



ELISA, EM, PCR기법을 이용한 식물 바이러스의 확정진단법개발

A study for the development of decisive detection system
of plant virus by using ELISA, EM, PCR technique

1994. 2

한국과학기술연구원
부설유전공학연구소

제 출 문

한국과학기술연구원
부설 유전공학연구소장 귀하

본 보고서를 "ELISA, EM, PCR 기법을 이용한 식물 바이러스의
확정진단법개발" 사업의 최종보고서로 제출합니다.

1994. 2. 28.

연구 책임자 : 정 혁 (KIST 책임연구원)

연구 원 : 전재홍(KIST 선임연구원)

박세원(KIST Post Doc.)

김현순(KIST 연구원)

정영희(KIST 연수연구원)

이용순(KIST 기사)

요 약 문

ELISA, EM, PCR 기법을 이용한 식물 바이러스의 확정진단법개발의 연구를 진행한 결과는 다음과 같다.

1) 기내배양중인 45개 감자품종을 사용하여 ELISA방법으로 PVS, PVX, PLRV, PVA, PVY등의 감염여부를 진단하여 PVS가 15개, PVX는 2개, PVY는 1개, PLRV의 경우에는 3개의 품종에서 감염이 확인되었다.

2) PSTV viroid(ATCC PV#86)는 ATCC에서 분양하여 배양중인 수미 감자줄기에 감염시켜 유지하였다.

3) PVS와 PLRV에 감염된 품종으로부터 virus를 추출하여 이를 전자현미경을 사용하여 관찰하였다.

4) PLRV와 PVS 및 PSTV의 RNA-PCR을 수행하여 기존의 ELISA 방법보다 성능이 우수한 새로운 감자의 virus 진단법을 개발하게 되었다. 앞으로 같은 방법으로 진행하면 감자의 PVM과 PVA 및 PVY같은 감자의 virus와 다른 식물의 여러 virus들도 쉽게 RNA-PCR 진단법으로 진단 가능하게 될 것이다.

SUMMARY

This study was carried out as experiment with the purpose of a study for the development of decisive detection system of plant virus by using ELISA, EM, PCR technique. Followings are the results of the experiment.

1) Using enzyme-linked immunosorbent assays(ELISA), we screened 45 potato cultivars cultured in vitro for potato virus A,S,X,Y, and PLRV. Fifteen cultivars were identified to be infected with PVS, 3 cultivars with PLRV, 2 cultivars with PVX, and 1 cultivars with PVY.

2) PSTV was obtained from ATCC PV#86, mechanically transmitted to viroid-free potato plant(cv.Superior) cultured in vitro and maintained by subculturing every 3 weeks.

3) Purified virus particles extracted from PVS and PLRV-infected potato tissues were examined with electron microscope.

4) The new RNA-polymerase chain reaction(PCR) method, more sensitive than ELISA technique, was developed for the potato virus(PVS and PLRV) and viroid(PSTV) detection. These results clearly demonstrate that RNA-PCR method can be easily developed for detecting other potato virus (PVA,PVX, and PVY) and any other plant virus or viroid.

CONTENTS

| | | |
|--------------|-------------------------------|----|
| Chapter I. | Introduction----- | 6 |
| Chapter II. | Materials and Methods ----- | 8 |
| Chapter III. | Results and discussions ----- | 11 |
| Chapter IV. | Conclusions ----- | 19 |
| Chapter V. | References ----- | 20 |

목 차

| | |
|---------------|----|
| 제 1 장 서 론 | 6 |
| 제 2 장 재료 및 방법 | 8 |
| 제 3 장 결과 및 고찰 | 11 |
| 제 4 장 결 론 | 19 |
| 제 5 장 인용문헌 | 20 |

제 1 장 서 론

여러 식물 바이러스에 의한 농작물의 피해는 현재 전세계적으로 심각한 문제로 대두되고 있는데 이는 바이러스에 감염되면 아직 확실한 치유방법이 없고 계속적으로 바이러스가 없는 무병우량한 식물체를 증식, 해마다 새로이 보급해야 하기 때문이다. 감자와 같은 영양번식작물과 화훼류의 경우 그 피해는 더욱 심각한 실정이므로 식물바이러스의 정확한 진단은 그만큼 중요하며 실제 선진 각국에서는 씨감자의 자국내 또는 국외로의 거래시 바이러스 감염유무의 진단확인이 필수적이다. 현재 진단법으로는 전세계적으로 ELISA방법을 많이 사용하고 있으나 기술 자체가 정확한 판별이 불가능하기때문에 여러방법을 중복하여 진단하고 있으며 virus의 정확한 진단법 개발에 많은 투자를 하고 있다. 한편 선진 각국에서는 막대한 예산과 정부인력을 들여 자국내로 들어오는 농산물 종자에 대한 검역체계를 엄격하게 통제 하고있는 추세이다. 그러나 국내의 식물 virus의 진단 수준은 극히 낮은 단계에 있기에 농작물 종자 수입개방에 앞서 문제가 심각히 부각되고 있다.

