

최 중
연구보고서

주요 과수 바이러스의 진단기술 개발

Development of diagnostic methods to identify
the major fruit viruses

경희대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “주요 과수 바이러스의 진단 기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2002년 7월 26일

주관연구기관명 : 경희대학교

총괄연구책임자 : 백 광 희

세부연구책임자 : 백 광 희

연 구 원 : 박 준 호

연 구 원 : 김 은 주

연 구 원 : 장 혜 옥

연 구 원 : 정 현 주

연 구 원 : 전 익 수

협동연구기관명 : 원예연구소

협동연구책임자 : 김 현 란

연 구 원 : 박 성 은

연 구 원 : 유 점 순

연 구 원 : 채 영 숙

연 구 원 : 이 신 호

여 백

요 약 문

I. 제 목

주요 과수 바이러스의 진단 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

국내 농업은 농산물 개방에 따른 경쟁 사회에서 농민의 소득증대를 위해 전략적 농업을 육성해야 하는데 국제 경쟁력을 가지기 위해서 균일한 품질을 가지는 농산물의 생산이 중요하고 이를 위해서 여러 가지의 병 방제가 중요하다. 과수 분야에서는 UR에 의한 수입개방으로 우리 농산물의 국제경쟁력 제고를 위한 대책 수립이 시급하게 되었으며, 수출 유망 작목으로서 국제경쟁력을 높이기 위한 고품질 과실생산이 절실하게 요구되고 있다.

과수 바이러스는 과수의 수량감소 뿐만 아니라 당도 및 착색불량, 기형과 등에 의하여 품질이 저하시키는 것으로 알려져 있으며 국내에서 과수 바이러스에 대한 연구는 단크론 항체 및 RT-PCR 진단용 primer 개발 등의 기술들이 여러 기관에서 산발적으로 연구되고 있으나 아직까지 체계적으로 과수 바이러스의 진단 기술 개발이 정립되지 못하고 있다. 과수바이러스에 대한 활발한 연구와 실용화가 이루어진 외국의 예와 비교하면 아직 초기단계라 할 수 있다.

현재까지 개발된 바이러스의 진단방법으로는 생물학적 검정법, 혈청학적 검정법, 분자생물학적 검정법이 있다. 생물학적 검정법은 병징 발현에 있어서 장기간이 소요되므로 조기진단에는 이용할 수 없는 단점을 가지고 있고, 혈청학적 검정법은 과수바이러스의 수체내의 낮은 농도로 인해 바이러스의 정제가 매우 어려워 항체 제작을 위해 필요한 일정량 이상의 정제바이러스를 얻는 것은 매우 어려운 문제점이 있다. 분자생물학적 검정법은 과수 바이러스 유전자 특이적 primer 를 선별하여 PCR

을 통해 극소량의 과수 바이러스의 존재를 확인할 수 있는 방법으로 진단을 단시간 내에 할 수 있고 조기 진단할 수 있어 고품질의 안정적인 농업 생산에 기여할 수 있는 장점이 있다.

사과와 감귤은 국내 과수 중 가장 큰 비중을 차지하고 있으며 ACLSV, ASGV, CTLV, SDV 등의 바이러스가 많은 피해를 주고 있는 것으로 알려지고 있다. 본 과제에서는 바이러스 ACLSV, ASGV, CTLV, SDV에 대한 감염을 PCR을 이용한 진단기술을 개발하여 농가 소득 증대에 기여하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구과제에서는 사과의 ACLSV, ASGV, 감귤의 CTLV, SDV에 대한 바이러스의 진단기술을 PCR을 통해 개발하고자 하였다. 이를 위해 바이러스 감염주로부터 바이러스 genomic RNA를 분리하였고 일부 유전자의 염기서열을 결정하였다. ACLSV, ASGV, CTLV 바이러스 경우 RT-PCR에 의해 성공적으로 바이러스 유전자의 클로닝 및 염기서열을 규명하였으나 SDV 경우 바이러스 분리에 어려움이 많아 같은 감귤에 감염하는 CTV로 대체하여 성공적으로 연구를 수행하였다. 각 바이러스들의 유전자 염기서열을 바탕으로 다양한 바이러스 특이적 primer를 제작하여 PCR을 시도하였으며 바이러스 진단에 이용할 수 있는 최적의 primer set를 선별하였다.

또한 ACLSV와 ASGV 혹은 CTLV와 CTV 바이러스들의 각 각의 감염뿐만 아니라 이들 바이러스의 복합 감염을 동시에 진단할 수 있는 PCR 진단 방법을 개발하였다. 본 연구에서 개발된 바이러스 진단 방법의 실용성을 검증하기 위해 농가에서 실제 재배되고 있는 과수를 이용하여 바이러스 진단을 시도하였다. 그리고, 그 동안 기존에 사용되고 있는 항체를 이용한 진단키트와 본 연구에서 개발된 바이러스 진단 방법을 비교 분석하여 PCR을 이용한 진단방법의 효용성을 검증하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 바이러스 분리 동정 및 증식

사과 및 감귤나무에 감염하는 바이러스 분리를 위해 ELISA 방법에 의해 선별하였다. 이때 ELISA에 사용된 항체는 스위스 BIOREBA사로부터 구입하였다. 선별된 바이러스 감염주는 *Chenopodium quinoa* 등 지표 식물을 이용하여 신초 및 꽃에 접종함으로써 바이러스를 증폭 분리하였다. 사과와 감귤에 감염하는 ACLSV, ASGV, CTLV SDV를 분리하였으며, CTV는 제주감귤연구소에서 제공받았다.

나. 목본성 작물로부터 고농도 RNA 추출법 개발

고농도의 RNA 추출방법 개발 수행에 있어서는 바이러스가 증식된 초본 기주의 잎과 목본성 기주의 잎조직을 비교하여 식물체로부터 total RNA를 추출하였다. 추출 방법은 상품으로 판매되는 Qiagen RNeasy Plantmini kit와 주로 동물에서 많이 사용되는 NucliSens Kit를 사용하여 추출 RNA 농도 및 순도를 조사하였다. 또한 목본작물에서 특히 저농도로 존재하는 바이러스를 효과적으로 검출할 수 있도록 순도가 높은 viral 핵산을 분리하였다. PCR반응에 저해작용을 하는 페놀성 물질들을 제거하기 위해 PVP 등 산화억제 작용을 하는 물질들을 종류별로, 농도별로 처리하여 최적의 완충액 조성방법 등 고농도의 RNA 추출을 위한 효율적인 방법을 개발하기 위한 시험을 수행하였다. 이를 통해 사과나 감귤 잎 조직으로부터 고농도, 고순도의 RNA를 분리할 수 있었으며 특히 Qiagen kit(독일)를 사용하였을 때 추출 RNA의 순도가 높아 PCR 반응효율을 높일 수 있었다. 세계적으로 감자 외에는 사용한 예가 거의 없는 NucliSens kit(네덜란드)를 식물에 적용한 결과, 비교적 높은 농도의 RNA를 얻을 수 있었으나 순도가 다소 떨어지는 것으로 나타났다. 일반적으로 사용되는 Phenol-chloroform법을 이용하여 사과 잎 조직으로부터 추출한 RNA는 ACLSV가 증식된 *C. quinoa* 기주를 이용한 경우에 비하여 매우 농도가 낮아 효과적으로 PCR 진단

이 불가능하였다.

다. RT-PCR을 통한 ASGV, ACLSV, CTLV, CTV 유전자 증폭

국내에서 분리된 ASGV(apple stem grooving capillovirus), ACLSV(apple chlorotic leaf spot virus), CTLV(citrus tatter leaf virus), CTV(citrus tristeza virus)로부터 genomic RNA를 추출하여 RT-PCR에 이용하였다. 기존에 알려진 이들 바이러스의 염기서열을 바탕으로 염기서열 보존이 비교적 잘 되어 있는 CP(coat protein), RNA polymerase 유전자 부위를 선택하여 RT-PCR의 primer로 이용하였다. RT-PCR을 수행한 결과 ACLSV, ASGV CP는 566 bp와 503 bp, ASGV RNA polymerase 유전자 N-terminal 부위에 해당하는 573 bp 의 증폭된 band를 확인하였다. 감귤에 감염하는 CTLV, CTV로부터 CP 유전자에 해당하는 503 bp와 672 bp 길이의 증폭된 DNA band를 확인하였다.

라. 각 바이러스의 CP(coat protein) 혹은 RNA polymerase 유전자의 염기서열 결정

과수에서 분리된 ASGV, ACLSV, CTLV, CTV 바이러스의 CP 및 ASGV RNA polymerase N-terminal 부위 유전자 염기서열 결정하기 위해 RT-PCR에 의한 증폭된 PCR 산물을 pGEM-T vector에 클로닝한 후 클로닝 된 3개 이상의 clone들의 각각 염기서열을 결정하였다. 결정된 바이러스 유전자의 염기서열을 기존에 genome data base에 보고된 유전자의 염기서열과 각각 비교한 결과 국내 사과와 ASGV, ACLSV CP, ASGV RNA polymerase N-terminal 부위 유전자 염기서열이 각각 57개, 136개, 118개의 위치에서 서로 다른 염기서열을 갖고 있었고 각각 88.7%, 75.9%, 79.4% 정도의 유사성을 보였다. 감귤에서 분리된 CTLV, CTV CP 유전자 염기서열 결정하여 같은 방법으로 비교한 결과 국내 CTLV, CTV CP 유전자는 기존에 알려진 CTLV, CTV CP 유전자와 26개, 47개의 위치에서 서로 다른 염기서열을 갖고 있었고 각각 94.8%, 93.0% 정도의 유사성을 보였다.

마. 사과에 감염하는 ASGV, ACLSV 검색을 위한 바이러스 특이적 primer 선발

ASGV의 CP 및 RNA polymerase 유전자의 염기서열을 바탕으로 다양한 primer를 제작하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 바이러스 DNA가 성공적으로 증폭되는 primer set (ASGV-Pf, ASGV-Pr)을 선발하여 ASGV 검색에 이용될 수 있음을 확인하였다. ACLSV의 경우는 CP 유전자의 염기서열을 바탕으로 다양한 primer를 제작하여 RT-PCR에 이용하였다. 그 결과 바이러스 DNA가 성공적으로 증폭되는 primer set (ACLSV-CPf, ACLSV-CPr)을 선발하여 ACLSV 검색에 이용될 수 있음을 확인하였다.

바. 감귤에 감염하는 CTLV, CTV 검색을 위한 바이러스 특이적 primer 선발

CTLV의 CP 유전자의 염기서열을 바탕으로 다양한 primer를 제작하여 RT-PCR에 이용하였다. 그 결과 바이러스 DNA가 성공적으로 증폭되는 primer set (CTLV-CPf, CTLV-CPr)을 선발하여 CTLV 검색에 이용될 수 있음을 확인하였다. 또한 CTV의 CP 유전자의 염기서열을 바탕으로 다양한 primer를 제작하여 RT-PCR에 이용하였다. 그 결과 바이러스 DNA가 성공적으로 증폭되는 primer set (CTV-CPf, CTV-CPr)을 CTV 검색에 이용될 수 있음을 확인하였다.

사. 바이러스 동시 진단을 위한 duplex PCR 개발

2종의 바이러스 ASGV와 ACLSV, 혹은 CTLV와 CTV를 동시에 진단할 수 있도록 선별된 각각의 primer들과 각각의 바이러스들의 RNA를 이용하여 RT-PCR을 수행하여 바이러스 동시 진단 PCR 방법을 개발하였다. ASGV와 ACLSV의 경우 404 bp와 566 bp 크기의 DNA가 증폭되어 젤 상에서 동시에 그 감염을 진단할 수 있었으며, 각 바이러스 genome을 함유하고 있는 RNA를 다양한 농도별로 혼합하여 각 DNA band의 sensitivity를 확인할 수 있었다. 또한 감귤의 바이러스 CTLV와 CTV의 경우도 같은 방법으로 503 bp와 372 bp 크기의 DNA가 증폭되어 젤 상에서 동시에 그 감염을 진단할 수 있었으며, 각 band의 sensitivity를 확인할 수 있었다.

아. RT-PCR에 대한 양성 대조군 primer 선발

RT-PCR을 통해 바이러스의 검색은 RNA 추출 방법 혹은 오염물질 등에 의해 RNA로부터 증폭이 잘 되지 않는 경우가 있다. 따라서 실제 바이러스에 의해 감염이 되었을 지라도 결과는 음성으로 잘못 판정할 수 있는 가능성이 있다. 이를 배제하기 위해 RT-PCR에 대한 양성 대조군(control) primer가 반드시 필요하다. 이를 위해 모든 생물의 translation에 필요하고 그 염기서열이 보존이 잘 되어 있는 인자인 EF1-a(Elongation Factor 1a) 유전자 부위에 대한 다양한 primer를 선별하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 들 중에 선별된 primer는 EF1a-Pf와 EF1a-Pr였으며, 이 primer와 감귤과 사과와 잎에서 추출한 total RNA를 사용하여 RT-PCR을 수행한 결과 예상대로 236 bp의 DNA가 증폭되었다. 또한 대조군 primer를 동시 진단 duplex PCR에 포함하여 그 사용 가능성을 타진하였다. 양성대조군 primer EF1a-Pf, EF1a-Pr primer를 RT-PCR에 첨가한 결과 ASGV, ACLSV, EF1a에 해당하는 404 bp, 566 bp, 236 bp의 DNA가 증폭되었다. 감귤의 경우는 503 bp, 372 bp, 236 bp DNA가 증폭되었다. 따라서, 두 경우 모두 양성 대조군 primer가 바이러스 검출에 문제가 없다는 것을 확인하였다.

자. 과수 잎으로부터의 ASGV, ACLSV, CTLV, CTV 바이러스의 진단 실용성 검증

ASGV, ACLSV, CTLV, CTV 바이러스들의 검색을 위한 선별된 각 바이러스 특이적 primer가 실제 실용성이 있는 지를 조사하였다. 이를 위해 재배중인 농가원에서 사과와 감귤 성목의 신초를 채집하여 PCR 진단 실용성을 시험하였다. 시험 결과 ACLSV, ASGV, CTLV, CTV에 특이적인 primer를 이용하여 이들 바이러스 감염주들을 특이적으로 검출할 수 있음이 밝혀졌다.

차. PCR에 의한 진단과 기존의 ELISA에 의한 진단의 바이러스 검출을 비교

본 연구를 통해 개발된 PCR 진단 방법과 기존에 이용되고 있는 ELISA에 의한 진단 방법을 감도면에서 비교 분석하였다. 사과 과수원에서 재배되고 있는 7-10년생 성목의 신초를 채집하여 ACLSV에 대한 진단 결과 ELISA 방법에 의해 53% 검출

율을. 보인데 반해 PCR 진단 방법을 통해서 66%의 검출율을 나타내었다. 따라서 PCR 진단 방법이 보다 정밀하게 특이적으로 바이러스를 진단할 수 있음을 확인하였다. 또한 duplex PCR 기술을 이용한 바이러스 동시 진단의 실용성도 검증하였다. 사과 주요 재배지역인 경북 봉화 등 7개 지역에서 채집한 시료를 이용하여 ELISA와 비교 진단한 결과, ELISA에서 바이러스 검출율이 11.5%인데 비해 duplex PCR에 의해서는 22.4%의 검출율을 보여 duplex PCR의 검출 정밀도가 더 높은 것으로 확인되었다.

감귤원의 성목 진단에서는 엽병을 포함한 잎조직과 개화기 꽃을 채집하여, CTLV와 CTV에 대해 ELISA 및 duplex PCR 진단결과 ELISA에 의해 검출되지 않은 CTLV가 PCR에 의해 효과적으로 검출이 가능하였고, 또한 CTLV와 CTV가 복합적으로 검출되어 duplex PCR의 가능성을 확인할 수 있었다. CTV 진단 항체를 보유하지 않아 ELISA진단을 수행하지 못하였지만 duplex PCR에 의해 CTV 감염주를 효율적으로 선별할 수 있었다.

Duplex PCR에 의해 2종의 복합감염 여부를 확인할 수 있어 한번의 PCR로 2종의 바이러스 진단이 가능함으로써 비용이나 노력면에서 경제성이 높아 실용가치도 매우 높을 것으로 판단되었다.

카. 대조군 primer 포함한 2종 바이러스 동시진단 duplex PCR 진단기술의 실용성 검증

최종적으로 개발된 대조군 primer 포함한 2종의 바이러스 동시진단 duplex PCR 진단기술을 농가에서 채집한 사과와 감귤의 잎을 이용하여 진단 실용성을 검증하였다. 그 결과 사과의 경우에 ASGV, ACLSV, EF1a에 해당하는 404 bp, 566 bp, 236 bp의 DNA가 증폭되었다. 감귤의 경우는 CTV, EF1a에 해당하는 372 bp, 236 bp DNA가 증폭되었고 CTLV는 검출되지 않은 것을 보아 채집한 감귤잎에서는 감염된 CTLV가 없다는 것을 알 수 있었다. 따라서 두 경우 모두 양성 대조군과 바이러스들의 검출에 문제가 없다는 것을 확인하였다.

2. 활용에 대한 건의

본 연구에서 축적된 지식과 기술을 바탕으로 국내에서 많이 재배되는 사과와 감귤의 치명적인 질병을 유도하는 4종의 바이러스에 대한 PCR을 이용한 진단기술을 개발하였다. 본 연구 결과를 통해 국내 특허 출원(10-2002-38226)하였고 각각의 바이러스들에 대한 단독 감염주, 복합 감염주를 정확하게 선별할 수 있어 시험재료의 선별과 바이러스 피해 해석에도 효율적일 것으로 생각된다. 또한 이 연구기술 개발 결과가 바이러스 무독묘의 효과 검증 및 선별하는데 있어 안정성, 정밀성과 경제성을 높여 이용가치가 매우 높을 것으로 판단된다. 그리고, 바이러스 방제를 위한 무독묘 생산 시스템 확립 및 실용화에 결정적으로 기여할 뿐만 아니라 다른 과수의 바이러스의 진단기술 개발에 체계적인 연구를 수행할 수 있고 주요 과수작물의 주요 품종 및 신품종, 대목종의 바이러스 무독묘 생산 및 보급을 실천함으로써 우리 과수종묘의 국제화를 위한 기반조성이 기대된다.

SUMMARY

Title : Development of diagnostic methods to identify the major fruit viruses.

Apple and citrus trees are one of the most widely grown fruit crops in Korea. They are widely infected by various viruses and their yields are significantly reduced by the infections. It has been known that the major viruses infecting apple and citrus in Korea are apple stem grooving virus (ASGV) and apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV), and citrus tristeza virus (CTV), citrus tatter leaf virus (CTLV), and satsuma dwarf virus(SDV), respectively.

ASGV is a member of the genus *Capillovirus* and a single stranded RNA and the total genome size is a 6.5 kb. ASGV causes a serious disease in apples growing *Malus sieboldii* rootstocks. ACLSV is a member of the genus *Trichovirus* from the *Closterovirus* group and a single stranded RNA and the total genome size is a 7.56 kb and the symptoms are irregular chlorotic rings and line patterns and prematurely small leaves shed.

CTV is a member of the closterovirus group and a single-stranded RNA virus and the total genome size is a 17-20 kb. CTV caused rapid decline in growth , stem pitting, and death. CTLV is a member of the *Capillovirus* group and a single stranded RNA and the total genome size is a 6.5kb. CTLV is serologically related with ASGV and the symptoms are chlorotic local lesions and tatter leaf. SDV is a member of the *Nepovirus* group and a single stranded RNA and the total genome size is 10.1 kb and the symptoms are leaf malformation and rosetting.

The early diagnosis of the viral infection is very economically important for crop production. The most common techniques for plant virus diagnosis are

based on serological method using the specific monoclonal antibodies. However, these methods are not sensitive enough for detection of viral RNA targets in some woody plant tissue due to the low viral titers. In addition, ELISA test is only reliable when virus titer is high after several month of growth. Therefore, it is very hard to diagnose the viral infection in the early stage. Recently, nucleic acid-based diagnostic techniques such as RT-PCR are being used for the detection of small number of virus. RT-PCR assay is known to be more sensitive than ELISA.

To develop the diagnostic method for the viral infection, we characterized the coat protein genes for the ASGV, ACLSV, CTLV, CTV and the N-terminal of RNA polymerase gene of ASGV in Korea. The sequence analysis of the coat proteins genes of ASGV, ACLSV, CTLV, CTV RNAs and the N-terminal of RNA polymerase gene of ASGV in Korea revealed that they have about 88.7%, 75.9%, 94.8%, 93.0% and 79.4% identity to those previously reported, respectively. Base on the nucleotide sequences of the viral genes, we could design the virus gene-specific primers for the detection of ASGV and ACLSV in species of *Malus*, and CTLV and CTV in species of *Citrus*. The RT-PCR using the primers for the genes of ASGV, ACLSV, CTLV, and CTV, successfully gave rise to 404, 566, 503 and 372 bp DNA fragments respectively. Using those viral gene-specific primers, we have also established the duplex RT-PCR assays to diagnose the infection by ASGV and ACLSV, or CTLV and CTV simultaneously. Furthermore, we designed the control primers which has to be included for the RT-PCR as a positive control. We chose the primers specific for Elongation Factor 1a(EF1a) gene as a positive control, since the gene is absolutely required for all the plant and highly conserved. The RT-PCR using the positive control primers successfully amplified the 236 bp DNA fragments corresponding to the EF1a gene.

We have tested the RT-PCR diagnostic methods whether they can be

successfully applied in the field. We tested many samples of *Malus* and *Citrus* collected from the diverse locations in Korea. We could successfully detect the viral infections using the duplex RT-PCR as well as single set of RT-PCR. We compared the sensitivity of the RT-PCR method with ELISA method for the detection of the viral infection. It turns out that RT-PCR methods are more reliable and more sensitive for the detection of ASGV and ACLSV, or CTLV and CTV than ELISA test. Therefore, we concluded that the RT-PCR diagnostic methods established in this study can be used in the fields for early detection of the viral infection.

The availability of these informations will lead to the development of diagnostic methods to identify the other major fruit viruses and will make use of prevention of the fruit viruses and selection of the virus-free seedling.

여 백

CONTENTS

Chapter 1. Introduction of the research development -----	19
Section 1. Necessity of the research development -----	19
Section 2. Research aim and range of the research development -----	21
Chapter 2. Status of the current research development -----	23
Chapter 3. Contents and results of the research -----	25
Section 1. Contents of the research -----	25
Section 2. Cloning of fruit virus gene and development of diagnostic methods to identify the major fruit viruses -----	28
1. Introduction -----	28
2. Materials and methods -----	31
3. Results and discussion -----	37
4. Summary -----	82
Section 3. Practical test of diagnostic methods to identify the major fruit viruses using PCR method -----	84
1. Introduction -----	84
2. Materials and methods -----	86
3. Results and discussion -----	92
4. Summary -----	118

Chapter 4. Achievement and contribution of research	-----121
Section 1. Achievement of research	-----121
Section 2. Contribution of research	-----122
Chapter 5. Future application	-----123
Chapter 6. References	-----125

목 차

제 1 장. 연구개발과제의 개요 -----	19
제1절. 연구개발의 필요성 -----	19
제2절. 연구개발의 목표와 범위 -----	21
제 2 장. 국내외 기술개발의 현황 -----	23
제 3 장. 연구개발 수행 내용 및 결과 -----	25
제1절. 연구개발 내용 -----	25
제2절. 과수 바이러스 유전자 클로닝 및 PCR을 이용한 바이러스 진단기술 개발 (제 1세부과제) -----	28
1. 서 론 -----	28
2. 연구 재료 및 방법 -----	31
3. 결과 및 고찰 -----	37
4. 적 요 -----	82
제3절. PCR을 이용한 과수바이러스 진단기술의 실용성 검정(협동 과제) ----	84
1. 서 론 -----	84
2. 연구 재료 및 방법 -----	86
3. 결과 및 고찰 -----	92
4. 적 요 -----	118

제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	121
제1절. 목표달성도 -----	121
제2절. 관련분야에의 기여도 -----	122
제 5 장. 연구개발결과의 활용계획 -----	123
제 6 장. 참고문헌 -----	125

제 1 장. 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발의 필요성

국내 농업은 농산물 개방에 따른 경쟁 사회에서 농민의 소득증대를 위해 전략적 농업을 육성해야 하는데 국제 경쟁력을 가지기 위해서 균일한 품질을 가지는 농산물의 생산이 중요하고 이를 위해서 여러 가지의 병 방제가 중요하다. 과수 분야에서는 UR에 의한 수입개방으로 우리 농산물의 국제경쟁력 제고를 위한 대책 수립이 시급하게 되었으며, 수출 유망 작목으로서 국제경쟁력을 높이기 위한 고품질 과실생산이 절실하게 요구되고 있다.

과수 바이러스는 과수의 수량감소 뿐만 아니라 당도 및 착색불량, 기형과 등에 의하여 품질이 저하시키는 것으로 알려져 있으며 국내에서 과수 바이러스에 대한 연구는 단크론 항체 및 RT-PCR 진단용 primer 개발 등의 기술들이 여러 기관에서 산발적으로 연구되고 있으나 아직까지 안정된 생산 체계가 확립된 기관은 없다. 과수바이러스에 대한 활발한 연구와 실용화가 이루어진 외국의 예와 비교하면 아직 초기단계라 할 수 있다. 주요 과수 바이러스를 진단 기술 개발이 시급하다.

현재까지 개발된 바이러스의 진단방법으로는 생물학적 검정법, 혈청학적 검정법, 분자생물학적 검정법이 있다. 과수바이러스의 진단에는 생물학적 검정법으로 목본지표 식물검정법, 초본지표 식물검정법이 있고 혈청학적 검정법으로 다크론 항체 및 단크론 항체를 이용하는 방법이 있다. 생물학적 검정법은 병징 발현에 있어서 장기간이 소요되므로 조기진단에는 이용할 수 없는 단점을 가지고 있다. 현재까지 과수바이러스의 진단에는 다크론 항체를 이용한 혈청학적인 방법을 일반적으로 사용하여왔다. 과수 바이러스는 수체내의 낮은 농도로 인해 바이러스의 정제도 매우 까다롭고 어려운 바이러스로 알려져 있다. 따라서 항체제작을 위해 필요한 일정량 이상의 정제바이러스를 얻는 것은 매우 어려운 실정이다. 분자생물학적 검정법은 PCR을 이용한 과수 바이러스 특이적 유전자 시스템의 연구로서 바이러스 염기서열 분석

이 선행되어 바이러스 특이적 primer 선별 제작하여 극소량의 과수 바이러스도 신속하게 조기 진단할 수 있어 고품질의 안정적인 농업 생산에 기여할 수 있는 장점이 있다.

사과와 감귤은 국내 과수 중 가장 큰 비중을 차지하고 있으며 ACLSV, ASGV, CTLV, SDV 등의 바이러스가 많은 피해를 주고 있는 것으로 알려지고 있다. 본 과제에서는 바이러스 ACLSV, ASGV, CTLV, SDV에 대한 감염을 PCR을 이용한 진단기술을 개발하여 농가 소득 증대에 기여하고자 하였다.

