

Tomato ringspot virus 검역진단시스템 개발

이시원^{1†} · 노재영^{2†} · 김재현^{2*}¹국립환경과학원 환경기반연구부, ²단국대학교 미생물학과

접수일(2015년 5월 14일), 수정일(2015년 8월 10일), 게재확정일(2015년 8월 4일)

Development of Diagnostic System for Detecting *Tomato ringspot virus* in Quarantine

Siwon Lee^{1†} · Jae-Young Rho^{2†} · Jae-heon Kim^{*}¹Environmental Infrastructure Research Department, National Institute of Environmental Research, Incheon 22689, Korea²Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Dankook University, Cheonan 31116, Korea

Received: MAY. 14. 2015, Revised: AUG. 10. 2015, Accepted: AUG. 4. 2015

초록

Tomato ringspot virus (ToRSV)는 Group IV(+) sense ssRNA viruses, *Nepovirus*속으로 분류되며 식물병원성을 가진 국내 미보고 관리급 검역바이러스이다. 본 연구에서는 우리나라 검역현장에서 ToRSV를 검사하기 위한 reverse transcription(RT)-polymerase chain reaction(PCR)과 nested PCR 진단시스템을 개발하였다. ToRSV 특이적으로 진단할 수 있는 RT-PCR은 프라이머 조합9 (F120/R20, 549 bp)와 조합31(F60/R80, 741 bp)이며, 각각의 nested PCR 결과 439와 363 bp를 증폭할 수 있다. 한편, 본 연구에서 개발한 유전자변형-양성대조구는 실험실 오염으로 인한 거짓양성반응을 확인할 수 있다. 본 연구에서 개발한 ToRSV 검역진단시스템은 향후 식물검역에 기여할 것으로 기대된다.

검색어 - 검역, Nested PCR, RT-PCR, *Tomato ringspot virus*, ToRSV

ABSTRACT

Tomato ringspot virus(ToRSV) is a regulated plant quarantine pathogen, belongs to genus *Nepovirus*, group IV(+) sense ssRNA viruses. In this study, reverse transcription(RT)-polymerase chain reaction(PCR) and nested PCR for diagnostic system of detecting ToRSV is development in quarantine. Two RT-PCR primer pairs[pair 9(F120/R20, 549 bp) and pair 31(F60/R80, 741bp)] are selection for detecting ToRSV, and nested PCR products are amplification 439 and 363 bp from RT-PCR primer pair 9 and 31, respectively. In addition, modified-positive control plasmid is development. It is possible to proving laboratory contamination and false positive reactions for detecting ToRSV. The diagnostic system is expected to contributing to detecting ToRSV in plant quarantine.

Key words - Nested PCR, Quarantine, RT-PCR, *Tomato ringspot virus*, ToRSV

*Corresponding author: Jae-heon Kim

Tel: +82-41-550-3452

Fax: +82-41-550-3450

E-mail: jaehkim1@dankook.ac.kr

†These authors are equally contributed to this work.

I. 서론

Tomato ringspot virus(ToRSV)는 Group IV (+) sense ssRNA viruses, *Nepovirus*속으로 분류되는 식물병원성 바이러스로, 북미, 유럽, 아시아, 호주 및 남아프리카 등에서 보고되고 있다 (Stace-smith, 1994). 유럽 지중해 식물 보호 단체(EPPO)에 따르면 ToRSV는 매우 넓은 기주범위 (토마토, 담배, 오이, 동부, 딸기, 나무딸기, 산딸기, 구즈베리, 포도, 복숭아, 체리, 살구속, 건포도, 제라늄, 수국, 글라디올러스 및 미국물푸레나무 등)를 가지고 있어 위험한 식물병으로 분류하고 있다(OEPP/EPPO, 2005). ToRSV는 현재 국내 미 보고 바이러스로 국내유입 시 재배농가에 직접적 및 경제적 피해가 예상되어 국내에서도 관리급 검역바이러스로 지정되었다(Animal, Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency, 2013). 국내 검역현장에서는 ToRSV를 진단하기 위해 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 사용하였으나 거짓양성반응 및 낮은 검출감도 (Caruso et al., 2003; Shin, 2009)로 인하여, 많은 연구가 수행된 안정적인 polymerase chain reaction(PCR) 기반의 검사방법이 검토되었다(Shin, 2009). 또한 많은 연구자들에 의해 개발된 다원화된

