

## 식물검역 종자전염 *Wheat Streak Mosaic Virus*의 PCR 검사시스템 개발

이시원<sup>1,2</sup> · 강은하<sup>1,3</sup> · 추연미<sup>4</sup> · 신용길<sup>1\*</sup> · 안태영<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>농림축산검역본부 식물검역기술개발센터, <sup>2</sup>단국대학교 미생물학과,  
<sup>3</sup>성균관대학교 유전공학과, <sup>4</sup>농림축산검역본부 영남지역본부 시험분석과

### Development of PCR Diagnosis System for Plant Quarantine Seed-borne *Wheat Streak Mosaic Virus*

Siwon Lee<sup>1,2</sup>, Eun-Ha Kang<sup>1,3</sup>, Yeon-Mee Chu<sup>4</sup>, Yong-Gil Shin<sup>1\*</sup>, and Tae-Young Ahn<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Plant Quarantine Technology Center, Animal and Plant Quarantine Agency, Suwon 443-440, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Dankook University, Cheonan 330-714, Republic of Korea

<sup>3</sup>Department of Genetic Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Republic of Korea

<sup>4</sup>Experiment & Analysis Division, Yeongnam Regional Office, Animal and Plant Quarantine Agency,  
Busan 602-833, Republic of Korea

(Received February 15, 2013 / Accepted April 29, 2013)

*Wheat streak mosaic virus* (WSMV), a member of the genus *Tritimovirus* in *Potyviridae*, severely impacts wheat and corn seed worldwide, but has yet to be detected in Korea, and hence, every effort should be made to prevent its introduction. To prevent WSMV from entering the country, it is necessary to prepare a specific, sensitive, simple, and fast detection method for routine application to plant quarantine procedures. For this reason, a two-step diagnosis system consisting of RT-PCR and nested PCR is being used for WSMV detection. In addition, a novel positive control was developed for use with the system. WSMV has been detected in seed sweet corn from Japan and seed wheat from USA by a two-step diagnosis system, the details of which are described in this study. After sequence analysis, similarities of 80.6 and 100.0% with other isolates were determined by BLAST. They showed the same topology, which was classified as 4 genotypes by various phylogenetic trees, using a poly protein encoding sequence amplification. In this analysis, WSMV-JSweet-corn2868 (JX845574) is classified as clade B, while WSMV-Uwheat1944-1 (KC754959) and WSMV-Uwheat1944-2 (KC754960) belong to clade D.

**Keywords:** quarantine, RT-PCR, seed-borne virus, WSMV

수입개방화, 세계인구의 증가, 기후변화 및 식량안보 등의 환경변화에 따라 블루오션으로 떠오르고 있는 '중자산업'은 미국과 네덜란드 등의 유럽과 더불어 중국, 일본으로 시장 확대가 예상되는 주요 산업으로, 단순히 기존의 '씨앗' 개념이 아니라 기능이 더해진 하이테크 상품으로 변화하고 있으며 농업생산에 중요한 역할을 차지하고 있다(Rural Development Administration, 2012). 종자는 바이러스와 세균 등 잠복성 병원체가 많아 다른 식물류에 비해 검사가 어려워 고도의 검정기술이 요구되며, 검사시간도 많이 소요된다(Min, 2009). 또한 수입지 정밀검사 또는 격리재배검사를 실시하고 있는 묘목과 구근 등과는 달리, 종자는 수입지 현장검사와 실험실검사로 식물체의 통관 여부를 결

정하고 있다. 따라서 기주를 통해 국내로 유입된 식물검역 종자 전염바이러스들은 유통 및 재배과정을 통하여 주변의 건전한 식물체에 대량으로 전염되어 막대한 경제적 피해를 입힐 수 있는 특성을 가지고 있다(Shin, 2009). 이렇듯 종자는 수출입의 유통시, 철저한 관리로 검역의 안전성을 확보해야 한다.

밀, 옥수수, 기장 및 귀리는 우리나라 주요 재배작물 중 하나로, 재배시 가장 큰 문제가 되는 병해는 바이러스이다. *Wheat streak mosaic virus* (WSMV)는 이러한 기주를 감염시킬 수 있는 바이러스이며(French and Stenger, 2003), 국내 미기록 종인 관리급 검역바이러스이다(Animal, Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency, 2013). WSMV는 바이러스 group IV positive sense single stranded RNA에 속하고, *Potyviridae*과 *Tritimovirus* 속이다(Stenger *et al.*, 1998). 유전자의 크기는 약 9.4 kb, G+C 함량은 44.6%이며, 131-9,202 부분에서 poly-protein을 암호화한다. 이 바이러스는 1920년대 미국의 Central Great Plains에서

\*For correspondence. (Y.G. Shin) E-mail: syg1286@korea.kr; Tel.: +82-31-202-6966; Fax: +82-31-204-0668 / (T.Y. Ahn) E-mail: ahnty@dankook.ac.kr; Tel.: +82-41-550-3451; Fax: +82-41-550-3450

