

## ELISA와 RT-PCR에 의한 국내재배난에서 심비디움 모자이크 바이러스와 오돈토글로섬 윤문 바이러스의 검정

박원목 · 심걸보<sup>1</sup> · 김수중 · 류기현\*  
고려대학교 생명공학원, <sup>1</sup>연암 축산원예전문대학, 천안 333-800

### Detection of Cymbidium Mosaic Virus and Odontoglossum Ringspot Virus by ELISA and RT-PCR from Cultivated Orchids in Korea

Won Mok Park, Kirl Bo Shim<sup>1</sup>, Su Joong Kim and Ki Hyun Ryu\*

Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul, 136-701, Korea

<sup>1</sup>Dept. of Horticulture, Yonam College of Agriculture, Chun An, 333-800, Korea

**ABSTRACT:** This study was carried out to detect cymbidium mosaic potexvirus (CymMV) and odontoglossum ringspot tobamovirus (ORSV) in cultivated orchid plants in Korea. The standard double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) were carried out for detection of the viruses in the collected orchid samples. ELISA was suitable for massive-scale diagnostic method for virus detection in orchids. RT-PCR was rapid, time-saving and reliable detective method, and detection limit data showed that RT-PCR was  $10^3$  times more sensitive than ELISA. Of the 321 individual orchids representing 5 orchids genera tested by the ELISA, CymMV and ORSV were detected in 15.6% and 22.4%, and mixed infection of the both viruses with 4.9%, respectively. Of the *Cymbidium* plants tested, cultivated plants showed 52.5% virus infection rate with either CymMV or ORSV and both viruses.

**Key words:** orchid virus, detection, ELISA, RT-PCR, CymMV, ORSV.

최근 국민 문화수준 향상과 난의 보급증가로 인해 외국으로부터 수입되는 난의 종류와 수량이 급속히 증가되고 있는 추세에 있다. 또한 수입란의 증가와 함께 춘란, 한란 등 국내 고유 야생난들이 각기 하나의 고유품종으로 각광을 받고 있다. 특히 난재배 및 보급의 일대 전환점이 된것은 조직배양에 의한 우량품종의 대량증식이 용이하게 되었기 때문이다. 이러한 난의 급속한 증가와 함께 각종 난바이러스병에 의한 피해 또한 급증하는 실정이다. 이들 난바이러스는 난 고유의 관상가치를 떨어뜨리는 직접적인 원인이 되는 것은 물론 품종퇴화와 대량으로 조직배양하여 얻는 후대에 까지 전염되어 경제적으로 막대한 손실을 초래하게 된다. 현재까지 분리동정된 난바이러스는 약 30여종으로써(12, 32), 이중에서 전세계적으로 가장 문제시되는 것은 오돈토글로섬 윤문 바이러스(odontoglossum ringspot virus; ORSV)와 심비디움 모자이크 바이러스(cymbidium mosaic virus; CymMV)이다(1, 7, 8, 10, 11, 19, 26, 28, 29, 30, 32). 국내에서도 난바이러스는 10여종 이상이 현재 보고되어 있으며 ORSV와 CymMV에 의한 피해가 큰 것으로 확인되었다

(2, 3, 13, 16, 18, 23, 30).

바이러스는 순활물 기생병원체로써 많은 작물에서 큰 피해를 주고 있으며 현재까지 뚜렷한 방제용 약제가 개발되지 않았기 때문에 화학적 방제가 어렵고 이 때문에 더욱 중요한 병원체로 여겨지고 있다. 식물바이러스병에 의한 피해를 줄이는 방법은 크게 네가지가 현재까지 알려져 있다(14). 첫째 바이러스 저항성 식물을 육종하여 재배하는 방법이다. 최근에는 바이러스의 여러 유전자(외피단백질, 복제효소, 이동단백질)를 이용한 형질전환 식물이 바이러스에 대한 저항성을 발현하는 경우가 알려져 이에 대한 많은 연구가 알려져 있다(14). 두번째는 바이러스의 매개체를 구제하는 방법으로 주로 곤충에 의해서 전반되는 바이러스의 경우 살충제를 이용해서 바이러스의 전반을 막을수 있어 결론적으로 바이러스의 피해를 감소 시키는 방법이다. 세번째는 식물 정단부 분열조직의 조직배양법과 열처리 등을 통한 바이러스 무병주를 선발하여 재배하는 방법이 있다. 마지막으로는 바이러스의 전염원을 제거하는 방법이다. 이를 위해서는 바이러스를 조기에 진단하여 바이러스 이병주를 제거하고, 영양번식을 통하여 증식되는 식물의 경우에는 바이러스가 영양번식을 통하여 지속적으로 후대에 전반되므로 모본

