

식물검역분야에서 유전자진단수법의 리용

김철우, 심윤희

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《다른 나라에서 다수확품종의 종자를 들여올 때 그에 대한 검역사업을 엄격히 하여 농작물에 피해를 줄수 있는 병균이나 바이러스가 묻어들어오는 일이 없도록 하여야 합니다.》
(《김정일선집》 증보판 제22권 164페이지)

식물검역사업은 다른 나라들로부터의 병해충의 침입을 미리 방지하기 위하여 항구와 비행장에서 진행되는 수입품들에 대한 검역과 주요병해충의 국내에서의 만연을 막기 위해 진행되는 검역 그리고 다른 나라에 식물체들을 수출할 때 해당 나라의 요구에 따라 실시되는 수출품들에 대한 검역으로 나눈다.

식물검역사업의 대상으로 되는 식물이나 병해충은 최근 화물수송체계가 발달함에 따라 건전한 식물들의 수출입량이 증가하고 다른 나라들에서 유전자원도입이 활발해지며 과일나무류와 화분류 등 해당 나라의 농업생산에 필요한 종자나 나무모의 수입이 늘어나면서 그 량과 질도 증대되는 경향성을 보이고있다. 이러한 상황은 수출입하는 다양한 식물들에 대하여 보다 짧은 기간에 보다 많은 대상을 정확히 검사할것을 요구하고있다.

이로부터 식물검역사업의 신속성과 효과성을 높이기 위하여 보통 혈청학적진단법이나 유전자진단 등과 같은 생리생화화학적 검사수법이 도입되고있는데 그중에서도 PCR에 기초한 유전자진단수법은 검출의 신속성, 간편성, 감도, 효률 및 신뢰성에서 매우 우월한 수법으로서 식물검역의 목적을 달성하는데 적합한 방법으로 되고있다.

론문에서는 식물검역분야에서 지금까지 유전자진단수법의 리용정형과 앞으로의 도입 전망에 대하여 논의하였다.

1. 식물검역에 유전자진단수법을 도입하게 된 배경

1) 수출입검사의 신속화, 고정밀화

나무류들 특히 살아있는 식물의 수출입검역에서는 선도 등 식물의 가치를 손상시키지 않는 적절한 검사조치를 실시하는것이 중요하다. 따라서 보다 신속하고 정확한 검사방법이 필요하며 또 다른 나라에서 수입되는 종자나 영양번식하는 나무모, 종자류, 알뿌리류 등은 그것이 제1차 전염원으로 되어 바이러스병 등이 퍼질수 있는 위험성이 높은데로부터 특별히 높은 정밀도를 가진 검사를 요구한다. 이러한 식물검사에서 유전자진단수법은 신속성과 신뢰성이 높은 유용한 검사수단이라고 보고있다.

영양번식하는것들중에 해당 나라들에서 재배되는 중요한 작물에 대해서는 일정한 기간 격리재배하여 검사를 진행하는 검역제도가 있다. 격리재배대상식물이 많은 량 수입되는 경우 이것을 일정한 기간 심어가꾼 다음 검사하자면 재배에 필요한 넓은 격리포전이가 있어야 하고 동시에 그 재배관리에 많은 로력이 필요되는 등 여러가지 문제들이 제기된다. 그뿐만 아니라 점목점종검정, 즙액점종검정 등 생물검정을 필요로 하는 격리재배검사에서 대량의 검체는 검사에 많은 로력이 동원될것을 요구한다. 만약 검사의 대상으로 되는 식물병들에 대하여 유전자진단수법으로 검출할수 있다면 그에 의한 효율적인 검역이 가능하게 된다.

수출검역에서는 상대국으로부터 특정의 병해에 침습되지 않았다는것을 증명하도록 요구하는 경우가 있다. 이 경우 대상으로 되는 병원체의 검출에 유전자진단수법을 리용하면 그 효과는 매우 크다.

2) 중요병해의 침입방지

다른 나라에서 발생하는 주요병들가운데서 해당 나라가 특별히 침입을 경계하는것에 대해서는 그 위험성이나 검사가 어려운 경우 수입 그자체를 금지하는외에 수출국에 대한 재배지검사를 요구하는 조치를 취하고있다. 특별히 엄중한 병으로 지적되고있는 식물병에 대해서는 검사지표에 구체적인 검사사항을 정하고 집중적인 검사를 진행하고있다. 그중에는 대체로 PCR법 등 유전자진단수법에 의한 검사가 규정되어있는것도 있다.