특히 영양번식작물인 감자에서 감자바이러스 X, Y, S, A, LR와 potato spindle tuber viroid등의 감염은 수확량에 치명적인 영향을 미치기 때문에 각국에서는 씨감자의 생산과 수출입시 이들을 필수적인 검사사항들로 정하고 엄격히 통제하고 있다. 오래전부터 이들의 검진방법들이 개발되어져왔는데 고가의 기기장비인 전자현미경으로 바이러스입자를 관찰하는 고전적인 방법과 감자바이러스 X, Y, S, A, LR의 경우에는 이들의 coat protein에 대한 면역항체반응을 이용한 ELISA방법이 개발되어 상품화하여 시판되고 있다(Clark et al, 1977). 그러나 가격이 비싸고 번거롭고 검진이 확실하지 못한 단점들을 갖고 있다. 또한 potato spindle tuber viroid의 경우에는 viroid이기에 ELISA방법으로는 검진

이 불가능하고 RNA전기영동법(Morris et al, 1975,1977)이나 방사성동위원소 probe를 사용한 nucleic acid spot hybridization방법(Salazar et al,1988)이 있으나 정확하지 못하고 복잡하고 시간이 많이 걸리며 위험성이 내재되어 있는 여러 단점들을 갖고 있다. 최근 유전자를 증폭시킬수 있는 PCR방법이 개발되어 여러분야에서 응용이 되고 있으며 특히 식물의 특정 유전자를 잎이나 뿌리의 절편으로부터 직접 증폭시켜 확인을 할 수 있게 되었다(1991,Berthomieu). 또한 식물 DNA virus의 경우 PCR 방법이 ELISA방법 보다 정확하게 virus 감염여부를 진단할 수 있음이 보고되고 있다(Takahashi et al.,1993, Chen et al.,1993).

본 연구에서는 감자 바이러스의 진단시 기존의 전자현미경과 ELISA방법 이외에 RNA PCR방법에 의한 새로운 검진방법에 의해 최근 심각히 문제가 되고 있는 감자 바이러스 S, LR의 감염여부의 확정진단법을 개발하고자 하였다. RNA PCR방법에 의한 진단은 특이한 바이러스유전자에 해당하는 primer를 합성하여 감자의 잎이나 뿌리의 절편에서 바이러스의 특정한 유전자만을 RNA PCR방법으로 대량 증폭시켜 바이러스 감염여부를 정확히 검진하고자 하였다. 또한 potato spindle tuber viroid의 경우에도 시료내의 viroid를 우선 reverse transcriptase를 사용하여 DNA를 우선 합성하고 이 후에 바이러스와 동일한 PCR 방법으로 이를 검진하고자 하였다.

따라서 본 연구에서는 ELISA, EM, PCR기법을 이용한 감자에 있어서 문제가 되고 있는 PLRV, PVS등의 감자 RNA virus와 viroid인 PSTV의 확정진단법을 개발하여 국내 농산물종자의 수출에 기여를 하고 또한 이를 응용하여 타작물의 virus 진단시에도 실제로 이용할 수 있는 틀을 마련하고자하였다. 그리고 궁극적으로 외국 농작물 종자 수입 개방에 따른 국내 검역체계를 확고히 하여 우리나라 농산물 산업에 이바지하고자 시작한 지난 1년간의 실험 결과를 본 보고서에 기술하였다.

제 2 장 재 료 및 방 법

가. 실험 재료

실험의 공시재료로는 본 실험실에서 수집하여 MS(Murashige and Skoog, 1963)배지를 기본배지로 Joung의 방법 (1989) 에 의해 기내배양하고 있는 45종류의 상업적으로 유명한 감자품종을 사용하였다. 이들 감자조직으로부터 일차적으로 ELISA방법으로 PVS, PVX, PLRV, PVA, PVY등의 감염여부를 진단하여 PVS, PVX, PLRV등의 감염을 확인하였고 이를 바이러스 감염된 실험재료로 사용하였다. PSTV는 ATCC(PV #86)로부터 구입하여 viroid-free한 기내배양중인 수미식물체에 감염시켰다. 이내지 삼주 기내배양된 감자의 잎을 사용하여 Raymer and O'Brien 등(1962)의 방법에 의해 0.05M glycine, 0.3 M K_2HPO_4 , pH 9.2의 inoculation buffer 2 ml에 PSTV를 녹이고 솜과 Celite 200mg에 묻혀서 잎에 살짝 문지르는 방법으로 감염시켜 2주일후에 이를 확인하였다.

