RT-PCR에 의한 카네이션괴저바이러스와 카네이션둥근반점바이러스 정밀진단

이시원^{1,2} · 강은하^{1,3} · 허노열¹ · 김상목¹ · 김유정¹ · 신용길^{1*}

¹농림수산검역검사본부 식물검역기술개발센터, ²단국대학교 미생물학과, ³성균관대학교 유전공학과

Detection of *Carnation necrotic fleck virus* and *Carnation ringspot virus* Using RT-PCR

Siwon Lee^{1,2}, Eun-Ha Kang^{1,3}, Noh-Yeol Heo¹, Sang-Mok Kim¹, Yu-Jeong Kim¹ and Yong-Gil Shin^{1*}

¹Plant Quarantine Technology Center, Suwon 443-440, Korea

²Department of Microbiology, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

³Department of Genetic Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

(Received on June 14, 2012; Revised on February 13, 2013; Accepted on February 20, 2013)

Carnation is considered to be one of the top three cutting flowers in the world, which is a main crop with 21 billion annual volume of manufacture. The four carnation items such as cuttings, seed, plant and unrooted cuttings are imported and exported. Viruses can be easily transmitted during vegetative propagation of carnation. *Carnation necrotic fleck virus* (CNFV) and *Carnation ringspot virus* (CRSV) are designated as Korea plant quarantine viruses and inspected. This study was aimed to develop specific primer sets for easy and rapid detection of CNFV and CRSV. Two RT-PCR primer sets were efficiently amplified 288 and 447 bp fragments for CNFV and 503 549 bp fragments for CRSV. Furthermore, developed nested primer sets make possible to high sensitive detection and verification. CNFV nested PCR primer sets all produced band of 147 bp and CRSV nested PCR primer sets did bands of 395 and 347 bp. In addition, plasmid inserted 6 sequences in amplicon were used as a positive control to improve inspection confidence. The successful application of PCR module newly developed in this study will be highly useful for detect of CNFV and CRSV for quarantine inspections.

Keywords : Carnation, *Carnation necrotic fleck virus*, *Carnation ringspot virus*, Mutation-positive control

서 론

카네이션(*Dianthus caryophyllus*)은 지중해 연안에 자생하는 석죽과의 *Dianthus*속에서 개량된 다년초로써 세계 3대 절화용 화훼작물이며(Kim 등, 2004), 중요한 경제 작물로 취급되고 있다(Zuker 등, 1999). 국내에서는 4대 절화작목 중 하나로 연간 농가 생산액이 210억 원에 이르며, 주로 김해와 부산을 중심으로 남부지역과 고랭지에서 재배되고 있다. 스승의 날, 졸업과 입학시즌 및 어버이날 등 특정 시기에 수요가 급증하고, 정식기에는 종묘의 공급이 부족하며, 카네이션의 생산비 문제로 묘주를 거의

전량 수입하여 사용하고 있다(Kang 등, 2011).

카네이션은 절화, 종자, 묘 및 삽수의 4품목으로 수출입 하고 있다. 2010년 식물검역연보에 따르면, 우리나라에서는 절화 221건(965,509개), 묘 1건(6,000개) 및 삽수 11건(17,995개)의 수출검사와 절화 131건(9,541,221개), 묘 102건(5,556,511개) 및 삽수 23건(1,669 kg)의 수입검사가 이루어졌으며, 전체적으로 수출보다 수입 검사량이 월등히 많다. 2009-2010년 식물검역연보의 작물별 수입검사 건수에 따르면, 옥수수(40%), 목화(18%), 밀(16%) 및 호박(5.5%)에 이어 카네이션은 4.5%로 5번째를 기록했으며, 2010년에도 4.5%로 6번째를 기록했다.

카네이션과 같은 영양번식성 작물의 경우, 증식하는 과정 중에 바이러스의 확산과 전파가 용이하며(Kim 등, 2004), *Carnation latent virus* (CLV), *Carnation ringspot virus* (CRSV), *Carnation mottle virus* (CarMV) 및 *Carnation*

*Corresponding author

(Phone) +82-31-204-0918, (Fax) +82-31-204-0668

(E-mail) syng1286@korea.kr

vein mottle virus (CVMV) 등 약 20여종의 바이러스가 감염되는 것으로 알려져 있다(Hollings와 Stone, 1964). 이 중 *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV), *Carnation etched ring virus* (CERV), CNFV, CRSV 및 *Tomato bushy stunt virus* (TBSV)는 식물검역원 고시 제 2012-136호에 따라 관리병해충으로 규정되어, 수입 카네이션 품목들에서 검사하고 있다.

