

최 종
연구보고서

감귤 바이러스 조기 정밀진단 기술개발 및
바이러스 저항성 연구

Development of rapid and precise techniques for
diagnosis of citrus virus by genetic engineering
approaches and development of virus resistant
citrus plants by using cross protection
with mild strain viruses

성균관대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “감귤 바이러스 조기 정밀진단 기술개발 및 바이러스 저항성 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

년 월 일

주관연구 기관명 : 성균관대학교
총괄연구 책임자 : 이석찬
세부연구 책임자 : 이석찬
연구원 : 김대현
연구원 : 심혜경
연구원 : 황현식
연구원 : 최승호
연구원 : 김소연
협동연구 기관명 : 남지농업연구소
협동연구 책임자 : 김광식
연구원 : 현재욱
연구원 : 조영민
연구원 : 현상훈
연구원 : 이현영

요 약 문

I. 제 목

감귤 바이러스 조기 정밀진단 기술개발 및 바이러스 저항성 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

감귤 (*Citrus L.*)은 전 세계적으로 연간 1억 톤 이상이 생산되어 과실 중에서는 생산량이 가장 많은 과수이지만, 재배 특성상 최저 기온 -7°C 이상인 지역에 국한되고 있어 우리나라에서는 주로 제주 지역에서만 재배되고 있다. 감귤 산업은 제주도 내 농업생산액 1위 작목으로 전체농가의 90%인 36천 농가가 종사하고 있으며, 재배면적은 전체 경지의 46%인 25천 ha 이다. 생산액은 농업 전체 소득액의 65%인 5천억 원으로 제주 GRDP의 약 20%를 점유하고 있는 주요 기간산업이다. 그러나 최근 농산물 수입 개방화와 감귤 생산량의 증대로 어려움을 겪고 있다.

현재는 국제 경쟁력을 높이기 위한 수단으로 고품질 과실생산에 노력을 기울이고 있으나, 신품종 육성단계부터 바이러스에 감염되어 품질을 떨어뜨리는 경우가 많다. 이는 과수 바이러스에 대한 연구가 미진한 것에 근본적인 원인이 있다. 과수 바이러스는 불안정하고 숙주 내 함량이 적으며 인공접종에 의한 발병이 어렵다. 특히, 감귤나무의 경우 영년생 목본식물로 타 식물에 비해 수체 내 여러 종의 바이러스를 잠재적으로 보유하고 있는 경우가 많다. 근래 품종갱신이 왕성하게 이루어짐에 따라 잠복 감염되어 있던 바이러스가 병징을 나타내 그 피해가 증가하고 있고, 바이러스 감염묘목의 유통에 의해 급속히 바이러스가 확산되고 있는 실정이다.

바이러스 병을 예방하거나 치료할 수 있는 방법은 없기 때문에 방제가 가장 중요하다. 따라서 현재는 건전한 식물체로부터 묘목을 생산하고 건전한 대

목을 사용하며 매개충을 방제하는 것이 유일한 예방책이다. 그러나 무독묘를 생산하여 농민들에게 보급하더라도 포장에서 매개충에 의해 재 감염될 가능성이 높고 이러한 경우 그 외부 병징이 훨씬 심각할 수 있다.

본 연구에서는 RT-PCR, dot-blot hybridization, ELISA, SSCP 등의 분자생물학적 방법을 이용한 진단 체계의 확립으로 CTV, CTLV, CiMV와 같은 주요 감귤 바이러스를 조기에 진단하는 것은 물론 감염 피해를 최소화 하고자 하였다. 가장 감염률이 높고 피해의 정도가 큰 CTV는 SSCP 분석을 통해 병원성과 밀접한 관련이 있는 변이 구조를 분석하여 근본적인 방제가 이루어질 수 있는 체계를 확립하였다. 국내에 분포하는 CTV의 수와 종류, 유입경로, 분포 상황, 바이러스의 특성 등을 분석하였고 이를 통해 CTV의 mild strain을 선발하여 교차 방어 기작에 근거한 저항성을 유도하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 국내 감귤 바이러스 수집 및 농가 피해 분석
- 감귤 바이러스 CP 유전자 클로닝 및 CP 단백질 특이적인 항체의 생산
- 바이러스 무독묘의 생산과 생물검정
- 약독계 바이러스를 이용한 cross-protection 및 생물검정
- 국내 최초로 감귤 바이로이드의 분리 및 동정
- 해외 citrus virus 및 바이러스 유전자 수집 및 정밀 검역 기술의 확보

IV. 연구개발 결과

1. 바이러스의 수집

제주도 (CTV, CTLV, CiMV, SDV)와 남해안 일대 (CTV)에서 주요 감

균 바이러스에 감염된 이병주를 선발하고 이를 증식하였다.

2. 검정용 primers의 제작과 RT-PCR 방법을 이용한 진단 체계의 확립

주요 감귤 바이러스의 CP 유전자 부위를 대상으로 진단용 primers를 제작하였고 각 바이러스의 단독 감염과 복합 감염을 진단할 수 있는 조건을 확립하였다. 확보한 유전자에 기초하여 각각의 바이러스에 특이적으로 결합할 수 있는 probe를 제작하였고 이를 dot-blot hybridization에 이용하였다. 이 방법으로 복합 감염 여부를 한 번의 반응으로 알 수 있도록 하였고, 다량의 시료를 다룰 수 있도록 하였다.

3. 바이러스 진단용 항체의 제작

진단용 항체를 제작하기 위해 확보한 CP 유전자를 발현하였다. 제작된 항체를 이용하여 ELISA 검정에 활용하였다.

4. SSCP를 이용한 진단 체계의 확립과 약독 바이러스의 선발

SSCP 방법을 이용하여 제주도와 남해 일대에 분포하는 CTV의 hypotypes에 대한 변이 구조 분석을 시도하였다. 이를 통해 우리나라에 분포하는 CTV의 종류와 변이 정도, 이와 관련한 병원성의 차이를 구분할 수 있었다. SSCP 결과와 염기 서열 분석 그리고 병징을 연관하여 분석함으로써 약독 바이러스를 선별할 수 있는 기준을 마련하였다. 본 연구에서는 우리나라 고유의 약독 바이러스 2종을 선발하였다.

5. 교차반응에 의한 저항성 유도 연구

선발한 2종의 mild strains와 severe strain을 이용하여 교차 방어에 의한 저항성을 유도하고자 하였다. 접수와 새로 발생한 가지에서 바이러스의 복제는 이루어지고 있지만 현재까지 외부 병징은 없는 상태로 mild strain에 의한 효과가 있는 것으로 판단된다.

6. SDV의 vector의 분리

SDV의 전이를 매개하는 soil-borne vector를 구명하기 위해 곰팡이를 분리 및 배양하여 SDV의 보독 여부를 확인하였으나 검정되지 않았다.

7. 감귤 바이로이드의 분리 및 동정

제주도에서 바이로이드 감염은 없는 것으로 보고 되어 있었으나 최근 농가와 시험장을 중심으로 바이로이드에 의한 병징이 보고 되고 있다. 이를 분석

한 결과 다른 나라에서 보고된 다수의 감귤 바이로이드가 발견되었다. 본 연구에서는 RT-PCR 방법으로 이를 진단하였고 감염된 바이로이드의 종류를 파악하였다. 현재 제주도에서 발견된 바이로이드는 CVd-I-LSS, HSVd, CVd-OS 3종이다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

현재까지 제주에서는 일본에서 선발한 mild strain을 이용하여 저항성 유도를 하고 있다. 이는 감귤 바이러스에 대한 연구의 방향이 조기 진단이라는 부분에 집중되어 있었기 때문이다. 본 연구에서는 SSCP 방법을 활용하여 국내에 분포하는 바이러스의 변이 구조를 분석하였고 일부는 특성을 구명하였다. 본 과제를 수행하며 선발한 두 종의 mild strain을 난지농업연구소에서 유지하고 있는데 이것의 특성을 계속적으로 관찰한다면 수입하지 않은 고유의 바이러스를 이용한 교차 방어를 기대할 수 있다. 또한 바이러스의 근본적인 방제를 위해 매개체에 대한 지속적인 연구가 필요하고 이번 연구과제 수행 중에 조사된 감귤 바이로이드의 특성 분석과 감귤 바이러스와의 상관 관계에 대해서도 추가 조사가 필요하다.

본 연구에서 처음으로 제시된 바이로이드 감염에 대한 보고는 앞으로의 감귤 바이러스 진단과 방제에 있어 매우 중요한 부분이다. 바이로이드 감염은 전염성이 강하고 단독 감염만으로도 강한 병원성을 나타낸다. 더욱 문제가 되는 것은 다른 바이러스와 복합 감염 되어 있을 경우 병원성의 상승 효과를 가져오게 된다는 것이다. 따라서 이를 사전에 진단하여 예방하는 것은 필수적이라 하겠다.

SUMMARY

(영문 요약문)

Citrus tristeza virus (CTV), a member of the genus *Closterovirus*, occurs in most citrus producing regions of the worldwide, and it is the most serious viral pathogen of citrus. Variations of biological and molecular characters have been observed for many CTV isolates. In this work, we tried (i) to develop the diagnostic method and identification technique for citrus viruses (CTV, CTLV, CiMV), (ii) to confirm the usefulness for comparison of viral RNA population of distinct isolates of CTV by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis, (iii) isolation of the mild virus strain by SSCP analysis that can be applied to monitor cross-protection. As a result, major citrus viruses, CTV, CTLV and CiMV, can be detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), dot blot hybridization techniques which can be used for quarantine purpose. Since most of citrus were infected with two or three viruses, multi-plex viruses detection techniques in CTV, CTLV, CiMV were confirmed to be a useful tool to save labour and time.

This study was conducted analyze the population of sequence variants for CTV isolates in Korea and to construct the phylogenetic trees of CTV in Korea. We also carried out finding the mild CTV strain to apply for the cross protection. The CTV isolates from yuzu (*C. junos*) collected from different geographic areas of southern provinces such as "Namhae", "Geoje", "Bosung", "Wan-Do", "Goheung"

and "Jeju island", were used for SSCP analysis. The SSCP profiles of the cDNAs obtained by RT-PCR with primers specifically designed for the p20 of the CTV population were used for this study. 142 samples from 6 sites analysed using the same procedure yielded 16 haplotypes for gene p20. The number of haplotypes found at each sampling site varied from two to six. Overall, the highest diversity of haplotypes was found in "Goheung" and the lowest in "Bosung" area, respectively. The SSCP profiles obtained from 65 PCR products in yuzu contained two or three DNA bands, whereas, in some case, others contained four or more bands of similar intensity. The genome of the 16 CTV haplotypes was completely sequenced and compared to the genome of the CTV isolates for gene p20. The genome of the 16 CTV haplotypes shows nucleotide identities of 88 ~ 99.8% with the genome of the CTV isolates for gene p20.

The pathologically mild isolates of CTV usually yielded two DNA bands by SSCP profiles, whereas the SSCP profiles of the most virulent isolates contained more than two DNA bands. Comparison of these haplotypes with those from other isolates suggests that some CTV isolates could have arisen as result of a mixed infection of two divergent isolates. Plants shown severe stem pitting were corresponded to those plants with typical SSCP profiles of severe strains. These results indicate that the primers designed for SSCP analysis can be used for distinguishing the mild strains from severe strains of CTV. SSCP analysis can be a very helpful tool for early selection of mild cross-protecting isolates, so that field trials could be restricted to a

selected group of mild isolates showing some capacity to impede multiplication of the severe isolates.

Recently we isolated and identified the citrus viroids from diseased citrus in the citrus fields and experimental stations by RT-PCR analysis. It was the first observation about citrus viroid identification in Korea. Citrus trees may be affected by many different viruses and virus-like diseases. Viroids are the smallest and structurally best characterised infectious agents presently known. Unlike viruses which have a protein coat, viroids are quite simply pieces of naked RNA. The viroid of most economic importance is citrus exocortis viroid (CEV) in many countries. Although we could escape the massive devastation caused by CTV and other citrus viruses by cross protection which was developed in our research team, we do have a problem with this rootstock as it is particularly sensitive to infection by CEV. Symptoms of CEV infection in trees on trifoliata first become apparent 4 to 8 years after planting, and include mild to severe bark cracking and scaling on the rootstock portion of the tree. The bark cracking and scaling impedes the flow of nutrients and water between the roots and canopy of the tree resulting in reduced tree vigour, stunting and losses in fruit quality and yield. The research data about citrus viroid in Jeju island was the first step on viroid research project. Now we just reported and showed the occurrence of citrus viroids in Jeju island and we all need to do investigate citrus viroid world with more careful and intensive works.

목 차

제 1 장	연구 개발 과제의 개요	10
제 2 장	국내외 기술개발 현황	15
제 3 장	연구 개발 수행 내용 및 결과	17
	1. 감귤 바이러스 수집과 유전자 확보	24
	2. 조기 정밀 진단 기술의 개발	29
	3. 바이러스 변이 구조 분석	39
	4. 약독 바이러스를 이용한 획득 저항성 유도	50
	5. 바이러스 매개물 분리 및 특성 분류	56
	6. 초감염성 기주 식물의 연구	56
	7. 국외 바이러스 수집 및 증식	57
	8. 무독묘의 생산 및 검정	57
	9. 약독 바이러스의 선발	62
	10. 바이로이드에 대한 보고	62
	11. 적요	69
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	71
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	73
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	76
제 7 장	참고문헌	77
제 8 장	논문발표	91

제 1 장. 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발의 필요성

우리 나라 감귤 재배 면적은 약 2만 6천 ha이며 연간 전체 생산량은 638,740 (M/T)으로 한국 농업에서 감귤의 비중은 사과나 포도보다도 높아 연간 7,159 억원의 감귤을 생산을 하고 있다. 매년 약 100만주의 감귤나무 묘목이 생산되나 바이러스에 대한 검정체계는 확립되어 있지 않다. CTV, CTLV, CiMV, SDV와 같은 감귤 바이러스가 제주도 전역에 걸쳐 이병되어 있는 것으로 조사되어 이에 대한 대책이 시급하다.

과수 바이러스에 의한 병은 발병 후에는 치료가 어렵기 때문에 조기 진단과 방제가 필수적이다. 따라서 국내 감염 감귤 바이러스의 특성을 이해하는 것은 조기 진단과 저항성 연구를 위해 매우 중요하다. 현재는 이와 관련한 연구가 국외에서 보고된 바이러스에 기초하여 이루어지고 있는 형편이다.

국내 감귤 바이러스 중 가장 높은 감염률과 분포를 보이는 **citrus tristeza virus (CTV)**는 $2,000 \times 10^{-12}$ nm 크기의 머리카락 모양을 갖는 바이러스로서 진딧물에 의해 매개된다. CTV에 의한 피해가 증가하는 것은 매개에 의해 혹은 접목 시 품종 변화에 따라 변이의 폭이 커서 비병원성 strain이 병원성 strain으로 변화되어 다양한 병을 유발시키기 때문이다. CTV의 조기 진단이 어려운 것은 초본 지표식물에 즙액 접촉이 잘되지 않고 목본 지표식물을 이용할 경우 오랜 기간이 소요되기 때문이다. 또한 바이러스의 수체 내 농도가 낮고 불안정하며 이로 인해 정제도 매우 까다롭다. CTV를 진단하기 위해 혈청학적 방법이나 RT-PCR에 기초한 방법 등이 이용되어 왔으나 우리 나라에서 확인된 바이러스에 기초한 것이 아니므로 비특이적인 반응을 일으키는 경우가 많았다. CTLV와 CiMV도 CTV의 경우와 크게 다르지 않다. 최근 확인된 **satsuma dwarf virus(SDV)**에 의한 온주위축병은 봄에 신장하는 가지의 잎에 나뭇배 모양, 숟가락 모양 등의 기형을 유발하고 전체적으로 위축된 특징을 나타낸다. SDV에 감염이 되면 수세를 약화시킬 뿐 아니라 복합감염이 되었을 때 더욱 극

심한 왜화를 초래하여 열매의 수량이 적어질 뿐 아니라 크기가 작아지고 불완전한 모양이 된다. 현재까지 전세계적으로 보고된 SDV와 이와 연관된 바이러스(SDV-related virus)는 모두 4종으로 아직까지도 이들의 구분과 분류가 이루어지지 않고 있다. 최근 제주에서도 SDV 감염에 대한 보고가 있었으나 이것에 대한 연구는 이루어지지 않은 상태이다.

감귤 바이러스에 관한 연구는 다음과 같은 이유에서 더욱 필요하다.

1. 국내 바이러스의 연도별 증가

면적의 82% 이상을 차지하고 있는 조생온주밀감의 홍수 출하를 극복하기 위해 감귤 바이러스에 감수성인 만감류 (2-3월 출하) 등의 재배가 증가하는 추세이므로 바이러스 감염으로 인한 피해가 증가할 가능성이 높다. 특히 CTV의 경우는 69.2%, SDV가 23.1%, CTLV는 9.3%의 감염율을 보였다. 또한 대부분 2개 이상의 바이러스에 복합 감염이 되어 있었다.

2. 해외 감귤 바이러스의 수집의 필요성

해외에서 새롭게 개발된 감귤 품종은 정상적인 유통 경로를 거치지 않고 국내 농가에 보급이 되고 있으며 이 과정에서 묘목과 함께 해외 바이러스가 유입되고 있다. 국내의 바이러스는 대부분 일본이나 대만에서 유입된 것으로 판단된다. 국내 감귤 농가를 보호하기 위해서는 해외 감귤 바이러스의 확보와 진단 기술이 필요하다.

3. 무독묘 생산의 필요성

과수 바이러스의 특성상 감염 후 이를 치료할 실용적인 약제가 없으므로 조기에 진단하여 방지하는 것이 가장 효과적이다. 또한 과수 바이러스 대부분이 접목을 통해 전달되므로 모수의 감염은 큰 경제적 손실을 불러온다. 일반적으로 무독묘 생산은 열처리 후 경정배양이나 경정접목을 수행해야 하는데 감귤은 경정배양이 어려워 무독묘를 생산하는데 어려움이 있다.

4. 정밀 진단 기술의 필요성

바이러스의 조기 진단이 가장 좋은 방법이므로 국내 바이러스 특성에 맞는 진단법 개발은 필수적이다. 지금까지는 주로 항체에 기초한 방법에 의존하였으나 시료와 계절의 제약을 받고 감도가 좋지 않으므로 이를 보완할 수 있는

새로운 방법의 개발이 필요하다. 무독묘 생산 뿐 아니라 포장에서의 방제를 위해서도 정밀 진단 기술은 개발되어야 한다.

5. 저항성 유도를 위한 약독 바이러스 선발의 필요성

감귤의 형질전환 기술이 확립되지 않아 저항성에 관련된 새로운 유전자를 도입하는 것이 불가능 하므로 약독 바이러스를 선발하여 이를 활용하는 것이 바이러스 방제의 가장 효율적인 방법이다. 그러나 약독 바이러스를 분리하는 것은 쉽지 않기 때문에 이를 위한 기술의 개발과 결과의 축적이 필요하다.

