표		달성도	연구개발의 내용
2차년도	2010-2011	제1세부	○ RT-PCR 기법을 이용한 주요 검역대상 식물바이러스의 진단기법 및 표준시료개발(각 5종)	100	1. 검역대상 식물바이러스(금지 및 관리급 바이러스) 및 기후변화에 따른 돌발발생 가능 바이러스들을 분양, 수집하여 증식시키고 순수분리 또는 부분적으로 순화함 2. 대상 바이러스의 게놈 염기서열을 이용한 프라이머 설계 및 프라이머 선발 (5종) 3. 증폭된 DNA 절편들의 염기서열 분석, 확인 및 양성대조구(clone) 확보 4. PCR 검사결과 검증용 nested-PCR 검사법 개발(5종) - 1차: 대상바이러스별 - 2차: 유연관계 바이러스별 - 3차: 기주관련 바이러스별 5. 프라이머들의 현장 효율성 검증
		제2세부	○ 1년차에 구축된 데이터베이스에 필요한 인터페이스 구축 및 연구결과를 관리할 수 있는 데이터베이스 구축	100	1. PRD의 개발 완료 및 자료 관리 작업 진행 2. PGD 유전체 정보 갱신 작업 3. PDB의 웹 인터페이스 구축 4. 웹 기반 분석 프로그램 연동 5. PIMD, TD 설계 및 개발
		제1협동	○ 검역대상 주요 곰팡이의 균사체 및 게놈 DNA 확보 및 형태적, 생리·생화학적 특성 분석 ○ 분자표지마커 개발 가능 유전자의 증폭 및 cloning ○ 검역 대상 곰팡이의 특이적 검출을 위한 PCR primer 조합의 선발 및 특이성 검증 ○ 검역대상 곰팡이의 발생 현황 모니터링 및 분류학적 검토	100	1. 1 차년도 검역대상 곰팡이의 수집 계속 및 <i>Bipolaris/Drechslera/Cochliobolus</i> 속 검역 곰팡이 종의 수집·보관 - <i>B. cynodontis</i> 등 5종 2. 수집 곰팡이의 균학적 특성을 조사함. 3. 검역 곰팡이의 균학적/병리학적 특성에 맞는 분자표지마커 유전자를 증폭하여 cloning 함. 4. 검역곰팡이의 속 내 또는 종 내 특이적PCR 검출을 위한 특이 primer 의 제작과 수집 곰팡이 및 유사 비검역 곰팡이 종을 대상으로 primer 의 특이성을 검증함.
		제2협동	○ <i>Mucor, Monilinia, Phialophora</i> 속의 진단기술 개발	100	1. <i>Mucor, Monilinia, Phialophora</i> 속의 균사체 및 게놈 DNA 확보 - <i>Phialophora cinerescens</i> 등 5종 2. 수집 곰팡이의 형태적, 생리·생화학적 특성 분석 3. 분자표지마커 개발 가능 유전자의 증폭 및 cloning 4. 수집 곰팡이의 계통분류학적 분석 5. 검역 대상 곰팡이의 특이적 검출을 위한 특이 primer 의 선발 및 특이성 검증 6. 국내외 문헌 검색으로 검역대상 곰팡이의 발생 현황 모니터링 및 분류학적 검토
		제3협동	○ 분자생물학 및 생화학적 기법을 이용한 <i>Xanthomonas</i> 속 세균의 진단기법 및 표준시료개발	100	1. <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>poinsettiicola</i> 등 5종 세균의 PRA datasheet 구축(형태적특성, 유입가능성 등 평가) 2. 유전자분석 기법(ERIC, BOX-PCR, 16S, ITS, groELgene, plasmid profiles, pathogenicity genes분석등)을 이용한 주요 검역대상 식물병원성 세균의 진단기법 및 표준시료개발연구개발
제4협동	○ 식물바이러스 진단용 ELISA Kit 개발(3종)	100	1. 첨단 검사법 미개발 식물병 바이러스의 복클론 항체를 이용한 ELISA Kit 개발 (3종) - 진단기법 미개발 바이러스 15종 중 3종		

구분	연도	연구개발의 목표		달성도	연구개발의 내용
3차년도	2011-2012	제1세부	○ RT-PCR 기법을 이용한 주요 검역대상 식물바이러스의 진단기법 및 표준시료개발(각 5종)	100	1. 검역대상 식물바이러스(금지 및 관리급 바이러스) 및 기후변화에 따른 돌발발생 가능 바이러스들을 분양, 수집하여 증식시키고 순수분리 또는 부분적으로 순화함 2. 대상 바이러스의 게놈 염기서열을 이용한 프라이머 설계 및 프라이머 선별 (5종) 3. 증폭된 DNA 절편들의 염기서열 분석, 확인 및 양성대조구(clone) 확보 4. PCR 검사결과 검증용 nested-PCR 검사법 개발(5종) - 대상바이러스별, 유연관계 바이러스별, 기주관련 바이러스별 5. 프라이머들의 현장 효율성 검증
		제2세부	○ 연구결과를 분석할 수 있는 웹 기반 분석 프로그램의 결합 및 개발된 시스템의 시험 운영	100	1. 연구에서 나오는 데이터를 PIMD에 저장하고 관리 및 웹 기반 인터페이스 개발 2. QIP, QD 설계 및 개발 3. 웹 기반 분석 프로그램 (ITP) 연동 4. PIMD, TD 설계 및 개발
		제1협동	○ 검역대상 주요 곰팡이의 균사체 및 게놈 DNA 확보 및 형태적, 생리·생화학적 특성 분석 ○ 분자표지마커 개발 가능 유전자의 증폭 및 cloning ○ 검역 대상 곰팡이의 특이적 검출을 위한 PCR primer 조합의 선별 및 특이성 검증 ○ 연구결과의 정보통합시스템 연계, 저장	100	1. <i>Curvularia/Mycosphaerella</i> 속 검역 곰팡이 종의 수집·보관 및 특성조사 - <i>C. clavata</i> 등 5종 2. 검역 곰팡이의 균학적/병리학적 특성에 맞는 분자표지마커 유전자를 증폭하여 cloning 함. 3. 검역곰팡이의 속 내 또는 종 내 특이적PCR 검출을 위한 특이 primer 의 제작과 수집 곰팡이 및 유사 비검역 곰팡이 종을 대상으로 primer 의 특이성을 검증함. 4. 특이 primer 또는 유전자 부위의 염기서열 분석을 통한 진단용 고감도 DNA chip 제작 5. 연구 결과물을 제2 세부과제 책임자의 정보통합시스템에서 저장·관리함.
		제2협동	○ <i>Pestalotiopsis, Septoria, Phomopsis</i> 속의 진단기술 개발	100	1. <i>Pestalotiopsis, Septoria, Phomopsis</i> 속의 균사체 및 게놈 DNA 확보 및 특성분석 - <i>Pestalotiopsis disseminata</i> 등 5종 2. 분자표지마커 개발 가능 유전자의 증폭 및 cloning 3. 수집 곰팡이의 계통분류학적 분석 4. 검역 대상 곰팡이의 특이적 검출을 위한 특이 primer 의 선별 및 특이성 검증 5. 특이 primer 또는 유전자 부위의 염기서열 분석을 통한 진단용 고감도 DNA chip 제작 6. 국내외 문헌 검색으로 검역대상 곰팡이의 발생 현황 모니터링 및 분류학적 검토
		제3협동	○ 분자생물학 및 생화학적 기법을 이용한 <i>Pseudomonas</i> 속 세균의 진단기법 및 표준시료개발	100	1. <i>Pseudomonas orydicola</i> Klement 등 5종 세균의 PRA datasheet 구축(형태적특성, 유입가능성등 평가) 2. 유전자분석 기법(ERIC, BOX-PCR, 16S, ITS, groELgene, plasmid profiles, pathogenicity genes분석등)을 이용한 주요 검역대상 식물병원성 세균의 진단기법 및 표준시료개발연구개발
		제4협동	○ 식물바이러스 진단용 ELISA Kit 개발(3종)	100	1. 첨단 검사법 미개발 식물병 바이러스의 복갈론 항체를 이용한 ELISA Kit 개발 (3종) - 진단기법 미개발 바이러스 15종 중 3종

구분	연도	연구개발의 목표		달성도	연구개발의 내용
4차년도	2012-2013	제1세부	○ RT-PCR 기법을 이용한 주요 검역대상 식물바이러스의 진단기법 및 표준시료개발(각 5종)	100	1. 검역대상 식물바이러스(금지 및 관리급 바이러스) 및 기후변화에 따른 돌발발생 가능 바이러스들을 분양, 수집하여 증식시키고 순수분리 또는 부분적으로 순화함 2. 대상 바이러스의 게놈 염기서열을 이용한 프라이머 설계 및 프라이머 선별 (5종) 3. 증폭된 DNA 절편들의 염기서열 분석, 확인 및 양성대조구(clone) 확보 4. PCR 검사결과 검증용 nested-PCR 검사법 개발(5종) - 1차: 대상바이러스별 - 2차: 유연관계 바이러스별 - 3차: 기주관련 바이러스별 5. 프라이머들의 현장 효율성 검증
		제2세부	○ 검역을 위한 빠른 병원균 동정 시스템 개발 완료	100	1. IMIQ 웹 인터페이스 설계 및 구현작업 2. QIP, QD 개발 및 웹 인터페이스 개발
		제1협동	○ 검역대상 주요 곰팡이의 균사체 및 게놈 DNA 확보 및 형태적, 생리·생화학적 특성 분석 ○ 분자표지마커 개발 가능 유전자의 증폭 및 cloning ○ 검역 대상 곰팡이의 특이적 검출을 위한 PCR primer 조합의 선별 및 특이성 검증 ○ 국내 검역대상 곰팡이 목록의 검토 및 개정	100	1. 1-3 차년도 검역대상 곰팡이의 수집 계속하고 4년차에는 <i>Mycosphaerella/Setosphaeria</i> 속 검역 곰팡이 종의 수집·보관 및 특성조사 - <i>M. linicola</i> 등 5종 3. 검역 곰팡이의 균학적/병리학적 특성에 맞는 분자표지마커 유전자를 증폭하여 cloning 함. 4. 진단용 oligo DNA chip 활용성 검증 5. 검역곰팡이의 속 내 또는 종 내 특이적PCR 검출을 위한 특이 primer 의 제작과 수집 곰팡이 및 유사 비검역 곰팡이 종을 대상으로 primer 의 특이성을 검증함. 6. 연구 결과물을 제2 세부과제 책임자의 정보통합시스템에서 저장·관리함.
		제2협동	○ <i>Puccinia, Gymnosporangium, Ustilago</i> 속의 진단기술 개발	100	1. <i>Puccinia, Gymnosporangium, Ustilago</i> 속의 균사체 및 게놈 DNA 확보 - <i>Puccinia, Gymnosporangium, Ustilago</i> 등 5종 2. 수집 곰팡이의 형태적, 생리·생화학적 특성 분석 3. 분자표지마커 개발 가능 유전자의 증폭, cloning 및 계통분류학적 분석 4. 검역 대상 곰팡이의 검출을 위한 특이 primer 의 선별 및 특이성 검증 5. 진단용 oligo DNA chip 활용성 검증 6. 국내의 문헌 검색으로 검역대상 곰팡이의 발생 현황 모니터링 및 분류학적 검토
		제3협동	○ 분자생물학 및 생화학적 기법을 이용한 <i>Coryneform bacteria</i> 및 <i>Streptomyces</i> 속 세균의 진단기법 및 표준시료개발	100	1. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> 등 5종 세균의 PRA datasheet 구축(형태적특성, 유입가능성등 평가) 2. 유전자분석 기법(ERIC, BOX-PCR, 16S, ITS, groELgene, plasmid profiles, pathogenicity genes분석등)을 이용한 주요 검역대상 식물병원성 세균의 진단기법 및 표준시료개발연구개발
제4협동	○ 식물바이러스 진단용 ELISA Kit 개발(2종)	100	1. 첨단 검사법 미개발 식물병 바이러스의 복발론 항체를 이용한 ELISA Kit 개발 (2종) - 진단기법 미개발 바이러스 15종 중 2종		

2. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

5년간의 본 연구를 통해, 총 7건의 특허 출원, 23편 논문 (SCI급 20편, 비SCI급: 3편)출간, 49편의 학술발표, 16명의 연구인력 양성, 2건의 수상실적등의 연구성과를 거두었다. 특히 개발된 검역 기술들은 검역현장 사용을 위해 프로토콜 최적화가 현재 진행 중이다. 또한 본 연구 성과는 PCR, RT-PCR, Taqman PCR 및 ELISA 기술을 이용한 식물병원성 진단키트 개발을 통해 연구개발의 실용화를 위해 노력할 것이며 병원체 유전체 해독 분야, DNA chip 이용 등 다양한 검출기술 개발 분야 등에 활용할 예정이다.