자유무역협정(Free Trade Agreement) 이후 수출입의 물동량이 지속적으로 증가하면서 카네이션의 수출입에 대한 검사건수도 증가할 전망이다, 이에 따라 식물바이러스 진단과 관련된 보다 효율적인 검사 방법이 지속적으로 요구되고 있는 추세이다. 최근에는 현재의 검사방법인 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)보다 간편하고 민감도가 높은 RT-PCR 방법으로 식물바이러스를 검사하는 방법이 연구되어 정착되고 있다(Kim 등, 2000; Kim 등, 2005; Lee 등, 2011a, 2011b; Park 등, 2004).

본 연구에서는 카네이션에 감염될 수 있는 식물검역 바이러스 중, 카네이션괴저바이러스(CNFV)와 카네이션등근반점바이러스(CRSV)를 간편하고 신속하게 진단할 수 있는 종 특이적인 primer를 각각 두 set씩 고안하였고, 더 높은 민감도로 검출이 가능하면서 1차 PCR을 검증할 수 있는 nested PCR primer set를 개발하였다. 또한 실험 시 검사의 신뢰도를 높일 수 있도록 돌연변이-양성대조구 클론(mutation-positive control)을 제작하였다.

재료 및 방법

표준시료. 금지품 수입허가를 통해 검사법 개발대상 바이러스인 CNFV와 CRSV가 감염된 시료를 수집하였으며(ADGEN, England), 2차와 3차 선발에 사용된 cDNA 시료는 국내 기업(PLUTOS, Korea)에서 구매하여 실험에 활용하였다.

Primer 제작. CNFV와 CRSV의 진단용 primer를 설계하기 위하여 미국 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI)로부터 CNFV (EU884443), CRSV (L18870) 그리고 CNFV와 분류학적으로 유사한 클로스터비리데(*Closteroviridae*) 3종(*Beet yellow stunt virus*, *Beet yellows virus* 및 *Citrus tristeza virus*) 및 CRSV와 분류학적으로 유사한 토머스비리데(*Tombusviridae*) 7종(*Furcraea necrotic streak virus*, *Red clover necrotic mosaic virus*, *Sweet clover necrotic mosaic virus*, *Maize chlorotic mottle virus*, *Tomato bushy stunt virus*, *Tobacco necrosis virus* 및 *Carnation mottle virus*)의 염기서열을 다운로드 하였다. 각각의 다운로드한 염기서열들은 DNAMAN DNA

analysis software package (DNAMAN version 6.0; Lynnon Biosoft, Canada)를 사용하여 sequence alignment 후 annealing temperature 51–59°C를 조건으로 종 특이적인 염기서열을 탐색하였다(Pan 등, 2000). CNFV는 정방향 8가지와 역방향 7가지, CRSV는 정방향 9가지와 역방향 8가지 primer를 설계하였으며(data not shown), 설계한 primer 정보는 Table 1에 기재하였다.

Primer 선별. 설계한 CNFV와 CRSV의 primer는 PCR 증폭이 가능한 21가지와 54가지로 조합하였으며, 이후 4단계에 걸쳐 선별하였다. 1차 선발로 primer 조합들과 대상 바이러스와의 특이적 반응여부를 보고, 2차 선발로 유연관계에 있는 바이러스와의 비특이적 반응여부를 확인하였다. 3차 선발로 기준 관련 바이러스와의 비특이적 반응여부를 확인한 후, 4차 선발로 기준 genomic DNA와의 비특이적 반응여부를 확인하였다. 2차와 3차 선발은 각각 바이러스들의 cDNA를 사용하였으며, CNFV는 ArMV, CRSV와의 비특이적 반응을 확인하였고, CRSV는 *Tobacco necrosis virus* (TNV), TBSV, ArMV 및 CNFV와의 비특이적 반응을 확인하였다. 이 때, target의 예상 크기 이외에 추가로 형성된 밴드는 모두 비특이적인 반응이라고 간주하였다.

핵산 추출. SolGent RNA mini prep kit (Solgent, Korea)를 사용하여 감염시료의 잎에서 total RNA의 추출하였으며, DNeasy® Plant mini kit (Qiagen, Netherlands)를 사용하여 카네이션의 genomic DNA를 추출하였다(Woo, 2002). 각 시료 0.1 g을 멸균된 막자사발에 담아 액체질소를 첨가하여 마쇄하였고, 최종적으로 nucleic acid free water 20 µl에 녹인 후 RT-PCR과 PCR의 주형으로 사용하였다.