외국의 경우 전자현미경 및 RT-PCR에 의한 바이러스 진단, 무독묘 생산, 약독 바이러스의 이용 등 첨단 기술연구가 종합적으로 수행되고 있으나 이와 비교할 때 국내 감귤 바이러스 연구는 시작 단계에 머무르고 있는 실정이다. 국내에서는 원예연구소 바이러스 연구팀과 제주 감귤센터 (현 난지농업연구소)를 중심으로 감귤바이러스 이병현황 조사와 진단을 위한 항체생산연구를 수행하고 무독묘 생산 에 집중하여 왔지만 과수 바이러스 특성상 연구의 어려움이 많기 때문에 기초 수준에 머무르고 있다. 본 연구진은 과제를 수행하면서 국내 바이러스 특성에 적합한 진단법 개발과 나아가 저항성을 유도할 수 있는 부분에 집중하여 근본적인 대책을 마련하고자 하였다.

제 2 절 . 연구개발 목표

이제까지 국내에서 수행되거나 현재 진행 중인 식물바이러스에 관련된 연구는 대부분 특정 바이러스의 분리 및 동정 그리고 몇몇 바이러스 유전자의 특성 연구에 맞춰져 있다. 본 과제에서는 이러한 흐름에서 탈피하여 전체 감귤 바이러스의 분포, 변이 구조, 유입 경로 등을 분석하고 이 결과에 기초하여 동정 및 진단 방법을 개발하고자 한다. 또한 바이러스 방제를 위한 약독계 바이러스의 선발과 무독묘의 생산을 추진하고 cross protection을 이용한 방제 가능성을 확인한다.

제 3 절. 연구개발의 추진 전략

- 1 단계: 감귤 바이러스 분리·동정 및 유전자 수집
 - 제주도내 바이러스의 병징 분석 및 바이러스 분리
 - 바이러스 유전자의 분리
 - 국내외 감귤 바이러스 수집, 증식 및 유전자 확보
 - 약독 바이러스의 선발
 - 무독묘의 생산 및 검정

- 2 단계: 바이러스 조기 정밀 진단 및 검역 기술의 개발
 - 바이러스의 분리 및 유전자 수집
 - 바이러스 특정 유전자의 분리 및 PCR 진단법 개발
 - Dot-blot hybridization을 이용한 진단법 개발
 - 항체를 이용한 바이러스 진단법의 개발
 - SSCP를 이용한 진단법 개발
 - 무독묘 생산 및 검정
 - 약독 바이러스의 선발

- 3 단계: 약독계 바이러스의 선발 및 감귤의 바이러스 저항성 연구
 - 감귤 약독계 바이러스를 이용한 획득 저항성의 유도
 - 감귤 바이러스 진단 및 검역 system의 확립
 - 무독묘의 생산 및 생물 검정

제 2 장. 국내외 기술 개발 현황

1. 국외 기술 개발 현황

- RT-PCR
 - 항체에 기초하여 개발된 검정법보다 감도가 좋고 활용의 범위가 넓다.
 - 계절 변화나 시료의 상태에 큰 영향을 받지 않는다.
 - 과수 바이러스는 불안정하고 수체내 농도가 낮지만 검정 가능하다.
- Real-time PCR
 - 기존의 RT-PCR 방법보다 감도가 뛰어나다.
 - 바이러스의 진단과 동시에 감염된 바이러스의 정량이 가능하다.
 - 유전자 증폭이 짧은 시간 내에 이루어지고 동시에 분석이 가능하다.
- SSCP
 - 저렴한 비용으로 다량의 시료를 다룰 수 있다.
 - 바이러스의 검정과 동시에 변이 구조 분석이 가능하다.
- 과수묘목 생산유통은 바이러스 검정이 완료된 무독묘를 원칙으로 하고 있다.
- 무독묘 보증제 실시로 농가 피해 최소화하고 있다 (영국, 미국, 일본).
- 선진국에서는 모든 과수묘목을 바이러스 무독묘목 유통체제로 법제화 하였다.

2. 국내 기술 개발 현황

- 해외에서 구입한 항체를 이용한 ELISA 방법이 주로 수행되고 있다.
- RT-PCR 진단법은 검정에 적합한 primers의 제작과 조건 확립이 필요하다.
- 감귤시험장에서 무독묘를 생산하였지만 정밀진단을 할 필요성이 있다.
- 국내에 과수 바이러스 전담 연구자가 많지 않다.
- 과수바이러스를 지속적으로 연구하는 연구조직의 연계가 부족하다.
- 시설 및 시험기자재의 체계적 확보가 미흡하다.

- 감귤바이러스에 의한 피해 면적과 병징 소개 및 PCR을 이용한 CTV 진단법에 관한 내용으로 3편의 논문이 Plant Pathology Journal에 보고되었다 (총괄책임자 소속 연구진 및 감귤시험장 연구진).

제 3 장. 연구 개발 수행 내용 및 결과

제 1 절. 연구 재료 및 방법

1. 실험 재료

가. 공시 식물

제주도, 대만과 일본으로부터 확보한 감귤바이러스 이병주 (SDV, CTV, CTLV, CiMV, SDV)와 indicator plant로 Mexican Lime을 사용하였다.

나. 공시 동물

BALB/c mice를 이용하였고 sarcoma cell을 복강에 주입하여 항체를 생산하였다.

2. 방법

가. Citrus virus의 수집 및 증식

1) 제주도내 citrus virus의 수집

감귤 바이러스에 의한 감염 증상이 나타나기 시작하는 시점인 5-6월을 전후로 바이러스 병징을 보이는 제주의 감귤 시료와 전남 고흥 유자시험장의 유자 시료를 각각 채취하였고 이를 품종, 병징 및 부위별로 격리하여 저온 저장하였다. 생물검정에 사용하는 Mexican Lime은 무균 항온실에서 관리하였고 배양한 무독묘를 사용하여 수집한 바이러스의 증식 및 생물검정에 이용하였다.

2) 국외 citrus virus의 수집

일본과 대만에서 citrus virus의 분리주 및 viroid에 감염된 시료를 확보하여 증식에 사용하였고 이를 바이러스 진단에 이용하였다.

나. 바이러스 유전자의 분리 및 염기서열 분석

1) RNA 분리

식물 조직을 액체질소에 급속 냉동시켜 파쇄한 뒤 RNA extraction buffer (200 mM Tris-HCl, pH9.0, 400 mM LiCl, 25 mM EDTA, 1% SDS)를

혼합한 후 60°C에서 5분간 반응시켰다. Chloroform:isoamylalcohol (24:1)을 첨가한 후 원심분리하여 얻은 상층액에 isopropyl alcohol을 처리하였고, pellet을 70% ethanol로 washing 하였다. 0.1%의 DEPC로 처리된 물에 용해시켰고 농도와 순도를 측정하였다.

2) RT-PCR

식물 조직에서 추출한 total RNA와 dsRNA를 주형으로 이용하여 cDNA를 합성하였다. 총 20 μ l에 5X buffer 4 μ l, 2 pmol reverse primer 0.5 μ l, 10 mM dNTP 0.5 μ l, 8 unit RNasin을 첨가하였다. 주형으로 사용한 RNA는 70°C에서 변성시킨 뒤 첨가하였고 42°C에서 5분간 반응시킨 뒤 MMLV RTase (Promega) 1 U을 첨가하고 45분간 반응시켰다. PCR mixture는 총 20 μ l가 되도록 만들어서 수행하였다. 합성한 RT solution 2 μ l를 첨가하였고, 10X buffer 2 μ l, 25mM MgCl₂ 1.2 μ l, 5 pmol primer를 각각 0.5 μ l, Taq polymerase를 0.5 unit 첨가하였다. 93°C에서 2분간 변성시킨 뒤 93°C(10초), 53°C(30초), 72°C(40초)의 조건으로 30 cycle을 반응시켰다. PCR 산물의 염기 서열 분석을 위해 pGEM-T Easy vector를 이용하였다.

3) Dot-blot hybridization

추출한 total RNA 각 5 μ g에 sample buffer (formaldehyde and formamide)를 첨가하고 65°C에서 변성시킨 뒤 membrane으로 옮겨주기 전까지 4°C에 두었다. Hybond-N+ membrane (Amersham Biosciences)은 10 SSC (1.5 M sodium chloride, 0.15 M sodium citrate, pH 7.0)에서 1 시간 동안 120 rpm으로 shaking 하여 준 뒤 blotter에 장착하였다. Vacuum pump를 이용하여 기포를 제거하고 준비한 RNA samples을 blotting 한 뒤 10 SSC로 2회 washing 하였다. Hybridization 은 probe를 [³²P]dCTP로 labeling 하여 첨가하고 42°C에서 수행하였다.

4) 바이러스 유전자의 염기서열 분석

바이러스 유전자의 염기서열 분석은 DNA star program을 사용하였다. 기본적인 상동성의 검색은 NCBI에서 web에 제공하는 soft ware를 사용하였다. 다. 바이러스 단백질의 발현 및 분리

확보한 바이러스의 CP를 발현시키기 위해 pET 22b를 사용하였다. 이것

을 BL21(DE3)pLysS에 transformation 시킨 뒤 subculture하고 LB/Ampicillin 배지에 1/100 접종하여 Absorbance(A) 600 nm 값이 0.4가 될 때까지 배양하였다. 이 때 IPTG를 1mM이 되도록 첨가하여 induction을 유도하였는데 IPTG를 첨가한 후에는 28°C에서 150rpm으로 shaking 하면서 4시간 배양하였다. 발현을 유도하여 키운 배양액을 원심분리하여 세포를 모으고 10 ml의 lysis buffer로 재현탁한 후 lysozyme (1 mg/ml)을 첨가하여 20분 동안 4°C에 두었다. 4°C를 유지하면서 초음파를 가해 분쇄한 뒤 원심분리하여 상층액을 얻고 이것을 Ni²⁺ 으로 precharged된 resin이 충전되어 있는 column에 loading 하였다. Sample이 resin을 완전히 통과한 후 1X binding buffer (5mM imidazole, 0.5M NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.9)를 흘려주어 washing 하여주고, 1X washing buffer (60mM imidazole, 0.5M NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.9)를 흘려주었다. 정제 과정에서 detector를 사용하였기 때문에 읽혀지는 peak에 따라 첨가하는 buffer의 양을 조절하여 주었다. 발현된 단백질의 elution을 위해 1X elution buffer (1M imidazole, 0.5M NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.9)를 첨가하였고, 이 과정을 통해 얻은 단백질은 0.9% NaCl 용액에 녹여 주었다.

라. 항체의 생산

1) 면역 혈청 생산

면역 혈청 생산을 위해 6주된 Balb/C mouse를 사용하였다. 4차에 걸쳐 면역을 실시하였는데 각 단계마다 0.9%의 NaCl에 녹인 바이러스의 coat protein을 25 µg 사용하였다. 1차 면역 시에는 단백질과 동량의 complete adjuvant를 사용하였고 이로부터 1주일이 지난후 2차 면역을 실시하였다. 역시 2차 면역 후 1주 경과하여 3차 면역을 실시하였는데 이렇게 4차까지 단백질과 동량의 incomplete adjuvant를 혼합하여 사용하였다. 4차 면역 후 14일 경과하여 복강 내에 sarcoma cell을 주입하였는데 이로부터 2주 후 복부가 불렀을 때 복수를 채취하였고 동시에 혈액을 채취하여 항혈청을 분리하였다.

2) ELISA

96 well plate의 각 well에 PBS로 희석한 antigen을 90 µl씩 넣은 뒤 filter paper 위에 plate를 올려놓고 37°C incubator에 넣어 2시간 동안 반응시켰다. Antigen을 제거한 뒤 Tween-20을 0.05% 포함하는 PBS를 200 µl씩 떨어뜨려 washing 하였고, PBS에 녹인 1% BSA를 90 µl씩 각 well에 떨어뜨려 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. Washing 과정을 2번 정도 반복한 뒤 primary

antibody solution을 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 3번 정도 washing 하여 준 뒤 secondary antibody solution을 넣고 37°C에서 1시간 동안 반응시키고 다시 washing을 3회 해주었다. Substrate인 pNPP를 첨가하여 발색을 확인하고 ELISA reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) Protein gel blot analysis

동일한 양의 protein을 SDS-PAGE를 통해 분리한 후 이것을 30V에서 12시간 이상 transfer 시켜 nitrocellulose membrane으로 옮겨주었다. PBS buffer에 1% BSA를 첨가하여 blocking 해주었다. Primary antibody를 넣고 상온에서 1시간 동안 반응시킨 뒤 PBS로 2번 정도 씻어 주고 1/1000로 희석한 secondary antibody를 넣고 1시간 동안 반응시켰다. 다시 PBS로 3회 정도 washing하여 준 뒤 멸균수에 NBT/BCIP tablet을 넣어 발색반응을 유도하였다.

마. 바이러스 저항성 유전자의 분리 및 cloning

바이러스 관련 저항성 유전자는 PCR 방법으로 Arabidopsis 또는 담배에서 분리하였다. PAL, PO, LOX, NPR, NDR, PR-1, Catalase, SOD 등을 1차적으로 분리하였고 salicylic acid 와 jasmonic acid에 의한 signaling pathway에 관련된 유전자를 분리하였다.

바. 무독묘의 생산

온주밀감의 경우 조직배양 중에 갈변이 잘되므로 activated charcoal을 사용하여 무독화하였다. 열처리와 경정접목을 병용하여 바이러스에 감염된 감귤나무를 주간 40°C, 야간 30°C로 열처리한 후 0.2~ 0.3mm로 잘라내어 기내에서 치상한 탱자대목에 접목, 무독묘를 생산하였다. 경정접목 후 활착율이 저하되므로 항바이러스제를 사용한 배지에서 기내배양을 하거나 열처리에 의한 shoot-tip grafting을 병행하였다.

사. 바이로이드의 분리 및 진단

바이로이드의 가장 확실한 진단은 생물검정이나 많은 시간이 소요되고 병징의 유도에 의해 판단이 되는 만큼 본 실험에서는 RT-PCR과 핵산의 염기서열 분석법을 병행하였다. 바이로이드의 증폭에 사용한 primers는 다음과 같다 (표 1).

표 1. 바이로이드 진단을 위해 제작한 primer sequences

Primer names	Targets	Primer sequences (5' -3')
CEV-AM3(-) CEV-AP3(+)	CEVd	CCGGGGATCCCTGAAGGACTT GGAAACCTGGAGGAAGTCGAG
CBLV-CM2(-) CBLV-AP2(+)	CBLVd	TCGACGACGACCAGTCAGCT TCCCCTTCAACCCGAGCGCTGC
CB2-CB(-) CB2-AP(+)	CVd-I-LSS	ACGACCGCTCAGTCTCCTCT CTGTAACCGGACCGGTCTCCTTC
CV3-AM(-) CV3-AP(+)	HSVd	CCGGGGCTCCTTTCTCAGGTAAGT GGCAACTCTTCTCAGAATCCAGC
CV2-AM(-) CV2-AP(+)	CVd-III	TCACCAACTTAGCTGCCTTCGTC CTCCGCTAGTCGAAAGACTCCGC
CV4-AM3(-) CV4-AP4(+)	CVd-IV	TCTATCTCAGGTCGCGAAGGAAGAAGC TCTGGGGAATTTCTCTGCGGGACC
CB3-AM6(-) CB3-AP(+)	CVd-OS	GTCCGCTCGACTAGCGGCAGAGAGC CGTCGACGAAGGCATGTGACTT

아. SSCP 분석

1) RT-PCR

cDNA 합성은 MMLV RT 5X buffer, 0.2 mM dNTP 혼합액, MMLV reverse transcriptase (promega, USA) 25 U를 넣고 37°C에서 1 시간 반응시켰다. 합성된 cDNA에 각각의 바이러스 유전자 부위를 증폭할 수 있도록 제작된 primer를 첨가하고 PCR을 수행하기 위해 pre-denaturing을 93°C에서 2분, 그리고 95°C 30초, 53°C 40초, 72°C 40초 조건에서 35 cycles를 수행했으며, final extension은 72°C에서 10분간 실시하였다.

2) SSCP analysis

CTV 내의 p20 gene을 대상으로 수행된 PCR products를 재료로 하여 수행하였다. 우선 DNA fragment를 denaturation 하기 위하여 PCR products (1 μ l)을 9 μ l의 denaturing solution (95% formamide, 20 mM EDTA and 500 mg/L bromophenol blue)과 함께 넣은 후, 100°C에서 15분간 heating하였고, DNA와의 상호간에 refolding을 막기 위해서 10분간 냉각하였다. 그리고 10 μ l중에서 6 μ l의 denatured DNA (p20 fragment)를 7.5%의 non-denaturing polyacrylamide mini gel (Mighty Small II, SE 250/SE 260, Hoefer Scientific, 10 x 8 cm)을 이용하여 0.5x TBE running buffer를 넣어서 200 V에서 4°C에서 18 시간 동안 전기영동 하였다 (Sambade 등, 2002).

3) Silver Staining

Sambade 등 (2002)이 보고한 절차에 의거 실험을 수행하였다. 먼저 SSCP를 수행한 non-denaturing gel을 고정시키기 위해서 fixation buffer (10% glacial acetic acid)에 30분 동안 교반하였고, 고정된 gel을 좀더 enhancing 시키기 위해서 enhancing solution에 넣어서 30분 동안 agitate 한 후, ultra pure water로 3분간 2번 세척하였다. 그리고 gel을 staining 하기 위하여 staining solution (silver nitrate AgNO₃, 37% formaldehyde)에 30분 동안 교반하였다. 이 물질을 제거하기 위해서 ultra pure water로 세척한 후, gel을 developing하기 위하여 developing solution (Na₂CO₃, 37% formaldehyde, sodium thiosulfate)에 넣어서 DNA 밴드가 나타날 때까지 교반하였다. 밴드가 나타나면 stop solution (10% glacial acetic acid)을 넣어서 발색을 중지시키고 gel을 건조시켜서 각 지역간 CTV의

DNA 패턴을 비교 분석하였다.

4) 계통 분류도

CTV p20 gene 부분의 염기서열을 Clustal V (Higgins와 Sharp, 1988)에 의해 배열한 후 수작업으로 보정하였다. Distance matrix는 Jukes와 Cantor (1969)의 방법에 의해 작성되었으며, 계통 분류도는 MEGA (Kumar 등, 1993)의 neighbor-joining program을 이용 Saito와 Nei (1987)의 neighbor-joining method에 의해 작성되었다. 계통분류도의 stability를 평가하기 위하여 neighbor-joining data에 대한 bootstrap analysis ($\times 1000$)가 수행되었다.

제 2 절. 결과 및 고찰

1. 감귤 바이러스 수집과 유전자 확보

가. 감귤 바이러스의 수집

제주를 동북, 동남, 서북, 서남의 4개 지역으로 나누고 바이러스에 의한 병징이 의심되는 개체를 중심으로 시료를 수집하였다. 일차적으로 ELISA 검정을 실시하여 바이러스에 감염된 개체를 선별하였고 접수를 2년생 탕자 묘목에 접목하여 바이러스를 증식하였다. 이 후 돌아난 새순을 취해 ELISA와 RT-PCR 검정을 실시하였고 감염이 확인되는 것은 격리된 유리 온실에서 배양하였다 (표 2). CTV에 감염된 이병주는 stem-pitting 증상을 나타내었고 CTLV는 접목부 이상증상, SDV는 잎이 spoon이나 boat를 닮은 기형 모양을 나타내었고 CiMV는 열매에서 모자이크 병징을 관찰할 수 있었다 (그림 1).