최초로 보고되었고(McKinney, 1937), 오스트레일리아에서도 보고되는 등 각 국에서 다양한 isolates가 보고 되고 있다(Ellis *et al.*, 2003). WSMV는 곡류의 파종시기에 감염되어 작물량에 있어 심각한 손상을 초래하여 주된 식량자원의 손실과 경제적인 피해를 일으키기 있기 때문에(French and Robertson, 1994), 구조, 진단, 유전자, 기주, 생활사, 벡터 및 염기서열의 다양성 등에 대한 많은 연구들이 전세계적으로 이루어지고 있을 뿐만 아니라(Stenger *et al.*, 1998; Parker *et al.*, 2005; Stenger and French, 2009; Tatineni *et al.*, 2009, 2011), 분자생물학적 방법을 사용한 진단분야와 염기서열의 다양성에 대한 연구들도 지속적으로 이루어지고 있다(French and Robertson, 1994; Stenger *et al.*, 1998; Ellis *et al.*, 2004; Price *et al.*, 2010).

우리나라에서는 WSMV에 감염될 수 있는 밀, 옥수수, 기장 및 귀리 종자의 잠복병원체를 검사하기 위해 오랫동안 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 검사법을 사용해왔다. ELISA 검사법은 1977년 식물바이러스 검정에 처음 사용되어 지금까지 사용하고 있다(Stein *et al.*, 1979). 하지만 종자의 특성상 대량의 건진 종자에 포함된 소수의 감염종자 내에 극히 미량 분포하는 바이러스를 검출하여야 하므로 더욱 검출감도가 높은 방법의 개발이 필요하며, ELISA의 거짓양성반응 등으로 인해 정밀한 진단과 검역 처분에 어려움이 발생한다(Caruso *et al.*, 2003; Priou *et al.*, 2006).

중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)은, ELISA 검사에 비해 낮은 바이러스 농도에서도 민감성이 좋아 검출 한계가 높고, 시간을 단축할 수 있어, 최근 진단의 대부분을 차지하고 있는 안정성 높은 검사방법이다(Kim *et al.*, 2000, 2005; Park and Kim, 2004; Lee *et al.*, 2011a, 2011b). 그러나, PCR 검사법을 개발하기 위하여 검토하던 중 다음과 같은 몇 가지 중요한 문제점이 발견되었다. 첫째, 여러 연구자들에 의해 개발된 PCR 검사법 적용 온도 조건이 서로 상이하여 여러 병원체를 동시에 검사하는 검역현장에서의 활용이 불편하였다. 둘째로, 동일 종자에서 2종 이상의 바이러스를 검사할 경우, 어떤 바이러스는 ELISA로 어떤 바이러스는 PCR로 검사법이 이원화되어 한 건에 대하여 이중으로 검사하게 됨으로, 불필요한 노동력과 검역현장에서의 불편과 인력부족 현상이 나타날 수 있다. 셋째 양성 대조구가 확보되어 있지 않아, PCR 검사 시의 실험오차 및 증폭 여부를 정확히 판정하기 어려울 수 있다. 게다가 양성 대조구의 시료는 검역바이러스에 감염된 시료이므로, 국내 분포나 수입 자체가 어려울 수 있다. 대량으로 수입하는 시료에 대한 검역검사법의 개발은 정밀성과, 편의성, 신속성 및 특이성을 가져야 하며, 검사법이 표준화 되는 것이 매우 중요하다. 또한 검사결과에 대한 오염여부와 거짓양성을 검증할 수 있는 방법이 개발되어, 안정성과 함께 보다 과학적인 검역을 지원해야 한다.

이러한 검역현장 요구에 부응하는 검사법 개발을 하기 위하여, 검출감도가 높고 많은 연구로 안정성이 뛰어난 2단계 PCR(RT-PCR, nested PCR)을 검사방법으로 선택하였다(Lee *et al.*, 2013). 또한 대량 수입검사에 반드시 필요한 양성 대조구의 확보, 동일한 PCR 온도조건, 관련 유전정보의 제공, primer 효율성 검증 및 PCR 비특이적 반응의 개선 등 일선 검역현장에서의 반드시 필요한 부분을 고려하였다. 단순히 primer 하나만을 개발

하는 것이 아니라, PCR 진단, 검증, 활용의 편의성, 현장의 실증 실험을 통한 지속적인 AS 및 개발 후 크로스-체크 등을 포함하는 수입지 종자 검사에 활용 가능한 검역검사 정밀진단 체계 구축을 목적으로 하였다.

따라서 본 연구에서는 밀과 옥수수 등의 수입종자에서 RT-PCR과 nested PCR 방법으로 WSMV를 신속하게 진단 할 수 있는 PCR 검사시스템을 개발하였으며, 오염으로 인한 거짓양성을 판단할 수 있는 새로운 양성 대조구(positive control) plasmid를 제작하였다. 또한 이번 연구에서 개발한 PCR 검사시스템으로 수입 종자시료를 검사하여 WSMV를 검출, 검역처분 하였다.