제2절. 연구개발의 목표와 범위

구 분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 바이러스 genomic RNA 분리 ○ 바이러스 유전자의 클로닝 및 염기서열 확인 ○ 바이러스 RNA 추출 방법 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 4가지 과수바이러스 ACLSV, ASGV, CTLV, SDV 의 genomic RNA 분리 - RT-PCR 에 의한 유전자의 클로닝 및 염기서열 결정 - 사과, 감귤 잎으로부터 PCR을 위한 바이러스 RNA 추출 방법의 개발
2차년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 바이러스 진단기술개발 ○ 개발된 진단 기술의 실용성 검정 	<ul style="list-style-type: none"> - ACLSV, ASGV, CTLV, 및 SDV 바이러스들의 검색을 위한 바이러스 특이적 primer 선발 - 복합감염에 대비한 바이러스 동시 진단 PCR 방법 개발 - 개발된 PCR 방법을 이용한 과수 잎으로부터의 ACLSV, ASGV, CTLV, 및 SDV 의 진단 실용성 검정 - 항체를 이용한 진단방법과 본 연구의 PCR 방법을 통한 바이러스 진단 결과 비교

여 백

제 2 장. 국내외 기술개발의 현황

과수 바이러스의 진단 기술면에서 볼 때 지표식물을 이용한 생물검정은 기본적인 검정기술이지만 초본지표식물을 이용한 생물검정은 대부분의 과수 바이러스들이 불안정하여 접종이 어렵고 병징 발현이 느려 단점이 있다. 접목검정은 신뢰성은 가장 높지만 greenhouse에서 4-12 주정도 소요되고 field에서 1-3 년 정도로 장기간 소요되며 포장이용과 노력면에서 효율성이 떨어지는 단점이 있다. 미국에서는 IR-2 project를 통해 보다 단기간에 좁은 면적에서 대량으로 검정할 시스템을 개발, 이용하고 있는 실정이다. 농촌진흥청 원예연구소에서 1993년 ~ 1995년까지 「원예작물 바이러스병 정밀 진단 기술 개발」이라는 농업특정과제에서 과수 바이러스의 분리 동정 및 진단기술 개발을 실시하였다. 결과로서 주요 과수 바이러스 발생현황조사 및 분리 동정이 이루어졌다. 사과에서는 다크론 항체를 이용한 ELISA진단에서 apple chlorotic ring spot virus(ACLSV)가 43.6%, apple stem grooving virus(ASGV)가 57.0%, apple mosaic virus(ApMV)가 0%의 감염율을 나타내었으나, ApMV의 병징표현에 의한 육안조사에서는 2개 지역에서 0.8%의 이병율을 나타내었다. 포도바이러스에서는 원예연구소 과수 재배과 포장에서 채집하여 조사한 결과 grapevine leafroll virus I (GLRaV I)이 9.5%, grapevine leafroll virus III (GLRaV III)가 14.6% 발생하고 있었으며 grapevine fanleaf virus(GFLV)가 5주, arabis mosaic virus(ArMV)가 2주, tobacco ringspot virus(ToRSV)가 1주 발생하여 이병율이 전체적으로 31.8% 였다. 모두 다크론 항체를 이용한 ELISA 진단결과로서 앞의 사과 바이러스 ApMV의 예에서와 같이 ELISA 검정에서는 0%의 감염율을 나타내었으나 육안조사에서 0.8%의 이병율을 나타낸 것과 같이 좀더 특이적인 항체를 이용한다면 더욱 더 정밀한 진단이 가능할 것으로 생각된다. 특이적인 항체로 진단이 가능하다면 병징 표현이 잘되지 않고 잠복 감염성이 있는 ACLSV 및 ASGV의 이병율도 좀더 높아질 것으로 생각된다. 과수 바이러스와 같이 수체 내에 농도가 낮고 바이러스의 조직내 소재양식도 사부(phloem) 국재성인 경우에는 특이적인 진단방법의 개발이 요구된다(Bosica, 1997). 미국 USDA와 워싱턴 주립대등과 일본의 식물검역소에

서 다량의 바이러스 종류별로 ELISA 검정기술을 보유하고 있으나 국내에는 아직 개발된 검정기술이 전무한 상태이다. 국내 과수바이러스의 진단방법에 관한 연구로는 농업과학기술원 연구진이 배나무잎 검은 점병 증상의 잎으로부터 12 nm의 굴곡형 사상형 유사 바이러스입자가 있음을 확인하였다. 목본지표식물에서의 접촉전염확인으로 바이러스병해로 추정은 하고 있으나 아직 확실한 분리 동정은 되어 있지 않다. 최근에 PCR 기법 중 multiplex 분석을 이용하여 쉽고 간편하며 빠르게 바이러스 감염 여부를 연구수행하고 있다 (Nie and Singh, 2000, Saade *et al.*, 2000, Sharman 등. 2000). 국내에서는 1999년도부터 성균관 대학교 권무식 교수 연구팀에서 「신고 배나무잎 검은 점병 바이러스의 분리 동정 및 진단기술 개발」이라는 과제로 병원바이러스의 동정 및 RT-PCR 및 단크론 항체를 제작하고 있다. 이것은 아직 시작단계에 불과하고 배나무뿐만 아니라 과수바이러스 전반적인 진단 기술이 미흡한 상태이다. 식물바이러스에서는 농업과학기술원에서 potato leaf roll virus 전체 입자에 대한 단크론 항체제작 등이 이루어지긴 하였으나 유전자 재조합체를 이용한 항체의 제작은 전무한 상태이다(정, 등 1997). 최근 외국에서 ELISA검정보다 정밀한 유전자를 이용한 진단기술이 개발되어 바이러스를 검출해 내는데 유용하게 이용되고 있으나 과수작물일 경우 바이러스 농도가 극히 낮고 억제물질들이 많아 분리된 핵산의 질이 나쁘거나 PCR 반응에 억제제들이 영향을 미쳐 검정에 어려움이 있다(Candresse *et al.*, 1995, Rowhani *et al.*, 1995, Kinard *et al.*, 1996, Jelkmann and Keim-konrad, 1997, James, 1999).

제 3 장. 연구개발 수행 내용 및 결과

제1절. 연구수행 내용

본 연구과제는 산업적으로 중요한 4가지 과수바이러스에 대한 진단 kit를 개발하는 것이다. 이러한 총괄 목표를 달성하기 위해서는 과수바이러스 RNA의 분리, 바이러스 유전자의 클로닝 및 염기서열 결정, 바이러스 RNA 추출 방법 개발, 바이러스 유전자 특이적 primer를 선별하여 PCR을 이용한 진단기술 개발, 2 종의 바이러스 동시 감염시 이를 진단할 수 있는 PCR 방법개발, 개발된 PCR 방법을 이용하여 실용성 검증 등의 단계적 연구진행이 필수적이다. 따라서 다음과 같은 세부과제와 협동연구과제로 구성하고 본 연구를 수행하였다.

세부과제 : 과수 바이러스 유전자 클로닝 및 PCR을 이용한 바이러스 진단기술 개발

- 바이러스 유전자의 클로닝 및 염기서열 결정
 - 협동연구 과제에서 얻어진 국내의 ACLSV, ASGV, CTLV, CTV 바이러스 RNA를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다.
 - RT-PCR에 사용될 primer는 기존에 알려진 바이러스의 염기서열을 바탕으로 염기서열 보존이 잘 되어 있는 부분을 이용하였다.
 - 본 연구에서는 바이러스 진단에 사용될 부위로 보존이 비교적 잘 되어 있는 CP (coat protein), RNA Polymerase 유전자 부위를 클로닝 하였다.
 - ACLSV, ASGV, CTLV 및 CTV 바이러스의 각 RT-PCR 에 의한 증폭된 PCR 산물을 pGEM-T-vector에 클로닝하고 각 유전자에 대한 염기서열을 결정하였다.
- ACLSV, ASGV, CTLV, 및 CTV의 검색을 위한 바이러스 특이적 primer 선발
 - 국내에서 발견된 ACLSV, ASGV, CTLV, 및 CTV의 유전자 염기서열을 기존에 밝혀진 바이러스의 염기서열과 비교 분석하였다.

- 밝혀진 염기서열을 토대로 CP, RNA Polymerase 유전자의 보존이 잘 되어 있는 부위를 선별하여 다양한 primer를 제조하여 PCR을 수행하였다.

- 각 각의 primer set중에 PCR을 통해 명확한 고유의 증폭된 DNA 절편 형성하는 것을 과수바이러스 진단에 이용하여 또한 이들 primer들이 과수의 염색체 DNA를 template로 PCR을 하였을 때 유사한 DNA band를 형성하는 지를 알아보았다.

◦ 복합감염에 대비한 바이러스 동시 진단 PCR 방법 개발

- 2종의 바이러스가 한 과수에 감염될 경우를 대비해 2종의 바이러스들을 동시에 진단할 수 있는 방법을 고안하였다..

- 위의 결과를 토대로 서로 다른 크기의 DNA band를 형성하는 각 각의 바이러스 DNA에 대한 primer set를 선별하였다. 이들 primer들을 혼합하여 PCR을 수행하고 실제 원하는 크기의 각 DNA band를 형성하는지를 알아보았다.

협동연구과제 : PCR을 이용한 과수바이러스 진단기술의 실용성 검정

◦ ACLSV, ASGV, CTLV, SDV, CTV 바이러스 감염주의 선별 및 지표식물을

이용한 분리

- 사과 및 감귤나무를 ELISA법에 의해 바이러스별 감염주를 선별하고 ELISA에 사용된 항체는 스위스 BIOREBA사로부터 구입한 항체를 이용하였다.

- 선별된 바이러스 감염주는 *Chenopodium quinoa* 등 지표식물을 이용하여 신초 및 꽃을 접종함으로써 바이러스를 분리하였다.

- 동정된 바이러스는 계대 배양하여 시험재료로 사용하였고 감염주는 포트에 이식하여 격리 재배하여 보존하며 생육단계별로 신초 및 잎조직을 채취하여 초저온 저장하여 시험에 사용하였다.

◦ RNA 추출방법 개발

- 바이러스가 증식된 초본 기주의 잎과 목본성 기주의 잎조직을 비교하여 식물체

로부터 total RNA를 추출하였다.

- 추출 방법은 Qiagen RNeasy Plant mini kit를 이용하여 total RNA를 추출하고 추출한 RNA는 전기영동하여 확인 후 공동연구기관에 제공하였다.

- 목본성 페놀성물질 등 RNA 추출 및 PCR 반응에 저해작용을 하는 물질들을 제거하기 위하여 PVP 등 산화억제 작용을 하는 물질들을 종류별로, 농도별로 처리하여 최적의 완충액 조성방법 등 고농도의 RNA 추출을 위한 효율적인 방법을 개발하였다.

◦ RT-PCR 진단 키트의 실용성 검정

- 개발된 RT-PCR 검정기술을 이용하여 실제 포장에서의 목본성 과수작물을 대상으로 검정효율성을 검증하였다.

- 감염주의 생육단계별, 검정조직 종류별, 부위별 PCR 진단 효율성을 검정하고 최적의 검정조직, 부위 등을 선발하였다.

- 조직배양단계에 있는 기내묘 등 바이러스 무독묘주 선발 시 사용할 수 있는 효율성도 검증하여 국내 바이러스 무독묘 육성시 필수적 검정과정으로 제시하였다.

- ELISA법과 비교하여 검정한계농도를 조사함으로써 검출감도를 비교하였고 바이러스별로, 작목별로 PCR 검정 효율성이 높은 조직과 검정시기를 선발하여 PCR검정에 의한 과수 바이러스의 진단체계를 확립하였다.

제 2절. 과수 바이러스 유전자 클로닝 및 PCR을 이용한 바이러스 진단기술 개발 (제 1 세부과제)

1. 서론

국내에서 과수 바이러스에 대한 연구는 단크론 항체 및 RT-PCR 진단용 primer 개발 등의 기술들이 여러 기관에서 산발적으로 연구되고 있으나 아직까지 체계적으로 검증된 연구 결과는 없다. 과수바이러스에 대한 활발한 연구와 실용화가 이루어진 외국의 예와 비교하면 아직 초기단계라 할 수 있다. 과수 바이러스는 수세 약화, 수명단축, 결실지연, 수량감소, 과실의 착색불량, 기형과 발생 및 과실의 당도 감소 등의 품질저하를 야기 시킬 뿐만 아니라 접목 불친화성 증대로 묘목 생산을 감소시킬 수 있다 (Yanase *et al.*, 1990). 이러한 과수 바이러스에 의한 병폐를 방지하기 위하여 치료법 개발과 더불어 감염여부를 쉽게 확인할 수 있는 검출방법의 개발이 시급히 요구된다. 영년생 목본성 과수는 체내에 바이러스 농도가 비교적 낮고 불균일하게 분포하며 잠복 감염되어 있는 경우가 많다. 이러한 이유로 바이러스 감염 여부를 파악하지 않고 과수를 계속적으로 재배하게 되어 오히려 바이러스를 확산시키는 결과를 초래하고 있다. 또한 대다수의 과수는 접목을 실시하는 경우가 많아, 바이러스 축적을 과속화시키고 있다.

대표적인 과수 바이러스로는 ACLSV(apple chlorotic leaf spot trichovirus), ASPV(apple stem pitting virus), ASGV(apple stem grooving capillovirus), CRLV(cherry rasp leaf nepovirus), ApMV(apple mosaic ilarvirus), TAMV(tulare apple mosaic ilarvirus), ToRSV(tomato ring spot nepovirus), PNRSV(prunus necrotic ring spot ilarvirus), ACLSV(apple chlorotic leaf spot trichovirus), SDV (satsuma dwarf virus), CTLV(citrus tatter leaf virus) 및 CTV(citrus tristeza virus) 등이 있다 (German S 등 1990, Mink, 1989., Stouffer, 1989., Welsh and van der Meer, 1989., Desvignes, 1999).

ASGV는 길이 600-700 nm, 직경 12 nm 의 capillovirus이며 총 genome 크기가 6.5kb로써 단일 가닥의 RNA로 구성되어 있다. ACLSV는 길이 720-740 nm, 직경 12nm의 trichovirus이며 총 genome 크기가 7.56kb로써 단일 가닥 RNA로 구성되어 있다 (Lister and Bar-Joseph, 1981). ASGV 및 ACLSV는 접목 전염되어 고접병을 야기한다. 새로운 품종을 갱신하기 위하여 접목할 경우 접수 품종이 이들 바이러스에 잠재 감염되어 있으면 2-3년 후에 나무 전체가 급속히 약해지고 심한 경우는 고사하는 병이 발생할 수 있다. 또한 CTLV는 길이 650 nm, 직경 19 nm의 capillovirus로써 CTLV에 감염된 감귤나무는 대목과 접수사이에 이층이 형성되어 접합면에서 수액이 나오거나 영양분의 이동이 차단될 수 있으며, 잎은 황화, 가지의 생육불량, 고사에 의해 결실이 불량해질 수 있다 (Yoshikawa *et al.*, 1993). CTV는 길이 2,000 nm, 직경 11nm 의 closterovirus 그룹에 속하는 굴곡성 사상형 바이러스로써 입자이며 총 genome 크기가 19.296kb이며 (Bar-Joseph, 1985) 또한 단일가닥의 RNA에 2개의 외피 단백질 (25, 27kDa)을 가진다 (Febres *et al.*, 1996). CTV는 감염주에 따라 다양한 증세를 보이는데 온주밀감(citrus unshiu)에는 저항성을 나타내어 실제로 피해가 나타내진 않으나 유자 (citrus junos)에는 줄기나 가지의 표피에 갈색무늬의 가는 줄이나 줄무늬를 보여 수세를 떨어뜨리고, 신장을 약화시켜 경제적 큰 경제적 손실을 야기한다 (Moreno and Guerri, 1997). 최근에 제주도에서 CTV를 ELISA방법으로 진단하고 (Kim *et al.*, 1999) CTV의 CP유전자 염기서열을 밝혀졌다 (Park *et al.*, 2000).

과수 바이러스의 진단기술로는 지표식물을 이용한 생물 검정법, 항혈청 검정법, PCR 검정법 등이 있다 (Takamatsu, 1994). 지표식물을 이용한 생물검정은 바이러스에 감수성을 가지는 목본 지표식물을 이용한 검정방법으로, 바이러스 무독수 육성이나 검역 시에 필수적인 과정으로 이용된다. 그러나 바이러스 종류에 따라 병징 발현이 빠르고 감수성이 우수한 지표식물을 탐색하여야 하는 단점이 있다. 항혈청 검정법은 ELISA (효소결합면역항체법) 등을 이용하는 방법으로, 과수 바이러스와 같이 수체내 바이러스 농도가 낮고 불균일하게 분포되어 있는 식물체에서는 동일한 검출결과를 얻기 어려우며, 재현성이 부족한 단점이 있다. PCR 검정법은 바이러스

DNA 단편을 특이적으로 증폭시키는 것으로 특정 primer를 이용하여 검정하는 방법이다. 또한 혈청학적 방법보다 PCR 검정법이 바이러스 검정에 대한 민감도가 높은 것으로 보고되었다 (정 등, 1997). PCR 검정법으로 바이러스를 검색하기 위해서는 각 바이러스에 특이적인 primer 및 PCR 반응 조건 등을 확립해야 한다. 따라서 과수 바이러스 유전자의 염기서열 분석이 선행되어야 하고 바이러스 특이적 primer 선별 제작하여야 한다. 이 방법은 극소량의 과수 바이러스도 신속하게 진단할 수 있어 초기에 그 감염을 확인하여 고품질의 안정적인 과수 생산에 기여할 수 있다고 생각된다.

본 연구과제에서는 사과와 ACLSV, ASGV, 감귤의 CTLV, SDV, CTV에 대한 바이러스의 진단기술을 PCR을 통해 개발하고자 하였다. 이를 위해 국내 이들 바이러스의 유전자들 중에 비교적 염기서열 보존이 잘 되어 있는 coat protein 혹은 RNA polymerase 의 유전자를 분리해내고 그 염기서열을 분석하였다. 각 바이러스들의 유전자 염기서열을 바탕으로 다양한 바이러스 특이적 primer를 제작하여 PCR을 시도하였으며 바이러스 진단에 이용할 수 있는 최적의 primer set 선별을 시도하였다. 또한 ACLSV와 ASGV 혹은 CTLV와 CTV 바이러스들의 각각의 감염뿐만 아니라 이들 바이러스의 복합 감염을 동시에 진단할 수 있는 PCR 진단 방법을 개발하였다.

2. 연구 재료 및 방법

가. 재료

1) 시약

대장균 배양을 위한 LB 배지는 Bacto-tryptone, yeast extract, Bacto-agar 등은 Difco (USA)에서, agarose, chloroform, phenol, isopropanol, ammonium sulfate, sodium dodecyl sulfate (SDS), sodium phosphate (monobasic, dibasic), sodium chloride 등은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였다. 바이러스의 RNA를 추출하기 위해 사용한 Tri-reagent는 Molecular Research Center Inc. (USA)에서 구입하였다. 식물체에서 총 RNA를 추출하기 위해 사용한 RNeasy plant mini kit은 QIAGEN (Germany)에서 구입하였다. 바이러스의 RT-PCR에 사용된 kit는 Titan™ one tube RT-PCR system으로 Boehringer Mannheim (germany)에서 구입하였다. PCR 산물의 클로닝에 사용된 pGEM-T-Vector는 Promega (USA)에서 구입하였다. 그 외에 본 연구에 사용된 각종 제한효소와 모든 시약들은 Bio-RAD, KOSCO Co., New England Biolab (NEB), Promega, Sigma Chemical Co.으로부터 구입하여 사용하였다.

2) 공시재료

실험에 사용된 사과 및 감귤 잎은 바이러스 감염 증상이 나타나기 시작한 시점인 5월 전후로 농업진흥청 원예기술연구소와 제주 감귤연구소의 포장에서 채집하였으며 과수 바이러스 진단기술 개발의 실용성 검정을 위해 지역별 농원에서 채집하여 사용하였다. *E. coli* JM109 (F' *traD36 lacI^f Δ(lacZ)M15 proA⁺B⁺/e14(McrA⁻) Δ(lac-proAB) thi gyrA96 (Nal^r) endA1 hsdR17 (r_k⁻m_k⁺) relA1 supE44 recA1*)는 transformation의 competent cell로 사용하였다.

나. 기기

원심분리기는 Hanil제품 (Korea), incubator, shaking incubator, clean bench 는 Vision (Korea)제품, chemical balancer는 Mettler 제품 (Swiss), Thermo cycler 는 MJ Research 제품 (USA) sepectrophotometer는 Pharmacia 제품, water bath는 Vision 제품을 사용하였다.

다. 방법

1) Viral total RNA의 분리

협동과제에서 제공되어진 바이러스들의 RNA를 추출하기 위해 바이러스를 인산염 완충액 0.1 ml에 혼합한 다음 시약(Molecular research center, Tri-reagent) 1 ml 을 첨가하여 혼합하였다. 상온에서 5분간 반응시킨 다음 0.5 ml 클로로포름을 혼합 하고, 상온에서 5-10분간 반응시켰다. 이후 4℃에서 10000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상층을 취하고, 여기에 0.5 ml isopropanol을 첨가하여 상온에서 10분간 반응시켰다. 이를 상온에서 7000 rpm으로 원심 분리하여 수득한 RNA 침전물에 75 % 에탄올 1 ml을 첨가하여 세척한 다음 10,000 rpm에서 5분 동안 원심분리한 후 에탄 올을 제거하고 건조시켜 RNase 가 함유하지 않은 증류수 50 μ l에 용해시켰다.

2) 감염주 식물체로부터 total RNA의 분리

협동과제에서 제공되어진 바이러스에 감염된 식물체 잎과 농가에서 채집한 식물 체 잎을 채취하여 냉동보관(-70℃)하여 RNA 분리에 사용하였다. 채집한 잎을 액체질 소에 급속 냉동시켜 아주 미세하게 파쇄하여 분말화 한 후, 이 분말을 5 ml의 RNA extraction buffer (0.2M Tris-HCl, pH 9, 0.4M LiCl, 25 mM EDTA, 1% SDS) 와 5 ml 의 phenol이 들어있는 15 ml centrifuge tube에 넣고 잘 섞어준 후 이 sample을 얼

음에 3-5분 보관한 후 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 얻어낸 수용액 층에 5 ml의 phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1)을 넣고 잘 섞어 준 후 10,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 수확한 상층액에 isopropanol 2.5 ml을 넣고 부드럽게 섞어준 후 얼음에 5분간 보관한 다음 7,000 rpm에서 8분간 원심 분리한 후 침전된 RNA를 DEPC 처리된 물로 녹인 후 pH 5.2인 0.3 M sodium acetate와 에탄올을 사용하여 재침전시켰다. 원심분리 후 건조시킨 후 total RNA을 DEPC로 처리된 물로 녹여 spectrophotometer를 사용하여 RNA 농도와 순도를 측정하였다.

3) RT-PCR을 이용한 바이러스 유전자의 증폭

추출된 ASGV(apple stem groving capillovirus), ACLSV(apple chlorotic leafspot trichovirus), CTLV(citrus tatter leaf virus), CTV(citrus tristeza virus)바이러스 RNA 및 바이러스 감염주 식물체의 RNA를 template로 사용하고 primer는 기존에 알려진 바이러스의 염기서열을 바탕으로 염기서열 보존이 비교적 잘되어 있는 부분 CP(coat protein) 유전자 부위 및 polymerase 유전자 부위 내에서 선택하였다 (표 1.). 추출한 RNA를 주형으로 각 primer 세트로 RT-PCR을 실시하였다 (Titan™ one Tube RT-PCR system, BOEHRINGER MANNHEIM). PCR tube에 template: RNA 1 μ l (μ g/ μ l), 5 X 완충액 (20 mM Tris-HCl, pH 8.3, 100mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1mM dithiothreitol (DTT), 0.5% Tween 20(V/V), 0.5% Nonidet P40(V/V), pH 7.5) 10 μ l, primer1 1 μ l (10 pM), primer2 1 μ l (10 pM), dNTP 4 μ l (2 mM), DTT-solution 2.5 μ l (100 mM), Enzyme mix 1 μ l, DEPC-water 29.5 μ l을 넣어 전체 부피를 50 ul로 만들었다. PCR 반응은 thermocycler에 50 °C에서 30분 반응시킨 후 94 °C에서 2분간 denaturation한 후(94 °C에서 1분, 54 °C에서 1분, 68 °C에서 1분) 10회 반복 한 후 (94 °C에서 1분, 54 °C에서 1분, 68 °C에서 1분*) 25회 반복한 후 68 °C에서 7분간 반응시켰다 (*: 1회당 5초씩 증가, annealing temperature : 사과 바이러스 경우; 54°C, 감귤바이러스 경우 ; 52°C).

4) 과수 바이러스 cDNA의 클로닝 및 염기서열 결정

역전사 중합효소 반응(RT-PCR)의 PCR 산물을 클로닝 하기위해 pGEM-T vector kit(Promega)을 사용하여 ligation은 제조사의 실험 방법에 따라 수행하였다. Ligation은 2X ligation buffer (66 mM Tris-HCl, pH 7.6, 6.6 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP) 10 μ l와 50 ng pGEM-T vector, 100 ng PCR 산물, 150 U T4 DNA ligase를 첨가 하여 총 20 μ l 부피로 되게 한 후 25 °C에서 1시간 반응 시켰다. Ligation 반응물을 Hanahan 방법에 따라 만들어진 competent cell (JM 109)에 첨가 하여, 얼음에 40분 방치 후 42°C에서 90초간 중탕하였다. 다시 얼음에 3 분간 방치 후 1 ml LB 배지 (1% Bacto trypton, 0.5% yeast extract, 1% NaCl)를 첨가한 후 37°C에서 200 rpm으로 1시간 진탕배양 하였다. 배양액 50 μ l를 50 μ g/ml의 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosidase (X-gal)이 포함된 LB/Ampicillin 평판 배지에 도말하여 흰색 콜로니를확인 하였다. 확인된 흰색 콜로니를 LB/Ampicillin 배지에 접종한 후 37°C에서 200 rpm 진탕 배양한 후 plasmid를 분리 하였다.

바이러스 유전자의 염기서열 분석은 클로닝된 plasmid double stranded DNA를 이용하여 Sanger등의 방법을 이용하였다. DNA 염기서열이 결정된 바이러스 유전자와 genome data base에서 기존의 다른 바이러스 genome과 상동성을 분석하였다.

5) 복합감염에 대비한 바이러스 동시 진단 duplex PCR 개발

2종의 바이러스가 한 과수에 감염될 경우를 대비해 복합 감염을 동시에 진단할 수 있도록 우선 사과에서 감염될 수 있는 바이러스 ACLSV와 ASGV을 진단하기 위해서 선별된 각각의 primer set과 각각의 바이러스 감염주로부터 추출한 RNA를 이용, 농도별로 혼합하여 RT-PCR을 수행하였다. PCR tube에 각각의 template RNA 1 μ l(μ g/ μ l)씩, 5 X 완충액 (20 mM Tris-HCl, pH 8.3, 100mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1mM dithiothreitol (DTT), 0.5% Tween 20(V/V), 0.5% Nonidet P40(V/V), pH 7.5) 10

μl , ASGV-Pf 1 μl (10 pM), ASGV-Pr 1 μl (10 pM), ACLSV-CPf 1 μl (10 pM), ACLSV-CPr 1 μl (10 pM), dNTP 4 μl (2 mM), DTT-solution 2.5 μl (100 mM), Enzyme mix 1 μl , DEPC-water 27.5 μl 을 넣어 전체 부피를 50 μl 로 만들었다. PCR 반응은 thermocycler에 50 °C에서 30분 반응시킨 후 94 °C에서 2분간 denaturation 한 후(94 °C에서 1분, 54 °C에서 1분, 68 °C에서 1분) 10회 반복 한 후 (94 °C에서 1분, 54 °C에서 1분, 68 °C에서 1분*) 25회 반복한 후 68 °C에서 7분간 반응시켰다 (*: 1회당 5초씩 증가).

감귤에 감염하는 CTLV와 CTV을 진단하기 위해서 선별된 각각의 primer set과 각각의 바이러스 감염주의 RNA를 이용, 농도별로 혼합하여 RT-PCR을 수행하였다. PCR tube에 각각의 template RNA 1 μl ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)씩, 5 X 완충액 (20 mM Tris-HCl, pH 8.3, 100mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1mM dithiothreitol (DTT), 0.5% Tween 20(V/V), 0.5% Nonidet P40(V/V), pH 7.5) 10 μl , CTLV-CPf 1 μl (10 pM), CTLV-CPr 1 μl (10 pM), CTV-CPf 1 μl (10 pM), CTV-CPr 1 μl (10 pM), dNTP 4 μl (2 mM), DTT-solution 2.5 μl (100 mM), Enzyme mix 1 μl , DEPC-water 27.5 μl 을 넣어 전체 부피를 50 μl 로 만들었다. PCR 반응은 thermocycler에 50 °C에서 30분 반응시킨 후 94 °C에서 2분간 denaturation한 후(94 °C에서 1분, 52 °C에서 1분, 68 °C에서 1분) 10회 반복 한 후 (94 °C에서 1분, 52 °C에서 1분, 68 °C에서 1분*) 25회 반복한 후 68 °C에서 7분간 반응시켰다 (*: 1회당 5초씩 증가).

6) Duplex PCR에 필요한 양성 대조군 primer 선별

양성 대조군 primer는 과수 바이러스 검정용 primer로 RT-PCR을 실시할 때 함께 사용하여 RT-PCR 반응 여부를 확인하기 위하여 사용하였다. 식물체의 전사에 관여하고 거의 모든 생명체에서 발현하는 단백질 중 EF1a(Elongation factor 1a, AJ223969)를 증폭시킬 수 있는 대조군 primer set을 선별하였다. EF1a-Pf, EF1a-Pr primer로 명명 하였다.

사과에서 감염될 수 있는 바이러스 ASGV와 ACLSV을 진단하기 위해서 선별된 각

각의 primer set과 각각의 바이러스들의 복합감염 사과 식물체의 RNA를 template로 사용하고 PCR tube에 template RNA 1 μl ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)씩, 5 X 완충액 (20 mM Tris-HCl, pH 8.3, 100mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1mM dithiothreitol (DTT), 0.5% Tween 20(V/V), 0.5% Nonidet P40(V/V), pH 7.5) 10 μl , ASGV-Pf 1 μl (10 pM), ASGV-Pr 1 μl (10 pM), ACLSV-CPf 1 μl (10 pM), ACLSV-CPr 1 μl (10 pM), EF1a-Pf 0.5 μl (10 pM), EF1a-Pr 0.5 μl (10 pM), dNTP 4 μl (2 mM), DTT-solution 2.5 μl (100 mM), Enzyme mix 1 μl , DEPC-water 26.5 μl 을 넣어 전체 부피를 50 μl 로 만들었다. PCR 반응은 thermocycler에 50 °C에서 30분 반응시킨 후 94 °C에서 2분간 denaturation 한 후(94 °C에서 1분, 54 °C에서 1분, 68 °C에서 1분) 10회 반복 한 후 (94 °C에서 1분, 54 °C에서 1분, 68 °C에서 1분*) 25회 반복한 후 68 °C에서 7분간 반응시켰다 (*: 1회당 5초씩 증가).

