

Note Open Access

RT-PCR과 nested PCR을 이용한 *Nepovirus*속 식물검역 바이러스 4종의 정밀진단

이시원^{1,2} · 강은하^{1,3} · 신용길^{1*} · 이수현^{4,5**}

¹농림축산검역본부 식물검역기술개발센터, ²단국대학교 미생물학과, ³성균관대학교 유전공학과, ⁴경북대학교 응용생명과학부, ⁵경북대학교 식물의학연구소

Development of RT-PCR and Nested PCR for Detecting Four Quarantine Plant Viruses Belonging to *Nepovirus*

Siwon Lee^{1,2}, Eun-Ha Kang^{1,3}, Yong-Gil Shin^{1*} and Su-Heon Lee^{4,5**}

¹Plant Quarantine Technology Center, Animal and Plant Quarantine Agency, Suwon 443-440, Korea

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

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

⁴School of Applied Biosciences, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

⁵Institute of Plant Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

(Received on March 25, 2013; Revised on September 13, 2013; Accepted on September 17, 2013)

For quarantine purpose, we developed the RT- and nested PCR module of *Tomato black ring virus* (TBRV), *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV), *Cherry leafroll virus* (CLRV) and *Grapevine fanleaf virus* (GFLV). The PCR modules, developed in this study make diagnosis more convenient and speedy because of same PCR condition. And also, the methods are more accurate because it can check whether the result is contamination or not using the mutation-positive control. We discard or return the 27 cases of *Nepovirus* infection seed by employing the module past 3 years. This study provides a rapid and useful method for detection of four quarantine plant viruses.

Keywords : Detection, *Nepovirus*, Nested PCR, Quarantine, RT-PCR

최근 세계의 기후변화는 농업과 생태계를 포함하는 우리의 환경체계에 영향을 미치고 있으며, 평균 기온의 지속적 증가에 따라 바이러스를 매개하는 곤충이 늘어나고, 식물바이러스 병이 확산되고 있는 추세이다(Garrett 등, 2006). 또한 자유무역의 영향으로 다양한 종류의 식물들이 국내로 수입되고 있으며, 그에 따라 잠재적 또는 동정되지 않은 병원성 식물바이러스들이 농작물, 사료, 견목, 종자, 야채, 과일 및 한약재를 통해서 함께 수입될 가능성이 높아지고 있다. 검역병원체의 지정은 식물을 자연

기주로 하는 병원체로, 국내에 분포하지 않는 병원체 중 검역적 위험도가 높은 병원체를 매년 위험도평가를 거쳐 정도에 따라 ‘금지급’, ‘관리급’ 및 ‘규제비검역’으로 구분하여 총 100종으로 관리하고 있다(Animal, Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency, 2013).

우리는 이 중 *Nepovirus*속 4종의 식물검역 바이러스, *Tomato black ring virus* (TBRV), *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV), *Cherry leafroll virus* (CLRV) 및 *Grapevine fanleaf virus* (GFLV)를 선택하였다. TBRV는 약 28 nm의 지름을 가지는 구형의 바이러스로(Murant, 1970), 선충을 벡터로 산딸기, 딸기 및 복숭아 일부 품종에 감염된다. ArMV는 약 30 nm의 지름을 가지고 있고(Francki 등, 1985), 자연 상태에서 기주 범위가 매우 넓어 채소 및 과수 등 다양한 작물에 발생하며, 국내에서는 딸기 바이러스병 진단을 위한 프라이머가 개발되어 있다(Choi 등, 2009). CLRV는

*Corresponding author

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

E-mail) syg1286@korea.kr

**Corresponding author

Phone) +82-53-950-5763, Fax) +82-53-950-6758

E-mail) suheon@knu.ac.kr

약 28 nm의 지름을 가지고 있고, 주로 즙액, 접목, 종자 및 선충에 의해 전염된다. 자연 상태에서 대부분의 기주는 체리 등의 목본식물과 완두 등의 콩과 작물과 관련이 있으며, 실험적 기주 범위는 36개 과(family) 이상의 넓은 기주를 가지고 있다. GFLV는 약 30 nm의 지름을 가지는 구형바이러스로 자연상태에서 주요 기주는 포도속 식물과 관련이 있으나, 콩과를 비롯한 등 다양한 기주를 가지

는 것으로 알려져 있다.

Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)는 항원 또는 항체를 색의 변화로 측정, 진단하는 방법으로 1977년 식물바이러스 검정에 처음 사용되었으며(Clark과 Adams, 1977), 검사의 정확성과 간편성으로 식물검역 바이러스 검사법으로 오랫동안 사용되었다. 그러나 검사과정에 소요되는 시간, 낮은 민감도 및 거짓양성반응 등의 문제점

Table 1. List of plant viruses used in this study

Virus	Genus	Family	Type
<i>Tomato black ring virus</i> (TBRV)	<i>Nepovirus</i>	<i>Secoviridae</i>	Tissue and RNA
<i>Arabid mosaic virus</i> (ArMV)	<i>Nepovirus</i>	<i>Secoviridae</i>	Tissue and RNA
<i>Cherry leaf roll virus</i> (CLRV)	<i>Nepovirus</i>	<i>Secoviridae</i>	Tissue and RNA
<i>Grapevine fanleaf virus</i> (GFLV)	<i>Nepovirus</i>	<i>Secoviridae</i>	Tissue and RNA
<i>Alfalfa mosaic virus</i> (AMV)	<i>Alfavirus</i>	<i>Bromoviridae</i>	cDNA sample
<i>Bean common mosaic virus</i> (BCMV)	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	cDNA sample
<i>Bean yellow mosaic virus</i> (BYMV)	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	cDNA sample
<i>Broad bean wilt virus 2</i> (BBWV 2)	<i>Fabavirus</i>	<i>Secoviridae</i>	cDNA sample
<i>Broad bean wilt virus</i> (BBWV)	<i>Fabavirus</i>	<i>Secoviridae</i>	cDNA sample
<i>Carnation mottle virus</i> (CarMV)	<i>Carmovirus</i>	<i>Tombusviridae</i>	cDNA sample
<i>Cowpea chlorotic mottle virus</i> (CCMV)	<i>Bromovirus</i>	<i>Bromoviridae</i>	cDNA sample
<i>Cowpea mild mottle virus</i> (CPMMV)	<i>Carmovirus</i>	<i>Tombusviridae</i>	cDNA sample
<i>Cowpea mosaic virus</i> (CPMV)	<i>Comovirus</i>	<i>Secoviridae</i>	cDNA sample
<i>Cowpea severe mosaic virus</i> (CPSMV)	<i>Comovirus</i>	<i>Secoviridae</i>	cDNA sample
<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i> (CGMMV)	<i>Tobamovirus</i>	<i>Virgaviridae</i>	cDNA sample
<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	<i>Cucumovirus</i>	<i>Bromoviridae</i>	cDNA sample
<i>Cucumber necrosis virus</i> (CNV)	<i>Tobamovirus</i>	<i>Virgaviridae</i>	cDNA sample
<i>Cymbidium ringspot virus</i> (CymRSV)	<i>Tobamovirus</i>	<i>Virgaviridae</i>	cDNA sample
<i>Kyuri green mottle mosaic virus</i> (KGMMV)	<i>Tobamovirus</i>	<i>Virgaviridae</i>	cDNA sample
<i>Lettuce mosaic virus</i> (LMV)	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	cDNA sample
<i>Prune dwarf virus</i> (PDV)	<i>Ilarvirus</i>	<i>Bromoviridae</i>	cDNA sample
<i>Pepper mottle virus</i> (PepMoV)	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	cDNA sample
<i>Pepper veinal mottle virus</i> (PYMV)	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	cDNA sample
<i>Raspberry ringspot virus</i> (RpRSV)	<i>Nepovirus</i>	<i>Secoviridae</i>	cDNA sample
<i>Ribgrass mosaic virus</i> (RMV)	<i>Tobamovirus</i>	<i>Virgaviridae</i>	cDNA sample
<i>Soybean mosaic virus</i> (SMV)	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	cDNA sample
<i>Squash mosaic virus</i> (SqMV)	<i>Comovirus</i>	<i>Secoviridae</i>	cDNA sample
<i>Tomato bushy stunt virus</i> (TBSV)	<i>Tobamovirus</i>	<i>Virgaviridae</i>	cDNA sample
<i>Tobacco mild green mosaic virus</i> (TMGMV)	<i>Tobamovirus</i>	<i>Virgaviridae</i>	cDNA sample
<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV)	<i>Tobamovirus</i>	<i>Virgaviridae</i>	cDNA sample
<i>Tobacco necrosis virus</i> (TNV)	<i>Necrovirus</i>	<i>Tombusviridae</i>	cDNA sample
<i>Tomato mosaic virus</i> (ToMV)	<i>Tobamovirus</i>	<i>Virgaviridae</i>	cDNA sample
<i>Tomato ringspot virus</i> (ToRSV)	<i>Nepovirus</i>	<i>Secoviridae</i>	cDNA sample
<i>Tobacco ringspot virus</i> (TRSV)	<i>Nepovirus</i>	<i>Secoviridae</i>	cDNA sample
<i>Tobacco rattle virus</i> (TRV)	<i>Tobamovirus</i>	<i>Virgaviridae</i>	cDNA sample
<i>Tobacco streak virus</i> (TSV)	<i>Ilarvirus</i>	<i>Bromoviridae</i>	cDNA sample
<i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV)	<i>Tospovirus</i>	<i>Bunyaviridae</i>	cDNA sample
<i>Turnip mosaic virus</i> (TuMV)	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	cDNA sample