PCR 조건을 하나로 맞춘 검사방법 및 유전자를 삽입한 유전자변형-양성대조구 플라스미드가 개발 (Lee et al., 2013^a; Lee & Shin, 2014; Lee et al., 2014)되어 현장에 적용되고있으나 ToRSV 검역 진단시스템은 국내에서는 아직까지 보고되지 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 검역현장에서 ToRSV를 검사하기 위한 reverse transcription (RT)-PCR, nested PCR 및 유전자변형-양성대조구 플라스미드를 개발하였다.

II. 재료 및 방법

2.1 시료수집 및 프라이머 제작

ToRSV와 유연관계가 있는 바이러스 6종[*Arabis mosaic virus*(ArMV), *Cherry leaf roll virus*(CLRV), *Grapevine fanleaf virus*(GFLV), *Raspberry ringspot virus*(RpRSV), *Tomato black ring virus*(TBRV) 및 *Tobacco ringspot virus*(TRSV)]과 동일한 숙주에 감염될 가능성이 있는 참고바이러스 6종[*Broad bean wilt virus* 2(BBWV2), *Bean common mosaic virus*(BCMV), *Tomato black ring virus*(TBRV), *Tobacco ringspot virus*(TRSV), *Tomato mosaic virus*

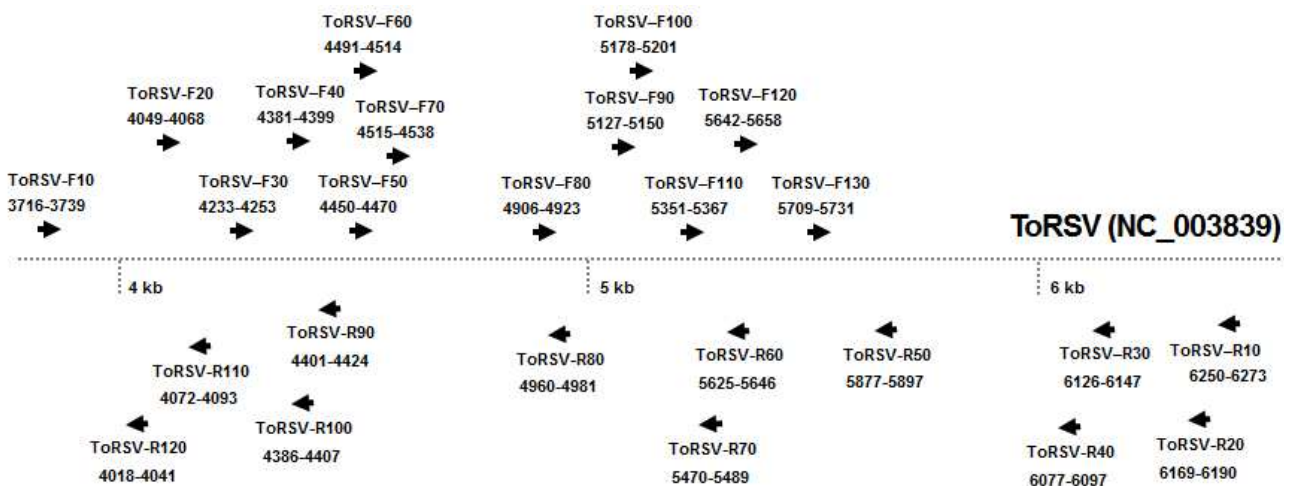


Fig. 1. Primers map for specific detection of ToRSV

(ToMV) 및 *Tomato spotted wilt virus*(TSWV)]의 RNA 및 cDNA를 식물바이러스은행과 농촌진흥청 농업과학원 등 유관기관을 통해 수집하였으며, 또는 바이러스가 spiking되어 있는 이병시료를 Bi-One Co.(Korea)를 통해 Adgen Co.(UK)에서 구매하였다.

