

One-Step RT-PCR 방법에 의한 수입 호접란묘의 심비디움 모자이크 바이러스와 오돈토글로섬 윤문 바이러스의 검정

윤종선* · 홍의연 · 김익환 · 윤 태 · 김태수 · 백기엽¹

충북농업기술원, ¹충북대학교 첨단원예기술개발연구센터

Detection of Cymbidium Mosaic Virus and Odontoglossum Ringspot Virus in Seed-Derived Plantlets of *Phalaenopsis* Imported by One-Step RT-PCR

Jong Sun Yun*, Eui Yon Hong, Ik Hwan Kim, Tae Yun, Tae Su Kim, and Kee Yoeup Paek¹

Chungbuk Agricultural Research and Extension Services, Cheongwon 363-880, Korea

¹Research Center for the Development of Advanced Horticultural Technology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

*corresponding author

ABSTRACT This experiment was carried out to detect the cymbidium mosaic virus (CymMV) and the odontoglossum ringspot virus (ORSV) in the seed-derived plantlets of *Phalaenopsis* imported from Taiwan by one-step reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Simple and rapid crude plant extracts for RT-PCR were prepared. The reverse transcription step was performed at 42°C for 45 min and the following thermal cycling scheme was used for 36 reaction cycles: template predenaturation at 96°C for 2 min, template denaturation at 96°C for 30 s, primer annealing at 60°C for 30 s, and DNA synthesis at 72°C for 1 min. Of the 40 seed-derived plantlets of *Phalaenopsis* imported from Taiwan, all of them were infected with CymMV, but ORSV was not detected.

Additional key words: electron microscopy, orchid, plant virus, primer, RNA

서 언

국민 문화 수준이 향상됨에 따라 난에 대한 수요가 증가하여 외국으로부터 수입되는 난의 종류와 수량이 급속히 증가되고, 이들 수입 식물로부터 외국의 병해충이 함께 유입될 가능성이 높은 실정이다. 호접란은 우리나라에서 가장 인기있는 양란 중의 하나로서 주로 대만 등지에서 수입된 플라스크 묘를 재배하여 2회 분갈이 과정을 거쳐 18~24개월 사이에 시장 출하되고 있다. 난의 바이러스는 여러 가지가 알려져 있지만 가장 많은 피해를 주는 것은 일반적으로 심비디움 모자이크 바이러스(cymbidium mosaic virus: CymMV)와 오돈토글로섬 윤문 바이러스(odontoglossum ringspot virus: ORSV)이다(Hu 등, 1993). 국내에서 재배하는 난에서도 심비디움 모자이크 바이러스와 오돈토글로섬 윤문 바이러스의 피해가 큰 것으로 확인되었으며(박 등, 1998; Ryu 등, 1998), 특히 호접란에서는 검정 식물체중에서 29.7%(박 등, 1998) 또는 42.9%(Ryu 등, 1998)의 식물체가 CymMV 또는 ORSV에 감염된 것으로 나타났다. ELISA 방법(Clark와 Adams, 1977)이 개발되어 식

물의 바이러스 검정에 많이 이용되어 왔으며(Ma 등, 1994; 윤 등, 1998; 윤 등, 1991), 최근에는 역전사 중합효소 연쇄 반응(reverse transcription-polymerase chain reaction: RT-PCR)을 이용한 바이러스 검정 기술이 실용화되어 오이 모자이크 바이러스의 검정(이 등, 1996), 감자 잎말림 바이러스의 검정(전 등, 1996), potato virus S의 검정(정 등, 1997) 및 수박에서 오이 녹반 모자이크 바이러스의 검정(양 등, 1998) 등에 활용된 바 있으며, RT-PCR 방법은 ELISA 방법보다 10³배 이상 정확할 것으로 확인되었다(전 등, 1996; 박 등, 1998). 기존의 RT-PCR 기법은 RT 반응 후 PCR 반응을 수행하여 2단계로 실험이 수행되었으나(전 등, 1996; 정 등, 1997; 이 등, 1996), 최근에 개발된 one-step RT-PCR 방법은 RT 반응과 PCR 반응이 primer와 효소를 추가로 첨가하지 않고 한 개의 tube 내에서 수행됨으로써 실험 단계를 줄이고 오염 위험성을 감소시킬 수 있는 장점이 있다(Marinho 등, 1998). 본 실험에서는 바이러스 이병 증상을 보이는 호접란 식물체를 공시하여 one-step RT-PCR 방법에 의해 CymMV와 ORSV의 검정 조건을 구명하고, 전자현미경으로 CymMV와 ORSV 입자를 검정하였으며, 우리나라