나. ELISA방법에 의한 진단

독일의 Boehringer Mannheim Chemica사로부터 Potato Virus S, X, A, Y, PLRV combination kit 를 구입하여 본 실험의 ELISA 테스트를 위해 사용하였으며 분석방법도 이 kit의 사용방법을 따랐다. 본 실험에서는 조직과 sample buffer의 혼합비를 1 : 6 (w/v) 으로 하여 막자사발로 마쇄한 다음 바이러스분석을 위한 sample용액으로 사용하였다.

다. 전자현미경에 의한 진단

바이러스의 감염이 확인된 식물체로부터 Tavantzis(1983)의 방법을 변형하여

virus를 순수 분리하였다. 감염된 조직 2 g에 extraction buffer(0.1% sodium sulfite를 함유한 0.165M disodium phosphate, 0.018M trisodium citrate buffer, pH 9) 8 ml을 넣고 마쇄한 후 거즈로 여과하여 10000rpm에서 10분동안 원심분리하고 그 상등액을 취하여 1/10부피의 0.2 M Na_2HPO_4 와 1/100부피의 1.0 M CaCl_2 를 첨가하고 15분간 흔든 후 다시 10000rpm에서 10분간 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 그 후 PEG 6000 을 6%(w/v)로 가하고 2.5 hr동안 흔들어 바이러스 입자를 15000rpm에서 25분 원심분리하여 침전시켰다. 이를 기본시료로 하여 Philips model CM20 전자현미경(TEM)으로 바이러스 입자를 관찰하였다.

라. PCR 방법에 의한 진단

Primer design : Potato leafroll Virus (Kawchuk et al, 1989) 의 경우에는 coat protein gene에 해당하는 염기서열중 일부를 선택하여 466 bp의 PCR 산물을 증폭시키도록 하였는데 sense primer로는 5'-AGGAAATGTCAATGGTGGTG-3'로 그리고 antisense primer로는 5'-TGATAAGTTTTGGCGCCGCC-3'를 한국생공에 의뢰하여 합성하였다. Potato virus S(Mackenzie et al, 1989)의 경우에는 500 bp의 PCR product가 생성이 되게 sense primer로 5'-ATGTATGCGCAACCAGAAGG-3', antisense primer로 5'-ATTCCAAACGACCGGAGCAT-3'을 합성하여 사용하였다.

PSTV(Herold et al, 1992)의 경우에는 총 359 bp의 PSTV 염기중 356 bp를 증폭하도록 conserved sequence부위에서 sense primer 5'-TGTGGTTCACACCTGACCTC-3'과 antisense primer 로 5'-ACCCAGAGTTTAGTTCGGAG-3'를 합성하여 사용하였다.

Virus RNA 분리 : 바이러스의 감염이 확인된 식물체로부터 Tavantzis(1983)의 방법을 변형하여 virus를 우선 분리한 후에 SDS-phosphate disruption buffer를 사용하여 바이러스 입자를 부수고 phenol처리를 한 후에 ethanol처리를 하여 바이러스 RNA를 분리하였다.

PSTV RNA 분리 : PSTV RNA는 감염된 감자식물체의 tip 조직 1 g을 사용하여

Morris(1977)등의 방법에 따라 0.5 ml의 extraction buffer(0.2M glycine, 0.1M Na₂HP0₄, 0.6M NaCl, 1.0% sodium lauryl sulfate adjusted to pH 9.5 with 5M NaOH)과 한 방울의 mercaptoethanol, 2ml 의 water saturated phenol containing 0.1% 8-hydroxyquinoline 과 2 ml 의 chloroform - pentanol (25:1, v/v)을 넣고 마쇄한 후에 10,000 rpm 에서 15 min동안 4⁰C에서 원심분리하여 수용액층에 1/5 v 의 10M LiCl을 첨가하여 ice에 2 hrs동안 방치한 후 10,000rpm 에서 15 min분간 원심분리하여 다시 phenol/chloroform 처리를 한 후 ethanol침전을 하여 RNA를 분리하였다.

RNA-PCR : RNA-PCR은 GeneAmp RNA PCR kit(Perkin Elmer Cetus사)을 사용하였는데 처음 cDNA synthesis는 mastermix 17 μ l와 template 2 μ l에 antisense primer 1 μ l를 넣고 75⁰C에서 5 분간 가열하고 42⁰C에서 30분간 반응하여 합성한 후 99⁰C에서 5 분 그리고 5⁰C에서 1 분간 냉각하였다. PCR 반응은 PCR mix에 sense primer 1 μ l를 넣고 RT reaction mixture 20 μ l를 넣어 95⁰C에서 2 분간 끓인 후 mineral oil을 넣고 첫 cycle은 94⁰C에서 5분 55⁰C에서 2 분, 72⁰C에서 3분을 하고 그 다음 35 cycle을 94⁰C에서 1분, 55⁰C에서 2분, 72⁰C에서 3분하였고 마지막 cycle은 94⁰C에서 1분, 55⁰C에서 2분, 72⁰C에서 10분의 일반적인 PCR반응을 행하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