\*Corresponding author.

에 바이러스가 존재하지 않는 개체를 재배하여야 하며 이를 위해서는 바이러스를 조기에 진단할 수 있어야 한다. 따라서 극히 바이러스의 양이 모본에는 미량이 존재 한다 하더라도 후대를 거치면서 바이러스의 양이 증가되어 피해를 일으킬 수 있으므로 보다 민감한 진단방법을 이용하여야 한다.

현재 각종 난에서 CymMV와 ORSV의 진단시 여러 가지 혈청학적 검정법이 개발 이용되고 있다(1, 5, 6, 16, 18, 26, 28). 본 연구는 현재 각종 난에서 문제시되고 있는 CymMV와 ORSV의 진단방법 체계를 확립하기 위하여 혈청학적 방법중에서 효소결합면역항체법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)과 분자생물학적 진단법인 역전사 중합연쇄반응법(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)을 적용하고, 이들 방법을 이용하여 충남지역에서 채집된 국내 재배난에서 두 바이러스의 발생을 조사하였다.

## 재료 및 방법

**공시식물 및 시료제조.** 충남일대의 난재배 농가 등을 중심으로 총 5속 321 난개체를 채집하여 공시식물로 사용하였다. 이들 채집된 난은 난의 종류 및 외견상의 병징별로 각각 구분하여 -20°C에 동결보존하였다. ELISA용 시료제조는 각 시료당 잎조직 1g에 0.01 M phosphate buffer(pH 7.0) 5 ml을 첨가하여 유발에서 마쇄한 후 3,000×g에서 5분간 원심분리하여 맑은 상등액을 취한 후 ELISA용 sample buffer로 희석 사용하였다(31).

RT-PCR용 시료제조는 정 등(4)의 방법에 따라 난 시료로부터 전핵산을 분리 사용하였다. 채집된 난잎의 마쇄액을 proteinase K와 SDS를 각각 최종농도가 5 μg/ml과 0.1%가 되도록 첨가한 후 37°C 수조에서 20분간 반응을 실시하였다. 반응액과 동량의 phenol/chloroform/isoamyl alcohol(PCI, 25:24:1=v/v/v)로 단백질을 제거하고 1/2배의 7.5 M ammonium acetate와 2.5 배의 100% 에탄올로 핵산을 침전시켜 이를 RT-PCR을 위한 재료로 사용하였다.

**공시 바이러스 및 항혈청.** 본 연구에서는 CymMV와 ORSV를 공시바이러스로 사용하였다. 또한 이들 두 바이러스에 특이적인 항혈청은 각각의 순화바이러스를 항원으로 토끼에 면역화시켜 얻은 항혈청을 조제하였다(5, 16, 18). 항혈청의 역기는 한천겔이중확산법에서 각각 1/124(v/v)과 1/64(v/v)을 사용하였다.

**ELISA 검정.** ELISA 검정은 double antibody sandwich(DAS)-ELISA 방법을 사용하였다(18). 공시 바이러스의 항혈청을 사용하여 황산암모늄 침전법과 diethylaminoethyl-52(DEAE-52) cellulose 이온교환 크로마토그래피로 immunoglobulin G(IgG)를 분리하여 ELISA에

사용하였다(18). 효소결합항체는 분리된 각각의 IgG와 alkaline phosphatase를 glutaraldehyde 방법으로 제조한 후 4°C에 보관 사용하였다(18). ELISA 용 plate는 Immulon II(96 well, Dynatech사)를 사용하였고, 모든 반응이 완료된 후에는 ELISA reader(EL340, Bio-Tek)로 405 nm에서 흡광도를 측정하여 ORSV 및 CymMV의 존재유무를 검정하였다. ELISA의 민감도는 두 바이러스가 각각 감염된 난에서 추출한 이병 즙액을 1:10(w/v)부터 1:81,920(w/v)까지 희석시킨후 희석비율별로 반응시켜 결정하였다.