감귤에서 감염될 수 있는 바이러스 CTLV와 CTV를 진단하기 위해서 선별된 각각의 primer set과 각각의 바이러스들의 복합감염 감귤 식물체의 RNA를 사용하고 PCR tube에 template RNA 1 μl ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)씩, 5 X 완충액 (20 mM Tris-HCl, pH 8.3, 100mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1mM dithiothreitol (DTT), 0.5% Tween 20(V/V), 0.5% Nonidet P40(V/V), pH 7.5) 10 μl , CTLV-CPf 1 μl (10 pM), CTLV-CPr 1 μl (10 pM), CTV-CPf 1 μl (10 pM), CTV-CPr 1 μl (10 pM), EF1a-Pf 0.5 μl (10 pM), EF1a-Pr 0.5 μl (10 pM), dNTP 4 μl (2 mM), DTT-solution 2.5 μl (100 mM), Enzyme mix 1 μl , DEPC-water 26.5 μl 을 넣어 전체 부피를 50 μl 로 만들었다. PCR 반응은 thermocycler에 50 °C에서 30분 반응시킨 후 94 °C에서 2분간 denaturation한 후(94 °C에서 1분, 52 °C에서 1분, 68 °C에서 1분) 10회 반복 한 후 (94 °C에서 1분, 52 °C에서 1분, 68 °C에서 1분*) 25회 반복한 후 68 °C에서 7분간 반응시켰다 (*: 1회당 5초씩 증가).

3. 결과 및 고찰

가. RT-PCR을 이용한 바이러스 유전자의 증폭

1) ASGV RNA 이용 RT-PCR 수행

협동과제에서 제공받은 사과와 배에서 분리된 ASGV (apple stem grooving capillovirus) 바이러스의 RNA를 추출하여 RT-PCR에서 template로 사용하고 primer는 기존에 알려진 ASGV 바이러스의 염기서열을 바탕으로 염기서열 보존이 비교적 잘 되어 있는 부분 CP (coat protein) 유전자 부위 (GenBank accession number : D14995)와 RNA polymerase 유전자의 N-terminal 부위(GenBank accession number : D14995)를 선택하였다. CP 유전자 부위에서 선택한 primer는 ASGV-CPf (5'-CCCCTGTTGGATTTGATACACCT-3'), ASGV-CPr (5'-TGC GGAATTCACACGACTCCTAA-3'), RNA polymerase 유전자의 N-terminal 부위 내의 primer는 ASGV-Pf6 (5'-ACAGGCTTAATTTCCGCG-3'), ASGV-Pr6 (5'-TCAAAAAGGGCTAAGAAAGTG-3')이며 RT-PCR을 수행한 결과 원하는 크기의 PCR 산물을 얻었다 (그림1).

2) ACLSV RNA 이용 RT-PCR 수행

협동과제에서 제공받은 사과에서 분리된 ACLSV (apple chlorotic leafspot trichovirus) 바이러스의 RNA를 추출하여 RT-PCR에서 template로 사용하고 primer는 기존에 알려진 ACLSV 바이러스의 염기서열을 바탕으로 염기서열 보존이 비교적 잘 되어 있는 부분 CP (coat protein) 유전자 부위 (GenBank accession number : AJ243438)를 선택하였다. CP 유전자 부위에서 선택한 primer는 ACLSV-CPf (5'-GAGAGTTTCAGTTTGCTAGACA-3'), ACLSV-CPr (5'-GCAAT TCAGTCTGTAAAG-3')이며 RT-PCR을 수행한 결과 원하는 크기의 PCR 산물을 얻어 염기서열을 확인하였다 (그림 2).

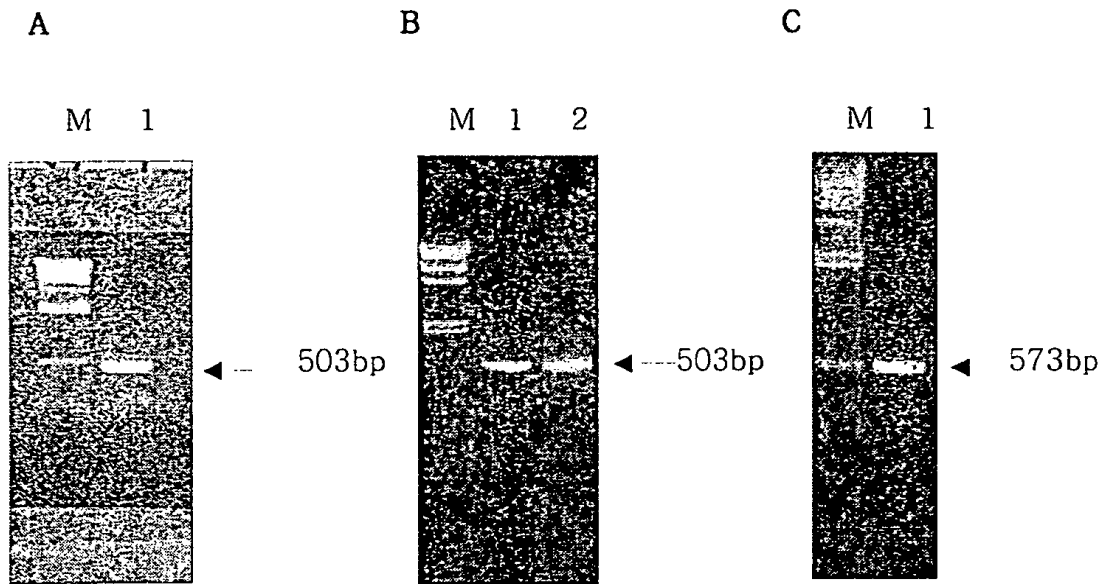


그림 1. ASGV 바이러스 CP 및 RNA polymerase 유전자 부위의 RT-PCR 결과.

A. 사과에서 분리된 ASGV 바이러스의 RNA를 template로 사용, RT-PCR에 의해 증폭된 ASGV CP유전자는 503 bp 길이의 DNA band 형성. B. 배에서 분리된 ASGV 바이러스의 RNA를 template로 사용, RT-PCR에 의해 증폭된 ASGV CP는 모두 503bp 길이의 DNA band 형성. C. 사과에서 분리된 ASGV 바이러스의 RNA를 template로 사용, RT-PCR에 의해 증폭된 ASGV RNA polymerase 유전자 N-terminal 부위는 573 bp 길이의 DNA band 형성. 좌측 lane은 DNA size marker (λ /Hind III)이다.

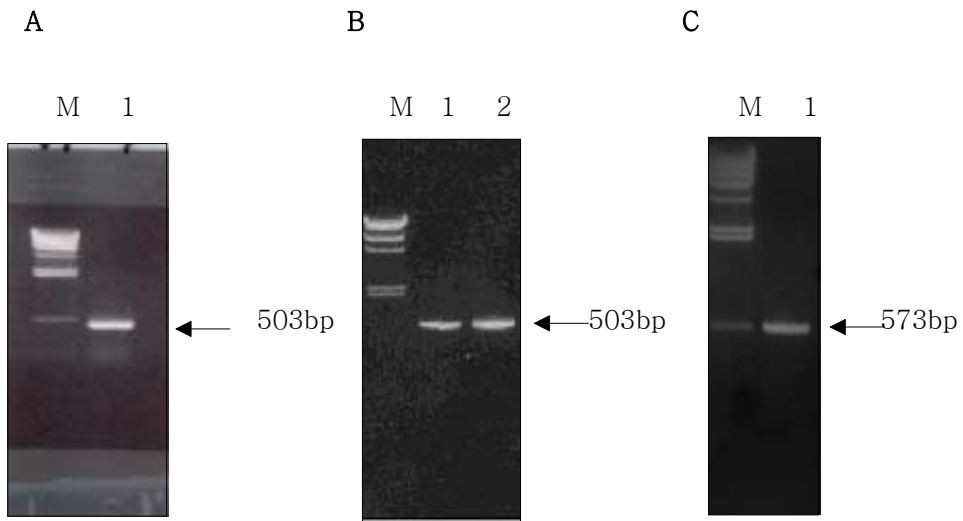


그림 1. ASGV 바이러스 CP 및 RNA polymerase 유전자 부위의 RT-PCR 결과.

A. 사과에서 분리된 ASGV 바이러스의 RNA를 template로 사용, RT-PCR에 의해 증폭된 ASGV CP유전자는 503 bp 길이의 DNA band 형성. B. 배에서 분리된 ASGV 바이러스의 RNA를 template로 사용, RT-PCR에 의해 증폭된 ASGV CP는 모두 503bp 길이의 DNA band 형성. C. 사과에서 분리된 ASGV 바이러스의 RNA를 template로 사용, RT-PCR에 의해 증폭된 ASGV RNA polymerase 유전자 N-terminal 부위는 573 bp 길이의 DNA band 형성. 좌측 lane은 DNA size marker (λ /Hind III)이다.

M 1

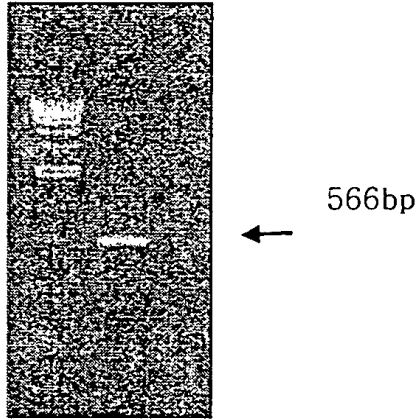


그림 2. ACLSV 바이러스 CP(coat protein) 유전자의 RT-PCR 결과.

A. 사과에서 분리된 ACLSV 바이러스의 RNA를 template로 사용, RT-PCR에 의해 증폭된 ACLSV CP유전자는 566 bp 길이의 DNA band 형성. 좌측 lane은 DNA size marker (λ /Hind III)이다.

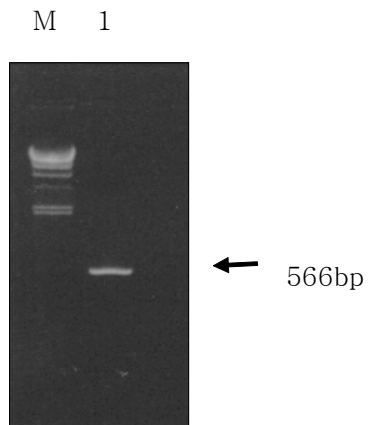


그림 2. ACLSV 바이러스 CP(coat protein) 유전자의 RT-PCR 결과.

A. 사과에서 분리된 ACLSV 바이러스의 RNA를 template로 사용, RT-PCR에 의해 증폭된 ACLSV CP유전자는 566 bp 길이의 DNA band 형성. 좌측 lane은 DNA size marker (λ /Hind III)이다.

3) CTLV RNA 이용 RT-PCR 수행

협동과제에서 제공받은 감귤에서 분리된 CTLV (citrus tatter leaf virus) 바이러스의 RNA를 추출하여 RT-PCR에서 template로 사용하고 primer는 기존에 알려진 CTLV 바이러스의 염기서열을 바탕으로 염기서열 보존이 비교적 잘되어 있는 부분 CP (coat protein) 유전자 부위 (GenBank accession number : D16681)를 선택하였다. CP 유전자 부위에서 선택한 primer는 CTLV-CPf (5'-CCCGCTGTTG GATTTGATACACCT-3'), CTLV-CPr (5'-TGCGGAATTTTCACACGACTCCTAA -3')이며 RT-PCR을 수행한 결과 원하는 크기의 PCR 산물을 얻어 염기서열을 확인하였다 (그림 3).

4) SDV 감염주 식물에서 추출한 total RNA 이용 RT-PCR 수행

협동과제에서 제공받은 국내의 SDV (Satsuma dwarf virus) 바이러스 감염주 식물에서 추출한 total RNA를 RT-PCR에서 template로 사용하고 primer는 기존에 알려진 바이러스의 염기서열을 바탕으로 염기서열 보존이 비교적 잘 되어 있는 부분 CP(coat protein) 유전자 부위 (GenBank accession number : AB009959)에서 다양한 primer (표 1)를 제작하여 RT-PCR을 수행한 결과 원하는 크기의 DNA를 얻을 수 없었고 또 클로닝하여 염기서열을 밝힌 결과 SDV와는 관계가 없는 것이었다. 그래서 SDV virus 유전자 중 polymerase 유전자 (GenBank accession number : AB009958)내에 특이적인 다양한 선택한 primer를 제작하여 RT-PCR을 수행하였다 (표 2). 그 결과 SDV-Pf6 (5'-CATGGAGATCTACGGATTCT-3'), SDV-Pr6 (5'-GGTGCCACCTCAGCAACAGT-3')를 사용하여 원하는 크기와 유사한 PCR 산물을 얻어 염기서열을 확인하였다 (그림 4). 증폭된 DNA 산물을 클로닝하여 확인된 염기서열을 genome data base에서 비교해본 결과 SDV virus의 염기서열이 아닌 uncultured banisveld landfill bacterium genome, Atlantic salmon mRNA 등과 유사한 것으로 확인되었다. 또한 다른 방법으로 SDV 바이러스를 확인하기 위해 SDV 감염주 식물에서 추출한 total RNA, random hexamer를 이용 RT-PCR 수행하였다 (그림 5). random hexamer와 superscript Reverse Transcriptase을 사용하여 RT를 수행한 후 다시 그 RT 산물을 template로

하여 nested PCR을 수행하여 SDV virus의 염기서열을 확인하였다. 각각의 증폭된 PCR 산물을 pGEM- T vector에 cloning 한 후 염기서열을 확인하였다. 확인한 염기서열 대부분이 SDV virus의 염기서열이 아닌 uncultured antarctica bacterium 이거나 chloroplast dendrobium chrysotoxum 이었다. 국내에서 아직 SDV의 분리가 성공한 예가 없고 기존에 감염주라고 추측되는 샘플을 분석해 보았지만 모두 SDV와는 상관에 없는 것으로 판명되었다. 따라서 본 연구에서 SDV 감염주를 얻을 수 없어 SDV에 관한 연구는 더 이상 진행하지 못했으며 대신에 감귤에 감염하는 CTV (citrus tatter leaf virus)에 대한 연구를 진행하였다.

5) CTV RNA 이용 RT-PCR 수행

협동과제에서 제공받은 감귤에서 분리된 CTV (citrus tatter leaf virus) 바이러스의 RNA를 추출하여 RT-PCR에서 template로 사용하고 primer는 기존에 알려진 CTV 바이러스의 염기서열을 바탕으로 염기서열 보존이 비교적 잘되어 있는 부분 CP (coat protein) 유전자 부위 (GenBank accession number : AF339088)를 선택하였다. CP 유전자 부위에서 선택한 primer는 CTV-CPf1 (5'-ATGGACGACGAAACAAAGAAATTG-3'), CTV-CPr (5'-TCAACGTGTGTTGAATTTCCCAAG-3'), CTV-CPf (5'-ACGGGTATAACGGACACT-3') 이다. RT-PCR을 수행한 결과 원하는 크기의 PCR 산물을 얻어 염기서열을 확인하였다 (그림 6).

M 1

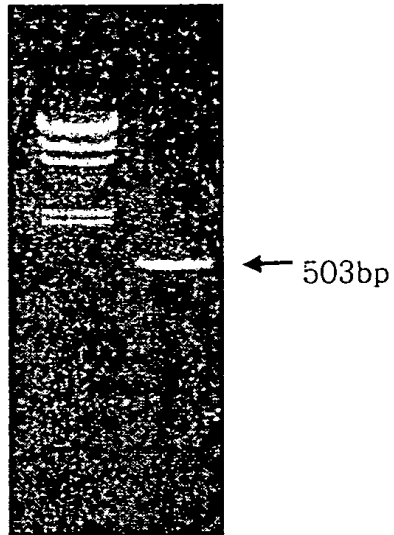


그림 3. CTLV 바이러스 CP(coat protein) 유전자의 RT-PCR 결과.

A. 감귤에서 분리된 CTLV 바이러스의 RNA를 template로 사용, RT-PCR에 의해 증폭된 CTLV CP유전자는 503 bp 길이의 DNA band 형성. 좌측 lane은 DNA size marker (λ /Hind III)이다.

M 1

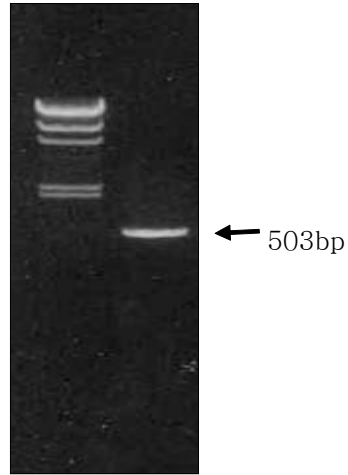


그림 3. CTLV 바이러스 CP(coat protein) 유전자의 RT-PCR 결과.

A. 감귤에서 분리된 CTLV 바이러스의 RNA를 template로 사용, RT-PCR에 의해 증폭된 CTLV CP유전자는 503 bp 길이의 DNA band 형성. 좌측 lane은 DNA size marker (λ /Hind III)이다.

서열 번호	프라이머 이름	프라이머 염기서열	유전자내 위치
1	SDV-CPf1	5'-GGTTATACAGAGTTCTCCGAACGT-3'	3042-3065
2	SDV-CPr1	5'-CTTTCTACCACCAACGGTAGAAG-3'	3721-3743
3	SDV-CPf2	5'-TTTGGAGCGTATTACGCTTATCTTC-3'	4395-4419
4	SDV-CPr2	5'-TTAAGCAGCTGTACGCAGCGATGG-3'	5004-5027
5	SDV-CPf3	5'-TCTGGACTGACCACCACGCGTAGT-3'	4371-4394
6	SDV-CPr3	5'-GGCCATCAGACTTTCCTGATTGAA-3'	5324-5345
7	SDV-CPr3	5'-TAAAGACACGAGTCTTGGATCTGG-3'	3581-3604
8	SDV-CPr3	5'-ATCCCGAACCTCTCCAGGGCAACT-3'	3979-4002

표 1. RT-PCR에 사용된 SDV 바이러스 CP 유전자 (GenBank Accession number : AB009959)에 특이적인 primer set.

서열 번호	프라이머 이름	프라이머 염기서열	유전자내 위치
1	SDV-Pf1	5'-GGAGCTGAAATACCAGAAGC-3'	3797-3816
2	SDV-Pr1	5'-ATCCACCTTGCGCATAATGT-3'	4199-4218
3	SDV-Pf2	5'-AAACCTATTTGCGAGCGCCGAA-3'	1205-1226
4	SDV-Pr2	5'-CCTTGCCTTTCGTAAAGAAGTTGG-3'	1641-1664
5	SDV-Pf3	5'-AGATAGATGATCGCTCGCCTTT-3'	4701-4722
6	SDV-Pr3	5'-TCTCATCCTTAGCACATGCAGT-3'	5111-5132
7	SDV-Pf4	5'-GTTAACCAACGCACGAGAAGAA-3'	5441-5462
8	SDV-Pr4	5'-GTACCCGTTTTGGCGCCATCAC-3'	5781-5802
9	SDV-Pf5	5'-TTCCGGGAGGCTGGCGCACTAAG-3'	6291-6313
10	SDV-Pr5	5'-GGCCATCAGACTTTCCTGATTG-3'	6773-6795
11	SDV-Pf6	5'-CATGGAGATCTACGGATTCT-3'	301-320
12	SDV-Pr6	5'-GGTGCCACCTCAGCAACAGT-3'	851-870

표 2. RT-PCR에 사용된 SDV 바이러스 RNA polymerase 유전자 (GenBank Accession number AB009958)에 특이적인 primer set.

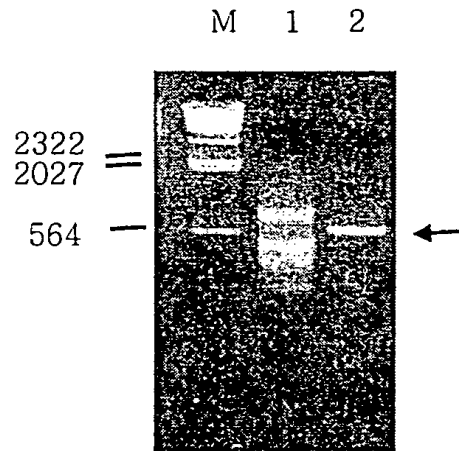


그림 4. SDV 감염주 식물에서 얻은 total RNA 이용 RT-PCR 결과.

M: λ /HindIII size marker, 1,2: SDV 감염주 식물에서 얻은 total RNA 이용 증폭된 RT-PCR 산물(576bp)이다.

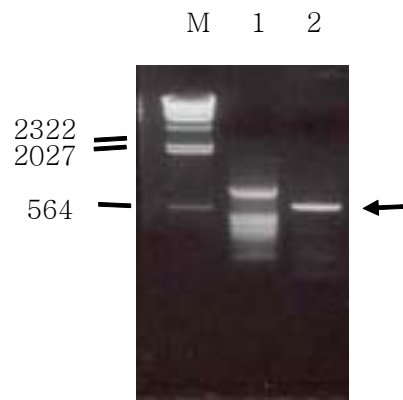


그림 4. SDV 감염주 식물에서 얻은 total RNA 이용 RT-PCR 결과.

M: λ /HindIII size marker, 1,2: SDV 감염주 식물에서 얻은 total RNA 이용 증폭된 RT-PCR 산물(576bp)이다.

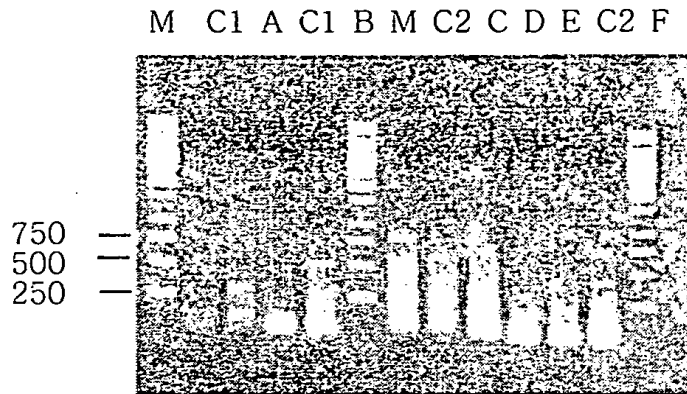


그림 5. SDV virus 진단 RT 후 PCR product 결과.

M: 1kbp ladder marker, C1: Virus free 땅과리 식물에서 추출한 total RNA을 이용한 negative control, C2: Virus free 감귤 식물에서 추출한 total RNA을 이용한 negative control, A,B: SDV virus 감염주 땅과리 온주식물에서 추출한 total RNA을 이용한 PCR product, C,D,E,F: SDV virus 감염주 감귤 온주 식물에서 추출한 total RNA을 이용한 PCR 산물이다.

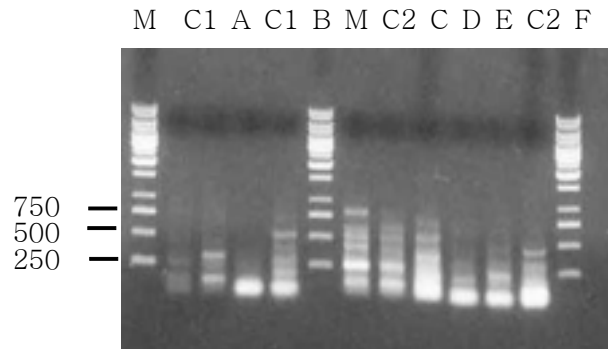


그림 5. SDV virus 진단 RT 후 PCR product 결과.

M: 1kbp ladder marker, C1: Virus free 땅파리 식물에서 추출한 total RNA을 이용한 negative control, C2: Virus free 감귤 식물에서 추출한 total RNA을 이용한 negative control, A,B: SDV virus 감염주 땅파리 온주식물에서 추출한 total RNA을 이용한 PCR product, C,D,E,F: SDV virus 감염주 감귤 온주 식물에서 추출한 total RNA을 이용한 PCR 산물이다.

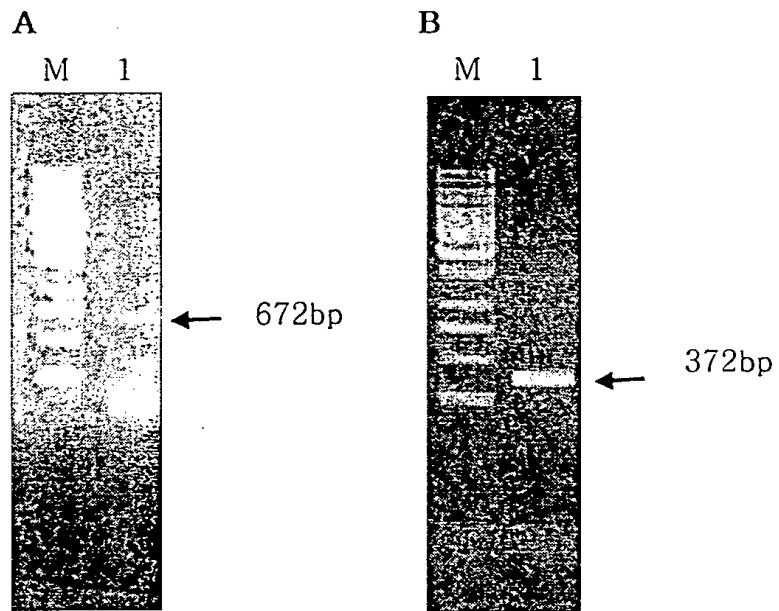


그림 6. CTV 바이러스 CP(coat protein) 유전자의 RT-PCR 결과.

A. 감귤에서 분리된 CTV 바이러스의 RNA를 template, primer를 CTV-CPf1, CTV-CPr로 사용, RT-PCR에 의해 증폭된 CTV CP유전자는 672bp 길이의 DNA band 형성. B. 감귤에서 분리된 CTV 바이러스의 RNA를 template, primer를 CTV-CPf, CTV-CPr로 사용, RT-PCR에 의해 증폭된 CTV CP 유전자 부위는 372bp 길이의 DNA band 형성. 좌측 lane은 DNA size marker (1kb ladder marker)이다.

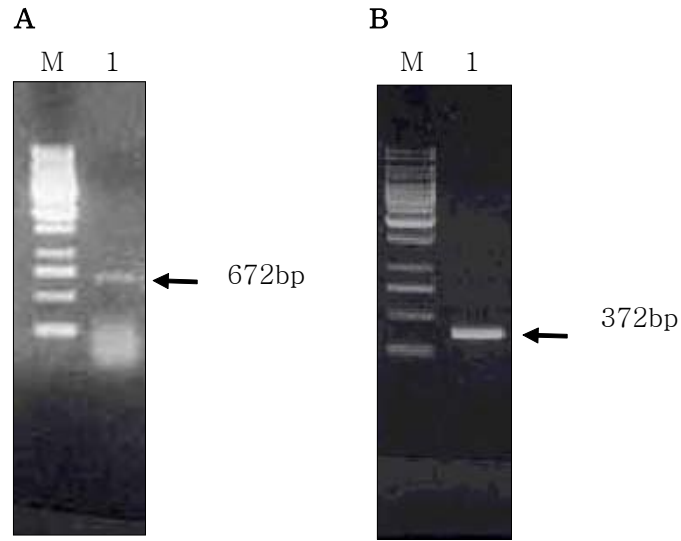


그림 6. CTV 바이러스 CP(coat protein) 유전자의 RT-PCR 결과.

A. 감귤에서 분리된 CTV 바이러스의 RNA를 template, primer를 CTV-CPf1, CTV-CPr로 사용, RT-PCR에 의해 증폭된 CTV CP유전자는 672bp 길이의 DNA band 형성. B. 감귤에서 분리된 CTV 바이러스의 RNA를 template, primer를 CTV-CPf, CTV-CPr로 사용, RT-PCR에 의해 증폭된 CTV CP 유전자 부위는 372bp 길이의 DNA band 형성. 좌측 lane은 DNA size marker (1kb ladder marker)이다.