이 발견되었으며(Caruso 등, 2003; Priou 등, 2006) 최근에는 항혈청검사법이 핵산검사법으로 변화되고 있는 추세이다(Kim 등, 2000; Kim 등, 2005; Lee 등, 2011a, 2011b; Park 등, 2004). 따라서 본 연구에서는 식물검역 *Nepovirus*속 4종의 바이러스들을 RT-PCR과 nested PCR을 사용하여, 신속하고 정확하게 진단 할 수 있는 방법을 개발하였다.

검사법 개발대상 바이러스(TBRV, ArMV, CLRV 및 GFLV) 4종이 감염되어 있는 식물의 조직을 국립식물검역원(현 농림축산검역본부)의 금지품 수입허가를 통해 수

입하였다(ADGEN, England). 실험에 사용된 *Alfalfa mosaic virus*(AMV)의 34종의 cDNA는 국내 기업(PLUTOS, Korea)에서 구매하여 실험에 활용하였으며(Table 1), 모든 시료들은 -80°C 초저온 냉동고에 보관하였다.

식물검역 바이러스 4종의 진단용 프라이머를 설계하기 위하여, 미국 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information)로부터 검사법 개발 대상 바이러스인 TBRV(AY157994), ArMV(NC_006056), CLRV(S84125) 및 GFLV(NC_003623)와 각각의 바이러스와 분류학적으로 유사한 바이러스들의 염기서열을 다운로드 하

Table 2. Sequence information of final selection and nested primer sets used in this study