한편 프라이머 제작을 위하여, 미국 국립생물정보센터로부터 ToRSV NC_003839(7,271bp)를 포함한 ToRSV strain 11종 및 Comoviridae에 속하는 참고바이러스 3종의 염기서열을 수집하였다 (data not shown). 수집한 염기서열을 DNAMAN DNA analysis software package(DNAMAN version 6.0; Lynnon Biosoft, Canada)를 사용하여, primer annealing 51-59°C 및 PCR 반응조건 55°C로 하는 국내 검역 바이러스 검사법(Lee et al., 2015)과 동일한 방법으로 ToRSV 특이 프라이머를 제작하였다 (Fig. 1).

2.2. 핵산추출 및 프라이머 선발

이병시료의 총 RNA 추출, cDNA 합성, RT-PCR 및 nested PCR의 Kit 사용, 조성 및 조건은 모두 이전에 보고된 식물검역바이러스 PCR 진단시스템과 동일하게 수행하였다(Lee et al., 2013^b). 또한 프라이머 선발은, 우선 설계한 RT-PCR 프라이머를 조합하여 PCR 증폭이 가능한 조합들을 구성한 후 다음의 선발 방식을 사용하였다. i) ToRSV 특이적 분석을 위하여, RT-PCR 프라이머 조합들을 대상으로 ToRSV의 RNA에 특이적 반응을 확인하였고, ii) 선발한 RT-PCR 프라이머 조합을 대상으로 참고바이러스주(유연관계 및 동일한 숙주에 감염될 수 있는 바이러스)에 비 특이적인 반응을 보이는 프라이머 조합을 제외하였으며, iii) 특이 및 비 특이적으로 선발한 RT-PCR 프라이머 조합을 대상으로, ToRSV RNA를 10⁻⁷까지 단계 희석하여 검출 한계실험을 수행하였다. iv) 최종적으로 2개의 RT-PCR 조합을 선발하였으며, 각각의 nested PCR을 설계 및 선발 하였다(Shin & Rho, 2014; Lee et al., 2015).

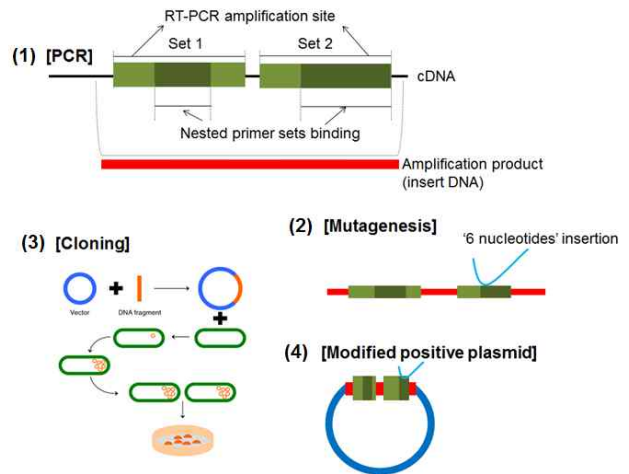


Fig. 2. Diagram of making for inserted positive control plasmid

2.3 유전자변형-양성대조구 플라스미드

ToRSV 검정에 양성대조구로 활용될 유전자변형-양성대조구 플라스미드를 제작하였다(Fig. 2). 최종적으로 선발된 2개의 RT-PCR 증폭 영역을 모두 포함하는 PCR 산물을 증폭시킨 후, 그것을 삽입 DNA로 사용하여 pGEM[®]-T Easy Vector(Promega, USA)에 결합한 뒤 대장균에 transformation하였다 (Lee & Rho, 2015). 이후 선발한 2개의 RT-PCR 프라이머 조합들 중 검출감도가 높은 하나를 선정하여, 해당 nested PCR 조합의 증폭 영역의 안쪽에 제한효소 *BamHI*이 반응할 수 있는 6개의 염기서열(GGATCC)삽입하였다(Nelson & McClelland, 1992). 유전자 삽입은 염기서열 분석 및 *BamHI* 처리를 통해 확인하였다.