## 재료 및 방법

### 표준시료

금지품 수입허가를 통해 WSMV 감염 시료를 수입하였으며(Adgen, England), 종 특이적 primer 선별 실험에 역검사체계로 used as the country flux 사용된 유사바이러스와 기주 특이적 바이러스의 cDNA 시료는 국내 기업(Plutos, Korea)에서 구매하여 사용하였다.

### 핵산추출

SolGent RNA mini prep kit (Solgent, Korea)를 사용하여 감염시료에서 total RNA를 추출하였고, Neasy<sup>®</sup> Plant mini kit (Qiagen, Netherlands)를 사용하여 기주의 DNA를 추출하였고, 순서는 제품의 각각의 매뉴얼에 따라 수행하였다. 멸균된 막자사발에 시료를 넣고 액체질소를 첨가하여 마쇄하였고, 그 중 0.1 g의 시료를 시작으로 최종적으로 nucleic acid free water 20 µl에 녹여 RT-PCR 주형 DNA로 사용하였다(Lee *et al.*, 2013).

### RT-PCR

WSMV의 진단용 primer를 설계하기 위하여 미국 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI)로부터 WSMV의 isolates 10종(Sidney81, El Batan3, Czech, Turkey1, ID99, MON96, Naghadeh, Saadat-Shahr, WA94 및 Arg2)과 분류학적으로 유사한 포티비리데(*Potyviridae*) 4종(*Agropyron mosaic virus*, *Brome streak mosaic virus*, *Oat necrotic mottle virus* 및 *Ryegrass mosaic virus*)의 염기서열을 다운로드 하였다. 각각의 다운로드 한 염기서열들은 DNAMAN DNA analysis software package (DNAMAN version 6.0; Lynnon Biosoft, Canada)를 사용하여 multiple sequence alignment하였으며, annealing 온도 51-59°C, G+C 함량 45-55%를 조건으로 염기서열을 탐색하여(Pan *et al.*, 2000), 종 특이적 primer를 선별하였다. 선별된 primer set는 정방향 5'-TGGCGATGAAGATGTCAG-3'과, 역방향 5'-CCATTTCTGTGAAGGCTTT-3'로 1차 RT-PCR 산물의 크기는 834 bp이다. 염기서열 유사 바이러스와 기주 특이적 바이러스에서의 비특이적 반응은 *Cereal chlorotic mottle virus* (CCMV)와 *Cucumber mosaic virus* (CMV)의 cDNA로 실험하였다. 또한, WSMV 종 특이적인 primer의 민감도를 조사하기 위하여 추출된 total RNA를 10<sup>-8</sup>까

지 희석하여 1 µl를 주형으로 반응하였다. RNA에서 cDNA 합성은 감염시료의 앞에서 추출한 total RNA 2 µl를 주형으로, incubation Buffer (Roche, Switzerland) 4 µl, N25 primer (50 pmol, NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN N) (N-프라이머를 이용한 핵산의 합성 방법; 국내 특허 10-2006-0121442) 3 µl, 2 mM dNTP (Enzymomics, Korea) 2 µl, RNasin® (Promega, USA) 0.7 µl, M-MuLV reverse transcriptase (Roche, Switzerland) 1.6 µl 및 deionized distilled water 6.7 µl로 총 볼륨 20 µl로 수행하였다. 이후 합성된 cDNA를 주형으로 Fast PCR PreMixture (Plutos) 10 µl를 포함하여 총 볼륨 20 µl에 맞춰 실시하였다. PCR은 기주인 밀과 옥수수의 genomic DNA 1 µl를 주형으로 각각 수행하였으며, 정방향과 역방향 primer (25 pmol)를 1 µl, deionized distilled water 7 µl 및 Fast PCR PreMixture 10 µl, 전체 20 µl로 실시하였다. RT-PCR은 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 반응시켰으며, 산물은 ethidium bromide (Sigma-Aldrich, USA)를 포함한 1.2% agarose gel에서 80분 전기영동 하였고, UV 하에서 결과를 확인하였다.

#### Nested PCR

1차 PCR 산물에 대한 nested PCR primer set는 정방향 5'-GC GTGTAACGAATACACATACTA-3'과 역방향 5'-CCATTCT GTGAAGGCTTT-3'으로 PCR 산물의 크기는 299 bp이며, 1차 PCR 산물을 100배 희석하여 1 µl를 주형으로 사용하였다. PCR 조건은 RT-PCR의 역전사 반응을 제외한 나머지 반응과 동일하게 반응시켰다. PCR 산물에 대한 염기서열 분석을 의뢰하였으며 (Bioneer, Korea), 최종적으로 분석된 염기서열과 다른 WSMV 들과의 유사성을 NCBI BLAST에서 확인하였다.