나. 과수 바이러스 cDNA의 클로닝 및 염기서열 결정

1) 사과에서 분리된 ASGV 바이러스 CP 유전자 염기서열 결정

RT-PCR에 의해 증폭된 CP 유전자에 대한 DNA 절편을 pGEM-T-vector에 클로닝한 후 그 염기서열을 결정하였다. PCR에 의한 오류를 감안하여 3개 이상의 clone을 무작위로 선별하여 염기서열을 결정하였으며 그 결과 최종적으로 ASGV 바이러스 CP 유전자 503bp의 염기서열을 확인 하였다 (그림 7). 본 연구결과 확인된 국내 사과의 ASGV CP 유전자와 기존 보고된 ASGV CP 유전자의 cDNA 혹은 genomic DNA의 염기서열과 비교한 결과 503 bp 중에 57개의 위치에서 서로 다른 염기서열을 갖고 있었고 88.7% 정도의 유사성을 보였다. 사과의 ASGV CP 유전자는 기존에 CTLV와 매우 유사하다는 것이 보고 되어 있어 CTLV와 그 염기서열을 비교한 결과 92.8% 정도의 유사성을 보였다.

2) 사과에서 분리된 ASGV 바이러스 RNA polymerase 유전자 N-terminal 부위 염기 서열 결정

RT-PCR에 의해 증폭된 ASGV RNA polymerase N-terminal 부위 유전자에 대한 DNA 절편을 pGEM-T-vector에 클로닝한 후 그 염기서열을 결정하였다. PCR에 의한 오류를 감안하여 3개 이상의 clone을 무작위로 선별하여 염기서열을 결정하였으며 그 결과 최종적으로 ASGV 바이러스 RNA polymerase N-terminal 부위 유전자 573bp의 염기서열을 확인 하였다 (그림 8). 본 연구결과 확인된 국내 사과의 ASGV RNA polymerase 유전자 N-terminal 부위의 염기서열과 기존 보고된 ASGV RNA polymerase 유전자의 cDNA 혹은 genomic DNA의 염기서열과 비교한 결과 573 bp 중에 118개의 위치에서 서로 다른 염기서열을 갖고 있었고 79.4%가 유사성을 확인할 수 있었다.

```

** ***** **
Amplified ASGV CP cDNA seq. 1 CCCGCTGTTGGATTTGATACACCTCCGGTTCATTTTAATT 40
                               ASGV-CPf
ASGV cDNA seq. 1361 GACCCAGTTTCCTGCTGTTGGATTTGATACCCCTCCGGTTCATTACAATT 1410
ASGV genome seq. 1302 GACCCAGTTTCCCGCTGTTGGATTTGATACACCTCCGGTTCATTATAATT 1351
CTLV cDNA seq. 5861 GACCCAGTTTCCTGCTGTTGGATTTGATACCCCTCCGGTTCATTACAATT 5910

***** ** ***** ** * ** *****

41 TGACAACGACCCGAAAGAAGGGGAGACTGAAGAGCAAAGAAGGCCAGA 90
1411 TGACAACGACCCAAAAGAAGGGGAACTGAAGAGCAAAGAAGGCCAGA 1460
1352 TGACAACGACCCAAAAGGAAGGGGAGACTGACGAAGGAAGGAAGGCCAGA 1401
5911 TGACAACGACCCAAAAGAAGGGGAACTGAAGAGCAAAGAAGGCCAGA 5960

* *** ***** ***** ** ** *****

91 GAGGGATCGTCTGGTGAAAAACAAGATTTGGAGAATAGACTTGTCAA 140
1461 GAGGGTTCGTCTGGCGAAAAACAATAATTTGGAGAATCGACTTGTCAA 1510
1402 GCGGGTTCGTCTGGCGAAAAACAATAATTTGGAGGATCGATTTGTCAA 1451
5961 GAGGGTTCGTCTGGCGAAAAACAATAATTTGGAGAATCGACTTGTCAA 6010

***** *****

141 CGTTGTACCTGAATTGAAAACCTTTGCTGCCACTTCTAGGCAGAACTCTT 190
1511 TGTTGTACCTGAATTGAAAACCTTTGCTGCCACTTCTAGGCAGAACTCTT 1560
1452 TGTTGTTCCCTGAATTGAAAACCTTTGCTGCCACTTCCAGGCAGAACTCTT 1501
6011 TGTTGTACCTGAATTGAAAACCTTTGCTGCCACTTCTAGGCAGAACTCTT 6061

***** ***** ** ***** ** *** **

191 TGAACGAATGTACGTTTCAGGAAGCTTTGTGAACCATTTGCTGATCTAGCA 240
1561 TGAATGAATGTACATTCAGAAAGCTTTGTGAGCCATTCGCTGATTTGGCC 1610
1502 TGAACGAATGTACGTTTCAGAAAGCTTTGCGAGCCATTTGCCGATTTGGCT 1551

```


6061 TGAATGAATGTACATTCAGAAAGCTTTGTGAGCCATTCGCTGATTTGGCC 6110
** ** ***** ** ** ***** ** *****

241 CGTGAATTTCTACATGAAAGGTGGTCCAAAGGACTGGCCACCAACATTTA 290
1611 CGTGAGTTTCTTCATGAAAGGTGGTCAAAGGATTGGCCACTAACATTTA 1660
1552 CGAGAATTTCTACATGAAAGGTGGTCTAAGGGATTGGCCACCAATATTTA 1601
6111 CGTGAGTTTCTTCATGAAAGGTGGTCAAAGGATTGGCCACTAACATTTA 6160

***** ** ***** ***** *

291 CAAGAAATGGCCCAAAGCTTTTGAAAAAAGTCCATGGGTGGCATTGACT 340
1661 TAAGAAATGGCCCAAAGCTTTTGAAAAAAGCCCTTGGGTGGCATTGATT 1710
1602 CAAGAAATGGCCCAAAGCTTTGAAAAAAGTCCATGGGTGGCCTTTGATT 1651
6161 TAAGAAATGGCCCAAAGCTTTTGAAAAAAGCCCTTGGGTGGCATTGATT 6210

***** ** * ***** ***** *****

341 TTGCCACTGGTCTAAAAATGAATCGTTTAAACACCTGATGAGAAGCAGGTG 390
1711 TTGCCACCGGTCTAAAAATGAATCGTTTAAACACCTGATGAGAAACAGGTG 1760
1652 TTGCCACTGGTCTGAAAATGAATCGTCTAACACCTGATGAGAAACAGGTG 1701
6211 TTGCCACCGGTCTAAAAATGAATCGTTTAAACACCTGATGAGAAACAGGTG 6260

** ** ** ***** ** ** *****

391 ATCGATAGAATGACAAAGAGGCTTTTTTCGTACTGAAGGACAAAAAGGGGT 440
1761 ATCGACAGGATGACCAAAGGCTTTTTTCGTACTGAAGGACAAAAAGGGGT 1810
1702 ATTGATAGAATGACCAAAGACTTTTTTCGTACTGAAGGACAAAAAGGGGT 1751
6261 ATCGACAGGATGACCAAAGGCTTTTTTCGTACTGAAGGACAAAAAGGGGT 6310

***** ***** ** *****

441 TTTGAGGCAGGTTTCGGAGAGTAACCTCGAACTGGAGGGTTAGGAGTCGT 490
1812 TTTGAGGCAGGTTTCGGAGAGTAATCTGGAAGTGGAGGGTTAGGAGTCGT 1860
1752 TTTGAGGCAGGTTTCGGAAAGTAACCTGGAAGTGGAGGGTTAGGAGTCGT 1801
6311 TTTGAGGCAGGTTTCGGAGAGTAATCTGGAAGTGGAGGGTTAGGAGTCGT 6360

```

*****
491  GTGAAATTCGCA           503
      ASGV-CPr
1861 GTGAAATTCGCAAATTGG   1880
1802 GTGAAATTCGCAA ACTGG   1821
6361 GTGAAATTCGCAAATTGG   6380

```

그림 7. 사과에서 분리된 ASGV CP 유전자의 염기서열 비교.

염기서열이 결정된 국내사과에서 분리된 ASGV CP 유전자와 기존 보고된 ASGV CP 유전자의 cDNA 혹은 genomic DNA의 염기서열 및 CTLV CP 유전자의 염기서열을 비교해서 동일한 염기서열들은 별표로 표시하였다. RT-PCR에 사용된 primer (ASGV-CPf 와 ASGV-CPr)들은 화살표로 표시하였다.

Amplified ASGV

RNA polymerase

***** ** **

N-terminal cDNA 1 ACAGGCTTAATTTCCGCGCTTTACGTCAATGGCTTTCACTTACAGAAACCCTCT 54

ASGV-Pf1

ASGV cDNA 1 AAATTTAACAGGCTTAATTTCCGCGCTCTACGTCAATGGTTTTCACTTACAGAAATCCGCT 61

ASGV genome 1 NAAATTTAACAGGCTTAATTTCCGCGCTTTACGTCAATGGCTTTCACTTACAGAAACCCCT 62

***** ** ***** * ** ***** *

55 AGAAATTGCAATCAACAACTTCCCAGCAAGCAATCTGATCAATTGCTTGCATTAACCACAG 116

62 AGAAATTGCAATCAACAACTTCCAAGCAAGCAATCTGATCAATTGCTTTCCTTGACCACAG 123

63 CGAAATTGCAATCAACAACTTCTAGTAAGCAGTCTGATCAACTGCTTTCCTTGACCACCG 124

***** ** ***** ** *****

117 ACGAGATTGAAAAGACCCTAGAAGTGACCAATCGCTTCTTTCTTTTTCAATAACCCAGAA 178

ASGV-Pf

124 ACGAGATTGAAAAGACCTTAGAAGTGACAAATCGCTTCTTCTTTTTCAATCACCCAGAA 185

125 ACGAGATTGAAAAGACCTTAGAAGTGACCAACCGCTTCTTCTTTTTCAATCACACCAGAA 186

***** ** ** ***** ** ** ** * ** ** **

179 GATCAAGAAGTGTAAACCAAGCATGGATTAACACTTGCACCCATCGGATTCAAATCGCACTC 240

186 GATCAAGAATTGTTGACCAAAACATGGTCTAACACTTGCACCTATCGGATTGATCACATTC 247

187 GATCAAGAATTGTTGACTAAGCATGGTCTAACACTTGCACCTATAGGGTTTAAGTCACACTC 248


```

***** * ***** ** ***** ** ** * ** ** ** **
489 GTCTTAGAGACCAATGCTTGAACGTAATAAATTTCCCAAAGTTCTTTTCCCTCCACGATGAA 550
                                     ←
                                     ASGV-Pr

496 GTCTTAGAAATCAATGCCTCACGCGTAATAAATTTCCCAAAGGTGTTATTCTTCATGACGAA 557

497 GTCTTAGAGATCAATGCCTTACACGTAACAAATTTCCCAAAGTTCTGTTTCTTCACGACGAG 558

```

```

***** ** ** *****
551 CTGCACTTTCTTAGCCCTTTGA          573
      ←
      ASGV-Pr1

558 TTCACTTTCTTAGCCCTTTGATATGGCT 587

559 TTGCACTTTCTAAGTCCATTGACATGGCT 588

```

그림 8. 사과에서 분리된 ASGV RNA polymerase 유전자 N-terminal 부위의 염기서열 비교.

염기서열이 결정된 국내사과에서 분리된 ASGV RNA polymerase 유전자 N-terminal 부위와 기존에 보고된 ASGV 유전자의 염기서열을 비교해서 동일한 염기서열들은 별표로 표시하였다. RT-PCR에 사용된 primer (ASGV-Pf1, ASGV-Pf, ASGV-Pr1 및 ASGV-Pr)들은 화살표로 표시하였다.

3) 배에서 분리된 ASGV 바이러스 CP 유전자 염기서열 결정

RT-PCR에 의해 증폭된 ASGV 바이러스 CP 유전자에 대한 DNA 절편을 pGEM-T-vector에 클로닝한 후 그 염기서열을 결정하였다. PCR에 의한 오류를 감안하여 3개 이상의 clone을 무작위로 선별하여 염기서열을 결정하였으며 그 결과 최종적으로 ASGV 바이러스 CP 유전자 503bp의 염기서열을 확인 하였다 (그림 9). 본 연구 결과 확인된 국내 배의 ASGV 바이러스 CP 유전자의 염기서열과 기존 보고된 ASGV 바이러스 CP 유전자의 cDNA 혹은 genomic DNA의 염기서열 및 확인된 사과와 ASGV 바이러스 CP 유전자를 비교한 결과 503 bp 중에 40개의 위치에서 서로 다른 염기서열을 갖고 있음을 확인할 수 있었다.

4) 사과에서 분리된 ACLSV 바이러스 CP 유전자 염기서열 결정

RT-PCR에 의해 증폭된 ACLSV 바이러스 CP 유전자에 대한 DNA 절편을 pGEM-T-vector에 클로닝한 후 그 염기서열을 결정하였다. PCR에 의한 오류를 감안하여 3개 이상의 clone을 무작위로 선별하여 염기서열을 결정하였으며 그 결과 최종적으로 ACLSV 바이러스 CP 유전자 566bp의 염기서열을 확인 하였다 (그림 10). 본 연구 결과 확인된 국내 사과의 ACLSV 바이러스 CP 유전자의 염기서열과 기존 보고된 ACLSV 바이러스 CP 유전자의 cDNA 혹은 genomic DNA의 염기서열을 비교한 결과 566 bp 중에 136개의 위치에서 서로 다른 염기서열을 갖고 있었고 75.9% 정도의 유사성을 확인할 수 있었다.

5) 감귤에서 분리된 CTLV 바이러스 CP 유전자 염기서열 결정

RT-PCR에 의해 증폭된 CTLV 바이러스 CP 유전자에 대한 DNA 절편을 pGEM-T-vector에 클로닝한 후 그 염기서열을 결정하였다. PCR에 의한 오류를 감안하여 3개 이상의 clone을 무작위로 선별하여 염기서열을 결정하였으며 그 결과 최종적으로 CTLV 바이러스 CP 유전자 503bp의 염기서열을 확인 하였다 (그림 11). 본 연구

구결과 확인된 국내 감귤의 CTLV 바이러스 CP 유전자의 염기서열과 기존 보고된 CTLV 바이러스 CP 유전자의 cDNA의 염기서열을 비교한 결과 503 bp 중에 26개의 위치에서 서로 다른 염기서열을 갖고 있었고 94.8% 정도의 유사성이 있었다. 또한 국내 사과와 ASGV 바이러스의 CP 유전자와 92.8%가 유사성을 확인할 수 있었다.

6) 감귤에서 분리된 CTV 바이러스 CP 유전자 염기서열 결정

RT-PCR에 의해 증폭된 CTV 바이러스 CP 유전자에 대한 DNA 절편을 pGEM-T-vector에 클로닝한 후 그 염기서열을 결정하였다. PCR에 의한 오류를 감안하여 3개 이상의 clone을 무작위로 선별하여 염기서열을 결정하였으며 그 결과 최종적으로 CTV 바이러스 CP 유전자 672bp의 염기서열을 확인 하였다 (그림 12). 본 연구 결과 확인된 국내 감귤의 CTV 바이러스 CP 유전자의 염기서열과 기존 보고된 CTV 바이러스 CP 유전자의 cDNA 혹은 genomic DNA의 염기서열을 비교한 결과 672bp 중에 47개의 위치에서 서로 다른 염기서열을 갖고 있었고 93.0% 정도의 유사성을 확인할 수 있었다.

```

** *****
Amplified ASGV CP cDNA(pyrus) 1 CCCGCTGTTGGATTGATACACCTCCGGTT 30
Amplified ASGV CP cDNA(malus) 1 CCCGCTGTTGGATTGATACACCTCCGGTT
                                     ASGV-CPf
ASGV cDNA          1361 GACCCAGTTTCTGCTGTTGGATTGATACCCCTCCGGTT 1400
ASGV genome       1302 GACCCAGTTTCCCGCTGTTGGATTGATACACCTCCGGTT 1341

```

```

***** ***** ** *****
31 CATTACAATTTGACAACGACCCCGAAGGAAGGGGAAACTG 70
31 CATTTTAATTTGACAACGACCCCGAAAGAAGGGGAGACTG 70
1401 CATTACAATTTGACAACGACCCCAAAGAAGGGGAAACTG 1440
1342 CATTATAATTTGACAACGACCCCAAAGGAAGGGGAGACTG 1381

```

```

* ** ** ***** *****
71 AAGAGCAAAGAAGGCCAGAGAGGGTTCGTCTGGCGAAAA 110
71 AAGAGCAAAGAAGGCCAGAGAGGGATCGTCTGGTGAAAA 110
1441 AAGAGCAAAGAAGGCCAGAGAGGGTTCGTCTGGCGAAAA 1480
1382 ACGAAGGAAGGAAGGCCAGAGCGGGTTCGTCTGGCGAAAA 1421

```

```

** ***** *****
111 AAGCAAAATTTGGAGAATCGACTTGTCAAATGTTGTACCT 150
111 AACAAAGATTTGGAGAATAGACTTGTCAAACGTTGTACCT 150
1481 AACAAAAATTTGGAGAATCGACTTGTCAAATGTTGTACCT 1520
1422 AACAAAAATTTGGAGGATCGATTTGTCAAATGTTGTTCT 1461

```

```

***** *****
151 GAATTGAAAACCTTTGCTGCCACTTCTAGGCAGAACTCTT 190
151 GAATTGAAAACCTTTGCTGCCACTTCTAGGCAGAACTCTT 190
1521 GAATTGAAAACCTTTGCTGCCACTTCTAGGCAGAACTCTT 1560
1462 GAATTGAAAACCTTTGCTGCCACTTCCAGGCAGAACTCTT 1501

```


**** ***** ***** ***** **
191 TGAATGAATGTACATTTCAGAAAGCTTTGTGAGCCATTTCGC 230
191 TGAACGAATGTACGTTTCAGGAAGCTTTGTGAACCATTTCGC 230
1561 TGAATGAATGTACATTTCAGAAAGCTTTGTGAGCCATTTCGC 1600
1502 TGAACGAATGTACGTTTCAGAAAGCTTTGCGAGCCATTTCGC 1541

***** ***** ***** **
231 TGATTTGGCTCGTGAGTTTCTTCATGAAAGGTGGTCGAAA 270
231 TGATCTAGCACGTGAATTTCTACATGAAAGGTGGTCCTAAA
1601 TGATTTGGCCCGTGAGTTTCTTCATGAAAGGTGGTCAAAA 1640
1542 CGATTTGGCTCGAGAATTTCTACATGAAAGGTGGTCTAAG 1581

***** ** ** *****
271 GGATTGGCCACCAACATCTATAAGAAATGGCCCAAAGCTT 310
271 GGACTGGCCACCAACATTTACAAGAAATGGCCCAAAGCTT 310
1641 GGATTGGCCACTAACATTTATAAGAAATGGCCCAAAGCTT 1680
1582 GGATTGGCCACCAATATTTACAAGAAATGGCCCAAAGCTT 1621

* ***** ** ***** ***** **
311 TTGAAAAAAGCCCCTGGGTGGCATTGATTTTGCCACCGG 350
311 TTGAAAAAAGTCCATGGGTGGCATTGACTTTGCCACTGG 350
1681 TTGAAAAAAGCCCCTGGGTGGCATTGATTTTGCCACCGG 1720
1622 TCGAAAAAAGTCCATGGGTGGCCTTTGATTTTGCCACTGG 1661

*** ***** ***** *****
351 TCTAAAAATGAATCGTTTAAACACCTGATGAAAAACAGGTG 390
351 TCTAAAAATGAATCGTTTAAACACCTGATGAGAAGCAGGTG 390
1721 TCTAAAAATGAATCGTTTAAACACCTGATGAGAAACAGGTG 1760
1662 TCTGAAAAATGAATCGTCTAACACCTGATGAGAAACAGGTG 1701

```

** ** *****
391 ATCGACAGAATGACCAAAGGCTTTTTTCGCACTGAAGGAC 430
391 ATCGATAGAATGACAAAGAGGCTTTTTTCGTACTGAAGGAC 430
1761 ATCGACAGGATGACCAAAGGCTTTTTTCGTACTGAAGGAC 1800
1702 ATTGATAGAATGACCAAAGACTTTTTTCGTACTGAAGGAC 1741

```

```

*****
431 AAAAAGGGGTTTTTCGAGGCAGGTTCCGAGAGTAACCTGGA 470
431 AAAAAGGGGTTTTTCGAGGCAGGTTCCGAGAGTAACCTCGA 470
1801 AAAAAGGGGTTTTTCGAGGCAGGTTCCGAGAGTAATCTGGA 1840
1742 AAAAAGGGGTTTTTCGAGGCAGGTTCCGAAAGTAACCTGGA 1781

```

```

*****
471 ACTGGAGGGTTAGGAGTCGTGTGAAATTCGCA 503
471 ACTGGAGGGTTAGGAGTCGTGTGAAATTCGCA 503
      ←
      ASGV-CPr
1841 ACTGGAGGGTTAGGAGTCGTGTGAAATTCGCAAATTTGG 1880
1782 ACTGGAGGGTTAGGAGTCGTGTGAAATTCGCAAACCTTGG 1821

```

그림 9. 배에서 분리된 ASGV CP 유전자의 염기서열 비교.

염기서열이 결정된 국내 ASGV CP 유전자와 genome data base에서 얻은 ASGV cDNA 와 ASGV genome의 염기서열을 비교해서 동일한 염기 서열들은 별표로 표시하였다. RT-PCR에 사용된 primer (ASGV-CPf 와 ASGV-CPr)들은 화살표로 표시하였다.

```

          **** ***** **** ** ** ** ** ****
Amplified ACLSV cDNA      1          GAGAGTTTCAGTTTGCTAGACAAAATCAGGAGAA 32
          ───────────────────────────────────────────────────────────────────────────────────▶
          ACLSV-CPf
ACLSV cDNA                141      CTCTGTARGAGAATTTTCAGTTTGCTAGACAAAATAAGAAGAA 183
ACLSV genome              6739     CTCTACTAGAGAATTTTCAGTCTGCTCGAGAAGATCAGAAGAA 6781

```

```

          **** ***** ** ** * ** * ***** ***** ** *****
33  GGAGAATGGCGGCAGTTCTCAATCTTCAGCTAAAGGTAGACGCAGAGCTGAAAGCGTTCCTG 94
184 GGAGGATGGCAGCAGTTCTGAATTTGCAGCTAAAGGTGGACGCCGATCTGAAAGCGTTCCTG 246
6782 GGAGGATGGCTGCGGTTTTAAATCTACAGCTAAAGGTGGACGCAGATCTGAAAGCGTTCCTT 6844

```

```

          *      ***      *** ***** ** ***** ** ***** * ***** *
95  GCCGCAGAGGGCAGGCCCTTCATGGAAAGACAGGGGCAATACTGGAACAGACATTGGAGGC 156
247  GTCGCAGAAGGCAGACCCCTTCATGGRAARACAGGGTAATCCTGGAACAGATACTGGAGTC 309
6845 GCAAAGAAAACAGACCCCTTCATGGAAAGACAGGGGCAACCCTGGAACAGATACTGGAGTC 6907

```

```

          ***** ***** * ** ** ** ** ***** ** ***** * ** *** *
157 CATCTTCGCGAACATAGCAATCCAGGGAACCTCGGAGCAGACGGAATTCCTCGATGTGACGG 218
310 CATCTTCGCGAACATAGCAATCCAAGGGACGTCAGAGCAGACAGAATTTCTGGATCTGATGG 372
6908 CATCTTCGCGAACATAGCAGTGCAAGGGACGTCGGAGCACACAGAATTCTTGGACCTGACAG 6970

```


***** ** ** ***** *****

529 CAATATGAATCGGCGTCTTTTACAGACTGAATTTGC 564

←
ACLSV-CPr

688 TAATATGAACCGTCGTCTTTTACAGACTGAATTTGCCAAAAGTGAAAATGAGGCGAACTCT 750

7286 TAATATGAATCGGCGCCTTTTACAAACTGAATTTGCAAAGAATGAAAAGTGAGGCGAAGATTT 7348

그림 10. 사과에서 분리된 ACLSV CP 유전자의 염기서열 비교.

염기서열이 결정된 국내 ACLSV CP 유전자와 genome data base에서 얻은 ACLSV cDNA 및 genomic DNA의 염기서열을 비교해서 동일한 염기서열들은 별표로 표시하였다. RT-PCR에 사용된 primer(ACLSV-CPf 와 ACLSV-CPr)들은 화살표로 표시하였다.

Amplified CTLV CP cDNA 1 CCCGCTGTT 9
 Amplified ASGV CP cDNA (*malus*) 1 CCCGCTGTT
 CTLV cDNA 5835 ATTGCTGTTTTTGGGTCATCTGATAAGACCCAGTTTCCTGCTGTT 5879

10 GGATTTGATACACCTCCGGTTCATTACAATTTGACACCGTCCCCA 54

CTLV-CPf

10 GGATTTGATACACCTCCGGTTCATTTTAATTTGACAACGACCCCG 54

5880 GGATTTGATACCCCTCCGGTTCATTACAATTTGACAACGACCCCA 5924

55 AAAGAAGAGGAAACCGAAGAGCAAAGAAGGCCAGGGAAGGGACG 99

55 AAAGAAGGGGAGACTGAAGAGCAAAGAAGGCCAGAGAGGGATCG 99

5925 AAAGAAGGGGAAACTGAAGAGCAAAGAAGGCCAGAGAGGGTTCG 5969

100 TCTGGTGAAAAAACTAAAATTTGGAGAATCGACTTGTCAAATGTA 144

100 TCTGGTGAAAAAACAAAGATTTGGAGAATAGACTTGTCAAACGTT 144

5970 TCTGGCGAAAAAACAAAAATTTGGAGAATCGACTTGTCAAATGTT 6014

145 GTACCTGAATTGAAAACCTTTGCTGCCACTTCTAGGCAGAACTCT 189

145 GTACCTGAATTGAAAACCTTTGCTGCCACTTCTAGGCAGAACTCT 189

6015 GTACCTGAATTGAAAACCTTTGCTGCCACTTCTAGGCAGAACTCT 6059

190 TTGAACGAATGTACGTTTCAGAAAGCTTTGTGAGCCTTTTGCTGAT 234
190 TTGAACGAATGTACGTTTCAGGAAGCTTTGTGAACCATTGCTGAT 234
6060 TTGAATGAATGTACATTTCAGAAAGCTTTGTGAGCCATTGCTGAT 6104

235 TTGGCTCGTGAATTTCTTCATGAAAGGTGGTCTAAAGGTCTGGCC 279
235 CTAGCACGTGAATTTCTACATGAAAGGTGGTCCAAAGGACTGGCC 279
6105 TTGGCCCGTGAGTTTCTTCATGAAAGGTGGTCAAAGGATTGGCC 2610

** *****
280 ACAAACATTTATAAGAAATGGCCCAAAGCTTTGAAAAAGCCCT 324
280 ACCAACATTTACAAGAAATGGCCCAAAGCTTTGAAAAAGTCCA 324
6150 ACTAACATTTATAAGAAATGGCCCAAAGCTTTGAAAAAGCCCT 6194

325 TGGGTGGCATTGATTTGCCACTGGTCTAAAAATGAATCGTTTA 369
325 TGGGTGGCATTGACTTTGCCACTGGTCTAAAAATGAATCGTTTA 369
6195 TGGGTGGCATTGATTTGCCACCGGTCTAAAAATGAATCGTTTA 6239

370 ACACCTGATGAAAAACAGGTGATTGACAGAATGACAAAGAGGCTT 414
370 ACACCTGATGAGAAGCAGGTGATCGATAGAATGACAAAGAGGCTT 414
6240 ACACCTGATGAGAAACAGGTGATCGACAGGATGACCAAAGGCTT 6284

```

*****
415 TTTCGTA CTGAAGGACAAAAGGGGTTTTCGAGGCAGGTTCCGGAG 459
415 TTTCGTA CTGAAGGACAAAAGGGGTTTTCGAGGCAGGTTCCGGAG 459
6285 TTTCGTA CTGAAGGACAAAAGGGGTTTTCGAGGCAGGTTCCGGAG 6329

***** *****
460 AGTAACCTGGA ACTGGAGGGTTAGGAGTCGTGTGAAATTC CGCA 503
      ←
      CTLV-CPr
AGTAACCTCGAA CTGGAGGGTTAGGAGTCGTGTGAAATTC CGCA
6330 AGTAATCTGGA ACTGGAGGGTTAGGAGTCGTGTGAAATTC CGCA 6373

```

그림 11. 감귤에서 분리된 CTLV CP 유전자의 염기서열 비교.

염기서열이 결정된 국내 CTLV CP 유전자와 genome data base에서 얻은 CTLV cDNA 및 genomic DNA의 염기서열을 비교해서 동일한 염기서열들은 별표로 표시하였다. RT-PCR에 사용된 primer(CTLV-CPf 와 CTLV-CPr) 들은 화살표로 표시하였다.