PCR. RNA에서 one-step RT-PCR을 위에서 추출한 total RNA 1 µl를 주형으로, 설계한 정방향과 역방향 primer (25 pmol)를 각각 1 µl, deionized distilled water (Sigma, USA) 7 µl 및 RT-PCR PreMixture (Plutos, Korea) 10 µl를 넣어 총 볼륨 20 µl로 수행하였다. RNA에서 cDNA 합성은 감염시료의 잎에서 추출한 total RNA 2 µl를 주형으로, M-MuLV Reverse transcriptase (Roche, Switzerland) 4 µl, N25 primer (50 pmol, NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN N) 3 µl, 2 mM dNTP (Enzynomics, Korea) 2 µl, RNasin® (Promega, USA) 0.7 µl, M-MuLV (Roche, Switzerland) 1.6 µl 및 DW 6.7 µl로 총 볼륨 20 µl로 수행하였다. 이후 합성된 cDNA를 주형으로, Fast PCR PreMixture (Plutos, Korea) 10 µl를 포함하여 총 볼륨 20 µl에 맞춰 nested PCR을 실시하였다. PCR은 카네이션 genomic DNA 1 µl를 주형으로 정방향과 역방향 primer (25 pmol)를 각각 1 µl, deionized distilled water 7 µl 및 Fast PCR

Table 1. Nucleic acid sequence of oligonucleotide primers used RT-PCR assay of the *Carnation necrotic fleck virus* and *Carnation ringspot virus* in this study

Primer name	Sequence	Length (bp)	Location
CNF_N10	5'-TTG CGT CAA CAG GAT TCC-3'	18	79-96
CNF_N20	5'-AAT CTC GTG AAG TGG CGT-3'	18	131-148
CNF_N30	5'-TAC ACT TAC GCC TTA CCC G-3'	19	355-373
CNF_N40	5'-TAT GTT CAG TTC CCG CAG-3'	18	449-466
CNF_N50	5'-GCA CAT AAT CAA CGA ACC C-3'	19	531-549
CNF_N60	5'-CGT ATC AGG CGT ATC AGT TAG-3'	21	636-656
CNF_N70	5'-GGA AAT GGT TTA CAG CCG-3'	18	732-749
CNF_N80	5'-CAT TAT GGT GTC GCC TGA-3'	18	864-881
CNF_C10	5'-CCA GGT AAG TAT GAA AGT CCA C-3'	22	1,031-1,052
CNF_C20	5'-GTG TCG CCA AAG TGG ATA-3'	18	806-823
CNF_C30	5'-CTC CAG AAC TAC GAA CAA CA-3'	20	669-688
CNF_C40	5'-ATT GTA ACC ACT CAA GGT GAC G-3'	22	504-525
CNF_C50	5'-CTG AAC ATA CGA CAC CTG AA-3'	20	438-457
CNF_C60	5'-GGC GTA AGT GTA AAT ACC TTG C-3'	22	345-366
CNF_C70	5'-AAC CCA TCT CTTGAG GTC G-3'	19	207-225
CRS_N08	5'-TAC TTC AGG GCA TTC GGT-3'	18	2,208-2,225
CRS_N10	5'-CGT CCA GAG AAT AGT AGA AGG T-3'	22	2,237-2,258
CRS_N20	5'-CGA CTT CAC AAG GAT TTA CTC G-3'	22	2,325-2,346
CRS_N30	5'-GCC TAA ACA GCG TCA GAA-3'	18	2,408-2,425
CRS_N40	5'-ACG CAA CCA CCC AGA TAG TC-3'	20	2,461-2,480
CRS_N50	5'-CCT ACT CCC AGT TTG CTC A-3'	19	2,583-2,601
CRS_N60	5'-GAC AGA GAC TCC CAA GAT GT-3'	20	2,745-2,764
CRS_N70	5'-CGA TGT CTG GAG GTT TGT AA-3'	20	2,855-2,874
CRS_N80	5'-CAG ACA GCA TAC TGG GAT G-3'	19	3,024-3,042
CRS_N90	5'-AGG AAC TCT GGT CGT AGG TC-3'	20	3,185-3,204
CRS_C10	5'-TAC TAA GGT TGC GGA CTG C-3'	19	3,566-3,584
CRS_C20	5'-GGT TCT CGT CTC CTA AGG TAA G-3'	22	3,505-3,526
CRS_C30	5'-AAC TTT GTT GGC GGC TAC-3'	18	3,401-3,418
CRS_C40	5'-TGG CAC CGA TTA CCG ATA-3'	18	3,211-3,228
CRS_C50	5'-TGT CCA TAA TCG GAG AGC-3'	18	2,900-2,917
CRS_C60	5'-ATA CAC AGC CGT AGA CAC CG-3'	20	2,806-2,825
CRS_C70	5'-AGT CTC TGT CCC ACA TCA GT-3'	20	2,735-2,754
CRS_C80	5'-CGA TAC AGG TCG TAG TTC G-3'	19	2,653-2,671