#### 양성 대조구 제작

실험실 오염여부를 확인할 수 있는 양성 대조구 제작을 위하여 선발된 primer set 구간을 포함하는 PCR 산물을 증폭하였으며, 이것을 pGEM®-T easy vector를 사용하여 cloning하였다(Promega). 5개의 클론을 염기서열 분석하였고, primer set 부착부위가 일치하는 하나의 클론을 선정하였다. 선발된 클론을 대상으로, nested primer set 증폭부위 안쪽으로 제한효소 *SalI*이 반응할 수 있는 염기서열인 GTCGAC (6 bp)를 Site-Directed Mutagenesis Kit를 이용하여 삽입하였으며(Nelson and McClelland, 1992), 삽입 여부를 5 반복으로 실험하였다(Supplementary data Fig. S1).

#### WSMV 검출

수입 시료인 스위트콘과 밀 종자는 각각 10 g씩 로트별 2반복으로 채취되었다. 채취된 시료 10 g을 막자 사발에서 액체질소를 첨가하여 곱게 마쇄하고, 이 중 1 g을 덜어 total RNA의 추출에 사용하였다. 이 후, RNA-spin™ Iip RNA Extraction kit-maxi prep (iNtRON, Korea)를 사용하여 제품의 사용방법에 따라 수행하였다. 본 연구에서 개발된 primer set로 2단계 PCR 검사를

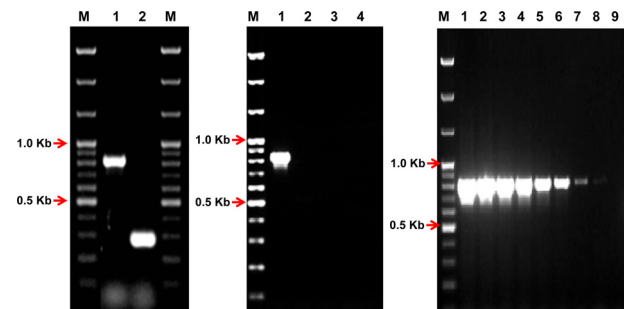
진행하였으며, 전기영동에 사용한 장치는 자동화 전기영동장치 HT DNA LabChip® Kit Version 2 (Caliper Life Sciences, USA)를 사용하였다. 염기서열 분석은 주식회사 Bioneer에 의뢰하여 수행하였으며, BLAST와 phydit version 3.1 (<http://plaza.snu.ac.kr/~jchun/phydit/>) 프로그램을 사용하여 분석된 염기서열과 reference isolates 간의 유사성을 확인하였다.

#### 계통수

분석된 염기서열을 기초로 계통수를 작성하였으며, 본 연구에서 증폭한 부분과 이전의 연구들(Stenger et al., 1998, 2002, 2006; French and Stenger, 2003;)을 비교하였다. 다양한 WSMV isolate의 염기서열들은 미국 국립생물정보센터에서 다운로드 하였고, bioedit 프로그램을 사용하여 multiple-alignment 하였다(Hall, 1999). MEGA version 5.05, Mrbayes version 3.1.2 (Holder and Lewis, 2003) 및 Network version 4.6.1.0 (Bandelt et al., 1999)을 사용하였으며, tree making methods로 maximum likelihood (ML), neighbor-joining (NJ), Bayesian interference (BI) 및 median-joining (MJ)을 사용하였고, distance model로 Jukes-Cantor 및 Tamura-Nei model을 사용하였다. 또한 검출된 3종 WSMV isolates의 NCBI accession number 등록을 위하여 sequin을 사용하였다.

#### 결과 및 고찰

검사법 개발을 위해 수집한 감염시료에서 total RNA는 174.2 ng/µl가 추출되었으며, 기주에서 추출한 total DNA는 111.9 ng/µl가 추출되었다. 본 연구에서 개발한 RT-PCR primer set는 WSMV의 poly protein을 암호화하는 4,938-5,771 부분에서 PCR 산물이 증폭되었으며, nested primer set는 5,473-5,771 부분에서 증폭되었다. 각각의 증폭된 RT-PCR 산물과 nested PCR 산물은 834 bp와 299 bp에 밴드를 형성하였고(Fig. 1A), CCMV와 CMV의 주형에서는 반응하지 않았으며(Fig. 1B), 기주인 밀과 옥수수의 genomic DNA에도 비 특이적인 밴드를 형성하지



**Fig. 1.** The results of PCR for species specific primer set to detect *Wheat streak mosaic virus* (WSMV). (A) Results of RT-PCR and nested-PCR. Lanes: 1, RT-PCR product (834 bp); 2, nested PCR product (299 bp). (B) Reference viruses. Lanes: 1, WSMV; 2, *Cereal chlorotic mottle virus* (CCMV); 3, *Cucumber mosaic virus* (CMV); 4, corn genomic DNA. (C) PCR sensitivity test for the primer set. Lanes: 1-9, total RNA  $10^0$ - $10^{-8}$ ; M, 100 bp step DNA Ladder maker.