본 실험실에서 기내배양중인 상업적으로 유명한 45종류의 감자품종의 감자조직으로부터 일차적으로 ELISA방법으로 PVS, PVX, PLRV, PVA, PVY등의 감염여부를 진단하였는데 45개 품종중 PVS가 가장 많아 15개 품종의 감염이 확인되었고 PVX의 경우에는 2개 품종, PLRV의 경우에는 3개의 품종에서 감염이 확인되었고 PVY의 경우에도 한 품종에서 감염이 확인되었다. 특히 PVX와 PLRV가 감염된 품종의 경우에는 PVS도 같이 걸려 있는 것으로 드러났는데 이는 실제 포장에서 수집한 품종들로서 2가지 이상의 virus가 심하게 같이 감염되어 있는 것을 알 수 있었다. 앞으로의 실험에서는 이들을 바이러스 감염된 대조구로서의 실험재료로 사용하였다. PSTV는 ATCC(PV# 86)로부터 구입하여 viroid-free한 기내배양중인 수미감자잎에 감염시켜 유지하였다.

감염된 감자의 잎으로부터 virus입자를 분리하여 전자현미경을 사용하여 PVS를 관찰한 결과 figure 1 에서와 같이 PVS가 감염된 조직으로부터는 전형적인 650 nm정도 크기의 filamentous한 PVS 입자를 관찰할 수 있었다.

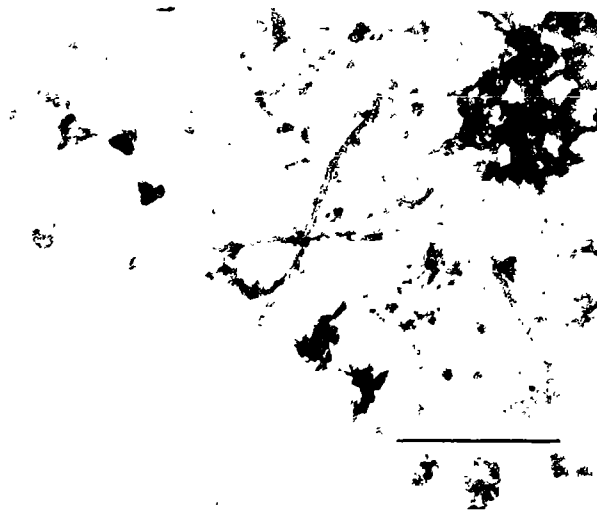


Figure 1. Electron micrograph of a purified PVS particles. Bar represents 250nm.

Potato virus S

PVS의 경우 ELISA test로 이미 감염이 확인된 품종중 Red pontiac을 실험재료로 사용하여 viral RNA를 위의 방법대로 분리하였다. PVS의 coat protein의 일부에 해당하는 500 bp의 PCR product의 band를 RNA-PCR을 하여 1.5% agarose gel electrophoresis에서 확인할 수 있었고 분리한 Red pontiac의 RNA를 희석하여 RNA-PCR을수행한 결과 10^{-3} 까지 희석하였을 때에도 band가 나타났다(Figure 2). 그러므로 처음 시료의 양을 1/10이상으로 줄여도 충분히 detection 가능하리라 생각된다.

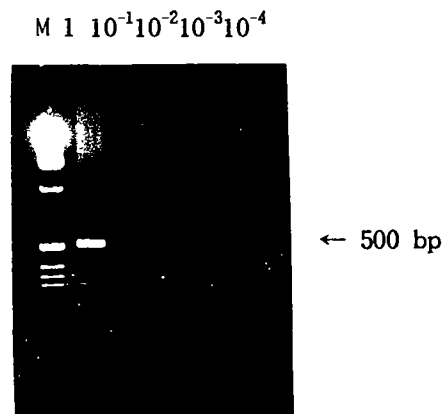


Figure 2. Sensitivity of RNA-polymerase chain reaction(PCR) for detection of potato virus S(PVS) RNA in PVS infected potato leaves. RNA was extracted from PVS infected tissues and 10-fold dilution for RNA-PCR. Lane M: 1kb ladder(BRL)