Primer		Sequence	Length (bp)	Expected size (bp)
TBRV #1	TBR-C30	5'-TGC CAG CCT CAA CGA AAT C-3'	19	510
	TBR-N40	5'-ACT GTG TTA AAT CGC CCG CA-3'	20	
TBRV #2	TBR-C70	5'-AGA TGC ACG GGG AGA TAA CT-3'	20	662
	TBR-N20	5'-GCA GTC TGT TCA CCT GCG-3'	18	
#1 nested	TBRN-C30	5'-CAA CRG CAG TGA TTC CAA ACA T-3'	22	313
	TBRN-N40	5'-TGG AAR GAG GCA AAG TCT GT-3'	20	
#2 nested	TBRN-C70	5'-TTC CAT CCC GCT TCA GCA AGT-3'	21	307
	TBRN-N20	5'-AGT TTG TCG AGG GTT CTG A-3'	18	
ArMV #1	ArM-C32	5'-ATT GGG GAA GGA CGG AAC AGA AAG A-3'	25	773
	ArM-N24	5'-CCC TTT CGG TCC CTC ATT GGC T-3'	22	
ArMV #2	ArM-C29	5'-GAC CCC GTT CCA TTC ACT A-3'	19	780
	ArM-N30	5'-AAC GCG GGG TCT TGC TGG TA-3'	20	
#1 nested	ArM-C29	5'-GAC CCC GTT CCA TTC ACT A-3'	19	385
	ArM-N25	5'-TGC CTC ACT GGA AAT AAC A-3'	19	
#2 nested	ArM-C28	5'-ACT CTT AGG ACT ATG CCT AAG T-3'	22	487
	ArM-N24	5'-CCC TTT CGG TCC CTC ATT GGC T-3'	22	
CLRV #1	CLR-C10	5'-GGA AAG ATT ACG TAA AAG GAA AAC-3'	24	673
	CLR-N60	5'-GGT TTT CAG CCC AGG KYA GTC TT-3'	23	
CLRV #2	CLR-C25	5'-CTT GCT AAC GCT ATC TAC CCA CAT-3'	24	633
	CLR-N50	5'-TCT GGC GGG AAT AGT GRA GGT C-3'	22	
#1 nested	CLR-C20	5'-AAA MMC GAT CGG GGC AAC AA-3'	20	313
	CLR-N80	5'-CAA TTC TGG CGA CCG TGT AAC-3'	21	
#2 nested	CLR-C30	5'-TRR RAT TCA AAG TCA CAG GTR TG-3'	23	479
	CLR-N62	5'-TCA GCC CAG GKY AGT CTT ATT TYA-3'	24	
GFLV #1	GFL-C30	5'-CTG CAA AAT TCC CAA CCA ACA ACT-3'	24	699
	GFL-N120	5'-GTT GTG TTT TGG GTA TGG GAG GTA-3'	24	
GFLV #2	GFL-C50	5'-TCA CCC GAA GGA GCG ATA GG-3'	20	582
	GFL-N100	5'-RTC TCC AAG GTT GCA TTT CAC R-3'	22	
#1 nested	GFL-C40	5'-ATT CGG TGT TCA GAC TCC AYT-3'	21	430
	GFL-N130	5'-CCC GGG GTG TAT GTG GAA GAG GAY-3'	24	
#2 nested	GFL-C60	5'-ACT TCC GTC CTC TTC CAC ATA CAC-3'	24	289
	GFL-N110	5'-TAC TTG CCC TCC CAT ATT CTT TGA-3'	24	

였다. 다운로드 한 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)(Table 2).

감염시료에서 total RNA의 추출과 기주의 genomic DNA 추출은 SolGent RNA mini prep kit(Solgent, Korea), RNA-spin™IIp RNA extraction kit(iNtRON, Korea) 및 DNeasy® Plant mini kit(Qiagen, Netherlands)를 사용하였다(Lee 등, In press). RT-PCR은 추출한 total RNA 1 µl를 주형으로, 설계된 정방향과 역방향 프라이머(25 pmol)를 각각 1 µl, DW(Sigma, USA) 7 µl 및 RT-PCR preMixture