PreMixture 10 μ l, 전체 20 μ l로 실시하였다. RT-PCR은 42°C, 60분의 역전사반응과 95°C, 10분의 denaturation 후 95°C에서 45초, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분 과정을 35회 반복 후, 마지막으로 72°C에서 5분간 반응시켰다. RNA를 주형으로 cDNA 합성은 42°C에서 60분 후 60°C에서 10분 반응시켰으며, PCR은 RT-PCR의 역전사반응을 제외한 나머지와 동일하게 반응시켰다. PCR 산물은 1X TAE buffer를 이용하여 1.2% agarose gel에서 80분 전기영동 후 ethidium bromide (SIGMA-ALDRICH)로 염색하여 UV 하에서 확인하였다.

효율성 검증과 nested PCR. 1-4차 선발에 합격한 primer 조합 중 민감도가 가장 높은 primer 조합을 선발하기 위하여 total RNA를 원액~10⁻⁸까지 희석하였으며, 각각 1 μ l를 주형으로 one-step RT-PCR로 반응하여 민감도가 가장 좋은 primer set를 두 개씩 선발하였다. 최종 선발된 primer set에 대하여 각각의 nested primer 조합을 설계하였으며, 1차 PCR 산물을 1/100 희석하여 1 μ l를 주형으로, 위에서 사용한 PCR 조건과 동일하게 반응시켰다.

염기서열분석과 양성대조구 제작. 최종 선발된 nested primer set의 PCR 증폭 산물에 대해 염기서열 분석을 의

뢰하였으며(Bioneer, Korea), 분석된 염기서열에서 primer binding site를 확인하였다. 양성대조구 제작을 위하여 최종 선발된 primer set 두 개의 구간을 모두 포함하는 PCR 산물을 증폭하였으며, 이것을 pGEM®-T Easy Vector를 사용하여 클로닝 하였다(Promega, USA). 양성대조구로 선발된 클론에 nested primer 증폭부위 안쪽으로 제한효소 *Xho* I이 반응할 수 있는 염기서열인 CTCGAG (6 bp)를 Site-Directed Mutagenesis Kit를 사용하여 삽입하였으며(Nelson과 McClelland, 1992), 제품의 프로토콜에 따라 수행하였다.

결 과

RNA 추출. 금지품 허가를 통해 구입한 CNFV와 CRSV 감염 시료에서 total RNA를 각각 155.04 ng/μl와 345.36 ng/μl 추출하였다. 또한 CNFV에 감염된 잎은 감염된 바이러스의 농도가 너무 낮아, 1과 3 μl를 사용하여 1차 선 발을 수행하였다.

Primer set 선발. CNFV의 최적 진단용 primer set를 선발하기 위해 설계한 21가지 primer 조합들로 1차 선 발을 진행한 결과, one-step과 two-step RT-PCR 모두에서 밴드가 형성된 것은 조합 1(CNF_N10/C60, 288 bp), 조합 2(CNF_N10/C50, 379 bp), 조합 3(CNF_N10/C40, 447 bp), 조합 7(CNF_N20/C50, 327 bp), 조합 8(CNF_N20/C40, 395 bp), 조합 12(CNF_N30/C30, 334 bp) 및 조합 18(CNF_N50/C20, 293 bp)로 7가지 조합이 선발되었다(Fig. 1A). CRSV의 최적 진단용 primer set를 선발하기 위해 설계한 54가지 조합들로 1차 선 발을 진행한 결과, one-step과 two-step RT-PCR 모두에서 좋은 결과를 나타낸 밴드는 조합 2(CRS_N10/C80, 435 bp), 조합 3(CRS_N10/C70, 518 bp), 조합 27(CRS_N40/C70, 294 bp), 조합 28(CRS_N40/C60, 365 bp), 조합 29(CRS_N40/C50, 457 bp), 조합 46(CRS_N70/C30, 564 bp), 조합 49(CRS_N80/C30, 395 bp), 조합 50(CRS_N80/C20, 503 bp) 및 조합 54(CRS_N08/C70, 547 bp)로 9가지가 선발되었다(Fig. 1B). 염기서열 유사 바이러스와 유연관계 바이러스에서의 비 특이적인 밴드가 나타나는 primer 조합을 제외하기 위한 2, 3차 선 발에서 CNFV의 조합들은 ArMV와 CRSV에 비 특이적인 밴드를 형성하지 않아 7가지 모두 선발하였으나(Fig. 2A), CRSV는 3차 선 발 중 ArMV에서 조합 28과 46 및 49에서 비특이적인 밴드가 형성되어 이를 제외시킨 6가지 조합을 선발하였다(Fig. 2B). 기주 genomic DNA와의 비특이적 반응여부를 확인하는 4차 선 발에서 CNFV의 7가지 조합들은 카네이션의 genomic DNA와 비특이