ELISA test로 1차적으로 PVS에 감염되었다고 판정한 경우에는 PCR 방법으로 진단시에 모두 양성으로 나타났으나 간혹 ELISA에서 결과가 음성(감염되지 않은)인데도 PCR에서는 양성으로 나타나는 경우가 있었다(Figure3). 이는 PCR의 false

positive band가 아닌가 생각되었으나 전자현미경으로 바이러스 입자를 관찰할 수 있었다. 또한 antiviral agent인 ribavirin 20 ppm을 계속적으로 처리했을 때 PVS가 줄어들지만 그러나 상당히 오랫동안 PVS가 잔존하였다.(Table 1). 이 경우는 ELISA test에서는 table 1.에서와 같이 virus가 없는 것으로 검진되지만 그 후 ribavirin을 제거시에는 다시 virus가 증식이 되어 virus가 있는 것으로 판명되는 경우가 있는데 이 때 PCR 방법으로 검진할 경우 figure 3 에서와 같이 virus가 있는 것으로 검진되므로 ELISA 방법보다 PCR 방법이 더욱 민감한 virus 진단법이라고 판단되어진다. 실제로 negative control의 경우 OD₄₀₅의 값이 0.165 인데 실험오차의 범위를 고려할 때 0.1 ~ 0.3의 OD값을 가지는 시료의 경우 virus의 감염여부 판정은 ELISA방법으로는 할 수 없는 애매한 경우에 해당된다. 이는 Takahashi(1993)등이 보고한 PCR 방법에 의한 rice tungro bacilliform virus DNA의 검진방법이 ELISA 방법보다 10³ - 10⁴ 배 민감하다는 결과를 생각했을 때 ELISA방법에 의해 판정이 애매한 부분도 PCR방법에 의해 정확히 virus 감염여부를 가릴 수 있으리라 예상된다.

Table 1. Effect of ribavirin on the eradication of S virus during *in vitro* shoot-tip culture of 4 potato cultivars.

| Cultivar | Ribavirin treatments (subculture cycles) | | | | |
|-------------|--|------|------|------|------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| | (OD ₄₀₅) | | | | |
| Norchip | 1.42 | 0.49 | 0.22 | 0.02 | 0.01 |
| Red Pontiac | 0.91 | 0.35 | 0.32 | 0.30 | 0.26 |
| Shepody | 1.20 | 0.26 | 0.84 | 0.17 | 0.22 |
| GERI 6 | 1.02 | 0.28 | 0.24 | 0.05 | 0.25 |

(Boehringer Mannheim Co.) Optical density of negative control was 0.161 at 405 nm.

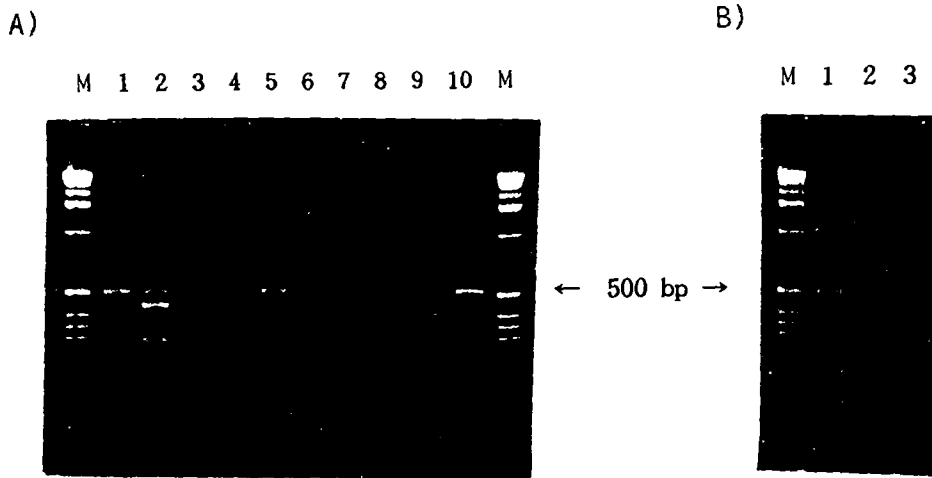


Figure 3. Detection of potato virus S RNA in nucleic acids extracted from A) 3 ELISA positive samples(1,2,10) and 7 ELISA negative samples and B) lane 1: Norchip(ELISA positive), lane 2 : ribavirin treated Norchip(ELISA negative), lane 3 : ELISA negative sample, M : 1 kb ladder.

Potato leafroll virus

.. Potato leafroll virus(PLRV)의 경우에는 45개 품종중 ELISA로 검진한 결과 3 개의 품종에서 PLRV positive 결과가 나왔는데 이들로부터 PVS와 마찬가지로 방법으로 PLRV의 coat protein유전자의 일부(466 bp)를 증폭시키도록 고안된 primer를 사용하여 RNA-PCR을 수행하였다. 이를 1.5% agarose gel상에서 전기영동하여 확인할 수 있었고 감염이 확인된 품종으로부터 분리한 RNA를 희석하여 RNA-PCR을 수행한 결과 10^{-6} 까지 희석하였을 때에도 band가 나타났다(Figure 4). 그러므로 PVS에서보다 더욱 민감하게 PLRV를 검진 가능하리라 예상되며 처음 시료의 양을 충분히 줄여도 정확한 PLRV의 detection이 가능하리라 생각된다.