**역전사 중합연쇄반응(RT-PCR).** 역전사 반응(reverse transcription; RT)은 이병난에서 분리된 전핵산과 ORSV 및 CymMV 각 RNA에 대하여 3' 말단과 상보적인 염기배열을 지닌 각기 두 바이러스에 특이적인 프라이머와 MuLV reverse transcriptase를 사용하여 37°C에서 60분간 실시하였다. CymMV용 프라이머는 RT시에는 CymMV-K 계통 RNA 염기서열(24) 740번부터 759번째 염기서열과 상보적인 염기서열을 가지는 CYP 1-2(5'-TATTAAGCTGGCTAAGTATA-3')를 사용하였고, ORSV의 경우는 ORSV-Cy 계통 RNA 염기서열(21) 6,185번부터 6,204번째와 상보적인 염기서열로 구성된 ORP1(5'-TTAGGAAGAGGTCCAAGTAA-3')를 각각 사용하였다. 반응이 끝난 후에는 상기 효소의 활성을 제거하기 위해서 99°C에서 5분간 실시하였다.

중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)은 RT 반응액과 두 공시 바이러스의 각각 RNA 5' 말단의 프라이머인 CymMV-K 계통 RNA의 1부터 20번째 염기서열과 동일한 CYP2(5'-AATAACTTGAAA-TAACATG-3') 프라이머와 ORSV-Cy 계통 RNA의 5,120번째부터 5,139번째까지의 염기서열에 해당하는 ORP2(5'-AATTGCCGGACAATTGCAA-3') 프라이머 및 Taq DNA polymerase를 사용하여 thermal cycler(Perkin Elmer)에서 denaturation 94°C에서 40초, polymerization 72°C에서 90초 및 annealing 46°C(OSRV)/42°C(CymMV)에서 40초를 30회 반복하였으며, 반복되는 cycle전에 미리 pretreatment로 95°C로 5분간 denaturation을, 그리고 최종 cycle 후에는 post-treatment로 72°C에서 10분간 반응을 실시하였다(4, 22). RT-PCR의 민감도는 두 바이러스가 각각 감염된 난에서 추출한 전핵산을 1:10(w/v)에서 1:81,920(w/v)까지 희석비율별로 반응시켜 결정하였다. RT-PCR을 통해 증폭된 DNA를 확인하기 위해서 agarose gel 전기영동을 실시하였다(25). 증폭된 RT-PCR 산물은 1.0% agarose gel로 100 V에서 30분간 전기영동을 실시하고 ethidium bromide로 염색하여 U.V. transilluminator에서 염색된 DNA 밴드를 관찰하여(25) 각 바이러스에 대한 염기서열상으로 계산된 target의 크기와 비교하여 진단을 실시하였다.

**Table 1.** Incidence of odontoglossum ringspot virus (ORSV) and cymbidium mosaic virus (CymMV) in cultivated orchid plants in Korea by using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Orchid	No. of samples infected with			No. of samples healthy	No. of samples total tested	Total infected (%)
	ORSV	CymMV	ORSV+CymMV			
<i>Cattleya</i>	14	17	6	52	89	41.6
<i>Cymbidium</i>	38	9	5	47	99	52.5
<i>Dendrobium</i>	12	18	3	43	76	43.4
<i>Oncidium</i>	4	1	0	15	20	25.0
<i>Phalaenopsis</i>	4	5	2	26	37	29.7
No. of total infected	72	50	16	183	321	
Percentage of total infected	22.4	15.6	4.9	57.0		43.0