(A)

(B)

Fig. 1. First selection of specific primer sets for the detection of CNFV and CRSV. (A) CNFV. M, 100 bp step DNA Ladder maker (Genepia, Korea); lane 1–42, two-step. RT-PCR (template 1 μl and 3 μl); lane 43–63, one-step RT-PCR (set #1–21). Lane 1–2, set #1; 3–4, set #2; 5–6, set #3; 7–8, set #4; 9–10, set #5; 11–12, set #6; 13–14, set #7; 15–16, set #8; 17–18, set #9; 19–20, set #10; 21–22, set #11; 23–24, set #12; 25–26, set #13; 27–28, set #14; 29–30, set #15; 31–32, set #16; 33–34, set #17; 35–36, set #18; 37–38, set #19; 39–40, set #20; 41–42, set #21. (B) CRSV. M, 100 bp step DNA Ladder maker; lane 1–54, two-step RT-PCR; lane 55–108, one-step RT-PCR.

적인 밴드를 형성하지 않았으며, CRSV의 7가지 조합들 역시 카네이션과 금낭화에서도 CRSV를 선발하기 위한 primer 조합들은 비특이적인 밴드를 형성하지 않았다(data not shown).

효율성 검증. 4단계 선 발을 거친 CNFV 조합 7가지 모두와 CRSV 조합 6가지 중 nested primer 조합을 많이

Fig. 2. Second and third selection of primer sets to detect CNFV and CRSV. (A) CNFV. M, 100 bp step DNA Ladder maker; lane 1·8·15, primer set #1; lane 2·9·16, primer set #2; lane 3·10·17, primer set #3; lane 4·11·18, primer set #7; lane 5·12·19, primer set #8; lane 6·13·20, primer set #12; lane 7·14·21, primer set #18. (B) CRSV. M, 100 bp step DNA Ladder maker; lane 1·10·19·28·37, primer set #2; lane 2·11·20·29·38, primer set #3; lane 3·12·21·30·39, primer set #27; lane 4·13·22·31·40, primer set #28; lane 5·14·23·32·41, primer set #29; lane 6·15·24·33·42, primer set #46; lane 7·16·25·34·43, primer set #49; lane 8·17·26·35·44, primer set #50; lane 9·18·27·36·45, primer set #54.

만들 수 있는 조합 2가지를 대상으로 희석한계 실험을 실시하였다. 실험 결과, CNFV primer 조합 1, 3 및 18에서 10^{-2} 의 민감도를 보였고, 나머지 조합들은 모두 10^{-1} 이하의 민감도를 보였으며(Fig. 3A), CRSV는 조합 50과 54에서 각각 10^{-3} 과 10^{-4} 의 민감도를 보였다(Fig. 3B).

Nested PCR primer 선발. 선발된 CNFV 조합 1, 3 및 18에 대하여 각각 3가지, 7가지 및 2가지의 nested primer 조합을 설계하였고, CRSV 조합 50과 54에 대하여 각각 4가지와 13가지의 nested primer 조합을 설계하였다. 설계

한 모든 조합에서 밴드가 형성되었으며, 일부 흐리거나 target 하는 크기에 맞지 않거나 비특이적인 밴드도 나타났다(Fig. 4). Nested PCR primer는 밴드의 밝기와 두께, 비특이적인 밴드의 유무, primer set와의 사이즈 차이 등을 고려하여 최종 선발하였다(Table 2). 최종 선발된 nested PCR primer set는 CNFV의 경우 두 개의 primer set 공통으로 CNF_N10/C70 (147 bp)이 선발되었고, CRSV의 경우 조합 50에 대해서는 CRS_N80/C30 (395 bp)이, primer set 54에 대해서는 CRS_N30/C70 (347 bp)이 선발되었다.