III. 결과 및 고찰

3.1 RT-PCR 프라이머 선발 및 검출감도

ToRSV의 특이적으로 진단할 수 있는 프라이머 정방향 13개와 역방향 12개가 제작되었으며(Fig. 1), 175bp~1,197bp의 크기로 RT-PCR 증폭이 가능한 55개의 조합이 설계되었다(data not shown). 총 55개의 조합을 대상으로 ToRSV의 특이적 분석을 수

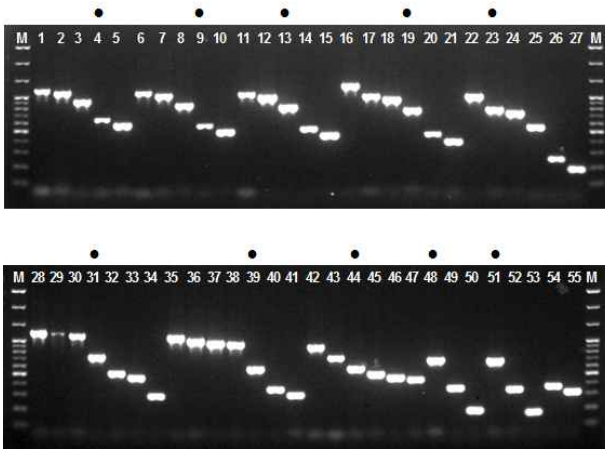


Fig. 3. Specific detection of Tomato ringspot virus(ToRSV) by using RT-PCR
Lane M, 100bp step DNA Ladder maker(Genepia, Korea); lane 1-55, ToRSV specific RT-PCR primer pair number.

행한 결과 모든 조합에서 특이적 밴드를 형성하여 이 중 증폭된 크기와 위치를 고려하여 10개의 조합

을 선발하였다(Fig. 3). 선발된 10개 조합을 대상으로 ToRSV의 유연관계가 있는 바이러스 6종에 비특이적 선발을 수행한 결과 조합 13, 19 및 39에서 비특이적 밴드가 형성된 반면 나머지 7개의 RT-PCR 프라이머 조합은 비특이적 밴드를 형성하지 않았다(Fig. 4A). 또한 선발된 7개 RT-PCR 프라이머 조합을 대상으로 동일한 숙주에 감염될 가능성이 있는 참고바이러스 6종에 비특이적 선발을 수행한 결과 조합 23에서 비특이적 밴드가 형성되어 선발에서 제외하였다(Fig. 4B). 최종적으로 선발된 6개의 프라이머 조합들 중 크기(500-800bp)와 증폭되는 부위를 고려하여 최종적으로 3개의 프라이머 조합[조합 9(F120/R20, 549bp), 조합31(F60/R80, 741bp) 및 조합48(F90/R48, 709bp)을 선발하였다.

ToRSV 검정을 위해 선발된 3개의 RT-PCR 프라이머 조합을 대상으로 검출감도를 분석한 결과 조합 9, 31 및 48은 각각 10^{-2} , 10^{-4} 및 10^{-1} 의 검출감도가 분석되어 상대적으로 조합9와 31을 최종 RT-