표 2. 바이러스에 감염된 이병주의 선발

Viruses	No. of Samples				Total
	Satsuma mandarin	Yuzu	Shiranuhi	Kiyomi	
CTV	20	45	6	0	71
CTLV	10	0	0	0	10
SDV	33	0	0	0	33
CiMV	5	0	0	0	5
		Total			119

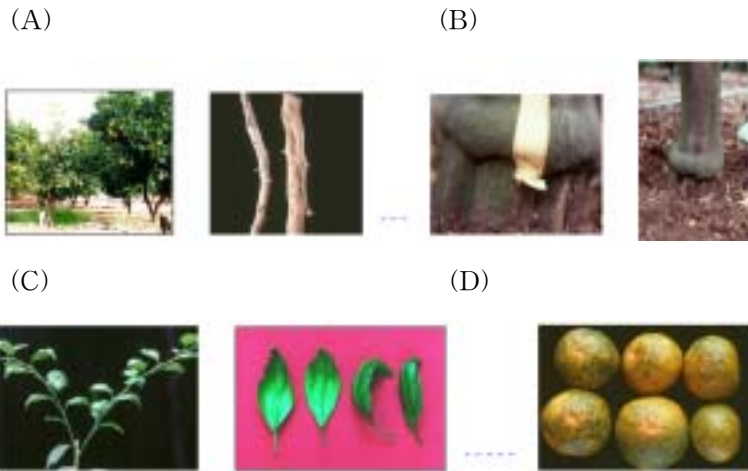


그림 1. 주요 감귤 바이러스에 의한 병징. (A) CTV 감염에 의한 수세 약화 (left) stem pitting 증상 (right), (B) CTLV 감염으로 인한 satsuma mandarin (*C. unshiu*) rootstock의 접목부 이상 증상, (C) SDV 감염에 의한 잎의 기형 (배 혹은 숟가락 모양), (D) CiMV 감염으로 인한 열매의 모자이크 무늬

유자(*C. junos*)는 온주밀감 (*C. unshiu*) 보다 바이러스의 strain에 따른 병징의 차이를 민감하게 보여줄 뿐 아니라 제주도와 남해 일대의 넓은 지역에 걸쳐 재배되고 있기 때문에 지역에 따른 변이를 보다 다양하게 보여줄 것으로 예상하였다. 제주도와 이에서 가까운 거리의육지에 위치한 남해안 일대의 유자 재배지역을 크게 남해, 완도, 거제도, 고흥, 보성 등 5개 지역으로 구분하였다. 바이러스 검정이 용이하도록 새순이 나오는 5월 상순에서 중순까지 병징의 정도에 따라 잎 조직을 수집하였다 (그림 2). CTLV, CiMV나 SDV에 의한 병징도 일부 관찰할 수 있었으나 대부분 CTV에 의한 병징을 나타내었다.



그림 2. 감귤 바이러스 수집을 위해 선정한 지역. ■, Jeju island (39); ●, Geoje (22); ▲, Namhae (20); ◆, Goheung (21); ◐, Boseong (20); ◆, Wando (20)

나. 바이러스 유전자 확보

제주도내 가장 많은 문제가 되고 있는 주요 바이러스인 CTV, CTLV, CiMV, SDV를 대상으로 유전자를 확보하였다. GenBank에 보고된 염기 서열에 기초하여 coat protein (CP) 유전자 부위에 특이적인 primer를 제작하였다 (표 3). 바이러스에 감염된 조직에서 RNA를 추출하고 RT-PCR 방법을 적용하여 각 바이러스의 CP 유전자를 확보하였다 (그림 3).

표 3. 주요 감귤 바이러스의 CP 유전자 확보를 위한 primers

Name	Sequence (5' -3')	Size	Reference
CTV	ACCCATATGGGCGACGAAACAAGAAG	640	Satyanarayana et al., 1999
	CTCGAGGTTCTGTCTACAAAAGGC		
CTLV	CATATGAGTTTGAAGACGTGCTTC	714	Yoshikawa et al., 1992
	CTCGAGACCCTCCAGTTCCAAGTTA		
CiMV	CATATGGGGAAAAGGTGGCACTCG	500	Iwanami et al., 1998
	CTCGAGAGCGGCTGTACGGAGAGA		
SDV	GTTATACAGAGTTCTCCGAA	1,329	Iwanami et al., 1999
	AGTCTGGGCGCTCGAAGTAGT		
	TCTGGACTGACCACCACGCGT	654	
	AGCAGCTGTACGCAGCGATGG		

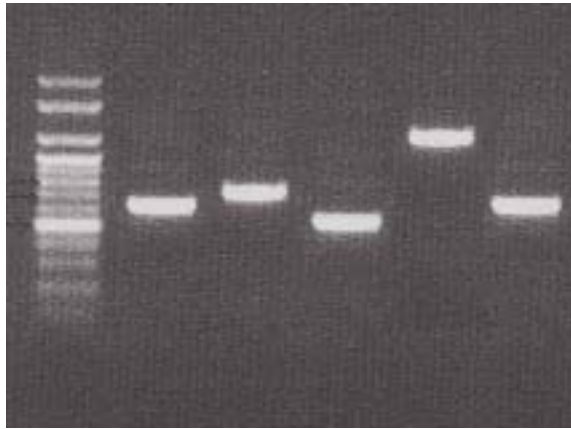


그림 3. 주요 감귤 바이러스의 coat protein gene 확보를 위한 RT-PCR. M, 100 bp DNA size marker; lane 1, PCR-amplified product from citrus infected with CTV (640 bp); lane 2, CTLV (714 bp); lane 3, CiMV (500 bp); lane 4, SDV large subunit; lane 5, SDV small subunit

2. 조기 정밀진단 기술의 개발

가. RT-PCR 방법에 기초한 진단 기술

1) primers의 제작

확보한 주요 감귤 바이러스 CP 유전자의 염기 서열에 기초하여 조기 정밀 진단에 사용할 수 있는 primer를 제작하였다. 변이의 정도에 상관없이 모든 바이러스를 증폭할 수 있도록 상동성이 높은 부위를 선택하여 제작하였다 (표 4). 또한 각각의 바이러스를 진단할 수 있는 PCR 조건이 동일할 수 있도록 하였다. PCR 수행 시 증폭 효율을 높이고 gel 상에서 분석이 용이하도록 PCR product의 크기를 600-700 bp 범위로 조정하였다.

표 3. RT-PCR 방법에 기초한 조기 정밀 진단을 위한 primers

Name	Sequence (5' -3')	Size
CTV	ATG GAC GAC GAG ACA AAG AAA	640
	CTC GAG ACG TGT GTT AAA TTT CCC AAG	
CTLV	ATG AGT TTG GAA GAC GTG CTT C	699
	ACC CTC CAG TTC CAA GTT A	
CiMV & SDV	CAT ATG GGG AAA AGG TGG CAC TCG	500
	CTC GAG AGC GGC TGT ACG GAG AGA	

2) 제작된 primers를 이용한 진단

제작된 CTV 진단용 primer를 시험하기 위해 서로 다른 haplotypes에 감염되어 있던 개체를 선택하여 RT-PCR을 수행하였다 (그림 4).



그림 4. CTV 진단용 primer를 이용한 RT-PCR. M, 100 bp DNA ladder; lane 1-3, severe strains; lane 4-5, mild strains

CTLV의 경우 병징이 없는 것으로 보이는 개체에서도 바이러스 유전자를 검출할 수 있었다 (그림 5).

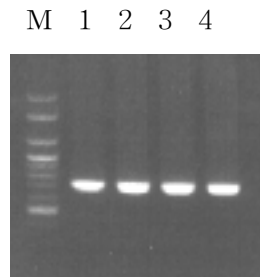


그림 5. CTLV 진단용 primer를 이용한 RT-PCR. M, 100 bp DNA ladder; lane 1-2, virus-infected trees; lane 3-4, healthy like trees

CiMV와 SDV는 매우 가까운 유연 관계에 있는 바이러스이고 현재까지 이 두 바이러스에 대한 보고가 많지 않기 때문에 양쪽 모두를 만족시키도록 primer의 서열을 결정하였다 (그림 6).

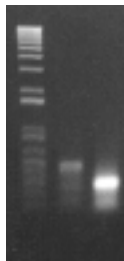


그림 6. SDV와 CiMV 진단용 primer를 이용한 RT-PCR.

3) Multiplex RT-PCR 진단법

조기 정밀 진단용으로 제작한 primers를 이용하여 바이러스의 복합 감염을 확인할 수 있도록 multiplex RT-PCR 조건을 확립하였다. 한 가지의 바이러스를 진단하기 위해서는 2개의 primers가 필요하므로 세 가지의 바이러스를 동시에 진단하기 위해서는 6개의 primers가 필요한데 한 번 반응 시 이렇게 많은 primers를 첨가하게 되면 정확성이 떨어지는 것을 확인하였다. 가장 높은 감염율을 보이는 CTV를 기본으로 하였고 이 외에 한 종류의 바이러스를 더 진단할 수 있도록 조건을 확립하였다 (그림 7).

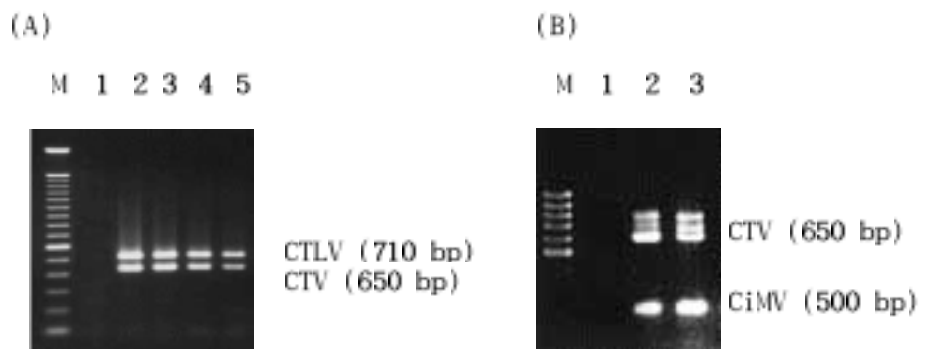


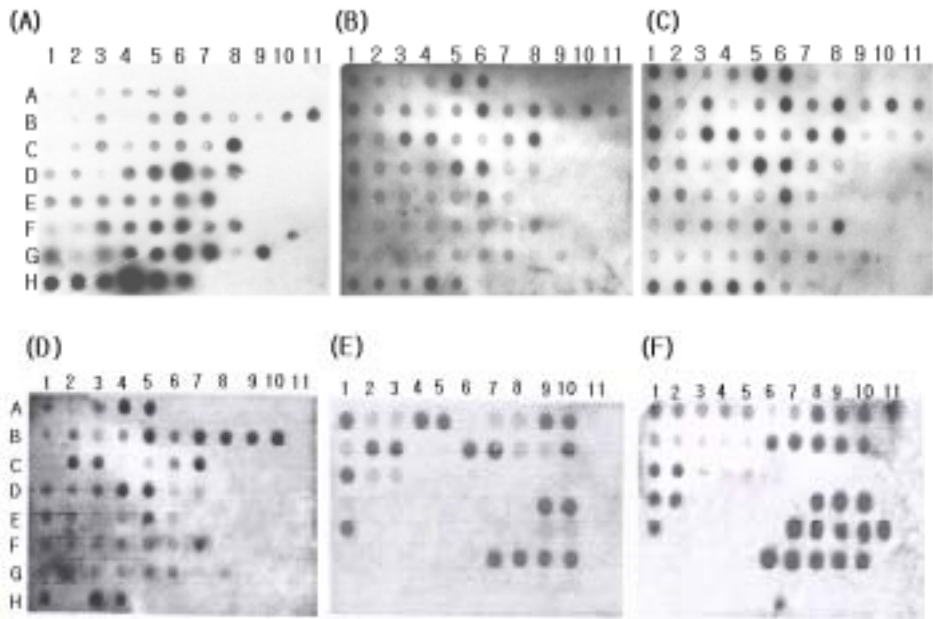
그림 7. 복합 감염 확인을 위한 multiplex RT-PCR. (A) CTV and CTLV, (B) CTV and CiMV

나. Dot-blot hybridization 진단법

감귤 바이러스의 유전자를 확보하고 RT-PCR에 기초한 진단법을 확립하는 과정에서 복합 감염의 가능성이 높은 것을 확인하였다. 이러한 복합 감염을 확인하는 방법으로는 dot-blot hybridization 방법을 적용하는 것이 효율적이었다. 한 번에 많은 양의 시료를 다룰 수 있고 동일한 시료에 대해 여러 개의 probes를 적용한 결과를 한 눈에 볼 수 있기 때문에 복합 감염 여부를 판단하는 것이 용이하였다. 분리한 주요 감귤 바이러스의 CP 유전자를 probe로 이용하여 품종, 증상 그리고 지역에 따른 주요 바이러스의 감염 여부와 복합 감염되어 있는 양상을 조사하였다 (그림 8).

전체적으로 CiMV와 CTLV의 복합 감염이 가장 많았다. CTV에 감염된 이병주의 열매 조직은 병징은 없었지만 CTV 및 CiMV를 검정할 수 있었다. 열매 조직은 다른 조직과 비교하여 상대적으로 적은 양의 조직을 이용하여 많은 양의 RNA를 얻을 수 있었고, 같은 양의 RNA를 사용하더라도 다른 조직과 비교하여 상대적으로 많은 양의 바이러스를 확인할 수 있었다. 유자 품종의 경우 CTV에 의한 외부 병징이 없어도 많은 양의 바이러스가 존재함을 확인할 수 있었다. 온주밀감보다는 부지화에서의 CTV 감염이 상대적으로 많았고, 새로운 증상을 보이는 부지화에서도 CTV의 감염이 확인되었다. 온주밀감에서는 CTLV에 의한 감염이 많았다. SDV 증상을 보이는 개체에서는 CiMV가 복합 감염된 경우가 많았는데 이는 SDV와 CiMV가 가까운 유연관계에 있기 때문이다.

동부 지역의 경우 같은 지역 안에서도 차이를 보여 남동지역은 CTV와 CiMV, 북동 지역은 CTLV와 CiMV의 감염이 많은 것으로 나타났다. 동부 지역에 비해 바이러스 감염율이 낮은 서부 지역과 제주시는 CTV의 감염이 주를 이루었고 CTLV와 CiMV의 감염율은 현저히 낮았다.



(G)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	CTV severe symptom (유자)										
B	CTV mild symptom (유자)										
C	CTLV 증상 (온주밀감)										
D	SDV 증상					CiMV 증상					
E	부지화 (M16 strain 포함)										
F	유자 (새로운 증상)										
G	무독묘 (온실)	노지에 옮긴 무독묘									
H	열매 (CTV 감염)										

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	SDV 증상 (지표식물)										
B	부지화										
C	남동지역 1 (남동)										
D	남동지역 2 (태흥)										
E	남동지역 3 (세화)										
F	북동 (선흘)										
G	제주시 (해안)										
H	서부 (고산)										

그림 8. 복합 감염 확인을 위한 dot-blot hybridization. 사용한 probes는 (A)&(D) CTV CP gene, (B)&(E) CiMV CP gene, (C)&(F) CTLV CP gene

다. ELISA 방법에 기초한 진단 기술

제주 지역에서 확보한 주요 바이러스들의 CP 유전자를 발현시켰다 (그림 9). 발현시킨 후 정제한 바이러스의 CP는 각각에 대해 특이적인 항체를 제작하기 위한 항원으로 사용하였다. 1 mM IPTG로 induction 시킨 후 37°C에서 4시간 배양하였을 때 가장 많은 단백질을 확보할 수 있었다.

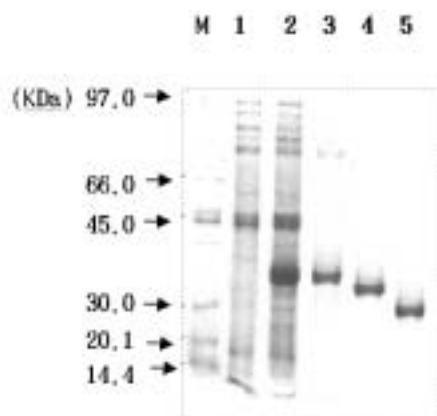


그림 9. 항체 제작을 위해 발현시킨 후 정제한 주요 바이러스들의 CP. M, low molecular weight marker; lane 1, crude extract of cell (not expressed); lane 2, crude extract of cell (1 mM IPTG); lane 3, CTLV (CP); lane 4, CTV (CP); lane 5, CiMV (CP).

ELISA를 통하여 면역단계에 따라 각각의 CP 단백질에 대한 항체 역가가 증가하였음을 확인할 수 있었다. 4차에 걸친 면역이 끝난 후 쥐에서 생성된 항혈청 내 항체의 역가는 순차적으로 희석한 항원인 감귤 바이러스 CTV, CiMV 및 CTLV CP에 대하여 10 ng까지 검출할 수 있는 것으로 확인되었다. ELISA를 이용하여 바이러스 증상이 뚜렷한 감귤 잎에서 바이러스 감염 여부를 확인한 결과 CTV, CiMV와 CTLV 모두 virus specific reaction을 보여주었다. 그러나 적은 양의 바이러스를 진단하기 위해서는 RT-PCR 방법을 사용하는 것이 좋을 것으로 사료된다 (표 5).

표 5. 주요 감귤 바이러스 진단을 위한 RT-PCR과 ELISA 방법의 비교

Infected plant sap × dilution factor	RT-PCR					
	CTV		CTLV		CiMV	
	Result		Result		Result	
1×10 ¹	+		+		+	
1×10 ²	+		+		+	
1×10 ³	+		+		+	
1×10 ⁴	+		+		+	
1×10 ⁵	+		+		-	
1×10 ⁶	+		-		-	
1×10 ⁷	+		-		-	
1×10 ⁸	+		-		-	
Healthy plant	-		-		-	
buffer	-		-		-	

Infected plant sap × dilution factor	ELISA					
	CTV		CTLV		CiMV	
	A ₄₀₅	Result	A ₄₀₅	Result	A ₄₀₅	Result
1×10 ¹	1.132	+	1.132	+	1.123	+
1×10 ²	0.876	+	0.278	-	0.891	-
1×10 ³	0.321	+	0.136	-	0.347	-
1×10 ⁴	0.124	-	0.132	-	0.124	-
1×10 ⁵	0.098	-	0.132	-	0.098	-
1×10 ⁶	0.089	-	0.145	-	0.088	-
1×10 ⁷	0.088	-	0.132	-	0.086	-
1×10 ⁸	0.076	-	0.113	-	0.067	-
Healthy plant	0.066	-	0.068	-	0.061	-
buffer	0.067	-	0.076	-	0.071	-

라. SSCP 방법을 이용한 조기 정밀 진단 기술의 개발

SSCP 방법은 한 번의 반응에서 많은 시료를 다룰 수 있고 염기 서열 분석만으로 구분이 어려운 것에 대한 특성 분석이 가능하여 세분화된 분류를 할 수 있는 장점이 있다 (Sambade 등, 2002; Spinardi 등, 1991).