Fig. 3. PCR sensitivity test for the detection of CNFV and CRSV. (A) CNFV. lane 1–9, primer set #1; lane 10–18, primer set #2; lane 19–27, primer set #3; lane 28–36, primer set #7; lane 37–45, primer set #8; lane 46–54, primer set #12; lane 55–63, primer set #18. (B) CRSV. lane 64–72, primer set #50; lane 73–81, primer set #54.

Fig. 4. Specificity test of nested PCR detect for CNFV and CRSV. Circle, final selected nested primer sets.

Table 2. Final selection and nested primer sets to detect CNFV and CRSV

Virus	Final selection primer sets			Nested primer sets			Mutation positive control (bp)
	Upstream	Downstream	Length (bp)	Upstream	Downstream	Length (bp)	
CNFV	CNF_N10	CNF_C60	288	CNF_N10	CNF_C70	147	CNF_N10/C30 (616)
	CNF_N10	CNF_C40	447	CNF_N10	CNF_C70	147	
CRSV	CRS_N80	CRS_C20	503	CRS_N80	CRS_C30	395	CRS_N08/C19 (1,337)
	CRS_N08	CRS_C70	549	CRS_N30	CRS_C70	347	

Table 3. Sequence information of final selection and nested primer sets

Primer		Sequence	Size (bp)	Length (bp)
CNFV #1	CNF_N10	5'-TTG CGT CAA CAG GAT TCC-3'	18	288
	CNF_C60	5'-GGC GTA AGT GTA AAT ACC TTG C-3'	22	
CNFV #3	CNF_N10	5'-TTG CGT CAA CAG GAT TCC-3'	18	447
	CNF_C40	5'-ATT GTA ACC ACT CAA GGT GAC G-3'	22	
CNFV #1,3 nested	CNF_N10	5'-TTG CGT CAA CAG GAT TCC-3'	18	147
	CNF_C70	5'-AAC CCA TCT CTTGAG GTC G-3'	20	
CRSV #50	CRS_N80	5'-CAG ACA GCA TAC TGG GAT G-3'	18	503
	CRS_C20	5'-GGT TCT CGT CTC CTA AGG TAA G-3'	22	
CRSV #54	CRS_N08	5'-TAC TTC AGG GCA TTC GGT-3'	18	549
	CRS_C70	5'-AGT CTC TGT CCC ACA TCA GT-3'	20	
CRSV #50 nested	CRS_N80	5'-CAG ACA GCA TAC TGG GAT G-3'	19	395
	CRS_C30	5'-AAC TTT GTT GGC GGC TAC-3'	18	
CRSV #54 nested	CRS_N30	5'-GCC TAA ACA GCG TCA GAA-3'	18	347
	CRS_C70	5'-AGT CTC TGT CCC ACA TCA GT-3'	20

Fig. 5. *Xho* I restriction enzyme to cut mutation-positive plasmid. The digestion products were analyzed on a 1.2% agarose gel post prestained with ethidium bromide. (A) CNFV. M, 100 bp step DNA Ladder maker; lane 1–4, control; lane 5–8, results. (B) CRSV. M, 100 bp step DNA Ladder maker; lane 1–4, control; lane 5–8, results.

Primer set와 nested primer set의 자세한 정보는 Table 3에 기재하였다.

염기서열 분석과 돌연변이-양성대조구 제작. 양성대조구 제작을 위해 primer set가 제작된 영역을 포함하는 부분인 CNFV 610 bp와 CRSV 1331 bp의 밴드를 증폭시켜 클로닝 후 염기서열을 분석한 결과, 모두 binding site가 확인되었다(data not shown). 돌연변이-양성대조구는 염기서열을 삽입 후 제한 효소 *Xho* I을 처리하여 확인한 결과, 6개의 nucleotide가 삽입되어 각각 616 bp와 1,337 bp가 증폭되었으며, plasmid에 제한 효소 염기서열의 삽입은 CNFV(Fig. 5A)와 CRSV(Fig. 5B)에서 각각 확인하였다.