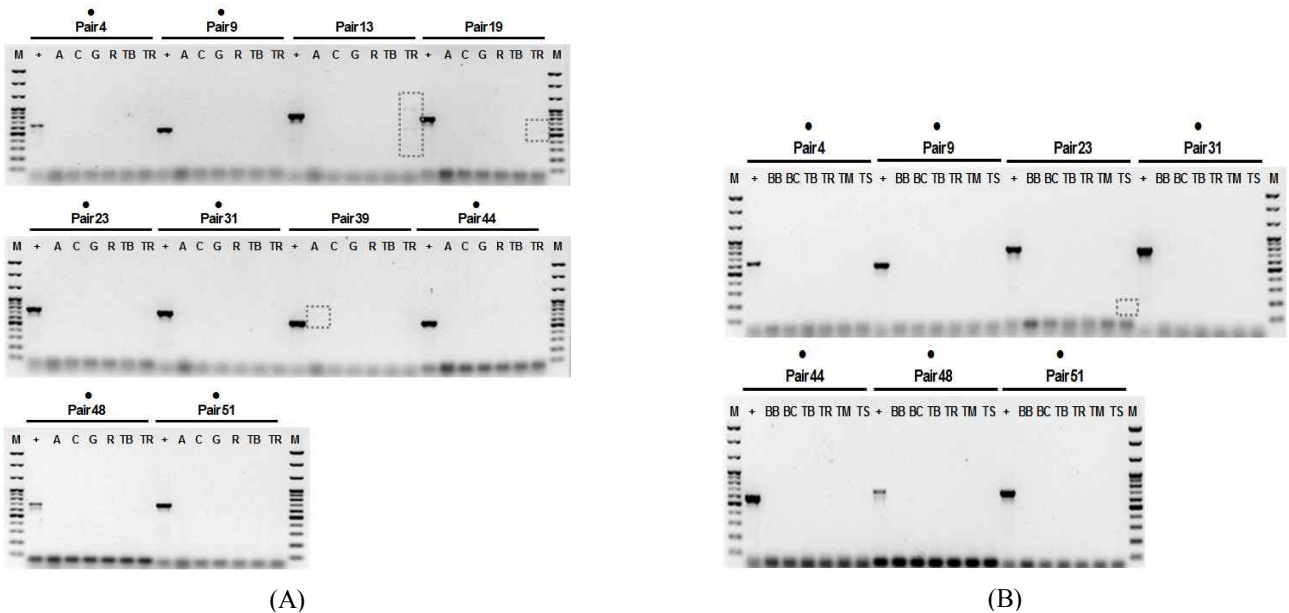


Fig. 4. Non-specific detection of related reference viruses (A) and host related viruses (B) by using RT-PCR
Lane M, 100bp step DNA Ladder maker; lane +, positive control(ToRSV); lane A, *Arabis mosaic virus*; lane C, *Cherry leaf roll virus*; lane G, *Grapevine fanleaf virus*; lane R, *Raspberry ringspot virus*; lane TB, *Tomato black ring virus*; lane TR, *Tobacco ringspot virus*; BB, *Broad bean wilt virus*; lane BC, *Bean common mosaic virus*; lane TM, *Tomato mosaic virus*; lane TS, *Tomato spotted wilt virus*; dot, selective primer pair.

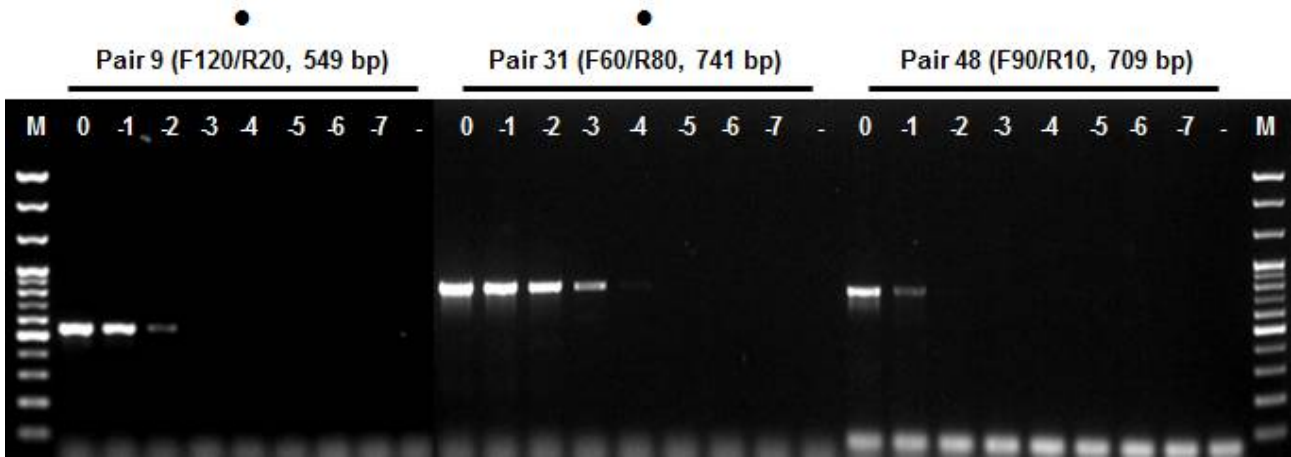


Fig. 5. Sensitivity test of three selective RT-PCR primer pairs

Lane M, 100bp step DNA Ladder maker; lane number, diluted value; lane 0, no dilution; dot, selective primer pair.

PCR 프라이머 조합으로 선발하였다(Fig. 5).