라 난 재배 농가에서 많이 재배하고 있는 대만 수입 호접란묘의 바이러스 감염 정도를 검정하기 위하여 실생 번식 식물체를 공시하여 one-step RT-PCR 기술에 의해 CymMV와 ORSV의 감염 여부를 검정하였다.

재료 및 방법

식물 재료 및 바이러스 추출

본 실험에 사용한 식물 재료 중에서 양성 대조구 식물체로는 충남 서산시에 있는 난 재배농장 고려원에서 재배중인 호접란 성묘 중에서 바이러스 이병 증상을 보이는 식물체를 수집하여 CymMV와 ORSV에 이병된 것을 확인한 후 사용하였으며, 대만 수입 실생 묘로는 충남 서산시 고려원에서 수집한 플라스틱묘 중에서 20개체와 경기도 화성군에 있는 난 재배농장 세제란원에서 수집한 플라스틱묘 중에서 20개체를 사용하였다. RT-PCR을 위한 total RNA 추출은 이 등(1996)의 방법을 일부 변형하여 호접란 식물체의 잎 조직으로부터 추출하였다. 즉, Eppendorf tube(1.5mL) 뚜껑을 이용하여 직경 약 1cm의 절편 2매(약 0.1g)를 직접 Eppendorf tube 내로 채취한 후, 액체질소로 동결하여 유리봉으로 마쇄한 후 200 μ L 추출용 완충액(3M guanidium thiocyanate, pH 6.5인 10mM 2-ethane sulfonic acid, 30mM EDTA)을 첨가하였다. Phenol : chloroform : isoamyl alcohol(25:24:1)을 200 μ L 넣고 잘 섞은 후 12,000rpm으로 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 원심 분리하여 상정액 100 μ L를 취하였으며, 상정액 100 μ L 중에서 2 μ L와 DEPC(Diethyl-pyrocabonate) water 98 μ L를 섞어서 1:50(v/v) 농도로, 또는 상정액 1 μ L와 DEPC water 99 μ L를 섞어서 1:100(v/v) 농도로 희석한 후 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 열처리 하여 RT-PCR용 template로 사용하였다.

One-Step RT-PCR

RT-PCR은 (주)기산과학의 RT-PCR kit를 사용하여 하나의 tube 내에서 one-step으로 수행되었으며, RT-PCR 조건은 Griesbach (1995), 이 등(1996), Marinho 등(1998) 및 양 등(1998)의 방법을 참고로 하여 4 μ L RCR Mix(20mM dNTP mixture, 25mM MgCl₂, 5u \cdot μ L⁻¹ thermostable DNA polymerase, 40units reverse transcriptase-MMuLV), 4 μ L RNA액, 6 μ L sense primer (24pmol) 및 6 μ L anti-sense primer(24pmol)를 넣어 총 20 μ L로 조절 후 42 $^{\circ}$ C에서 45분간 반응시켜 cDNA를 합성하였으며, PCR은 96 $^{\circ}$ C에서 2분간 template를 예비 변성시킨 후 96 $^{\circ}$ C에서 30초간 template 변성, 55 $^{\circ}$ C 또는 60 $^{\circ}$ C에서 30초간 primer 부착 및 72 $^{\circ}$ C에서 60초간 DNA 합성을 1cycle로 하여 총 36cycle 또는 40cycle을 반응시키고, 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 충분히 증폭시켰다. 이때 사용한 CymMV primer와 ORSV primer는 (주)기산과학에서 구입하였으며, primer의 염기서열은 공개되지 않았다. PCR 반응이 끝난 후 10 μ L PCR product를 2% agarose gel에서 100V로 80분

간 전기영동하고, Et-Br로 염색한 후 UV하에서 band를 조사하였다.