남해, 보성, 완도, 거제, 고흥, 제주 등 6개 지역을 대상으로 142개의 샘플을 채취한 후 SSCP 분석을 위해 RT-PCR을 수행하였다. CTV의 변이를 가장 잘 나타내고 증폭이 용이한 p20 유전자 부위를 선정하였다 (표 6).

표 6. SSCP 분석을 위한 p20 유전자 증폭용 primers

Primer	Nucleotide sequence	Sizes (nt)
20 A (forward)	5'- CGAGCTTACTTTAGTGTTA -3'	520
20 B (reverse)	5'- TAATGTCAAACCTGACCGC - 3'	

남해 지역 (그림 10-A)의 경우 20개 샘플 중 8개 (8/20), 보성지역 (그림 10-B) 20개 샘플 중 6개 (6/20), 완도지역 (그림 10-C) 20개 샘플 중 17개 (17/20), 거제지역 (그림 10-D) 22개 샘플 중 13개 (13/22), 고흥지역 (그림 10-E) 21개 샘플 중 11개 (11/21), 제주지역 (그림 10-F) 39개 샘플 중 36개 (36/39)에서 CTV의 CP 유전자가 증폭되었고 각각의 RT-PCR product를 SSCP 분석에 활용하였다.

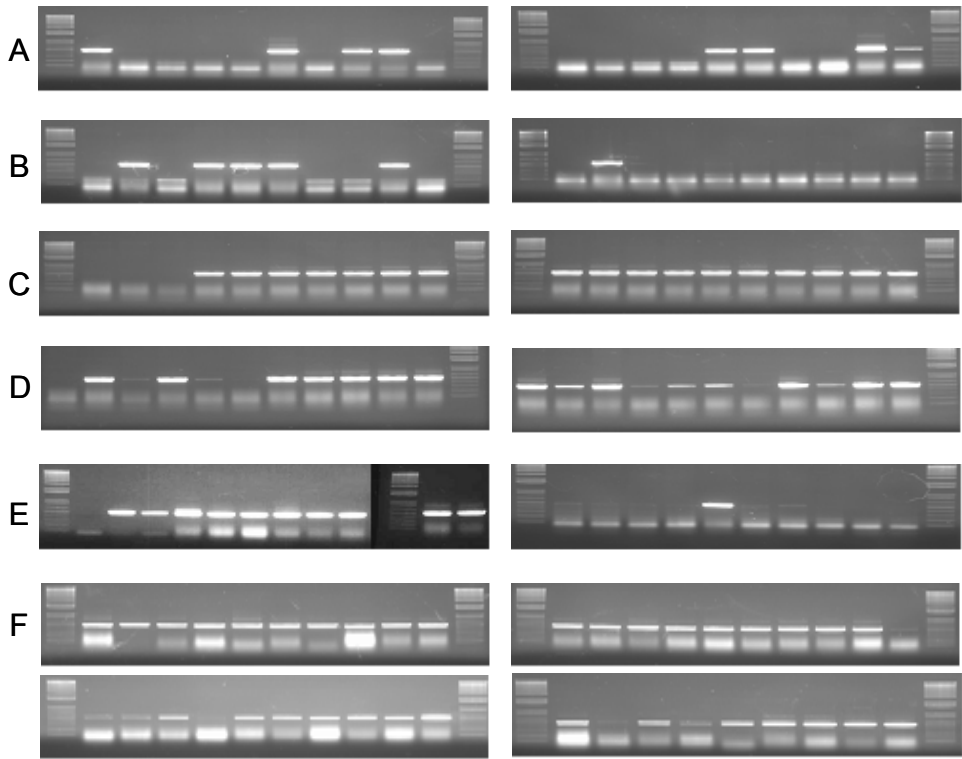


그림 10. SSCP를 위한 RT-PCR (A) Namhae, (B) Boseong, (C) Wando, (D) Geoje, (E) Goheung, (F) Jeju.

3. 바이러스의 변이 구조 분석

SSCP를 수행한 결과 남해지역은 a, b, c, d pattern의 4개 haplotypes으로 나눌 수 있었다 (그림 11-A). 가장 많은 것은 d type (3개)이었고, 적은 것은 b type (1개) 이었다. 보성지역에는 b, c pattern을 관찰하였다 (그림 11-B). 남해지역과 달리 b type이 4개로 가장 많았고 (67%), c type이 2개로 나타났다. 보성지역에 분포하는 CTV는 남해지역과 중복되어 있음을 알 수 있었다. 완도지역에서는 i, j, k, l, m pattern의 5개 haplotypes을 관찰하였다 (그림 11-C). 남해와 보성지역과 전혀 다른 type으로 복합 감염된 개체가 많은 것을 확인할 수 있었다. 거제지역에서는 e, f, g, h pattern의 또 다른 haplotypes을 얻을 수 있었다 (그림 11-D). 이 가운데 h type이 가장 많았으며 (38%), f type이 상대적으로 가장 적었다 (15%). 전체적으로 3개 이상의 bands를 나타내는데 복합 감염된 것이 많음을 알 수 있다. 고흥지역에서는 f, g, m, n, o, p pattern의 가장 다양한 type이 존재하고 있음을 확인하였다 (그림 11-E). o type이 5개로 가장 많았으며 (45%), 나머지 type은 o type에 비해 적은 수로 존재하였다. 제주지역에서는 h, i, m, n, p pattern의 haplotypes가 존재하고 있음을 확인하였고, n type이 가장 적게 나타났으며 (7%), 그 외 다른 haplotype은 비슷한 빈도를 나타내었다 (그림 11-F).

수세가 약하고 stem-pitting 증상이 뚜렷한 샘플에서는 3개 이상의 bands로 분리되는 공통적인 SSCP pattern을 나타내었다. 유자나무의 외부증상 (수령, 수세, stem-pitting 발현 정도)과 SSCP pattern을 비교한 결과를 표 7에 제시하였다. 우리나라에 분포하는 CTV의 65 haplotypes는 크게 16개 strains로 구분이 가능하였다. 이들의 SSCP 결과를 외부병징 및 염기 서열 분석과 비교한 결과 이들 간의 염기 서열은 90% 이상 같았으나 병원성에는 크게 차이가 있음을 알 수 있었다. 16개의 type strains를 재선발하여 SSCP를 수행하였다. Haplotype i, n, o 등은 2개의 bands로 나타났으며, 나머지 haplotypes에서는 3 ~ 6개의 bands로 나타나 복합 감염되어 있음을 알 수 있었다 (그림 12). 병징의 발현이 심한 것은 단독 감염에 의한 경우도 있으나 많은 경우 복합 감염되어 나타나는 것임을 알 수 있다.

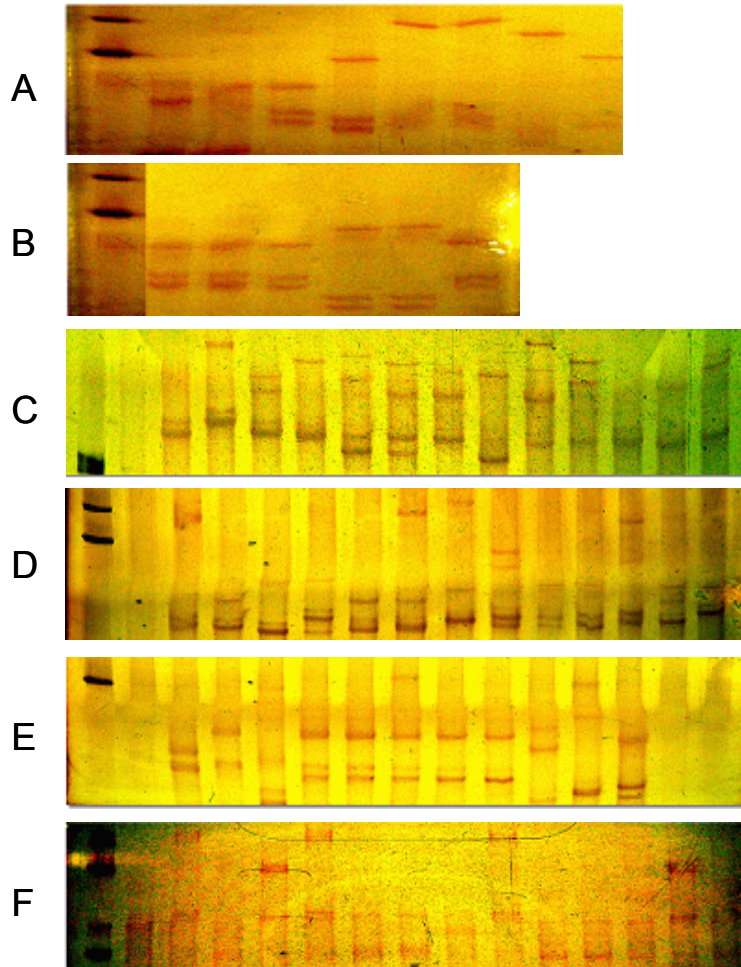


그림 11. (A) Haplotypes detected for the p20 gene of the CTV genome using single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis at Namhae sites (B) Boseong; (C)Wando; (D) Geoje; (E) Goheung; (F) Jeju

Table 7. CTV strain analysis (p20 gene) at the different sites in Korea by SSCP analysis.

No.	Sites	RT-PCR band intensity	SSCP	Symptom		
				Age	Vigor ^a	Stem- pitting ^b
1	Namhae A	++	a	10	++	+
2	Namhae A	++	a	15	+++	+++
3	Namhae A	++	b	15	+++	-
4	Namhae A	++	c	35	+	+
5	Namhae B	++	d	20	++	+++
6	Namhae B	++	d	40	+	+
7	Namhae B	++	d	40	+	-
8	Namhae B	+	c	50	+++	+
9	Boseong A	++	b	15-20	++	+/-
10	Boseong A	++	b	15-20	++	+/-
11	Boseong A	++	b	15-20	++	+/-
12	Boseong A	++	c	15-20	++	+
13	Boseong A	++	c	15-20	++	+/-
14	Boseong B	++	b	20	+	+++
15	Geoje B	++	h	15	+++	-
16	Geoje C	++	e	30	+++	-
17	Geoje C	++	f	30	+++	-
18	Geoje D	++	g	5	++	+/-
19	Geoje E	++	e	15	+++	-
20	Geoje E	++	h	15	+++	-
21	Geoje E	++	h	15	+++	-
22	Geoje E	++	g	15	+++	-
23	Geoje E	++	f	15	+++	-

Table 7. (Continued)

No.	Sites	RT-PCR band intensity	SSCP	Symptom		
				Age	Vigor ^a	Stem- pitting ^b
24	Geoje F	++	h	15	+++	+/-
25	Geoje H	++	h	15	++	-
26	Geoje H	++	g	15	++	-
27	Geoje H	++	e	15	++	-
28	wando B	++	i	15	++	+/-
29	wando B	++	j	15	++	+/-
30	wando B	++	k	15	++	+/-
31	wando B	++	l	15	++	+/-
32	wando C	++	m	15	++	+/-
33	wando C	++	m	15	++	+/-
34	wando C	++	k	15	++	+/-
35	wando C	++	l	15	++	+/-
36	wando C	++	k	15	++	+/-
37	wando C	++	k	15	++	+/-
38	wando C	++	i	15	++	+/-
39	wando C	++	i	15	++	+/-
40	wando C	++	k	15	++	+/-
41	Goheung A	++	n	15	++	+/-
42	Goheung A	++	o	15	++	+/-
43	Goheung B	++	g	15	++	+/-
44	Goheung B	++	o	15	++	+/-
45	Goheung B	++	o	15	++	+/-

Table 7. (Continued)

No.	Sites	RT-PCR band intensity	SSCP	Symptom		
				Age	Vigor ^a	Stem- pitting ^b
46	Goheung C	++	g	15	++	+/-
47	Goheung C	++	o	15	++	+/-
48	Goheung C	++	o	15	++	+/-
49	Goheung D	++	m	15	+	++++
50	Goheung D	++	p	15	+	++++
51	Goheung E	++	f	15	+++	+/-
52	Jeju A	++	n	20	+	+++
53	Jeju A	++	p	20	+	+++
54	Jeju A	++	m	20	+	+++
55	Jeju A	++	m	20	+	+++
56	Jeju A	++	p	20	+++	-
57	Jeju A	++	i	20	+++	-
58	Jeju A	++	i	20	+++	-
59	Jeju A	++	i	20	+++	-
60	Jeju A	++	p	20	+++	-
61	Jeju B	++	h	30	++	+/-
62	Jeju B	++	h	30	++	+/-
63	Jeju B	++	h	30	++	+/-
64	Jeju B	++	m	30	++	+/-
65	Jeju B	++	h	30	++	+/-

^aVigor : Strong (+++), Moderate (++) , Weak (+),

^bStem-pitting : symptom intensity is scored from - to ++++.

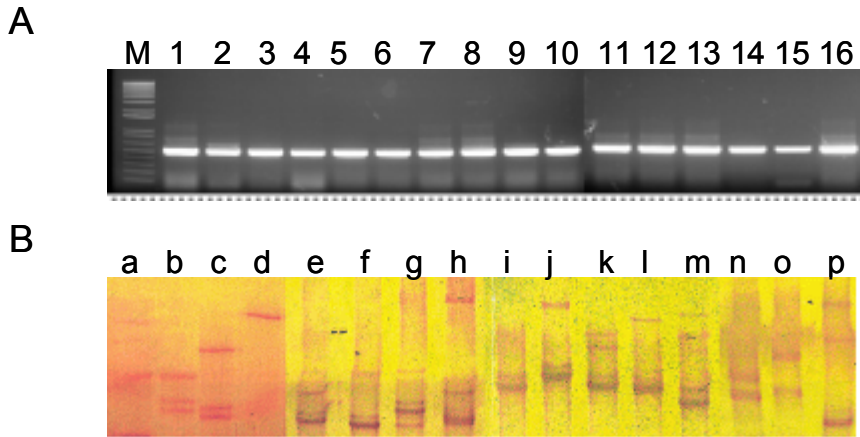


그림 12. A typical pattern of the p20 gene of CTV when analyzed by single-strand conformation polymorphism. (A) PCR-amplified product from yuzu at the different sites, expressing 16 haplo -types by SSCP analysis. (B) SSCP analysis of the cDNA obtained by RT-PCR using specific primers; M, 1kb marker; lane 1, haplotype a; lane 2, haplotype b; lane 3, haplotype c; lane 4, haplotype d; lane 5, haplotype e; lane 6, haplotype f; lane 7, haplotype g; lane 8, haplotype h; lane 9, haplotype i; lane 10, haplotype j; lane 11, haplotype k; lane 12, haplotype l; lane 13, haplotype m; lane 14, haplotype n; lane 15, haplotype o; lane 16, haplotype p. SSCP analysis was performed by electrophoresis under non-denaturing conditions in 7.5% acrylamide gels, at 4°C, and 200 V for 18 h.

위의 결과를 표8에 제시하였다. h type이 65개 중 9개로 가장 많이 나타났으며 (14%), j type이 1개로 가장 적게 나타났다 (2%). 제주와 고흥지역은 여러 종류의 haplotype이 혼재되어 있음을 알 수 있었고, 보성지역의 2개 strain은 남해지역과 혼재되어 나타나는 양상을 보였다. 제주지역에서는 새로운 haplotype이 나타나지 않았으며, 대부분 육지의 남해안 지역에 존재하는 haplotype과 공통적으로 혼재되어 있음을 볼 수 있었다. 이는 유자나무 접수가 대부분 남해안 지역에서 수입해 오면서 바이러스도 함께 감염되어 유입되어 온 것으로 추정된다.

Table 8. Distribution of SSCP haplotype p20 gene at the different sites, southern province and Jeju Island.

	Total	Haplotypes (p 20 gene)															
		a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p
Namhae	8	2	1	2	3												
Boseong	6		4	2													
Geoje	13					3	2	3	5								
Wando	13									3	1	5	2	2			
Goheung	11						1	2						1	1	5	1
Jeju	14								4	3				3	1		3
Total	65	2	5	4	3	3	3	5	9	6	1	5	2	6	2	5	4

국내에서 수집한 CTV 16개 haplotypes의 유연 관계를 분석한 결과 A (e, n, o), A' (b, d, g, h, i, p), B (a, c, m), C (f, j, k, l)의 4 그룹으로 나눌 수 있었다 (그림 13). 이에 기초하여 외국에서 기 보고된 CTV strains와의 유연 관계를 분석하였다 (그림 14). A 그룹 (e, n, o)은 T315, T362P1, 190, T309, T300, T385, T340, T311, T398P2 등과 가장 근접하였고 A' 그룹 (b, d, g, h, i, p)은 T405P2, T398P1, T405P1, T346, T373 등과, B 그룹 (a, c, m)은 DS2CT, Seedling Yellow, T-36 등과, 그리고 C 그룹 (f, j, k, l)은 386P1, 65P1, 519P1 등과 가장 가까웠다. A와 A' 그룹에서는 대부분 스페인에서 존재한다고 보고된 strain이 많이 포함되어 있었으며, B 그룹은 스페인, 일본, 시실리아 등에서, 그리고 C 그룹에서는 이집트, 미국(캘리포니아), 스페인 등에서 보고된 strain등과 같은 그룹 내에 속해 있었다. 따라서 우리 나라에서 분석한 CTV isolate (16개의 haplotype)들이 스페인, 미국, 이집트, 일본 등 외국의 여러 나라에서 보고된 strain 등과 혼재되어 있음을 알 수 있으며, 이는 감귤이 다른 원예작물에 비해서 생산량이 많으며 다른 나라와의 수·출입이 활발하게 이루어지는 바, 외국의 여러 나라에서 재배되는 과정에서 감귤 내에 바이러스가 감염된 상태로 우리 나라로 유입되어 온 것으로 판단되어진다.

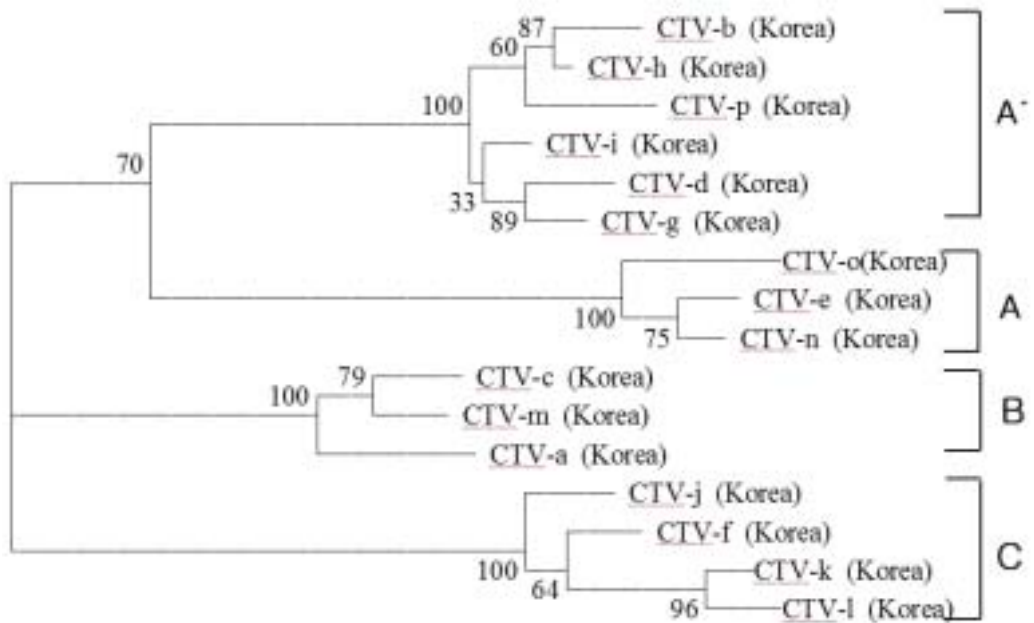


그림 13. Phylogenetic dendrogram of Korean isolates on the basis of 16 haplotypes sequences. The branching pattern was produced by the neighbor-joining method. The numbers at the nodes indicate the levels of the bootstrap support based on a neighbor-joining analysis of 1,000 resampled data sets.