**Table 1.** The pairwise similarity and different per total nucleotides of poly protein partial gene among WSMV-JSweet-corn2868 (JX845574; 299 bp), WSMV-Uwheat1944-1 (KC754959) and WSMV-Uwheat1944-2 (KC754960) using Phytidit program version 3.1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1 JSweet-corn2868 (JX845574)	100	38/256	37/256	3/299	9/299	38/299	39/299	39/299	39/299	39/299	39/299	40/299	40/299	41/299	41/299	58/299
2 Uwheat1944-1 (KC754959)	85.16	100	6/256	36/256	38/256	4/256	9/256	9/256	5/256	6/256	8/256	6/256	8/256	8/256	4/256	48/256
3 Uwheat1944-2 (KC754960)	85.55	97.66	100	35/256	37/256	6/256	7/256	7/256	5/256	4/256	8/256	10/256	6/256	6/256	4/256	47/256
4 Czech (AF454454)	99.00	85.94	86.33	100	6/299	37/299	40/299	40/299	38/299	38/299	36/299	39/299	39/299	40/299	40/299	55/299
5 Saadat-Shahr (EU914918)	96.99	85.16	85.55	97.99	100	40/299	43/299	43/299	41/299	41/299	39/299	42/299	42/299	43/299	43/299	55/299
6 Sidney 81 (AF057533)	87.29	98.44	97.66	87.63	86.62	100	11/299	11/299	3/299	7/299	11/299	7/299	10/299	11/299	7/299	54/299
7 WA94 (FJ348358)	86.99	96.48	97.27	86.62	85.62	96.32	100	0/299	12/299	4/299	12/299	16/299	7/299	4/299	8/299	56/299
8 WA99 (AF511643)	87.29	96.48	97.27	86.62	85.62	96.32	100.0	100	12/299	4/299	12/299	16/299	7/299	4/299	8/299	56/299
9 ID99 (AF511619)	86.96	98.05	98.05	87.29	86.29	99.00	95.99	95.99	100	8/299	12/299	6/299	11/299	12/299	6/299	53/299
10 ID96 (AF511618)	86.96	97.66	98.44	87.29	86.29	97.66	98.66	98.66	97.32	100	10/299	12/299	5/299	4/299	6/299	54/299
11 H98 (AF511615)	86.96	96.88	96.88	87.96	86.96	96.32	95.99	95.99	95.99	96.66	100	14/299	9/299	12/299	8/299	51/299
12 Turkey 1 (AF454455)	86.62	97.66	96.09	86.96	85.95	97.66	94.65	94.65	97.99	95.99	95.32	100	15/299	16/299	10/299	54/299
13 Type strain (AF285169)	86.62	96.88	97.66	86.96	85.95	96.66	97.66	97.66	96.32	98.33	96.99	94.98	100	7/299	7/299	54/299
14 MON96 (AF511630)	86.29	96.88	97.66	86.62	85.62	96.32	98.66	98.66	95.99	98.66	95.44	94.65	97.66	100	8/299	54/299
15 H95S (AF511614)	86.29	89.44	98.44	86.62	85.62	97.66	97.32	97.32	97.99	97.99	97.32	96.66	97.66	97.32	100	54/299
16 El Batan (AF285170)	80.60	81.25	81.64	81.61	81.61	81.94	81.27	81.27	82.27	81.94	82.94	81.94	81.94	81.94	81.94	100

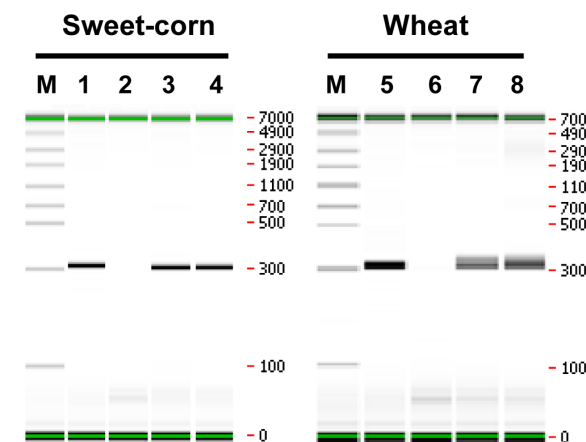
않았다(자료 미제시). 또한 개발한 primer set는 추출한 total RNA를 10<sup>7</sup>까지 희석을 주형 RNA로부터 834 bp에서 밴드를 형성하는 것으로 보아, 감염시료는 다르지만 10<sup>-2</sup>-10<sup>-4</sup> 정도 수준이었던 다른 검역바이러스의 primer sets (Lee *et al.*, 2013) 보다 높은 민감도를 가지는 것으로 예상 되었다(Fig. 1C).

양성 대조구 제작을 위해 primer set가 제작된 부분을 포함하는 2,013 bp를 증폭되었으며(Supplementary data Fig. S3), 이것을 insert DNA로 cloning하여 plasmid로 DNA가 만들어졌다(자

료 미제시). 이 후, 제한 효소 *SalI*을 처리하여 216 bp와 89 bp 두 개의 밴드가 형성되어, 6개 염기서열(GTCGAC)의 삽입이 잘 이루어졌음을 확인하였다(Supplementary data Fig. S4).