3.2 Nested PCR 프라이머 선발

ToRSV의 nested PCR 프라이머를 선발하기 위하여 RT-PCR 조합9와 31로부터 증폭할 수 있는 조합 9-1(ToRSV-F130/R30, 439bp), 조합9-2(ToRSV-F130/R40, 389bp)와 조합31-1(ToRSV-F90/R70, 363bp) 및 조합31-2(ToRSV-F100/R70, 312bp)를 설계하였으며, 분석결과 모두 특이적 밴드가 형성되었고 강도도 유사하여(Fig. 6), 최종적으로 염기서열 분석시 유리한 크기가 큰 ToRSV-F130/R30(439bp)와 ToRSV-F90/R70(363bp)을 최종 nested PCR 프라이머 조합으로 선발하였다. 따라서 검역현장에서 ToRSV를 특이적으로 진단할 수 있는 RT-PCR은 프라이머 조합9(F120/R20, 549bp)와 조합31(F60/R80, 741bp)이며, nested PCR 결과 각각 439와 363bp를 증폭할 수 있다(Table 1).

3.3 유전자변형-양성대조구 플라스미드

검역현장에서 ToRSV를 진단할 때 양성대조군으로 활용할 유전자변형-양성대조구를 제작하였다. RT-PCR 조합9와 31이 포함된 F10/R20(2,474 bp)를 증폭 후, 클로닝하였다(data not shown). ToRSV 검정을 위한 RT-PCR 조합9의 nested PCR 증폭부

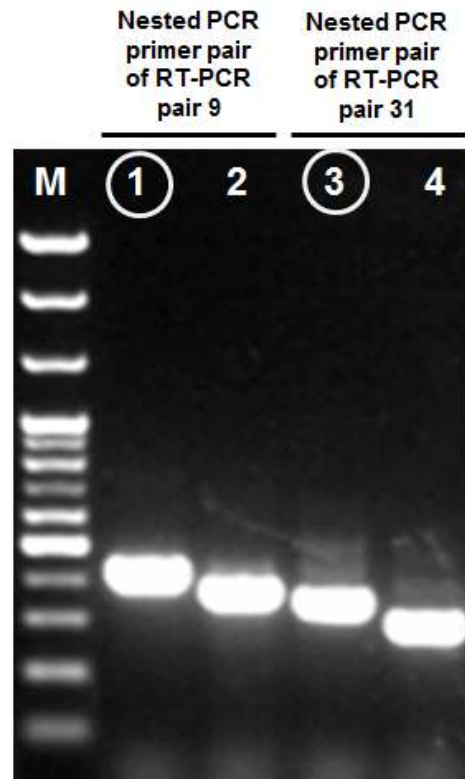


Fig. 6. Result of nested PCR for detecting ToRSV
Lane M, 100bp step DNA Ladder maker; lane 1, ToRSV-F130/R30(439bp); lane 2, ToRSV-F130/R40(389bp); lane 3, ToRSV-F90/R70(363bp); lane 4, ToRSV-F100/R70(312bp); circle, final selective nested PCR primer pair.

Table 1. Information of finally selective RT-PCR and nested PCR primer pairs for detecting *Tomato ringspot virus*

Pair No.	PCR	Primer	Sequence	Length (bp)	
9	RT	ToRSV_F120	TACCACGCCCCCTTGTA	549	
		ToRSV_R20	AAAATTTARCATCGGGCACATC		
	Nested	ToRSV_F130	AATTTCTATTAAGCCGGACACCA		439
		ToRSV_R30	AGACCACGGCTTCCACTGAGAA		
31	RT	ToRSV_F80	ATGGCAGCGATTTTGGTT	741	
		ToRSV_R60	TGGTACGGTGATGCGATAAACA		
	Nested	ToRSV_F90	TCCTTTGCTTATTGGTATGGATGT		363
		ToRSV_R70	CCACGCACGATAGWATGTTC		

위(439bp)를 선정하여 *BamHI*이 반응할 수 있는 6개의 염기서열을 삽입하였다. 그 결과 'GGATCC'가 포함된 총 445bp의 염기서열이 분석되었으며(Fig.

7), 또한 *BamHI* 제한효소를 처리한 결과 272와 173bp로 두 개의 밴드가 형성(data not shown)되어 염기서열 삽입을 확인할 수 있었다.