M 1 10⁻¹ 10⁻² 10⁻³ 10⁻⁴ 10⁻⁵ 10⁻⁶ 10⁻⁷ 0 M

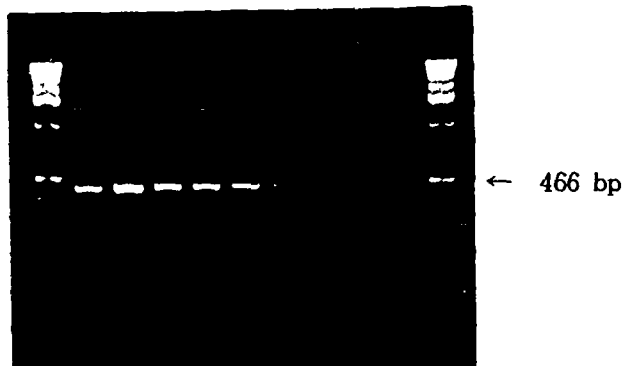


Figure 4. Sensitivity of RNA-polymerase chain reaction(PCR) for detection of potato leafroll virus (PLRV) RNA in PLRV infected potato leaves. RNA was extracted from PLRV infected tissues and 10-fold dilution for RNA-PCR. Lane M: 1kb ladder(BRL)

ELISA test로 1차적으로 PLRV에 감염되었다고 판정한 45개 품종중 3 품종의 경우에는 PCR 방법으로 진단시에도 모두 양성으로 나타났다. 그리고 ELISA에서 음성이거나 PVX나 PVY에 감염된 경우에는 PCR에서도 나타나지 않아 PLRV의 모든 경우에서 ELISA의 결과와 일치하였다(Figure 5). 또한 PCR에서 positive band가 나온 시료의 경우에는 전자현미경으로도 바이러스 입자를 관찰할 수 있었다. 그러므로 PLRV의 검진시에 PCR방법만으로도 충분히 PLRV의 감염 여부를 정확히 진단할 수 있게 되었다.

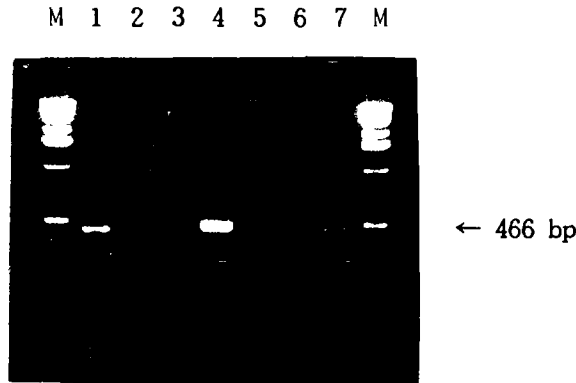


Figure 5. Detection of potato leafroll virus RNA in nucleic acids extracted from three ELISA positive samples(lane 1,4,7), PVX(lane 2) , PVY (lane 3)infected samples, and ELISA negative samples(lane 5,6). M : 1 kb ladder.

Potato spindle tuber viroid

PSTV의 진단은 PSTV가 coat protein이 없는 RNA viroid이기에 ELISA방법으로는 진단할 수 없고 방사선동위원소를 사용하여 복잡하게 검진을 하거나 대량 분리하여 전기영동하여 gel상에서 판별해야 하기에 PCR 진단법과 같이 간단히 진단할 수 있는 방법의 개발이 더욱 절실히 요구된다. 본 실험에서는 먼저 PSTV를 인위적으로 수미품종의 감자잎에 감염시켰고 PSTV가 RNA virod이기에 위의 제 2장의 방법에서와 같이 PSTV를 분리한 후에는 PVS나 PLRV과 같은 방식으로 RNA-PCR을 수행하여 이를 확인하고자 하였다.

인위적으로 접촉감염시킨 후 3주후에 PSTV를 분리하여 RNA-PCR을 수행하였는데

그 결과 figure 6A에서와 같이 원하는 356 bp 위치에 band가 나왔다. 증폭된 band가 PSTV cDNA인지를 확인하기 위하여 이 band의 DNA를 low melting agarose gel상에서 분리하여 Stratagene사의 PCR-script cloning vector에 cloning 하여 figure 6B에서와 같이 내부의 BamHI site를 이용한 BamHI 처리로 서로 다른 방향으로 들어간 두 colony를 분리하였다. 이를 Pharmacia사의 T₇ Sequencing kit를 사용하여 sequencing한 결과 figure 7에서와 같이 PSTV의 DNA임이 확인되었다. 이로써 RNA-PCR방법에 의해 PSTV의 경우에도 효과적으로 detect할 수 있음이 밝혀졌다. 그러므로 앞으로 PSTV를 간편하게 분리하는 방법을 사용하고 RNA-PCR반응조건을 보다 간단하고 효율적으로 한다면 상업적으로 이용가능한 방법으로 개발할 수 있을 것이다.