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자 등록	논문		학술 발표	연구 인력 양성
	출원	등록	품종 명칭 등록	품종 수입 신고	품종보호			SCI	비SCI		
					출원	등록					
계	목표	15	10					10	5		
	달성	7	0					20	3	49	16

과제성과

과제번호	309015-4	사업구분	수출전략기술개발
연구과제명	수출입 식물병 검역을 위한 진단기술 개발		
연구자	김국형	주민등록번호	650825-*****
소속기관	서울대학교	전자우편	kookkim@snu.ac.kr

기술거래				
번호	기술실시계약명	기술실시대상기관	기술실시발생일자	당해년발생액 출원등록일

사업화				
번호	사업화명	제품명	업체명	사업화 형태

교육 및 지도활용 내역				
번호	교육명	교재명	주요내용	활용년도

정책활용 내역(농정시책 반영 및 정책건의)				
번호	정책활용상태	주관부처	시책추진실적 및 계획	활용년도

타 연구개발사업에의 활용				
번호	연구사업명	연구제목	연구자	활용년도

산업재산권(발명특허, 실용신안, 의장, 규격 등), 신제품, 프로그램개발					
번호	출원등록명	출원등록자명	구분	산업재산권 종류	출원등록일
1	판토에아 스테와티 아종 스테와티 동정용 프라이머 조성물 및 그 응용	임춘근; 박덕환; 쉬리 타파; 조준 모; 김범석	특허출원	특허	2010-10-05
2	가지검은마름병 진단용 프라이머, 이를 이용한 가지검은마름병 진단	임춘근; 박덕환; 쉬리 타파; 조준 모; 한준희	특허출원	특허	2011-01-12
3	중합효소 연쇄반응에 의한 종 특이적 푸자리움 베르티실리오이드 검출을 위한 올리고뉴클레오티드 및 이를 포함하는 키트	윤성환; 강미란; 김지혜; 김희경; 이테레사; 이승 호; 류재기	특허출원	특허	2011-11-11

산업재산권(발명특허, 실용신안, 의장, 규격 등), 신품종, 프로그램개발

번호	출원등록명	출원등록자명	구분	산업재산권 종류	출원등록일
4	박과 또는 가지과 식물에 대한 병원성 바이러스 검출 마커 및 이를 이용한 검출방법	김국형; 이종승; 조원경; 이수현; 최홍수	특허출원	특허	2011-09-22
5	중합효소 연쇄반응에 의한 종 특이적 푸자리움 프롤리페라툼 검출을 위한 올리고뉴클레오티드 및 이를 포함하는 키트	순천향대학교 산학협력단	특허출원	특허	2012-10-16
6	귀리에서 Halo blight 병을 일으키는 슈도모나스 코로나과시엔스 검출용 프라이머 세트 및 이를 이용한 슈도모나스 코로나과시엔스 검출 방법	충북대학교 산학협력단	특허출원	특허	2013-01-21
7	사과에서 blister spot 병을 일으키는 슈도모나스 시린개 피브이 파플란스 검출용 프라이머 세트 및 이를 이용한 슈도모나스 시린개 피브이 파플란스 검출 방법	충북대학교 산학협력단	특허출원	특허	2013-01-21

논문(국내외 전문학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	학술지게재일	SCI구분
1	Effects of Recombination on the Pathogenicity and Evolution of Pepper mottle virus	Plant Pathology Journal	Kook-Hyung Kim	2009-12-01	SCI
2	Specific PCR Detection of Four Quarantine Fusarium Species in Korea	Plant Pathology Journal	Sung-Hwan Yun	2010-12-01	SCI
3	Genetic stability of Magnaporthe oryzae during successive passages through rice plants and on artificial medium	Plant Pathology Journal	Yong-Hwan Lee	2010-12-01	SCI
4	Cyber infrastructure for Fusarium: three integrated platforms supporting strain identification, phylogenetics, comparative genomics and knowledge sharing	Nucleic Acids Research	Yong-Hwan Lee	2010-11-17	SCI
5	A Short-chain Dehydrogenase/reductase Gene is Required for Infection-related Development and Pathogenicity in Magnaporthe	Plant Pathology Journal	Yong-Hwan Lee	2010-03-01	SCI
6	Fungal Secretome Database: Integrated platform for annotation of fungal secretomes	BMC GENOMICS	Yong-Hwan Lee	2010-02-01	SCI
7	Identification and analysis of in planta expressed genes of Magnaporthe oryzae	BMC GENOMICS	Yong-Hwan Lee	2010-02-01	SCI
8	Direct detection of Brenneria rubrifaciens by (polymerase chain reaction) PCR-based assay using rubrifacine synthetic gene	African Journal of Microbiology Research	Chun Keun Lim	2010-08-18	SCI
9	Cyber infrastructure for Fusarium: three integrated platforms supporting strain identification, phylogenetics, comparative genomics and knowledge sharing	Nucleic Acids Research	Bongsoo Park, Jongsun Park	2010-11-17	SCI

논문(국내외 전문학술지) 게재					
번호	논문명	학술지명	주저자명	학술지게재일	SCI구분
10	A single amino acid change in HC-Pro of soybean mosaic virus alters symptom expression in a soybean cultivar carrying Rsv1 and Rsv3	Archives of Virology	Kook-Hyung Kim	2011-01-01	SCI
11	Role of Ascospores and Arthroconidia of Xylogone ganodermorphthora in Development of Yellow Rot in Cultivated Mushroom, Ganoderma lucidum	The Plant Pathology Journal	Hyo-Jung Kang	2011-05-15	SCI
12	종 특이 PCR primer 조합을 이용한 옥수수 오염 Fusarium verticillioides 의 PCR 검출	식물병연구	강미란	2011-11-22	비SCI
13	Ophiostoma ips Isolated from Reddish Brown Stained Japanese Red Pine Wood	The Plant Pathology Journal	Jae Jin Kim	2011-02-22	SCI
14	?Differential roles of the phospholipase C genes in fungal development and pathogenicity of Magnaporthe oryzae	Fungal Genetics and Biology	Jinhee Choi	2011-01-13	SCI
15	The cell cycle gene MoCDC15 regulates hyphal growth, asexual development and plant infection in the rice blast pathogen Magnaporthe	Fungal Genetics and Biology	Jaeduk Goh	2011-05-12	SCI
16	The PEX7-mediated matrix protein import system is required for fungal development and pathogenicity in Magnaporthe oryzae	PLoS ONE	Jaeduk Goh	2011-12-14	SCI
17	RT-PCR Detection of Five Quarantine Plant RNA Viruses Belonging to Potyand	The Plant Pathology Journal	Jong-Seung Lee	2011-08-03	SCI
18	Generation of Antibodies Against Rice stripe virus Proteins Based on Recombinant	The Plant Pathology Journal	Sen Lian	2011-01-23	SCI
19	Development of RT-PCR Based Method for Detecting Five Non-reported Quarantine	The Plant Pathology Journal	Jong-Seung Lee	2011-01-24	SCI
20	Gene Expression Profiling during Conidiation in the Rice Blast Pathogen Magnaporthe oryzae	PLoS one	Kyoung Su Kim	2012-08-01	SCI
21	CFGP 2.0: a versatile web-based platform for supporting comparative and evolutionary genomics of fungi and Oomycetes	Nucleic Acids Research	Jaeyoung Choi	2013-01-27	SCI
22	Indian citrus ringspot virus의 ELISA 진단 시스템 구축	식물병연구	신명주	2012-09-30	비SCI
23	우리나라 벼와 옥수수로부터 분리한 Gibberella fujikuroi 중복합체와 Fusarium commune 소속 균주의 푸모니신 생성능	식물병 연구	이수형;김지혜;윤성환	2012-12-31	비SCI

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	발표자	발표제목	발표일시	장소, 국명 출원등록일
1	Hyeok-Geun Lee, Jang-Kyun Seo, Hong-Soo Choi, Seong-Han Sohn and Kook-Hyung Kim	Identification of symptom determinants using chimeras between Tomato bushy stunt virus and Grapevine Algerian latent virus	2009-10-29	제주
2	Shree Prasad Thapa, Eun chang Kim, Duck Hwan Park, Saeyoull Cho, Jang Hyun Hur, Chun Keun Lim	Characterization of Erwinia rhapontici isolated from Asian pear by 16S rRNA and 16S-23S intergenic spacer regions and sequencing of hrpN gene	2009-10-29	제주
3	Shree Prasad Thapa, Eun chang Kim, Duck Hwan Park, Saeyoull Cho, Jang Hyun Hur, Chun Keun Lim	The pathogenicity island of Erwinia pyrifoliae WT3, Japanese Erwinia Ejp617 and its relatedness to Erwinia amylovora Pathogenicity island (PAI)	2009-10-29	제주
4	윤성환	Molecular characterization of genes involved in sexual development and pathogenesis by Fusarium graminearum	2009-10-29	제주
5	윤성환	High through-put analysis of genes involved in sexual development in Gibberella zeae	2009-10-22	서울
6	윤성환	Toward understanding the sexual development in the homothallic ascomycete Gibberella zeae	2009-05-29	제주
7	현민우, 서동연, 윤여홍, 김성환	Deloping molecular markers for the identification of blue stain fungi, the Ophiostoma piceae complex	2009-10-29	제주
8	이미경, 이송희, 이창윤, 이창원, 로현수, 이현숙	Electrophoretic Karyotype of Lyophyllum shimeji and its variation among monokaryotic progenies	2009-10-22	서울
9	이송희, 이미경, 류재산, 김민경, 이창원, 로현수, 이현숙	Electrophoretic Karyotype of Pleurotus eryngii and its variationn among monokaryotic progenies	2009-11-16	Taichung
10	곽서영, 김동규, 로현수, 이현숙	Characterization of a novel ssRNA mycovirus in Agaricus bisporus	2009-11-16	Taichung
11	박상호, 김국형	Point mutation in the N-terminal basic of the Red clover necrotic mosaic virus (RCNMV) capsid protein affects symptom expression and virion accumulation	2010-06-25	춘천
12	S.-H. Park, Tim L. Sit, Steven A. Lommel and K.-H. Kim	The N-terminal basic region of the Red clover mosaic virus capsid protein is involved in symptom development and long-distance movement in a non-virion form	2010-07-19	Montana, USA