3) 국내검역의 신속화, 고정밀화

국내에서 유통되는 종자감자나 과일나무에 대해서는 우량종묘의 관리와 공급의 목적으로 주로 비루스병을 대상으로 한 검역(지정종묘검역, 과일나무모검역)이 진행되고있다. 이러한 종묘는 번식과 증식에 리용되기때문에 식물병의 만연원천으로 될 위험성이 있어 그 검사에는 보다 높은 정밀도가 요구된다.

유전자진단수법은 간편하면서 높은 검정정밀도가 보장되기때문에 이 목적에 맞는다.

일부 나라들에서는 감귤고리무늬병과 같이 국내에서 새롭게 발생한 주요식물병을 방지하기 위한 초기대책으로서 병발생정도를 검사하는데 유전자진단수법을 리용하고있다. 그것은 우선 검사의 신속성을 보장할수 있고 다음으로 검사결과가 믿음직하기때문이다.

또한 사과, 배의 화상병 등 아직 발생하지 않은 새로운 식물병의 침입에 대처하여 그 침입경로를 추정할수 있는 기술을 확립하는것도 병발생과 예방에서 중요한 문제로 나서는 데 그 침입경로를 신속히 추정하는 유력한 방법의 하나가 바로 유전자진단수법이다. 침입경로의 추정에서는 병원체유전자의 지역간차이를 검출하는것이 효과적이라고 보고있는데 이를 위하여 병원체게놈DNA의 제한효소절단단편의 다형해석법이 리용되고있다.

2. PCR법의 도입

1) 식물병의 진단 및 동정을 위한 PCR법의 리용

현재 식물병을 진단하고 동정하기 위한 병원체의 검출법으로서 PCR법이 널리 리용되고있다.

PCR를 리용하여 짧은 시간동안에 다량의 유전자복제물을 합성할수 있다는데로부터 표적유전자를 높은 감도로 검출할수 있다. 세균이나 피토플라즈마, 일부 비루스 등 DNA를 유전자로 하는 병원체들에 대해서는 보통의 PCR법이 리용된다. 그러나 RNA를 유전자로 가지고있는 많은 비루스와 비로이드에서는 RNA로부터 DNA를 합성(역전사)하는 RT-PCR법이 리용된다.

PCR법, RT-PCR법을 적용하기 위해서는 목적하는 병원체에 특이적인 배렬부분을 포함한 염기배렬정보가 필수적인데 최근 많은 식물병원체에 대한 유전자해석이 진행되어 다량의 염기배렬정보가 인터넷상의 자료기지에 공개되고있다. 그러한 정보에 기초하여 PCR의 개시점으로 되는 DNA단편(프라이머)이 설계되고 PCR법에 의한 특이적인 검출이 가능하게 되었다.

지금까지 감자나 고구마, 과일나무 등에 세균병이나 비루스병, 비로이드병을 일으키는 병원체의 진단 및 동정에 리용되고있는 유전자진단법에 대한 자료를 표에 주었다.

표. 병원체의 진단 및 동정에 리용되고있는 유전자진단법

대상병원체	숙주식물	유전자진단법
세균류		
감귤고리무늬병균	감귤나무류	PCR법
수박열매반점병균	수박	PCR법
배나무가지썩음병균	배나무, 사과나무 등	PCR법 - RFLP법
화상병균	배나무, 사과나무 등	PCR법
비루스		
사과나무줄기구멍비루스	사과나무, 배나무	RT-PCR법
사과나무줄기흡비루스	사과나무, 배나무	RT-PCR법
사과위황잎반점비루스	사과나무, 배나무	RT-PCR법
귤검댕이잎비루스	귤나무류	RT-PCR법
귤삼각점비루스	귤나무류	RT-PCR법
추리두창비루스	복숭아나무, 추리나무, 살구나무	RT-PCR법
포도피사비루스	포도나무	RT-PCR법
포도부채잎비루스	포도나무	RT-PCR법
포도잎말림병비루스 1, 2, 3	포도나무	RT-PCR법
포도비루스A	포도나무	RT-PCR법
포도비루스B	포도나무	RT-PCR법
포도얼룩무늬비루스	포도나무	RT-PCR법
딸기얼룩점비루스	딸기	RT-PCR법
딸기황색칼날비루스	딸기	RT-PCR법
딸기잎줄무늬비루스	딸기	PCR법
고구마깃털무늬비루스	감자	RT-PCR법
감자잎말림병비루스	감자	RT-PCR법
비로이드		
사과화상검질비로이드	사과나무	RT-PCR법
사과열매균렬비로이드	사과나무	RT-PCR법
귤검질균렬비로이드	귤나무류	RT-PCR법
귤비로이드 - I (귤굵은잎비로이드)	귤나무류	RT-PCR법
귤비로이드 - II (귤악액비로이드)	귤나무류	RT-PCR법
귤비로이드 - III	귤나무류	RT-PCR법
귤비로이드 - IV	귤나무류	RT-PCR법
귤비로이드 - OS, CG	귤나무류	RT-PCR법
호프스탄트비로이드	복숭아나무, 추리나무	RT-PCR법
감자방추모양비로이드	감자, 고구마	RT-PCR법