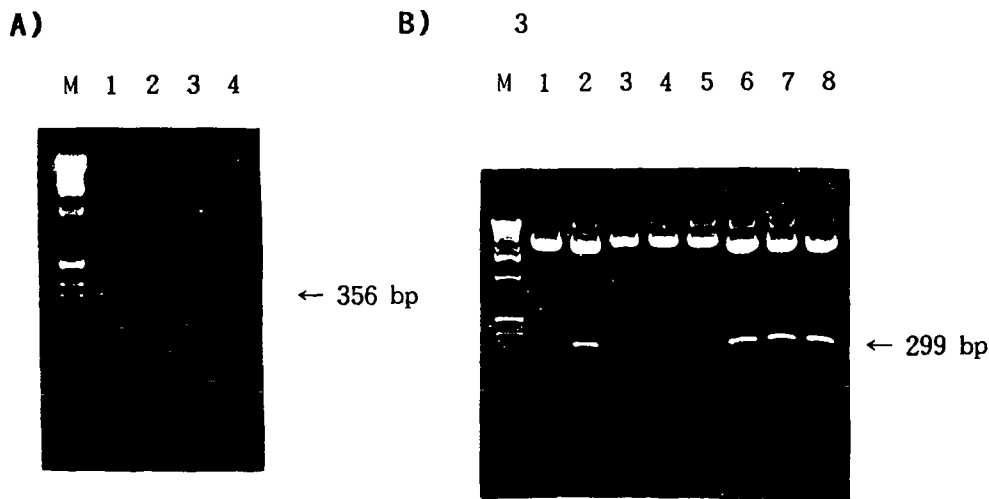


Figure 6. A) Detection of potato spindle tuber viroid(PSTV) RNA in nucleic acids extracted from PSTV infected potato cv.Superior tissue(lane 1), negative control(lane 2) , not infected potato cv Superior tissue(lane 3),and negative control potato cv. Superior tissue(lane 4). M : 1 kb ladder. B) Agarose gel electrophoresis analysis of BamHI digested DNAs for the identification of DNA insertion into vector in the transformed colonies (lane 1,3,4,5)sense oriented and (lane 2,6,7,8) antisense oriented.

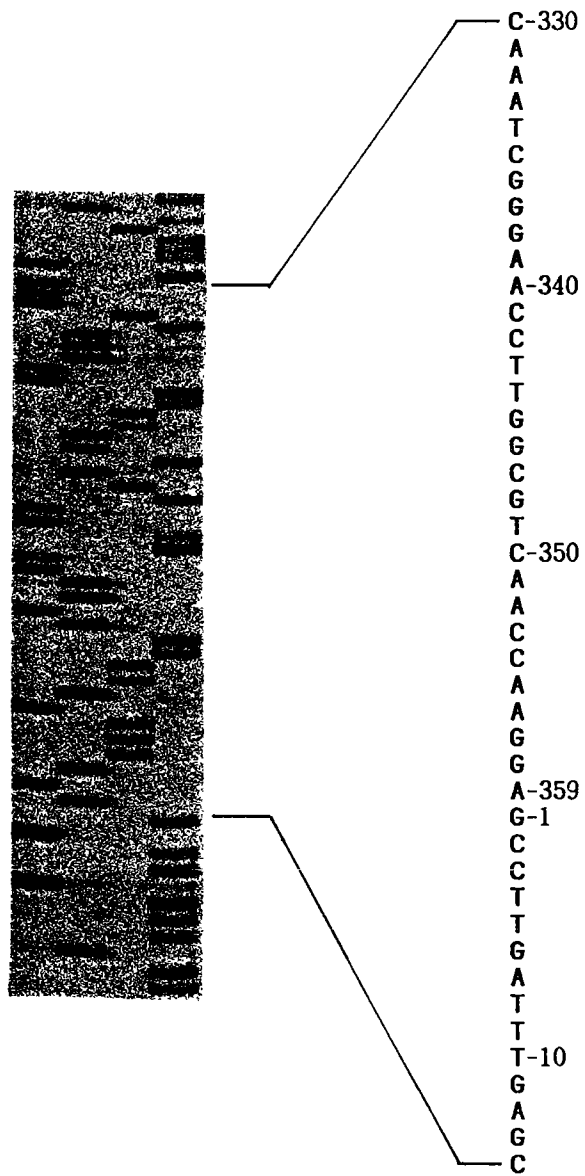


Figure 7. The results of dideoxy sequencing of PSTV cDNA in PCR-Script vector of PCR products amplified from PSTV infected potato.