(Plutos, Korea) 10 µl로 전체 20 µl로 수행하였다. PCR은 위에서 추출한 기주의 genomic DNA 1 µl를 주형으로 정방향과 역방향 프라이머(25 pmol)를 각각 1 µl, DW 7 µl 및 nested-PCR kit(Plutos, Korea) 10 µl로 전체 20 µl로 실시하였다. RT-PCR 조건은 42°C, 60분의 역전사 반응과 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 반응하였으며, PCR 조건은 RT-PCR의 역전사 반응을 제외한 나머지 반응과 같게 하였다. PCR 산물은 1X TAE buffer를 이용하여 1.2% agarose gel에서 80분 전기영동 후 ethidium bromide로 염

Table 3. Final selection and nested primer sets used in this study to detect 4 *Nepovirus* species

Virus ¹	Final selection primer sets			Nested primer sets			Positive control (bp)
	Upstream	Downstream	Length (bp)	Upstream	Downstream	Length (bp)	
TBRV	TBR-C30	TBR-N40	510	TBRN-C30	TBRN-N40	313	TBR-N20/C10 (2,999)
	TBR-C70	TBR-N20	662	TBRN-C70	TBRN-N20	307	
ArMV	ArM-C32	ArM-N24	773	ArM-C29	ArM-N25	385	ArM-N17/C32 (1,443)
	ArM-C29	ArM-N30	780	ArM-C28	ArM-N24	487	
CLRV	CLR-C10	CLR-N60	673	CLR-C20	CLR-N80	313	CLR-N10/C10 (1,497)
	CLR-C25	CLR-N50	633	CLR-C30	CLR-N62	479	
GFLV	GFL-C30	GFL-N120	699	GFL-C40	GFL-N130	430	GFL-N60/C10 (1,656)
	GFL-C50	GFL-N100	582	GFL-C60	GFL-N110	289	

¹TBRV: *Tomato black ring virus*, ArMV: *Arabis mosaic virus*, CLRV: *Cherry leafroll virus*, and GFLV: *Grapevine fanleaf virus*.