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	발표자	발표제목	발표일시	장소, 국명 출원등록일
13	Sae Yeon Hong and Sung-Hwan Yun	Specific detection of several quarantine Fusarium species using PCR	2010-01-20	서울
14	Sae Yeon Hong, Hee-Kyoung Kim and Sung-Hwan Yun	Specific PCR detections of several quarantine Fusarium species in	2010-04-23	부산
15	Mi-Ran Kang, Sae Yeon Hong, Hee-Kyoung Kim and Sung-Hwan Yun	Specific PCR primers for detection of four quarantine Fusarium species in Korea	2010-10-28	전주
16	Jaeyoung Choi, Jongsun Park and Yong-Hwan Lee	Effects of Phenotypes on Pathogenicity with Genotypes of T-DNA Mutants in Magnaporthe oryzae	2010-01-20	천안
17	Sook-Young Park, Jongsun Park, Se-Eun Lim, Sunghyung Kong, Seryun Kim, Hee-Sool Rho, Kyoung-Young Jeong, Jae-Jin Park Myung-Hwan Chi, Soonok Kim and Yong-Hwan Lee	Phylogenomics and Expression Profiling of Transcription Factor Genes in Magnaporthe oryzae	2010-01-20	천안
18	궐aejin Park, Jeil Hong and Yong-Hwan Lee	PBS (Phenotype Based Screening) System: An Effective Strategy For Bidirectional Genetic Approach In The Rice Blast Fungus, Magnaporthe oryzae	2010-03-30	Asilomar, CA
19	Ja ej in Park, Junhyun Jeon, Sook-Young Park, Sunghyung Kong, Jongsun Park and Yong-Hwan Lee	Phylogenetic and Functional Characterization of Putative Forkhead Transcription Factors in the Rice Blast Fungus	2010-08-09	미국 샤롯데
20	Sook-Young Park, Myung-Hwan Ji, Hyojung Kim, Michael G. Milgroom, Seong-Sook Han, Seogchan Kang, and Yong-Hwan Lee	Genetic Stability of Magnaporthe oryzae Isolates during Successive Passages through Rice Plants and on Artificial Medium	2010-08-09	미국 샤롯데
21	궐unghyung Kong, Sook-Young Park, and Yong-Hwan Lee	Genomic survey and functional characterization of bZIP transcription factors in the rice blast fungus	2010-08-09	미국샤롯

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	발표자	발표제목	발표일시	장소, 국명 출원등록일
22	Sook-Young Park , Se - Eun Lim , Jongsun Park, Yang Kim, Myung-Hwan Ji, Seryun Kim, Sunghyung Kong, Jaejin Park , Kyungyong Jung, Heesool Rho , Soonok Kim , Seogchan Kang and Yong-Hwan Lee	Genome-Wide Expression Profiling of Transcription Factor Genes in Magnaporthe oryzae	2010-08-13	미국 리틀락
23	Jaejin Park , Kyoung Su Kim, Jaeduk Goh , Yeokyung Yoon and Yong-Hwan Lee	Development of Phenotype Based Screening (PBS) System for Bidirectional Genetic Approach in Magnaporthe oryzae	2010-08-13	미국 리틀락
24	Jaejin Park , Kyoung Su Kim, Jeil Hong and Yong-Hwan Lee	Effective Bidirectional Genetic Approach via Phenotype Based Screening (PBS) System in the Rice Blast Fungus	2010-10-28	전주
25	Junhyun Jeon , Ralph A. Dean , Yong-Hwan Lee	Mechanisms underlying loss of virulence through serial passage cultures in the rice blast fungus , Magnaporthe oryzae	2010-10-28	전주
26	Min Woo Hyun, Dong Yeon Suh, Yeo Hong Yun and Seong Hwan Kim	Detection of Ophiostoma piceae complex group by PCR	2010-10-28	전주
27	Shree Prasad Thapa, Chun Keun Lim, Jang Hyun Hur, and Duck Hwan Park	Development of PCR-based assay for species-specific detection of quarantine phytopathogenic bacteria in Korea	2010-04-23	부산
28	Shree Prasad Thapa, Duck Hwan Park, Jang Hyun Hur, Chun Keun Lim	Multiplex PCR assay for the detection of Pantoea stewartii subsp. stewartii using species-specific genetic markers	2010-10-28	전주
29	서동연, 현민우, 윤 여홍, 김성환	Detection of Dutch Elm Disease Fungi Ophiostoma ulmi and O. novo-ulmi by PCR	2012-01-05	천안 상록리조트
30	윤여홍, 서동연, 윤 성권, 김현주, 김성 환	Conventional PCR and real-time quantitative PCR detection of Phoma glomerata	2012-10-24	서울대학교
31	노영희	Multiplex PCR assays for the detection of Xanthomonas arboricola pv. juglandis, causal agent of walnut blight	2012-10-25	서울대학교

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	발표자	발표제목	발표일시	장소, 국명 출원등록일
32	노영희	PCR assay for the detection of <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>papulans</i> , causal agent of the apple blister spot	2012-10-25	서울대학교
33	노영희	PCR assays for the detection of <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> , causal agent of walnut blight	2012-10-01	Wageningen, Netherlands
34	최재영	Bioinformatic Portal System for fungal functional, comparative and evolutionary genomics	2012-03-05	중국 심천
35	박숙영	Genome-Wide Expression Profiling of Transcription Factor Genes Provides New Insights into Regulatory Mechanisms Underpinning Pathogenicity and Stress	2012-03-27	일본 후쿠오카
36	박재진	Functional characterization of genes encoding forkhead transcription factors in <i>Magnaporthe oryzae</i>	2012-07-30	일본 교토
37	최재영	CFGP 2.0: A Web-based, Comparative and Evolutionary Genomics Platform for Eukaryotic Genomes	2012-07-30	일본 교토
38	정경용	Laboratory Information Management System for Functional Genomics of <i>Magnaporthe oryzae</i>	2012-07-30	일본 교토
39	정현정	Functional characterization of two genes encoding Zn(II)2Cys6 transcription factors, MoCOD1 and MoCOD2 in <i>Magnaporthe oryzae</i>	2012-10-24	대한민국
40	이용환	Systems Biology Initiatives for the Rice Blast fungus	2012-07-30	일본 교토
41	이용환	A web-based bioinformatics platform for fungal genomic resources	2012-10-19	대한민국
42	이용환	The rice blast fungus: genomics and beyond.	2012-10-24	대한민국
43	김지혜; 강미란; 김희경; 이승호; 이수형; 류재기; 이테레사; 윤성환	Fumonisin-producing <i>Gibberella fujikuroi</i> species complex associated with rice and corn in Korea	2012-03-27	Fukuoka, Japan
44	김지혜; 강미란; 김희경; 이승호; 이테레사; 윤성환	Population structure of <i>Gibberella fujikuroi</i> species complex associated with rice and corn in Korea	2012-10-24	대한민국
45	정해영; 이승훈; 이테레사; 윤성환	Draft genome sequence of <i>Fusarium fujikuroi</i> B14, causal agent of bakanae disease in rice	2012-10-24	대한민국
46	홍찬영	Genome-wide functional analysis of histone acetyltransferases in the rice blast fungus, <i>Magnaporthe oryzae</i>	2012-01-05	천안 상록리조트
47	서동연, 윤여홍, 박승준, 김성환	Molecular detection of the plant pathogenic fungus <i>Botryosphaeria parva</i> by PCR	2013-01-08	천안 상록리조트
48	윤여홍, 서동연, 윤성권, 김성환	Conventional and real-time quantitative PCR detection of the plant pathogenic fungus <i>Phomopsis sclerotioides</i>	2013-01-05	천안 상록리조트

국내 및 국제 학술회의 발표								
번호	발표자	발표제목	발표일시	장소, 국명 출원등록일				
49	안지혜	Development of PCR assays to detect causal agent of oats halo blight, Pseudomonas coronafaciens	2012-10-25	서울대학교				
홍보실적(신문, 방송, 저널 등)								
번호	홍보유형	매체명	제목 산업재산권 종류	일시				
전시회 등 참여(전시회, 박람회, 제품설명회 등)								
번호	유형	행사명칭	전시품목	장소	활용년도			
기타 활용 및 홍보실적(단행본 발간, CD 제작 등)								
번호	일자	활용명칭 활용내역	활용내역 출원등록일					
연구인력 활용/양성 성과								
번호	인력양성명		인력양성년도 인력양성년도	인력양성 대상수 출원등록일				
1	이송희		2009	1				
2	곽서영		2009	1				
3	서동연		2009	1				
4	김명호		2009	1				
5	손문일		2009	1				
6	박상호		2012	1				
7	송다미		2012	1				
8	김나리		2012	1				
9	신명주		2012	1				
10	정현정		2012	1				
11	홍찬영		2013	1				
12	김지혜		2012	1				
13	안지혜		2013	1				
14	노영희		2013	1				
15	송민지		2012	1				
16	김용언		2013	1				
국제화 협력성과								
번호	유치기간	국적	학위	전공	파견기간	파견국	학위	전공

기타 홍보실적(수상실적)			
번호	일자	홍보명칭 구분	주요내용 출원등록일
1	2012-10-26	한국식물병리학회 우수포스터 상	Recognition of excellence KSPP-2012 poster competition
2	2012-10-25	한국식물병리학회 학술상	오랫동안 국내외 식물병 연구분야에서 훌륭한 업적을 이룩하여 한국식물병리학 발전에 크게 기여하여 그 공적을 격려함

2. 관련분야의 기술발전예의 기여도

- 검역정보 관리 시스템(QIMS)의 개발 목표는 검역중 동정 과정에 발생하는 PCR, ELISA, sequencing 등의 실험적 동정 기반자료를 축적 및 관리하며, 유전체 정보를 활용하여 종 동정에 도움을 줄 수 있는 시스템을 구축하는 것이다. QIMS는 각 실험 항목별로 저장 및 관리할 수 있는 웹기반의 인터페이스를 구축하였으며, 내부적으로 개발되는 분자 표지 정보를 축적하여 분석대상 시료로부터 분리한 염기서열과의 비교 분석을 위한 생물정보학 프로그램들도 도입하였다. 뿐만 아니라 다수의 유전체 정보를 담고 있는 데이터베이스에서 검색할 수 있도록 하여, 실험적 동정의 근거가 약한 경우에 근연종에 관한 단서를 찾거나 동정의 근거로 활용할 수 있도록 개발하였다. 따라서 QIMS는 당초 목표에 부합하는 시스템으로 개발 완료되었으며, 지속적인 자료 갱신이 이루어진다면 그 사용성이 크게 높아질 것으로 기대된다.
- 현재까지 수입식물 시료에 오염되어 있는 곰팡이 병원체의 동정은 육안 및 현미경 검경에 거의 의존하였기 때문에 본 과제에서 개발한 특이 프라이머 이용 PCR 검출을 검역현장에 적용할 경우, 곰팡이 병원체의 신속하고 정확한 동정에 큰 기여를 할 수 있을 것이다. 또한 본 과제에서 개발한 모든 특이 프라이머는 염기서열에서 신규성을 갖고 있기 때문에 PCR에 의한 곰팡이 종 동정 분야의 기초와 실용적인 측면에서 기여할 것으로 기대한다. 한편, 본 과제에서 개발한 특이 프라이머의 현장적용성 향상 및 상품화 연구가 진행될 경우, 병원체의 분자진단 분야에도 기여할 것으로 기대한다.
- 본 연구과제의 당초목표가 5종의 대상세균에 대한 검출을 개발하고자 하였는데 지금까지 2종에 대해서는 당초 목표하지 않은 Taqman PCR법까지 완성하였고, 2종에 대해서는 대상세균에 대한 부분적인 특이성 프라이머를 찾는 데 까지 연구가 이루어졌다. 당초 예상한 바대로 *P. syringae*의 pathovar 수준에서 특이적 프라이머를 찾는 것이 매우 어렵고 많은 시간이 소요되며, 특히 2종의 세균의 경우 대표균주 간의 차이가 커서 이 2그룹의 분류에 문제가 있는 결과가 나오기도 하였다. 이러한 점을 감안하면 본 연구 목표는 완수되었다고 판단되며, 2종의 대상세균에 대한 검출법은 앞으로 더 많은 연구가 요구된다.
- 본 연구를 통해 얻은 대상세균의 draft genome sequence는 모두 세계 최초이며, 그 2종에 대한 sequence는 gene bank에 deposit되어 전 세계적으로 이들 세균을 연구하는 연구자에게 많은 도움을 줄 것으로 판단된다. 또한 본 연구를 통해 얻은 PCR 프라이머 및 PCR법은 앞으로 논문으로 발표되어 식물검역 및 진단, 그리고 분류 분야에 크게 기여할 것으로 판단된다.
- 식물바이러스 검역용 ELISA kit 10종 개발이 목표였으나 합성할 수 있었던 5종의 바이러스 진단용 ELISA kit 외에 바이러스 5종은 coat protein gene expression이 *E. coli*에서 되지 않아 항원을 얻을 수 없어 ELISA kit 개발이 불가능하였다. 따라서 coat protein gene expression이 *E. coli*에서 되지 않는 바이러스 들은 그 유전체 sequence를 이용한 특이 primer를 개발하여 PCR 방법으로 바이러스를 진단할 수 있도록 하였다. 현재 우리나라에 보고되지 않은 바이러스들을 대상으로 실험을 진행하였기 때문에 반드시 필요한 현장적용 실험을 수행하지 못하였으며, 이 실험을 수행하기 위해서는 식물검역원의 협조가 필요한 상황이다. 현장적용 실험이 완료된 ELISA kit는 기산 및 바이원 등 ELISA kit 판매회사를 통해 보급이 가능하다(본 실험실에서 개발한 버섯 바이러스 진단용 ELISA kit를 이들 회사를 통하여 보급한 전례가 있음).