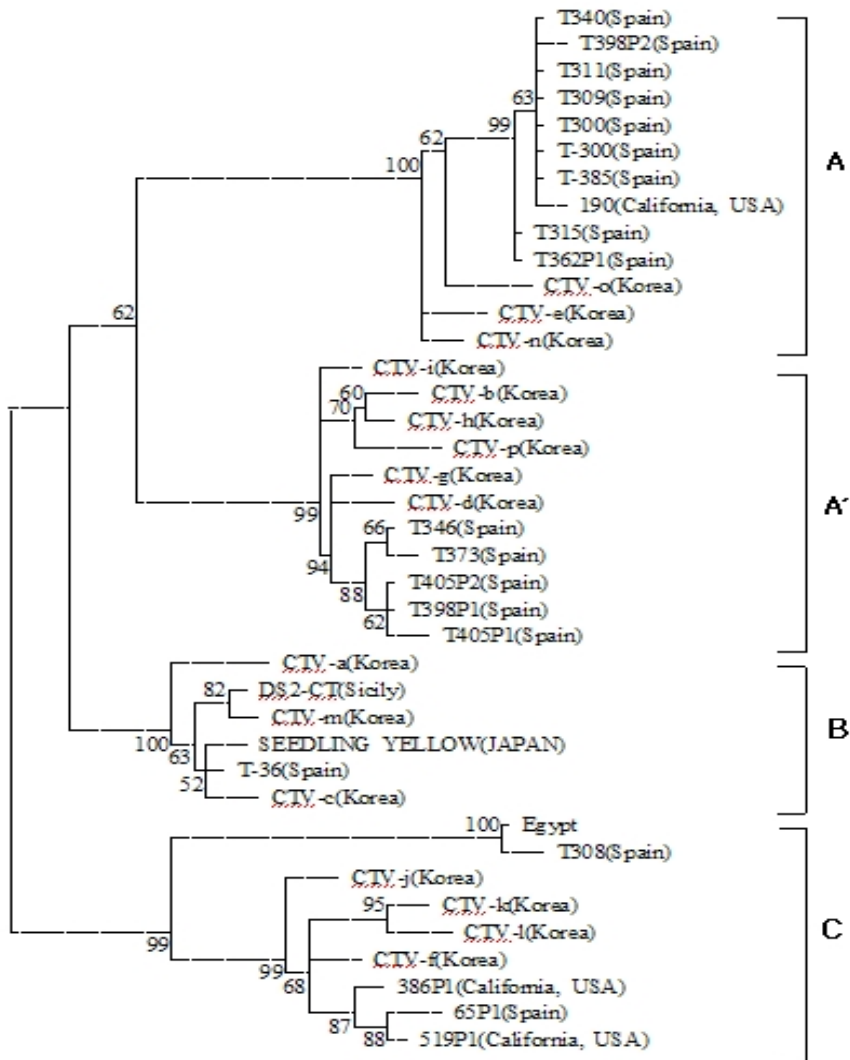


그림 14. Phylogenetic tree based on a comparison of the p20 gene sequences for citrus tristeza virus. The branching pattern was generated by the neighbor-joining method (Saito and Nei, 1987). The numbers at the nodes indicate the levels of bootstrap support based on a neighbor-joining analysis of 1,000 resampled data sets.

표 9. Comparison of symptom of yuzu(*C. junos*) and nucleotide sequence in 17 different haplotypes.

Group	Haplo type	Sample No.	symptoms			Sequence group	regions
			years	vigor	Stem-pitting		
1	a	2	10-15	M	+++	C	Namhae
2	b	5	15-20	M-S	+?-	A	Namhae, Boseong
3	c	4	15-35	W-M	+	C	Namhae, Boseong
4	d	3	20-40	W-M	+++	A	Namhae
5	e	3	15-30	M-S	-	B	Geoje
6	f	3	15-30	M-S	-	D	Geoje, Goheung
7	g	5	5-15	M	+?-	A	Geoje, Goheung
8	h	9	15-20	S	-	A	Geoje, Jeju
9	i	6	15-20	M	+?-	A	Wando, Jeju
10	j	1	15-20	M	+?-	D	Wando
11	k	5	15-20	M	+?-	D	Wando
12	l	2	15-20	M	+?-	D	Wando
13	m	6	15-20	W-M	+	C	Wando, Goheung Jeju
14	n	2	15-20	M	+?-	B	Goheung, Jeju
15	o	5	15-20	M	+?-	B	Goheung
16	p	4	15-20	W	+++	A	Goheung, Jeju

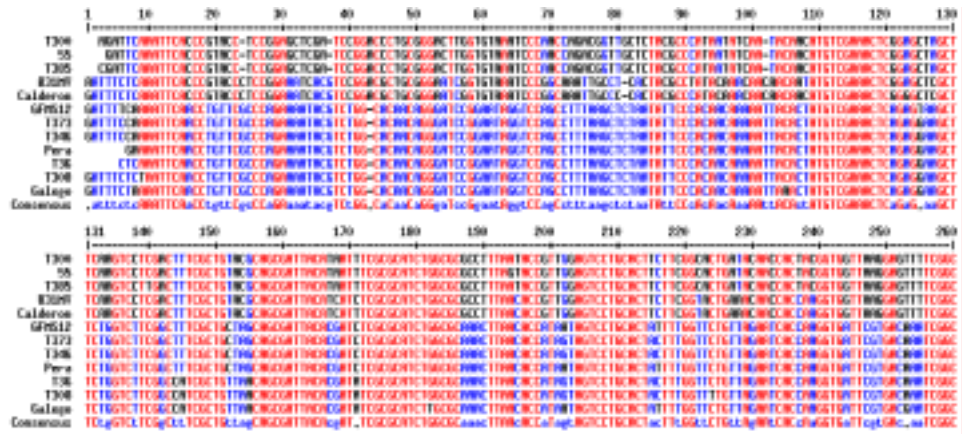
4. 약독 바이러스를 이용한 획득 저항성 유도

가. 약독 바이러스의 선발

1) PCR 방법을 이용한 약독 바이러스의 선발

약독 바이러스를 선발하기 위한 primer를 제작하기 위해 CTV의 염기 서열을 분석하였다. CTV의 mild strain과 severe strain의 전체 genome을 분석한 결과 5' UTR region 에서 변이가 존재함을 확인할 수 있었다 (그림 15-A). Forward primer는 mild / severe strain의 각각에 특이적으로 결합하도록 2종류로 제작하였고 reverse primer는 mild / severe strain 모두에 대해 결합할 수 있도록 제작하였다. 이와 같이 제작한 primer를 사용하여 mild strain과 severe strain을 구분할 수 있었다 (그림 15-B).

(A)



(B)

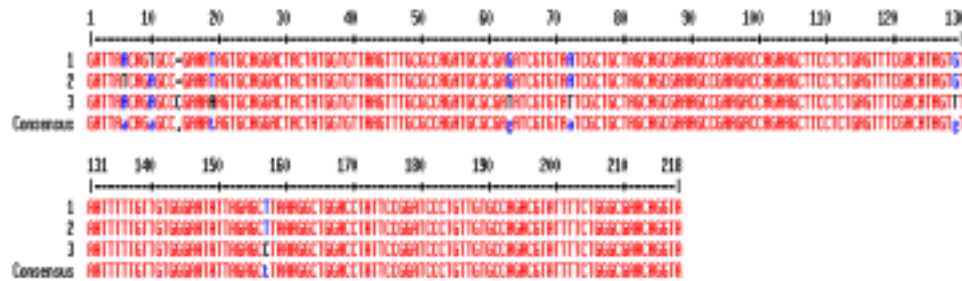


그림 15. (A) Mild strain과 severe strain의 5' UTR region의 염기 서열 분석 결과. T300-Calderon은 대표적인 mild strain, GFMS12-Galego는 대표적인 severe strain이고 GenBank에 등록된 서열을 이용하였다. 앞부분에 차이가 나는 것을 알 수 있는데 크게 검정색표기와 파란색표기로 대별된다. 검정색은 mild strain 간에 파란색은 severe strain 간에 상동성이 있는 것을 나타낸다. (B) mild 와 severe strain 각각에 특이적으로 결합하는 primers를 이용해 PCR 후 염기 서열 확인

2) SSCP 분석을 통한 약독 바이러스의 선발

SSCP 방법을 이용한 국내 감귤 바이러스의 수집과 조기 정밀 진단 방법을 확립하는 과정에서 축적된 기술과 결과를 이용하여 약독 바이러스를 선발하였다. 국내에 분포하는 CTV의 hypotypes를 구분하는데 적합했던 p20 유전자 부위와 함께 CP 유전자 부위에 대해서도 SSCP를 실시하여 profile이 일치하는 것을 찾고자 하였다. 난지연구소 소재 유자포장에서 mild와 severe strain을 선정하였다. mild strain 선정은 CTV에 감염된 25년생 유자나무 중에서 stem-pitting, seedling yellows와 같은 외부 증상을 보이지 않으면서 수세가 좋고 건전한 나무를 1차적으로 선정하였고 SSCP analysis를 통해 뚜렷한 2개인 bands를 보이는 나무를 선정하여 접수를 취하였다. severe strain은 CTV에 의한 외부 병징이 뚜렷하고 수세가 약하면서 수량이 떨어지는 나무를 선정한 후 SSCP analysis를 수행한 후 밴드 패턴 수가 5 ~ 6개 다양하면서 복잡하게 나타나는 나무를 선정하였다. 최종적으로 두 개의 mild strain을 선발하였고 (그림 16), 하나의 severe strain을 선발하여 접목함으로써 교차 방어의 효과를 검증하였다.

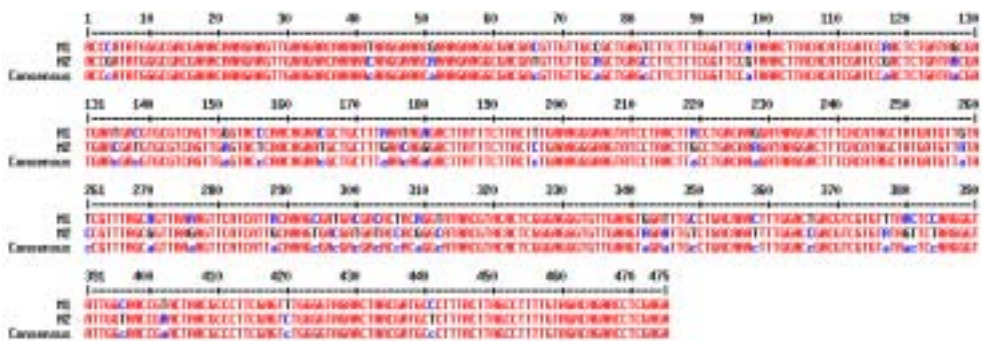


그림 16. 교차 방어에 사용하기 위하여 선발한 mild strains. M1 and M2

무독묘에 mild strain을 접종하고 6개월이 경과한 뒤 severe strain을 접종하였다 (그림 17). 다시 일년이 경과한 후 각 접종과 새로 발생한 가지에서 바이러스감염 여부를 확인하였다.

나. 교차 방어 효과의 검정

나무가 어린 상태이기 때문에 충분한 시간을 두고 관찰하여야 교차 방어의 효과를 확인할 수 있지만 2년이 경과한 현재 외부 병징은 없었다 (그림 17). mild strain과 severe strain 본래의 것과 접종 후 염기 서열 그리고 새로 발생한 가지에서 확보한 바이러스의 염기 서열을 비교해 보았다. YS는 본래의 염기 서열과 일치하였고 YM1은 접종에서 검정되지 않았지만 새로 발생한 가지에서는 YM1의 염기 서열과 동일한 바이러스가 확인되었다 (그림 26). 접수의 YM2는 본래의 것과 일치하였고, YS도 그러하였으며 새로 발생한 가지에서는 YM2의 염기 서열을 확인할 수 있었다 (그림 18). 각각의 SSCP profile과 염기 서열 분석결과가 일치하는 것을 확인하였다.



그림 17. 선발한 두 개의 mild strain M1과 M2를 각각 무독묘에서 유지 및 증식. severe straindh 같은 방법으로 유지 및 증식.

Scions A	Graft A	Sequence homology
M1	M1'	ND ^a
S	S'	S = S' (100%)
	N1	M1 = N1 (100%)

^a Not determined

Scions B	Graft B	Sequence homology
M2	M2'	M2 = M2' (100%)
S	S'	S = S' (100%)
	N2	M2 = N2 (100%)

그림 18. M1과 M2 각각의 교차 방어에 대한 효과를 분석한 결과

5. 바이러스 매개체 분리 및 특성 분석

SDV를 중심으로 바이러스 매개체에 관한 실험을 계획하고 3차 년도에 수행하였다. SDV를 포함하여 아직까지 감귤 바이러스 매개체에 대한 보고가 없었으나 연구실에서 수행한 ASGV 매개체 연구의 일환으로 토양 내 곰팡이를 분리하여 바이러스의 보독율을 조사하였다. SDV 이병주 식물과 주변의 토양으로부터 곰팡이를 분리한 뒤 이들로부터 total RNA를 분리하고 dot blot hybridization 방법으로 바이러스를 보독한 곰팡이를 선별하고자 하였으나 SDV를 보독한 곰팡이를 선별할 수 없었다. 이번 실험에서는 긍정적인 결과를 얻지 못하였으나 앞으로 바이러스 매개체에 대한 연구는 매우 중요하므로 보다 집중적인 연구가 필요하다.

6. 초감염성 초본성 기주식물의 연구를 위한 저항성 유전자 분리

과수 바이러스 연구를 용이하게 하기 위하여 감귤 바이러스의 즙액접종이 잘되는 초본성 기주식물을 개발하고자 17종의 병저항성 관련 유전자를 분리하였다. 분리한 저항성 관련 유전자를 애기장대에 도입하여 antisense 또는 PTGS 방법으로 발현을 억제하여 증식과 순화를 하고자 계획하였다. 그러나 애기장대가 과수 바이러스 뿐 아니라 일반 식물 RNA 바이러스의 기주식물로 적합하지 않다는 보고와 예비실험 결과에 의하여 2차년도 계획서 상에서 수정하여 삭제하였다. 하지만 과수 바이러스를 초본 기주 식물에서 증식시키기 위해서는 보편적으로 사용되고 있는 명아주와 담배 등을 이용한 개발이 필요하다. 애기장대로부터 확보한 17개의 병저항성 유전자의 목록과 primer는 다음과 같다.

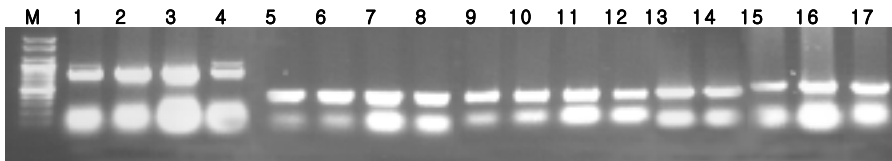


그림 19. 병 저항성 관련 17종 유전자의 RT-PCR에 의한 증폭 및 확인

표 9. 애기장대에서 보고된 병 저항성 관련 유전자 및 본 실험에 사용한 primers

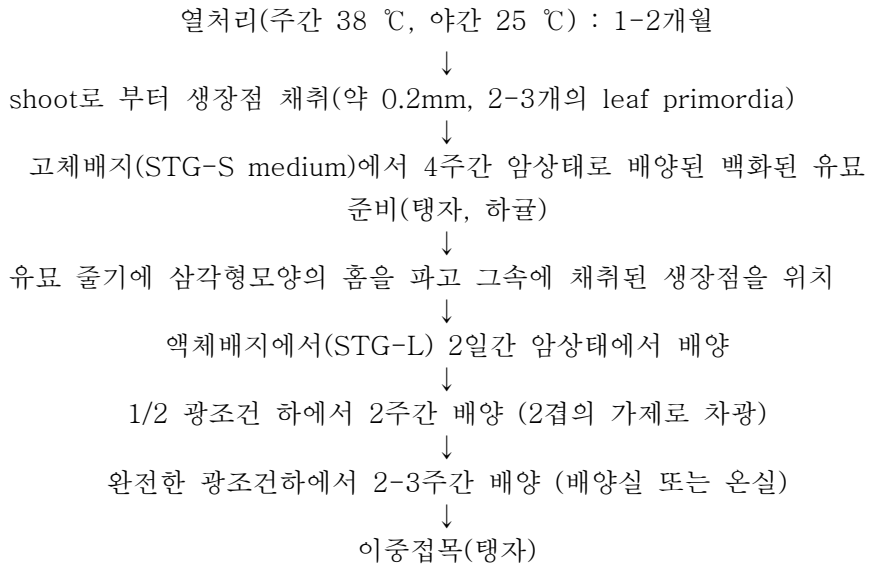
Gene name	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
ndr	atgaataatcaaaatgaaga	ttaacgaatagcaagaata
eds	acgcacttggagagaaaa	ggcttgacacttggcttct
lsd1	agctgggtgtcatggtgt	ctcaccaacttccgcttc
plc	agaacgcgttccaggtgtct	cttcaggaccattggagagc
aos	gctccgggttgatcactaa	cttaccggcgcattgtttat
lox	accacacggcctgtacttgaggagac	gcaagctcagctctaccaccaacgg
cat	ccttacaagtatcgccagctagtt	cacgtagtgtgagcttggcagctttg
pld	gcagcattgcctgtagga	attgcaccgatttcagttct
cpr5	ggatgttctcgaagctgcat	gcaagctctctccattcacc
vsp	ctcctcgaatcgaacacccat	ggagcttaaaaacccttc
sam2	caagattgggtcgtctca	ggggaagtccaggtcgtctc
pr1	tgaatgaaatgctgttcttgg	aattccccggaggatcatcg
npr1	tggaaggtagaaccgcactcatgat	tcaccgacgacgatgagagagtta
pal	aggaatcagctccgattcttggat	agtttgcagacgagattagctcc
gst	ctgagaagaagaagtgaagctttt	taagaagatctcactctctctgcca
pdf1.2	atggataagttgtctccatc	taacatgggacgtaacagataca
pox	tgcatttctctgtcttcaacatc	cgtaggcgtacgtagatcaaaatct

7. 국외 감귤 바이러스 수집 및 증식

국외 감귤 바이러스의 도입과 증식을 위하여 Univ. of Florida와 국립대 만대의 협조로 CTV와 SDV를 분양 받았고, 제주감귤연구센터의 -70C 초저온 냉동고에 보관중이다. 추가적으로 대만에서 바이로이드 감염 조직을 분양받아 무독묘에 접종하였고 격리포장에서 증식 중에 있다. 국내 바이로이드와의 유연 관계를 분석하여 진단과 동정에 활용하며 이를 수입 감귤의 진단에 활용하고자 한다.