401 ACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGAAGTAACGATGCCCTTTATTTAGCGTTT 450
401 ACGCCCTTCGAGTTTGGGGTAGAACTAATGATGCCCTTTACTTAGCTTTT 450
16555 ACGCCCTTCGAGTTTGGGGTAGAACTAACGATGCCCTTTACTTAGCTTTT 16604

** *****
451 TGTAGACAGAATCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTC CGCTAGATGCAGG 500
451 TGTAGACAGAATCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTC CGCTAGATGCAGG 500
16605 TGCAGACAGAATCGCAATTTGAGTTATGGCGGACGTC CGCTAGACGCAGG 16654

***** ** ***** ** *****
501 GATTCCGGCCGGGTATCATTACCTGTGCGCAGATTTCTTGACCGGAGCTG 550
501 GATTCCGGCCGGGTATCATTACCTGTGTGCAGATTTCTTGACCGGAGCTG 550
16655 GATTCCGGCCGGGTATCATTACTTGTGTGCGGATTTCTTGACTGGGGCTG 16704

* ***** ** *****
551 GCTTGACTGACTTGAATGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTG 600
551 GCTTGACTGATTTAGAATGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTG 600
16705 GTTTGACTGATTTAGAATGTGCTGTGTACATACAAGCTAAAGAACAATTA 16754

601 TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTCGTAGTTACCAATGTCAGGCAGCT 650
601 TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGAAGTCGTAGTTACCAATGTCAGGCAGCT 650
16755 TTGAAGAAGCGAGGGGCTGATGATGTCGTAGTTACTAATGTCAGGCAGCT 16804

651 TGGGAAATTCAACACACGTTGA 672

CTV-CP_r

651 TGGGAAATTCAACACACGTTGA 672

16805 TGGGAAATTCAACACACGTTGA 16826

그림 12. 감귤에서 분리된 CTV CP 유전자의 염기서열 비교.

염기서열이 결정된 국내 CTV CP 유전자와 genome data base에서 얻은 CTV cDNA 및 genomic DNA의 염기서열을 비교해서 동일한 염기서열들은 별표로 표시하였다. RT-PCR에 사용된 primer (CTV-Cp_f1, CTV-CP_f, CTV-CP_r)들은 화살표로 표시하였다.

다. ASGV, ACLSV, CTLV, CTV 검색을 위한 바이러스 특이적 primer 선발

1) 사과에 감염하는 ASGV, ACLSV 검색을 위한 바이러스 특이적 primer 선발

ASGV의 CP 및 RNA polymerase 유전자의 염기서열을 바탕으로 다양한 primer (표 3)를 제작하여 RT-PCR에 이용하였다. 그 결과 그림 13-A와 같이 primer (ASGV-Pf, ASGV-Pr)를 사용할 경우 바이러스 DNA가 성공적으로 증폭되어 ASGV 검색에 이용될 수 있음을 확인하였다. 또한 ACLSV의 CP 유전자의 염기서열을 바탕으로 다양한 primer (표 3)를 제작하여 RT-PCR에 이용하였다. 그 결과 그림 13-B와 같이 primer(ACLSV-CPf, ACLSV-CPr)를 사용할 경우 바이러스 DNA가 성공적으로 증폭되어 ACLSV 검색에 이용될 수 있음을 확인하였다.

2) 감귤에 감염하는 CTLV, CTV 검색을 위한 바이러스 특이적 primer 선발

CTLV의 CP 유전자의 염기서열을 바탕으로 다양한 primer (표 4)를 제작하여 RT-PCR에 이용하였다. 그 결과 그림 13-C와 같이 primer(CTLV-CPf, CTLV-CPr)사용할 경우 바이러스 DNA가 성공적으로 증폭되어 CTLV 검색에 이용될 수 있음을 확인하였다. 또한 CTV의 CP 유전자의 염기서열을 바탕으로 다양한 primer (표 4)를 제작하여 RT-PCR에 이용하였다. 그 결과 그림 13-D와 같이 primer(CTLV-CPf, CTLV-CPr)를 사용할 경우 바이러스 DNA가 성공적으로 증폭되어 CTV 검색에 이용될 수 있음을 확인하였다.

ASGV, ACLSV, CTLV, CTV 검색을 위해 선별된 바이러스 특이적 primer set들을 이용하여 이병주와 건전주에서 반복하여 RT-PCR을 수행한 결과 가장 확실한 결과를 나타내는 primer set은 표 5에서 보는 바와 같다.

서열 번호	프라이머 이름	프라이머 염기서열	유전자내 위치
1	ASGV-MPf1	5'-ATGGCTATCGTCAACGTCAAC-3'	4788-4808
2	ASGV-MPr1	5'-TGTATCAAATCCAACAGCGGG-3'	5872-5892
3	ASGV-CPf	5'-CCCGCTGTTGATTTGATACACCT-3'	5871-5893
4	ASGV-CPr	5'-TGCGAATTTACACGACTCCTAA-3'	6350-6373
5	ASGV-Pf1	5'-GGGAGAAGGTCTCTAAGGA-3'	662-680
6	ASGV-Pr1	5'-TCAAAGTCATCTCTCATCCC-3'	1138-1157
7	ASGV-Pf2	5'-AATGCTAGCAGAGATATT-3'	1979-1996
8	ASGV-Pr2	5'-TTTCTGACTTCAATTTCC-3'	4972-4989
9	ASGV-Pf3	5'-GACGCTTGC GGAGATTTT-3'	3444-3461
10	ASGV-Pr3	5'-TCTCAGATTTTAGCTTTC-3'	3800-3817
11	ASGV-Pf4	5'-CTAGATTTACTGGGGAAA-3'	1393-1410
12	ASGV-Pr4	5'-TTTACTAGTCGGTGTACT-3'	5020-5037
13	ASGV-Pf5	5'-TTGAACTCACTTGGGCGC-3'	2587-2604
14	ASGV-Pr5	5'-CTCCGTCCCAGTAGTCAT-3'	3214-3231
15	ASGV-Pf6	5'-ACAGGCTTAATTTCCGCG-3'	9-26
16	ASGV-Pr6	5'-TCAAAGGGGCTAAGAAAGTG-3'	562-581
17	ASGV-Pf	5'-GTGACCAATCGCTTCTTTTCT-3'	148-168
18	ASGV-Pr	5'-TGGAGGAAAAGA ACTTTGGG-3'	531-551
19	ACLSV-CPf1	5'-ATGGCAGCAGTTCTGAATTT-3'	190-203
20	ACLSV-CPr1	5'-CTAAATACAAAGATCAGTTGA-3'	751-771
21	ACLSV-CPf	5'-GAGAGTTTCAGTTTGCTAGACA-3'	6742-6763
22	ACLSV-CPr	5'-GCAAATTCAGTCTGTAAAAG-3'	7288-7307

표 3. ASGV, ACLSV 바이러스 감염여부를 진단하기 위해 제작한 바이러스 특이적 PCR primer set.

서열 번호	프라이머 이름	프라이머 염기서열	유전자내 위치
1	CTLV-Pf1	5'-GGATTTGATACCCCTCCG-3'	5880-5907
2	CTLV-Pr1	5'-AGAGTTCTGCCTAGAAGT-3'	5952-5969
3	CTLV-Pf2	5'-TTCAGAAAGCTTTGTGAG-3'	6075-6092
4	CTLV-Pr2	5'-CTCCGAACCTGCCTCGAA-3'	6312-6329
5	CTLV-CPf	5'-CCCGCTGTTGATTTGATACACCT-3'	5871-5893
6	CTLV-CPr	5'-TGCGAATTTCACACGACTCCTAA-3'	6350-6373
7	CTV-CPf1	5'-ATGGACGACGAAACAAAGAAATTG-3'	1-24
8	CTV-CPr1	5'-TCAAATTGCGATTCTGTCTACAA-3'	451-473
9	CTV-CPf2	5'-TAAACTTACACATCGATCCAACG-3'	92-115
10	CTV-CPr2	5'-ATGAACTCTTAACTGCTAAACGT-3'	256-278
11	CTV-CPf3	5'-ACACTCGGGAGGGTGTGGAAGTG-3'	315-337
12	CTV-CPr3	5'-AATTGTTCTTTAGCTTGTATGTA-3'	577-599
13	CTV-CPf	5'-ACGGGTATAACGGACACT-3'	301-317
14	CTV-CPr	5'-TCAACGTGTGTTGAATTTCCAAG-3'	649-672

표 4. CTLV, CTV 바이러스 감염여부를 진단하기 위해 제작한 바이러스 특이적 PCR primer set.

서열 번호	프라이머 이름	프라이머 염기서열	유전자내 위치	증폭산 물 크기
1	ASGV-Pf	5'-GTGACCAATCGCTTCTTTTCT-3'	148-168	404bp
2	ASGV-Pr	5'-TGGAGGAAAAGAACTTTGGG-3'	531-551	
3	ACLSV-CPf	5'-GAGAGTTTCAGTTTGCTAGACA-3'	6742-6763	566bp
4	ACLSV-CPr	5'-GCAAATTCAGTCTGTAAAAG-3'	7288-7307	
5	CTLV-CPf	5'-CCCGCTGTTGATTTGATACACCT-3'	2332-2354	503bp
6	CTLV-CPr	5'-TGCGAATTTACACGACTCCTAA-3'	2811-2834	
7	CTV-CPf	5'-ACGGGTATAACGGACACT-3'	301-317	372bp
8	CTV-CPr	5'-TCAACGTGTGTTGAATTTCCCAAG-3'	649-672	

표 5. 각 바이러스 감염여부를 진단하기 위한 선별한 바이러스 특이적 PCR primer set.

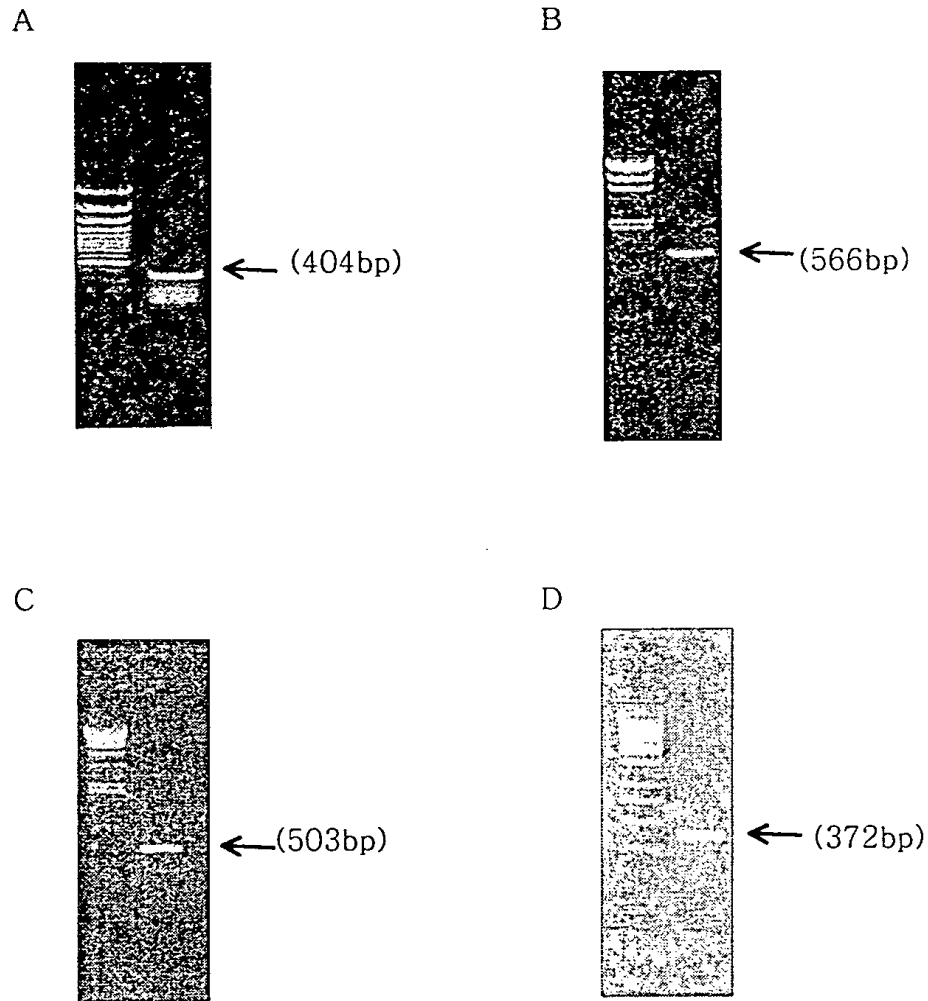


그림 13. RT-PCR에 의한 과수 바이러스들의 특이적 DNA 단편의 증폭 결과.

A. ASGV 진단 PCR로 증폭된 DNA band(404bp), B. ACLSV 진단 PCR로 증폭된 DNA band (566bp), C. CTLV 진단 PCR로 증폭된 DNA band(503bp) D. CTV 진단 PCR로 증폭된 DNA band (372bp)이다.

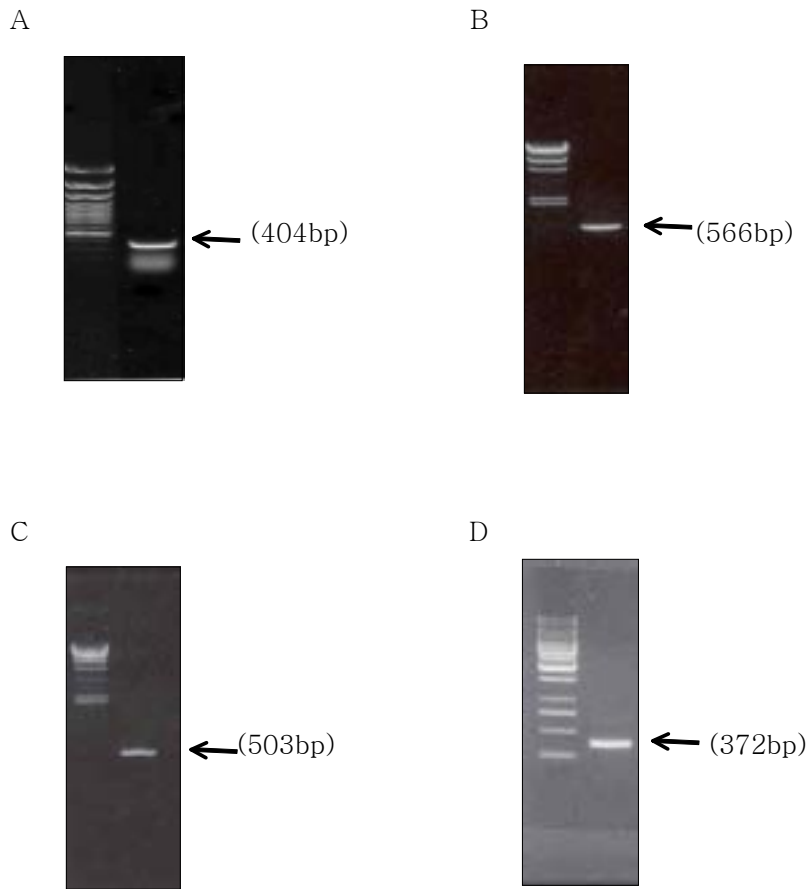


그림 13. RT-PCR에 의한 파수 바이러스들의 특이적 DNA 단편의 증폭 결과.

A. ASGV 진단 PCR로 증폭된 DNA band(404bp), B. ACLSV 진단 PCR로 증폭된 DNA band (566bp), C. CTLV 진단 PCR로 증폭된 DNA band(503bp) D. CTV 진단 PCR로 증폭된 DNA band (372bp)이다.

라. 바이러스 동시 진단을 위한 duplex PCR 개발

1) ASGV와 ACLSV 동시 진단을 위한 duplex PCR 개발

2종의 바이러스가 한 사과에 감염될 경우를 대비해 복합 감염을 동시에 진단할 수 있도록 ASGV와 ACLSV에 특이적인 primer(ASGV-Pf, ASGV-Pr, ACLSV-CPf, ACLSV-CPr)들을 모두 혼합하여 RT-PCR을 수행하였다. 이 때 각각의 바이러스에 대한 감염주로부터 RNA를 분리하여 다양한 농도별로 혼합하여 RT-PCR의 template로 이용하였다. 그 결과 ASGV와 ACLSV에 특이적인 404 bp와 566 bp DNA band를 확인할 수 있었으며, ASGV 혹은 ACLSV 각각의 감염주 RNA의 농도에 따라 그 band density가 변화하는 것을 알 수 있었다 (그림 14). 따라서, 본 duplex PCR 방법을 통해 이들 감염을 동시에 구분하여 진단할 수 있음을 확인하였다.

2) CTLV와 CTV 동시 진단을 위한 duplex PCR 개발

2종의 바이러스가 한 감귤에 감염될 경우를 대비해 복합 감염을 동시에 진단할 수 있도록 우선 감귤에서 감염될 수 있는 바이러스 CTLV와 CTV에 특이적인 primer (CTLV-CPf, CTLV-CPr, CTV-CPf, CTV-CPr)들을 모두 혼합하여 RT-PCR을 수행하였다. 이 때 각각의 바이러스에 대한 감염주로부터 RNA를 분리하여 다양한 농도별로 혼합하여 RT-PCR의 template로 이용하였다. 그 결과 CTLV와 CTV에 특이적인 503 bp와 372 bp DNA band를 확인할 수 있었으며, CTLV 혹은 CTV 각각의 감염주 RNA의 농도에 따라 그 band density가 변화하는 것을 알 수 있었다 (그림 15). 따라서, 본 duplex PCR 방법을 통해 이들 감염을 동시에 구분하여 진단할 수 있음을 확인하였다.

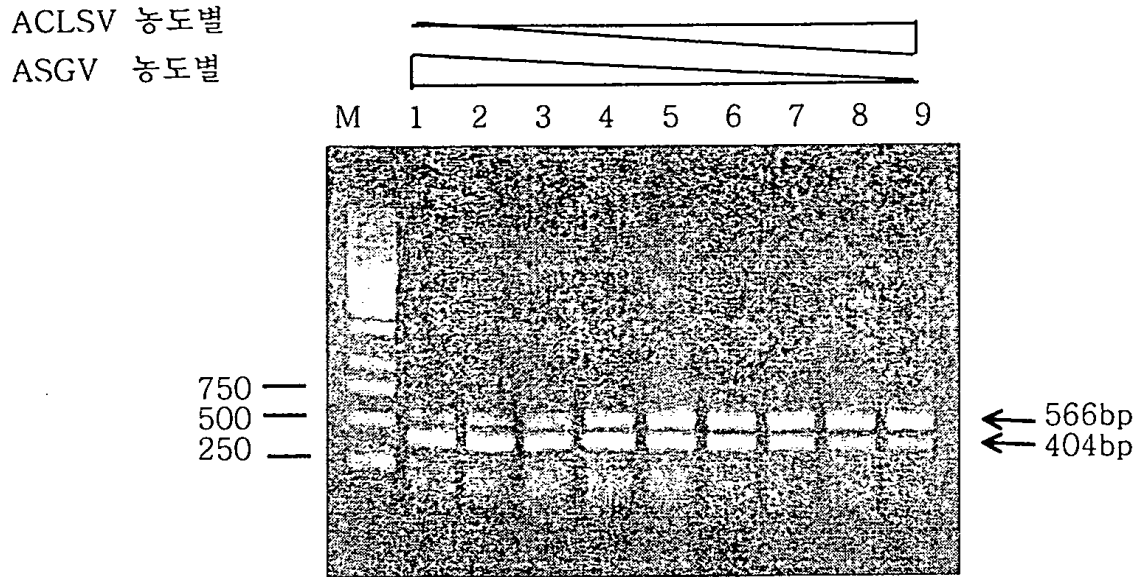


그림 14. ASGV와 ACLSV의 복합감염 진단 RNA 농도별 duplex PCR 결과.

M. 1kb ladder marker , 1-9 ACLSV와 ASGV의 감염주 RNA 농도별 (5, 10, 50, 100, 500, 1000ng) RT-PCR 산물결과이다.

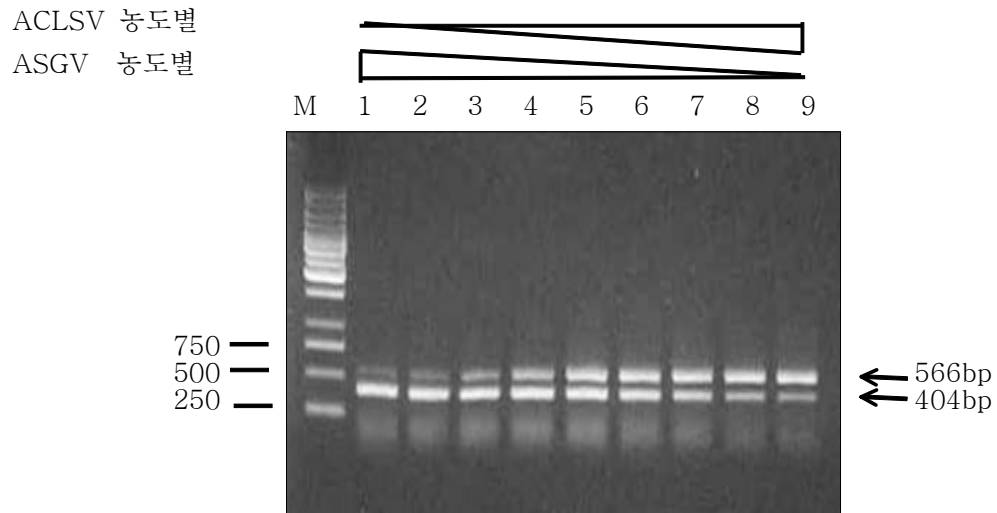


그림 14. ASGV와 ACLSV의 복합감염 진단 RNA 농도별 duplex PCR 결과.

M. 1kb ladder marker , 1-9 ACLSV와 ASGV의 감염주 RNA 농도별 (5, 10, 50, 100, 500, 1000ng) RT-PCR 산물결과이다.

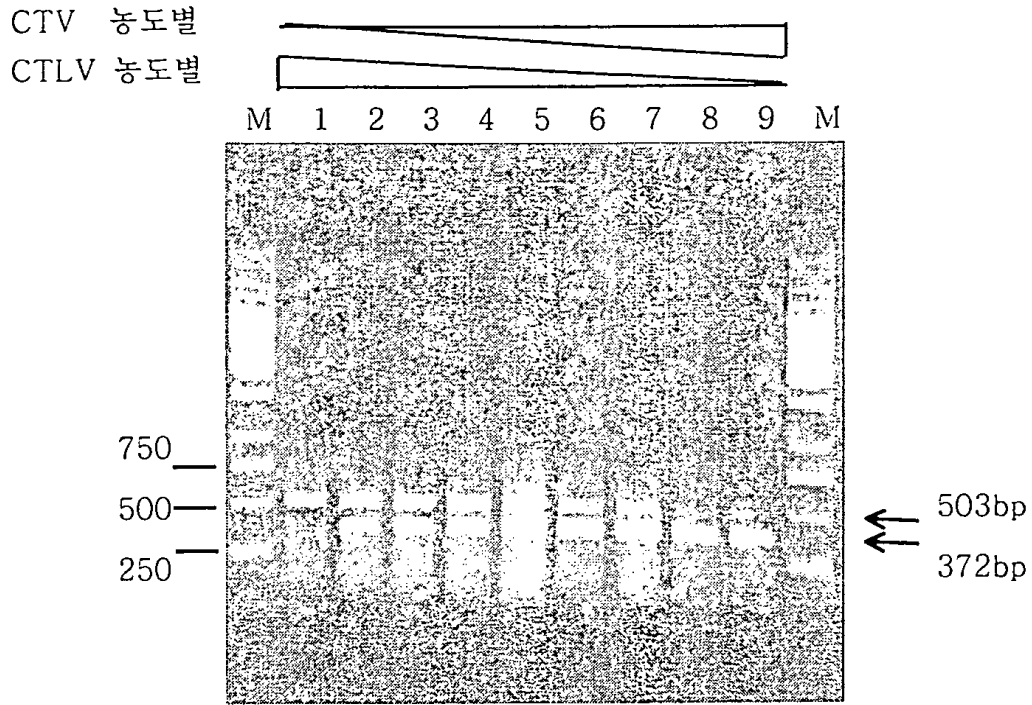


그림 15. CTV와 CTLV의 복합감염 진단 RNA 농도별 duplex PCR 결과.

M. 1kb ladder marker , 1-9 CTV와 CTLV의 감염주 RNA 농도별(0, 5, 10, 50, 100, 500, 1000ng) RT-PCR 산물 결과이다.

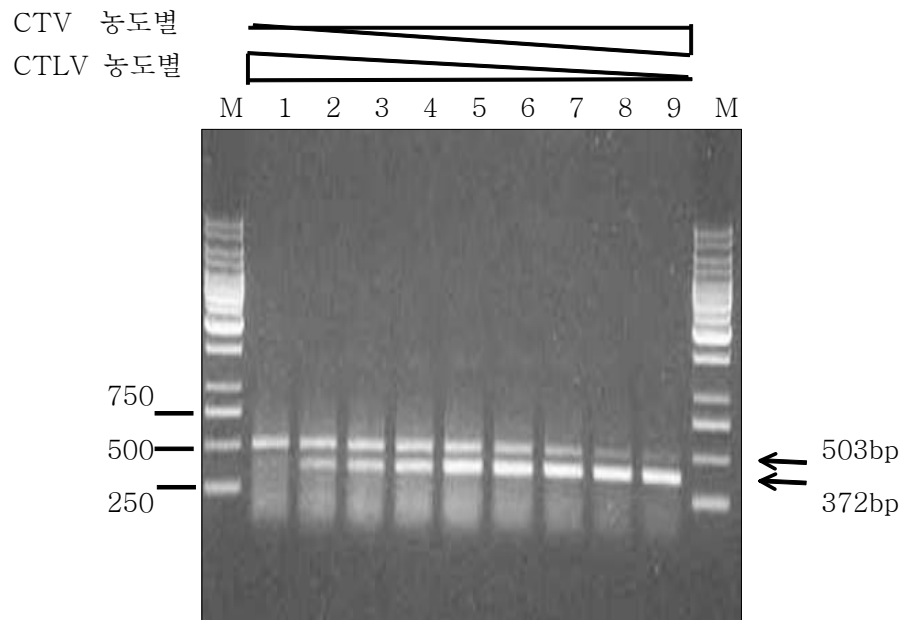


그림 15. CTV와 CTLV의 복합감염 진단 RNA 농도별 duplex PCR 결과.

M. 1kb ladder marker , 1-9 CTV와 CTLV의 감염주 RNA 농도별(0, 5, 10, 50, 100, 500, 1000ng) RT-PCR 산물 결과이다.

마. RT-PCR에 대한 양성 대조군 primer 선발

1) 대조군 primer 선발

RT-PCR을 통해 바이러스의 검색은 RNA 추출 방법 혹은 오염물질 등에 의해 RNA로부터 증폭이 잘 되지 않는 경우가 있다. 따라서 실제 바이러스에 의해 감염이 되었을 지라도 결과는 음성으로 오판될 수 있는 가능성이 있다. 이를 배제하기 위해 RT-PCR에 대한 양성 대조군(control) primer가 반드시 필요하다. 이를 위해 모든 생물의 translation에 필요하고 그 염기서열이 보존이 잘 되어 있는 단백질 EF1-a(elongation factor 1a) 유전자 (GenBank accession number : AJ223969)부위에 대한 primer를 선별하여 RT-PCR을 수행하였다. 이때 사용한 primer는 EF1a-Pf(5 '-ACCAACCTTGACTGGTACAAGG-3')와 EF1a-Pr(5 '-TGGTGCATCTCAACGGACTT-3')였으며, 이 primer와 감귤과 사과에서 추출한 total RNA를 사용하여 RT-PCR을 수행한 결과 예상대로 236 bp의 DNA가 증폭되었다 (그림 16).

2) 대조군 primer 포함한 duplex PCR

위와 같이 사과와 감귤에 감염하는 ASGV, ACLSV, CTLV, CTV를 duplex PCR을 이용한 진단 방법에 양성대조군 primer 포함되는 경우 그 영향을 살펴보았다. 양성 대조군 primer EF1a-Pf, EF1a-Pr primer를 RT-PCR에 첨가한 결과 사과의 경우 그림 17과 같이 ASGV, ACLSV, EF1a에 해당하는 404 bp, 566 bp, 236 bp의 DNA가 증폭되었다. 감귤의 경우는 그림 18과 같이 503 bp, 372 bp, 236 bp DNA가 증폭되었다. 따라서, 두 경우 모두 양성 대조군 primer가 바이러스 검출에 문제가 없다는 것을 확인하였다.

M 1 2

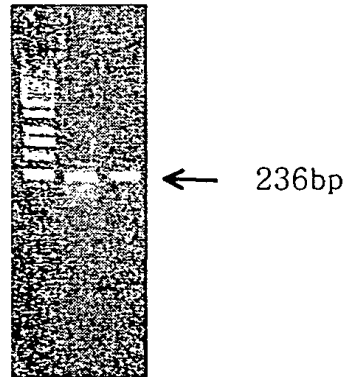


그림 16. 대조군 primer을 사용한 RT-PCR 결과.

M :1kb ladder size marker, 1.감귤 앞에서 추출한 total RNA를 이용한 RT-PCR 산물. 2.사과 앞에서 추출한 total RNA에서 RT-PCR 산물이다.