본 연구에서 개발한 PCR 검사시스템으로 일본에서 선박으로 수입된 스위트콘 종자 2건과 미국에서 수입된 밀 종자 1건에서 nested PCR 결과 WSMV를 양성반응을 확인하였다(Fig. 2). 스위트콘 종자는 2개의 로트에서, 밀 종자는 1개의 로트에서 채취된 시료들이 PCR 양성반응을 보였는데 우선, 우리가 제작한 양성 대조구로부터 오염 없이 검출된 것을 확인하였다(Supplementary data Figs. S2 and S3). 각각의 염기서열 분석 결과, 일본산 스위트콘 종자에서 검출된 2건은 염기서열이 100% 일치하였으며, WSMV isolate WSMV-JSweet-corn2868 (JX845574)으로 명명하였다. 미국산 밀 종자에서 검출된 1건은 서로 다른 2개의 isolates로 구분되었으며, WSMV-Uwheat1944-1 (KC754959) 과 WSMV-Uwheat1944-1 (KC754960)로 명명하였다. 이들을 BLAST 한 결과, WSMV-JSweet-corn2868은 Czech (99.0% nucleotide sequence similarity), Saadat-Shahr (96.99%) 및 Sidney 81 (87.29%)의 유사성을 보였으며 WSMV의 다른 isolates와는 80.60-87.29%의 유사성을 보였다. 그리고 WSMV-Uwheat1944-1 (KC754959)은 Sidney 81 (98.44%), WSMV-Uwheat1944-2 (KC754960)는 ID96 (98.44%) 및 H95S (98.44%)와 가장 높은 유사성을 보였으며, 다른 isolates와 81.25-98.44%의 유사성을 보였다(Table 1).

또한 WSMV는 종내 변이가 많은 바이러스로(French and Stenger, 2003), 염기서열의 다양성에 대한 연구들이 이루어져 왔다(Stenger *et al.*, 2002; Stenger and French, 2009). 각국에서 분리된 WSMV의 isolates는 염기서열에 기초한 다양한 계통수들을 통해 A, B, C 및 D, 모두 4개의 clade로 분류하였고(Rabenstein



**Fig. 2.** Nested PCR detection of WSMV in sweet-corn and wheat seeds using HT DNA LabChip® Kit version 2. Lanes: 1-4, Sweet-corn; 5-8, wheat samples. Lanes: M, HT DNA 5K maker (Caliper Co.); 1, WSMV nested-PCR positive control (305 bp); 2, negative control; 3, Yeongnam 2868 sweet-corn LOT 502247-1; 4, Yeongnam 2868 sweet-corn LOT 502247-2; 5, WSMV nested-PCR positive control (305 bp); 6, negative control; 7, Yangsan sample LOT 1944-1; 8, Yangsan sample LOT 1944-2.

et al., 2002; Stenger et al., 2002), 아르헨티나와 미국북서태평양과 오스트레일리아에서 분리된 isolates들과 밀접한 관계가 있는 것을 규명(Stenger and French, 2009) 하기도 하는 등, WSMV isolates를 genotype으로 그룹화하고 있는 추세이다. 기존 연구에서 대부분의 WSMV isolates는 clade D로 분류되었고(Stenger et al., 1998, 2002), 이를 본 연구에서도 확인하였다(Supplementary data Fig. S5). WSMV clade C로 분류되는 isolate Iran (AF454458)에서는 증폭한 부위가 alignment되지 않아 계통수에서 함께 표시할 수는 없었으나(Fig. 3A), ML, NJ, BI 및 MJ tree에서 모두 같은 topology가 확인되었다(Supplementary data Fig. S5 and Fig. 3A). 검출된 WSMV-JSweet-corn2868 (JX845574)은 모든 계통수에서, 체코에서 분리되었던 isolate Czech와 이란에서 분리되었던 isolate Saadat-Shahr와 함께 Clade B로 분류되었으며, Czech와 가장 높은 유연관계를 보였다(Figs. 3A and 3B). 또한, isolate WSMV-Uwheat1944-1 (KC754959)은 오스트레일리아 isolate인 Sidney 81, 미국 isolate인 ID99 및 터키 isolate인 Turkey 1과 유연관계를 보였고, WSMV-Uwheat1944-2 (KC754960)는 미국 isolate인 WA94, WA96, MON96, ID96, type strain 및 H95S와 유연관계를 보였으며, 이들은 Clade D로 분류되었다(Figs. 3A and 3B). 우리가 검출한 WSMV-Uwheat1944-1 (KC754959)과 WSMV-Uwheat1944-2 (KC754960)는 Clade D에서도 유연관계가 멀다는 것을 확인하였다.