## 결 과

충남일원에서 채집된 국내 재배난으로부터 CymMV 및 ORSV를 ELISA 및 RT-PCR 진단방법으로 검정하였다. 총 5속(*Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Oncidium* 및 *Phalaenopsis*) 321개체의 채집된 난을 대상으로 ELISA에 의한 두 바이러스의 검정 결과, ORSV의 경우 72개체(22.4%)에서 그리고 CymMV는 50개체(15.6%)에서 감염이 확인되었으며, 이들 두 바이러스가 중복감염된 난은 16개체(4.9%)로서 전체 바이러스 감염율은 43.0%로 조사되었다(Table 1). 본 연구의 주요 채집장소인 충남일원에서는 조사된 5속중에서 *Cymbidium*이 가장 바이러스 감염율이 높았으며(52.5%), *Oncidium*이 가장 낮은 감염율(25.0%)을 보였다. 또한 *Cymbidium* 및 *Oncidium*에서는 ORSV가 CymMV보다 상대적으로 높은 감염율을 나타낸 반면, *Cattleya*, *Dendrobium* 및 *Phalaenopsis*에서는 상반된 결과를 보였다.

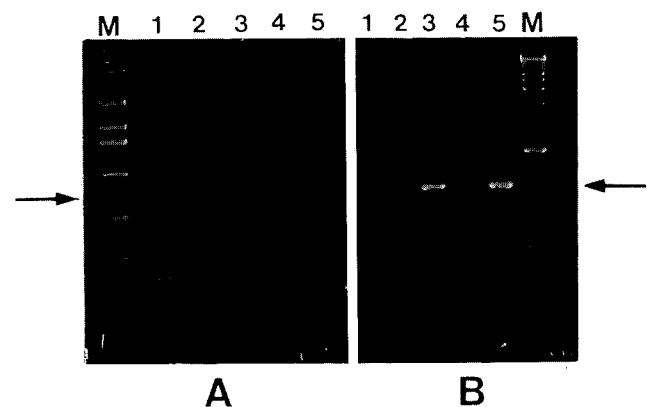
채집된 난을 바이러스 종류와 병징별로 비교한 결과 ORSV는 모자이크, 전신적 괴저증상 및 복합적 병징을 보이는 난시료에서 주로 검정되었다(Table 2). 괴저반점을 보이는 난시료에서는 CymMV가 ORSV보다 상대적으로 높은 빈도로 검출되었고, 육안으로 무병징을 보인 난시료로부터도 6.1%의 바이러스 감염율을 보였다. 또한 병징별로 두 바이러스의 ELISA 검정에서의 흡광도가 상

이하였는데, 모자이크병징을 보인 난시료가 다른 병징에서의 것과 비교시 흡광도가 높게 나타나 바이러스의 식물체내 농도가 높음을 의미하였다(Table 3).

RT-PCR을 사용하여 ORSV 및 CymMV의 검정을 실

**Table 3.** Absorbance values for symptom types of odontoglossum ringspot virus (ORSV) and cymbidium mosaic virus (CymMV) by the enzyme-linked immunosorbent assay

Symptom types	ELISA value at 405 nm			
	ORSV	CymMV		
	Mean positive	Mean negative	Mean positive	Mean negative
Mosaic	0.482	0.009	0.390	0.011
Necrotic spots	0.213	0.007	0.317	0.012
Necrosis	0.206	0.009	0.294	0.008
Complexes	0.202	0.006	0.299	0.011
Symptomless	0.157	0.007	0.238	0.009
Buffer control	—	0.005	—	0.006



**Fig. 1.** Detection of cymbidium mosaic virus (CymMV) (photo A) and odontoglossum ringspot virus (ORSV) (photo B) by RT-PCR with each virus-specific primers in crude nucleic acids from orchid leaves. Lane M : 1 kb DNA ladder for size standard; 1 : *Cattleya*, 2 and 3 : *Cymbidium*, 4 : *Dendrobium*, and 5 : *Oncidium*. The arrows indicate the 692 bp target RT-PCR product for CymMV detection (photo A) and the 1,085 bp diagnostic RT-PCR product for ORSV detection (photo B).