8. 무독묘의 생산 및 검정

바이러스 무독묘는 열처리(주간 : 38 °C, 야간 : 25 °C)한 후 경정배양하여 생산하였으며 생산된 무독묘는 곤충의 접근이 차단된 망실에서 보관 배양되고 있다. 현재 생산하여 보관하고 있는 무독 기본묘는 총 135주이다. 이들은 철저하게 격리 보관되고 있으며 CTV와 CTLV에 대해서는 RT-PCR에 의해, 그리고 SDV에 대해서는 ELISA에 의해 년 1회 바이러스의 감염여부를 검사하고 있다.



<경정배양 과정>



그림 20. Virus-free stock 제작을 위한 shoot tip micrografting

- A: 2개의 leaf primordia를 shoot tip
- B: 백화된 탱자묘목에 삼각형의 홈을 파고 그 위에 안치된 shoot-tip
- C: 액체배지에서 배양되고, shooting이 되고 있는 경정배양체
- D: 2년생 탱자 대목에 이중 접목된 모습.

Table 10. Number of virus free stocks and cultivars

그룹	품종	개체 수
온주밀감	암기조생	4주
	상야조생	4주
	애월조생	5주
	다윈	4주
	일남일호	6주
	궁본조생	5주
	대포조생	2주
	궁천조생	70주
탄골	부지화	7주
	남향	1주
탄제린	윙킹만다린	3주
기타	유자	24주
총계		135주



그림 21. 무독묘 증식 및 재배를 위한 감귤연구센터의 온실 현황

무독묘를 생산하기 위한 감귤 시료의 바이러스 감염 상태를 확인하기 위하여 주관연구기관에서 제작한 항체와 일본에서 도입한 항체를 이용하여 ELISA를 이용하여 바이러스의 감염 여부를 확인하였다.

Table 11. Citrus cultivars used as sources of shoot-tips and infections of citrus virus shown by indexing with ELISA.

Isolate	Cultivar	Virus infection			Isolate	Cultivar	Virus infection		
		CTV	SDV	CTLV			CTV	SDV	CTLV
MS-1	ESM	+	-	+	MS-23	YZ	+	+	-
MS-2	YZ	+	-	+	MS-24	YZ	+	+	-
MS-3	Shiranuchi	+	-	+	MS-25	YZ	+	-	-
MS-4	YZ	+	-	-	MS-26	YZ	+	-	+
MS-5	ESM	-	+	-	MS-27	YZ	+	-	+
MS-6	YZ	+	-	+	MS-28	YZ	+	-	-
MS-7	YZ	+	-	+	MS-29	ESM	-	+	-
MS-8	YZ	+	-	-	MS-30	YZ	+	-	-
MS-9	ESM	+	+	-	MS-31	YZ	+	-	+
MS-10	ESM	-	-	+	MS-32	YZ	+	-	+
MS-11	YZ	+	-	+	MS-33	ESM	+	+	-
MS-12	YZ	+	+	-	MS-34	ESM	-	+	-
MS-13	ESM	+	-	+	MS-35	YZ	+	-	+
MS-14	YZ	+	-	-	MS-36	ESM	-	+	-
MS-15	YZ	+	-	+	MS-37	YZ	+	-	-
MS-16	ESM	+	-	+	MS-38	YZ	+	-	-
MS-17	YZ	+	-	-	MS-39	YZ	+	-	-
MS-18	YZ	+	-	+	MS-40	Shiranuchi	+	-	-
MS-19	YZ	+	-	+	MS-41	Shiranuchi	+	-	-
MS-20	ESM	+	-	+	MS-42	Shiranuchi	+	-	+
MS-21	ESM	-	+	-	MS-43	Shiranuchi	+	-	+
MS-22	YZ	+	-	+	-	-	-	-	-

ESM; early satsuma mandarin, YZ; yuzu, Virus infections were evaluated by ELISA, +; positive reaction, -; negative reaction, CTV; citrus tristeza virus, SDV; satsuma dwarf virus, CTLV; citrus tatter leaf virus

무독묘를 생산하기 위해 감귤 바이러스와 사용한 감귤 품종간의 관계를 조사한 결과 SDV의 경우는 사용한 모든 품종에서 좋은 결과를 보여주었으나 CTV의 경우는 생존율이 높지 않았으며 Shiranuhi 품종에서 80%로 가장 좋았다. 반면 CTLV의 경우는 Early satsuma mandarin에서 100% 생존율을 보여주었으나 다른 품종에서는 80-67%로 낮았다.

Table 12. Percentage of virus-free stocks by citrus viruses.

	CTV	SDV	CTLV
Early satsuma mandarin	66.7 (4/6)	100 (7/7)	100 (5/5)
Yuzu	76.9 (20/26)	100 (4/4)	80 (12/15)
Shiranuhi	80 (4/5)	-	66.7 (2/3)
Total	5.6 (28/37)	100 (11/11)	82.6 (19/23)

무독묘 생산을 위하여 micorgrafting에 사용하는 shoot tip의 크기에 따른 생존율과 바이러스 감염 여부를 확인한 결과 CTV의 경우에 shoot size가 0.3 mm 미만일 때가 무독묘 생산에 가장 좋았으며 shoot tip의 크기가 커질수록 생존율은 높았으나 바이러스 보독율은 높았다.

Table 13. Effects of shoot tip size on successful rates of shoot tip grafting and rates of virus-free plants in citrus tristeza virus.

Cirtus	Shoot size	% of successful grafting	% of virus free plants
CTV	less than 0.3 mm	16.7	100
	0.3 - 0.5 mm	31.7	85.7
	0.5 - 0.7 mm	42.8	66.7

9. 약독 바이러스 선발

약독계 바이러스를 이용한 교차 보호는 진딧물에 의해 주로 매개되는 CTV에 대해서 현재 많이 사용되고 있으며, 특히 최근 재배면적이 급증하고 있는 부지화에서는 약독계 바이러스인 CTV M16A이 집중된 묘목이 고가로 일본으로부터 수입되고 있는 실정이다. 본 시험에서도 약독계 바이러스를 선발하고자 CTV이병주들 중에서 병징이 없거나 극히 미약한 병징을 보이는 개체들 6주에 대해서 1차적으로 선발하여 생물 검정을 실시하였다.

CTV에 대한 약독계 바이러스의 선발과 이 약독계 바이러스를 이용한 cross-protection에 대한 연구 보고는 주관연구기관과 병행하여 수행하였으며 이에 대한 결

과는 주관연구기관에서 정리하였다.

10. 바이로이드에 대한 보고

가장 작은 식물 병원체로 알려져 있는 바이로이드는 외피단백질이 없고 막대기 모양(rod-shape)의 구조를 하고 있으며 원형의 한가닥 RNA로 구성되어 있는 246-463nt 크기의 병원성 물질이다 (Duran-Vila 등, 2000). 지금까지 감귤에서 병징을 유도하는 것으로 보고된 바이로이드는 7종이 알려져 있다 (표 14).

Table 14. Symptoms caused by citrus viroids and its size.

종 류	크 기 (nt)	병 징	
		Stunting	Leaf epinasty
CEVd	370-375	severe	severe
CBLVd	315-329	mild	random
CVd-I-LSS	325-330	mild?	?
HSVd	295-303	-	-
CVd-III	291-297	moderate	general
CVd-IV	284-286	moderate	random
CVd-OS	329-331	?	?

(Arizona 861-S1 Etrog citons (*Citrus medica*) 에서의 병징)

부지화는 1972년에 일본 과수시험장에서 청견('Miyakawa' wase (*Citrus unshiu* Marc. x 'Trovita' orange(*C. sinensis* Osh.) 과 풍간('Nakano No. 3' ponkan (*C. reticulata*))을 교배하여 만들어낸 품종(Matsumoto, 2001)으로서 우리나라에서는 “한라봉” 이라고 불려지고 있다. 부지화는 90년대 초부터 재배되기 시작하여 최근에는 제주도에서 총 739ha (2003년 기준), 약 1,667여 농가에서 재배되고 있을 뿐만 아니라 남해안 일대에서도 재배가 증가되고 있는 고품질의 감귤이다. 최근 부지화 품종에서 대목부위의 겉껍질이 벗겨지고 수세가 약화되는 전형적인 바이로이드 피해 증상이 발견되고 있으며 이들로부터 바이로이드를 동정하였다 (그림 22).

제주 감귤에 발생하는 바이로이드 종류를 알아보기 위하여 바이로이드의 전형적인 bark scaling 증상을 보이는 감귤 나무로부터 RT-PCR를 이용하여 바이로이드 종류를 검정하였다. RT-PCR에 사용한 프라이머는 Ito 등(2002)이 개발한 것을 사용하였다 (표 15).

(A)



(B)



그림 22. (A) Viroid rkaftua 증상중의 하나인 Bark scaling 모습, (B) Viroid 감염에 따른 수세 약화 및 황화 증상

Table 15. Primers for RT-PCR analysis of citrus viroids

Name	Target	Product size (bp)
CEV-AM3(-) CEV-AP3(+)	CEVd	371
CBLV-CM2(-) CBLV-AP2(+)	CBLVd	233
CB2-CB(-) CB2-AP(+)	CVd-I-LSS	247
CV3-AM(-) CV3-AP(+)	HSVd	302
CV2-AM(-) CV2-AP(+)	CVd-III	271
CV4-AM3(-) CV4-AP4(+)	CVd-IV	209
CB3-AM6(-) CB3-AP(+)	CVd-OS	166

RT-PCR를 수행하기 위하여 각각의 나무로부터 0.3-0.5 g의 새순을 채취하여 Trizole reagent를 이용하여 total RNA를 추출하여 사용하였다. 5 μ l의 RNA로부터 cDNA를 합성하여 주형 DNA로 사용하였으며 이것을 1-500배 희석하여 사용해본 결과 100배 희석된 cDNA에서도 뚜렷하게 바이로이드 유전자가 증폭됨을 알 수 있었다. 또한 Mg의 농도에 따른 PCR 조건을 알본 결과 2.5 mM에서 가장 뚜렷하게 바이로이드 유전자를 증폭시켰지만 1mM에서도 충분히 증폭됨을 알 수 있었다. 프라이머의 annealing temperature도 65 $^{\circ}$ C에서 가장 뚜렷하게 증폭되었다.

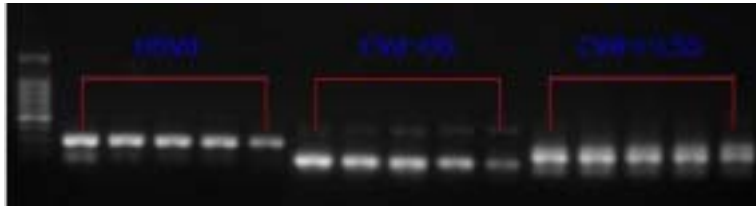


그림 23. cDNA 양에 따른 PCR 최적화. 각 바이러스의 외쪽부터 1, 1/10, 1/100, 1/500배

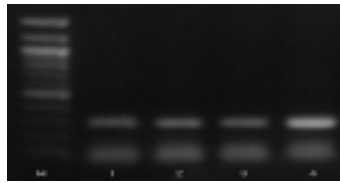


그림 24. Mg농도에 따른 최적화. lane 1, Mg²⁺ 1mM; 2, 1.5 mM; 3, 2.0mM; 4, 2.5 mM

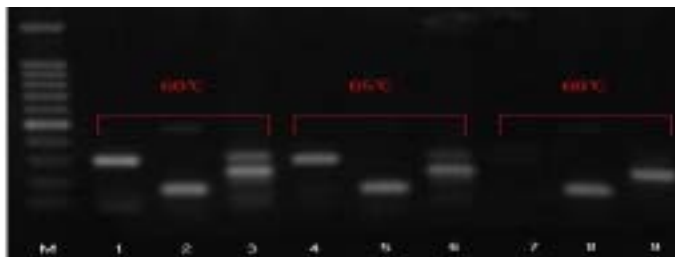


그림 25. Annealing Temperature에 따른 PCR 최적화
Lane 1, 4, 7 : HSVd, lane 2, 5, 8 : CVd-OS, lane 3, 6, 9 : CVd-I-LSS

이들 결과를 종합하여 감귤나무로부터 바이로이드를 검정하기 위한 PCR 조건은 94 °C에서 10 분간 first denaturation 후 94°C에서 30초동안 denaturation 하고, 65°C에서 10초동안 Primer annealing 한뒤, 72°C에서 10초동안 Extension하는 방법으로 35 cycle를 수행하였다. 마지막 extension를 72 °C에서 5분간 실시하였다.

<바이로이드 동정>

위의 프라이머들을 이용하여 제주도내 감귤로부터 바이로이드를 동정한 결과 HSVd, CVd-OS 그리고 CVd-I-LSS 3개 종이 동정되었으며 또한 CBLVd도 동일한 크기의 밴드가 증폭됨을 확인하였다. 각각 증폭된 유전자의 염기서열을 조사한 결과 평균 97-100%의 homology를 보여 이들이 감귤에서 분리 보고된 viroid임을 확인하였다.



그림 26. 토핑-L(CV-2) isolate의 PCR 분석 및 염기서열 분석

- Hop stunt viroid isolate CVdIIa205-2-1 : 100% homology
- Hop stunt viroid isolate CVdIIa205-2-4 : 100% homology
- Hop stunt viroid isolate CVdIIa54-2-1 : 100% homology



그림 27. 토평 1-2(CB-3) 및 토평 2-2(CB-3) isolate의 PCR 분석 및 염기서열 분석

- Citrus viroid OS variant 3Y3-S : 97% homology
- Citrus viroid OS variant 10SA1-IW : 97% homology
- Citrus viroid OS variant TS : 96% homology
- Citrus viroid OS variant TS : 100% homology
- Citrus viroid OS variant 3Y3-S : 99% homology
- Citrus viroid OS variant 10SA1-IW : 99% homology

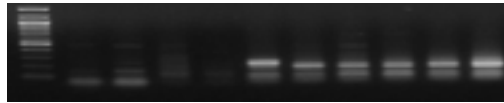


그림 28. 하레-3 isolate와 하레-6 isolate의 PCR 분석 및 염기서열 분석

- Citrus viroid-I-LSS variant TS : 100%
- Citrus viroid-I-LSS variant 9K-S : 98%
- Citrus viroid-I-LSS : 98%
- Citrus viroid-I-LSS variant TS : 100%
- Citrus viroid-I-LSS variant 9K-S : 98%
- Citrus viroid-I-LSS : 98%

<실제 농가로 부터의 바이로이드 검정>

실제 농가로부터 바이로이드의 감염 여부를 조사하기 위해 20개 과원의 36주를 조사한 결과 12개 과원 및 포장의 21주로 부터 바이로이드가 검출되었다 (표 16). 하지만 조사 과원 중에는 바이로이드 피해 증상으로 보고된 농가도 포함되어 있기 때문에 추후 실질적인 조사가 이루어 져야 할것으로 생각된다.

표 16. Survey analysis of citrus viroid occurrence in Jeju island

수집장소	품종	조사 주수	Bark scaling	검출바이로이드	수세
위미 A	부지화	2	+	HSVd	하
위미 B	부지화	2	+	HSVd, CVd-I-LSS, CVd-OS	극히 안 좋음
토평 A	부지화	2	+	HSVd, CVd-OS	중
토평 B	부지화	2	+	HSVd	중
하례 A	자몽	1	+	-	
제주시 A	하귤	1	+	-	
안덕 A	부지화	2	-	HSVd	
하효 A	부지화	1	-	-	
보목 A	부지화	2	+	-	중
하례 B	부지화	1	-	HSVd	중
하례 C	부지화	1	+	HSVd, CVd-I-LSS, CVd-OS	매우 약함
남원 A	부지화	1	-	HSVd, CVd-OS	하
광령 A	부지화	3	+	HSVd	중
의귀 A	세또까	2	-	-	황화 증상
태흥 A	부지화	2	-	HSVd, CVd-I-LSS, CVd-OS	강
	세또까	1	-	-	황화증상
남원 B	부지화	1	-	HSVd, CVd-I-LSS, CVd-OS	매우약함
상대 A	부지화	2	-	-	M16 묘목
하례 D	부지화	2	-	HSVd, CVd-I-LSS, CVd-OS	중
서귀포시농 업기술센터	부지화	4	-	-	M16 묘목
조사포장 수 : 20, 총 조사 주수 : 36주, 바이로이드 검출 주수 : 21주					

11. 적요

감귤 바이러스에 의한 병해는 강한 병원성을 갖는 바이러스 단독 감염으로 인해 발병하기도 하지만 많은 경우 한 개체 안에 여러 strain이 존재한 결과로 발병하는 경우가 더 많다. 따라서 소량으로 존재하는 바이러스까지 진단할 수 있는 진단법의 개발은 필수적이다. 국내 감귤 바이러스 (CTV, CTLV, CiMV, SDV)의 진단에 적합한 primers를 제작하였고, 한 번의 반응으로 복합 감염 여부를 조사할 수 있는 조건을 확립하였다. CTV, CTLV 및 CiMV를 대상으로 dot-blotting hybridization 방법을 이용하여 복합 감염을 분석할 수 있도록 하였다. CTV, CTLV 그리고 CiMV에 대한 CP 유전자를 발현시켜 항원으로 사용하여 항체를 이용한 진단을 수행하였다. 그러나 RT-PCR이나 dot-blot hybridization을 이용한 진단이 효과적이었다.

RT-PCR 방법은 정확한 진단이 가능하지만 염기 서열을 분석하는 과정을 거치지 않으면 감염된 바이러스의 특성을 알 수가 없다. 염기서열 분석 과정을 거친다고 해도 변이가 심하지 않거나 특징 지을 수 있는 변이 부분을 결정하기 어려울 때에는 바이러스의 분류가 더욱 모호해진다. SSCP 방법을 활용하면 한 번에 많은 시료를 다룰 수 있는 것은 물론 염기 서열상으로는 크게 차이가 없던 변이도 구조적인 차이에 의해 다르게 나타나기 때문에 특성에 따른 세분화된 분류가 가능하다 (Sambade 등, 2002; Spinardi 등, 1991).

SSCP analysis 방법을 이용하여 주요 감귤 바이러스 중 우리 나라에 가장 많이 감염되어 있는 CTV를 대상으로 바이러스의 변이 구조를 분석하였으며, 더불어 mild strain과 severe strain을 구분할 수 있도록 연구를 추진하였다. 제주와 남해 일대의 6개 지역을 선정하여 조사한 결과 142개 중 65개가 CTV에 감염되어 있었으며, a ~ p로 구분할 수 있는 16개의 haplotypes를 얻을 수 있었다. 16개의 haplotypes을 외부병징과 비교하여 분석한 결과 바이러스의 전형적인 병징인 스템피팅, 수세약화, 궤양성 호반증 등을 보이는 등 severe한 바이러스 증상을 보이는 haplotype은 a, c, d, m, p 등으로 나타났다. haplotype a, c, m인 경우에는 외부 병징과 기존의 strain과의 염기서열을 분석한 결과 severe strain으로 나타나 기존의 보고와 유사한 결과를 나타내었으나 haplotype d, p의 경우는 새로운 severe strain으로 검토되어 추후 세밀한 검토가 요망되었다.