제 5 장 개발 성과 및 성과활용 계획

제 1절

실용화·산업화 및 교육지도 계획

- 검역 과정에서 생산되는 실험적 동정 자료의 저장 및 관리가 가능한 시스템을 구축하였고, 유전체 정보에 기반한 동정 방법 및 체계를 갖추게 되었다. 병원균, 식물병, 기주 정보는 지속적으로 추가 및 갱신되어야 하며, 유전체 정보를 기반으로 하는 검역종 동정의 정확성을 확보하기 위해서는 검색 대상 데이터베이스의 업데이트가 필요할 것이다.
- 연구 개발된 특이 프라이머의 검역현장 사용을 위한 프로토콜의 최적화 및 키트 개발
- 본 과제의 연구결과를 이용하여 개발 가능한 검역곰팡이 병원체 검출용 분자진단기술은 식물병원성 곰팡이의 검출 및 관련 식물병 진단키트 개발에 직접 응용 가능함. 또한 식물병원균의 식품유해 곰팡이 (예: 곰팡이 독소 생성균), 인축 병원성 곰팡이, 산업적 유용 곰팡이 (예: 항생물질 생산 균주) 의 검출·탐색 등에도 응용 가능함.
- 개발 가능 제품
 - 특이 프라이머 조합을 이용한 각종 곰팡이의 검출 키트
 - oligonucleotide probe 를 이용한 고감도 곰팡이 진단 용 DNA chip
- 제품 활용 대상
 - 식물 재배, 유통, 검역 현장
 - 농산물 원재료 및 식품의 생산 및 안전관리 현장
 - 국가/민간 연구기관, 병원 등
- 국내 및 국외시장 분석결과 식물병원성 곰팡이에 의한 식물병 진단용 키트제품의 일부 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 현재 국내외 유통되는 제품의 대부분은 주로 바이러스나 세균 병원체를 대상으로 하는 면역/혈청학적 키트이며, 특이 프라이머나 DNA probe 를 이용한 분자진단 제품의 시장은 국내외 모두 성숙되어 있지 않음. 따라서 본 연구과제에서 개발될 기술을 응용하여 산업화에 성공하면 해당 제품이 국내외 시장을 선도할 수 있을 것으로 기대됨.
- 본 과제의 연구결과들의 검역 현장 적용 및 활용을 위해 농림축산 검역본부의 식물 진균, 세균 및 바이러스들을 검역하는 검역관들을 대상으로 단기 워크숍을 진행하였으며, 추후 요청 시 각 세부과제 책임자들이 검역관들을 대상으로 추가적인 워크숍을 진행하기로 하였고 이는 개발된 기술들이 검역 현장에서 바로 활용 건 수 제고에 크게 기여할 것임.
- 위와 같은 실용화를 위하여 향후 농림축산검역본부와 지속적인 협의, 현장교육 프로그램 개발/운영, 진단키트 개발업체와의 공동연구 필요
- 우리나라 및 외국의 검역소에서는 바이러스 검출에 바이러스에 대한 항체를 이용한 ELISA 방법과 바이러스 유전체 특이 primer를 이용한 PCR방법으로 바이러스를 검출하고 있다. 본 연구에서 합성한 바이러스에 대한 항체 및 바이러스 특이 primer는 field test가 검역현장에서 완료되면 ELISA kit를 회사에 납품할 수 있을 것이다. 본 연구팀은 타 바이러스의 항체를 이용한 ELISA kit를 kit 판매회사에 납품한 경험이 있다.

- 검역 병원체에 대한 검역과정 간소화 및 효율적인 검증시스템 개발로 검사신뢰도 확보
- 수출입 농가의 검역관련 애로사항 해결
- 수출 농산물의 안정성 확대
- 국내 식물검역 기술력 향상
- 활용의 편의성 증대
- 국내 농업 및 임업 생태계 보호

제 2 절

특허, 논문 추가 확보 계획

- 향후 진행되는 후속 연구 개발을 통해 특허출원과 논문 발표
- 대상세균 5종 대표균주의 draft genome sequence를 확보하여 그 중 2종의 draft genome sequence를 gene bank(NCBI)에 deposit하였음. 대상세균 2종에 대한 PCR용 프라이머, PCR법, Taqman PCR법에 대한 국내특허 출원하였음. 연구결과에 대한 논문게재 및 추가 특허출원 예정임.

제 3 절

추가연구, 타연구에 활용 계획

- 본 과제에서 수행한 *Fusarium* 속 계통발생학 연구를 통해 확정된 각 분류군별 주요 authentic 종의 유전체 해독 연구 가능. 또한 현재 타과제에서 수행 중인 *Fusarium* 곰팡이 종의 유전체 해독과 연계하여 추가적인 *Fusarium* 특이 프라이머 개발 가능
- 특이 프라이머를 이용한 곰팡이 병원체 PCR 검출용 키트 개발 연구 가능
- 본 과제 결과는 추가적인 곰팡이 종 특이 프라이머의 개발 외 oligonucleotide microarray (DNA chip)를 이용한 병원체 진단에 충분히 활용 가능함.
- 본 연구에서 바이러스 표피 단백질의 종류에 따라 mouse나 토끼에서 항체 형성을 잘하는 것과 항체형성이 잘되지 않는 것들이 있다. 이는 타 단백질에서도 나타나는 현상으로 그 원인은 여러 가설이 있으나 정확히 알려진 바는 없다. 항체 형성이 약한 바이러스는 그 유전체 정보를 이용한 RT-PCR방법으로 바이러스를 검출 할 수 있다.
- 본 연구의 가장 큰 애로점은 대상 바이러스 병이 우리나라에 없어 특히 ELISA kit 적정실험에 필요한 이병 식물의 조직을 얻을 수 없다는 것이다. 식물 검역현장과 긴밀한 협조로 본 연구팀이 검역현장에 상주하면서 ELISA kit 합성 표준모델을 만들어야 한다. 아쉽게도 지금까지 식물검역 팀과 일정조절이 잘되지 않아 시판 가능한 ELISA kit는 완성되지 않았으나 식물검역소의 현장팀과 현장에서 적용 가능한 kit로 조정한다면 이 kit의 상품화 및 특허등록은 문제가 없을 것으로 생각한다. 위와 같은 이유로 국제학회지 투고도 미루어지고 있다.

제 4 절

기타 기대 효과

- 검역대상 병원체 목록의 개정
- 곰팡이 병원체에 대한 검역과정 간소화
- 검역 곰팡이 병원체의 발견을 증진

- 해외 유입 곰팡이 병원체에 의한 병 발생 피해와 방제비용 최소화
- 수출 농산물의 안전성 확대에 따른 수출비용 감소
- 국내 식물검역 기술력 향상을 통한 국가경쟁력 증진
- 바이러스 저항성 품종개발 시 개발한 많은 clone을 동시에 바이러스 저항성 검정을 할 수 있다.
- 본 연구에서 항체합성에 사용한 방법은 다른 식물바이러스의 항체합성 시에 사용할 수 있다.

제 6 장 개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절

본 연구과정에서 알게 된 이태리의 Dr. Marco Scotichini는 *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*가 일으키는 walnut blight의 전문가로서 유전적 배경이 다른 *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* 다양한 균주를 제공했으며, 연구결과에 대한 많은 조언을 얻을 수 있었다.

제 2 절

최신 수목병원 진균 진단 기술 개발 동향

캐나다 브리티시컬럼비아 대학교 산림과학대학 교수이자 Natural Resources Canada (NRCan)의 연구원인 Richard Hamelin 박사 연구팀은 산림에 피해를 주는 수목병원균을 좀 더 빠르고 믿을 만한 진단기술을 개발하고자 캐나가 정부로부터 \$4.25 million (한화 47억6천만원)을 지원 받아 유전체 분석에 기반한 Bio-chip 개발 연구를 수행하고 있다. The TAIGA (Tree Aggressors Identification using Genomic Approaches) project로 불리는 본 연구는 40종의 주요 수목병원 진균을 대상으로 genome sequencing 을 수행한 후 전체적인 유전체 정보 pipe-line을 구축하고 서로 다른 유전자 부위와 염기 서열을 파악한 뒤 중간 혹은 race 까지 구별을 할 수 있는 분자마커의 개발은 물론 북미 지역의 특정 병원균이 기주의 유형에 따른 분포를 분석하여 on-site 변이 그룹을 파악하는 monitoring method 개발도 하고 있다.

현재 캐나다 서부의 대면적에 걸쳐 커다란 경제적, 환경적 피해를 주고 있는 mountain pine beetle이 전반시키고 있는 Ophiostoma와 Grosmannia 균류에 대한 genome sequencing을 완료하고 여러 지역간 이들 균류가 유전적으로 어떻게 매개충의 대발생 주기에 맞추어 분포하고 있는지 그 패턴을 분석하고 있다. 이는 계속확산 되는 피해를 대비해서 병원균의 침해력이 어떻게 서로 다른 나무수종에 까지 퍼져 가는지 mapping을 수행하고 기후변화와 연계해서 그 분석을 수행하고 있다.



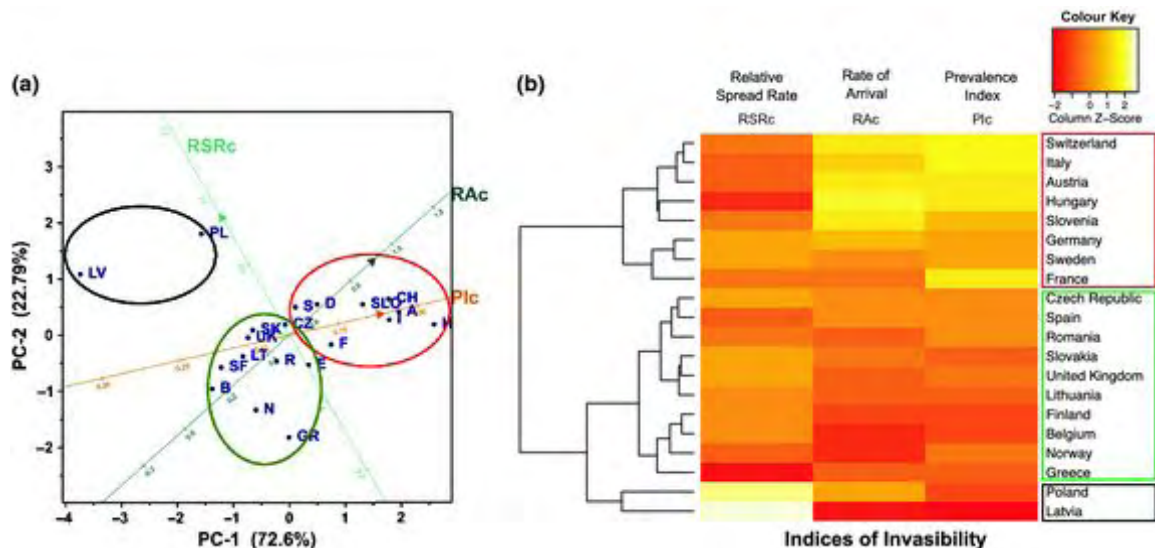
<그림> 캐나다 비씨주 대단위 면적에 발생한 mountain pine beetle 과 공생 진균에 의한 소나무 피해 모습의 예. 적색은 죽어가는 나무임.