전자현미경에 의한 바이러스 검정

바이러스 이병 증상을 보이는 호접란 식물체에서 바이러스 입자의 검정은 농촌진흥청 농업과학기술원 병리과 전자현미경실에 의뢰하여 검정하였다. 즉, negative 염색법에 의해 염색한 후 투과 전자현미경(HITACHI H-800) 2만배율로 바이러스 입자를 관찰한 후 3만배율로 사진 촬영하였다.

결과 및 고찰

One-Step RT-PCR에 의한 호접란의 CymMV와 ORSV의 검정 조건 구명

모자이크와 괴저(壞疽) 반점을 나타내고, 정상적인 호접란 식물체에 비하여 꽃의 크기가 작고 꽃잎의 색이 퇴색되었으며, 화경이나 선형으로 꼬이는 등 바이러스 이병 증상을 나타내는 식물체에서 (Fig. 1) total RNA를 추출하여 RT 반응과 PCR반응을 한 개의 tube내에서 one-step으로 수행하였다. Primer를 부착시키는 annealing 온도는 55 $^{\circ}$ C 또는 60 $^{\circ}$ C로 하여 30초간 반응시킨 결과 60 $^{\circ}$ C에서 band가 더 선명하였으며, PCR 반응은 40회 보다 36회에서 더 선명한 band를 확인할 수 있었다. Fig. 2의 A에서 Lane 1~5 및 Lane7은 RNA액을 1:50(v/v) 농도로 희석한 것이고, Lane 6은 1:100(v/v) 농도로 희석한 결과로서 327bp에서 두 농도 모두 명확한 band가 형성되어 CymMV를 확인할 수 있었으며, Fig. 2의 B에서 Lane 1~5 및 Lane7은 1:50(v/v) 농도로 희석한 것이고, Lane 6은 1:100(v/v) 농도로 희석한 결과로서 331bp에서 두 농도 모두 명확한 band가 형성되어 ORSV를 확인할 수 있었다. 순수 RNA만 추출하여 RT-PCR을 수행한 방법을 사용하지 않고 RNA액을 phenol : chloroform : isoamyl alcohol(25:24:1)에 한 번 더 정제한 후 RT-PCR을 수행하여도 효과적으로 바이러스를 진단할 수 있었던 것(양 등, 1998)을 고려할 때, 많은 양을 검정할 경우 이 방법을 사용하는 것이 효과적일 것으로 생각된다. 이상의 결과를 고려하여 RT-PCR용 RNA액 농도를 1:50(v/v)으로 하였고, RT-PCR 조건은 42 $^{\circ}$ C에서 45분간 반응시켜 cDNA를 합성하였으며, PCR은 96 $^{\circ}$ C에서 2분간 template를 예비 변성시킨 후 96 $^{\circ}$ C에서 30초간 template 변성, 60 $^{\circ}$ C에서 30초간 primer 부착 및 72 $^{\circ}$ C에서 60초간 DNA 합성을 1cycle로 하여 총 36cycle을 반응시키고, 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 충분히 증폭시킴으로써 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었다.

전자현미경에 의한 호접란의 CymMV와 ORSV의 검정

전자현미경에 의한 호접란의 CymMV와 ORSV의 검정 결과 CymMV는 길이 540~560nm, 폭 10.7~12.0nm 정도로 가늘고 약간 곡선인 실 모양이었고, ORSV는 길이 330~360nm, 폭 16.0