**Table 2.** Comparison of incidence of odontoglossum ring-spot virus (ORSV) and cymbidium mosaic virus (CymMV) in orchid plants by foliar symptom types by using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Symptoms	No. of samples infected with			No. of samples total	Total infected (%)
	ORSV	CymMV	ORSV+CymMV		
Mosaic	40	19	5	102	62.7
Necrotic spots	10	18	1	63	46.0
Necrosis	8	3	2	22	59.1
Complexes	12	6	8	35	74.3
Symptomless	2	4	0	99	6.1

시한 결과 Fig. 1에서와 같이 agarose gel 상에서 증폭된 DNA 밴드의 유무와 크기로 쉽게 바이러스를 진단할 수 있었다.

RT-PCR을 사용하여 총 5속 123 난개체에서 검정을 실시한 결과 ORSV는 24.4%, CymMV 13.0% 그리고 중복감염은 5.7%로 전체적으로는 43.1%로 조사되었으며 (Table 4), 본 방법으로 조사된 바이러스 이병율은 ELISA 결과(Table 1)와 유사한 결과를 나타내었다.

또한 상기 다른 두 진단방법간의 민감도, 즉 바이러스 진단한계를 동일한 시료를 사용하여 조사한 결과 두 바이러스 모두에서 RT-PCR이 ELISA보다 매우 높게 나타났다(Table 5). 즉, RT-PCR을 사용한 경우 ORSV는 1/40,960(w/v)배, ELISA는 1/5,120(w/v)배까지 진단이

**Table 4.** Incidence of *odontoglossum ringspot virus* (ORSV) and *cymbidium mosaic virus* (CymMV) in orchid plants by using the reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR)

Orchid	No. of samples infected with		No. of samples total	Total infected tested (%)
	ORSV	CymMV		
<i>Cattleya</i>	6	4	2	28 42.9
<i>Cymbidium</i>	14	3	1	30 60.0
<i>Dendrobium</i>	4	5	2	25 44.0
<i>Oncidium</i>	5	1	1	20 35.0
<i>Phalaenopsis</i>	1	3	1	20 25.0
No. of total infected	30	16	7	123
Percentage of total infected	24.4	13.0	5.7	43.1

**Table 5.** Comparison of detection limits for detection of *odontoglossum ringspot virus* (ORSV) and *cymbidium mosaic virus* (CymMV) between enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) in ORSV and CymMV doubly-infected *Cymbidium* orchid

Dilution of sap	ORSV		CymMV	
	ELISA	RT-PCR	ELISA	RT-PCR
1/10	+	+	+	+
1/20	+	+	+	+
1/40	+	+	+	+
1/80	+	+	+	+
1/160	+	+	+	+
1/360	+	+	+	+
1/640	+	+	+	+
1/1,280	+	+	+	+
1/2,560	+	+	+	+
1/5,120	+	+	-	+
1/10,240	-	+	-	+
1/20,480	-	+	-	+
1/40,960	-	+	-	-
1/81,920	-	-	-	-

가능하였다. 또한 CymMV는 ELISA에서는 1/2,560(w/v)배에서 그리고 RT-PCR은 1/20,480(w/v)배까지 검정 할 수 있었다.

## 고 칠

본 연구에서는 충남일원에서 채집된 국내재배난에서 주요 바이러스인 CymMV와 ORSV의 감염율을 조사하였다. 본 조사결과 충남일원 재배난에서 40% 이상의 높은 바이러스 감염율을 보였다. 국내에서도 이들 두 바이러스에 대한 지속적인 감염율 조사가 된 바 있으며(2, 3, 13, 16, 31) 본 결과와 유사하였다. 이를 두바이러스외에 국내에서 보고된 기타 바이러스(2, 3)의 감염율까지 고려한다면 실제 바이러스의 감염율은 더 높을것으로 생각된다. 또한 외국의 난바이러스 보고(1, 7, 8, 10, 11, 29, 30, 32)와 비교시에는 국내 바이러스의 피해가 규모는 작지만 그 피해도가 큰 것으로 조사되었다.