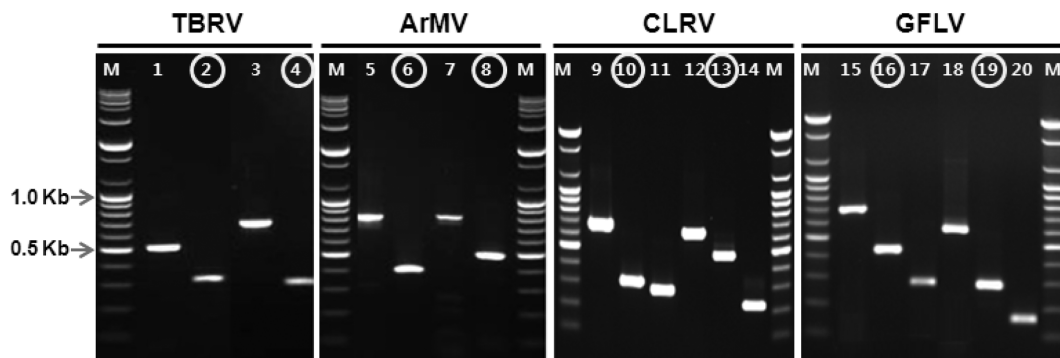


Fig. 1. Results of RT-PCR products and nested-PCR products. Circle, final selected nested primer pairs. M, 100 bp step DNA Ladder maker(Genepeia, Korea); lane 1, TBRV final selected primer set #5 (510 bp); lane 2, TBRV nested-PCR product from primer #5 (TBR-C30/N40, 313 bp); lane 3, TBRV final selected primer #18 (662 bp); lane 4, TBRV nested-PCR product from primer #18 (TBR-C70/N20, 317bp); lane 5, ArMV final selected primer #8 (773 bp); lane 6, ArMV nested-PCR product from primer #8 (ArM-C29/N25, 385 bp); lane 7, ArMV final selected primer #9 (780 bp); lane 8, ArMV nested-PCR product from primer #9 (ArM-C28/N24, 487 bp); lane 9, CLRV final selected primer #8 (673 bp); lane 10, CLRV nested-PCR product from primer #8 (CLR-C20/N80, 313 bp); lane 11, CLRV nested-PCR product from primer #8 (CLR-C24/N80, 280 bp); lane 12, CLRV final selected primer #44 (633 bp); lane 13, CLRV nested-PCR product from primer #44 (CLR-C30/N62, 479 bp); lane 14, CLRV nested-PCR product from primer #44 (CLR-C30/N80, 230 bp); lane 15, GFLV final selected primer #25 (699 bp); lane 16, GFLV nested-PCR product from primer #25 (GFLV-C40/N130, 430 bp); lane 17, GFLV nested-PCR product from primer #25 (GFLV-C40/N140, 280 bp); lane 18, GFLV final selected primer #42 (582 bp); lane 19, GFLV nested-PCR product from primer #42 (GFLV-C60/N110, 289 bp); lane 20, GFLV nested-PCR product from primer #42 (GFLV-C60/N120, 164 bp).

색하여 UV 하에서 확인하였다. PCR 증폭산물에 대한 nested 프라이머 조합을 설계하였으며, 1차 PCR 산물을 1/100 희석하여 1 μ l를 주형으로 사용하였고 나머지 조건은 위의 PCR 조건과 동일하게 반응하였다. 또한 최종 합격된 프라이머 조합의 민감도를 확인하기 위하여, total RNA를 원액- 10^{-7} 까지 희석하여 1 μ l를 주형으로 one-step RT-PCR로 반응하였다(Lee 등, 2013).

바이러스 별로 2 sets 씩의 RT-PCR을 선발하였으며, 이에 대한 nested 조합을 선발하였다. RT-PCR과 nested PCR 결과, TBRV(set 1, 510→313; set 2, 662→307 bp), ArMV(set 1, 773→385; set 2, 780→487 bp), CLRV(set 1, 673→313; set 2, 633→479 bp) 및 GFLV(set 1, 699→430; set 2, 582→289 bp)에 각각 특이적 밴드를 형성하였으며(Table 3, Fig. 1), 염기서열 유사 바이러스, 공통 기주에 감염 될 수 있는 바이러스 및 기주의 genomic DNA에서 비특이적인 반응이 나타나지 않았다(data not shown). 또한 RT-PCR 조합들은 TBRV(set 1, 10^{-3} ; set 2, 10^{-1}), ArMV(set 1, 10^{-3} ; set 2, 10^{-4}), CLRV(set 1, 10^{-5} ; set 2, 10^{-4}) 및 GFLV(set 1, 10^{-2} ; set 2, 10^{-3})의 민감도를 보였다(Fig. 2).

각각의 바이러스에 대하여 두 세트씩 선발된 프라이머 조합들을 모두 포함하는 PCR 산물을 증폭하였으며, 증폭산물은 TBRV(2,999 bp), ArMV(1,443 bp), CLRV(1,497 bp) 및 GFLV(1,656 bp)였다. 증폭산물을 insert DNA로 pGEM[®]-T Easy Vector를 사용하여 클로닝 하였다(Promega, USA). 양성대조구로 선발된 클론을 대상으로, nested 프라이머 증폭부위 안쪽으로 제한효소인 *Xho* I이 반응할 수 있는 염기서열(CTCGAG, 6 bp)을 Site-Directed Mutagenesis Kit를 사용하여 삽입하였다(Nelson과 McClelland, 1992).