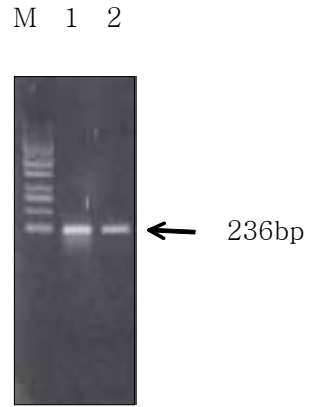


그림 16. 대조군 primer을 사용한 RT-PCR 결과.

M :1kb ladder size marker, 1.감귤 잎에서 추출한 total RNA를 이용한 RT-PCR 산물. 2.사과 잎에서 추출한 total RNA에서 RT-PCR 산물이다.

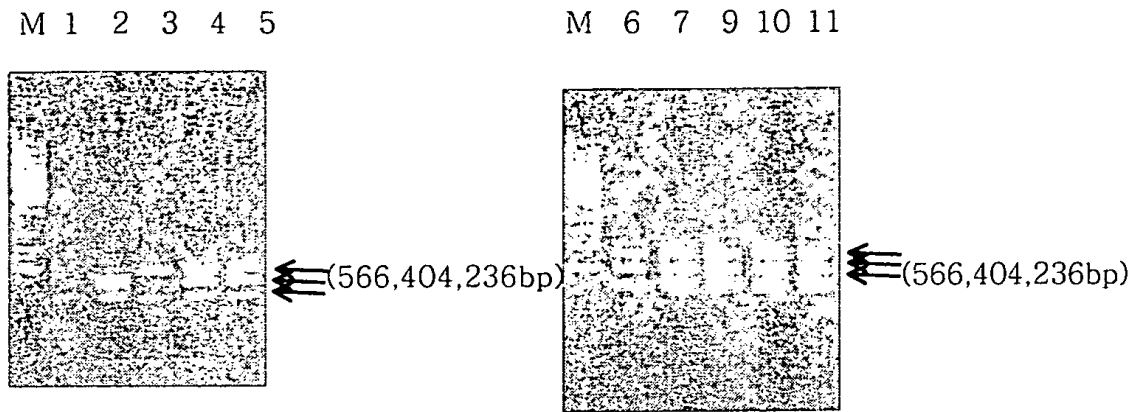


그림 17. 대조군 primer 포함하는 ASGV/ACLSV duplex PCR.

M: 1kb ladder marker, 1.사과 무독묘의 잎에서 추출한 RNA를 이용하여 증폭된 PCR 산물. 2. ASGV 감염주 사과 잎에서 추출한 RNA를 이용하여 증폭된 PCR 산물. 3 ACLSV 감염주 사과 잎에서 추출한 RNA를 이용하여 증폭된 PCR 산물. 4-11. ASGV, ACLSV 복합감염 사과 잎에서 추출한 RNA를 이용하여 증폭된 PCR 산물이다.

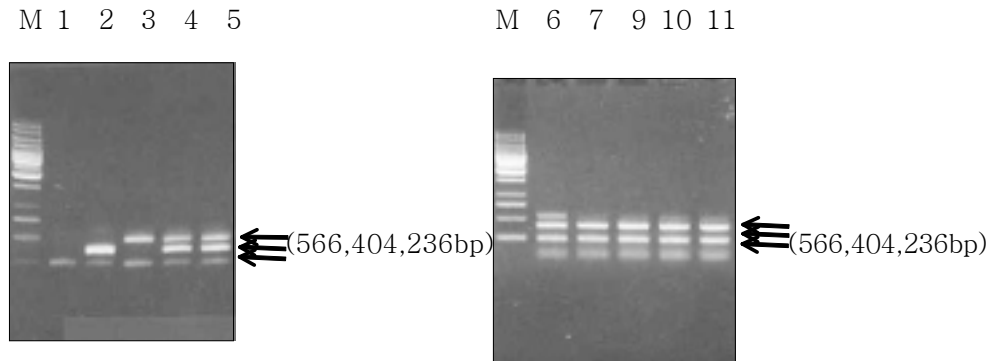


그림 17. 대조군 primer 포함하는 ASGV/ACLSV duplex PCR.

M: 1kb ladder marker, 1. 사과 무독묘의 잎에서 추출한 RNA를 이용하여 증폭된 PCR 산물. 2. ASGV 감염주 사과 잎에서 추출한 RNA를 이용하여 증폭된 PCR 산물. 3. ACLSV 감염주 사과 잎에서 추출한 RNA를 이용하여 증폭된 PCR 산물. 4-11. ASGV, ACLSV 복합감염 사과 잎에서 추출한 RNA를 이용하여 증폭된 PCR 산물이다.

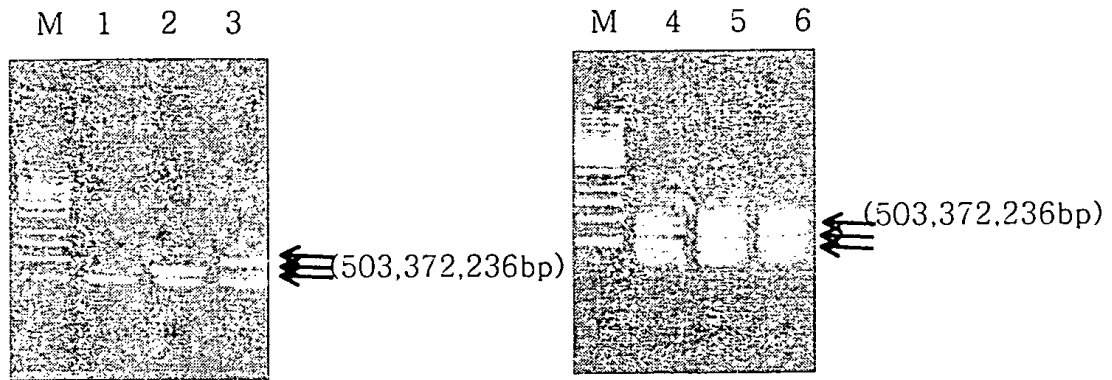


그림 18. 대조군 primer 포함하는 CTLV/CTL duplex PCR.

M: 1kb ladder marker, 1. 감귤 무독묘의 잎에서 추출한 RNA를 이용하여 증폭된 PCR 산물. 2. CTV 감염주 감귤 잎에서 추출한 RNA를 이용하여 증폭된 PCR 산물. 3: CTLV 감염주 감귤 잎에서 추출한 RNA를 이용하여 증폭된 PCR 산물. 4-6. CTV, CTLV 복합감염 감귤 잎에서 추출한 RNA를 이용하여 증폭된 PCR 산물이다.

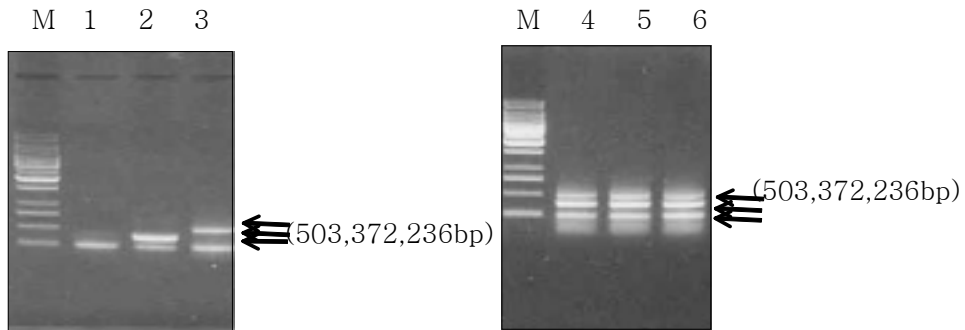


그림 18. 대조군 primer 포함하는 CTLV/CTL duplex PCR.

M: 1kb ladder marker, 1. 감귤 무독묘의 잎에서 추출한 RNA를 이용하여 증폭된 PCR 산물. 2. CTV 감염주 감귤 잎에서 추출한 RNA를 이용하여 증폭된 PCR 산물. 3: CTLV 감염주 감귤 잎에서 추출한 RNA를 이용하여 증폭된 PCR 산물. 4-6. CTV, CTLV 복합감염 감귤 잎에서 추출한 RNA를 이용하여 증폭된 PCR 산물이다.

4. 적 요

본 연구에서는 과수 작물 중에 사과와 감귤에서 감염하는 4종의 바이러스 (ASGV, ACLSV, CTLV, CTV)에 대한 PCR 진단기술 방법을 개발하였다. PCR 진단기술 방법을 개발하기 위해 국내 ASGV, ACLSV, CTLV, CTV 바이러스의 genomic RNA를 분리하여 coat 단백질 혹은 RNA polymerase 유전자의 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열을 토대로 PCR을 통해 진단에 이용할 수 있는 과수 바이러스 특이적 primer set를 선별하였다. 또한 2종의 바이러스들이 복합 감염시 신속하게 정확하게 검색을 위한 바이러스 특이적 진단용 primer set을 선별 하였다. 제작된 바이러스 특이적 primer set을 사용하여 사과와 감귤나무에 바이러스의 감염을 동시에 진단하기 위해 이병 식물 잎으로부터 추출한 total RNA를 주형으로 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 사과의 ASGV와 ACLSV 경우 404bp, 566bp의 DNA 밴드, 감귤의 CTLV와 CTV 경우 503bp, 372bp의 DNA 밴드 형성 유무로서 각 바이러스들의 감염을 동시에 진단할 수 있었다. 또한 역전사 중합효소 연쇄반응에 대한 positive control로서 이용할 수 있는 primer set를 제작하여 이용하였다. 이를 위해 식물에서 전사에 필요한 유전자들 중에 하나인 EF1-a(elongation factor 1a) 유전자 부위를 EF1a-Pf, EF1a-Pr primer set을 사용하여 236bp의 DNA 밴드 형성 유무로서 확인하였다. 본 연구결과 RT-PCR을 수행함으로써 바이러스들의 복합 감염여부를 진단할 수 있을 뿐 아니라 감염경로를 추적하거나 종실이나 대목에 대한 감염여부를 진단하는데 매우 유용하게 이용하여 바이러스를 예방하고 방제할 수 있도록 주요 과수 바이러스 진단의 기반을 마련하였다. 이를 요약하면 다음과 같다.

1. 사과 바이러스 ASGV 및 ACLSV의 genomic RNA를 분리하여 CP (coat protein)유전자 및 RNA polymerase 유전자의 N-termian 부위를 클로닝하였다. 또한 각 바이러스 유전자의 염기서열을 결정하였고 기존에 알려진 바이러스의 유전자의 염기서열을 비교 분석하였다.

2. 감귤 바이러스 CTLV와 CTV genomic RNA를 분리하여 CP (coat protein) 유전자를 클로닝하였다. 또한 각 바이러스 유전자의 염기서열을 결정하였고 기존에 알려진 바이러스의 유전자의 염기서열을 비교 분석하였다.
3. 결정된 바이러스 유전자의 염기서열을 토대로 ASGV, ACLSV, CTLV 및 CTV 바이러스들의 진단을 위한 바이러스 특이적 primer를 선별하였다.
4. 사과와 감귤의 ASGV, ACLSV, CTLV 및 CTV 바이러스들의 감염을 동시 진단할 수 있는 duplex PCR 방법을 개발하였다.
5. RT-PCR 반응 시 양성 대조군으로 이용될 수 있는 대조군 primer를 선별하였다.

제 3 절. PCR을 이용한 과수바이러스 진단기술의 실용성 검토(협동 과제)

1. 서론

사과 ACLSV, ASGV, ASPV는 예전부터 알려져 왔던 고접병의 병원 바이러스로서 고접병에 걸리게 되면 잎이 작아지고 황화되며 조기에 홍엽으로 변하게 된다. 신초의 생육이 나빠지고 수세가 점차 쇠약해지며 과실도 작아지고 결실율이 떨어지며 수피에 균열이 생기는 것도 있다. 대목의 목질부에 흠이 패이는 이상증상이 나타나며 외관상으로는 날개무늬병에 의한 피해와 유사하다. 과수작물의 바이러스들은 비교적 수체내에 농도가 낮고 불균일할 뿐만 아니라 바이러스에 따라 매우 불안정한 바이러스들이 많으므로 즙액접종에 의해 쉽게 바이러스를 분리하기가 어려운 편이다. 따라서 즙액이나 접촉에 의해 옆의 나무로 바이러스가 전염되는 예는 극히 드물며 주로 접목에 의해서 전염이 이루어진다. ACLSV는 즙액접종에 의해 *Chenopodium quinoa* 등의 초본식물에 전염이 되지만 사과 이외에도 배, 복숭아 등에도 자연감염되어 있다. ASGV는 즙액접종에 의해 담배(*Nicotiana glutinosa*)와 *C. quinoa* 등의 초본식물에 감염하며 사과, 배 등의 인과류에 자연 감염된다.

감귤의 CTV(*Citrus tristeza virus*)는 목질부에 갈색 줄모양의 돌기가 있는 것이 특징이다. 잎과 과실이 작아지고 과실이 기형과가 되어 상품의 질을 떨어뜨리고 수세가 약화되고 생장이 둔화되어 식물체가 위축된다. CTLV는 접목부위가 이상 비대되는 증상을 보이고 나무전체가 왜화되면서 수세가 약화된다. 비대된 접목부의 껍질을 벗겨보면 접수와 대목 사이에 경계층이 형성되어 쉽게 부러진다. SDV에 감염되면 봄에 자란가지에 기형잎이 발생하고 가지가 총생하는 증상을 나타낸다. 발아직후 잎 모양이 뒤로 젖혀져서 배모양으로 되고 진딧물 피해를 받은 것과 같이 노란색을 띤다. 건전잎에 비해 잎이 작으면서 두꺼워지며 가지의 생장이 억제되고 절간이 짧아져 수세가 작아진다. 과실도 크기가 작아지고 과피가 두꺼워지고 수량도 감소하게 된다.

이와 같이 과수작물에 존재하는 바이러스는 수체내에 농도가 비교적 낮고 불균

일하게 존재하기 때문에 바이러스에 의한 피해 인식 부족 뿐만 아니라 진단에도 어려움이 많았던 게 사실이다. 고접 등에 의한 품종갱신과 바이러스 미검정 묘목의 보급으로 인해 우리가 알지 못하는 사이에 바이러스가 점점 확산되어 그 피해가 점차적으로 늘어가고 있는 실정이었다. 많은 선진외국의 경우 바이러스를 무독화시킨 묘목을 육성하여 유통시킴으로써 과수작물의 바이러스병을 방제하고 있는 실정이지만 우리나라는 이들 바이러스들에 대한 정밀한 조기진단 기술의 체계가 시작단계에 있었고 대부분이 항혈청 진단에 의존하고 있는 실정이었다. 유전자를 이용한 PCR진단 기술의 적용면에서 과수와 같은 목본성 작물에서는 식물체 조즙액의 성분들이 RT-PCR과정에서 중합효소의 작용을 억제하여 검정을 불가능하게 하는 경우가 많다. 포도의 경우 조직추출물 내에 페놀성 화합물과 다당류 등 여러가지 복합물질들이 과다하게 함유되어 있어 PCR반응을 저해하는 것으로 알려져 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 쉽게 산화되고 갈변되는 식물체로부터 저농도로 존재하는 바이러스를 정밀하게 검출해 내기 위한 여러가지 복합적인 IC-RT-PCR(Immunocapture RT-PCR)법과 Spot-PCR법 등이 개발되고 있다. 또한 식물체로부터 바이러스 복제과정에서 일시적으로 형성되는 복제형 RNA인 double strandRNA(dsRNA)를 검출하여 실험에 이용함으로써 RNase등에 노출되어 쉽게 오염되고 분해되는 ssRNA보다 안정적이고 식물체의 total RNA를 이용하는 것보다 진단 특이성을 더 높힐 수 있는 장점을 가지고 있어 식물 바이러스 진단법으로 많이 사용되고 있다. 하지만 column chromatography과정을 거쳐야 하는 복잡한 추출법때문에 소요노력이 너무 많아 미량의 핵산만 있어도 충분히 진단이 가능한 PCR에 사용하기에는 경제성이 낮아 이용도가 낮은 편이었다. 본 과제는 핵산추출 및 PCR반응에 저해작용을 하는 물질들의 활성을 억제하고 고농도 고순도의 핵산 추출과 효과적인 PCR진단에 관하여 검토하고자 수행하였다. 또한 사과와 감귤의 주요 바이러스들을 분리동정하여 공동연구기관에 제공, 이들 바이러스에 대한 정밀한 유전자 진단기술 체계를 확립함으로써 과수 우량종묘 생산과 검역기술의 발전과 더불어 우리나라 과수산업의 국제경쟁력을 높히는데 목표를 두고 과제를 수행하였다.

2. 연구 재료 및 방법

가. 시약

1) 바이러스 분리동정 및 ELISA

ELISA진단시 사과 ACLSV와 ASGV에 대해서는 BIOREBA Co.(스위스)로부터 구입한 IgG와 alkaline phosphatase가 결합된 conjugated IgG를 사용하였으며, 감귤 CTLV는 일본으로부터 구입한 항체를 제주농업시험장에서 분양받아 사용하였다. 즙액 extraction buffer와 washing buffer, pNPP(p-nitrophenyl phosphate)는 Sigma Chemical Co.에서 구입한 시약으로 조제 사용하였으며, coating, conjugate, substrate buffer는 BIOREBA Co.의 제품을 이용하였다. 기타 바이러스 분리 및 전자현미경 검경시 사용한 완충액조성에 소요되는 시약들은 모두 Sigma Chemical Co. 제품으로 구입하여 사용하였다.

2) RNA 추출 및 RT-PCR

식물체에서의 total RNA 추출은 Qiagen RNeasy Plant mini kit(독일)와 Nuclisens nuclei acid isolation kit(네덜란드)를 구입하여 사용하였고, 일반적 추출방법에 사용된 phenol, LiCl, SDS 등 소요 시약들은 Sigma Chemical Co.(미국)에서 구입하여 이용하였다. 산화방지제 효과검정에 사용된 sodium sulfite, PVP (polyvinylpyrrolidone)등과 전기영동시 Agarose등의 시약들도 Sigma Chemical Co.(미국)에서 구입하였으며 dsRNA추출에 사용된 cellulose는 Whatmann CF-11을 이용하였다. RT-PCR은 Promega Co.의 Access RT-PCR System을 사용하여 수행하였다.

나. 기기

ELISA흡광도 측정에는 Tecan Spectra(미국)제품의 reader를 사용하였고 micro

plate 수세에는 Tecan Twister(미국)를 사용하였다. 바이러스 입자관찰은 Carl zeiss LEO 906(독일) 투과전자현미경을 사용하였으며, PCR은 TAKARA Co.(일본)의 PCR Thermal Cycler MP제품을 이용하였다.

다. 방법

1) 바이러스 분리동정

사과와 감귤나무의 ELISA검정을 통하여 바이러스 감염주를 선별하였다. 사과 ACLSV와 ASGV는 선별한 바이러스 감염주의 잎과 꽃을 *Chenopodium quinoa* 등 지표식물에 접종하여 바이러스를 분리하였다. 접종한 후 병징이 발현된 기주식물의 범위를 조사하고 병징 발현 잎을 leaf dip법으로 전자현미경 검경하여 입자를 관찰한 다음, ELISA에 의해 혈청학적 관계를 확인하여 분리 바이러스를 동정하였다. 동정된 바이러스는 증식기주식물을 이용하여 증식하고 PCR진단 시험재료로 공동연구기관에 제공하였다. 지표식물의 반응을 조사하는 생물검정은 0.01M phosphate buffer, pH7.2를 접종완충액으로 사용하여 사과 또는 감귤잎이나 꽃을 마쇄한 다음, 600mesh의 carborundum을 지표식물 잎에 뿌린 후 즙액을 묻혀 주는 방법으로 즙액접종하였다. 바이러스 입자관찰은 leaf dip법에 의해 2% PTA(phosphotungstic acid, pH7.0) 염색액을 grid위에 1방울 올려놓고 관찰할 식물체 조직에서 수 mm크기의 조직편을 면도칼로 잘라 염색액에 적시는 과정을 2~3회 반복한 후 여분의 PTA액을 filter paper로 빨아내고 실온 건조시킨 다음 투과전자현미경으로 관찰하였다. 또한 분리한 바이러스를 증식하여 순화한 후 입자를 관찰하였다. 혈청학적 관련성은 분리된 지표식물의 병징 발현잎을 채취하여 가능 바이러스들에 대하여 ELISA 검정함으로써 확인하였다. ELISA검정할 시료는 비닐백을 이용하여 Tris-HCl buffer를 10배량(w/v) 첨가한 다음 즙액을 추출, 항원으로 사용하였다. ELISA 과정은 virus IgG를 coating buffer(Na_2CO_3 , NaHCO_3 , NaN_3 , pH9.6)에 1000배 농도($1\mu\text{l}/\text{ml}$)로 희석한 후 96well microplate에 $200\mu\text{l}$ 씩 넣은 다음 30°C 에서 4시간 처리하였다. coating액은 버리고

PBS-T(phosphate buffer saline, 0.5% Tween-20) 세척용액으로 well을 3회이상 세척한 다음 추출즙액을 넣고 4℃에서 overnight시켰다. PBS-T용액으로 well을 5회 수세한 후 conjugate buffer(2% polyvinylpyrrolidone, 0.05% Tween-20, 0.2% bovine serum albumin)에 1000배 농도로 희석한 conjugated IgG를 넣어 30℃에서 5시간 처리하였으며, 처리가 끝난 plate는 다시 PBS-T용액으로 수세 후 substrate buffer(Diethanolamine, NaN_3)에 pNPP를 1mg/ml로 넣은 substrate를 well에 넣은 다음 실온에서 1시간 처리한 후 ELISA reader로 405nm의 흡광도를 측정하였다.

2) RNA 추출방법

바이러스가 증식된 초본 기주의 잎 또는 목본성 기주의 잎조직을 사용하여 total RNA를 추출하였으며, phenol-chloroform을 이용한 방법 1(M1, 그림 19)과 guanidium thiocyanate를 이용한 방법 2(M2, 그림 20)의 일반적 방법과 상품화된 Qiagen kit(Qk)와 Nuclisens kit(Nk)를 이용하는 방법들간의 RNA추출량 및 농도를 비교하였다. 추출한 핵산(RNA)의 농도는 Spectrometer로 측정한 A_{260} 의 흡광도를 기준으로 $A_{260}=1=40\mu\text{g/ml}$ 으로 계산하여 얻고 전체 yield도 환산하여 처리별로 비교하였다. 또한 목본성 작물에 많은 페놀성물질 등 RNA추출 및 PCR반응에 저해작용을 하는 물질들에 대하여 PVP, 2-mercapto ethanol, sodium sulfite 등 산화억제 작용을 하는 물질들을 농도별로 처리하여 그 효과를 분석하였다. 또한 CF-11 cellulose를 이용한 소규모의 dsRNA 간이추출에 의한 효율성 및 진단 실용성도 검정하였으며 추출 방법은 그림 21과 같이 수행하였다.

- Leaf tissue 100mg ground with liquid nitrogen
- Mixed with 400 μ l extraction buffer(100mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 100mM LiCl, 1% sodium dodecyl sulfate) and 400 μ l water saturated phenol
 - Vortex for 30seconds
 - Add 400 μ l chloroform/isoamylalcohol(24:1)
 - Vortex for 30seconds
 - Centrifuge 15,000g for 5min
 - Collect of aqueous phase, added equal volume of 4M LiCl
 - Incubate at 4°C, overnight
 - Centrifuge 15,000g for 10min at 4°C
 - Washing with 70% ethanol
 - Collect the pellet
 - Ethanol precipitation
 - Dissolved in 20 μ l of distilled water

그림 19. Phenol-chloroform(M1)을 이용한 RNA추출 과정.

- Leaf tissue 100mg ground with liquid nitrogen
- Mixed with 450 μ l denaturing solution(4M guanidium thiocyanate, 25mM sodium citrate(pH7.0), 0.5% Sarcocyl, 0.1M 2-mercaptoethanol)
 - Vortex vigorously for 10min
 - Add and mix 10 μ l of 2M sodium acetate(pH4.0), 100 μ l of water-saturated phenol, 20 μ l of chloroform/isoamylalcohol(49:1)
 - Incubate for 15min on ice and centrifuge 15,000g for 15min
 - Collect the aqueous phase, moved to new tube
 - Add 240 μ l of ethanol, mix and incubate for 15min at -20°C
 - Centrifuge 15,000rpm for 15min at 4°C
 - Discard the upper aqueous phase, washing with 200 μ l of 80% ethanol
 - Centrifuge 10,000rpm for 5min at 4°C and the Pellet vaccum drying
 - Add 100 μ l Nuclease free water
 - Ethanol precipitation
 - Dissolved with 30 μ l Nuclease free water

그림 20. Guanidium thiocyanate(M2)을 이용한 RNA추출과정.

Leaf tissue 100mg ground with liquid nitrogen

- Add 600 μ l of 1X STE(0.1M NaCl, 0.05M Tris, 0.001M EDTA, pH6.8), 80 μ l of 10% SDS, and 800 μ l of 2X STE-saturated phenol to the powdered tissues
- Vortex the mixture thoroughly and centrifuge for 5min at 14,000rpm at RT
- Remove the upper aqueous phase and transfer to a clean microtube
- Add ethanol to a final concentration of 16.5%, add 10mg cellulose, vortex vigorously
- Centrifuge briefly to pellet the CF-11, and discard the supernatant
- Wash the CF-11 cellulose by vortexing three times with 1ml of 1X STE in 16.5% ethanol
- Collect CF-11 by centrifugation
- Elute the dsRNA from the CF-11 by adding 200 μ l of 1X STE and vortex to mix
- Centrifuge for 5min and transfer the supernatant to a clean tube
- Repeat elution and centrifugation steps again(total vol. 400 μ l)
- Precipitate with 40 μ l of 3M NaOAc and 1ml ethanol, incubate at -20°C for 20min
- Centrifuge for 10min at maximum speed, rinse with 80% ethanol
- Air dry, and pellet resuspend in 15 μ l of distilled water

그림 21. 바이러스 dsRNA의 간이추출과정.

3) RT-PCR 진단 기술의 실용성 검증

공동연구기관에서 제공한 RT-PCR검정 조건 및 primer를 이용하여 실제 포장의 나무들을 대상으로 진단 효율성을 검증하였다. 최적의 진단시료를 선별하고자 감귤 바이러스 감염주의 성엽, 유엽, 엽병조직의 핵산추출농도 및 PCR진단 효율을 비교 검정하였다. 사과는 경기 수원, 경북 봉화·안동·영주, 충북 옥천·충주, 충남 예산 등 주요 재배지역에서 성목의 신엽을 채집하여 ACLSV와 ASGV 감염여부를 PCR로 진단하여 실용성을 검증하였으며, 감귤은 제주 서귀포 농가와 남제주군 남원읍에 소재하는 제주농업시험장 포장 및 농가포장에서 잎과 꽃 시료를 채집하여 PCR진단하였다. 또한 공동연구기관에서 개발한 복합진단 primer와 진단조건을 이용하여 duplex PCR 실용성도 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 바이러스 분리동정

사과는 ELISA에 의해 바이러스 이병주를 선별하고 이들 이병주의 신엽과 꽃을 *Chenopodium quinoa* 등 기 보고되어 있는 지표 식물에 즙액접종하여 바이러스를 분리하였다. 사과에서 ACLSV와 ASGV를, 배에서 ASGV를 분리하였으며 감귤에서 CTLV와 SDV를 분리동정하였다 (표 6).

사과 ACLSV는 홍로품종의 과실 이상증상을 나타내는 나무의 무병징 잎을 즙액접종한 후 약 10일후에 *C. quinoa*의 상엽에서 병징을 나타내었다. 식물체 전체가 감염되고 line pattern의 모자이크와 모틀병징을 나타내었으며, 이를 증식하여 PEG-bentonite법을 이용하여 바이러스를 순수정제한 후 입자를 관찰한 결과 실모양의 긴 입자들이 서로 엉켜 있는 것을 확인할 수 있었다(그림 22).

ASGV는 배와 사과에서 2종이 분리되었으며, 배 신고품종에서 잎에 검은점이 발현되는 잎검은점병 발생주의 신엽을 지표식물에 접종한 결과, *C. quinoa* 접종엽에서 국부병반(local)을 나타내고 상엽으로 전반되어 심한 모틀과 고사증상을 나타내는

것을 관찰할 수 있었으며 ACLSV와 동일한 PEG-bentonite법을 이용하여 바이러스를 순화하여 사상형의 capillovirus입자를 확인하였다(그림 23).