제 3 절

유럽의 침입력이 강한 수목병원 진균 최신 연구 동향

최근 유럽에서는 침입력이 강한 수목병원균(invasive forest pathogens, IFPs)에 대한 방대한 자료를 기반한 데이터베이스를 마련하여 유럽에서 이들 병원진균의 침입과 병원성 결정 요인을 조사하였다. 침입력 강한 병원균에 대한 자세한 분류학적, 생물학적 정보와 토지의 이용정보, 기후정보, 병원균이 침입하는 시점에 대한 정보와 합쳐서 침입력 결정 요소를 파악하였고 침입에 민감하도록 작용하는데 연계되는 지형적, 기후적 요소를 지닌 환경에 대한 세분된 분류를 수행하였다. 분석에 따르면 지난 40년간 침입력이 강한 수목병원균은 기하급수적으로 증가했고 1919년까지 이미 침입력이 강한 수목병원균은 존재하였으며 유럽에 걸쳐서 이동하였다. 그 후 북미와 최근 아시아로부터 새로운 침입력이 강한 수목병원균이 도입되었고 하이브리드형 벼우너균도 출현하였다. 보다 넓은 환경범위를 지니고 있거나 사람들의 영향력이 크거나 또는 국제적 무역이 큰 나라일수록 더 많은 침입력이 강한 수목병원균이 유입되었다. 강수량은 침입력이 강한 수목병원균 확산율에 영향을 미쳤다. 이전이나 새로이 변화한 환경조건과 생태적 속성이 침입력에 영향을 주는 것으로 분석되었다.

지난 과거동안 상업적으로 고립되어져 있던 지역의 경우 상업화 되거나 교류가 증대하면 침입력이 강한 수목병원균의 새로운 확산이 예견된다. 다양한 환경을 지니면서 인구밀도가 높은 나라의 경우 병원균의 새로운 도착을 방지하려는 노력을 기울이는데 매우 소극적 일수 있다. 새로운 침입에 대한 나라간의 긴밀한 협력이 필요하다. 침입력이 강한 수목병원균은 한번 도입되면 제거는 사실상 불가능하여 보이므로 비록 지구촌의 이동을 고려할 때 어려울지 모르지만 사전에 방지가 유일하게 신뢰할 만한 수단으로 결론하고 있다.



<그림> 유럽나라별 침입력 강한 병원진균의 상대적 확산률, 도착(유입)율, 퍼진 정도를 분석 비교한 결과. 색으로 네모친 부분을 보면 유형이 비슷한 나라 간에 그룹을 이루고 있다.

제 4 절

응용된 PCR 방법의 확대

기존의 PCR 방법이 아닌 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 방법을 이용하여 병원 균주를 검출하는 방법이 연구 되고 있다. 이 방법은 strand displacement activity가 높은 *Bst polymerase*를 이용함으로써 4개의 프라이머에 의해 이루어진다. 먼저 내부 프라이머가 DNA에 결합하여 신장되고, 이어 그 바깥쪽으로 외부 프라이머가 결합되어 신장되면서 strand displacement가 발생하며 먼저 형성된 가닥은 떨어져 나오게 된다. 떨어져 나온 단일 가닥의 5'-말단에서부터 loop 구조가 형성되며 이는 3'-말단에서도 같은 과정이 반복되고 loop 구조가 신장되게 된다. LAMP를 수행하기 위해서는 증폭시킬 유전자의 6개의 위치를 인식하도록 특별히 고안된 4개의 프라이머를 사용하게 된다 (Blomstrom et al., 2008, Tsugunori et al., 2000, Zhang et al., 2009). 이는 일반 PCR이 2개의 위치를 인식하는 것과 비교했을 때, LAMP는 target DNA에 대한 특이성이 매우 높아짐을 의미한다. LAMP의 가장 큰 특징은 등온에서 유전자의 증폭이 이루어진다는 점으로, 온도의 구배가 필요한 PCR에 비해서 등온 조건은 몇 가지 이점을 가지고 있다. 먼저 온도 조절이 필요 없기 때문에 상대적으로 반응 시간이 짧아진다. 따라서 좀 더 빠른 시간 내에 유전자 증폭을 가능하게 한다. LAMP를 이용한다면 전기영동 시간을 제외하고 한 시간 내에 유전자 증폭이 가능함을 기존 여러 논문에서 이미 보고되었다 (Ohori et al., 2006, Xu et al., 2009). 더구나 온도 변화에 따른 DNA 손실 및 손상이 없기 때문에 증폭 효율이 매우 높다. 또한 등온 조건에서의 증폭은 LAMP가 다른 검출 방법들과 달리 현장성을 가질 수 있다는 근거가 된다. 일정한 온도만 유지하면 되기 때문에 고가의 장비가 필요 없이 항온수조 등 간단한 장비만을 가지고도 반응이 가능하다. 따라서 LAMP를 이용한다면 굳이 실험실 내에서의 환경이 아니더라도 현장에서 특정 유전자의 검출이 가능해진다.

개발기술명		식물바이러스진단	
Keyword		plant virus detection	
검색건수		919	
유효논문건수		12	
핵심논문 및 관련성	논문명	Genome characterization and genetic diversity of beet curly top Iran virus: a geminivirus with a novel nonanucleotide	Identification of regions of the Beet mild curly top virus capsid protein involved in systemic infection, virion formation and leafhopper transmission
	학술지명	Virus Genes	Virology
	저자	H. R. Bolok Yazdi, J. Heydarnejad, H. Massumi	Maria J. Soto ¹ , Li-Fang Chen, Young-Su Seo, Robert L. Gilbertson
	게재년도	2008	2005
	관련성(%)	70	70
핵심논문 및 관련성	논문명	Purification and properties of blackberry chlorotic ringspot, a new virus species in subgroup 1 of the genus Harvirus found naturally infecting blackberry in the UK	Complete nucleotide sequence of chili leaf curl virus and its associated satellites naturally infecting potato in Pakistan
	학술지명	Annals of Applied Biology	Arch Virol

개발기술명		식물바이러스진단	
	저 자	A.T. Jones, W.J. McGavin, V. Gepp, M.T. Zimmerman, S.W. Scott	M. Mubin, R. W. Briddon, S. Mansoor
	게재년도	2006	2007
	관련성(%)	70	50
핵심논문 및 관련성	논문명	Genetic diversity of a natural population of Cucurbit yellow tunting disorder virus	The Enigma of Double-stranded RNA (dsRNA) Associated with Mushroom Virus X (MVX)
	학술지명	Journal of General Virology	Curr. Issues Mol. Biol.
	저 자	C. F. Marco and M. A. Aranda	Juluri R. Rao, David W. A. Nelson, and Stephen McClean
	게재년도	2005	2005
	관련성(%)	70	70
핵심논문 및 관련성	논문명	Analysis of the RNA of Potato yellow vein virus: evidence for a tripartite genome and conserved 3'-terminal structures among members of the genus Crinivirus	Nucleotide sequence, genome organization and phylogenetic analysis of Strawberry pallidosis associated virus, a new member of the genus <i>Crinivirus</i>
	학술지명	Journal of General Virology	Arch Virol
	저 자	I. C. Livieratos, E. Eliasco, G. Muller, R. C. L. Olsthoorn, L. F. Salazar, C. W. A. Pleij and R. H. A. Coutts	I. E. Tzanetakis, J. Reed, and R. R. Martin
	게재년도	2004	2005
	관련성(%)	70	70
핵심논문 및 관련성	논문명	Isolation and characterization of a novel mycovirus, PeSV, in <i>Pleurotus eryngii</i> and the diagnostic system for it.	Isolation of a novel mycovirus OMTV in <i>Pleurotus ostreatus</i> and its detection using a triple antibody sandwich-ELISA.
	학술지명	Biotechnol. Lett.	J. Virol. Methods
	저 자	H. S. Ro, E. J. Kang, J. S. Yu, T. S. Lee, C. W. Lee, H. S. Lee	H. S. Ro, N. J. Lee, C. W. Lee, and H. S. Lee
	게재년도	2007	2006
	관련성(%)	70	70
핵심논문 및 관련성	논문명	An application of protein microarray in the screening of monoclonal antibodies against a mushroom virus OMSV	Detection of the mycovirus OMSV in the edible mushroom, <i>Pleurotus ostreatus</i> , using an SPR biosensor chip
	학술지명	Anal. Biochem.	J. Virol. Methods
	저 자	SW Kim, MG Kim, HA Jung, KH Lee, HS Lee, HS Ro	SW Kim, MG Kim, Jinju Kim, HS Lee, HS Ro
	게재년도	2007	2008
	관련성(%)	70	70

제 7 장 개발시설·장비 현황

검역정보 관리 시스템은 기 구축 되어있는 3계층 시스템(three-tiered system) 기반에서 구축되었다. 웹서버 및 데이터베이스 서버가 분리되어 있으며, 사용자 인터페이스가 두 서버간의 통신을 매개하는 형식의 철저히 분업화 된 시스템으로 개발되었다. 개발 및 서비스 서버는 본 연구 그룹에서 구축해 놓은 시스템 환경을 사용하였고, 이는 유전체 정보의 용이한 활용과 본 시스템 개발의 효율성을 추구하기 위함이다. 본 연구를 통하여 개발된 검역정보 관리 시스템의 웹서버 및 데이터베이스는 연구개발 초기부터 농림축산 검역본부와 협의를 통해 세부과제 연구 책임자(서울대학교 이용환교수)의 연구실에 기 설치된 컴퓨터 장비를 이용하여 진행하기로 협의되었으며, 추후 농림축산 검역본부의 이관 요청 시 개발된 웹서버와 데이터베이스를 이관할 예정이다.

제 8 장 참고문헌

- 관세청, 품목별 수출입통계. 2011. <http://www.customs.go.kr>.
- 농림수산물검역검사본부(QIA. Animal, Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency). 식물방역법 시행규칙 제 4조. 2012. <http://www.qia.go.kr/>
- 농촌진흥청, 농촌진흥소식. 2012. <http://www.rda.go.kr>.
- 이용주, 강미형, 노태환, 이두구, 이건희, 김시주. 2009. 콩 종자에서 *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*의 검출을 위한 Direct PCR방법 개발. 식물병연구 15: 83-87.
- 이금희, 국내 수입식물 현황 및 바이러스 검역., 국립식물검역소
- 조정희, 정민정, 송민지, 임규옥, 이혁인, 김정희, 백지현, 차재순. 2010. 강남콩 종자에서 *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*의 검출을 위한 PCR 프라이머의 개발. 식물병연구, 16: 129-135.
- 홍성준, 홍연규, 이봉춘, 임미정, 윤영남, 황재복, 송석보, 박성태. 2007. PCR assay 이용 콩 종자에서 *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* 검출 및 종자오염 조사. 식물병연구 13: 145-151.
- Aguilar,J.M., Franco,M., Marco,C.F., Berdiales,B., Rodriguez-Cerezo,E., Truniger,V. and Aranda,M.A., Further variability within the genus *Crinivirus*, as revealed by determination of the complete RNA genome sequence of Cucurbit yellow stunting disorder virus., *J. Gen. Virol.* 84 (PT 9), 2555-2564 (2003)
- Al-Sallami, F., Karov, S. P., Vassileva, P., Popova, R., and Vassilev, V. 1997. *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* Associated with Fungal Black Point of Wheat (*Triticum aestivum*) Grain, *Dev. Plant Pathology* 9: 505-509.
- Barta, T. M., and Willis, D. K. 2005. Biological molecular evidence that *Pseudomonas syringae* pathovars *coronafaciens*, *striaefaciens* and *garcae* are likely the same pathovar. *Journal of Phytopathology* 153: 492-499.
- Barzic, M. R. and Eric, G. 1996. Structure and activity of persicomycins, toxins produced by a *Pseudomonas syringae* pv. *persicae*/Prunus *persica* isolate. *European Journal of Biochemistry* 239: 702-709.
- Bazzi, C., and Calzolari, A. 1983. Bacterial blister spot of 'Mutsu' apples in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 22: 19-21.
- Bazzi, C., Stead, D. E., Alexandrova, M., and Stefani, E. 1997. Identification and Classification of Fluorescent *Pseudomonas* Species from Cereals in Italy. *Plant Pathology* 9: 509-514.
- Belisario, A. Ralangio, C., and Zoina, A. 1997. Suscettibilità e fattori predisponenti a *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* in vivaio di noce comune. *Informatore Fitopatologico* 4: 60-64.
- Bella, P., Licciardello, G., Tessitori, M., and Catara, V. 2008. A real-time PCR quantitative detection assay for *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* in *Nerium oleander*. *Phytopathologia Mediterranea* 47: 204-213.
- Bender, C. L. 1999. Chlorosis-inducing phytotoxins produce by *Pseudomonas syringae*. *European Journal of Plant Pathology* 105: 1-12.
- Bezuidenhout, C.C., Prinsloo, M., and Van der Walt, A.M. (2006). Multiplex PCR-based detection of potential fumonisin-producing *Fusarium* in traditional African vegetables. *Environ. Toxicol.* 21, 360-366.
- Blomstrom AL, Hakhverdyan M, Reid SM, Dukes JP, King DP, Belak S, and Berg M. 2008. A one-step reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification assay for simple and rapid detection of swine vesicular disease virus. *J. Virol. Methods* 147, 188-193.