2) 핵산추출의 간략화

PCR법이나 RT-PCR법으로 검출을 진행하기 위하여서는 병에 걸린 식물로부터 목적하는 병원체의 핵산을 추출하여야 한다. 일반적으로 이것을 핵산추출공정이라고 하는데 검사를 위하여 병원체의 핵산만을 순수하게 추출할 필요는 없다. 그러므로 식물유래의 핵산과 병원체의 핵산을 함께 추출하면 된다. 핵산을 추출하는데는 여러가지 방법이 리용되고있는데 추출하려고 하는 식물의 종류, 병원체유전자의 종류에 따라 해당하는 방법을 적용한다.

핵산의 추출공정은 PCR법에서 가장 시간과 품이 많이 드는 공정이므로 이것을 간략화하는것은 검출의 신속화, 간편화와 직접적으로 관련된다.

식물방역부문에서는 여러 식물에서 다양한 병원체에 대하여 핵산추출을 진행하는 방

법으로서 CTAB법이나 칼리움/SDS법을 기초로 하는 간단한 핵산추출법을 리용하고있다.[2, 3] 이 방법은 전DNA, 전RNA를 짧은 시간동안에 효율적으로 추출할수 있게 하며 PCR형틀의 조제법으로서도 매우 유용하다.

3) 핵산추출을 필요로 하지 않는 PCR법

식물방역부문에서는 PCR법으로 핵산추출을 간략화하는외에 핵산추출을 필요로 하지 않는 PCR법에 대해서도 검토하고있다. 그 결과 프람복스비루스의 검출법으로서 IC-RT-PCR법이 도입되었으며 감귤고리무늬병균의 검출법으로서 관흡착법에 의한 PCR법이 개발[1, 4, 8]되었다.

3. 새로운 수법의 도입

1) 주파수마당전기영동법을 리용한 유전자해석

최근 역학적조사를 진행하는 수단으로서 분자역학적수법이 개발되었다.

주파수마당전기영동법(PFGE)을 리용한 세균계놈DNA의 제한효소절단단편의 해석은 병원성대장균 O-157에서 실용화되고있는것처럼 균그루의 기원 즉 지역간차이를 밝히는데서 가장 우월한 방법으로 되고있다.

식물방역부문에서는 이것을 사과, 배의 화상병의 검출에 도입하는것을 검토하고있다. 발생지역마다 화상병균균그루에 대하여 PFGE법에 의한 해석을 진행하고 그러한 영동모형을 자료기지화하는것으로 해당 나라에 화상병균이 침입하는 경우 그 기원을 밝히고 침입경로를 추정할수 있다고 보고있다.

2) LAMP법을 리용한 병원체의 검출

LAMP법은 최근에 개발된 새로운 형의 유전자증폭법이다.[7] LAMP(Loop-mediated Isothermal Amplification)란 중간생성물의 고리모양구조를 양끝에 있는 아령형DNA단편을 기점으로 하여 일정한 온도에서 유전자증폭하는 방법을 말한다.

LAMP법의 특징은 다음과 같다.

첫째로, 표적유전자부분의 6개의 영역을 인식하는 4종류의 프라이머(그가운데서 두종류는 각각 2개의 영역을 포괄)를 리용하기때문에 PCR법에 비해 특이성이 높다는것이다.