감귤에서는 CTLV와 SDV를 분리동정하였다. CTLV는 제주 농업시험장 감귤연구소에 보유하고 있는 접목부 이상증상을 나타내는 감염주로부터 신엽과 꽃을 접종하여 분리하였다. 지표식물들 중에서 *C. quinoa* 접종엽에 국부병반을 나타내고 상엽으로 전전되어 잎의 가는 엽맥사이로 투명화되는 vein clearing증상을 나타내는 것이 관찰되었다. 분리된 바이러스는 *C. quinoa*를 이용하여 바이러스를 증식하고 공동연구기관에 PCR진단용으로 제공하였다. SDV는 잎이 아래로 숟가락모양으로 말리는 전형적인 병징을 나타내는 온주밀감나무에서 발아기에 새로 나오는 신엽과 꽃을 채취하여 지표식물에 즙액접종한 결과, *C. quinoa*에서는 접종엽에만 국부병반을 나타내고 병징이 상엽으로 전반되지 않았으며, 땅파리(*Physalis floridana*)는 상엽에 모자이크와 기형증상을 나타내었다(그림 24). CTV는 제주농업시험장에서 분양받은 혈청으로 ELISA진단하여 양성반응을 나타낸 감염주의 잎을 공동연구기관에 바이러스원으로 제공하였다.

바이러스명	기주작물(품종)	증식기주	바이러스 형 태	비 고
ACLSV	사과(홍로)	<i>Chenopodium quinoa</i>	사상형	<i>Trichovirus</i>
ASGV	사과(spy227), 배(신고)	"	사상형	<i>Capillovirus</i>
CTLV	감귤	"	사상형	<i>Capillovirus</i>
SDV	감귤(온주)	<i>Physalis floridana</i>	구형	<i>Nepovirus</i>

표 6. ACLSV, ASGV, CTLV, SDV 바이러스 분리동정.



그림 22. 사과에서 분리한 ACLSV의 병징 및 입자형태.

A ; 사과 홍로 소과증상주(우)로부터 분리, B : *Chenopodium quinoa*의 병징, C ; 순화 바이러스 입자



그림 22. 사과에서 분리한 ACLSV의 병징 및 입자형태.

A ; 사과 홍로 소과증상주(우)로부터 분리, B : *Chenopodium quinoa*의 병징, C ; 순화 바이러스 입자

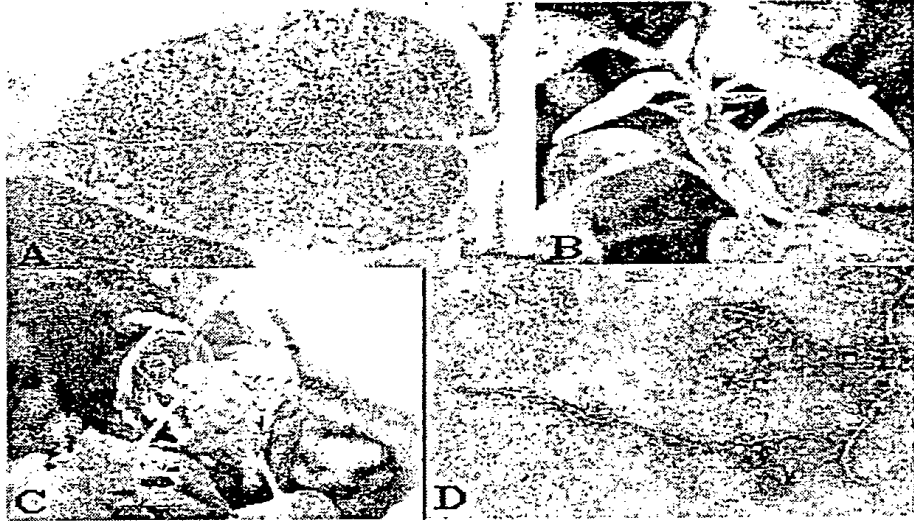


그림 23. 사과와 배에서 분리한 ASGV의 병징 및 입자형태.

A ; 신고배 잎검은점병 발생잎에서 분리, B ; 사과 Spy227품종 신엽에서 분리, C ; 접종한 *Chenopodium quinoa*에서의 mottle병징, D ; 순화한 ASGV 바이러스 입자

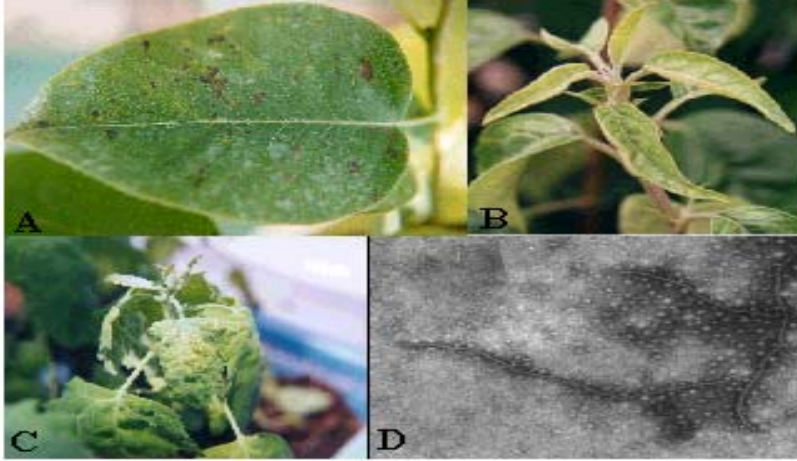


그림 23. 사과와 배에서 분리한 ASGV의 병징 및 입자형태.

A ; 신고배 잎검은점병 발생잎에서 분리, B ; 사과 Spy227품종 신엽에서 분리, C ; 접종한 *Chenopodium quinoa*에서의 mottle병징, D ; 순화한 ASGV 바이러스 입자

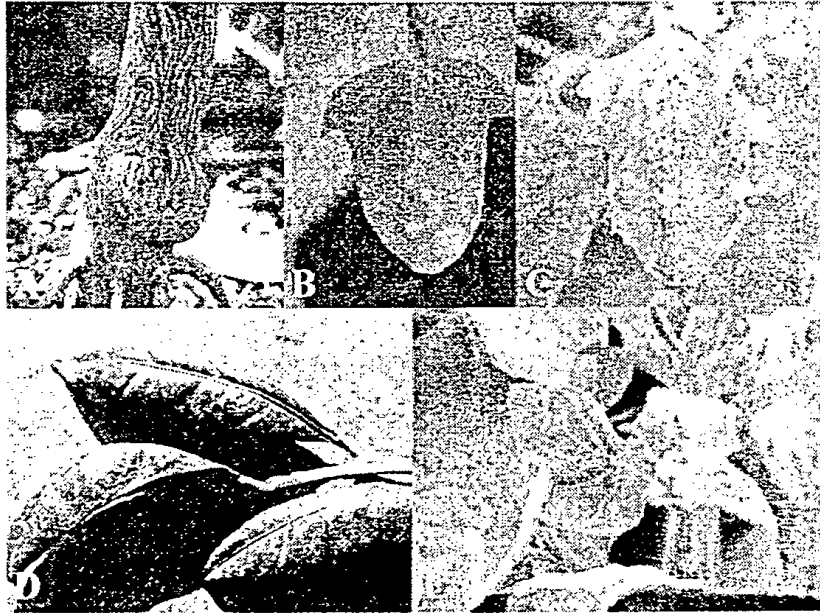


그림 24. 감귤에서 분리한 바이러스 병징.

A ; 감귤 CTLV에 감염된 접목부이상증상, B ; CTLV에 접종
Chenopodium quinoa 접종엽의 local병징, C ; *Chenopodium quinoa*
 상엽의 vein clearing병징, D ; SDV감염 온주밀감의 병징,
 E ; SDV접종한 *Physalis floridana*에 나타난 잎 기형

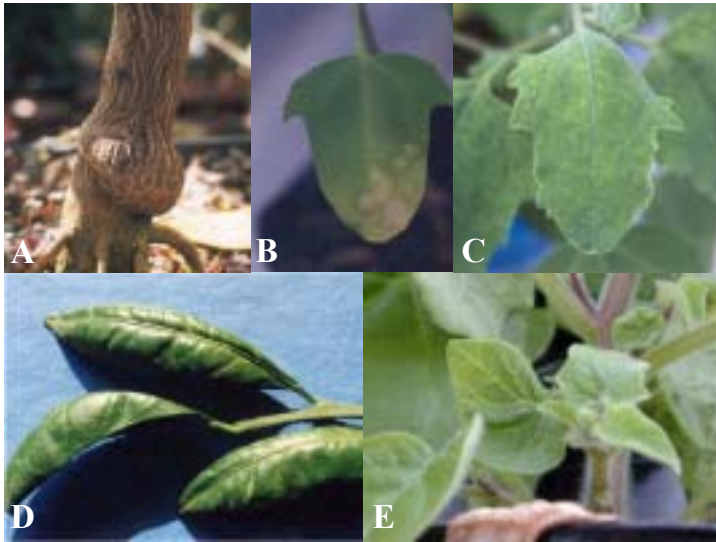


그림 24. 감귤에서 분리한 바이러스 병징.

A ; 감귤 CTLV에 감염된 접목부이상증상, B ; CTLV에 접종 *Chenopodium quinoa* 접종엽의 local병징, C ; *Chenopodium quinoa* 상엽의 vein clearing병징, D ; SDV감염 온주밀감의 병징, E ; SDV접종한 *Physalis floridana*에 나타난 잎 기형

나. 목본성 과수작물에서의 고순도 RNA추출법 개발

1) RNA 추출방법간 비교

쉽게 산화되어 갈변하는 사과잎에서의 RNA 추출농도를 조사하기 위해, ACLSV가 감염된 사과잎과 바이러스를 증식시킨 초본 지표식물 *C. quinoa*의 잎을 비교해서 일반적 추출법 M1을 이용하여 total RNA를 추출한 결과 표 2에서와 같이 추출농도와 순도 등에 매우 큰 차이를 볼 수 있었다. 이와 같이 추출농도가 현저히 낮은 사과잎을 이용하여 일반적인 RNA추출법인 M1, M2법과 상품화된 키트를 이용하는 Qk, Nk법의 비교한 결과 manual 방법인 M1, M2에 비해 상품화된 kit를 사용하였을 때가 추출 핵산의 농도와 순도가 크게 높은 것으로 나타났다(그림 25). 그렇지만 상품화된 키트를 사용하는 경우에 추출농도나 순도, 노력면에서 크게 효과적일뿐만 아니라 일정한 결과를 얻을 수 있어 실험오차를 줄일 수 있는 반면, 대량으로 진단할 때에는 비용이 너무 많이 소요되는 문제를 안고 있었다. 따라서 보다 추출농도와 순도를 높이고 비용이나 노력면에서 효율적인 추출방법을 찾고자 일반적인 핵산추출 방법 M1과 M2법을 비교해 본 결과, guanidium thiocyanate를 이용한 M2추출방법이 phenol-chloroform 이용한 M1법에 비해 핵산 농도와 수확량이 높았고, PCR 진단에도 효과적이었다.

CTLV가 감염된 감귤 잎과 초본 기주작물인 *C. quinoa* 잎을 비교하여 추출RNA농도와 순도를 비교해 본 결과 사과와 달리 두 조직간 차이가 크지 않은 것으로 조사되어(data 미기재) 감귤 잎조직의 경우에는 과수조직에 많은 저해물질들이 함유량이 적거나 영향이 크지 않는 것으로 판단되었다. 또한 핵산추출 방법에 따라서도 일반적 manual방법인 M2법과 kit를 사용한 Qk, Nk간에도 큰 차이가 없었다(표 7).

사과나 감귤 잎조직에서 RNA추출시 Q kit를 사용하였을 때가 추출 RNA의 순도가 높아 PCR 반응에 가장 효율적이었다. 세계적으로 감자외에는 사용한 예가 거의 없는 N kit를 식물에 적용한 결과, 비교적 높은 농도의 RNA를 얻을 수 있었으나 순도가 다소 떨어지는 것으로 나타났다.

구 분	RNA 농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	RNA추출량 (yield, $\mu\text{g}/100\text{ng}$)	순 도 (A260/A280)
apple leaf	46.6	2.330	0.244
<i>C. quinoa</i> leaf	480.0	24.000	1.000

* 핵산추출법 : phenol-chloform법(M1)이용, 100mg시료에서 추출

표 6. ACLSV 감염 사과잎과 명아주 잎에서 추출된 total RNA농도 및 순도 비교.

핵산추출방법	RNA 농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	RNA추출량 (yield, $\mu\text{g}/100\text{mg}$)	순도 (A260/A280)
Qk	303.7	18.222	2.012
Nk	367.9	22.074	0.944
M2	400.4	12.013	1.419

표 7. RNA 추출방법별 CTLV 감염 감글잎에서의 추출 농도와 순도 비교.

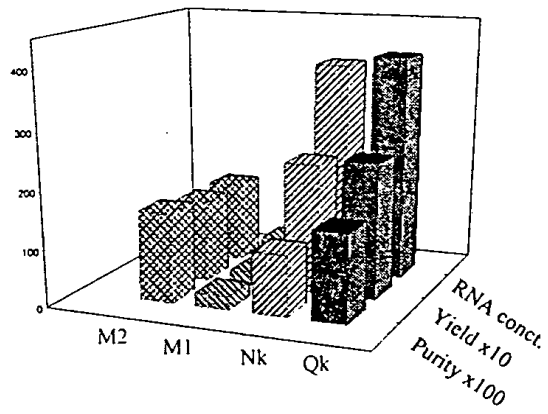


그림 25. RNA추출방법별 사과 잎에서의 total RNA 추출농도와 순도.

M2 : guanidium thiocyanate이용, M1 : phenol-chloroform이용

Nk : N kit이용, Qk : Q kit 이용

2) 추출 용액내 환원제의 첨가처리 효과

일반적인 manual방법인 Phenol-chloroform법에 의하여 사과 잎에서 추출한 RNA는 ACLSV가 증식된 *C. quinoa* 초본기주를 이용한 경우에 비하여 매우 농도가 낮아 PCR진단이 어려웠다. 이를 개선하기 위해, M1법에서의 RNA 추출용액에 페놀성분의 활성억제를 위해 많이 사용되는 PVP와 2-mercaptoethanol을 농도별로 첨가처리하여 효과를 검정한 결과, 다소 첨가효과는 인정되었으나(표 8) 실험오차가 크고 균일한 결과를 얻지 못해 최적의 농도 선발에는 문제가 있었다. 특히 2-ME 처리시험에서 추출된 RNA의 농도가 PVP첨가시험구에 비해 크게 높아, 환원제 종류에 따른 효과보다는 시험재료나 실험조건 등 실험적 요인에 의한 차이가 큰 것으로 판단되었다. 처리별로 추출된 RNA를 template로 하여 RT-PCR을 수행한 결과, 비교적 순도가 높았던 RNA를 사용한 경우만 ACLSV 특이밴드가 관찰되어 RNA의 순도가 PCR 반응에 매우 중요함을 알 수 있었다.

3) dsRNA 추출과 sodium sulfite 첨가에 의한 진단 효율성 증진

식물체로부터 바이러스 복제과정에서 일시적으로 형성되는 복제형 RNA인 dsRNA를 추출하여 쉽게 오염되고 분해되는 ssRNA보다 안정적이어서 실험오차를 줄이고 진단 특이성을 높이고자 100mg의 시료로부터 dsRNA를 간단하게 추출하여 denature시킨 다음 PCR template로 사용하였다.

ACLSV 감염 사과 잎조직을 이용하여 Qk로 추출한 total RNA와 비교하여 PCR 반응 시킨 결과, 그림 26의 line5의 Qk로 추출한 total RNA를 사용한 경우에는 PCR 증폭산물이 거의 보이지 않을 정도로 매우 약한 것에 비해 dsRNA를 이용한 line1은 증폭산물의 농도는 높게 나타나 dsRNA를 이용하는 것이 더욱 효과적임을 알 수 있었다. 또한 dsRNA추출시 추출용액인 STE buffer에 환원제로서 sodium sulfite의 효과를 알아 보고자 농도별로 처리한 결과, 그림 26의 line 1~4에서와 같이 0, 0.5, 1.0, 1.5% sodium sulfite처리농도에 따른 PCR 증폭산물의 농도 차이를 볼 수 있었

다. 이상의 결과로 특히 산화가 잘 되어 쉽게 갈변하는 사과 조직을 이용하여 저농도의 바이러스를 효율적으로 검출해 내기 위해서는 sodium sulfite 1.0%농도로 첨가 처리한 추출용액을 사용하여 추출한 dsRNA를 PCR반응의 template로 사용하는 것이 가장 효과적이면서 정밀하게 진단할 수 있을 것으로 판단되었다.

환원제 종류	처리농도(%)	농도($\mu\text{g}/\text{ml}$)	순도 (A260/A280)	PCR반응 ^z
PVP	0	53.2	0.851	-
	1	134.7	1.468	-
	2	158.3	1.540	+
	5	97.4	1.243	-
2-ME	0	1188.8	1.071	-
	0.2	1376.4	1.137	-
	0.5	1600.0	1.316	+
	0.8	1219.2	0.780	-
	1.0	1600.0	1.327	+

* 추출방법 : Phenol-chloroform법(M1), 사과 ACLSV 감염잎 100mg에서 추출
^z total RNA 5 μl 를 template로 사용

표 8. RNA추출용액내 환원제의 첨가처리에 의한 추출농도와 순도 및 PCR반응.

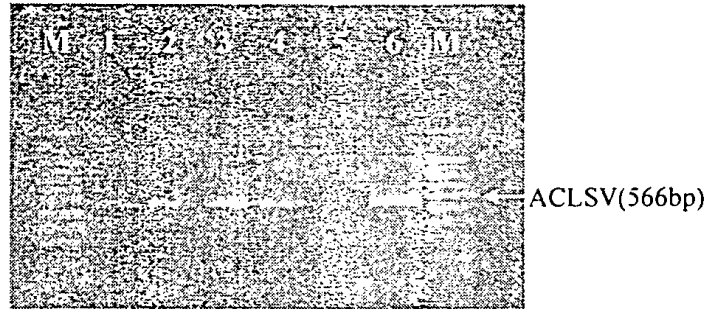


그림 26. ACLSV감염 사과 잎에서 추출한 dsRNA를 이용한 PCR반응 및 sodium sulfite 처리 효과.

M;100bp ladder, 1~4; dsRNA를 template로 사용, 5; Qkit로 추출한 totalRNA사용, 6; C. quinoa leaf에서 Qkit로 추출한 totalRNA사용, 1;Sodium sulfite 0%, 2;Sodium sulfite 0.5%, 3;Sodium sulfite 1.0%, 4;Sodium sulfite 1.5%

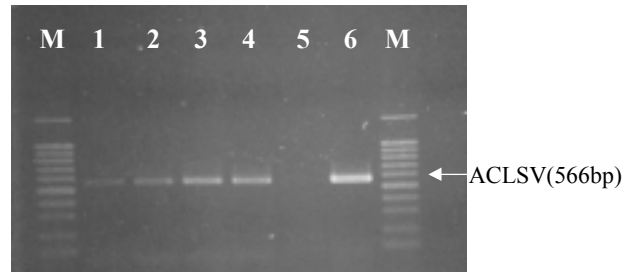


그림 26. ACLSV감염 사과 잎에서 추출한 dsRNA를 이용한 PCR반응 및 sodium sulfite 처리 효과.

M;100bp ladder, 1~4; dsRNA를 template로 사용, 5; Qkit로 추출한 totalRNA사용, 6; C. quinoa leaf에서 Qkit로 추출한 totalRNA사용, 1;Sodium sulfite 0%, 2;Sodium sulfite 0.5%, 3;Sodium sulfite 1.0%, 4;Sodium sulfite 1.5%

다. RT-PCR진단기술의 실용성 검정

1) 검정조직에 따른 PCR진단 효율성 검정

PCR진단에 이용할 검정조직의 종류에 따른 반응을 조사하고자 감귤 잎의 성엽, 유엽, 엽병 부위로 나누어 추출핵산 농도 및 PCR반응을 조사하였다. Qkit로 추출한 RNA는 엽병조직에서 현저하게 높았고, 유엽조직은 농도는 비교적 낮고 추출량도 작았지만 매우 높은 순도의 RNA가 추출되었다(표 9). PCR반응 결과, 엽병조직에서 증폭산물의 농도가 가장 높았고, 성엽조직에 비해 순도가 높았던 유엽조직에서의 증폭산물이 더 많은 것으로 확인되었다.

2) 1차 개발 primer 및 PCR 진단기술의 실용성 검정

공동연구기관에서 제공한 primer와 조건을 이용하여 재배중인 사과원과 감귤원에서 잎을 채집하여 PCR 진단 실용성을 검증하였다. ACLSV, ASGV, CTLV의 외피단백질 부위에 특이적인 primer를 이용하여 이들 바이러스 감염주들을 단독적으로 검출이 가능하였다. 그림 26에서와 같이, ACLSV 감염주는 약 566bp위치에서 특이밴드가 검출되었고, ASGV와 CTLV감염주에서는 503bp 크기의 산물이 확인되었다. 1차 개발된 외피단백질부위 특이적 primer를 이용하여 과원 성목에서의 PCR 진단효율성을 검토하고 항체를 이용한 ELISA진단과 결과를 비교하였다.

사과 재배농가의 과수원에서 재배되고 있는 7~10년생 성목의 신초를 채집하여 ACLSV에 대한 선발 primer와 진단조건을 이용하여 PCR 진단한 결과, ELISA에서 53% 검출율을 보인데 반해 PCR 진단에서 66%의 검출율을 나타내어 보다 정밀하게 특이적으로 진단이 가능함을 확인할 수 있었다(표 10). 감귤의 경우에도 CTLV에 대한 진단 primer와 조건으로 바이러스의 특이적 검출이 가능함을 확인할 수 있었으나, 과원의 성목 20주를 대상으로 CTLV를 진단한 결과, 감염주는 검출되지 않았다.

검정 조직	RNA 농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	RNA 추출량 (Yield, $\mu\text{g}/100\text{mg}$)	순 도 (A260/A280)
성엽	61.6	3.08	0.960
유엽	41.6	2.08	1.719
엽병	155.2	7.76	1.984

표 9. 감귤의 검정조직 종류별 RNA추출농도.

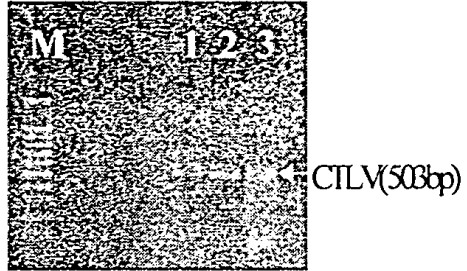


그림 28. 검정조직별 RT-PCR반응 결과.

M: size marker, 1;성엽, 2; 유엽, 3; 엽병

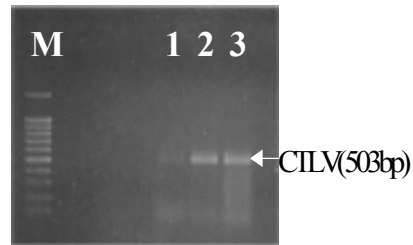


그림 28. 검정조직별 RT-PCR반응 결과.

M: size marker, 1;성엽, 2; 유엽, 3; 엽병

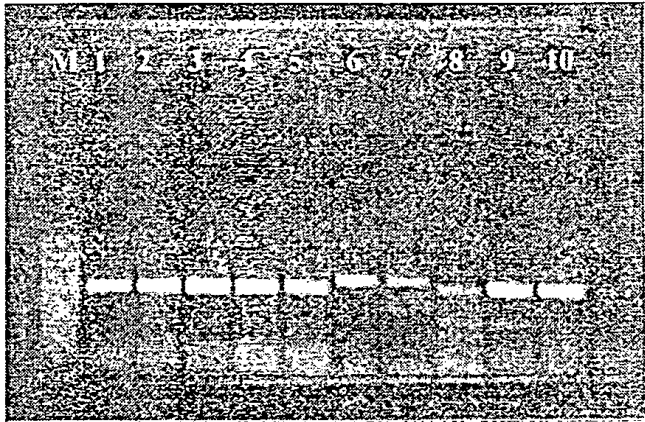


그림29. 사과 ACLSV 및 ASGV, 감귤 CTLV의 선발 프라이머를 이용한 PCR진단 결과.

M ; 100bp ladder, Line 1~3 ; CTLV 감염 감귤 잎조직, Line 4~5 ; ASGV 감염 사과잎조직, Line 6~7 ; ACLSV 감염 사과 잎조직, Line 8~10 ; ASGV 감염 명아주

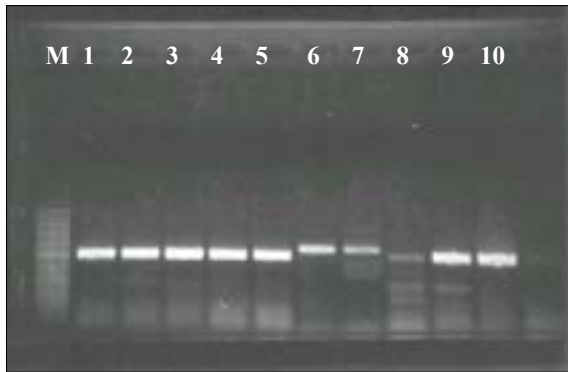


그림29. 사과 ACLSV 및 ASGV, 감귤 CTLV의 선발 프라이머를 이용한 PCR진단 결과.

M ; 100bp ladder, Line 1~3 ; CTLV 감염 감귤 잎조직, Line 4~5 ; ASGV 감염 사과잎조직, Line 6~7 ; ACLSV 감염 사과 잎조직, Line 8~10 ; ASGV 감염 명아주

과 중	검 정 바이러스	검정주수	양성반응주 수 (검출율)		비 고
			ELISA	RT-PCR	
사 과 positive cont.	ACLSV	15	8 (53.3)	10 (66.7)	Nkit RNA 추출
		2	2	2	
감 굴 positive cont.	CTLV	20	-	0	
		1	-	1	

표 10. 1차 선별 RT-PCR조건을 이용한 사과와 감귤과원 성목의 ACLSV와 CTLV 바이러스 진단.

3) 2종 바이러스 동시진단 PCR(Duplex PCR) 진단기술의 실용성 검증

2차적으로 개발된 바이러스 복합감염주의 동시진단 기술을 이용하여 진단 실용성을 검증하였다. 사과 주요 재배지역인 경북 봉화 등 7개 지역에서 채집한 시료와 배 예산 등 3개지역에서 채집한 시료를 ELISA와 비교 진단한 결과, ELISA에서 바이러스 검출율이 11.5%인데 비해 duplex PCR에 의해서는 22.4%의 검출율을 보여 검출 정밀도가 높은 것으로 확인되었다(표 11).

감귤원의 성목 진단에서는 엽병을 포함한 잎조직과 개화기 꽃을 채집하여, CTLV와 CTV에 대해 ELISA 및 Duplex PCR을 통해 진단하였다. 표 12에서와 같이 01-5~01-9의 시료에서는 ELISA에 의해 검출되지 않은 CTLV가 PCR에 의해 효과적으로 검출이 가능하였고, 01-9시료에서는 CTLV와 CTV가 복합적으로 검출되어 duplex PCR의 가능성을 확인할 수 있었다. CTV 진단 항체를 보유하지 않아 ELISA진단을 수행하지 못하였지만 duplex PCR에 의해 CTV 감염주를 효율적으로 선별할 수 있었다.

그림 30에서와 같이 duplex PCR에 의해 2종의 복합감염 여부를 확인할 수 있어 1번의 PCR로 2종의 바이러스 진단이 가능함으로써 비용이나 노력면에서 경제성이 높아 실용가치도 매우 높을 것으로 판단되었다. 또한 각각의 바이러스들에 대한 단독 감염주, 복합감염주를 정확하게 선별할 수 있어 시험재료의 선별과 바이러스 피해 해석에도 효율적일 것이고 바이러스 무독묘를 선별하는데 있어 안정성, 정밀성과 경제성을 높여 이용가치가 매우 높을 것으로 판단되었다.

4) 대조군 primer 포함한 2종 바이러스 동시진단 PCR (duplex PCR) 진단기술의 실용성 검증

최종적으로 개발된 대조군 primer 포함한 2종의 바이러스 동시진단 PCR 진단기술을 농가에서 채집한 사과와 감귤의 잎으로부터 양성 대조군 및 ASGV, ACLSV, CTLV, CTV 바이러스 복합 감염주의 동시진단 기술을 이용하여 진단 실용성을 검증하였다. 그 결과 사과의 경우 그림 31과 같이 ASGV, ACLSV, EF1a에 해당하는 404 bp, 566

bp, 236 bp의 DNA가 증폭되었다. 감귤의 경우는 그림 32과 같이 CTV, EF1a에 해당하는 372 bp, 236 bp DNA 가 증폭되었고 CTLV는 검출되지 않은 것을 보아 채집한 감귤잎에서는 감염된 CTLV가 없다는 것을 알 수 있었다. 따라서, 두 경우 모두 양성 대조군과 바이러스들의 검출에 문제가 없다는 것을 확인하였다.