- Bonn, W. G., and Bedford, K. E. 1986. Midvein necrosis of Mutsu apple caused by *Pseudomonas syringae* pv. *papulans*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 8: 167-169.
- Boudon, S., Manceau, C., and Nottoghem, J. L. 2005. Structure and origin of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* populations causing bacterial spot of stone fruit trees in Western Europe. *Phytopathology* 95: 1081-1088.
- Bradbury, J. F. 1986. *Guide to Plant Pathogenic Bacteria* Kew. CAB International Mycological Institute.
- Buell, C. R., Joardar, V., Lindeberg, M., Selengut, J., Paulsen, I. T., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Deboy, R. T., Durkin, A. S., Kolonay, J. F., Madupu, R., Daugherty, S., Brinkac, L., Beanan, M. J., Haft, D. H., Nelson, W. C., Davidsen, T., Zafar, N., Zhou, L., Liu, J., Yuan, Q., Khouri, H., Fedorova, N., Tran, B., Russell, D., Berry, K., Utterback, T., Van Aken, S. E., Feldblyum, T. V., D'Ascenzo, M., Deng, W., Ramos, A. R., Alfano, J. R., Cartinhour, S., Chatterjee, A. K., Delaney, T. P., Lazarowitz, S. G., Martin, G. B., Schneider, D. J., Tang, X., Bender, C. L., White, O., Fraser, C. M., and Collmer A. 2003. The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 10181-10186.
- Burmeister, H.R., and Vesonder, R.F. (1990). Production of a novel steroid sulfate metabolite [4,4,24-trimethylcholesta-8,14,24(28)-trien-2 alpha,3 beta,11 alpha,12 beta-tetrol 12-acetate, 3-sulfate] by *Fusarium* species and its biological activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3209-3212.
- Burr, T. J. 1982. Blister spot of Apples. *New York food and Life Sciences Bulletin*. No. 95.
- Burr, T. J., and Hurwitz, B. 1979. The etiology of blister spot of 'Mutsu' apple in New York State. *Plant Disease* 63: 157-160.
- Burr, T. J., and Hurwitz, B. 1981. Seasonal susceptibility of Mutsu apples to *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* (Rose) Dhanvantari. *Plant Disease* 65: 334-336.
- Burr, T. J., and Katz, B. 1982. Evaluation of a selective medium for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* and *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in apple orchards. *Phytopathology* 72: 564-567.
- Burr, T. J., and Katz, B. 1984. Overwintering and distribution pattern of *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* in apple buds. *Plant Disease* 68: 383-385.
- Choi, J., Cheong, K., Jung, K., Jeon, J., Lee, G.W., Kang, S., Kim, S., Lee, Y.W., and Lee, Y.H. (2013). CFGP 2.0: a versatile web-based platform for supporting comparative and evolutionary genomics of fungi and Oomycetes. *Nucleic acids research* 41, D714-719.
- Collins, D. J. 2010. *Oat Diseases in Alabama*. Alabama Cooperative Extension System.
- Cuppels, D. A., Moore, R. A., and Morris, V. L. 1990. Construction and use of a nonradioactive DNA hybridization probe for detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato plants. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 1743-1749.
- Czosnek H, Eybishtz A, Sade D, Gorovits R, Sobol I, Bejarano E, Rosas-Díaz T, Lozano-Durán R., Discovering Host Genes Involved in the Infection by the Tomato Yellow Leaf Curl Virus Complex and in the Establishment of Resistance to the Virus Using Tobacco Rattle Virus-based Post Transcriptional Gene Silencing., *Viruses*. 2013 Mar 22;5(2):998-1022
- de Sá, P.B., Havens, W.M., and Ghabrial, S.A. (2010). Characterization of a novel broad-spectrum antifungal protein from virus-infected *Helminthosporium* (*Cochliobolus*) *victoriae*. *Phytopathology*

100, 880–889.

- Dhanvantari, B. N. 1969. Bacterial blister spot of apple in Ontario. *Canadian Plant Disease Survey* 49(2): 36–37.
- Dhanvantari, B. N. 1977. A taxonomic study of *Pseudomonas papulans* Rose 1917. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 20: 557–561.
- Ellis, M. A., and Madden, L. V. 2000. Effectiveness of fosetyl–aluminum and streptomycin alone and in combination for control of blister spot on 'Mutsu' apples in Ohio and New York. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2000-1204-01-RS.
- Emmanuelle Brière. 2102. A New DNA-Based Tool to Detect and Monitor Forest Pests. <http://www.nrcan.gc.ca/node/6309>.
- EPPO, Global database, Distribution Map. European and Mediterranean Plant Protection Organization. <http://www.eppo.org/>
- Fanelli, V., Cariddi, C., and Finetti-Sialer, M. 2007. Selective detection of *Pseudomonas syringae* pv. tomato using dot blot hybridization and real-time PCR. *Plant Pathology* 56: 683–691.
- Farrer, R. A., Kemen, E., Jones, J. D. G., and Studholme, D. J. 2009. De novo assembly of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a genome using Illumina/Solexa short sequence reads. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 291: 103–111.
- Ferraris, T. 1927. *Trattato di patologia e terapia vegetale*. Vol. II (pp. 1019–20) Hoepli, Milano.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2004. Oat diseases and their control. FAO Plant Production and Protection Series, FAO cooperate document repository.
- FAOSTAT. Crops Production Quantity 2010. <http://faostat.fao.org/>
- Finetti-Sialer, M. M., and Ciancio, A. 2005. Isolate-specific detection of Grapevine fan-leaf virus from *Xiphinema index* through DNA-based molecular probes. *Phytopathology* 95: 262–268.
- Gardan, L., Shafik, H., Belouin, S., Brosch, R., Grimont, F., and Grimont, P. A. D. 1999. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremiae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex. Sutic and Dowson 1959). *International Journal of Systematic Bacteriology* 49: 469–478.
- Gervasi, F., and Scortichini, M. 2009. Detection of *Pseudomonas avellanae* from hazelnut twigs by TaqMan real-time PCR. *Journal of Plant Pathology* 91(3): 573–578.
- Gil-Salas FM, Morris J, Colyer A, Budge G, Boonham N, Cuadrado IM, Janssen D., Development of real-time RT-PCR assays for the detection of Cucumber vein yellowing virus (CVYV) and Cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV) in the whitefly vector *Bemisia tabaci*., *J Virol Methods*. 2007 Dec;146(1-2):45–51.
- Ginzinger, D. G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR : An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology* 30: 503–512.
- Granett, J., Walker, M.A., Kocsis, L., and Omer, A.D. (2001). Biology and management of grape phylloxera. *Annual review of entomology* 46, 387–412.
- Farber, J.M., and Sanders, G.W. (1986). Fusarin C production by North American isolates of *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol* 51., 381–384.
- Hajri, A., Meyer, D., Delort, F., Guillaumès, J., Brin, C., and Manceau, C. 2010. Identification of a genetic lineage within *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* as the causal agent of vertical oozing canker of Persian (English) walnut in France. *Plant Pathology* 59: 1014–1022.
- Harder, D. E., and Haber, S. 1992. Oat diseases and pathologic techniques. *Oat science and*

- technology - Agronomy Monograph, ASA - CSSA, USA, 33:307-402.
- Hibino H., Biology and epidemiology of rice viruses., *Annu Rev Phytopathol.* 1996;34:249-74.
- Hirano, Y., and Arie, T. (2006). PCR-based differentiation of *Fusarium oxysporum* ff. sp. *lycopersici* and *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *J Gen Plant Pathol* 72, 273-283.
- Jacobs K, Bergdahl DR, Wingfield MJ, Halk S, Seifert KA, Bright DE, Wingfield BD. 2004. *Leptographium wingfieldii* introduced into North America and found associated with exotic *Tomicus piniperda* and native bark beetles. *Mycological Research* 108: 411-418.
- Janse, J. D. 2010. Diagnostic methods for phytopathogenic bacteria of stone fruits and nuts in COST 873. *EPPO Bull.* 40: 68-85.
- Jelkmann W, Fechtner B, Agranovsky AA., Complete genome structure and phylogenetic analysis of little cherry virus, a mealybug-transmissible closterovirus., *J Gen Virol.* 1997 Aug;78 (Pt 8):2067-71.
- Jenkinson, P., and Parry, D.W. (1994). Splash dispersal of conidia of *Fusarium culmorum* and *Fusarium avenaceum*. *Mycol Res* 98, 506-510.
- Jeong, H., Lee, S., Choi, G.J., Lee, T., and Yun, S.H. (2013). Draft genome sequence of *Fusarium fujikuroi* B14, the causal agent of the bakanae disease of rice. *Genome announcements* 1.
- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezuk, Y., McGinnis, S., and Madden, T.L. (2008). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic acids research* 36, W5-9.
- Jones, A. L. 1971. Bacterial canker of sweet cherry in Michigan. *Plant Disease* 55: 961-965.
- Jung, K., Park, J., Choi, J., Park, B., Kim, S., Ahn, K., Choi, D., Kang, S., and Lee, Y.H. (2008). SNUGB: a versatile genome browser supporting comparative and functional fungal genomics. *BMC genomics* 9, 586.
- Jurado, M., Marin, P., Callejas, C., Moretti, A., Vazquez, C., and Gonzalez-Jaen, M.T. (2010). Genetic variability and Fumonisin production by *Fusarium proliferatum*. *Food Microbiol.* 27, 50-57.
- Jurjevic, Z., Wilson, D.M., Wilson, J.P., Geiser, D.M., Juba, J.H., Mubatanhema, W., Widstrom, N.W., and Rains, G.C. (2005). *Fusarium* species of the *Gibberella fujikuroi* complex and fumonisin contamination of pearl millet and corn in Georgia, USA. *Mycopathologia* 159, 401-406.
- Kerkoud, M., Manceau, C., Garden, L., Samson, R., and Paulin, J. P. 2000. Epiphytic occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* (Rose) in France, where blister spot has never been seen. *European Journal of Plant Pathology* 106: 481-485.
- Kerkoud, M., Manceau, C., and Paulin, J. P. 2002. Rapid diagnosis of *Pseudomonas syringae* pv. *papulans*, the causal agent of blister spot of apple, by polymerase chain reaction using specifically designed *hrpL* gene primers. *Phytopathology* 92: 1077-1083.
- Kim JJ, Lee S, Kim SH and Breuil C. Distinguishing *Ophiostoma ips* and *Ophiostoma montium*, two bark beetle-associated sapstain fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003;222:187-192.
- Koenig,R., Verhoeven,J.T., Fribourg,C.E., Pfeilstetter,E. and Lesemann,D.E., Evaluation of various species demarcation criteria in attempts to classify ten new tombusvirus isolates., *Arch. Virol.* 149 (9), 1733-1744 (2004)
- Koh, J. K., and Nou, I. S. 2002. DNA markers for identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Molecules and Cells* 13: 309-314.
- Kong, H., Patterson, C. D., Zhang, W., Takikawa, Y., Suzuki, A., and Lydon, J. 2004. A PCR protocol for the identification of *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* based on genes required for