제 4 장 결 론

ELISA, EM, PCR 기법을 이용한 식물 바이러스의 확정진단법개발의 연구를 진행한 결과는 다음과 같다.

1) ELISA방법으로 기내배양중인 45개 감자품종을 사용하여 PVS, PVX, PLRV, PVA, PVY등의 감염여부를 진단하였다. 그 중 PVS가 15개, PVX는 2개, PVY는 1개, PLRV의 경우에는 3개의 품종에서 감염이 확인되었고 이들을 이용하여 이 후의 전자현미경과 PCR실험의 실험재료로 사용하였다.

2) PSTV viroid는 ATCC(PV #86)에서 분양하여 배양중인 수미 품종의 감자줄기에 감염시켜 유지하였다.

3) PVS와 PLRV가 감염된 품종으로부터 virus를 추출하여 이를 전자현미경으로 관찰하였다.

4) PLRV와 PVS 및 PSTV의 알려진 염기서열로부터 적절한 primer를 설계한 후에 virus의 RNA를 cDNA로 만들고 이를 증폭시켜 virus를 진단하는 RNA-PCR방법을 개발하였는데 이는 기존의 ELISA 방법보다 정확하게 감자 virus를 진단할 수 있었다. 위와 같은 방법으로 연구한다면 PVM, PVA, PVY 같은 감자의 virus와 다른 식물의 여러 virus들도 쉽게 진단 가능하게 될 것이다.

결론적으로, 현재 널리 사용되고 있으나 부정확한 ELISA방법과 함께 민감도에 서 뛰어나고 그리고 EM, ELISA로 검진 불가능한 viroid의 경우에도 가능한 RNA-PCR 기법을 서로 비교 사용하여 확정적으로 식물 바이러스의 진단이 가능하게 되었다.

제 5 장 인 용 문 헌

Chen KH, Guo JR, Wu XY, Loi N, Carraro L, Guo YH, Chen YD, Osler R, Pearson R, Chen TA 1993 Comparison of monoclonal antibodies, DNA probes, and PCR for the detection of the grapevine yellows disease agent. *Phytopathology* 83 : 915 - 922

Clark MF, Adams AN 1977 Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J gen virol* 34 : 475 - 483

Diener TO, Raymer WB 1969 Potato spindle tuber virus: A plant virus with properties of a free nucleic acid. II. Characterization and partial purification. *Virology* 37 : 351 - 366

Diener TO 1971 Potato spindle tuber "virus", IV. A replicating low molecular weight RNA. *Virology* 45 : 411 - 482

Horold T, Haas B, Singh RP, Boucher A, Sanger HL 1992 Sequence analysis of five new isolates demonstrates that the chain length of potato spindle tuber viroid(PSTVd) is not strictly conserved but as variable in other viroids. *Plant Mol Biol* 19 : 329 - 333

Joung H 1989. Mass production of potato microtuber by tissue culture technique and its application. In: '89 Agricultural biotechnology symposium, Seoul National Univ., 100-124 pp.

Kawchuk LM, Martin RR, Rochon DM, Mcpherson J 1989 Identification and characterization of the Potato leafroll virus putative coat protein gene. *J Gen Virol* 70 : 783 - 788

Mackenzie DJ, Tremaine JH, Stace-Smith R 1989 Organization and Interviral homologies of the 3'-terminal portion of potato virus S RNA. *J Gen Virol* 70 : 1053 - 1063

Morris TJ , Smith EM 1977 Potato spindle tuber disease: Procedures for the detection of viroid RNA and certification of disease free potato tubers. *Phytopathology* 67 : 145 - 150

Morris TJ, Wright NS 1975 Detection on polyacrylamide gel of a diagnostic nucleic acid from tissue infected with potato spindle tuber viroid. *Am Potato J* 52 : 57 - 63

Murashige T, Skoog F 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15 : 473 - 497

Raymer WB, O'Brien MJ 1962 Transmission of potato spindle tuber virus to tomato. *Am Potato J* 39 : 401 - 408

Salazar LF, Balbo I, Owens RA 1988 Comparison of four radioactive probes for the diagnosis of potato spindle tuber viroid by nucleic acid spot hybridization. *Potato Research* 31 : 431 - 442

Semancik JS, Weathers LG 1972 Exocortis disease : evidence for a

new species of 'infectious' low molecular weight RNA in plants. *Nat New Biol* 237 : 242 - 244

Takahashi Y, Tiongco ER, Cabauatan PQ, Kognanezawa H, Hibino H, Omura T
1993 Detection of rice tungro Bacilliform virus by polymerase chain reaction for assessing mild infection of plants and viruliferous vector leafhoppers *Phytopathology* 83 : 655 - 659

Tavantzis SM 1983 Improved purification of Potato Carlaviruses. *Phytopathology* 73 : 190 - 194