과종	채집 지역	검정 주수	ELISA 양성반응 주수			DuplexPCR 양성반응 주수		
			ACLSV	ASGV	ACLSV +ASGV	ACLSV	ASGV	ACLSV +ASGV
사과	봉 화	6	0	0	3	0	2	4
	영 주	6	3	1	1	3	1	1
	안 동	6	0	0	0	1	1	0
	예 산	3	0	0	0	0	1	0
	옥 천	3	0	0	1	0	1	1
	충 주	3	0	0	0	0	2	0
	수 원	24	9	0	1	12	0	4
배	예 산	3	0	1	0	1	2	0
	성 남	2	0	0	0	0	1	0
	수 원	2	0	0	0	0	1	0
계(검출율)		58	12(20.7%)	2(3.4%)	6(10.3%)	17(29.3%)	12(20.7%)	10(17.2%)

* DuplexPCR react : ACLSV 566bp, ASGV 403bp 위치의 특이밴드 형성여부 관찰

표11. 사과와 배 재배농가 성목에서의 DuplexPCR을 이용한 바이러스 진단 실용성 검정.

Samples	검정조직	ELISA 반응		Duplex PCR 반응	
		CTLV	CTV	CTLV	CTV
01-1	leaf(+petiole)	-	NT	-	-
01-2	"	-	NT	-	-
01-3	"	-	NT	-	-
01-4	"	-	NT	-	-
01-5	"	-	NT	+	-
01-6	"	-	NT	+	-
01-7	"	-	NT	+	-
01-8	"	-	NT	+	-
01-9	"	-	NT	+	+
02-1	flower	-	NT	-	+
02-2	"	-	NT	-	+
02-3	"	-	NT	-	+
02-4	"	-	NT	-	+
02-5	"	-	NT	-	+
CTLV감염 <i>C. quinoa</i>	leaf	+	NT	+	-

표 12. 감글 성목의 DuplexPCR에 의한 CTLV 진단 실용성 검정.

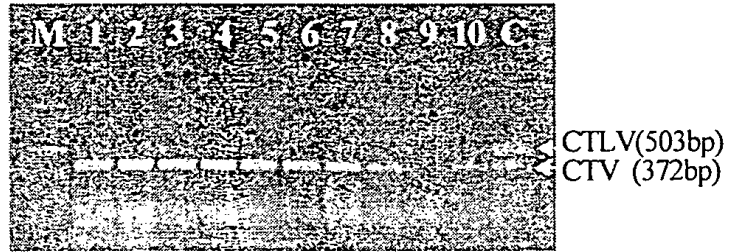


그림 30. 감귤나무 꽃에서의 CTLV와 CTV DuplexPCR결과.

* 검정시료 : 제주농업시험장에서 채집한 성목의 꽃조직, RNA추출 : Q kit이용
M;PCR marker, 1-10; 감귤꽃시료, C; 복합감염주 control

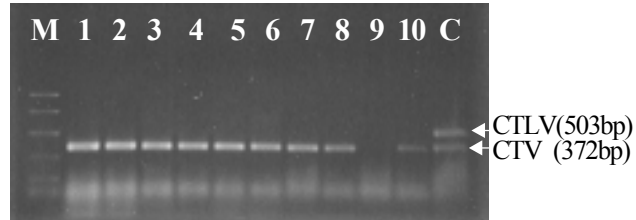


그림 30. 감귤나무 꽃에서의 CTLV와 CTV DuplexPCR결과.

* 검정시료 : 제주농업시험장에서 채집한 성목의 꽃조직, RNA추출 : Q kit이용
M;PCR marker, 1-10; 감귤꽃시료, C; 복합감염주 control

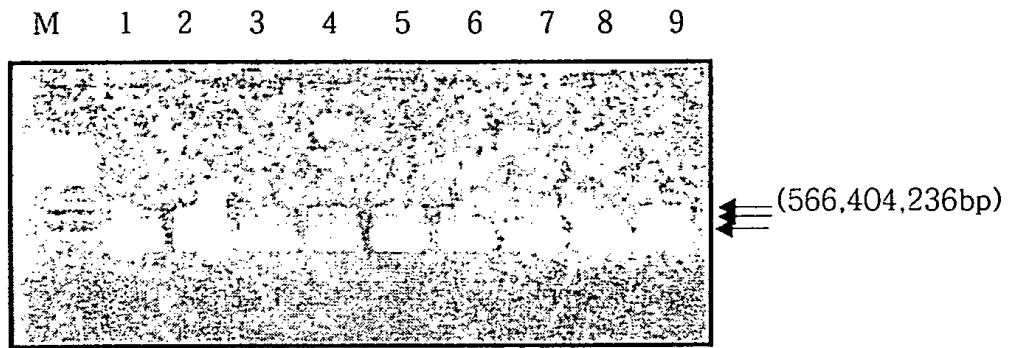


그림 31. 사과 잎으로부터의 복합감염 바이러스, 대조군 primer 포함 동시 진단 multiplex PCR 결과.

M : 1kb ladder, 1-9 : 사과 잎에서 추출한 total RNA을 이용하여 증폭된 DNA band

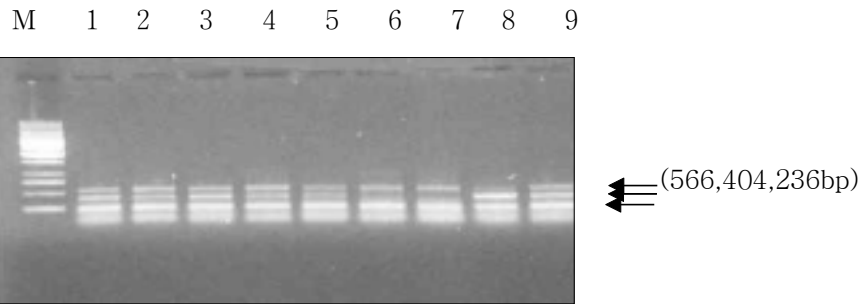


그림 31. 사과 잎으로부터의 복합감염 바이러스, 대조군 primer 포함 동시 진단 multiplex PCR 결과.

M : 1kb ladder, 1-9 : 사과 잎에서 추출한 total RNA을 이용하여 증폭된 DNA band

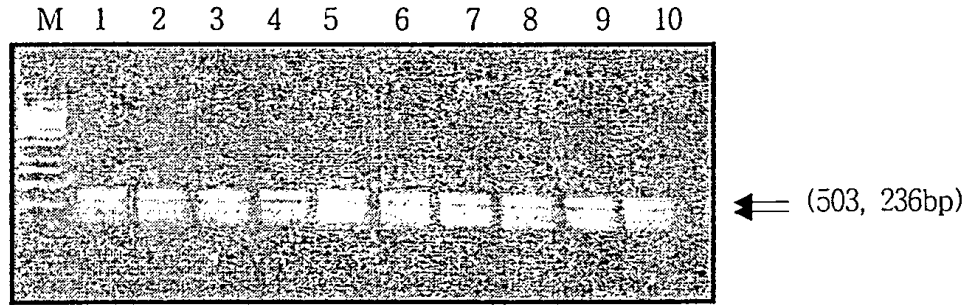


그림 32. 감귤 잎으로부터의 복합감염 바이러스, 대조군 primer 포함 동시 진단 multiplex PCR 결과.

M : 1kb ladder, 1-10 : 감귤 잎에서 추출한 total RNA을 이용하여 증폭된 DNA band

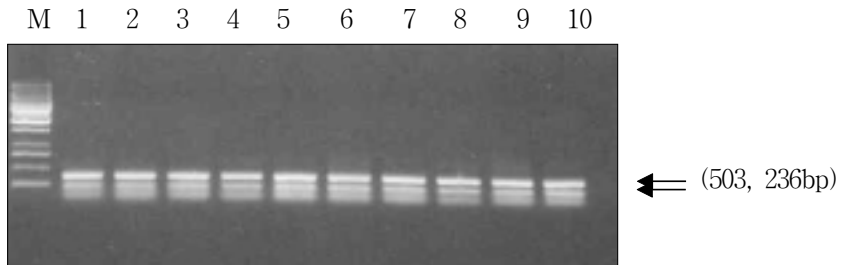


그림 32. 감귤 잎으로부터의 복합감염 바이러스, 대조군 primer 포함 동시 진단 multiplex PCR 결과.

M : 1kb ladder, 1-10 : 감귤 잎에서 추출한 total RNA을 이용하여 증폭된 DNA band

4. 적 요

본 연구에서는 우리나라 사과와 감귤 재배원에서 주로 문제되는 바이러스 4종에 대해 생물검정, 전자현미경검정, 혈청검정 등을 통하여 바이러스를 분리동정하였다. 사과에서 ACLSV, ASGV, 배에서 SGV, 감귤에서 CTLV, SDV를 분리동정하였으며 바이러스원은 공동연구기관에 시험재료로 제공하였다. 또한 과수작물내 페놀성물질 등으로 인해 쉽게 산화되고 갈변되어 핵산추출과 RT-PCR반응에 저해적인 작용을 하는 문제점을 극복할 수 있는 효과적인 핵산추출방법을 개발하고자 하였다. 상품화된 키트를 사용하는 경우가 추출농도나 순도, 노력면에서 효과적이었으나 대량 진단시에 비용이 너무 비싼 문제가 있었다. 일반적 RNA추출방법중에서는 M2법이 M1에 비해 효과적이었으며, 환원제 첨가처리 효과는 일관성있는 결과를 얻지 못하였다. 하지만 식물체로부터 바이러스 dsRNA를 빠르고 간편하게 추출하여 PCR 진단에 이용함으로써 효율성을 높일수 있었으며 특히 산화되어 쉽게 갈변하는 사과 조직에서 저농도로 존재하는 바이러스를 효율적으로 검출해 내기 위해서는 sodium sulfite 1.0%농도로 첨가처리한 STE용액으로 추출한 dsRNA를 PCR의 template로 사용하는 것이 가장 효과적인 것으로 판단되었다. 공동연구기관에서 개발한 진단프라이머와 조건으로 사과 재배 농가의 과수원에서 재배되고 있는 7~10년생 성목의 바이러스 감염여부를 PCR를 통해 진단한 결과, ELISA에서 바이러스가 53% 검출된데 반해 PCR 진단에서는 66%의 검출율을 나타내어 PCR진단이 보다 특이적이고 정밀도가 높은 것을 확인할 수 있었다. 2차적으로 개발된 바이러스 복합감염주의 동시진단 기술을 이용한 실용성 검정에서도 1회의 PCR로 2종의 바이러스 진단이 가능하여 비용이나 노력면에서 경제성이 높아 실용가치도 매우 높을 것으로 판단되었다. 또한 각각의 바이러스들에 대한 단독 감염주, 복합감염주를 정확하게 선별할 수 있어 시험재료의 이용과 바이러스 피해해석에도 효율적일 뿐만 아니라 특히 바이러스 무독묘를 선별하는데 있어 안정성, 정밀성과 경제성을 높이는 등 이용가치가 매우 확대될 것으로 판단되었다. 이상의 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 사과에서 ACLSV, ASGV, 배에서 SGV, 감귤에서 CTLV, SDV를 분리동정하였으며 바이러스원은 공동연구기관에 시험재료로 제공하였다.
2. 일반적 핵산추출방법 중 guanidium thiocyanate를 이용한 M2추출방법이 phenol-chloroform 이용한 M1에 비해 핵산 농도와 수확량이 높았고, PCR 진단에도 효과적이었다.
3. RNA 추출시 환원제 PVP와 2-mercaptoethanol은 무처리에 비해 다소 처리효과가 인정 되었으나, 환원제 종류와 농도에 따른 효과보다는 시험재료나 실험조건 등 실험적 요인에 의한 차이가 큰 것으로 판단되었다.
4. 바이러스 복제과정에서 일시적으로 형성되는 dsRNA를 신속 간이적으로 추출하여 PCR에 사용함으로써 진단 특이성을 높일수 있었으며 sodium sulfite 1.0% 첨가처리에 의해 고순도의 핵산추출 및 PCR 효율성을 더욱 증진시킬 수 있었다.
5. 1차 개발한 바이러스 외피단백질부위 특이적 primer와 진단조건을 이용하여 과원성목의 진단 실용성을 검정한 결과 ACLSV 감염주는 약 566bp위치에서 특이밴드가 검출되었고, ASGV와 CTLV감염주에서는 503bp 크기의 산물이 확인되었으며 ELISA에서 53% 검출율을 보인데 반해 PCR 진단에서는 66%의 검출율을 나타내어 보다 정밀한 검정이 가능하였다.
6. 2차적으로 개발된 바이러스 복합감염주의 동시진단 기술을 이용한 실용성 검정에서도 ELISA에 비해 DuplexPCR을 이용한 진단에서 바이러스 감염주의 검출율이 높았으며 감귤의 CTLV와 CTV, 사과, 배의 ACLSV와 ASGV 복합감염주의 검출이 가능함을 확인하였다.
7. 최종적으로 개발된 대조군 primer 포함한 2종의 바이러스 동시 duplex PCR 진단

기술을 농가에서 채집한 사과와 감귤의 잎으로부터 양성 대조군 및 ASGV, ACLSV, CTLV, CTV 바이러스 복합 감염주의 동시진단 기술을 이용하여 진단 실용성을 검정
이 두 경우 모두 양성 대조군과 바이러스들의 검출에 문제가 없다는 것을 확인하였다.

제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절. 목표달성도

연 도 세부과제 및 주내용	2000 (1차년도)	2001 (2차년도)	달성도 (%)
■ 과수바이러스 유전자 클로닝 및 PCR을 이용한 바이러스 진단기술 개발 - RT-PCR에 의한 바이러스 유전자의 클로닝 - 바이러스 유전자의 염기서열 결정 - ACLSV, ASGV, CTLV 및 SDV(CTV) 바이러스들의 검색을 위한 바이러스 특이적 primer 선발 - 복합감염에 대비한 바이러스 동시 진단 PCR 방법 개발	*****		100
	-----		100
	*****	*****	100
	-----	-----	100
	-----	-----	100
■ PCR을 이용한 과수 바이러스 진단기술의 실용성 검증 - 4가지 과수 바이러스의 genomic RNA 분리 - 사과, 감귤잎으로부터 PCR을 위한 바이러스 RNA 추출방법의 개발 - PCR을 이용한 과수 바이러스 진단 기술의 실용성 검증 - 과수 잎으로부터의 4가지 바이러스들의 진단 실용성 검증	*****		100
	-----		100
	*****	*****	100
	-----	-----	100
	-----	-----	100
***** : 계획 ----- : 달성			

제2절. 관련분야에의 기여도

과수 바이러스는 수체 내에 매우 낮은 농도로 존재하므로 항체에 의한 면역학적 진단방법은 매우 어려우며 국내 과수 바이러스의 진단 기술 분야의 경우 매우 초기 단계의 기술이라 말할 수 있다. 본 연구결과를 통해 4종의 바이러스에 대한 PCR 진단기술이 성공하였으며 그 기술을 국내 특허 출원 (10-2002-38226)을 하였고 한국 식물병리학회 주체 학술대회 “The 2001 KSPP Annual meeting international conference” 에서 진단기술 관련 내용을 발표하였다. 또한 국립식물검역소(송영섭 사무관)에 그 진단기술을 시책 건의함으로써 초기에 과수 무독묘나 국외 수입묘의 바이러스 검색을 선 실시하여 농가에 보급시킬 수 있게 하였다. 또한 그 진단기술을 토대로 다른 바이러스 진단 기술의 개발에도 많은 기초정보를 제공할 것으로 사료되며 다양한 과수 바이러스에 대한 획기적인 진단기술의 개발의 전환점을 제공한 것으로 사료된다.

본 연구결과를 통해 개발된 과수바이러스 진단방법은 산업체로의 이양이 매우 용이하여 과수바이러스 진단 기술의 상용화 및 대중화를 통하여 고부가 산업의 활성화에 기여할 것으로 사료되며 바이러스 진단이 실행된 무독종묘 및 우량 종묘들을 보급됨으로서 고품질, 고생산성의 과수생산이 예상됨으로서 농가소득 향상은 물론 수출 경쟁력도 상승할 것으로 사료된다. 또한 현재 외국으로부터 전량 수입되는 과수 바이러스 진단 kit 는 지역에 따른 생물종의 다양성에 의하여 국내 과수바이러스에 높은 특이성을 보이지 않고 있는 것이 현실이므로 본 연구를 통하여 국내 과수바이러스의 정확한 진단이 가능하게 되었으며 이와 아울러 높은 수입대체 효과가 예상된다.

제 5 장. 연구개발결과의 활용계획

본 연구 결과는 국내에서 많이 재배되는 사과와 감귤의 치명적인 질병을 유도하는 4종의 바이러스에 대한 PCR을 이용한 진단 기술을 개발하는데 직접적인 역할을 하였다. 구체적으로 연구개발 결과의 활용계획은 다음 아래와 같다.

- 개발된 바이러스의 진단 기술 결과를 정책적으로 식물검역소에 기술전수 함으로써 우량종묘 및 무독묘 생산을 유도를 기대할 수 있다.

- 4종의 바이러스 진단 기술을 산업체에 기술이전을 통해 바이러스 진단 kit의 상품화 개발 완료 후 국내 농가에 보급을 확대할 수 있을 것이다.

- 또한 개발된 진단 기술을 적용하여 농가의 과수에 대한 단기간, 좁은 면적에서 대량으로 바이러스 검정 시스템 개발 구축 체계를 확립할 수 있을 것이다.

- 또한 바이러스 무독묘의 효과 검증 및 바이러스 방제를 위한 모독묘 생산 시스템 확립 후 실용화 방안에 이용되어질 수 있을 것이다.

- 본 연구결과를 토대로 다른 주요 과수작물의 주요 품종 및 신품종, 대목종의 바이러스들의 연구에 적용하여 바이러스 무독묘 생산 및 보급에 대한 방법을 구축할 수 있을 것이다.

여 백

제 6 장. 참고 문헌

Ayllon MA, Lopez C, Navas-Castillo J, Garnsey SM, Guerri J, Flores R, Moreno P. Polymorphism of the 5' terminal region of Citrus tristeza virus (CTV) RNA: incidence of three sequence types in isolates of different origin and pathogenicity. *Arch Virol.* 2001; 146(1): 27-40.

Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L. Viruses of Plants, Description and lists from the VIDE Database. *CAB International.* 1996.

Candresse T, German S, Lanneau M, Dunez J. In vitro translation of apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) RNA. *Arch Virol.* 1996; 141(11): 2031-43.

Candresse, T., Kofalvi, S. A., Lanneau, M., Dunez., J., A PCR-ELISA procedure for the simultaneous detection and identification of prunus necrotic ringspot(PNRSV) and apple mosaic (ApMV) ilarviruses. *Acta Horticulturae.* 1998; (472): 219-225.

Demeke, T., Adams, R. P., The effect of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *BioTechniques.* 1992; (12): 332-334.

Desvignes, J.-C., Virus disease of fruit trees. Ctifl, Paris. EPPO, Certification schemes-pathogen-tested material of *Malus*, *Pyrus* and *Cydonia*. EPPO. 1999, :29, 239-252.

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

German S, Candresse T, Le Gall O, Lanneau M, Dunez J. Analysis of the dsRNAs of apple chlorotic leaf spot virus. *J Gen Virol.* 1992;73 (4) : 767-73.

Hanahan, D. Studies on transformation of *E. coli* with plasmid. *J. Mol. Biol.* 1983. 166; 557

German S, Candresse T, Lanneau M, Huet JC, Pernollet JC, Dunez J. Nucleotide sequence and genomic organization of apple chlorotic leaf spot closterovirus. *Virology.* 1990;179(1) : 104-12.

German-Retana S, Bergey B, Delbos RP, Candresse T, Dunez J. Complete nucleotide sequence of the genome of a severe cherry isolate of apple chlorotic leaf spot trichovirus (ACLSV). *Arch Virol.* 1997; 142(4): 833-41.

Hyoun-Hyang Park, Dae-Hyun Kim, Woo Taek Hyun, Doo-Khil Moon, Young-Jin Koh and Tae-Jin Choi Sequence analysis of the coat protein gene of citrus tristeza virus isolated from Cheju island. *plant pathol. J.* 2000. 16(1) : 43-47.

Iwanami T, Kondo Y, Makita Y, Azeyanagi C, Ieki H. The nucleotide sequence of the coat protein genes of satsuma dwarf virus and naval orange infectious mottling virus. *Arch Virol.* 1998; 143(2): 405-12.

Iwanami T, Kondo Y, Karasev AV. Nucleotide sequences and taxonomy of satsuma dwarf virus. *J Gen Virol.* 1999; 80 (3): 793-7.

James D, Jelkmann W, Upton C. Nucleotide sequence and genome organisation of cherry mottle leaf virus and its relationship to members of the Trichovirus genus. *Arch Virol.* 2000; 145(5): 995-1007.

Jelkmann, W., Keim-Konrad, R., An immunocapture polymerase chain reaction and plate trapped ELISA for the detection of apple stem pitting virus. *J. Phytopathol.* 1997;(145): 499-504.

Kinard, G. R., Scott, S. W., Barnett, O. W., Detection of apple chlorotic leaf spot and apple stem grooving virus using RT-PCR. *Plant Dis.* 1996;(80) ; 616- 621.

Karasev AV, Nikolaeva OV, Koonin EV, Gumpf DJ, Garnsey SM. Screening of the closterovirus genome by degenerate primer-mediated polymerase chain reaction. *J Gen Virol.* 1994; 75 (6): 1415-22.

Karasev AV, Boyko VP, Gowda S, Nikolaeva OV, Hilf ME, Koonin EV, Niblett CL, Cline K, Gumpf DJ, Lee RF, et al. Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome. *Virology.* 1995; 208(2): 511-20.

Kim, D. J., Oh, D. -C., Hyun, C. -W., Kwon, H.-M., Kim, D.-H. and Lee, S. -C. Incidence of three major citrus viruses in Cheju Island, *Plant Dis, Agric*, 1999: (5): 34-40.

Koonin EV, Mushegian AR, Ryabov EV, Dolja VV. Diverse groups of plant RNA and DNA viruses share related movement proteins that may possess chaperone-like activity. *J Gen Virol.* 1991;72 (12) : 2895-903.

Koomjul PK, Brandt WF, Farrant JM, Lindsey GG. Inclusion of polyvinylpyrrolidone in polymerase chain reaction reverses the inhibitory effects of polyphenolic contamination of RNA. *Nucleic Acids Res.* 1999(27):915-916.

Lister, R. M., and Bar-Joseph, M. Closteroviruses. in; Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis, 1981, p 809

Levy L, Lee I, Hadi A. A simple and rapid preparation of infected plant tissue extracts for PCR amplification of virus, viroid, and MLO nucleic acids. *J. Virol. Methods* 1994(49): 295-304.

Mink, G. I., Apple chlorotic leafspot. In : Fridlund, P. R., Virus and viruslike diseases of pome. fruits and simulation noninfectious disorders. Cooperative Extension College of Agriculture and Home Economics Washington Stat University, Pullman, W A. 1989, pp. 8-9.

Moreno, P., and Guerri J. Variability of citrus tristeza closterovirus(CTV) : methods for differentiating isolates, In: Filamentous Viruses of Woody Plants, ed, by P. L. Monet, 1997: pp. 97-108.

Mawassi M, Mietkiewska E, Hilf ME, Ashoulin L, Karasev AV, Gafny R, Lee RF, Garnsey SM, Dawson WO, Bar-Joseph M. Multiple species of defective RNAs in plants infected with citrus tristeza virus. *Virology*. 1995 ; 214(1): 264-8.

MacKenzie DJ, McLean MA, Mukerji S, Green M. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription polymerase chain reaction. *Plant Dis*. 1997(81) :222-226.

McGarvey P, Kaper JM. A simple and rapid method for screening transgenic plants using the PCR. *BioTechnuques*. 1991(11) : 428-432.

Morris, TJ. Dodds JA. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology*. 1979(69) : 854-858.

Nishiro T, Kawai A, Takahashi T, Namba S, and Yamashita S. Purification and properties of citrus tatter leaf virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 1989(55):254-258.

Nie. X., Singh, R. P., Detection of multiple of potato viruses using an oligo(dT) as a common cDNA primer in multiplex RT-PCR. *J. Virol. Methods.* 2000; (86); 179-185.

Ohira, K, Namba, S, Rozanov, M, Kusumi,T, Tsuchizaki, T. Complete sequence of an infectious full-length cDNA clone of citrus tatter leaf capillovirus: comparative sequence analysis of capillovirus genomes. *J Gen Virol.* 1995; 76 (9) : 2305-9.

Ohira, K, Ito, T, Kawai A, Namba, S, Kusumi, T, Tsuchizaki, T. Nucleotide sequence of the 3'-terminal region of citrus tatter leaf virus RNA. *Virus Genes.* 1994; 8 (2): 169-72.

Poul F, Dunez J. Use of monoclonal antibodies for the identification of different antigenic domains in apple chlorotic leaf spot virus. *Arch Virol.* 1990; 114(3-4) :191-202.

Pappu HR, Karasev AV, Anderson EJ, Pappu SS, Hilf ME, Febres VJ, Eckloff RM, McCaffery M, Boyko V, Gowda S, et al. Nucleotide sequence and organization of eight 3' open reading frames of the citrus tristeza closterovirus genome. *Virology.* 1994;199(1): 35-46.

Sharman, M., Thomas, J. E., Dietzen, R. G., Development of a multiplex immunocapture PCR with colourimetric detection for viruses of banan, *J. virol. Methods.* 2000; (89): 75-88.

Sanger. F. and A.R. Coulson. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 13; 373

Satoh H, Matsuda H, Kawamura T, Isogai M, Yoshikawa N, Takahashi T. Intracellular distribution, cell-to-cell trafficking and tubule-inducing activity of the 50 kDa movement protein of Apple chlorotic leaf spot virus fused to green fluorescent protein. *J Gen Virol.* 2000; 81(8): 2085-93.

Sato K, Yoshikawa N, Takahashi T, Taira H. Expression, subcellular location and modification of the 50 kDa protein encoded by ORF2 of the apple chlorotic leaf spot trichovirus genome. *J Gen Virol.* 1995;76 (6) : 1503-7.

Sato K, Yoshikawa N, Takahashi T. Complete nucleotide sequence of the genome of an apple isolate of apple chlorotic leaf spot virus. *J Gen Virol.* 1993;74 (9) : 1927-31.

Stouffer, R. F., Apple stem pitting. In : Fridlund, P. R., Virus and viruslike diseases of pome fruits and simulation noninfectious disorders. Cooperative Extension College of Agriculture and Home Economics Washington Stat University, Pullman, W A. 1989, pp.138-144.

Singh RP, Nie X, Singh M, Coffin R, Duplessis P. Sodium sulphite inhibition of potato and cherry polyphenolics in nucleic acid extraction for virus detection by RT-PCR. *J. Virol. Methods.* 2002(99):123-131.

Takamatsu, S., Lin, B. N., Furuta, H. and Makara, K. Rt-PCR mediated cloning and sequence analysis of lily symptomless virus. *Ann, Phytopath Soc.* 1994; 60: 487-490

Rowhani, A., Manningas, M. A., Lie, L. S., Daubert, S. D., Golino. D. A., Development of a detection system for viruses of woody plants based on PCR

analysis of immobilized virions. *Phytopathology* , 1995: (85): 347-352.

Valverde RA. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Dis.* 1990(74):255-258.

Welsh, M. F., van der Meer, F. A., Apple stem grooving. In : Fridlund, P. R., Virus and viruslike diseases of pome fruits and simulation noninfectious disorders. Cooperative Extension College of Agriculture and Home Economics Washington State University, Pullman, W A. 1989, pp.127-137.

Yanase, H., Mink, G. I., Sawmura, K., Yamaguchi, A., Apple topworking disease. In; compendium of apple and pear diseases. 1990, pp. 74-75

Yoshikawa N, Sasaki E, Kato M, Takahashi T. The nucleotide sequence of apple stem grooving capillovirus genome. *Virology.* 1992; 191(1): 98-105.

Yoshikawa N, Imaizumi M, Takahashi T, Inouye N. Striking similarities between the nucleotide sequence and genome organization of citrus tatter leaf and apple stem grooving capilloviruses. *J Gen Virol.* 1993; 74 (12): 2743-7.

Yoshikawa N, Oogake S, Terada M, Miyabayashi S, Ikeda Y, Takahashi T, Ogawa K. Apple chlorotic leaf spot virus 50 kDa protein is targeted to plasmodesmata and accumulates in sieve elements in transgenic plant leaves. *Arch Virol.* 1999; 144(12): 2475-83.

Zhang YP, Uyemoto JK, Kirkpatrick BC. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *J. Virol. Methods.* 1998(71) : 45-50.

정영희, 전재홍, 최경화, 김현순, 오현우, 정 혁. ELISA 및 RT-PCR 기법을 이용한 potato virus S의 검정. 1997. 한식병지. 13: 317-322

이상용, 홍진성, 이진상, 최장경. 간이 조즙액 추출법을 이용한 RT-PCR 및 1 pair primer를 이용한 원예작물에 감염하는 수종의 potyvirus의 동시 신속 진단. 1996. 한식병지. 12: 432-436.