농림축산검역본부의 인터넷 병해충정보시스템(<http://10.110.128.100>)에 의하면, WSMV는 1996년 1월부터 2011년 12월까지 16년간 총 1,762,496건 검사되었고, 이 중 폐기 처분 사례는 미국으로부터 수입한 옥수수 종자 2건, 4,740 kg에 그쳤던 반면, 본 연구에서 개발한 2단계 PCR 진단 시스템을 사용한 후로는 1년 만에 3건, 1,836 kg을 폐기하는 실적을 올렸다(자료 미 제시). 본 연구에서 개발된 PCR 검사시스템은 지속적으로 식물

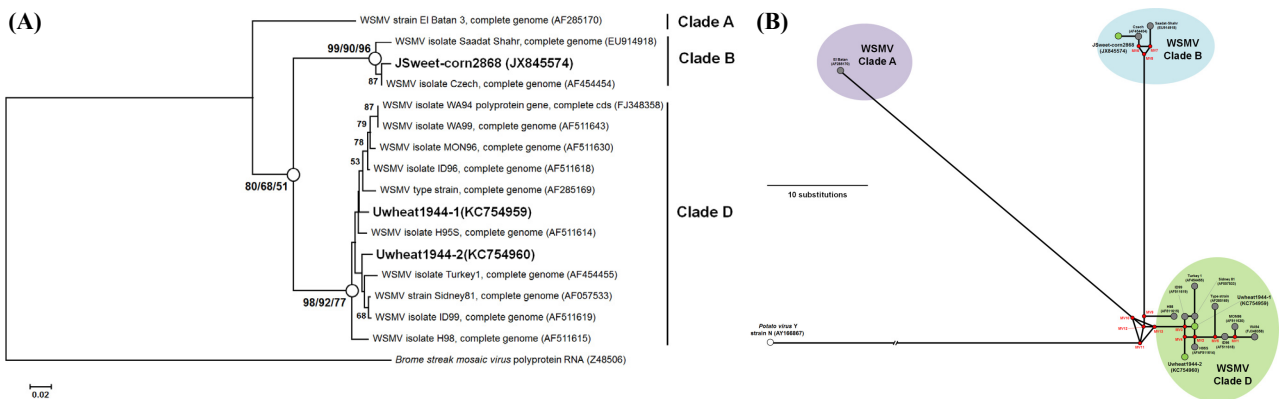
검역에 활용될 것이며, 국경검역에 기여할 것으로 기대된다. 또한 본 연구에서는 WSMV와 같이 변이가 심하거나 또는 BLAST 결과 다른 바이러스들이 리스트에 포함된다면 계통수 분석을 분류와 동정에 활용할 것을 본 연구에서는 제안한다. 또한 더욱 편리하고 효과적인 검사방법이 지속적으로 개발되어, 모든 식물검역 병원체들에 대한 신속, 정확한 검사가 이루어져야 할 것이다.

적요

*Wheat streak mosaic virus* (WSMV)는 *Potyviridae* 과 *Tritimovirus* 속으로 분류되는 식물병원성 바이러스로 밀과 옥수수 종자 등에 많은 피해를 주고 있다. 본 연구에서는 관리급 식물검역 종자전염바이러스인 WSMV를 신속하고 정확하게 진단하기 위한 2단계 PCR 시스템을 개발하였으며, 실험실 오염의 여부를 확인할 수 있는 새로운 양성 대조구를 제작하였다. 본 연구에서 개발된 PCR 시스템으로 일본에서 수입한 스위트콘 종자와 미국에서 수입한 밀 종자의 검역과정에서 WSMV-JSweet-corn2868, WSMV-Uwheat1944-1 및 WSMV-Uwheat1944-2를 검출하였다. 검출된 증폭 산물은 다른 WSMV의 isolates와 80.60-100.00%의 유사성을 보였다. WSMV는 계통수에서 4가지 genotype이 확인되며, 이번 연구에서 검출한 isolate WSMV-JSweet-corn2868 (JX845574)은 Clade B로 분류되었고, isolate WSMV-Uwheat1944-1 (KC754959)과 WSMV-Uwheat1944-2 (KC754960)는 Clade D로 분류되었다.

감사의 말

본 연구는 2009-2011년 농림축산검역본부 식물검역기술개발센터의 연구비 지원으로 수행되었습니다.



**Fig. 3.** Phylogenetic tree showing the phylogenetic position of WSMV isolates based on poly-protein coding partial sequences. (A) Neighbor-joining tree showing the phylogenetic position of our detection WSMV-JSweet-corn2868 (JX845574), WSMV-Uwheat1944-1 (KC754959), and WSMV-Uwheat1944-2 (KC754960) based on poly-protein coding partial sequences. Evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter model. Open circle means that the corresponding branches were also recovered in the NJ which is Kimura 2-parameter distance model, maximum likelihood and Bayesian interference. Bootstrap values (>50%) based on 1,000 replications are shown. Bar, 0.02 substitutions per nucleotide position. (B) Median-joining network of WSMV-JSweet-corn2868 (JX845574), WSMV-Uwheat1944-1 (KC754959) and WSMV-Uwheat1944-2 (KC754960) and closely related WSMV isolates. The length of the lines corresponds to the number of substitutions. Bar, ten substitutions. *Ryegrass mosaic virus* strain AV (AF035818) was used as an out-group; the broken line means that the length of the branch is not to scale.