고 찰

카네이션은 1996년부터 2012년까지 17년간, 종자 6건(1,000 kg 미만), 묘 1,413건(75,154,600개), 삽수 103건(4,700 kg + 317,710개) 및 절화 1,632건(333,390 kg + 84,612,770개)의 수입검사가 이루어졌다(Pest information system, 농림검역검사본부 인트라넷; <http://10.110.128.100>). 이 중 묘에서 *Fusarium moniliforme*, *Alternaria alternata*,

Uromyces dianthi, *Cladosporium echinulatum*, *Stemphylium botryosum* 및 *Botrytis cinerea*와 같은 곰팡이 6종, 9건과 절화에서 *Uromyces dianthi*, *Cladosporium echinulatum*, *Alternaria dianthi*, *Cladosporium herbarum*, *Stemphylium botryosum*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Epicoccum purpurascens* 및 *Fusarium avenaceum*과 같은 곰팡이 10종 185건 등 많은 곰팡이 검출 실적을 보였다. 반면, 지난 17년간 CNFV와 CRSV는 각각 1,968,830건의 검사가 이루어 졌으나, 이를 포함하여 바이러스가 검출되어 검역처분을 한 경우는 아직 한 번도 없었다.

한편, 카네이션에서 CRSV를 진단하기 위한 non-isotopic molecular hybridization 방법은 연구된 적이 있었지만 (Sánchez-Navarro 등, 1999), CNFV와 CRSV를 진단하기 위한 2단계 PCR 검사법은 연구되지 않았다. 따라서 2011년까지 국내 수입되는 카네이션 시료에서 CNFV와 CRSV의 검사는 모두 ELISA로 이루어졌다. 검사에 많은 시간이 소요되며, 민감도가 낮다는 문제점이 있는 ELISA는 (Caruso 등, 2003; Priou 등, 2006) 최근에 2단계 PCR 검사방법(RT-PCR과 nested PCR)으로 대체되었으며, 2012년부터는 본 연구에서 개발한 검사 방법을 도입하여 CNFV와 CRSV를 검사하고 있다.

최근 Real-time PCR이나 Loop-mediated isothermal (LAMP) PCR 등과 같은 다양한 방법들이 등장하였다(Cho 등, 2012; Lu 등, 2012; Meng 등, 2012; Pan 등, 2012). 하지만 Real-time PCR은 비용이 많이 들고, 특별한 probe를 제작해야 하며, 실험실 오염문제로 짧은 증폭부위 때문에 아직은 검역적 진단법으로 아직 사용하지 못하고 있으며, LAMP PCR 또한 너무 예민한 민감도에 따른 거짓양성 반응 때문에 검역검사 방법으로는 사용하지 못하고 있는 실정이다.

본 연구에서는 CNFV와 CRSV에 종특이적인 염기서열을 이용하여 RT-PCR과 nested PCR을 위한 primer set과 실험 시 양성대조기로 사용할 수 있는 돌연변이-양성대조기를 고안하였다. 돌연변이-양성대조기는 실험 시 양성대조기로 사용될 것이며, 염기서열을 분석하면 6개의 염기서열 삽입 유무에 따라 plasmid에서 시료로부터의 오염을 확인할 수 있을 것이다. 본 연구에서 개발한 방법이 카네이션 절화, 종자, 묘, 삽수 등 수입검역 시료에서 CNFV와 CRSV를 신속, 정확 그리고 특이적으로 검출 가능하여 검역검사에 기여할 것이라고 예상된다.

요 약

카네이션은 세계 3대 절화용 화훼작물의 하나로, 농가

생산액 210억 원에 이르는 주요작물이다. 이들은 절화, 종자, 묘 및 삽수의 4 품목으로 수출입 되고 있다. 카네이션과 같은 영양번식성 작물의 경우, 증식하는 과정 중에 바이러스의 확산과 전파가 용이한데, 우리나라에서는 카네이션괴저바이러스(CNFV)와 카네이션등근반점바이러스(CRSV)를 식물검역 바이러스로 지정하여 수입검사를 수행하고 있다. 본 연구에서는 CNFV와 CRSV를 신속, 정밀하고 쉽게 진단할 수 있는 특이적인 프라이머를 고안하였으며, 높은 검출 감도를 가지는 nested 프라이머 조합을 개발하였다. CNFV를 검사하기 위해 최종 선발된 특이적인 프라이머는 2 세트로 288과 447 bp를, CRSV를 검사하기 위해 최종 선발된 특이적인 프라이머는 2 세트로 503과 549 bp를 증폭하였다. CNFV의 nested는 2 세트 모두 147 bp로 동일하며, CRSV는 각각 395와 347 bp의 밴드를 증폭하였다. 또한, 실험의 신뢰도를 높이기 위하여, 증폭산물에 염기서열 6개를 삽입한 플라스미드를 제작하여 양성대조기로 활용하였다. 본 연구에서 개발한 방법은, 향후 CNFV와 CRSV에 대한 신속, 정밀한 국경 검역을 지원할 수 있을 것이라고 기대된다.