둘째로, 사슬치환형DNA폴리메라제를 리용하기때문에 PCR에서는 필요한 열변성이 필요없고 일정한 온도(60~65°C)에서의 증폭이 가능하다는것이다.

셋째로, 아령구조를 기점으로 하는 증폭에 의한 높은 증폭효율때문에 대량의 증폭산물이 얻어진다는것이다. 그밖에도 증폭반응의 부산물로서 불용성물질이 생긴다는데로부터 특이적증폭을 눈으로 확인할수 있고 또한 흐림도계를 리용할수 있으며 전기영동에 의한 검출이 필요없는것 등을 들수 있다. 이러한 특징을 가지고있는것으로 하여 1단계에서 매우 특이적으로 짧은 시간동안에 표적유전자를 검출할수 있다.

현재 프람복스비루스나 감자스핀돌추버비로이드 등의 주요병에 대하여 LAMP법에 의한 병원체의 검출이 검토되고있다.[5, 6]

4. 앞으로 도입이 기대되는 기술

원래 유전자의 기능해석수법으로서 개발된 포괄적인 유전자발현해석법인 미소정렬법이 최근 병원체의 검출에 응용되고있다. 원리적으로는 유리판, 막 등의 지지체우에 고정한 표적병원체유래의 유전자단편(탐침)과 PCR법 등으로 표식한 검출대상유래의 유전자단편사이에 진행하는 분자교잡중형성이다. 이 방법의 우점은 한점의 지지체우에서 한번에 몇종

의 병원체(10종이상)를 검출할수 있다는것과 검출계의 자동화가 비교적 쉽다는것이다. 이 방법이 식물검역에 리용되면 PCR이상으로 검사의 신속성을 보장할수 있다.

5. 유전자진단수법에 의한 검사의 문제점

유전자진단수법은 검출감도가 높은 우점이 있는 반면에 교차오염의 영향을 받기 쉬운 결함이 있다. 또한 보다 높은 감도로 병원체를 검출할수 있는 반면에 잘못된 양성결과를 초래할 위험성도 높아진다. 검사법의 검토에서는 교차오염을 막기 위해 노력하며 그것이 나타나지 않았다는것을 검증할수 있는 체계를 세우는것이 과제로 된다.

또한 유전자진단수법은 염기배열의 차이를 검출하는것이기때문에 목적하는 병원체와의 약간의 유전자변이가 검출에 방해로 되기도 한다. 유전자진단법을 검사에 리용할 때에는 병원체를 직접 리용하지 않고 특이적인 염기배열부분을 검출한다는것을 항상 염두에 둘 필요가 있다.

맺 는 말

유전자진단과 같은 고급한 검출방법들이 보다 적절한 식물검역에 리용되고있다. 농작물을 해치는 병해충의 침입과 피해를 방지함으로써 농업생산의 안전에 기여하는것은 병해충방지연구, 면역과 방역사업의 공동의 사명이다. 때문에 병해충에 대한 연구를 진행하여 합리적인 검사법과 방지법을 개발하고 적절한 해결대책을 세우며 그것을 농업생산과 검역사업에 리용하는것은 매우 중요한 사업으로 된다.

참 고 문 헌

- [1] A. N. Adams et al.; Plant Path., 60, 240, 2011.
- [2] S. L. Dellaporta et al.; Plant Mol. Biol. Rep., 4, 19, 2013.
- [3] J. J. Doyle et al.; Phytochem. Bull., 49, 11, 2017.
- [4] C. M. Chagas et al.; Phytopathol. Z., 134, 301, 2015.
- [5] M. U. Chang et al.; Ann. Phytopathol. Soc. Jpn, 82, 156, 2016.
- [6] C. M. Fauquet et al.; Virology, 76, 502, 2015.
- [7] K. Kato et al.; Ann. Phytopathol. Soc. Jpn, 80, 624, 2014.
- [8] T. Wetzal et al.; J. Virol. Meth., 54, 27, 2016.

주체109(2020)년 7월 5일 원고접수

Application of Gene Diagnostic for Plant Disease Quarantine

Kim Chol U, Sim Yun Hui

This article shows gene diagnostic techniques to inspect plant diseases in plant pathology, and their applications and prospect in the future. The excellent inspection methods such as gene diagnosis improve the quality of plant quarantine.

Keywords: plant quarantine, gene diagnosis, pathogen, insect