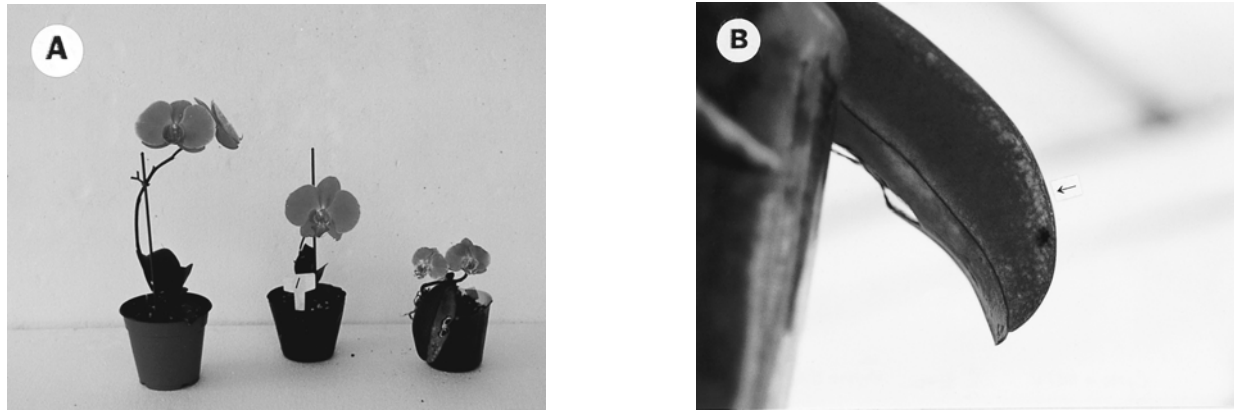


Fig. 1. Comparison of flowers of the healthy plants (left and middle in A) and the plant infected with CymMV and ORSV (right in A) in *Phalaenopsis*. Lesions appeared on the leaf of plant infected with CymMV and ORSV (B).

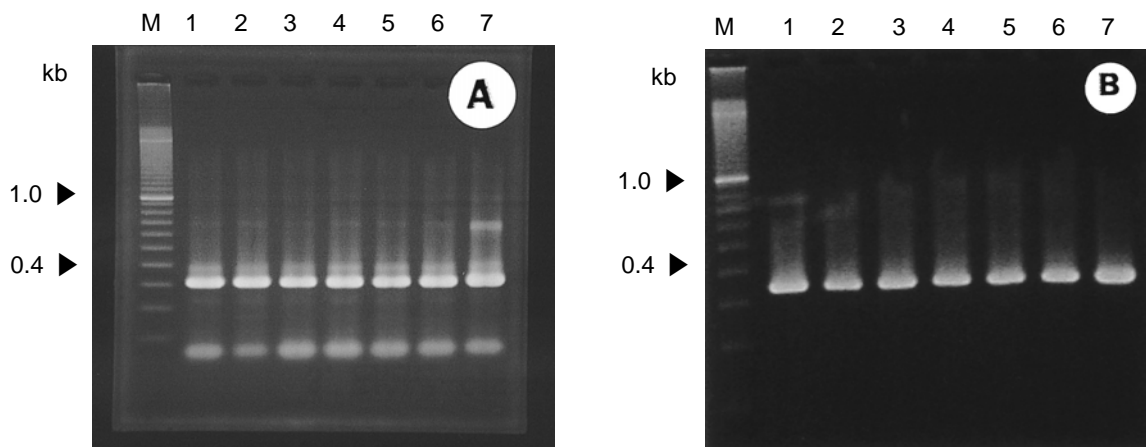


Fig. 2. Detection of CymMV and ORSV in *Phalaenopsis* leaves by one-step RT-PCR. (A) Detection of CymMV (327 bp), 1:50 dilution: lanes 1,2,3,4,5,7; 1:100 dilution: lane 6; lane M: 100 bp DNA ladder. (B) Detection of ORSV (331 bp), 1:50 dilution: lanes 1,2,3,4,5,7; 1:100 dilution: lane 6; lane M: 100 bp DNA ladder.

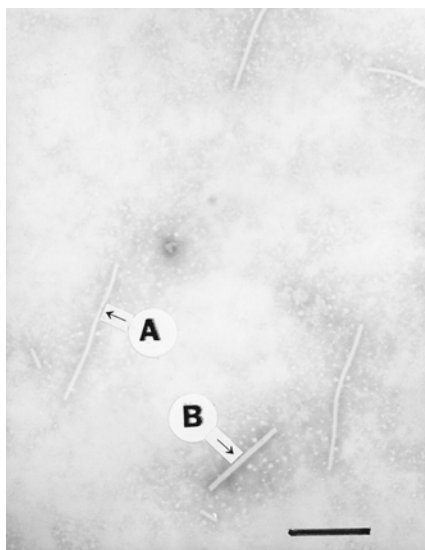


Fig. 3. Electron micrograph of virus particles isolated from *Phalaenopsis*.
A: CymMV particle; B: ORSV particle. Bar indicates 300 nm.