감귤 바이러스에 대한 교차방어를 위해 유자나무에서 외부병징 발현 정도 및 SSCP 패턴 분석에 의하여 감귤바이러스에 대한 mild 및 severe strain을 선별하였다. 유자나무를 대상으로 열처리 및 micrografting 방법을 병행하여 무독묘를 만든 후 mild strain 및 severe strain을 접종하여 CTV strain을 감염시켰다. cross-protection 발현 양상을 분자생물학적으로 검정 중에 있다.

본 협동 과제를 수행하면서 수행한 연구 결과를 정리하면 다음과 같다.

- 국내 제주도를 비롯하여 국내 남해안에서 감귤 바이러스를 수집하였다.
- 대만과 미국에서 감귤 바이러스 감염 조직을 수집하여 증식 및 보관하고 있다.
- 감귤 바이러스에 대한 무독묘를 다양한 감귤 품종을 이용하여 생산하였다.
- CTV의 경우는 약독계 바이러스를 분리하여 이제까지 확립되지 않은 cross protection 실험을 수행하였으며 현재까지의 연구 결과로는 긍정적인 protection 효과를 보았으나 앞으로 4-5년 더 관찰을 할 필요가 있다.
- 이제까지 국내에서는 보고되지 않은 감귤 바이로이드의 분리 및 동정을 최초로 수행하였으며 이는 앞으로 감귤 고품질화에 매우 중요한 자료를 제공할 것이다.

제 4장. 목표 달성도 및 관련 연구 분야에의 기여도

구분	평가의 착안점 및 기여도		
	착안사항	달성도	관련분야의 기여도
1차년도 (2001)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 바이러스 수집 ○ 바이러스 유전자의 분리 ○ 약독 바이러스의 선발 ○ 바이러스 무독묘 생산 	100 100 90 90	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내외 감귤바이러스의 확보 및 약독 바이러스의 선발을 위한 SSCP 기술의 확립 ○ 바이러스 감염 조직 및 유전자의 확보
2차년도 (2002)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 바이러스 유전자 분리 ○ PCR을 이용한 바이러스 진단 기술의 확립 ○ 바이러스 단백질의 분리 (항원용) ○ 항체를 이용한 바이러스 진단 기술의 확립 ○ 바이러스 초감염성 기주식물의 연구 ○ 약독 바이러스의 선발 	100 100 100 100 0 90	<ul style="list-style-type: none"> ○ 감귤 바이러스의 조기 정밀 진단 기술의 확립과 CTV의 약독 바이러스의 선발 ○ CTV의 제주도 및 남해안 일대의 분포 상황과 유전자 변이 분석
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 약독 바이러스의 생물검정 ○ 바이러스 조기 정밀 진단 기술의 확립 	100 100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 약독바이러스에 의한 cross protection 기술의 도입 ○ 바이로이드의 분리 및 유전자 분석
3차년도 (2003)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 바이러스 저항성 감귤의 생물검정 ○ 바이러스 매개 운반체의 분리 및 동정 ○ 바이로이드의 분리 및 동정 	100 100 100 0 100	<ul style="list-style-type: none"> ○ SDV 매개체의 분리 실험은 곰팡이를 대상으로 매개 여부를 확인하는 실험을 수행하였으나 긍정적인 결과를 확보하지 못함

구분	평가의 착안점 및 기여도		
	착안사항	달성도	관련분야의 기여도
최종 평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 바이러스 조기 정밀 진단 기술의 확립 ○ 바이러스 및 바이러스 유전자 확보 ○ 바이러스 무독묘 확보 ○ 약독 바이러스의 선발 및 응용 ○ 바이로이드의 분리 및 동정 	100 100 100 100 100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 감귤 바이러스 조기 정밀 진단 기술의 확립 ○ 역도 바이러스의 선발과 바이러스 저항성 유도에 활용 ○ 바이로이드의 분리 및 분석 ○ 무독묘의 생산 및 증식

제 5장. 연구 개발 결과의 활용 계획

1. 기술적 측면

- 바이러스 감염 역학과 바이러스의 생활사 및 바이러스 방제에 대한 새로운 개념의 연구를 수행할 수 있다.
- 바이러스의 순화, 항원 재조합 단백질의 생산 및 항체를 제조, 응용하는 기술을 가진 인력의 양성을 통하여 기술의 확산을 기대할 수 있다.
- 국내 과수 바이러스에 대한 특이성 항체 생산의 원천기술을 확보하고 산업체에 이양하면 바이러스 진단 kit의 생산이 가능하다.
- 빠른 시간에 많은 종묘로부터 바이러스의 존재 유무를 진단할 수 있는 과수 바이러스 진단 Kit의 개발로 기타 다른 식물 바이러스의 분리, 동정 및 진단 Kit의 생산을 위한 기술을 축적할 수 있을 것으로 사료된다
- 진단 kit의 대중화를 통하여 우량 종묘를 공급하는 기술의 확립과 첨단 기술의 활용을 통해 우리농업의 생산성 향상에 기여함으로써 첨단기술 개발의 중요성을 대중에게 홍보하게 되는 계기가 될 것이다.
- SSCP를 이용하여 국내 제주도과 남부 해안지대에서 분리한 CTV의 분포와 변이 상태를 확인하였다. 이는 바이러스의 전이 과정과 도입 경로를 추적할 수 있는 단서를 제공할 것으로 보여진다.
- CTV의 약독계 바이러스를 분리하여 cross protection 실험을 수행한 결과 앞으로 3-4-년 다 관찰이 필요하나 현재까지는 긍정적인 결과를 보여주어 약독계 바이러스를 이용한 바이러스 방제 가능성을 보여주었다.
- 국내에서는 처음으로 본 과제를 수행하면서 감귤에서 viroid를 분리하였다.

2. 경제 · 산업적 측면

- 바이러스 진단 후 보급된 무독묘로부터 고품질, 고생산성 과수 생산이 예상되며 이로써 수출 경쟁력이 향상되어 농가의 고소득이 예상된다.
- 국내 바이러스 항체 생산 기술은 부분적으로 연구소와 대학을 중심으로 발전하고 있으나 대부분 의학 분야에 편중되어 있고, 식물바이러스에 대한 항체를 생산하는 연구소와 대학은 그리 많지 않다. 본 과제를 통하여 습득한 식물바이러스 항체 생산 기술을 산업체로에 이양함으로써 고부가 산업의 활로를 모

색할 수 있다.

- 바이러스 진단 Kit는 대부분 수입하고 있는 실정이며 수입 진단 Kit는 국내 과수 바이러스에 대해서 높은 특이성을 보여주지 않는 경우가 있어 국내 바이러스 특이성 항체의 생산이 필요하다. 이로써 국내 과수 바이러스 특이성 항체를 생산 보급하게 되어 보다 정확한 진단이 가능하고 외화 대체효과도 예상된다.
- 약독계 바이러스의 분리를 통하여 바이러스 방제의 한 방법을 확립하였으며 이는 품질 향상에 기여할 것으로 보여진다.
- 감귤 바이로이드의 진단 기술의 확립으로 수입 감귤류의 바이로이드 진단에 활용할 수 있는 기초 기술을 제공할 것이다.

3. 활용방안

제주도 고유 과수인 감귤에 많은 피해를 주고 있는 citrus virus에 대한 조기 정밀 진단 기술을 확립하기 위하여 바이러스 특이성 항체를 생산하고 PCR primer를 제작하여 이를 우량종묘 및 무독묘 생산과 방제를 위한 식물의 진단에 활용하고자 한다. 식물 바이러스에 대한 항체 생산 기술을 확립하여 국내 산업체에 기술 이양을 하고자 한다. 국내 감귤시장 규모의 증가 추세로 볼 때 2001년에는 약 8000억원대로 예상되며 향후 고수의 내수 시장 및 수출 상품으로 개발하기 위해서는 무독묘의 생산이나 선발이 매우 중요하다. 감귤 바이러스 진단 kit의 개발로 감귤나무의 무병화와 급속 대량생산 기술이 개발되면 이를 다른 과수인 배, 사과, 복숭아, 포도, 복숭아, Kiwifruit등 다른 유망과종에도 적용할 수 있을 것으로 기대된다.

4. 추가 연구의 필요성

감귤은 국내에서는 제주도에 국한하여 제주도 전역에서 농장을 중심으로 재배되어 왔으며 접목을 통하여 새로운 품종의 도입이 반복적으로 이루어져 바이러스의 전이가 매우 빠르며 또한 하나의 과수에 여러 개의 바이러스가 복합적으로 감염이 되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 바이러스 방제를 위하여 우선 감귤의 품종 별로 무독묘의 개발을 수행하였고 바이러스의 조기정밀 진단 기술

을 추적하였다. 또한 CTV를 중심으로 역독 바이러스를 선별하여 cross protection의 가능성을 확인하였다.

하지만 지난 3년간의 연구 결과와는 별도로 감귤 바이러스의 매개에 관한 연구가 전혀 되어 있지를 않아 이에 대한 집중적인 연구가 필요하다. 매개체의 분석이 없이는 방제에 대한 효과가 반감 할 것이고 방제가 불가능하기 때문이다.

또한 3차 년도에 감귤에서 다양한 바이러스의 감염과 더불어 여러 종류의 바이로이드가 감염 되어 있는 사실을 확인하여 아직까지 국내에서는 보고된 바 없는 감귤 바이로이드에 관한 체계적인 연구가 필요하다.

제 6장. 해외 과학 기술 정보

항체에 기초한 ELISA 방법은 상대적으로 용이하고 간편하게 바이러스를 검정할 수 있기 때문에 보편적으로 많이 사용되어 왔다 (Aramburu et al., 1991; Rocha-Pena et al., 1991; Niblett et al., 2000). 그러나 최근에는 RT-PCR 방법의 사용이 일반화되고 있는 추세이다 (Lair et al., 1994; Mattew, 1995; Ito et al., 2002). RT-PCR에 기초한 방법은 항체에 기초하여 개발된 검정법보다 감도가 좋고 활용의 범위가 넓기 때문이다. 특히, 과수 바이러스는 계절에 따른 변화가 심하고 불안정한 특성을 갖는데 RT-PCR 방법은 소량의 바이러스도 검정이 가능하므로 이러한 제약을 받지 않고 활용 가능하다. 최근에는 real-time PCR 방법이 개발되어 식물 바이러스의 검정에 활용되고 있다 (Lunello et al., 2004; Mumford et al., 2004). Real-time PCR 방법은 기존의 RT-PCR 방법보다 감도가 뛰어나고, 바이러스의 진단과 동시에 감염된 바이러스의 정량이 가능하다. 또한 유전자의 증폭이 기존 방법보다 짧은 시간 내에 이루어지고 전기영동을 하지 않아도 증폭과 동시에 분석이 이루어지므로 효율적이다. 그러나 고가의 시약과 장비가 필요하기 때문에 현재까지는 보편화되어 있지 않다.

최근 CTV 연구와 관련하여 많이 수행되는 연구는 SSCP 방법을 이용한 바이러스의 변이 구조 분석이다 (Lopez et al., 1998; Ayllon et al., 1999; Kong et al., 2000; Rubio et al., 2001; Sambade et al., 2003). SSCP는 저렴한 비용으로 다량의 시료를 다룰 수 있고, 바이러스의 검정 뿐 아니라 바이러스이 변이 정도를 분석할 수 있다. 최근 추세는 단순히 바이러스의 감염 여부를 진단하는 것을 벗어나 변이 구조를 분석하고 mild와 severe strain을 구분하는 방법을 선호하고 있다. CTV는 hyplotypes 간의 염기 서열이 매우 유사하지만 병원성은 전혀 다르게 나타나기 때문이다. CTV는 aphid에 의해 매개되는 바이러스로 매개되기 전과 후 또는 접목에 의해 기주 식물이 바뀌었을 때 변이가 일어나 새로운 type이 만들어지고 이것의 병원성은 처음의 것과 전혀 다르게 나타날 수도 있다. 따라서 변이 구조를 파악하는 것은 조기 진단을 하는 것만큼 중요하다. SSCP는 이러한 면에서 적합한 방법이기 때문에 현재 가장 많이 수행되고 있다.

제 7장. 참고문헌

권혁모. 2000. 난지권 원예작물 연구동향 분석과 금후 연구방향, 연구동향분석보고서 (200-7). 문영당. pp. 12-16.

권혁모, 고관달. 1985. 감귤 바이러스에 관한 연구. 제주도 농촌진흥원 시험연구보고서. pp. 320-327.

김현란. 1996. 과수 바이러스병의 최근 연구동향. 식물바이러스 연구회.

남기웅, 김충희, 김경수. 1995. 배나무잎 이상반점증상에 관한 연구6. 간이 검정법 개발. 한국식물병리학회지. 12(3):214-218.

농림부, 2002. □□농업총조사□□, 각 년도. 통계청.

농촌진흥청 과수연구소. 1993. 과수 바이러스병 조기 정밀진단 기술개발 및 방제 대책 연구. 농촌진흥청 농업특정연구사업 1차년도 완결보고서. pp. 1-20.

농촌진흥청 원예연구소. 1994. 1994년도 시험연구보고서. 농촌진흥청.

농촌진흥청 원예연구소. 2002. 2002년도 시험연구보고서. 농촌진흥청.

농촌진흥청, 전남대학교 농과대학. 1995. 원예작물 바이러스병 정밀진단. 농촌진흥청 농업특정연구사업보고서. pp. 13-54.

전라남도 농업기술원 난지과수시험장. 2002. 시험연구사업보고서.

이석찬, 현재욱. 2001. 감귤 바이러스 조기 정밀진단 기술 개발 및 바이러스 저항성 연구, 농림기술개발연구과제계획서. 농림부.

최장경, 장무웅, 이재열. 1996. 식물바이러스학. 향문사.

홍경희, 김용석, 김희천, 김정배, 이운직, 이은종, 조원대, 조의규. 1985. 배 잎의 이상반점증상에 관한 연구. 농시논문집 (원예) 27(2): 46-55.

井上忠男. 1980. 植物ウリルス病の抗血清診断の普及のために. 植物防疫 34(3): 101-101.

宇杉富雄, 土崎當男. 1982. ELISA法(Enzyme-linked immunosorbent assay)によるカンキツ モザイクウイルスの検出. 日植病報 48: 330-332.

高橋義行. 1988. 植物ウイルス病の血清學的 診断法(2), ELISA法- その特徴と 實驗上の注意点. 植物防疫 42(2): 88-92.

高木信雄. 1997. 生産現場のウイルス防除の取り組み. 果實日本. pp. 37-39.

高原利雄. 2002. Viroid 無毒化による不知火の樹勢強化と品質向上. 農業技術研究機構果樹研究所 柑橘研究部 口之津. 果實日本 11月號. pp. 91-95.

田中寛康ほか. 1969. 温州萎縮病の病徴發現に關ほす環境條件の影響1. 舟型葉の發現と溫度との關係. 園試報告 B9: 163-173.

久原重松. 1980. 酵素綜合抗体法(ELISA)による植物ウイルス病の診断. 植物防疫 34(3): 129-135.

宮川經邦. 1976. 果樹のウイルス病-研究と對策. 農山漁村文化協會. pp. 42-106, 121-180.

宮川經邦, 佐 木篤. 1977. 柑橘のウイルス病診断. 農山漁村文化協會. pp. 8-82.

山口沼. 1982. 果樹ウイルス病の基礎知識. 農山漁村文化協會. pp. 31-44, 56-78, 110-149.

山田峻一, 尺村健三. 1952. 温州ミカの萎縮病に関する研究. 東海近畿農業試験場研究報告園藝部 1: 61-71.

Agrios, G. N. 1988. Plant pathology. *Academic Press*. London. pp. 587-622.

Auger, S, J. and Esterio, G. M. 1998. Grapevine virus diseases: symptoms, main ways of transmission and effects on the production and quality of grapes and its products. *Aconex* 59: 5-13.

Ayllon, M. A., Rubio, L. Moya, A. Guerri, J. and Moreno, P. 1999b. The haplotype distribution of two genes of citrus tristeza virus is altered after host change or aphid transmission. *Virology* 255: 32-39.

Albiach-Marti MR, Guerri J, Cambra M, Garnsey SM, Moreno P. Differentiation of citrus tristeza virus isolates by serological analysis of p25 coat protein peptide maps. *J Virol Methods*. 2000 Jul;88(1):25-34.

Albiach-Marti MR, Mawassi M, Gowda S, Satyanarayana T, Hilf ME, Shanker S, Almira EC, Vives MC, Lopez C, Guerri J, Flores R, Moreno P, Garnsey SM, Dawson WO. Sequences of Citrus tristeza virus separated in time and space are essentially identical. *J Virol*. 2000 Aug;74(15):6856-65.

Ballester-Olmos J. F., Pina, J. A., Carbonell, E., Moreno, P., Hermoso de Mendoza, A. and Cambra M Navarro, L. 1993. Biological diversity of citrus virus (CTV) isolates in Spain. *Plant Pathology* 42: 219-229.

Ballester-Olmos, J. F., Pina, J. A, Moreno, P., Hermoso de Mendoza, A., Cambra, M. and Navarro, L. 1988. Biological characterization of different citrus tristeza virus isolates in Spain. *Proc. 10th Conf. int. Org. Citrus Virol. (IOCV)*. pp. 28-32.

Bar-joseph, M. and Lee, R. F. 1989. Citrus tristeza virus :Description of plant viruses. No. 353. *Assoc. of Biol., Wellesbourne, UK.*

Berlansky. R. H., Lee, R. F. and Garnsey, S. M. 1988. *In situ* immunofluorescence for the detection of citrus tristeza virus inclusion bodies. *Plant Disease* 72: 820-826.

Bouyahia, H. 2001. Improvement of serological methods for the diagnosis of the grapevine fanleaf virus (GFLV) and grapevine leaf roll associated closterovirus (GLRaV-7). 39 p.

Cabaleiro, C. and Segura, A. 1997. Field transmission of grapevine leafroll associated virus 3 (GLRaV-3) by the mealybug planococcus citri. *Plant Disease* 81(3): 283-287.

Calavan. E. C. 1972. Thermotherapy of citrus for inactivation of certain viruses. *Plant Disease.* 56(11): 976-980.

Campbell, A. I. 1973. Virus effects on the performance of apple trees on apomictic seedling rootstocks. *J. Hort. Sci.* 48: 155-163.

Civerolo, E. L. and Mircetlich, S. M. 1972. A comparison of two strains of apple chlorotic leaf spot virus. *Phytopathology* 62: 529-532.

D'urso, F., Sambade, A., Moya, A., Guerri, J. and Moreno, P. 2003. Variation of haplotype distributions of two genomic regions of Citrus tristeza virus populations from eastern Spain, *Molecular Ecology* 12: 517-526.

Dwiastuti, M. E., Triwiratno, A. and Muharam, A. 1995, Citrus tree preimmunization : selection of protective CTV mild strain. *Jurnal-Hortikultura (Indonesia)* 5(1): 35-46.