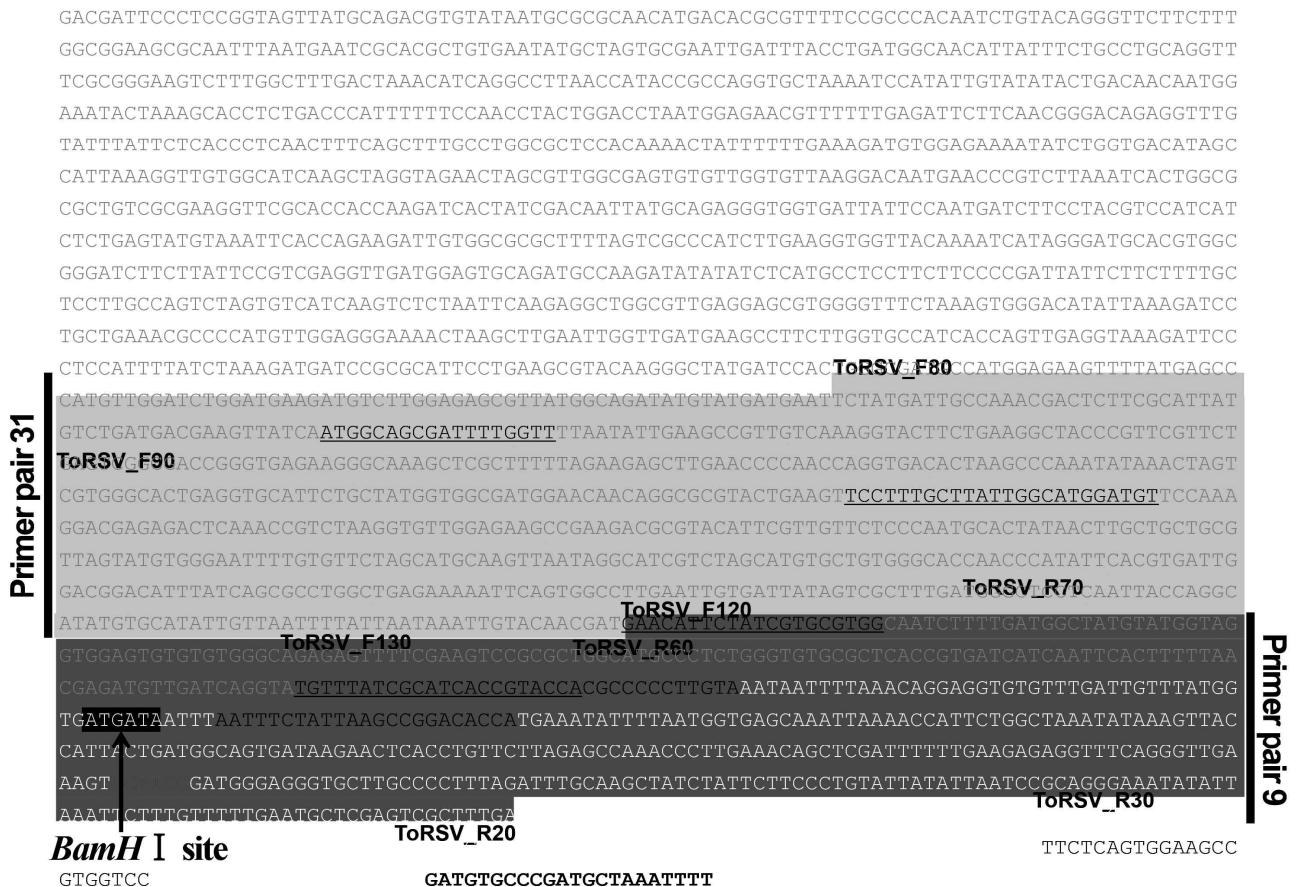


Fig. 7. Sequence information of modified-positive control plasmids for detecting ToRSV in quarantine