~17.3nm 정도의 막대형으로, 가운데 검은 선이 있었다(Fig. 3). 박 등(1990)이 심비디움을 비롯한 재배란에서 면역전자현미경을 이용하여 CymMV와 ORSV를 검정한 결과 CymMV는 480×13nm, ORSV는 300×18nm의 크기였다는 결과와 비교할 때 본 결과에서는 CymMV의 길이가 다소 길었다. 이 시료에서 CymMV와 ORSV의 존재 비율은 3:1 정도로 CymMV가 더 많았으며, 이 중 복감염 식물체에서 추출한 RNA액을 양성 대조구 시료로 사용하였다.

One-Step RT-PCR에 의한 대만 수입 호접란 묘의 CymMV와 ORSV의 검정

충남 서산시의 고려원에서 수집한 플라스크묘 중에서 20개체와 경기도 화성군의 세제란원에서 수집한 플라스크묘 중에서 20개체를 임의로 선정하여 RNA액을 추출한 후 One-Step RT-PCR에 의한 호접란의 CymMV와 ORSV의 검정 조건 구명시험에서 얻어진 결과에 입각하여 one-step RT-PCR을 수행한 후 PCR 산물을

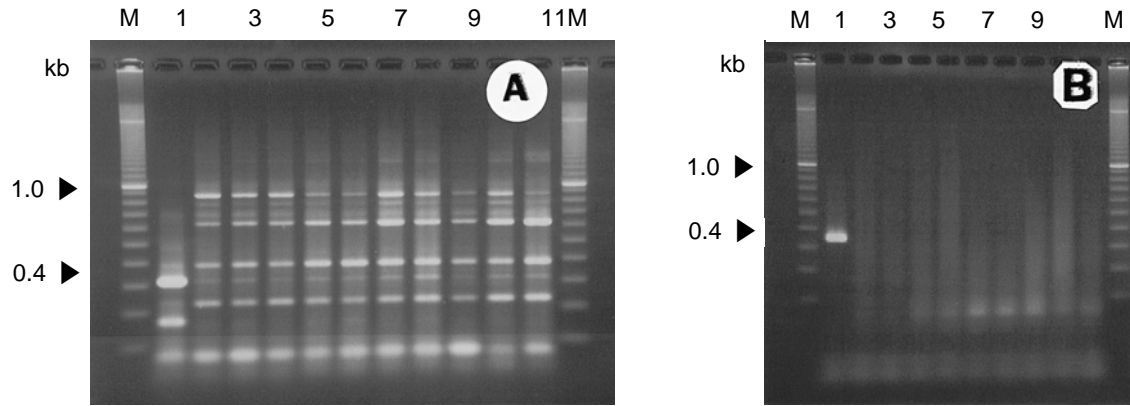


Fig. 4. Detection of CymMV and ORSV in *Phalaenopsis* leaves by one-step RT-PCR. (A) Detection of CymMV (327 bp), lane 1: positive control; lane 2 to 11: seed-derived plantlets of *Phalaenopsis* imported from Taiwan (collected from Korea Orchid Nursery); lane M: 100 bp DNA ladder. (B) Detection of ORSV (331 bp), lane 1: positive control; lane 2 to 10: seed-derived plantlets of *Phalaenopsis* imported from Taiwan (collected from the Korea Orchid Nursery); lane M: 100 bp DNA ladder.

agarose gel에서 전기영동하고, band를 조사하였다. Fig. 4의 A에서 lane 1은 양성대조구이며, lane 2에서 11까지는 고려원에서 수집한 대만 수입 팔레놉시스 실생묘의 CymMV 검정 결과로서 327bp에서 CymMV 감염을 나타내는 band가 형성되었다. Band의 밝기가 양성 대조구에 비하여 검정시료에서 가늘고 흐릿한 점을 고려할 때 CymMV의 농도가 낮은 것을 알 수 있었다. 그림 4의 B는 고려원에서 수집한 대만 수입 팔레놉시스 실생묘의 ORSV 검정