본 연구는 또한 혈청학적 진단법인 ELISA와 함께 90년대 들어 식물바이러스의 진단에 이용되고 있는 RT-PCR을 사용하여 두 난바이러스의 감염율을 조사하였다. RT-PCR은 DNA로부터 전사된 mRNA로 부터 발현된 유전자를 클로닝할 목적으로 개발된 방법(9, 27)으로서 현재 바이러스의 진단에 중요하게 이용되고 있다(4, 15, 17, 20, 22).

바이러스 진단방법의 결정에서 가장 중요한 것은 바이러스 진단의 민감도와 정확성에 있다. 식물에서 바이러스를 진단하는 경우는 경제성이 있는 작물의 경우나 혹은 영양번식체의 경우 처럼 모본에 의해서 바이러스가 확산되는 경우에 주로 적용된다. 그러므로 바이러스의 함량이 적은 상태더라도 바이러스를 진단할수 있어야 한다. 진단한계가 좁은 방법을 이용할경우 바이러스가 검정되지 않지만 바이러스가 소량으로 감염되어 있을 수 있고 이에 따라 증식과정을 거치면서 혹은 식물이 포장으로 나갔을 때 바이러스가 대량 발생될 수 있다. 가장 많이 사용하는 ELISA의 경우에는 대량으로 시료를 검정 할 수 있다는 특징을 지니고 있지만 진단한계가 RT-PCR에 비해서 낮다. 그러므로 난처럼 중요 원종의 유지나 바이러스 무병 모본주의 선발은 보다 진단한계가 높은 RT-PCR을 이용하는 것이 더 좋다고 할 수 있다.

바이러스의 진단방법은 뚜렷한 방제 방법이 없는 현재의 상황에서는 난을 포함하여 고부가가치 원예식물의 모본을 바이러스 무병주로 육성하여 바이러스의 전파를 막는 것이 가장 유력한 방법이라고 할 수 있다. 그런 의미에서 보다 민감한 진단방법인 RT-PCR을 이용한 진단방법은 그 실용성이 보다 크다고 할 수 있다. RT-PCR 방법은 장비와 운영비가 현재로는 고가이고 검정하려는 바이러스에 대한 유전자 염기서열결정이 되어야하는 단점

을 지니고 있는데 반해 많은 장점을 지니고 있다. 첫째로는 상대적으로 간단한 방법이며 많은 시간을 할애하지 않아도 성공적으로 수행할 수 있다. 둘째는 바이러스의 계통을 쉽게 확인할 수 있다. 셋째는 합성된 바이러스의 cDNA를 클로닝하여 다른 여러 실험의 재료로 사용할 수 있다. 넷째는 바이러스 그룹 특이적 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 실시하고 제한효소 처리를 동시에 실시하면 미지의 바이러스를 쉽게 확인할 수 있다(17). 마지막으로 바이러스의 진단한계가 매우 넓기 때문에 극소량의 바이러스도 쉽게 진단할 수가 있다.

바이러스를 진단한다는 개념이 단순히 어떤 바이러스가 감염되었는지 혹은 감염되지 않았는지를 확인하는 수준에서 발전해, 바이러스에 감염되었는지, 감염되었다면 어떤 바이러스이고 그 바이러스는 어떤 계통인지도 넓어져 가고 있다. 또한 바이러스의 유전자원을 확보하고 그 유전자를 이용하여 염기서열 분석을 통한 유전자의 기능 확인, 바이러스 유전자를 이용한 바이러스 저항성 형질 전환식물의 육성 및 바이러스를 이용한 유전자 운반자 (vector)의 확립 등이 최근의 연구의 주된 흐름으로 볼 때 RT-PCR을 이용한 바이러스의 진단은 대단히 유용한 방법이라고 할 수 있다.

## 요 약

본 연구는 국내 재배난에서 심비디움 모자이크 바이러스와 오돈토글로썸 윤문 바이러스를 효소항체결합법 (ELISA)과 역전시중합연쇄반응법(RT-PCR)을 사용하여 검정하였다. 본 연구결과 ELISA는 대량의 난시료에서 바이러스를 검정하는데 적합하였다. RT-PCR법은 신속하고 재현성이 있는 난바이러스 검정법이었고 ELISA와 비교시  $10^3$ 배 이상의 민감도를 보였다. 총 5속 321개체의 채집된 난을 대상으로 CymMV와 ORSV 감염율을 ELISA방법으로 조사한 결과 CymMV 감염율은 15.6%, ORSV 감염율은 22.4%였고 이들 두바이러스의 중복감염율은 4.9%였다. 심비디움속의 경우에서는 두 바이러스의 전체 감염율은 52.5%로 조사되었다.