References

- Caruso, P., Bertolini, E., Cambra, M. and López, M. M. 2003. A new and sensitive co-operational polymerase chain reaction for rapid detection of *Ralstonia solanacearum* in water. *J. Microbiol. Method.* 55: 257-272.
- Cho, M. S., Park, D. S., Lee, J. W., Chi, H. Y., Sohn, S. I., Jeon, B. K. and Ma, J. B. 2012. Quantitative real-time PCR assay for detection of *Paenibacillus polymyxa* using membrane-fusion protein-based primers. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22: 1575-1579.
- Hollings, M. and Stone, O. M. 1964. Investigation of carnation viruses. I. Carnation mottle. *Ann. Appl. Biol.* 53: 103-118.
- Kang, C. H., Han, B. S., Kwon, S. H. and Song, Y. J. 2011. Selection of suitable varieties of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) and optimization of culture conditions for efficient tissue culture. *Korean J. Plant Res.* 24: 121-129. (In Korean)
- Kim, D., Hyun, J., Hwang, H. and Lee, S. 2000. RT-PCR Detection of *Citrus tristeza virus* from early Satsuma mandarin and Yuzu in Cheju Island. *Plant Pathology J.* 16: 48-51.
- Kim, Y. J., Park, S., Yie, S. W. and Kim, K. H. 2005. RT-PCR Detection of dsRNA Mycoviruses Infecting *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus blazei* Murrill. *Plant Pathology J.* 21: 343-348.
- Kim, Y. S., Jeong, J. H. and Eun, J. S. 2004. Virus free healthy plant production through meristem culture in carnation

- (*Dianthus caryophyllus*). *Korean J. Plant Res.* 17: 331–338. (In Korean)
- Lee, J. S., Cho, W. K., Choi, H. S. and Kim, K. H. 2011a. RT-PCR Detection of Five Quarantine Plant RNA Viruses Belonging to Poty- and Tospoviruses. *Plant Pathology J.* 27: 291–296.
- Lee, J. S., Cho, W. K., Lee, S. H., Choi, H. S. and Kim, K. H. 2011b. Development of RT-PCR based method for detecting five non-reported quarantine plant viruses infecting the family *Cucurbitaceae* or *Solanaceae*. *Plant Pathology J.* 27: 93–97.
- Lu, X., Li, X., Mo, Z., Jin, F., Wang, B., Zhao, H., Shan, X. and Shi, L. 2012. Rapid identification of *Chikungunya* and *Dengue virus* by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification method. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 87: 947–953.
- Meng, S., Xu, J., Xiong, Y. and Ye, C. 2012. Rapid and sensitive detection of *Plesiomonas shigelloides* by loop-mediated isothermal amplification of the *hugA* gene. *PLoS One* 7: 1–6.
- Nelson, M. and McClelland, M. 1992. Use of DNA methyltransferase/endonuclease enzyme combinations for megabase mapping of chromosomes. *Methods Enzymol.* 216: 279–303.
- Pan, L., Zhang, L., Wang, G. and Liu, Q. 2012. Rapid, simple, and sensitive detection of the *ompB* gene of spotted fever group rickettsiae by loop-mediated isothermal amplification. *BMC Infect Dis.* 12: 254–260.
- Pan, Y. B., Burner, D. M. and Legendre, B. L. 2000. An assessment of the phylogenetic relationship among sugarcane and related taxa based on the nucleotide sequence of 5S rRNA intergenic spacers. *Genetica* 108: 285–295.
- Park, M. R. and Kim, K. H. 2004. RT-PCR Detection of three non-reported fruit tree viruses useful for quarantine purpose in Korea. *Plant Pathology J.* 20: 147–154.
- Priou, S., Gutarra, L. and Aley, P. 2006. An improved enrichment broth for the sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* (biovars 1 and 2A) in soil using DAS-ELISA. *Plant Pathology J.* 55: 36–45.
- Sánchez-Navarro, J. A., Cañizares, M. C., Cano, E. A. and Pallás, V. 1999. Simultaneous detection of five carnation viruses by non-isotopic molecular hybridization. *J. Virol. Method.* 82: 167–175.
- Woo, G. J., Park, S. H., Lee, D. H., Lee, W. Y., Lee, S. H., Park, Y. C., Kwak, H. S., Kang, Y. S., Park, J. S., Nam, B. S. and Kim, C. N. 2002. Establishment of the detection methods for genetically modified foods. *Annu. Rep. KFDA.*
- Zukker, A., Ahroni, T., Tzfira, T., Ben-Mier, H. and Vainstein, A. 1999. Wounding by bombardment yields highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Mol. Breeding* 5: 367–375.