결과로서, lane 1은 양성대조구로서 331bp에서 명확한 band가 형성되었으나, lane 2에서 10까지는 실생묘를 전기영동한 결과로서 331bp에서 band가 형성되지 않은 점으로 볼 때, 이 시료들은 ORSV에 감염되지 않은 것으로 확인되었다. 충남 고려원에서 수집한 20개 시료와 경기도 화성군 세계란원에서 수집한 20개 시료 등 총 40개 시료를 검정한 결과 모두 CymMV에 감염된 것으로 확인되었으며, 다만 바이러스 농도는 낮았고, 시료간에도 바이러스 농

Table 1. Detection of cymbidium mosaic virus (CymMV) and odontoglossum ringspot virus (ORSV) in seed-derived plantlets of *Phalaenopsis* imported from Taiwan by one-step reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

| Sample No. ^z | CymMV | ORSV | Sample No. | CymMV | ORSV |
|-------------------------|------------------|----------------|------------------|-------|------|
| Positive control | +++ ^y | ++ | Positive control | +++ | ++ |
| 1 | + | - ^x | 21 | + | - |
| 2 | + | - | 22 | + | - |
| 3 | + | - | 23 | + | - |
| 4 | + | - | 24 | + | - |
| 5 | + | - | 25 | + | - |
| 6 | ++ | - | 26 | + | - |
| 7 | ++ | - | 27 | ++ | - |
| 8 | ++ | - | 28 | + | - |
| 9 | + | - | 29 | + | - |
| 10 | + | - | 30 | + | - |
| 11 | ++ | - | 31 | + | - |
| 12 | ++ | - | 32 | + | - |
| 13 | ++ | - | 33 | + | - |
| 14 | ++ | - | 34 | + | - |
| 15 | + | - | 35 | + | - |
| 16 | + | - | 36 | + | - |
| 17 | + | - | 37 | + | - |
| 18 | ++ | - | 38 | + | - |
| 19 | ++ | - | 39 | + | - |
| 20 | + | - | 40 | ++ | - |

^zSamples 1 to 20 were collected in the Korea Orchid Nursery and samples 21 to 40 were collected in the Seje Orchid Nursery.

^yClearness of the amplification product.

^xNo amplification product was detected.

도의 차이가 있는 것을 알 수 있었다. 그러나, ORSV 검정에서는 2 개 지역에서 수집한 40개 시료 모두 ORSV에 감염되지 않은 것으로 확인되었다(Table 1). 이상의 결과를 고려할 때, 비록 제한된 시료를 검정한 결과이기도 하지만 대만에서 수입되는 팔레뇨시스 실생묘들이 CymMV에 감염된 비율이 높을 것으로 판단된다. 박 등(1990)은 팔레뇨시스 3개체를 전자현미경으로 검정한 결과 1개체가 ORSV에 감염되었다고 하였으며, Ryu(1998) 등은 팔레뇨시스 28개체를 검정한 결과 CymMV에 감염된 것이 6개체, ORSV에 감염된 것이 3개체, 두 가지 바이러스에 중복 감염된 것이 3개체로 42.9%가 바이러스에 감염되었다고 하였고, 박 등(1998)은 팔레뇨시스 37개체를 검정한 결과 CymMV에 감염된 것이 5개체, ORSV에 감염된 것이 4개체, 두 가지 바이러스에 중복 감염된 것이 2개체로 29.7%가 바이러스에 감염되었다는 결과와 비교할 때 본 연구 결과에서는 CymMV 감염률이 높은 것으로 나타났다.

최근 외국으로부터 수입되는 난의 종류와 수량이 급속히 증가하여 이들 수입 식물로부터 바이러스를 포함한 외국의 병해충이 함께 유입될 가능성이 높은 실정에 있다. 식물체가 바이러스에 감염되면 뚜렷한 방제법이 없는 현재의 실정에서는 식물 검역이 철저히 이루어져야 할 것이며, 조작배양을 통하여 바이러스 무병주를 생산하여 바이러스의 전파를 막아야 할 것이다. 특히, 호접란의 경우 최근까지는 화경배양을 통한 클론묘의 대량증식에 관한 연구가 많이 이루어져 왔으나, 앞으로는 단순한 대량증식보다는 화경배양 모주의 바이러스 검정 및 생장점 배양과 항바이러스제 처리 등을 통한 바이러스 무병주의 생산이 요구되며, 이러한 과정에서 one-step RT-PCR 방법은 매우 효율적인 바이러스 검정 방법의 하나로 활용될 수 있을 것이다.