3.4 ToRSV 검역

본 연구에서는 검역현장에서 ToRSV를 신속, 정확하게 진단할 수 있는 검역진단시스템을 개발하였다. 국내로 ToRSV 검사작물이 유입되면 식물체에서 총 RNA를 추출한 뒤, 본 연구에서 개발한 RT-PCR, nested PCR 및 유전자변형-양성대조구를 사용하여 검사를 수행한다. 만약 검정에 사용한 유전자변형-양성대조구로부터 실험실 오염이 일어나 시료에서 양성반응이 나타난다면 RT-PCR 조합9의 nested PCR 증폭산물의 염기서열 분석결과 인위적으로 삽입한 6개의 염기서열(GGATCC)이 분석되거나 nested PCR 산물을 *BamHI* 처리를 하면 두 개의 밴드로 분리되어 거짓양성반응을 확인할 수 있다. 한편, Animal, Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency(2013)에 따르면, 화물과 휴대 등으로 국내 유입되는 다음의 작물들에 대해서 ToRSV 검사를 수행한다. 나무딸기(*Rubus idaeus*, *Rubus occidentalis*), 글라디올러스속(*Gladiolus* spp.), 까치밥나무속(*Ribes* spp.), 나무딸기속(*Rubus* spp.), 난과(*Orchidaceae*), 담배(*Nicotiana tabacum*), 딱총나무속(*Sambucus* spp.), 딸기(*Fragaria ananassa*), 벌노랑이(*Lotus corniculatus*), 벚나무속(*Prunus* spp.), 블루베리속(*Vaccinium* spp.), 비취란속(*Vanda* spp.), 사과나무속(*Malus* spp.), 양벚(*Prunus avium*, *Prunus serotina*), 제라늄속(*Pelargonium* spp.), 토마토(*Lycopersicon esculentum*) 및 포도나무속(*Vitis* spp.). 따라서 본 연구에서 개발한 ToRSV 검역진단 시스템은 관련 작물로부터 신속한 검정으로 향후 식물검역에 기여할 것이라고 기대된다.

V. 감사의 글

We are grateful to the editor for extensive comments and to two anonymous reviewers who helped to improve the manuscript. The present research was conducted with the support of Animal

and Plant Quarantine Agency in 2011.

» 참고문헌

- 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: 67-75.
- Caruso P, Bertolini E, Cambra M and López MM. 2003. A new and sensitive co-operational polymerase chain reaction for rapid detection of *Ralstonia solanacearum* in water. J. Microbiol. Methods 55: 257-272.
- Lee S, Cha MJ, Kim SM, Heo NY, Shin YG and Lee SH. 2014. Development of nucleotide primers for diagnostic RT-PCR and nested PCR detection of three seed-transmitted viruses(CRLV, SpLV and WCIMV) in quarantine. J. Agric. & Life Sci. 48: 75-83.
- Lee S, Kang EH, Heo NY, Kim SM, Kim YJ and Shin YG. 2013. Detection of *Carnation necrotic fleck virus* and *Carnation ringspot virus* using RT-PCR. Res. Plant Dis. 19: 36-44^a.
- Lee S, Kang EH, Shin YG and Lee SH. 2013. Development of RT-PCR and nested PCR for detecting four quarantine plant viruses belonging to *Nepovirus*. Res. Plant Dis. 19: 220-225^b.
- Lee S, Lee JY, Shin YG, Lee SH and Ahn TY. 2015. Development and verification of nested PCR assay for detection of *Tobacco rattle virus* in plant quarantine. J. Bacteriol. Virol. 45: 54-61.
- Lee S. and Rho JY. In press. Development of a PCR diagnostic system for detecting *Andean potato mottle virus* associated with potato quarantine in Korea. American J. Potato Res.
- Lee S and Shin YG. 2014. Development and practical use of RT-PCR for seed-transmitted *Prune*

- dwarf virus* in Quarantine. *Plant Pathol. J.* 30: 178-182.
- Nelson M and McClelland M. 1992. Use of DNA methyltransferase/endonuclease enzyme combinations for megabase mapping of chromosomes. *Methods Enzymol.* 216: 279-303.
- OEPP/EPPO. 2005. Tomato ringspot nepovirus. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 35: 313-318.
- Shin YG. 2009. An advanced quarantine system for the inspection of seed-borne viruses in Korea., Ph.D. Thesis, Kyungpook National University, Daegu, Gyeongsangbuk-do, Korea.
- Shin YG and Rho JY. 2014. Development of a PCR Diagnostic System for *Iris yellow spot tospovirus* in Quarantine. *Plant Pathol. J.* 30: 440-444.
- Stace-smith R. 1994. *Tomato ringspot virus*, no. 290. (no. 18 revised) in: *Description of plant viruses*. Commonw. Mycol. Inst. Assoc./Appl. Biol., Kew, England.