## 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**, Appendix.
- Bandelt, H.J., Forster, P., and Röhl, A.** 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **16**, 37-48.
- 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. Methods* **55**, 257-272.
- Ellis, M.H., Rebertzke, G.J., Kelman, W.M., Moore, C.S., and Hyles, J.E.** 2004. Detection of *Wheat streak mosaic virus* in four pasture grass species in Australia. *Plant Pathol.* **53**, 239.
- Ellis, M.H., Rebertzke, G.J., Mago, R., and Chu, P.** 2003. First report of *Wheat streak mosaic virus* in Australia. *Australas. Plant Pathol.* **32**, 551-553.
- French, R. and Robertson, N.L.** 1994. Simplified sample preparation for detection of *wheat streak mosaic virus* and *barley yellow dwarf virus* by PCR. *J. Virol. Methods* **49**, 93-99.
- French, R. and Stenger, D.C.** 2003. Evolution of Wheat streak mosaic virus: Dynamics of population growth within plants may explain limited variation. *Annu. Rev. Phytopathol.* **41**, 199-214.
- Hall, T.A.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**, 95-98.
- Holder, M. and Lewis, P.O.** 2003. Phylogeny estimation: Traditional Raditional and Bayesian approaches. *Nature Reviews* **4**, 275-284.
- Kim, D., Hyun, J., Hwang, H., and Lee, S.** 2000. RT-PCR detection of *Citrus tristeza virus* from early Satsuma mandarin and Yuzu Cheju island. *Plant Pathol. 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 Pathol. 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 Pathol. 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 Potyand Tospoviruses. *Plant Pathol. J.* **27**, 291-296.
- Lee, S., Kang, E.H., Heo, N.Y., Kim, S.M., Kim, Y.J., and Shin, Y.G.** 2013. Detection of *Carnation necrotic fleck virus* and *Carnation ringspot virus* using RT-PCR. *Res. Plant Dis.* **19**, 1-9.
- McKinney, H.** 1937. Mosaic diseases of wheat and related cereals. US Department of Agriculture Circular. No 442.
- Min, J.S.** 2009. Import and export for seed quarantine. *J. Korea Soc. Seed Sci. Ind.* **6**, 8-13.
- 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., Bumer, 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 Pathol. J.* **20**, 147-154.
- Parker, L., Kendall, A., Berger, P.H., Shiel, P.J., and Stubbs, G.** 2005. *Wheat streak mosaic virus*-structural parameters for a Potyvirus. *Virology* **340**, 64-69.
- Price, J.A., Simmons, A., Fellers, J., and Rush, C.M.** 2010. Multiplex real-time RT-PCR for detection of *Wheat streak mosaic virus* and *Triticum mosaic virus*. *J. Virol. Methods* **165**, 198-201.
- 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 Pathol. J.* **55**, 36-45.
- Rabenstein, F., Seifers, D.L., Schubert, J., French, R., and Stenger, D.C.** 2002. Phylogenetic relationships, strain diversity and biogeography of *Tritimoviruses*. *J. Gen. Virol.* **83**, 895-906.
- Rural Development Administration.** 2012. Present condition and henceforward prospect of seed industry in the world. *J. Korea Soc. Seed Sci. Ind.* **9**, 32-38.
- Shin, Y.G.** 2009. An advanced quarantine system for the inspection of seed-borne viruses in Korea. Ph. D. thesis. Kyungpook National University, Daegu, Gyeongsangbuk-do, Korea.
- Stein, A., Loebenstein, G., and Koenig, R.** 1979. Detection of cucumber mosaic virus and bean yellow mosaic virus in gladiolus by enzyme-linked immunosobent assay (ELISA). *Plant Dis. Rep.* **63**, 185-188.
- Stenger, D.C. and French, R.** 2009. *Wheat streak mosaic virus* genotypes introduced to Argentina are closely related to isolates from the American Pacific Northwest and Australia. *Arch. Virol.* **154**, 331-336.
- Stenger, D.C., Hall, J.S., Choi, I.R., and French, R.C.** 1998. Phylogenetic relationships within the Family *Potyviridae*: *Wheat streak mosaic virus* and *Brome streak mosaic virus* are not members of the genus *Rymovirus*. *Phytopathology* **88**, 782-787.
- Stenger, D.C., Hein, G.L., and French, R.** 2006. Nested deletion analysis of *Wheat streak mosaic virus* HC-Pro: Mapping of domains affecting polyprotein processing and eriophyid mite transmission. *Virology* **350**, 465-474.
- Stenger, D.C., Seifers, D.L., and French, R.** 2002. Patterns of polymorphism in *Wheat streak mosaic virus*: Sequence space explored by a clade of closely related viral genotypes rivals that between the most divergent strains. *Virology* **302**, 58-70.
- Tatineni, S.A., Winkle, D.H.V., and French, R.** 2011. The N-Terminal region of *Wheat streak mosaic virus* coat protein is a host- and strain-specific long-distance transport factor. *J. Virol.* **85**, 1718-1731.
- Tatineni, S., Ziems, A.D., Wegulo, S.N., and French, R.** 2009. *Triticum mosaic virus*: a distinct member of the family *Potyviridae* with an unusually long leader sequence. *Phytopathology* **99**, 943-950.