Febres, V., J., Pappu, H., R., Anderson, E., J., Pappu, S., S., Lee, R., F. and Niblett, C., L. 1994. The diverged copy of the citrus tristeza virus coat protein is expressed in vivo. *Virology New York*. 201(1): 178-181.

Febres, V. J., Ashoulin, L., Mawassi, M., Frank, A., Bar-joseph, M., Manjunath, K. L., Lee, R. F. and Niblett, C. L. 1996. The p27 protein is present at one end of citrus tristeza virus particles. *phytopathology* 86: 1331-1335.

Francki, P. R. and Aichele, M. D. 1987. Reactions of crab apples considered as potential apple pollinizers to latent virus infection. *Fruit Var. J.* 41: 17-18.

Fridland, P. R. 1981. Current status of pear virus diseases in North America. [Conference paper]. Third international symposium on pear growing. Corvallis, Oregon (USA). pp. 29-31.

Fridlund, P. R. and Darke, S. R. 1981. Effect of pear vein yellows and a nonviral factor on the performance of pear trees. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 106: 412-414.

Fulton, R. W. 1972. Apple mosaic virus. Description of plant viruses, No. 83. *Commonwealth Mycological Institution and Association of Applied Biologists*, Kew, Surrey, England.

Fulton, R. W. 1986. Practices and precautions in the use of crops protection for plant virus disease control. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24: 67-81.

Gago-Zachert, S., Costa, N., Semorile, L. and Grau, O. 1999. Sequence variability in p27 gene of citrus tristeza virus (CTV) revealed by SSCP analysis, *Plant Biotechnology* 1.

Garnsey, S. M., Gumpf, D. J., Roistacher, C. N., Civerolo, E., Lee, R. F., Yokomi, R. K. and Bar-Joseph, M. 1987. Toward a standard evaluation of the biological properties of citrus tristeza virus. *Phytophylactica* 19: 151-157.

Gotlieb, A. R. 1977. Isolation, characterization, and transmission of apple mosaic virus in white birch and isolation and characterization of a latent virus in yellow birch. *Ann Arbor, Mich. (USA). University Microfilms International* 94.

Gowda S, Satyanarayana T, Davis CL, Navas-Castillo J, Albiach-Marti MR, Mawassi M, Valkov N, Bar-Joseph M, Moreno P, Dawson WO. The p20 gene product of Citrus tristeza virus accumulates in the amorphous inclusion bodies. *Virology*. 2000 Sep 1;274(2):246-54.

Hardcastle, T. and Gotlieb, A. R. 1980. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of apple mosaic virus in yellow birch. *Canadian Journal of Forest Research* 10(3): 278-283.

Hassing, J. and Larsen, E. C. 1976. Influence of virus on growth of one-year-old apple trees. *J. Hort. Sci.* 51: 211-214.

Hayashi, K. 1991. PCR-SSCP : A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Meth. Meth. Appl.* 1: 34-38.

Higgins, D. G. and Sharp, P. M. 1988. Clustal: a package for performing multiple sequence alignment on a computer. *Gene* 73: 237-244.

Hu, J. S., Sether, D. M., Liu, X. P., Wang, M., Zee, F. and Ullman, D. E. 1997. Use of tissue blotting immuno-assay to examine the distribution of pineapple closterovirus in Hawaii. *Plant Disease*. 81(10): 1150-1154.

Ieki, H. 1987. The use of cross-protection with mild strains of citrus tristeza virus (CTV) to control stem pitting disease of citrus in Japan. *Bull. Fruit Tree Res. Stn.* pp. 8-14.

Iwanami, T., Hidaka, T. and Omura, M. 1993. Shoot-tip culture of citrus (III. Elimination of citrus tatter leaf virus from cultured shoots). *Bull. Fruit Tree Res. Stn.* 24: 61-71.

Ieki, H., Yamaguchi, A., Kano, T., Koizumi, M. and Iwanami, T. 1997. Control of stem pitting disease caused by citrus tristeza virus using protective mild strains in navel orange. *Annals of the Phyto Pathological Society of Japan.* 63(3): 170-175.

Duran-Vila, N., Semancik, J. S., and Broadbent, P. 2000. Viroid Diseases. Pages 51-52 in: *Compendium of Citrus Diseases*, 2nd ed., L. W. Timmer, S. M. Garnsey, and J. H. Graham, eds. APS Press, St. Paul.

Ito, T., Ieki, H., and Ozaki, K. 2002. Simultaneous detection of six citrus viroids and *Apple stem grooving virus* from citrus plants by multiple reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 106:235-239.

Jukes, T. H. and Cantor, C. R. 1969. Evolution of protein molecules, p. 21-132. In H. N. Munro(ed.), *Mammalian protein metabolism*. Academic Press, New York.

Karasev, A. V., Boyko, V. P., Gowda, S., Nikolaeva, O. V., Hilf, M. E., Koonin, E. V., Niblett, C. L., Cline, K., Gumpf, D. J., Lee, R. F., Garnsey, S. M., Lewandowski, D. J. and Dawson, W. O. 1995. Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome. *Virology* 208: 511-520.

- Kienholz, J. R. 1939. Stony pit of pear. *Phytopathology* 29: 260-267.
- Kim D. H. 1999. Study on the virus infection state of citrus of cheju-do area and the culture of virus-free stocks. *A Thesis for the Degree of Master of Science*.
- Kim, D. H., Oh, D. C., Hyun, C. W., Kwon, H. M., Kim, D. H. and Lee, S. C. 1999. Incidence of three citrus viruses in Cheju Island, *Plant Dis. Agric.* 5: 34-40.
- Kim, D. H., Hyun, J. W., Hwang, H. S. and Lee, S. C. 2000. RT-PCR detection of citrus tristeza virus from early satsuma mandarin and yuzu in cheju island. *Plant Pathol. J.* 16(1): 48-51.
- Kim, K. H. 1999. Recent development in detection and identification of fruit tree viruses, *Plant Pathol.* 15(4): 199-209.
- Kinard, G. R., Scott, S. W. and Barnett, O. W. 1996. Detection of apple chlorotic leaf spot and apple stem grooving viruses using RT-PCR. *Plant Disease* 80(6): 616-621.
- Koganezawa, H. and Yanase, H. 1990. A new type of elongated virus isolated from apple trees containing the stem pitting agent. *Plant Disease* 74: 610-614.
- Kolber, M., Kobza, S., Lehoczy, J. and Pacsa, S. 1981. Detection of grapevine fanleaf virus (GFLV) with ELISA techniques in the leaf samples collected in various phenophases, and in deep-frozen leaf extracts. *Kertgazdasag (Hungary)* 13(2): 11-22.
- Kong, P., Rubio, L., Polek, M. and Falk, B. W. 2000, Population Structure and

genetic diversity within california citrus tristeza virus (CTV) isolates, *Virus Genes* 21(3): 139-145.

Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. 1993. MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis, version 1.0. The Pennsylvania State University, University Park.

Lister and Bar-Joseph, M. 1981. Closteroviruses in ; *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis*. p. 809.

Makkouk, K. M. and Faris, M. S. 1983. Detection of citrus tristeza virus by different variants of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Phytopathologia Mediterranea* (Italy) 22(3): 177-180.

Makkouk, K. M. and Faris, M. S. 1985. Economizing mass indexing of citrus tristeza virus by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Lebanese Science Bulletin* (Lebanon) 1(1): 7-12.

Martins, A., Ladeira, J. S. and Carneiro, L. C. 1995. Occurrence and effects of the leaf curl virus of the grapevine "GLRaV-3" on yield and quality. Third symposium on vine-growing in the Alentejo. *Evora*. pp. 39-48.

Mashiyama, S., Sekiya, T. and Hayashi, K. 1990. Screening of multiple DNA samples for detection of sequence changes. *Technique* 2 : 304-306.

Mawassi M, Satyanarayana T, Albiach-Marti MR, Gowda S, Ayllon MA, Robertson C, Dawson WO. The fitness of citrus tristeza virus defective RNAs is affected by the lengths of their 5'- and 3'-termini and by the coding capacity. *Virology*. 2000 Sep 15;275(1):42-56.

Mehta, P., Brlansky, R. H., Gowda, S. and Yokomi, R. K. 1997.

Reverse-transcription polymerase chain reaction detection of citrus tristeza virus in aphids. *Plant Disease* 81(9): 1066-1069.

Minafra, A. and Hadidi, A. 1994. Sensitive detection of grapevine virus A, B or leafroll associated III from viruliferous mealybugs and infected tissue by cDNA amplification. *J. Virol. Methods* 47: 175-188.

Moreno, P., Guerri, J. and Munoz, N. 1990. Identification of spanish strains of citrus tristeza virus by analysis of double-stranded RNA. *Phytopathology (USA)* 80(5): 477-482.

Moreno, P., Guerri, J., Ballester-Olmos J. F., Albiach, R. and Martinez, M. E. 1993a. Separation and interference of strains from a citrus tristeza virus isolate evidenced by biological activity and double-stranded RNA (dsRNA) analysis. *Plant Pathology* 42: 35-41.

Newbury, H. J. and Possingham, J. V. 1977. Factors affecting the extraction of intact ribonucleic acid from plant tissue containing interfering phenolic compounds. *Plant Physiology* 60: 543-547.

Niblett, C. L., Genc, H., Cevik, B., Halbert, S., Brown, L., Nolasco, G., Bonacalza, B., Manjunath, K. L., Febres, V. J., Pappu, H. R. and Lee, R. F. 2000. Progress on strain differentiation of citrus tristeza virus and its application to the epidemiology of citrus tristeza disease, *Virus Research* 71: 97-106.

Orita, M., Iwahara, H., Kanazawa, H., Hayashi, K. and Sekiya, T., 1989a. Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2766-2770.

Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T. and Hayashi, K., 1989b, Rapid and sensitive

detection of point mutation and DNA polymorphism using the polymerase chain reaction. *Genomics* 8:271-278.

Pappu H. R., Karasev A. V., Anderson, E. J., Pappu, S. S., Hilf M. E., Febres, V. J., Eckloff, R. M. G., McCaffery, M., Boyko, V., Gowda, S., Dolja, V. V., Koonin, E. V., Gumpf, D. J., Cline, K. C., Garnsey, S. M., Dawson, W. O., Lee, R. F. and Niblett, C. L. 1994. Nucleotide sequence and organization of eight-3' open reading frames of the citrus tristeza closterovirus genome. *Virology* 199: 35-46.

Pappu, H. R., Niblett, C., Lee, R. and Civerolo, E. 1993. Comparative sequence analysis of the coat proteins of biologically distinct citrus tristeza closterovirus isolates. *Virus Genes*, 7(3): 255-264.

Permar, T. A., Garnsey, S. M., Gumpf, D. J. and Lee, R. F. 1990. A monoclonal antibody that discriminates strains of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 80(3): 224-228.

Plese, N., Hoxha, E. and Milicic, D. 1975. Pathological anatomy of trees affected with apple stem grooving virus. *Phytopathology* 82: 315-325.

Ponz, F. and Bruening, G. 1986. Mechanism of resistance to plant viruses. *Ann. Rev. Phytopathology* 24:355-381.

Raccah, B., Leobenstein, G., Bar-Joseph, M. and Oren, Y. 1976. Transmission of tristeza by aphids prevalent on citrus and operation of the tristeza suppression program in Israel. In: *Calavan, E.C.(Ed.), Proceedings of the 7th Conference of the IOCV. Riverside, CA.* pp. 47-49.

Roistacher, C. N. and Moreno, P. 1991. The worldwide threat from destructive isolates of citrus tristeza virus - A review. In : Brlansky, R. H., Lee, R. F.,

Timmer, L. W., eds. Proceeding of the 1th conference of the international organization of citrus virologists. Riverside, CA, USA: *International Organization of Citrus Virologists*. pp. 7-19.

Rubio, L., Ayllon, M. A., Guerri, J., Pappu, H. R., Niblett, C. L. and Moreno, P. 1996. Differentiation of citrus tristeza virus (CTV) isolates by single-strand conformation polymorphism analysis of the coat protein gene. *Ann. App. Biol.* 129: 479-489.

Rubio, L., Ayllon M. A., Kong, P., Fernandez, A., Polek, M., Guerri, J., Moreno, P. and Falk, B. W. 2001. Genetic variation of citrus tristeza virus isolates from california and spain : evidence for mixed infections and recombination, *American Society for Microbiology*. pp. 8054-8062.

Rustici G, Accotto GP, Noris E, Masenga V, Luisoni E, Milne RG. Indian citrus ringspot virus: a proposed new species with some affinities to potex-, carla-, fovea- and allexiviruses. *Arch Virol.* 2000;145(9):1895-908.

Saito, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.

Sambade, A., Rubio, L., Garnsey, S. M., Costa, N. W., Muller, G., Peyrou, M., Guerri, J. and Moreno, P. 2002. Comparison of viral RNA populations of pathogenically distinct isolates of Citrus tristeza virus: application to monitoring cross-protection, *Plant Pathology* 51: 257-265.

Savov, A., Angelicheva, D., Jordanova, A., Eigel, A. and Kalaydijieva, L. 1992. High percentage acrylamide gels improve resolution in SSCP analysis. *Nucleic Acids Res.* 20: 6741-6742.

Sheffield, V. C., Beck, J. S., Kwitek, A. E., Sandstorm, D. W. and Stone, E. M. 1993. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis

for the detection of single base substitutions. *Genomics* 16: 325-332.

Shigeta, S., Muramoto, K., Nakata, E. and Nozaki, T. 1995. A short-term evaluation of cross protection by mild strains of citrus tristeza virus (CTV). *Bulletin of the Yamaguchi Agricultural Experiment Station (Japan)* 46: 98-105.

Shimomura, K., Hirashima, K. and Kusano, N. 1999. Selection of mild strains against a severe strain of citrus tristeza virus (CTV), 1: Selection of mild strains of CTV based on virulence against CTV-sensitive citrus varieties and checking the cross-protection ability by cleft grafting method. *Bulletin of the Fukuoka Agricultural Research Center (Japan)* 18: 87-91.

Spinardi, L. Mazars, R. and Thellet. 1991. Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP. *Nucleic Acids Res.* 19: 4009.

Su, H. and Chu, J. 1984. Modified technique of citrus shoot-tip grafting and rapid propagation method to obtain citrus bud woods free of citrus viruses and libukin organism. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 1: 332-338

Sweet, J. B. 1980. Hedgerow hawthorn (*Crataegus spp.*) and blackthorn (*Prunus spinosa*) as hosts of fruit tree viruses in Britain (Apple chlorotic leafspot virus, Prunus necrotic ringspot, Prune dwarf virus) *Ann. Appl. Biol.* 94: 83-90.

Uyemoto, J. K. and Gilmer, R. M. 1971. Apple stem-pitting virus: propagation hosts and purification. *Ann. Appl. Biol.* 69: 17-21.

Van Vuuren S. P., Collins, R. P. and da Graca, J. V. 1993. Evaluation of citrus tristeza virus isolates for cross protection of grapefruit in South Africa. *Plant Disease* 77: 24-8.

- Vives, M. C., Rubio, L., Lopez, C., Navas-Castillo, J., Albiach-Marti, M. R., Dawson, W. O., Guerri, J., Flores, R. and Moreno, P. 1999. The complete genome sequence of the major component of a mild citrus tristeza isolate. *J. Gen. Virol.* 80: 811-816.
- Walter, B. 1998. Viruses and virus-diseases of the grapevine : diagnosis and control methods. *Virology* 2(6): 435-444.
- Whiteside, J. O., Gransey, S. M. and Timmer, L. W. 1988. Compendium of citrus disease. *APS. press, St. Paul, Minnesota, USA.* p. 80.
- Yankulova, M. 1976. Investigations on the grapevine fanleaf virus (GFLV). *Plant Protection Science* 4: 11-22.
- Yanase, H., Mink, G. I., Sawmura, K. and Yamaguchi, A. 1990. Apple topworking disease. In; compendium of apple and pear diseases. pp. 74-75.
- Yang, Z. N., Mathews, D. H., Dodds, J. A. and Mirkov, T. E. 1999. Molecular characterization of an isolate of citrus tristeza virus that causes severe symptoms in sweet orange. *Virus Genes* 19(2): 131-142.

제 8장. 논문 발표

지난 3년동안 수행한 연구 결과를 정리하여 다음과 같이 2개의 논문 투고를 준비중에 있다.

Production of Citrus Virus-Free Stocks by Shoot Tip Grafting and Heat Treatment

Dae-Hyun Kim^{1, 2}, Hye-Kyung Shim², Jae-Wook Hyeon³, Min-Su Choi², Sukhan Lee^{2*}

¹Evaluation and Coordination Office of the Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

²Department of Genetic Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

³Plant environment division of the National Jeju Agricultural Experiment Station, Jeju city 690-150, Korea

Abstract

The plant infected citrus viruses was made virus-free stocks using modified method of shoot tip grafting (STG) in thermotherapy at 40°C for 16 hours in the light, and at 30°C for 8 hours of darkness for 4 weeks. Trifoliate orange (*Poncirus trifoliata*) or Natsudaidai were used as rootstock seedling for STG. Percentage of virus-free stocks by citrus viruses in citrus tristeza virus (CTV), satsuma dwarf virus (SDV) and citrus tatter leaf virus (CTLV) were 75.6%, 100%, 82.6% respectively. Shoot tip size on successful rates of STG was as small as possible, rates of virus free plants were higher. However survival rates were low.

Comparison of viral RNA population of *citrus tristeza virus* of geographically different areas by SSCP analysis from republic of Korea

Dae-Hyun Kim^{1, 2}, Hye-Kyung Shim², Jae-Wook Hyeon³, Min-Su Choi², Sukhan Lee^{2*}

¹Evaluation and Coordination Office of the Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

²Department of Genetic Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

³Plant environment division of the National Jeju Agricultural Experiment Station, Jeju city 690-150, Korea

Abstract

The objective of this work was to analyze the population of sequence variants of *citrus tristeza virus* (CTV) isolates in Korea and to make the phylogenetic trees of CTV in Korea. We also tried to analyze and find the mild strain of CTV to apply for the cross protection. The CTV isolates from yuzu (*C. junos*) collected from different geographic areas of Southern provinces such as Namhae, Geoje, Bosung, Wan-Do and Goheung and Jeju island, Korea were used for single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. The SSCP profiles of the cDNAs obtained by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) with primers specifically designed for the p20 of the CTV population. The SSCP profiles obtained from 142 PCR products in yuzu contained two or three DNA bands, whereas, in some case, others contained four or more bands of similar intensity. The genome of the 16 CTV haplotypes in the SSCP profiles was completely sequenced and compared to the genome of the CTV isolates for gene p20. The genome of the 16 CTV haplotypes shows nucleotide identities of 88 ? 99.8% with the genome of the CTV isolates for gene p20. The pathologically mild isolates of CTV usually yielded two DNA bands by SSCP profiles, whereas the SSCP profiles of the most virulent isolates contained more than two DNA bands. Comparison of these haplotypes with those from other isolates suggests that some CTV isolates could have arisen as result of a mixed infection of two divergent isolates. Plants shown severe stem pitting were corresponded to those plants with typical SSCP profiles of severe strains.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.