- tagetitoxin production. *Biological Control* 30: 83-89.
- Krishnamurthy, R., Remis, M., Brooke, L., Miller, C., Navin, A., and Guerra, M. (2006). Quarantine Activity Reporting System (QARS). AMIA Annual Symposium proceedings / AMIA Symposium AMIA Symposium, 990.
- Kubo KS, Novelli VM, Bastianel M, Locali-Fabris EC, Antonioli-Luizon R, Machado MA, Freitas-Astúa J., Detection of Brevipalpus-transmitted viruses in their mite vectors by RT-PCR., *Exp Appl Acarol.* 2011 May;54(1):33-9.
- Lacey, M. S., and W. J. Dowson. 1931. Studies in bacterioses. XVIII. A bacterial canker of apple trees. *Annals of Applied Biology* 18: 30-36.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., et al. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- Leslie, J.F., Anderson, L.L., Bowden, R.L., and Lee, Y.W. (2007). Inter- and intra-specific genetic variation in *Fusarium*. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 25-32.
- Leslie, J.F., and Summerell, B.A. (2006). *The Fusarium lab manual* (Ames, IA, U.S.A.: Blackwell).
- Liu, Y.L., Whelen, S., and Hall, B.D. (1999). Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Mol. Biol. Evol.* 16, 1799-1808.
- Locali-Fabris, E.C., Freitas-Astua, J., Souza, A.A., Takita, M.A., Astua-Monge, G., Antonioli-Luizon, R., Rodrigues, V., Targon, M.L. and Machado, M.A., Complete nucleotide sequence, genomic organization and phylogenetic analysis of Citrus leprosis virus cytoplasmic type., *J. Gen. Virol.* 87 (PT 9), 2721-2729 (2006)
- Loreti, S., De Simone, D., and Gallelli A. 2008. Detection and Identification of *Brenneria nigrifluens*, the Causal Agent of the Shallow Bark Canker of Walnut by, PCR Amplification. *Journal of Phytopathology* 156: 464-469.
- Lozano, G. E. Moriones, J. Navas-Castillo, Complete nucleotide sequence of the RNA2 of the crinivirus tomato chlorosis virus., *Archives of Virology*, March 2006, Volume 151, Issue 3, pp 581-587
- Lozano, I. and Morales, F., Molecular characterization of Rice stripe necrosis virus as a new species of the genus *Benyvirus*., *Eur. J. Plant Pathol.* 124, 673-680 (2009)
- Lydon, J., and Patterson, C. D. 2001. Detection of tabtoxin-producing strains of *Pseudomonas syringae* by PCR. *Letters in Applied Microbiology* 32: 166-170.
- Malonek, S., Rojas, M.C., Hedden, P., Gaskin, P., Hopkins, P., and Tudzynski, B. (2005). Functional characterization of two cytochrome P450 monooxygenase genes, P450-1 and P450-4, of the gibberellic acid gene cluster in *Fusarium proliferatum* (*Gibberella fujikuroi* MP-D). *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1462-1472.
- Marasas, W.F. (2001). Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. *Environmental health perspectives* 109 Suppl 2, 239-243.
- Marasas, W.F., Kellerman, T.S., Gelderblom, W.C., Coetzer, J.A., Thiel, P.G., and van der Lugt, J.J. (1988). Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 55, 197-203.
- Marasas, W.F.O., Nelson, P.E., and Toussoun, T.A. (1984). *Toxigenic Fusarium species: identity and mycotoxicology* (University Park: The Pennsylvania State University Press).

- Maes, M., Garbeva, P., and Kamoen, O. 1996. Recognition and detection in seed of the *Xanthomonas* pathogens that cause cereal leaf streak using rDNA spacer sequences and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 86: 63-69.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., Berka, J., Braverman, M. S., Chen, Y. J., Chen, Z., Dewell, S. B., Du, L., Fierro, J. M., Gomes, X. V., Goodwin, B. C., He, W., Helgesen, S., Ho, C. H., Irzyk, G. P., Jando, S. C., Alenquer, M. L. I., Jarvie, T. P., Jirage, K. B., Kim, J. B., Knight, J. R., Lanza, J. R., Leamon, J. H., Lefkowitz, S. M., Lei, M., Li, J., Lohman, K. L., Lu, H., Makhijani, V. B., McDade, K. E., McKenna, M. P., Myers, E. W., Nickerson, N., Nobile, J. R., Plant, R., Puc, B. P., Ronan, M. T., Roth, G. T., Sarkis, G. J., Simons, J. F., Simpson, J. W., Srinivasan, M., Tartaro, K. R., Tomasz, A., Vogt, K. A., Volkmer, G. A., Wang, S. H., Wang, Y., Weiner, M. P., Yu, P., Begley, R. F., and Rothberg, J. M. 2005. Genome sequencing in open microfabricated high density picoliter Reactors. *Nature* 437: 376-380.
- Marques, Abi S. A., Marchaisson, A., Garden, L., and Samson, R. 2008. BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae* - *P. viridiflava* group. *Genetics and Molecular Biology* 31(1): 106-115.
- Martens, J. W., Seaman, W. L., and Atkinson, T. G. 1984. Diseases of field crops In Canada. Canadian Phytopathological Society, Harrow, Ontario, Canada.
- Mohan, S. K., and Schaad, N. W. 1987. An improved agar plating assay for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *P. s.* pv. *phaseolicola* in contaminated bean seed. *Phytopathology* 77: 1390-1395.
- Molouba, F., Guimier, C., Berthier, C., Guenard, M., Oliver, V., Baril, V., and Horvais, A. 2001. Detection of bean seed-borne pathogens by PCR. *Acta Horticulturae* 546: 603-607.
- Moltmann, E. 2000. Die blasenfleckenkrankheit an 'Delbarestivale' verursacht durch *Pseudomonas syringae* pv. *papulans*. *Obstbau* 8: 457-458.
- Mule, G., Susca, A., Stea, G., and Moretti, A. (2004). A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *F. verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. *Eur. J. Plant Pathol.* 110, 495-502.
- Munkvold, G.P., and Desjardins, A.E. (1997). Fumonisin in maize. Can we reduce their occurrence? *Plant Dis.* 81, 556-565.
- Musa, A. R., Minardi, P., and Mazzuchi, U. 2001. Identification and expression of the *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* *hrpZ* gene which encodes an harpin elicitor. *Antonie van Leeuwenhoek* 79: 61-71.
- Naoto, Y., Hikohisa, K., Toshikuni, H., inventors; Pfu, assignee. [Network quarantine system]. Japanese patent JP 2006-155062. 2006 Jun 15. Japanese.
- Nelson, P.E., Desjardins, A.E., and Plattner, R.D. (1993). Fumonisin, mycotoxins produced by fusarium species: biology, chemistry, and significance. *Ann. Rev. Phytopathol.* 31, 233-252.
- NCBI. National Center for Biotechnology Information. Nucleotide BLAST (BLASTN). <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>
- Nicolaisen, M., Justesen, A.F., Thrane, U., Skouboe, P., and Holmstrom, K. (2005). An oligonucleotide microarray for the identification and differentiation of trichothecene producing and non-producing *Fusarium* species occurring on cereal grain. *J. Microbiol. Methods* 62, 57-69.
- Ninot, A., Aletà, N., Moragrega, C., and Montesinos, E. 2002. Evaluation of a Reduced Copper

- Spraying Program to Control Bacterial Blight of Walnut. *Plant Disease* 86: 583-587.
- Nirenberg, H.I., and O'Donnell, K. (1998). New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90, 434-458.
- O'Brien, H. E., Desveaux, D., and Guttman, D. S. 2011. Next-generation genomics of *Pseudomonas syringae*. *Current Opinion in Microbiology* 14: 1-7.
- OEPP/EPPO. 2005. Diagnostics PM 7/43(1), *Pseudomonas syringae* pv. *persicae*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 35: 285-287.
- O'Donnell, K., and Cigelnik, E. (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.* 7, 103-116.
- O'Donnell K. and Cigelnik E. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylo. Evol.* 7:103-116.
- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E., and Ploetz, R.C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 2044-2049.
- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Tacke, B.K., and Casper, H.H. (2000a). Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 7905-7910.
- O'Donnell, K., Nirenberg, H.I., Aoki, T., and Cigelnik, E. (2000b). A Multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience* 41, 61-78.
- Ohuri A, Endo S, Sano A, Yokoyama K, Yarita K, Yamaguchi M, Kamei K, Miyaji M, and Nishimura K. 2006. Rapid identification of *Ochroconis gallopava* by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *Vet. Microbiol.* 114, 359-365.
- Park, J., Park, B., Jung, K., Jang, S., Yu, K., Choi, J., Kong, S., Kim, S., Kim, H., Kim, J.F., et al. (2008a). CFGP: a web-based, comparative fungal genomics platform. *Nucleic acids research* 36, D562-571.
- Park, J., Park, B., Veeraraghavan, N., Jung, K., Lee, Y.-H., Blair, J.E., Geiser, D.M., Isard, S., Mansfield, M.A., Nikolaeva, E., et al. (2008b). *Phytophthora Database: A Forensic Database Supporting the Identification and Monitoring of Phytophthora*. *Plant Disease* 92, 966-972.
- Parkinson, N., Bryant, R., Bew, J., and Elphinstone, J. 2011. Rapid phylogenetic identification of members of the *Pseudomonas syringae* species complex using the *rpoD* locus. *Plant Pathology* 60: 338-344.
- Palacio-Bielsa, A., Cambra, M. A., and López M. M. 2009. PCR detection and identification of plant-pathogenic bacteria: updated review of protocols (1989-2007). *Journal of Plant Pathology* 91: 249-297.
- Pascon RC, Kitajima JP, Breton MC, Assumpção L, Greggio C, Zanca AS, Okura VK, Alegria MC, Camargo ME, Silva GG, Cardozo JC, Vallim MA, Franco SF, Silva VH, Jordão H Jr, Oliveira F, Giachetto PF, Ferrari F, Aguilar-Vildoso CI, Franchiscini FJ, Silva JM, Arruda P, Ferro JA, Reinach F, da Silva AC., The complete nucleotide sequence and genomic organization of Citrus Leprosis associated Virus, Cytoplasmatic type (CiLV-C), *Virus Genes*. 2006 Jun;32(3):289-98.
- Paximadis, M. and Rey, M.E., Genome organization of Tobacco leaf curl Zimbabwe virus, a new,