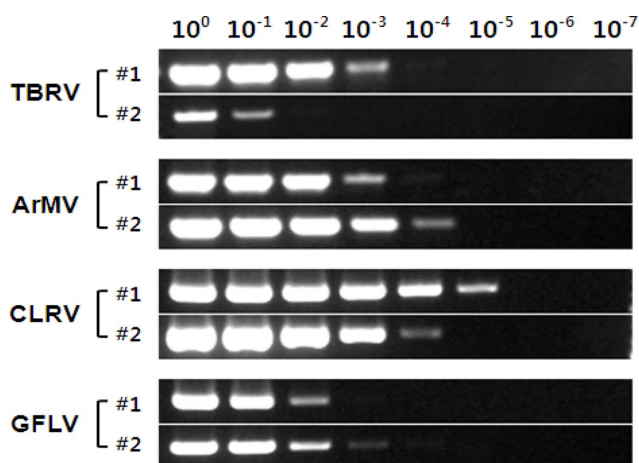


Fig. 2. PCR sensitivity test for the detection of four quarantine viruses.

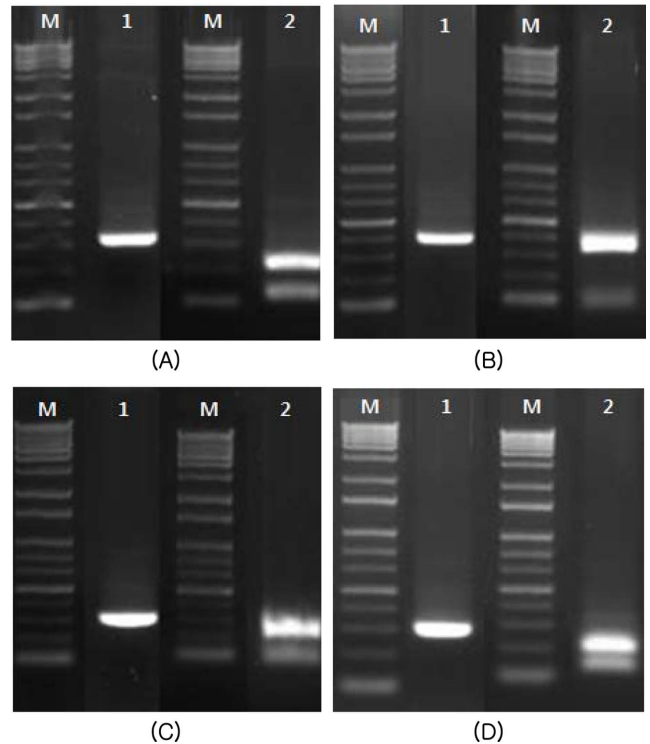


Fig. 3. *Xho* I restriction enzyme to cut mutation-positive plasmid. The digestion products were analyzed on a 1.2% agarose gel prestained with ethidium bromide. (A) Lane M, Maker; lane 1, TBRV nested PCR product for mutation-positive plasmid; Lane 2, Result of restriction enzyme *Xho* I treatment. (B) Lane M, Maker; lane 1, ArMV nested PCR product for mutation-positive plasmid; Lane 2, Result of restriction enzyme *Xho* I treatment. (C) Lane M, Maker; lane 1, CLRV nested PCR product for mutation-positive plasmid; Lane 2, Result of restriction enzyme *Xho* I treatment. (D) Lane M, Maker; lane 1, GFLV nested PCR product for mutation-positive plasmid; Lane 2, Result of restriction enzyme I treatment.

제작된 플라스미드는 염기서열 분석결과 프라이머 부착 부위가 확인되었으며(data not shown), 양성대조구로 사용할 돌연변이-양성대조구는, 제한 효소 *Xho* I을 처리하여 6개의 염기서열에 대한 삽입 여부를 확인하였다(Fig. 3).