## 감사의 말씀

본 논문은 1997년도 한국학술진흥재단 자유공모과제 연구지원비와 경상대학교 식물분자생물학 및 유전자조작연구센터(PMBBRC)의 연구지원비에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Bodnaruk, W. H. and Hennen., G. R. 1979. Incidence of

- cymbidium mosaic and odontoglossum ringspot viruses in wild and cultivated orchids of the *Cattleya* alliance surveyed in Florida. *American Orchid Soc. Bull.* 48 : 26-27.
- Chang, M. U., Chun, H. H., Baek, D. H., and Chung, J. D. 1991. Studies on the viruses in orchids in Korea. 1. Bean yellow mosaic virus, cucumber mosaic virus, cymbidium mild mosaic virus and cymbidium mosaic virus. *Korean J. Plant Pathol.* 7 : 108-117.
  - Chang, M. U., Chun, H. H., Baek, D. H., and Chung, J. D. 1991. Studies on the viruses in orchids in Korea. 2. Dendrobium mosaic virus, odontoglossum ringspot virus, orchid fleck virus and unidentified potyvirus. *Korean J. Plant Pathol.* 7 : 118-129.
  - Chung, S. Y., Yoon, K. E., Ryu, K. H., and Park, W. M. 1996. Detection of cymbidium mosaic virus from orchids by reverse transcription and polymerase chain reaction amplification of the viral coat protein and 3'-noncoding region sequence. *J. Korean Soc. Hort. Sci.* 37 : 158-165.
  - Frowd, J.A., and Tremaine, J. H. 1977. Physical, chemical, and serological properties of cymbidium mosaic virus. *Phytopathology* 67 : 43-49.
  - Hsu, H. T., Vongsasitorn, D., and Lawson, R. H. 1992. An improved method for serological detection of cymbidium mosaic potexvirus infection in orchids. *Phytopathology* 82 : 491-495.
  - Hu, J. S., Ferreira, S., Wang, M., and Xu, M. Q. 1993. Detection of cymbidium mosaic virus, odontoglossum ringspot virus, tomato spotted wilt virus, and potyviruses infecting orchids in Hawaii. *Plant Dis.* 77 : 464-468.
  - Hu, J. S., Ferreira, S., Xu, M. Q., Lu, M., Iha, M., Pflum, W., and Wang, M. 1994. Transmission, movement, and inactivation of cymbidium mosaic and odontoglossum ringspot viruses. *Plant Dis.* 78 : 633-636.
  - Innis, M. A., and Gelfand, D. H. 1990. Optimization of PCRs. In: PCR prptocols: a guide to methods and applications. Academic Press, Inc. California pp. 3-12.
  - Inouye, N. 1977. Serological diagnosis method for cymbidium mosaic virus and odontoglossum ringspot virus in orchids. *Nogaku Kenkyu* 56 : 1-13.
  - Ishii, M., and Martinez, A. P. 1973. Significant orchid diseases in Hawaii. *Hawaii Orchid J.* 2 : 6-10.
  - Lawson, R. H. 1995. Viruses and their control. In: *Orchid Pests and Diseases*, American Orchid Soc., pp. 74-104.
  - Lee, H. S., and La, Y. J. 1976. Studies on virus disease of orchids in Korea. *Korean J. Plant Protect.* 15 : 137-145.
  - Matthews, R. E. F. 1993. Diagnosis of Plant Virus Diseases, CRC press, Florida.
  - Pappu, S. S., Brand, H. R., Pappu, H. R., Rybicki, E. P., Gough, G. H., Frenkel, M. J., and Niblett, C. I. 1993. A polymerase chain reaction method adapted for selective amplification and cloning of 3' sequences of potyviral genomes: application to dasheen mosaic virus. *J. Virol. Methods* 41 : 9-20.
  - Park, W. M., Kim, W. G., Ryu, K. H., Yoon, K. E., Kwack, B. H., and So, I. S. 1990. Detection of odontoglossum ringspot virus and cymbidium mosaic virus from cultivated orchids by immunosorbent electron microscopy.