- distinct monopartite begomovirus associated with subgenomic defective DNA molecules., J. Gen. Virol. 82 (Pt 12), 3091-3097 (2001)
- Patino, B., Mirete, S., Gonzalez-Jaen, M.T., Mule, G., Rodriguez, M.T., and Vazquez, C. (2004). PCR detection assay of fumonisin-producing *Fusarium verticillioides* strains. J. Food Protect. 67, 1278-1283.
- Pierce, N. B. 1901. Walnut bacteriosis. Botanical Gazette 31(4): 272-273.
- Pouget, R. (1990). Histoire de la lutte contre le phyloxera de la vigne en France (Paris: Institut national de la recherche agronomique).
- Stokstad, E. (2004). Agriculture. Plant pathologists gear up for battle with dread fungus. Science 306, 1672-1673.
- Primer3 input (v. 0.4.0). <http://frodo.wi.mit.edu/>
- Proctor, R.H., Plattner, R.D., Brown, D.W., Seo, J.A., and Lee, Y.W. (2004). Discontinuous distribution of fumonisin biosynthetic genes in the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycol. Res. 108, 815-822.
- Prosen, D., Hatziloukas, E., Schaad, N. W., and Panopoulos, N. J. 1993. Specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola DNA in bean seed by polymerase chain reaction-based amplification of a phaseolotoxin gene region. Phytopathology 83: 965-970.
- Raj SK, Aminuddin, Aslam M, Singh BP., Elimination of eggplant mottled crinkle virus using virazole in explant cultures of *Solanum melongena* L., Indian J Exp Biol. 1991 Jun;29(6):594-5.
- Rademaker, J. L. W., Louws, F. J., Schultz, M. H., Rossbach, U., Vauterin, L., Swings, J., and de Bruijn, F. J. 2005. A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. Phytopathology 95: 1098-1111.
- Reinhardt, J. A., Baltrus, D. A., Nishimura, M. T., Jeck, W. R., Jones, C. D., and Dangl, J. L. 2009. De novo assembly using low-coverage short read sequence data from the rice pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *oryzae*. Genome Research 19: 294-305.
- Richard AH, Nichole B, and Stephen JV 2002. Evaluation of rapid DNA extraction methods for the quantitative detection of fungi using real-time PCR analysis. J.Microbiol. Methods. 50:319-323.
- Rose, D. H. 1916. Blister spot of apples. Phytopathology 6: 110.
- Rose, D. H. 1917. Blister spot of apples and its relation to a disease of the apple bark. Phytopathology 7: 198-208.
- Rott, M. E. W. Jelkmann, Little cherry virus-2: Sequence and genomic organization of an unusual member of the Closteroviridae., Archives of Virology, January 2005, Volume 150, Issue 1, pp 107-123
- Rubio L, Abou-Jawdah Y, Lin HX, Falk BW., Geographically distant isolates of the crinivirus Cucurbit yellow stunting disorder virus show very low genetic diversity in the coat protein gene., J Gen Virol. 2001 Apr;82(Pt 4):929-33.
- Rustici,G., Milne,R.G. and Accotto,G.P., Nucleotide sequence, genome organisation and phylogenetic analysis of Indian citrus ringspot virus. Brief report, Arch. Virol. 147 (11), 2215-2224 (2002)
- Satoh K, Kondoh H, Sasaya T, Shimizu T, Choi IR, Omura T, Kikuchi S., Selective modification of rice (*Oryza sativa*) gene expression by rice stripe virus infection., J Gen Virol. 2010 Jan;91(Pt 1):294-305.
- Santini1, A. , L. Ghelardini, C. De Pace, M. L. Desprez-Loustau, P. Capretti, A. Chandelier, T. Cech, D. Chira, S. Diamandis, T. Gaitniekis, J. Hantula, O. Holdenrieder, L. Jankovsky, T. Jung, D.

- Jurc, T. Kirisits, A. Kunca, V. Lygis, M. Malecka, B. Marcais, S. Schmitz, J. Schumacher, H. Solheim, A. Solla, I. Szabò, P. Tsopeles, A. Vannini, A. M. Vettrano, Webber, J. S. Woodward, J. Stenlid. 2013. Biogeographical patterns and determinants of invasion by forest pathogens in Europe. *New Phytologist* 191:238-235.
- Scherm, B., Balmas, V., Spanu, F., Pani, G., Delogu, G., Pasquali, M., and Migheli, Q. (2013). *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Mol. Plant Pathol.* 14, 323-341.
- Schaad, N. W. 1982. Detection of seedborne bacterial plant pathogens. *Plant Disease* 66: 885-890.
- Schaad, N. W., and Cunfer, B. M. 1979. Synonymy of *Pseudomonas coronafaciens*, *Pseudomonas coronafaciens* pathovar *zeae*, *Pseudomonas coronafaciens* subsp. *atropurpurea* and *Pseudomonas striafaciens*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 29: 213-221.
- Schaad, N. W., and Frederick, R. D. 2002. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Canadian Journal of Plant Pathology* 24: 250-258.
- Schaad, N. W., Cheong, S. S., Tamaki, S., Hatziloukas, E., and Panopoulos, N. J. 1995. A combined biological and enzymatic amplification (Bio-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. *Phytopathology* 85: 243-248.
- Schena, L., Nigro, F., Ippolito, A., and Gallitelli, D. 2004. Real-time quantitative PCR: A new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *European Journal of Plant Pathology* 110: 893-908.
- Scortichini, M., and Rossi, M. P. 2003. Genetic diversity of *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae* strains and comparison with some other *X. arboricola* pathovars using repetitive PCR genomic fingerprinting. *Journal of Phytopathology* 151: 113-119.
- Sholberg, P. L., and Bedford, K. E. 1997. Characterization of blister spot [*Pseudomonas syringae* pv. *papualns*] in British Columbia and its potential for spread to new apple cultivars. *Canadian Journal of Plant Pathology* 19: 347-351.
- Singh MK, Singh K, Haq QM, Mandal B, Varma A., Molecular characterization of Tobacco leaf curl Pusa virus, a new monopartite Begomovirus associated with tobacco leaf curl disease in India., *Virus Genes*. 2011 Oct;43(2):296-306.
- Scott, P.M., and Lawrence, G.A. (1987). Liquid chromatographic determination and stability of the *Fusarium* mycotoxin moniliformin in cereal grains. *JOAC* 70, 850-853.
- Smith, M. A. 1944. Blister spot, a bacterial disease of apple. *Journal of Agricultural Research* 68: 269-298.
- Sreenivasa, M.Y., González-Jaén, M.T., Dass, R.S., Raj, A.P.C., and Janardhana, G.R. (2008). A PCR-based assay for the detection and differentiation of potential fumonisin-producing *Fusarium verticillioides* isolated from Indian maize kernels.. *Food Biotechnol.* 22, 160-170.
- Tao, T. S., Yue, Y. Y., Chen, W. X., and Chen, W. F. 2004. Proposal of *Nakamurella* gen. nov. as a substitute for the bacterial genus *Microsphaera* Yoshimi et al. 1996 and *Nakamurellaceae* fam. nov. as a substitute for the illegitimate bacterial family *Microsphaeraceae* Rainey et al. 1997. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 999-1000.
- Toben, H., Mavridis, A., and Rudolf, K. 1990. Occurrence of Basal Glume Rot (*Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*) on Cereals in West Germany and Testing for Resistance in Wheat. *Plant Pathogenic Bacteria, Proceedings 7th Int. Conf., Budapest*, 643-648.
- Tóth, B., Mesterházy, Á., Nicholson, P., Téren, J., and Varga, J. (2004). Mycotoxin production and

- molecular variability of European and american isolates of *Fusarium culmorum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 110, 587-599.
- Tzanetakis, I.E., Halgren, A.B., Keller, K.E., Hokanson, S.C., Maas, J.L., McCarthy, P.L. and Martin, R.R., Identification and detection of a virus associated with strawberry pallidosis disease., *Plant Dis.* 88, 383-390 (2004)
- Tzanetakis IE, Price R, Martin RR., Nucleotide sequence of the tripartite *Fragaria chiloensis* cryptic virus and presence of the virus in the Americas., *Virus Genes.* 2008 Feb;36(1):267-72. Epub 2007 Dec 22.
- Tzanetakis, I.E. and Martin, R.R., New features in the genus *Illarvirus* revealed by the nucleotide sequence of *Fragaria chiloensis* latent virus., *Virus Res.* 112 (1-2), 32-37 (2005)
- Van Gent-Pelzer, M.P.E., Van Brouwershaven, I.R., Kox, L.F.F., and Bonants, P.J.M.A. (2007). TaqMan PCR method for routine diagnosis of the quarantine fungus *Guignardia citricarpa* on citrus fruit. . *J Phytopathol* 155, 357-363.
- Vanneste, J. L., and Yu, J. 2006. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *populans* in apple budwood. *New Zealand Plant Protection* 59: 146-149.
- Vanneste, J. L., Cornish, D. A., Yu, J., and Morris, C. E. 2009. The application of Polymerase chain reaction for characterising strains of *Pseudomonas syringae* isolated from New Zealand rivers. *New Zealand Plant Protection* 62: 256-261.
- Van Vuurde, J. W. L., Franken, A. A. J. M., Birnbaum, Y., and Jochems, G. 1991. Characteristics of immunofluorescence microscopy and of dilution-plating to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed lots and for risk assessment of field incidence of halo blight. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 97: 233-244.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., and Swings, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45: 472-489.
- Vigouroux, A. 1967. Nouvelle dépérissement du pêcher dans l'Ardèche? *Phytoma* 192: 34-5.
- Vigouroux, A. 1970. Etudes sur les bactérioses des arbres fruitiers. Une nouvelle bactérioses du Pêcher: description, étiologie, développement du parasite, *Ann. Phytopathology* 2: 155-179.
- Vitushkina, Maria Beate Fechtner, Alexey Agranovsky, Wilhelm Jelkmann, Development of an RT-PCR for the detection of little cherry virus and characterization of some isolates occurring in Europe., *European Journal of Plant Pathology*, December 1997, Volume 103, Issue 9, pp 803-808
- Von Kietzel, J. and Rudolph, K. 1997. Epiphytic Occurrence and Spread of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. *Plant Pathology* 9: 29-34.
- Wallwork, H. 1992. Cereal leaf and stem diseases. Grains Research and Development Corporation, Barton, Australia.
- Walcott, Ron. R. 2003. Detection of seedborne pathogens. *HortTechnology* 13: 40-47.
- Webster, D. M., Akin, J. D., and Cross, J. E. 1983. Bacterial blights of snap and their control. *Plant Disease* 67: 935-940.
- Wintermantel WM, Hladky LL, Gulati-Sakhuja A, Li R, Liu HY, Tzanetakis IE., The complete nucleotide sequence and genome organization of tomato infectious chlorosis virus: a distinct crinivirus most closely related to lettuce infectious yellows virus., *Arch Virol.* 2009;154(8):1335-41.
- Wintermantel WM, Wisler GC, Anchieta AG, Liu HY, Karasev AV, Tzanetakis IE., The complete

- nucleotide sequence and genome organization of tomato chlorosis virus., Arch Virol. 2005 Nov;150(11):2287–98. Epub 2005 Jul 8.
- Yazeed, H.A.E., Hassan, A., Moghaieb, R.E.A., Hamed, M., and Refai, M. (2011). Molecular detection of fumonisin-producing *Fusarium* species in animal feeds using polymerase chain reaction (PCR). J Appl Sci Res 7, 420 – 427.
- Yoshimi, Y., Hiraishi, A., and Nakamura, K. 1996. Isolation and characterization of *Microsphaera multipartita* gen. nov., sp. nov., a polysaccharide-accumulating Gram-positive bacterium from activated sludge. International Journal of Systematic bacteriology 46: 519 – 525.
- Young, J. M. 1987. New plant disease record in New Zealand: *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* from nectarine, peach, and Japanese plum. New Zealand Journal of Agricultural Research 30: 235-47.
- Young, J. M. 1988. *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* from nectarine, peach, and Japanese plum in New Zealand. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 18: 141-151.
- Young, J. M. 1995. Bacterial decline. In: Compendium of Stone Fruit Disease (Ed. by Ogawa, J. M., El Zehr, G. W., Bird, D. F., Ritchie, K., Uriu, J., and Uyemoto, K.). APS Press, St Paul (US).
- Zaccardelli, M., Spasiano, A., Bazzi, C., and Merighi, M. 2005. Identification and in planta detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* using PCR amplification of *hrpZ*pst. European Journal of Plant Pathology 111: 85-90.
- Zhang F., Ma L, Xu X, Zheng J, Shi Y, Lu Y, and Miao Y. 2009. Sensitive and rapid detection of *Karenia mikimotoi* (Dinophyceae) by loop-mediated isothermal amplification. Harmful Algae 8, 839-842.