본 연구에서 검사한 방법으로, 최근 3년(2010-2012년), 화물, 우편 및 휴대로 국내 유입된 식물에 대하여 검사를 진행 한 결과, TBRV(7건), ArMV(19건) 및 CLRV(1건) 검출되어 폐기 또는 반송되었으며, 최근 GFLV는 검출되지 않았으나 2007년 수입 콩 종자에서 2건이 검역된 사례가 있었다. TBRV는 양상추 종자에서 3건 검출 되었으며, 토마토 종자, 백일초 종자, 콩종자 및 고추종자에서 각각 1건씩 검출하였다. ArMV는 수선구근 8건, 중구용 쪽파 3건, 무수카리구근, 백합구근, 벨레발리아구근, 양상추 종자, 카마시아구근, 튜립구근, 하늘나리구근 및 히야신스

구근에서 1건씩 검출하였다. CLRV는 복숭아종자에서 1건 검출되어 검역처분하였다.

요 약

본 연구에서는 식물검역바이러스 4종(TBRV, ArMV, CLRV 및 GFLV)을 RT-PCR과 nested PCR 방법으로 진단 할 수 있는 방법을 개발하였다. 본 연구에서 개발한 방법은 모두 같은 PCR 조건으로 검사자에게 편리성과 신속성을 높여줄 뿐 아니라, 돌연변이-양성대조구의 사용으로 실험 오염여부를 확인할 수 있어 더욱 정확하다. 개발한 방법으로 최근 3년 *Nepovirus*속 4종의 바이러스를 검사한 결과, 27건을 검출하여 검역처분 하였다. 본 연구 결과들은 앞으로도 수출입 식물에서 해당 바이러스들을 신속, 정밀하게 진단할 수 있는 방법으로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

Acknowledgement

This study was supported by a grant (Project No. Z-1542051-2013-15-01) from Animal and Plant Quarantine Agency, Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Republic of Korea.

References

- Animal, Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency. 2013. List of plant quarantine viruses in Korea in newly revised in 2013. *Res. Plant Dis.* 19: 65–75. (In Korean)
- 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. Meth.* 55: 257–272.
- Choi, G. S., Lee, J. A., Cho, J. D., Chung, B. N., Cho, I. S. and Kim, J. S. 2009. Strawberry virus diseases occurring in Korea, 2007–2008. *Res. Plant Dis.* 15: 8–12. (In Korean)
- Clark, M. F. and Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475–483.
- Francki, R. I. B., Milne R. G. and Hatta, T. 1985. Atlas of plant viruses. Vol. II, pp. 23–38. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Garrett, K. A., Dendy, S. P., Frank, E. E., Rouse, M. N. and Travers, S. E. 2006. Climate change effects on plant disease: Genomes to ecosystems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 489–509.
- Kim, D., Hyun, J., Hwang, H. and Lee, S. 2000. RT-PCR Detection of *Citrus tristeza virus* from early Satsuma mandarin and 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.
- Lee, J. S., Cho, W. K., Lee, S. H., Choi, H. S. and Kim, K. H. 2011a. 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.
- Lee, J. S., Cho, W. K., Choi, H. S. and Kim, K. H. 2011b. RT-PCR Detection of Five Quarantine Plant RNA Viruses belonging to *Poty* and *Tospoviruses*. *Plant Pathology J.* 27: 291–296.
- Lee, S., Kang, E. H., Kim, Y. J., Kim, S. M. and Shin, Y. G. 2013. Detection of *Carnation necrotic fleck virus* and *Carnation ringspot virus* using RT-PCR. *Res. Plant Dis.* 19: 36–44. (In Korean)
- Murant, A. F. 1970. Tomato black ring virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No. 38. Association of Applied Biologists, Wellesbourne, UK.
- Nelson, M. and McClelland, M. 1992. Use of DNA methyltransferase/endonuclease enzyme combinations for megabase mapping of chromosomes. *Methods Enzymol.* 216: 279–303.
- Nelson, M. and McClelland, M. 1992. Use of DNA methyltransferase/endonuclease enzyme combinations for megabase mapping of chromosomes. *Methods Enzymol.* 216: 279–303.
- 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.