- J. Korean Soc. Hort. Sci.* 31 : 417-422.
17. Park, W. M., Ryu, K. H., Kim, S. J. and Choi, J. K. 1995. Rapid detection and identification of cucumber mosaic virus by reverse transcription and polymerase chain reaction(RT-PCR) and restriction analysis. *J. Plant Biol.* 38 : 267-274.
  18. Park, W. M., Yoon, K. E., Chung, S. Y., and Ryu, K. H. 1990. Purification and serological detection of odontoglossum ringspot virus isolated from *Cymbidium goeringii* in Korea. *Korean J. Plant Pathol.* 6 : 474-481.
  19. Pearson, M. N., and Cole, J. S. 1986. The effects of cymbidium mosaic virus and odontoglossum ringspot virus on the growth of *Cymbidium* orchids. *J. Phytopathol.* 117 : 193-197.
  20. Robertson, N. L., French, R. and Gray, S. M. 1991. Use of group-specific primers and the polymerase chain reaction for the detection and identification of luteoviruses. *J. Gen. Virol.* 72 : 1437-1477.
  21. Ryu, K. H. and Park, W. M. 1995. The complete nucleotide sequence and genome organization of odontoglossum ringspot tobamovirus RNA. *Arch. Virol.* 140 : 1577-1587.
  22. Ryu, K. H. and Park, W. M. 1995. Rapid detection and identification of odontoglossum ringspot virus by polymerase chain reaction amplification. *FEMS Microb. Letters* 133 : 265-269.
  23. Ryu, K. H., Park, W. M., Chung, S. Y., and Yoon, K. E. 1995. Occurrence of cymbidium mosaic virus and odontoglossum ringspot virus in Korea. *Plant Dis.* 79 : 321.
  24. Ryu, K. H., Yoon, K. E., and Park, W. M. 1995. Cloning and sequencing of a cDNA encoding the coat protein of a Korean isolate of cymbidium mosaic virus. *Gene* 156 : 303-304.
  25. Sambrook, J., Fritsh, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning : A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Labortary, New York.
  26. Tanaka, S., Nishii, H., Ito, S., Kameya, I. M., and Sommartya, P. 1997. Detection of cymbidium mosaic potexvirus and odontoglossum ringspot tobamovirus from Thai orchids by rapid immunofilter paper assay. *Plant Dis.* 81 : 167-170.
  27. Wang, A. M., Doyle, M. V., and Mark, D. F. 1989. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 9717-9721.
  28. Wisler, G. C., Zettler, F. W., and Purcifull, D. E. 1982. A serodiagnostic technique for detecting cymbidium mosaic and odontoglossum ringspot viruses. *Phytopathology* 72 : 835-837.
  29. Wisler, G. C., Zettler, F. W., and Sheehan, T. J. 1979. Relative incidence of cymbidium mosaic and odontoglossum ringspot viruses in several genera of wild and cultivated orchids. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 92 : 339-340.
  30. Wong, S. M., Chng, C. G., Lee, Y. H., Tan, K., and Zettler, F. W. 1994. Incidence of cymbidium mosaic and odontoglossum ringspot viruses and their significance in orchid cultivation in Singapore. *Crop Protect.* 13 : 235-239.
  31. Yoon, K. E., Chung, S. Y., Ryu, K. H., and Park, W. M. 1991. Detection of odontoglossum ringspot virus by enzyme-linked immunosorbent assay in *Cymbidium* orchids. *J. Korean Soc. Hort. Sci.* 32 : 419-423.
  32. Zettler, F. W., Ko, N. J., Wisler, G. C., Elliott, M. S., and Wong, S. M. 1990. Viruses of orchids and their control. *Plant Dis.* 74 : 621-626.

(Received April 17, 1998)