초 록

우리나라 난 재배 농가에서 많이 재배하고 있는 호접란 대만 수입묘의 바이러스 감염 정도를 검정하기 위하여 플라스크묘 상태의 실생 번식 식물체를 공시하여 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR) 기술에 의해 CymMV와 ORSV의 감염 여부를 검정하였다. 호접란 식물체의 잎에서 조즙액을 추출하여 RT-PCR을 위한 total RNA로 사용하였다. 42℃에서 45분간 반응시켜 cDNA를 합성하였으며, 96℃에서 2분간 template를 예비 변성시킨 후, 96℃에서 30초간 template 변성, 60℃에서 30초간 primer 부착 및 72℃에서 1분간 DNA 합성을 1cycle로 하여 총 36cycle을 반응시키고, 72℃에서 10분간 안정화하는 조건으로 one-step RT-PCR을 수행하였다. 바이러스 검정 결과 정도의 차이는 있으나, 40개 시료 모두 CymMV에 감염되어 있었으며, ORSV에 감염된 식물체는 없었다.

추가 주요어 : 전자현미경, 난, 식물 바이러스, 프라이머, RNA

전재홍, 정영희, 최경화, 김현순, 오현우, 박세원, 정 혁. 1996. RT-PCR 방법을 이용한 효과적인 감자 잎말림 바이러스의 검정. 한국식물병리학회지 12:358-362.

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

Clark, M.F. and A.N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34:475-483.

Griesbach, J.A. 1995. Detection of tomato ringspot virus by polymerase chain reaction. Plant Dis. 79:1054-1056.

Hu, J.S., S. Ferreira, M. Wang, and M.Q. Xu. 1993. Detection of cymbidium mosaic virus, odontoglossum ringspot virus, tomato spotted wilt virus, and potyviruses infecting orchids in Hawaii. Plant Dis. 77:464-468.

이상용, 홍진성, 이진상, 최장경. 1996. 간이 조즙액 추출법을 이용한 RT-PCR 방법에 의한 오이 모자이크 바이러스의 검정. 한국식물병리학회지 12:432-436.

Ma, Y., H.L. Wang, C.J. Zhang, and Y.Q. Kang. 1994. High rate of virus-free plantlet regeneration via garlic scape-tip culture. Plant Cell Rpt. 14:65-68.

Marinho, V.L.A., J. Kummert, G. Rufflard, D. Colinet and P. Lepoivre. 1998. Detection of apple stem grooving virus in dormant apple trees with crude extracts as templates for one-step RT-PCR. Plant Dis. 82:785-790.

박원목, 김우갑, 류기현, 윤경은, 곽병화, 소인섭. 1990. 면역전자현미경을 이용한 재배란에서의 odontoglossum ringspot virus 및 cymbidium mosaic virus의 검정. 한국원예학회지 31:417-422.

박원목, 심결보, 김수중, 류기현. 1998. ELISA 및 RT-PCR에 의한 국내 재배란에서 심비디움 모자이크 바이러스와 오돈토글로섬 윤문 바이러스의 검정. 한국식물병리학회지 14:130-135.

Ryu, K.H., S.J. Kim, and W.M. Park, 1998. Incidence of cymbidium mosaic virus and odontoglossum ringspot virus in Cymbidium and other orchids in Korea. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 39:213-217.

양덕춘, 이진숙, 김두옥, 임용표, 민병훈. 1998. RT-PCR을 이용한 수박 cucumber green mottle virus의 효율적인 진단 및 외피 단백질 유전자의 클로닝. 식물조직배양학회지 25:519-524.

윤종선, 황세구, 송인규, 이철희, 윤 태, 정인명, 백기엽. 1998. 생장점 배양에 의한 마늘 신초의 대량증식. 농촌진흥청 원예작물연구논문집 (I) 40(2):14-19.

윤경은, 정소영, 류기현, 박원목. 1991. Cymbidium屬에서의 酵素抗體 結合法을 이용한 odontoglossum ringspot virus의 檢定. 한국원예학회지 32:419-423.